

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelena R. Mitrović

**PREKLINIČKA ISPITIVANJA DISPERZIJA
NANOKRISTALA I LIPIDNIH NANOČESTICA
DEUTERISANIH PIRAZOLOHINOLINONSKIH
LIGANADA – FIZIČKOHEMIJSKI I BIOLOŠKI
ASPEKTI**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Jelena R. Mitrović

**PREKLINIČKA ISPITIVANJA DISPERZIJA
NANOKRISTALA I LIPIDNIH NANOČESTICA
DEUTERISANIH PIRAZOLOHINOLINONSKIH
LIGANADA – FIZIČKOHEMIJSKI I BIOLOŠKI
ASPEKTI**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Jelena R. Mitrović

**PRECLINICAL INVESTIGATIONS OF
NANOCRYSTAL DISPERSIONS AND LIPID
NANOPARTICLES OF DEUTERATED
PYRAZOLOQUINOLINONE LIGANDS –
PHYCOCHEMICAL AND BIOLOGICAL
ASPECTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta; deo eksperimentalnog rada urađen je na Katedri za farmakologiju i Katedri za farmaceutsku hemiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard-Karls Univerziteta u Tübingenu, Nemačka i na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, Slovenija.

MENTOR

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

ČLANOVI KOMISIJE

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

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

3. _____
Dr Miloš Petković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

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

5. _____
Dr Sanela Savić, naučni saradnik
DCP Hemigal, Leskovac

Datum odbrane _____

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se mentoru, prof. dr Snežani Savić na ogromnoj podršci, usmeravanju i savetima koji su veoma često prevazilazili eksperimentalni rad. Prof. Dr Miroslavu Saviću se zahvaljujem na bezbrojnim pitanjima koji su me usmeravali ka cilju i dubljem proučavanju problema. Veliko hvala članovima komisije za pomoć prilikom eksperimentalnog rada i pisanja doktorske disertacije.

Svojoj porodici dugujem zahvalnost što su me bodrili tokom eksperimenata i pisanja doktorske disertacije i davali vetar u leđa. Sestrama se zahvaljujem što su imale strpljenja i podsticale da svoje ideje sprovedem u delo. Posebno sam zahvalna prijateljima koji su, svako na svoj način, bili tu uz mene i davali snagu da istrajem u svojim zamislima. Konačno, zahvaljujem se svim članovima Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju i Katedre za farmakologiju na lepo provedenom vremenu u laboratoriji i diskusijama oko eksperimenata i rezultata.

Preklinička ispitivanja disperzija nanokristala i lipidnih nanočestica deuterisanih pirazolohinolinonskih liganada – fizičko-hemijski i biološki aspekti

SAŽETAK

Trenutni trendovi u otkriću novih potencijalnih kandidata za lek doveli su do sinteze supstanci sa niskom rastvorljivošću, što uglavnom vodi ka niskoj bioraspoloživosti nakon primene i time može zaustaviti njihov dalji razvoj. Iz tog razloga, uključivanje savremenih pristupa formulaciji već u ranoj fazi razvoja leka može omogućiti prevazilaženje nepovoljnih fizičko-hemijskih osobina nosivih supstanci i sprovođenje farmakoloških i toksikoloških prekliničkih studija. Deuterisani pirazolohinolinoni predstavljaju nove, patentno zaštićene ligande za GABA_A receptore koje odlikuje visoka selektivnost, efikasnost i metabolička stabilnost, ali i niska rastvorljivost u vodi, uljima i mnogim organskim rastvaračima.

Stoga je osnovni cilj ove doktorske disertacije bio razvoj nanočestičnih formulacija dva pirazolohinolinonska liganada, DK-I-56-1 (7-metoksi-2-(4-metoksi-d₃-fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on) i DK-I-60-3 (7-metoksi-d₃-2-(4-metoksid₃-fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on), kao i procena mogućnosti primene razvijenih formulacija u prekliničkim ispitivanjima navedenih supstanci. Izbor formulacionih strategija za prevazilaženje slabe rastvorljivosti bio je vođen fizičko-hemijskim karakteristikama liganada uzimajući u obzir planiran put primene. Razvijena su dva tipa formulacija: nanokristali i lipidne nanočestice. Njihova sveobuhvatna karakterizacija uključila je procenu kritičnih fizičko-hemijskih osobina značajnih za stabilnost tokom čuvanja i nakon primene, kao i procenu njihovog ponašanja nakon oralne i parenteralne primene u kontekstu sprovođenja farmakokinetičkih i farmakodinamskih studija. Dok se kao osnovna prednost nanokristalnih formulacija izdvojio jednostavan sastav i niska koncentracija stabilizatora, lipidne nanočestice kompleksnije strukture obezbeđuju dodatno povećanje oralne bioraspoloživosti zahvaljujući lecitinu i polisorbatu 80 kao stabilizatorima. Dodatno, liofilizacijom uspešno je povećana stabilnost nanokristalnih disperzija i načinjen prvi korak ka prevazilaženju osnovnog nedostatka ovih sistema.

Pokazano je da odabrane formulacije mogu doprineti ispitivanju pirazolohinolinonskih liganada kroz omogućavanje njihove primene u sastavu biokompatibilnih formulacija koje dovode do povećanja biološke raspoloživosti, ali i zadržavanja osnovnih osobina liganada tokom distribucije kroz organizam, kao i obezbeđenja praćenja farmakoloških efekata bez uticaja ekscipijenasa tradicionalno korišćenih za rastvaranje slabo rastvornih kandidata za lekove tokom njihovog prekliničkog istraživanja.

Ključne reči: nanokristali, lipidne nanočestice, liofilizacija, niska rastvorljivost, pirazolohinolinoni, parenteralna primena, oralna primena, nuklearna magnetna rezonanca, farmakokinetika, test spontane lokomotorne aktivnosti.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

Preclinical investigations of nanocrystal dispersions and lipid nanoparticles of deuterated pyrazoloquinolinone ligands – physicochemical and biological aspects

ABSTRACT

Recent trends in the discovery of new potential drug candidates have led to the synthesis of substances with low solubility which usually leads to the low bioavailability after administration. This often results in the discontinuation of the drug development. Because of that, the usage of advanced formulation approaches already in early stages of drug development could help to overcome the unfavorable physicochemical properties of new chemical entities and enable pharmacological and toxicological preclinical studies. Deuterated pyrazoloquinolinones represent the new, patent protected ligands for GABA_A receptors, with high selectivity, efficacy and metabolic stability but very low solubility in water, oils and many organic solvents.

Therefore, the main aim of this doctoral thesis was the development of nanoparticle formulations of two pyrazoloquinolinone ligands, DK-I-56-1 (7-Methoxy-2-(4-methoxy-d₃-phenyl)-2,5-dihydro-3H-pyrazolo[4,3-c]quinolin-3-one) and DK-I-60-3 (7-Methoxy-d₃-2-(4-methoxy-d₃-phenyl)-2,5-dihydro-3H-pyrazolo[4,3-c]quinolin-3-one), as well as the estimation of the application of developed formulations in preclinical studies of the mentioned substances. The selection of formulation strategies to overcome the low solubility was guided by the physicochemical properties of the mentioned substances taking into account the intended administration routes. Two types of formulations were developed: nanocrystals and lipid nanoparticles. Their comprehensive characterization included the assessment of the physicochemical properties significant for the stability during storage and after administration as well as the analysis of their behavior after oral and parenteral administration in context of the prospective pharmacokinetic and pharmacodynamic studies. While the main advantage of nanocrystals was the simple composition and low concentration of stabilizers, lipid nanoparticles with more complex structure provided the additional increase of bioavailability thanks to lecithin and polysorbate 80 as stabilizers. In addition, the stability of nanocrystal dispersion during storage was successfully enhanced by lyophilization and in that way the first step to overcome the main disadvantage of these systems was made.

It was shown that the selected formulations could contribute to the investigation of pyrazoloquinolinone ligands through their delivery within the biocompatible formulations which enable bioavailability enhancement, at the same time keeping the basic characteristics of ligands during distribution in the body as well as providing pharmacological effects monitoring without the effects of excipients traditionally used to dissolve low solubility drug candidates during their preclinical studies.

Keywords: nanocrystals, lipid nanoparticles, lyophilization, poor solubility, pyrazoloquinolinones, parenteral administration, oral administration, nuclear magnetic resonance, pharmacokinetics, spontaneous locomotor activity assay.

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical Technology

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Razvoj derivata pirazolohinolinona.....	1
1.2. Izazovi u otkriću i razvoju lekova	2
1.2.1. Formulacioni pristupi prevazilaženju slabe rastvorljivosti.....	3
1.2.2. Primena nanotehnologije u formulaciji lekova.....	5
1.3. Nanokristalne disperzije	5
1.3.1. Definicija, značaj i osnovne fizičko-hemijske karakteristike nanokristalnih disperzija	5
1.3.2. Stabilizacija nanokristala.....	7
1.3.3. Postupci dobijanja nanokristala	8
1.3.4. Liofilizacija nanokristalnih disperzija	10
1.3.5. Farmakokinetički aspekti primene nanokristalnih disperzija	15
1.3.6. Nanokristalne disperzije na tržištu.....	16
1.4. Lipidne nanočestice	19
1.4.1. Definicija, vrste i struktura lipidnih nanočestica	19
1.4.2. Formulacija lipidnih nanočestica.....	20
1.4.3. Metode izrade lipidnih nanočestica	22
1.4.4. Farmakokinetički aspekti primene lipidnih nanočestica.....	22
1.4.5. Pregled registrovanih lekova koji sadrže lipidne nanočestice	24
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	25
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	27
3.1. Materijal	27
3.2. Metode.....	27
3.2.1. Saturaciona rastvorljivost DK-I-56-1 i DK-I-60-3 u odabranim rastvaračima.....	27
3.2.2. Izrada disperzija nanokristala	27
3.2.3. Liofilizacija.....	28
3.2.4. Izrada disperzija lipidnih nanočestica.....	28
3.2.5. Analiza veličine čestica	29
3.2.6. Zeta potencijal	30
3.2.7. Merenje pH vrednosti i električne provodljivosti.....	30
3.2.8. Efikasnost inkapsulacije	30
3.2.9. Termalne analize diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom.....	30
3.2.10. Difrakcija X-zraka na uzorku supstance u obliku praška	31
3.2.11. Mikroskopske metode.....	32
3.2.12. Ispitivanje brzine rastvaranja nanokristala	33
3.2.13. Određivanje rastvorljivosti nanokristala.....	33

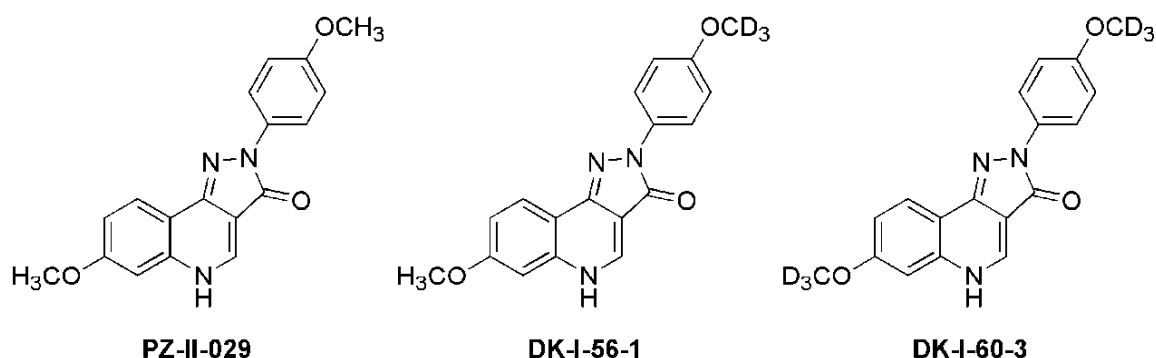
3.2.14. Ispitivanje stabilnosti razvijenih formulacija.....	33
3.2.15. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom	34
3.2.16. Strukturna analiza lipidnih nanočestica nuklearnom magnetnom rezonancom.....	34
3.2.17. In vivo farmakokinetičke studije razvijenih nanoformulacija	35
3.2.18. In vivo farmakodinamska studija sa nanokristalnom disperzijom DK-I-56-1.....	37
3.2.19. Analitička metoda.....	37
3.2.20. Statistička analiza	37
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	38
4.1. Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada	38
4.1.1. Mikroskopska analiza i određivanje veličine čestica.....	38
4.1.2. Difrakcija X-zraka na uzorku praška.....	38
4.1.3. Studije rastvorljivosti.....	39
4.1.4. Termalna analiza supstanci.....	40
4.1.5. Analiza lipidnih smeša i mogućnosti uključivanja DK-supstanci	41
4.2. Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada	46
4.2.1. Izrada nanokristalnih disperzija.....	46
4.2.1.1. Ispitivanje uticaja procesnih i formulacionih parametara na veličinu čestica nanokristala DK-I-60-3 namenjenih za oralnu primenu	46
4.2.1.2. Ispitivanje uticaja procesnih i formulacionih parametara na veličinu čestica nanokristala DK-I-56-1 namenjenih za parenteralnu primenu	49
4.2.2. Morfologija nanokristala mikroskopijom atomskih sila (AFM).....	52
4.2.3. Analiza čvrstog stanja nanokristala diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) i difrakcijom X-zraka na uzorku supstance u obliku praška (XRPD)	54
4.2.4. Ispitivanje brzine rastvaranja.....	57
4.2.5. Ispitivanje stabilnosti nanokristala DK-I-60-3 u fosfatnom puferu.....	60
4.2.6. Ispitivanje rastvorljivosti nanokristala.....	61
4.2.7. Ispitivanje stabilnosti nanokristala DK-I-56-1 u prisustvu proteina.....	62
4.2.8. Liofilizacija nanokristalnih disperzija DK-I-56-1	63
4.3. Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada.....	78
4.3.1. Fizičko-hemijska karakterizacija lipidnih nanočestica	78
4.3.2. Stabilnost u odabranim puferima.....	79
4.3.3. Ispitivanje morfologije lipidnih nanočestica mikroskopijom atomskih sila.....	80
4.3.4. Strukturna analiza lipidnih nanočestica	81
4.4. Rezultati i diskusija četvrte faze eksperimentalnog rada.....	86
4.4.1. Neurofarmakokinetička studija i studija biodistribucije nanokristalnih disperzija DK-I-60-3.....	86
4.4.2. Neurofarmakokinetička studija lipidnih nanočestica DK-I-60-3.....	88
4.4.3. Studija biološke raspoloživosti nanokristalne disperzije i lipidnih nanočestica DK-I-60-3.....	90
4.4.4. Neurofarmakokinetička studija i studija biodistribucije nanokristalnih disperzija DK-I-56-1.....	91

4.4.5. Farmakodinamska studija sa nanokristalnom disperzijom DK-I-56-1	93
5. ZAKLJUČAK.....	96
5.1. Zaključak prve faze eksperimentalnog rada	96
5.2. Zaključak druge faze eksperimentalnog rada	97
5.3. Zaključak treće faze eksperimentalnog rada.....	99
5.4. Zaključak četvrte faze eksperimentalnog rada	100
5.5. Opšti zaključak	102
6. LITERATURA.....	103

1. UVOD

1.1. Razvoj derivata pirazolohinolinona

Pirazolohinolinoni su sintetisani kao prvi nebenzodiazepinski ligandi koji se vezuju za benzodiazepinsko mesto na GABA_A receptorima. Uvođenjem odgovarajućih modifikacija u strukturu, dobijen je ligand PZ-II-029 (slika 1.1.1 levo), koji se visokim afinitetom vezuje za GABA_A receptore koji sadrže $\alpha 6$ subjedinicu. Strukturni analozi pirazolohinolinona uključujući PZ-II-029 su visoko selektivni za posebnu grupu GABA_A receptora sa subjedinicama $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$. Oni deluju kao pozitivni alosterni modulatori (na $\alpha 6+\beta 3$ - međupovršini), i dodatno kao antagonisti na benzodiazepinskom mestu (na $\alpha+\gamma 2$ - međupovršini). Zahvaljujući ovim svojstvima sintetisani ligandi pokazuju različite efekte nakon primene. Pokazano je da pirazolohinolinoni mogu sprečiti ataksične efekte diazepama, bez uticaja na njegove psihomotorne i antikonvulzivne efekte (Divović Matović i sar., 2022). Zbog široke zastupljenosti u mozgu, veliki broj farmakoloških efekata posredovano je ovim receptorima te su GABA_A receptori ciljna mesta delovanja mnogih lekovitih supstanci. Međutim, mnoge lekovite supstance koji se nalaze na tržištu poseduju nisku selektivnost ka određenim α subjedinicama, zbog čega dolazi do razvoja neželjenih efekata kao što su sedacija, ataksija, amnezija, tolerancija, i zavisnost (Knutson i sar., 2018). GABA_A receptori koji sadrže $\alpha 6$ subjedinicu mogu imati ulogu u terapiji neuropsihijatrijskih poremećaja kao što su tikovi, neki simptomi shizofrenije, opsesivno kompulzivni poremećaj i poremećaj nedostatka pažnje, ali i depresije, migrene i trigeminalnog orofacijalnog bola (Sieghart i sar., 2022).



Slika 1.1.1. Hemijske strukture novosintetisanih pirazolohinolinonskih liganada

Nakon primene PZ-II-029, međutim, biološka raspoloživost i poluvreme eliminacije nisu bili zadovoljavajući zbog velike mogućnosti metabolizma posredstvom O-demetilacije i slabe rastvorljivosti. Stoga, u cilju prevazilaženja niske bioraspoloživosti, izvršena je deuteracija metoksi grupa (Knutson i sar., 2018). Vodonikovi atomi zamenjeni su u jednoj (DK-I-56-1, 7-metoksi-2-(4-metoksi-d3-fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on) ili obe (DK-I-60-3, 7-metoksi-d3-2-(4-metoksid3-fenil)-2,5-dihidro-3Hpirazolo[4,3-c]hinolin-3-on) metoksi grupe, što se može videti u hemijskim strukturama na slici 1.1.1. Deuteracija ima pozitivan efekat na metaboličku stabilnost, dok farmakološki profil supstance biva zadržan. To je objašnjeno efektom primarnog kinetičkog izotopa deuterijuma (D vs. H). Ovaj efekat je rezultat razlike u energiji nulte tačke C-D i C-H veza zbog niže frekvencije vibracija C-D veza. Shodno tome, cepanje C-D veze zahteva veću energiju aktivacije, praćenu istovremenom sporijom brzinom metabolizma O-demetilacijom od C-H veze (Nelson i Trager, 2003). Ovaj inovativan pristup je primenjen i u sintezi deukravacitiniba koji je odobren od strane FDA septembra 2022. godine (Benedetto i sar., 2020).

Metabolička stabilnost je potvrđena u eksperimentima sa mikrozomima humane i mišje jetre, a povećanje bioraspoloživosti pokazano je nakon oralne i intraperitonealne primene, što ima veliki značaj za dalji prelaz supstanci u fazu razvoja. Na osnovu velikog broja komplementarnih

eksperimenata, od mnogih sintetisanih analoga, za dalja istraživanja izabrani su DK-I-56-1 i DK-I-60-3. Kada se uporede ova dva liganda, dideuteracija nije imala aditivan efekat na povećanje metaboličke stabilnosti i biorasploživosti. Dodatno, ispitivanja na ćelijskim kulturama su pokazala da su sintetisana jedinjenja netoksična, čak i u visokim koncentracijama (Knutson i sar., 2018). U bihejvioralnim testovima bili su lišeni mnogih efekata karakterističnih za benzodiazepine, dok pri zajedničkoj primeni sa diazepamom nema rizika od neželjenih interakcija (Divović Matović i sar., 2022). Zahvaljujući blagoj hiperlokomotornoj aktivnosti, mogu se razmotriti za neke oblike stanja depresije (Knutson i sar., 2018). Međutim, zbog slabe rastvorljivosti ovih supstanci, postojale su potrebe za korišćenjem formulacija sa visokim udelima organskih rastvarača, što je otežavalo njihovu farmakodinamsku karakterizaciju, ali i izazivalo zabrinutost za bezbednost primenjenih tretmana.

1.2. Izazovi u otkriću i razvoju lekova

Povećana primena visokopropusnog skrininga i kombinatorijske sinteze, kao i istraživanje novih ciljnih mesta dejstva rezultovala je razvojem lekovitih supstanci sa slabom rastvorljivošću u vodi. Za visok afinitet vezivanja i selektivnost na ciljnim mestima dejstva neophodno je formiranje hidrofobnih interakcija. Stoga ne čudi podatak da čak 90% novih hemijskih entiteta (*new chemical entity*, NCE), i 40% lekovitih supstanci na tržištu ima ograničenu rastvorljivost (Kalepu i Kennanti, 2015; Merisko-Liversidge i Liversidge, 2011). Prilikom skrininga u fazi otkrića lekova koriste se supstanca se uglavnom rastvara u dimetilsulfoksidu (DMSO), tako da su rastvorljivost u DMSO-u i stabilnost u ovom rastvaraču osnovni determinišući faktori za dalji razvoj. S obzirom na ograničenu upotrebu DMSO-a u prekliničkoj i kliničkoj fazi ovakav prisup može imati negativne posledice u narednim koracima razvoja. Osobine ovog rastvarača obezbeđuju rastvaranje velikog broja lekovitih supstanci različitih molekulskih karakteristika, pa dobra rastvorljivost u DMSO-u ne mora nužno voditi ka visokim vrednostima rastvorljivosti u drugim rastvaračima. U fazi razvoja leka, fokus studija rastvorljivosti je na formulaciji i karakteristikama čvrstog stanja supstance, i identifikovanja korelacije *in vitro/in vivo*. Tada se ispituje rastvorljivost u različitim organskim rastvaračima, uljima, i uobičajeno korišćenim korastvaračima, kako bi se izabrao dalji formulacioni korak (Li i Zhao, 2007; Alsenz i Kansy, 2007).

Rani razvoj formulacije je integralni deo otkrića i razvoja lekova. Značaj odabira odgovarajućih formulacionih pristupa ogleda se u obezbeđivanju sprovođenja farmakoloških (farmakodinamskih i farmakokinetičkih) i toksikoloških studija, zbog čega se ove formulacije nazivaju i omogućujućim formulacijama (engl. *enabling formulations*). U prekliničkim studijama, osnovne farmakokinetičke studije sprovode se u cilju razumevanja apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije supstance, dok obimnija istraživanja uključuju i proučavanja uticaja hrane i distribuciju u određene organe kao što su mozak i jetra. Uobičajeno, ova ispitivanja se sprovode na glodarima (najčešće miševi i pacovi) i ne-glodarima (psi, majmuni, prasadi), i uključuju različite puteve primene. Oralni put primene je najčešći, pri čemu se gastričnom sondom formulacija primenjuje direktno u želudac. Iako je primena rastvora u prednosti, zbog ograničene rastvorljivosti veoma često se pribegava primeni suspenzija. Sa druge strane, parenteralna primena obuhvata gotovo sve vidove injekcione primene, od kojih je intraperitonealna primena posebno značajna kod glodara jer omogućava brzu apsorpciju u sistemsku cirkulaciju. Zbog malog volumena biološke tečnosti u peritonealnom prostoru, preferira se primena rastvora, uz korišćenje dobro tolerisanih korastvarača u odgovarajućim koncentracijama (Li i Zhao, 2007).

Prilikom razvoja formulacija glavni ograničavajući faktor je najčešće slaba rastvorljivost lekovite supstance/kandidata za lek/vodeće supstance. Procenjuje se da bez rešavanja ovog problema od 5000-10000 sintetisanih NCE će se razviti samo jedan proizvod (lek). Na primer, za 40% slaborastvorljivih NCE, odgovarajući pristup formulaciji povećava efektivnost razvoja leka za 67% (Van Eerdenbrugh i sar., 2008). Uključenje istraživača koji se bavi (pre)formulacionim strategijama u proces razvoja zato postaje ključno sa aspekta prevazilaženja prepreka ka dobroj

bioraspoloživosti i posledično bržem prelasku na kliničku fazu (Ayad, 2015). Međutim, primećeno je da se pri izboru vrste formulacija istraživači velikim delom oslanjaju na svoje iskustvo u određenoj oblasti tehnologija, često zanemarujući fizičko-hemijske osobine lekovite supstance (Bergström i sar., 2016). Što bolje formulator razume međusobnu interakciju između fizičko-hemijskih osobina supstanci, posebnih aspekata različitih formulacionih opcija i potrebnih *in vivo* performansi, to je veća šansa da se izabere optimalni pristup formulaciji. Ovo smanjuje rizik od kasnijih neuspeha u kliničkim ispitivanjima na ljudima (Möschwitzer, 2013).

1.2.1. Formulacioni pristupi prevazilaženju slabe rastvorljivosti

Kao što je prethodno navedeno, u prvim fazama razvoja leka formulacije koje se koriste su uglavnom konvencionalni rastvori ili suspenzije u zavisnosti od toga da li je supstanca rastvorljiva u vodi ili ne. Za povećanje rastvorljivosti, tradicionalno koriste se supstance za podešavanje pH vrednosti (za molekule koji jonizuju), korastvarači i solubilizatori, vodeći računa o maksimalnim dozvoljenim nivoima ovih ekscipijenasa u preparatima (Williams i sar., 2013; Pestel i sar., 2006). Visoka koncentracija ekscipijenasa može uticati i na farmakokinetičke i farmakodinamske osobine supstance, što otežava dobijanje validnih rezultata i njihovo tumačenje. Dodatno, primena suspenzija, zbog niske rastvorljivosti može ograničiti bioraspoloživost i na taj način ugroziti farmakološka ispitivanja. Zbog toga se sve veća pažnja posvećuje razvoju pomenutih omogućujućih formulacija (Kalepu i Nekkanti, 2015; Ayad, 2015).

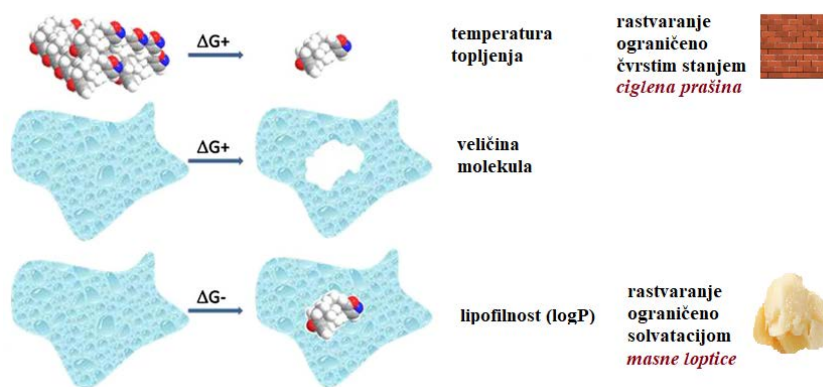
Termodinamički posmatrano, rastvorljivost čvrste supstance je funkcija tri procesa (slika 1.2.1.):

$$S = f(\text{energija kristalne rešetke} + \text{kavitaciona energija} + \text{energija solvatacije})$$

Pri prvom koraku u rastvaranju kristalnih supstanci energija se troši za remećenje kristalne rešetke i disociranje molekula (energija kristalne rešetke u gorenavedenoj funkciji). Zatim dolazi do formiranja šupljine u rastvaraču (vodi) dovoljne veličine za uključivanje molekula (energija potrebna za ovaj proces je kavitaciona energija). Na kraju energija solvatacije se oslobađa pri formiranju interakcija između rastvorene supstance i rastvarača (Lipinski i sar., 1997). Ovo je donekle integrisano u opštu jednačinu rastvorljivosti (jednačina 1). Prvi proces je okarakterisan stabilnošću kristalne rešetke, odnosno temperaturom topljenja (T_m), a druga dva particionim koeficijentom između oktanol i vode ($\log P_{oct}$):

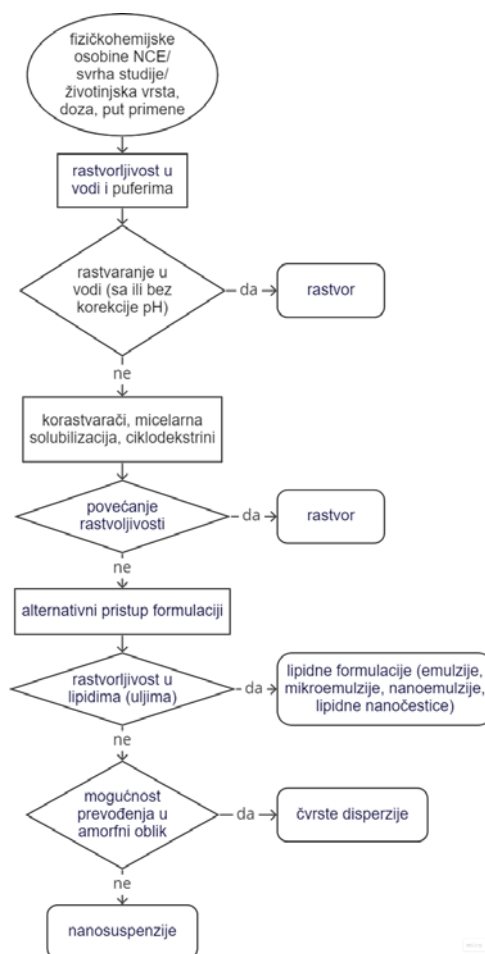
$$\log S_0 = 0,5 - 0,01(T_m - 25) - \log P_{oct} \quad (\text{jednačina 1})$$

gde je S_0 intrinzička rastvorljivost.



Slika 1.2.1. Termodinamički principi procesa rastvaranja (preuzeto i prilagođeno iz Bergström i sar. (2016)).

U zavisnosti od prirode supstance, rastvorljivost može biti primarno ograničena jednim od pomenutih procesa. Kod čvrstih kristalnih supstanci, čija je temperatura topljenja viša od 200 °C, rastvaranje je uglavnom limitirano osobinama čvrstog stanja, odnosno jakim intermolekulskim interakcijama. Ove supstance se opisuju kao ciglena prašina (engl. *brick dust*). Sa druge strane, supstance koje poseduju visoku lipofilnost ($\log P > 3$) otežano hidratišu, pa su nazvane masnim lopticama (engl. *grease ball*) (Bergström i sar., 2016). Pošto je formulacioni pristup ovim grupama supstanci različit, za uspešan razvoj formulacije poželjno je da se NCE svrsta u jednu od ovih grupa. Veliki broj istraživanja bavio se utvrđivanjem molekulskih svojstava koji bi ukazali na pripadnost molekula jednoj od pomenute dve grupe, što je posebno značajno u prvim fazama razvoja leka kada su dostupne male količine supstance. Molekuli iz grupe masnih loptica su uglavnom veliki, fleksibilni i lipofilni, a lipofilnost potiče uglavnom od aromatičnih prstenova (Bergström i sar., 2007). *Brick dust* supstance uglavnom su umereno lipofilne ($\log P$ oko 2), to su mali molekuli, veoma rigidni i planarni, zbog čega formiraju stabilne kristalne rešetke (Wassvik i sar., 2006; Wassvik i sar., 2008). Pored navedenih, postoje i supstance kod kojih je rastvorljivost ograničena i čvrstim stanjem i solvatacijom (Bergström i sar., 2016).



Slika 1.2.2. Algoritam pri pristupu formulaciji preparata sa lekovitim supstancama slabe rastvorljivosti.

Za *grease ball* supstance formulacija se razvija u pravcu lipidnih formulacija. Tipične lipidne formulacije se sastoje od lipida, surfaktanata i/ili kosurfaktanata i koriste se za povećanje oralne bioraspoloživosti zahvaljujući povećanju solubilizacionog kapaciteta gastrointestinalnog trakta i prevazilaženju ograničenja pri rastvaranju, s obzirom da se pri primeni lekovita supstanca nalazi u rastvorenom obliku (Bergström i sar., 2016). Za *brick dust* supstance razmatraju se dve

formulacione opcije – dobijanje amornog ili nanokristalnog oblika u zavisnosti od toga da li supstanca može biti prevedena u amorfan oblik zadovoljavajuće stabilnosti (Peltonen i Hirvonen, 2018; Bergström i sar., 2016). Pošto je energija kristalne rešetke daleko veća od kavitacione energije i energije solvatacije, cilj amorfizacije bio bi smanjenje potrebne energije za proces rastvaranja zbog slabijih intermolekulskih interakcija u amornom stanju (Jermain i sar., 2018; Peltonen i Strachan, 2020). Formulisanjem nanokristala, sa druge strane, povećava se saturaciona rastvorljivost i brzina rastvaranja zahvaljujući veoma malim veličinama čestica (Jermain i sar., 2018). Obe tehnologije nakon rastvaranja, dakle, dovode do formiranja stanja supersaturacije u kome je trenutna rastvorljivost veća od termodinamičke rastvorljivosti (Peltonen i Strachan, 2020). Na osnovu pomenutih razmatranja može se formirati algoritam ka formulaciji preparata sa supstancama slabe rastvorljivosti u vodi (Slika 1.2.2).

1.2.2. Primena nanotehnologije u formulaciji lekova

Primena nanomedicine u farmaceutskoj industriji poslednjih godina postaje sve interesantnija jer kombinuje nanotehnologiju sa farmaceutskim i biomedicinskim naukama. Cilj ovog pristupa je razvoj lekova veće efikasnosti i bolje bezbednosti. Zaista, od pojave prvih liposoma na tržištu 1990-ih, došlo je do povećanja broja odobrenih lekova koji sadrže nanomaterijale od strane Američke uprave za hranu i lekove, ali i broja odobrenih kliničkih studija (Bobo i sar., 2016). Veliki broj nanoformulacija se trenutno nalazi u kliničkim ispitivanjima, a još više njih je u postupku prekliničkih istraživanja (Bisso i Leroux, 2020). U prekliničkim studijama, ova tehnologija može služiti kao pomoćno sredstvo za skrining (Kalepu i Nekkanti, 2015). Tehnika nanokristalizacije se pokazala kao obećavajući pristup za formulaciju mnogih novih lekova, što je reflektovano činjenicom da je do 2017. godine ukupan broj zahteva za registraciju lekova koji sadrže nanokristale u SAD prešao 80 (Peltonen i Strachan, 2020). Pored nanokristala, veliku pažnju zauzimaju i lipidne nanočestice, posebno nakon razvoja vakcina za Covid-19.

Međutim i pored intenzivnog i dugotrajnog istraživanja nanotehnoloških lekova, relativno mali broj proizvoda dospe na tržište. Jedna od prepreka je potencijalna toksičnost nanomaterijala koja potiče od njihove interakcije sa biološkim površinama, što rezultira produkcijom slobodnih radikala i ćelijskom smrti. Dodatno, moguć je razvoj neželjenih reakcija i ispoljavanja toksičnosti usled akumulacije u organima kao što su jetra, bubrezi, i organi centralnog nervnog sistema i kardiovaskularnog sistema. Budući da su u pitanju kompleksni sistemi, njihova karakterizacija zahteva multidisciplinarni pristup. Pored toga, velika pažnja treba biti usmerena na razvoju metoda karakterizacije nanočestica, ali i njihovih standardizacija. Međutim, iako postoji velika razlika između nanomaterijala i materijala *in bulk*, regulatorna tela koriste podatke o bezbednosti za *in bulk* materijale, što stvara dodatne probleme. Dodatno ograničenje u razvoju svakako predstavlja i finansijski aspekt proizvodnje (Gadekar i sar., 2021).

1.3. Nanokristalne disperzije

1.3.1. Definicija, značaj i osnovne fizičko-hemijske karakteristike nanokristalnih disperzija

Nanokristalne disperzije ili nanosuspencije predstavljaju disperzije čestica lekovite supstance veličina ispod 1000 nm (uglavnom od 200 do 600 nm) stabilizovane surfaktantima, polimerima ili njihovim kombinacijama (Müller i sar., 2001; Müller i sar., 2011; Chin i sar., 2014; Al-Kassas i sar., 2017; Peltonen i Hirvonen, 2018). Zbog male veličine čestica, pretpostavlja se da se osnovne osobine materijala menjaju. Savršene kristale karakteriše visok stepen uređenosti sa pravilno raspoređenim atomima unutar kristalne rešetke. Suprotno, amorfni sistemi ne poseduju uređenost na makro-nivou, a mogu posedovati određenu uređenost na mikro-nivou, kod kojih su molekuli nasumično raspoređeni. Nanokristali se mogu smatrati formulacijama između pomenutih graničnih pojava, čije su fizičko-hemijske osobine takođe između kristalnih i amornih faza, i zavise od

veliĉine kristala (Peltonen i Strachan, 2020). Osnovne odlike koje se vezuju za nanokristale zbog kojih su interesantni u razvoju farmaceutskih preparata su:

1. Povećanje brzine rastvaranja - kao najznaĉajnja prednost ovih formulacija, direktna je posledica smanjenja veliĉine ĉestica. Ukoliko se uzmu u razmatranje sferne ĉestice, prema Noyes-Whitney jednaĉini smanjenje veliĉine sa 50 μm na 500 nm dovodi do povećanja brzine rastvaranja 100 puta (jednaĉina 2):

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{vh}(C_s - C) \quad (\text{jednaĉina 2})$$

gde je dC/dt brzina rastvaranja, D difuzioni koeficijent, S površina, V zapremina medijuma za rastvaranje, h debljina difuzionog sloja, C_s saturaciona koncentracija i C koncentracija u vremenu t (Peltonen i Hirvonen, 2018). Smanjenje veliĉine ĉestica, pored povećanja specifiĉne površine dovodi do smanjenja debljine difuzionog sloja, što simultano dovodi do veće brzine rastvaranja (Jermain i sar., 2018). Veliki broj radova je potvrdio ovu teoriju. Međutim, veliku paŹnju treba posvetiti eksperimentalnim uslovima testiranja brzine rastvaranja. Prvi problem koji moŹe dati laŹno pozitivne rezultate jeste nepotpuno odvajanje rastvorenih od nerastvorenih ĉestica zbog malih veliĉina nanokristala (Jünemann i Dressman, 2012). U najvećem broju sluĉajeva razdvajanje se vrši filtriranjem, pa korišćenjem filtera sa veliĉinom pora većom od veliĉine ĉestica, moŹe zakljuĉiti gotovo trenutno rastvaranje. Korišćenjem filtera malih veliĉina pora (0,1 i 0,02 μm) mogu se dobiti pouzdaniji rezultati (Juenemann i sar., 2011), mada njihova upotreba moŹe dovesti do rupture ili zaĉepljivanja filtera, što se uglavnom ogleda u dobijanju veoma varijabilnih rezultata. Pored ovoga, ispitivanjem pri tzv. *sink* uslovima uglavnom je nemoguće uoĉiti razlike između frakcija nanokristala razliĉitih veliĉina. Da bi se dobili diskriminativni rezultati, potrebno je omogućiti sporo rastvaranje, te koliĉina lekovite supstance treba biti sliĉna rastvorljivosti u medijumu (Liu i sar., 2013).

2. Povećanje rastvorljivosti moŹe se opisati Kelvinovom jednaĉinom, koja je povezana sa Ostwald-Freundlich jednaĉinom (jednaĉina 3):

$$S_{NP} = S_0 e^{\frac{2V_m\gamma}{RT r}} \quad (\text{jednaĉina 3})$$

gde je S_{NP} rastvorljivost ĉestica preĉnika r , S_0 je rastvorljivost bulk materijala, V_m je molarna zapremina, γ je površinski napon, R gasna konstanta i T temperatura. Kelvinova jednaĉina opisuje povezanost između preĉnika kapi teĉnosti i pritiska pare koji dovodi do isparavanja. Pod pretpostavkom da je fazni prelaz supstance iz teĉnog u gasovito stanje sliĉan prelazu iz ĉvrste u teĉno, ova jednaĉina pokazuje povećanje saturacione rastvorljivosti za ĉestice manje od 1 μm (Jernain i sar., 2018). Povećanjem rastvorljivosti nanokristali, kao i amorfni sistemi dovode do supersaturacije (Peltonen i Strachan, 2020; Jermain i sar., 2018). Međutim, eksperimentalno, veoma mali broj radova je pokazao znaĉajno povećanje rastvorljivosti nanokristala, te postoji mogućnost da ova pogodnost formulacija nema veliki kliniĉki znaĉaj. Kao i u sluĉaju testiranja brzine rastvaranja, i kod ispitivanja rastvorljivosti veliki uticaj na rezultate imaju eksperimentalni uslovi (Van Eerdenbrugh i sar., 2010).

3. Povećanje adhezivnosti generalno za sve nanoĉestiĉne sisteme posledica je njihove male veliĉine, odnosno veće specifiĉne površine, a stoga i veće kontaktne površine dostupne za interakcije (Müller i sar., 2011). Ćetiri teorije opisuju ovaj fenomen: 1) elektrostatiĉka teorija zasnovana na elektrostatiĉkim interakcijama; 2) teorija adsorpcije koja se bazira na postojanju vodoniĉnih i *Van der Waals*-ovih sila; 3) difuziona teorija koja podrazumeva međusobno proŹimanje i fiziĉko preplitanje proteina mukusa i lanaca polimera na površini ĉestica i 4) teorija hvatanja (engl. *trapping theory*) koja opisuje zadrŹavanje nanoĉestica u neravnoj površini mukoze (Gao i sar., 2012).

Iako naizgled deluju kao jednostavni sistemi koji se sastoje od kristalnog jezgra aktivne supstance i adsorbovanih stabilizatora, struktura nanokristala može biti veoma složena. Ona može biti ispitana različitim studijama korišćenjem nuklearne magnetne rezonance (NMR) u čvrstom ili tečnom stanju. To je pokazano na primeru nanokristalnih disperzija karbamazepina. Pored aktivne supstance, u ovim formulacijama hidroksipropilmetilceluloza je takođe bila u čvrstom agregatnom stanju, iako je pri izradi korišćen njen rastvor. Na površini čestica nalazio se sloj koji se sastojao od aktivne supstance i stabilizatora (natrijum-laurilsulfata i hidroksipropilmetilceluloze) u polučvrstom stanju koji je u ravnoteži sa rastvorenom fazom i doprinosi stabilizaciji elektrostatičkim i sternim odbijanjem (Kojima i sar., 2018).

1.3.2. Stabilizacija nanokristala

Velika površinska energija nanokristala (i nanočestica uopšte) generiše veliku ukupnu površinsku energiju, koja je termodinamički nepovoljna. U cilju smanjenja površinske energije, čestice teže ka agregiranju, dovodeći do brže sedimentacije i kriminga kao i rasta kristala što za posledicu može da ima neujednačeno doziranje. Ovo je najčešći vid nestabilnosti nanosuspenzija koji se sprečava korišćenjem stabilizatora. Dva su osnovna mehanizma stabilizacije koloidnih disperzija – elektrostatičko odbijanje i sterna stabilizacija. Prvi je opisan *Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek* (DLVO) teorijom koja predviđa postojanje odbojnih elektrostatičkih sila i privlačnih *Van der Waals*-ovih interakcija. Privlačne sile su dominantne na veoma malim i velikim rastojanjima, dok na srednjim rastojanjima do međusobnog odbijanja dolazi usled preklapanja električnih dvosloja dve čestice (Wu i sar., 2011).

Sterna stabilizacija podrazumeva korišćenje amfifilnih nejonskih stabilizatora. Ovi molekuli se adsorbuju na površinu čestica hidrofobnim regionom, dok se drugi, dobro hidratizirani deo, proteže u spoljašnju fazu. Kada se čestice nađu u blizini, ukoliko ne postoji jaka interakcija između spoljašnje faze i stabilizatora, lanci stabilizatora bivaju isprepleteni izbacujući molekule spoljašnje faze iz interčestičnog regiona, što rezultira agregacijom. Ovaj proces je termodinamički nepovoljan ukoliko je stabilizator dobro hidratiziran. Naime, jake entalpijske interakcije između rastvarača (vehikuluma) i segmenta stabilizatora koji je odgovoran za stabilizaciju je ključan faktor koji omogućuje sterna efekat. Dakle, odsustvo međusobnih interakcija lanaca smanjuje broj konfiguracija dostupnih adsorbovanom „repu” surfaktanta, što rezultuje smanjenjem promene entropije i pozitivnom Gibsovom slobodnom energijom. Pored toga, za uspešnu stabilizaciju, stabilizator mora biti dovoljno dugog polimernog lanca i gusto pakovan na površini, kako bi osigurao sterna barijeru na dovoljnom nivou na kojem su privlačne *Van der Waals*-ove sile manje od odbojnih sternih sila. Kombinacija dva pomenuta mehanizma stabilizacije (elektrostatička i sterna) se pokazala pogodnom za mnoge lekovite supstance, zbog boljeg pakovanja jonizujućeg surfaktanta na površini čestice u prisustvu nejonskog stabilizatora (Wu i sar., 2011).

Treći način stabilizacije koloidnih disperzija je deplecija, koja potiče od slobodnih neadsorbovanih polimera. Na površini čestica dolazi do adsorpcije polimera, zahvaljujući jakim privlačnim silama, što omogućuje sterna stabilizaciju kratkog dometa. U zavisnosti od koncentracije, ostatak polimera, koji nije adsorbovan, stupa u interakciju sa ovim regionom vezanih polimera, što dovodi do razvoja odbojnih sila deplecije (Trenkenschuh i Friess, 2021). Ovaj način stabilizacije ipak je i dalje predmet debate.

Izbor stabilizatora u formulaciji nanokristalnih disperzija

Pri izboru stabilizatora veliku ulogu ima planirani put primene formulacija. Kod oralnih nanosuspenzija veoma često se koristi natrijum-laurilsulfat u kombinaciji sa nekim polimernim stabilizatorom (polivinilpirolidon i derivati celuloze: metilceluloza, hidroksipropilceluloza, hidroksipropilmetilceluloza). Kako je elektrostatička stabilizacija osetljiva na prisustvo jona (Wu i sar., 2011), postoji velika mogućnost za destabilizaciju nanokristala u želucu, pri kiselosti sredini i u

prisustvu elektrolita (Li i sar., 2021). S obzirom da su polimerni stabilizatori otporni na povećanu jonsku jačinu okruženja, kombinacija elektrostatičke i sterne stabilizacije je i iz tog aspekta poželjna.

Dok su za oralni put primene ograničenja u izboru mala, pri formulaciji parenteralnih nanosuspenzija mali broj stabilizatora je odobren za korišćenje: polisorbata 20, polisorbata 80, poloksameri, lecitin i albumin, a od polimera polivinilpirolidon K12 (Patel i sar., 2020). Nakon intravenske primene, takođe zbog uticaja pH i jonske jačine moguće je da dođe do agregacije čestica. U *in vitro* ispitivanju stabilnosti nanočestica u plazmi, pokazano je da do agregacije dolazi veoma brzo, posebno kada je pomešana veća koncentracija leka sa plazmom (Aramwit i sar., 2006).

Pored izbora vrste stabilizatora, ključni korak je izbor njegove koncentracije. Pri suviše niskim koncentracijama prekrivenost površine čestica može biti nepotpuna, a pri suviše visokim koncentracijama formiranje micela može narušiti stabilnost sistema. Za adsorpciju sternih stabilizatora, pored koncentracije, treba obratiti pažnju na molekulsku masu, pošto se stepen adsorpcije smanjuje sa povećanjem molekulske mase (Wang i sar., 2013). Brojne studije su pokazale da efikasnost stabilizatora značajno zavisi od osobina lekovite supstance. U literaturi je prisutan veliki broj primera nanokristala različitih supstanci stabilizovanih stabilizatorima u širokom opsegu koncentracija. Iako je generalno zaključeno da su supstance manje rastvorljivosti u vodi, velike molekulske mase i visoke tačke topljenja najpogodnije za dobijanje uspešnih nanosuspenzija (Van Eerdenbrugh i sar., 2008), kao i da logP vrednost i entalpija imaju velikog uticaja na uspešnu nanonizaciju (George i Ghosh, 2013), u skrining studiji sa devet lekovitih supstanci nije uspostavljena korelacija između fizičko-hemijskih karakteristika lekovite supstance i uspeha u dobijanju stabilnih nanosuspenzija (Van Eerdenbrugh i sar., 2009).

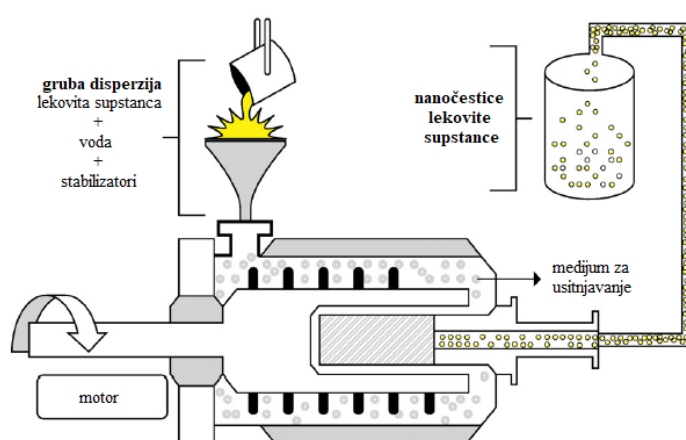
Pored agregacije čestica, kod nanosuspenzija moguće je da do povećanja veličina čestica dođe usled *Ostwald*-ovog sazrevanja. U cilju smanjenja rasta kristala lekovita supstanca koja se usitnjava treba da bude slabo rastvorljiva (Wang i sar., 2013). U tom smislu, biraju se stabilizatori koji ne utiču značajno na rastvorljivost supstance koja se usitnjava, a u slučaju surfaktanata, poželjno je da koncentracija bude ispod kritične micelarne koncentracije (Verma i sar., 2009). Drugi parametar koji utiče na ovaj fenomen je homogenost sistema, odnosno raspodela veličine čestica. Čestice različite veličine imaju različitu saturacionu rastvorljivost, prema *Ostwald-Freundlich* jednačini, što formira koncentracioni gradijent između njih. Posledica toga je difuzija molekula iz regiona visoke koncentracije oko malih čestica u region niže koncentracije (oko većih čestica). U tom regionu zbog supersaturacije dolazi do kristalizacije na velike čestice, a sa druge strane nastavlja se rastvaranje malih čestica, tako da u suštini dolazi do rasta velikih čestica na račun manjih. Na *Ostwald*-ovo sazrevanje pored veličine čestica utiču i stabilizatori pošto smanjuju međupovršinski napon između čvrstih čestica i tečnog medijuma (Wu i sar., 2011).

1.3.3. Postupci dobijanja nanokristala

Dve osnovne grupe metoda za izradu nanokristalnih disperzija zasnivaju se na rastu kristala precipitacijom (*bottom-up*) ili smanjenju veličina čestica (*top-down*). Međutim, zbog otežane kontrole rasta kristala, prva grupa metoda nije interesantna farmaceutskoj industriji, te su veći naponi uloženi u razvoj metoda usitnjavanja. Zapravo, prva tehnologija proizvodnje patentirana je 1990-tih pod imenom *NanoCrystal*[®] od strane Gary Liversidge i Sterling Drug Inc./Eastman Kodak i podrazumeva tehniku usitnjavanja pomoću kuglica u tečnom medijumu (engl. *wet ball milling*, WBM), i korišćena je za razvoj većine proizvoda na tržištu. Četiri godine kasnije Müller i saradnici razvili su metodu baziranu na homogenizaciji pod visokim pritiskom (*piston gap high pressure homogenization* (HPH)), nazvanu *DissoCubes*[™]. Nedugo zatim razvijena je druga varijanta homogenizacije, *Nanopure*[®], za formulacije sa manjim udelom vode ili nevodene disperzije (Shegokar i Müller, 2010; Möschwitzer, 2013).

Kuglično usitnjavanje u tečnom medijumu

Kod kugličnog usitnjavanja u tečnom medijumu, supstanca, poželjno u mikroniziranoj formi, suspenduje se u medijumu koji sadrži stabilizatore i prenosi u sud sa kuglicama (perlicama). Kuglice i suspenzija se mešaju i dolaze u međusobnu interakciju što dovodi do usitnjavanja čestica lekovite supstance različitim mehanizmima: abrazijom, cepanjem ili lomljenjem (slika 1.3.1). Ovako opisan niskoenergetski proces može trajati i nekoliko dana kako bi se dobile disperzije malih veličina čestica. Sa druge strane, visokoenergetski proces zahteva dostupnost posebne aparature koji omogućuje pumpanje suspenzije određenom brzinom kroz komoru za usitnjavanje, kontinuirano ili diskontinuirano, tako da se usitnjavanje završava za 30-120 min. Usitnjavanje je rezultat napona smicanja i sila kompresije unutar komore. Osnovni nedostatak ove tehnike je mogućnost onečišćenja koje potiče od medijuma za usitnjavanje, zbog abrazije sa komorom uređaja, pa se velika pažnja posvećuje korišćenju otpornih materijala kao što su polistirenske kuglice (razvijene za ovu namenu, Pollymill®) ili itrijumom stabilizovane kuglice od cirkonijum oksida (Möschwitzer, 2013; Al-Kassas i sar., 2017).



Slika 1.3.1. Šematski prikaz metode kugličnog usitnjavanja u tečnom medijumu (preuzeto i prilagođeno iz Merisko-Liversidge i Liversidge (2011)).

Ova tehnika usitnjavanja posebno je interesantna u ranom razvoju lekova (Siewert i sar., 2018) zbog mogućnosti minijaturizacije i relativno jednostavnog prenosa na nivo proizvodnje. Veliki broj istraživača je modifikacijom kugličnih mlinova ili korišćenjem drugih aparatura koje inicijalno nisu za to namenjene uspeo da dobije nanokristalne disperzije korišćenjem miligramskih količina lekovite supstance (Frank i Boeck, 2016; Van Eerdenbrugh i sar., 2008). Jedan primer minijaturizacije procesa je primena uređaja za lizu ćelija (engl. *cell disruptor*) uz korišćenje kuglica cirkonijum-oksida obloženog itrijumom (Corrias i sar., 2017). Korišćenjem modifikovanih tehnika omogućen je skrining stabilizatora ili drugih formulacionih aspekata pri dobijanju nanokristala u ranim fazama razvoja novih lekova. Dodatno, ova tehnika izrade je kompatibilna sa gotovo svim lekovitim supstancama, tako da ima prednost u odnosu na homogenizaciju pod visokim pritiskom za dobijanje nanokristala malih veličina čestica (Van Eerdenbrugh i sar., 2008).

Homogenizacija pod visokim pritiskom

Homogenizacija pod visokim pritiskom u *piston-gap* uređajima zasniva se na propuštanju suspenzije lekovite supstance kroz uzak otvor dijametra 25 μm veoma velikom brzinom i pod pritiskom od 500 do 1500 bar. Proces propuštanja se ponavlja uglavnom oko 20-25 ciklusa uz postepeno povećanje pritiska. Kada se suspenzija nalazi u zatvorenom sistemu, pritisak je konstantan, međutim kada ona prođe kroz uzak otvor dolazi do razvoja dinamičkog pritiska, dok statički pritisak u tečnosti opada ispod napona pare što uzrokuje ključanje tečnosti i formiranje mehurića. Čim tečnost napusti uzak otvor, mehurići vazduha kolabiraju zbog normalizacije pritiska.

Čestice lekovite supstance nanometarskih veličina dobijaju se pod dejstvom kavitacionih sila (generisanih zbog formiranja i kolabiranja mehurića vazduha), sila smicanja i kolizije. Ovom tehnikom proizveden je jedan lek na tržištu za oralnu primenu (Triglide®, fenofibrat).

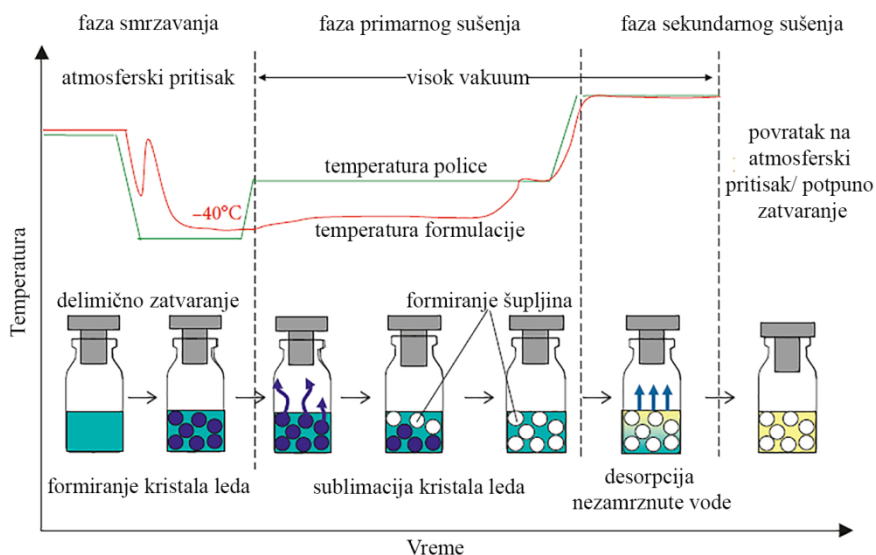
Drugi tip homogenizacije pod visokim pritiskom podrazumeva korišćenje mikrofluidizirajuće tehnike. Koriste se dve vrste komora: „Y” i „Z” tip. Kod prve vrste, suspenzija protiče u dva mlaza koja se međusobno sudaraju tako da dolazi do kolizije čestica i njihovog lomljenja zbog sila smicanja i kavitacije. Kod „Z” tipa mikrofluidizera do usitnjavanja dolazi zbog promena smera proticanja suspenzije. Kako je za dobijanje malih veličina čestica potrebno čak 50 ili više propuštanja, ovaj proces se ne smatra pogodnim za proizvodnju, pa na tržištu još uvek nema nanokristalnih lekova dobijenih ovom tehnikom (Möschwitzer, 2013; Al-Kassas i sar., 2017).

1.3.4. Liofilizacija nanokristalnih disperzija

Zbog povećanog rizika od agregacije tokom čuvanja nanosuspenzija u tečnom stanju (engl. *liquid nanosuspensions*, LNS), veoma često se sprovodi njihovo prevođenje u čvrsto stanje sušenjem raspršivanjem ili sušenjem smrzavanjem. Na ovaj način se dobijaju tzv. čvrste nanosuspenzije (engl. *solid nanosuspensions*, SNS) (Yue i sar., 2013). SNS se mogu primenjivati nakon rekonstitucije (redispersgovanja), ili se puniti u kapsule ili komprimovati u tablete. Od dva pomenuta načina solidifikacije, liofilizacija se smatra pogodnijom za manje količine formulacija u ranim fazama razvoja. Sušenje raspršivanjem je u tom smislu nepovoljno zbog relativno velikih gubitaka koji se stvaraju prilikom procesa. Međutim, pregledom literature primećuje se manjak suštinskog razumevanja uticaja procesa liofilizacije na stabilnost nanočestičnih sistema, zbog čega se veoma često dobijaju liofilizati koji sadrže agregate.

Teorija procesa liofilizacije

Liofilizacija predstavlja složen proces uklanjanja rastvarača (vehikuluma) kroz tri faze – smrzavanje, primarno sušenje i sekundarno sušenje (Slika 1.3.2.). Kako se najčešće uklanja voda, od velike je važnosti razumeti fazne prelaze vode koji karakterišu pomenute faze procesa:



Slika 1.3.2. Prikaz procesa liofilizacije (preuzeto i prilagođeno iz Kawasaki i sar. (2019))

1) *Smrzavanje*. Inicijalno, formulacija se zamrzava i dolazi do formiranja kristala leda (fazni prelaz vode iz tečnog u čvrsto agregatno stanje). Pretpostavlja se da su formirani kristali leda relativno „čisti”, bez prisustva rastvorenih čestica ili drugih delova formulacije, a ostatak formulacije biva pomeren sa fronta zamrzavanja u poseban region. U ovom, međuprostornom regionu, pored

formulacije nalazi se nekristalna voda, najčešće u staklastom stanju, sa poželjno minimalnom mobilnošću. Formulacija na kraju ove faze treba da bude u potpunosti zamrznuta (Abdelwahed i sar., 2006a; Fonte i sar., 2016; Jennings, 1999). Vreme potrebno za smrzavanje zavisi više od visine punjenja nego od ukupnog volumena punjenja. Generalno, za visinu punjenja od oko 1 cm potrebno je da zamrzavanje traje oko 3 h (Abdelwahed i sar., 2006a). Nakon uklanjanja kristala leda sublimacijom, ako se pretpostavi da je celokupna voda u formulaciji kristalisala, struktura koja ostaje će predstavljati intersticijalni region kada je formulacija u zamrznutom stanju. Podjednako je važno da smrznuta formulacija ima strukturu takvu da pruža minimalan otpor protoku vodene pare u narednim fazama. Osušeni proizvod veoma često ima strukturu nalik na dimnjak na sredini kolača. Ovakva struktura formira se već tokom smrzavanja. Kako kristali leda rastu sa dna bočice, sistem prelazi u tzv. *mushy state* („kašasta faza”, faza koja se sastoji iz smeše čvrste i tečne faze). Dimnjaci su formirani kao rezultat dva modela konvekcije – jedan se dešava u tečnom sloju odmah iznad, a drugi ispod tog regiona (Jennings, 1999).

2) *Primarno sušenje*. Nakon smrzavanja pritisak u liofilizatoru se smanjuje i povećava se temperatura koja će promovisati sublimaciju kristala leda (fazni prelaz iz čvrstog u gasovito stanje). Kako sublimacija odmiče, front led-gas se pomera kroz kolač. Završetak primarnog sušenja podrazumeva da su svi kristali leda uklonjeni iz formulacije, tako da volumen koji zauzima kolač biva ekvivalentan volumenu zamrznutog matriksa. Glavni cilj primarnog sušenja jeste smanjenje najveće količine vode dok je matriks u zamrznutom stanju. Međutim, ako je mobilnost vode u međuregionu značajna, nakon sublimacije eksponirani region će biti nerigidan što može rezultovati kolapsom ili čak otopljanjem (Jennings, 1999).

Sublimacija leda se dešava sa površinskog sloja kristala koji se sastoji od molekula vode koji nemaju jasno definisanu strukturu. Kako se pritisak gasa spušta, molekuli vode sa dovoljno energije i pravim moment vektorom mogu napustiti površinu. Kada se nađe u gasovitoj fazi, molekul vode može se sudariti sa molekulima rezidualnog gasa, kao što je kiseonik ili azot i vratiti se na površinu. Stoga, brzina sublimacije pre svega zavisi od pritiska u komori liofilizatora. Primarno sušenje formulacije se razlikuje od primarnog sušenja čistog leda, ali principi faznog prelaza vode ostaju isti. Osnovna razlika je postojanje međupovršinskog regiona, koji može pružiti otpor protoku vodene pare (Jennings, 1999; Kawasaki i sar., 2019).

Parametri primarnog sušenja - pritisak u komori i temperatura police se određuju na osnovu termalnih karakteristika formulacije. Pošto masa leda prevladava u odnosu na masu međupovršinskog regiona, temperatura zamrznutog matriksa tokom primarnog sušenja će biti vođena temperaturom kristala leda na gas-čvrsto međupovršini (Jennings, 1999; Kawasaki i sar., 2019). Kako bi se sprečio kolaps kolača, primarno sušenje se sprovodi na temperaturi ispod takozvane temperature kolapsa (T_c) ili kritične temperature formulacije. Temperatura kolapsa predstavlja temperaturu na kojoj voda u intersticijalnom (međupovršinskom) regionu postaje značajno mobilna (Jennings, 1999). Ovaj parametar se uobičajeno određuje mikroskopijom sušenja smrzavanjem (engl. *freeze-drying microscopy*), a zatim se definišu parametri procesa. Uglavnom, vrednosti T_c su za oko 2 °C više od temperature staklastog prelaza maksimalno krio-koncentrovanog rastvora (T_g') ili jednake eutektičkoj temperaturi (T_{eu}), tako da se pomenuti parametar može odrediti i termalnom analizom uzorka (diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom) (Abdelwahed i sar., 2006a).

3) *Sekundarno sušenje*. Finalno, zaostala vlaga koja predstavlja adsorbovanu vodu na površini i adsorbovanu vodu u međupovršinskom regionu se uklanja sekundarnim sušenjem. Količina zaostale vode nakon završetka primarnog sušenja je uglavnom suviše visoka (5-10 %) da bi se postigla željena stabilnost. Smanjenje sadržaja vlage se postiže desorpcijom sa kolača bez smanjivanja zapremine kolača, povećanjem temperature proizvoda i smanjenjem parcijalnog pritiska vodene pare u kontejneru. U ovoj fazi najznačajniji parametri koje treba razmatrati su temperatura, pritisak,

ali i vreme sušenja, koje može trajati i nekoliko dana (Jennings, 1999; Fonte i sar., 2016; Kawasaki i sar., 2019).

Specifičnosti liofilizacije nanokristalnih disperzija

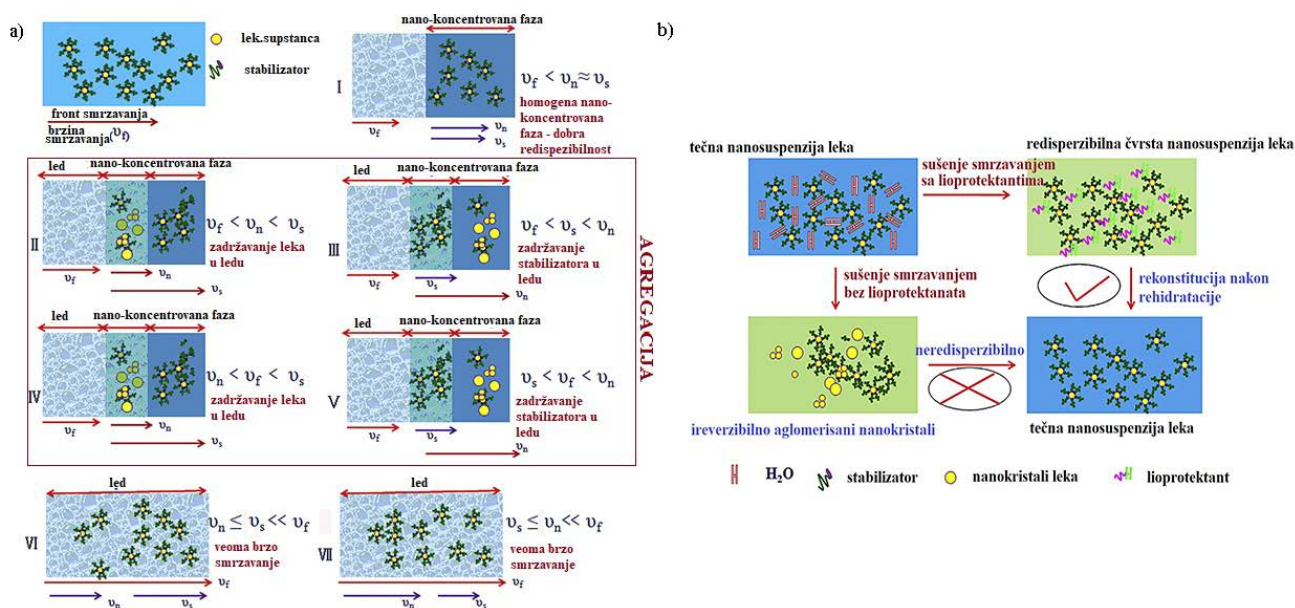
Prilikom liofilizacije nanokristalnih disperzija, usled uklanjanja vode javlja se mogućnost za povećanje veličine čestica nanokristala, uglavnom kao posledica njihove agregacije. Iako svaka faza procesa nosi određeni rizik za agregaciju, najveći broj istraživanja bavio se uticajem smrzavanja na stabilnost nanokristala. Tradicionalno, za obezbeđivanje stabilnosti tokom smrzavanja dodaju se krioprotektanti koji treba da spreče preplitanje lanaca sternih stabilizatora homogenim pokrivanjem i zaštitom površine čestica (Chung i sar., 2012). Kao što je prethodno objašnjeno, prilikom smrzavanja se formiraju dva regiona – kristali leda i međupovršinski (kriokoncentrovani, a kod liofilizacije nanosuspenzija uobičajeno se koristi termin nano-koncentrovani) region. Tokom nukleacije i rasta kristala leda krioprotektanti i nanokristali bivaju gurnuti u kriokoncentrovani region, pri čemu koncentracija nanokristala raste i do 50 puta. Nanočestice dolaze u bliži međusobni kontakt, što povećava rizik od savladavanja odbojnih i preovlađivanja privlačnih sila među njima (Chung i sar., 2012; Trenkenschuh i Friess, 2021). Konačno, na temperaturi ispod T_g' ova faza prelazi u staklasto stanje, tako da čestice bivaju imobilisane u formiranom matriksu (Abdelwahed i sar., 2006b). Opisani princip je u osnovi tzv. hipoteze vitifikacije koja objašnjava mehanizam zaštitnog efekta krioprotektanata (Abdelwahed i sar., 2006a).

Pored opisane hipoteze, postoji i drugo objašnjenje efekata krioprotektanata. Prema hipotezi izolacije čestica nije neophodno da dođe do vitifikacije, već krioprotektanti prostorno izoluju pojedinačne čestice u zamrznutom matriksu i na taj način sprečavaju agregaciju. Smisao ove hipoteze ogleđa se u zavisnosti između stabilnosti čestica i površinskog napona disperzionog medijuma. Do agregacije dolazi u medijumu sa visokim površinskim naponom, koji se povećava sa sniženjem temperature. Dodatno, do povećanja površinskog napona dolazi tokom nukleacije kristala leda zbog povećanja koncentracije u kriokoncentrovanom regionu. Koncentrovani rastvori saharoze i glukoze imaju relativno nizak površinski napon, stoga mogu omogućiti ujednačeno dispergovane čestice, bez imobilizacije kao neophodnog preduslova za obezbeđivanje stabilnosti. Ova hipoteza prvi put je opisana na primeru kompleksa lipida i DNK (Allison i sar., 2000), ali je potvrđena i na primeru nanokristalnih disperzija (Beirowski i sar., 2011b). U tom smislu akcenat je dat na formulacionom dizajnu (osobine nanočestica, stabilizatori, krioprotektanti) pre nego na procesnim parametrima (Beirowski i sar., 2011b). Vizuelizacijom je pokazano da se u odsustvu krioprotektanata formiraju klasteri nanočestica, a da se dodatkom saharoze povećava međučestično rastojanje polimernih nanočestica na bazi poli(D,L-laktid-ko-glikolida) (Niu i Panyam, 2017).

Zbog velikog rizika od agregacije tokom ove faze liofilizacije, velika pažnja posvećena je proučavanju uticaja brzine smrzavanja na stabilnost (Lee i Cheng, 2006). Generalno, smatra se da brzo smrzavanje i veća koncentracija krioprotektanata vodi ka boljoj redisperzibilnosti. Pri brzom smrzavanju formiraju se manji kristali leda i veća specifična površina leda, što smanjuje mogućnost razvoja mehaničkog stresa, a koncentracija krioprotektanata treba da bude iznad određene granice jer u suprotnom njihova migracija u kriokoncentrovani region neće biti potpuna (Lee i sar., 2009). Ključni procesi koji dovode do agregacije čestica tokom smrzavanja su dakle prepletanje lanaca sternih stabilizatora i fuzija čestica. Krioprotektanti treba da se nalaze između nanočestica, na taj način sprečavajući ove procese. Stoga, na kraju smrzavanja neophodno je dobiti homogen kriokoncentrovani region (Slika 1.3.3a). Tokom zamrzavanja se odvijaju složeni procesi separacije faza od kojih zavisi okruženje nanočestica, a samim tim i da li će doći do njihovih interakcija. Ukoliko je brzina smrzavanja manja od kritične brzine difuzije nanočestica i krioprotektanta, pri zamrzavanju će se formirati relativno homogeni kriokoncentrovani region. U suprotnom, nanočestice ili krioprotektanti će ostati „zarobljeni” u kristalima leda, te se povećava mogućnost agregacije (Chung i sar., 2012). Difuzija nanokristala zavisi od osobina lekovite supstance, pa pošto

brzina difuzije hidrofobnih lekovitih supstanci može biti relativno velika, redistribibilnost će biti poboljšana sporijim zamrzavanjem (Yue i sar., 2014).

Kao krioprotektanti najčešće se dodaju šećeri – saharoza, trehaloza, glukoza, laktoza, ali i polimeri kao što su poletilenglikoli, polivinilpirolidon, ili aminokiseline kao što su glicin i histidin (Abdelwahed i sar., 2006a). Izbor vrste i koncentracije krioprotektanata je od suštinske važnosti za sprečavanje agregacije tokom smrzavanja (Beirowski i sar., 2011a). Generalno, disaharidi su efikasniji od polisaharida kao što je dekstran zbog fleksibilnije strukture i manje veličine molekula (Trenkenschuh i Friess, 2021). Sa druge strane, iako hemijski slične, trehaloza i saharoza imaju različite osobine. Trehaloza se od drugih šećera izdvaja zbog odsustva intermolekulskih vodoničnih veza, niske higroskopnosti, više T_g' (-29 °C, u odnosu na saharozu čija T_g' je -32 °C) i niske hemijske reaktivnosti, pa se veoma često koristi u liofilizaciji (Fonte i sar., 2016, Mohammady i sar., 2020).



Slika 1.3.3. Mehanizam stabilizacije korišćenjem a) krioprotektanata i b) lioprotektanata pri liofilizaciji nanosuspenzija (preuzeto i prilagođeno iz Yue i sar. (2014)).

Iako se u literaturi mogu sresti formulacije koje sadrže manitol kao krioprotektant, on veoma retko obezbeđuje potrebnu stabilizaciju. Zbog toga što lako kristališe, manitol se pre svega koristi kao sredstvo za dopunjavanje, omogućujući mehaničku potporu liofilizatu i elegantan izgled kolača (Trenkenschuh i Friess, 2021). Naime, zbog njegove kristalizacije i formiranja eutektičke smeše sa ledom, manitol se zadržava u odeljku sa kristalima leda, smanjujući mogućnost za interakciju sa nanočesticama. Dodatno, rastući kristali leda i manitola mogu vršiti mehaničku silu na nanočestice što vodi ka njihovoj agregaciji. Stoga, da bi postojao stabilišući efekat manitola, neophodno je da on barem delimično bude prisutan molekularski dispergovan u amorfnoj fazi. Pokazano je da mnoge supstance, kao što su natrijum-hlorid, natrijum-tetraborat i saharoza mogu inhibirati kristalizaciju manitola (Abdelwahed i sar., 2006b; Mohammady i sar., 2020). Međutim, iako kao amorfna supstanca može formirati vodonične veze, ova forma manitola može imati negativan uticaj na stabilnost (Jena i sar., 2016).

Analogno liofilizaciji proteina, surfaktanti kao što je polisorbitat 80 imaju značajnu ulogu u liofilizaciji nanočestica. U formulacijama proteina, dodatak surfaktanta smanjuje površinski napon i na taj način smanjuje adsorpciju proteina na međupovršinu led-voda. Isto se može očekivati u formulaciji nanočestičnih suspenzija (Abdelwahed i sar., 2006b). Sa druge strane, dodatak poloksamera može biti nepovoljan. Njihova rastvorljivost se povećava sa smanjenjem temperature zbog povećanja hidratisanosti polioksietilenskih i polioksipropilenskih blokova, pa se smanjuju

dinamički pokreti lanaca na površini nanočestica (Abdelwahed i sar., 2006a). Drugo objašnjenje za agregaciju čestica stabilisanih poloksamerom je njegova kristalizacija tokom smrzavanja, u odsustvu krioprotektanta. Međutim, u prisustvu krioprotektanta, dolazi do dehidratacije poloksamera u rastvoru, što forsira njegovo adsorbovanje na površini nanočestica. Pretpostavlja se da poloksameri u tom smislu mogu imati ulogu krioprotektanata, ali ne i lioprotektanta bez prisustva disaharida (Saez i sar., 2000). Interesantno je da saharoza inhibira kristalizaciju poloksamera, ali da trehaloza ne postiže taj efekat. Ova razmatranja su posebno interesantna sa aspekta određivanja parametra kritične temperature formulacije (engl. *critical formulation temperature*, CFT). Pri primarnom sušenju iznad ove temperature dolazi do morfoloških promena u kolaču koji se karakterišu kao „mikrokolaps”, „kolaps” ili „skupljanje” koji negativno utiču na kvalitet liofilizata (Beirowski i sar., 2011b).

Primarno sušenje, kao naredni korak u liofilizaciji takođe nosi rizike za stabilnost nanočestičnih formulacija. Pošto je voda integralni deo električnog dvosloja, dehidratacija dovodi do njegovog remećenja. Na ovakve spoljne uticaje posebno je osetljiv difuzioni sloj. Sa druge strane, kod sterno stabilisanih čestica, mobilnost surfaktanata i polimera na površini nanočestica može biti onemogućena u odsustvu vode. Stoga je zamena molekula vode neophodna za zadržavanje fizičko-hemijskih osobina nanočestica tokom i nakon sušenja (Trenkenschuh i Friess, 2021). Ovaj princip je osnova takozvane hipoteze zamene vode na kojoj se bazira stabilišući efekat lioprotektanata (Slika 1.3.3b). Pretpostavlja se da se formiranjem vodoničnih veza između lioprotektanata i stabilizatora nanočestica održava pseudo-hidratisano stanje, neophodno za stabilnost. Amorfno stanje lioprotektanata omogućuje maksimalno formiranje vodoničnih veza, pa je određivanje i praćenje fizičkog stanja lioprotektanata u formulaciji neophodan korak u karakterizaciji liofilizata (Abdelwahed i sar., 2006b). Hipoteza zamene vode je dokazana molekulskim simulacijama u kojima je došlo do formiranja vodoničnih veza između trehaloze i fosfolipida (Trenkenschuh i Friess, 2021). Kao lioprotektanti se najčešće koriste iste supstance kao i krioprotektanti.

Primarno sušenje se sprovodi na temperaturi ispod temperature kolapsa, T_c , kako bi se sprečio kolaps kolača. Kolaps kolača predstavlja promenu njegovog makroskopskog izgleda, što se vidi uglavnom kao njegovo skupljanje, dok nekolabiran kolač zauzima istu zapreminu kao suspenzija pre liofilizacije. Kolabiran kolač, osim nezadovoljavajućeg izgleda, uglavnom karakteriše produženo vreme rekonstitucije i povišen udeo rezidualne vlage, koji negativno utiče na stabilnost preparata. Pored toga, često u ovakvim preparatima dolazi do agregacije čestica. I u slučaju odsustva agregacije, ipak, ovakav preparat se odbacuje kao neprihvatljiv (Fonte i sar., 2016; Patel i sar., 2017).

Trećim korakom u liofilizaciji, sekundarnim sušenjem, smanjuje se rezidualna vlaga. Idealno, u farmaceutskim preparatima se smatra poželjnim manje od 1% vlage u liofilizatu (Abdelwahed i sar., 2006a), iako prema Evropskoj farmakopeji nema konkretnih zahteva. Međutim, primećeno je da pri korišćenju visoke koncentracije saharoze, veoma često nije moguće postići nizak stepen zaostale vlage. Jedno od objašnjenja za ovaj fenomen može se pronaći u adsorbovanoj vodi u kolaču i niskom stepenu difuzije na površinu, pa je u ovim slučajevima čak neophodno povećati temperaturu sušenja za postizanje boljih rezultata (Jennings, 1999). Međutim, kod amorfnihi liofilizata temperatura sekundarnog sušenja ne treba da bude viša od temperature staklastog prelaza (T_g) (Fonte i sar., 2016). Sadržaj vlage u finalnom preparatu treba da bude održavan na minimumu jer može negativno uticati na stabilnost. Pre svega tokom čuvanja može imati efekat plastifikatora (Beirowski i sar., 2012), a smanjujući T_g liofilizata ispod temperature čuvanja može indukovati kristalizaciju krio/lioprotektanta (Abdelwahed i sar., 2006a), na taj način smanjujući stabilnost preparata.

1.3.5. Farmakokinetički aspekti primene nanokristalnih disperzija

Zahvaljujući promenama fizičko-hemijskih karakteristika lekovite supstance usled smanjenja veličine čestica, očekuje se povećanje biološke raspoloživosti i maksimalne koncentracije u plazmi nakon primene, kao i smanjenje vremena za postizanje maksimalnih koncentracija (Shah i sar., 2016a). Pored gore pomenutih osobina, nanokristalne disperzije karakteriše gotovo stoprocentna opterećenost lekom, zbog malih koncentracija stabilizatora. Samim tim, smanjuje se mogućnost razvoja neželjenih efekata povezanih sa nosačem lekovite supstance, te se smatraju veoma bezbednim formulacijama. Intenzivno se proučavaju za sve puteve primene, pri čemu imaju poseban značaj i u prekliničkim istraživanjima lekova, kada je neophodno optimizovati *in vivo* ekspoziciju i smanjiti neželjene efekte. Nanosuspencije mogu poslužiti kao optimalni izbor s obzirom da omogućuju postizanje visokih koncentracija i ne sadrže visoke koncentracije različitih ekscipijenasa (Patel i sar., 2020).

Parenteralna primena. Primena slabo rastvorljivih supstanci u vidu rastvora intravenskim putem često nije moguća bez visokih koncentracija organskih rastvarača, korastvarača i/ili solubilizatora, čime se povećava rizik od razvoja neželjenih efekata, ali i toksičnosti koji potiču od ovih ekscipijenasa. Dodatno, povećava se mogućnost uticaja ekscipijenasa na farmakokinetičke i farmakodinamičke osobine lekovite/biološki aktivne supstance (Pestel i sar., 2006). Osnovna prednost nanokristalnih disperzija je, stoga, odsustvo organskih rastvarača i niska koncentracija stabilizatora.

Sudbina nanokristala u organizmu nakon intravenske primene zavisi od veličine čestica. Ukoliko je veličina čestica mala (manja od 200 nm) ili je supstanca velike intrinzičke rastvorljivosti, veoma brzo će doći do njihovog rastvaranja, pa će farmakokinetički profil biti sličan onom nakon primene rastvora. Ako je veličina čestica veća, nanokristali cirkulišu kroz organizam kao submikronske čestice i mogu biti prepoznati kao strana tela i eliminisani fagocitozom ćelija mononuklearnog fagocitnog sistema, a zatim akumulirani u jetri, slezini, plućima ili drugim organima. Ovaj proces može biti brz (kroz nekoliko minuta) ili sporiji, u zavisnosti od veličine i sastava formulacije (odnosno korišćenih stabilizatora). U fagocitnim ćelijama, nanočestice se sporo rastvaraju u fagolizozomima, i slobodna lipofilna lekovita supstanca može proći kroz membranu fagolizozoma u citoplazmu, a zatim napustiti ćeliju difuzijom zahvaljujući koncentracionom gradijentu. Rezultat je produženo oslobađanje lekovite supstance, a farmakokinetički parametri će biti različiti od onih nakon primene rastvora. Očekivano je da maksimalna koncentracija i površina ispod krive budu umanjene, a volumen distribucije, srednje vreme zadržavanja i poluvreme eliminacije povećani (Gao i sar., 2012). Teorija preuzimanja nanokristala od strane makrofaga i akumulacija u organima kao što je slezina potvrđena je vizuelizacijom kristala itrakonazola u makrofagama na mikrografijama slezine nakon intravenske primene nanosuspencija (Rabinow i sar., 2007). Iako postoji sumnja da je došlo do kristalizacije tokom pripreme uzorka za mikroskopiju, ovo je jedini dosadašnji nalaz kristala leka u makrofagama, dok su zaključci u ostalim radovima uglavnom izvedeni iz tumačenja razlika između farmakokinetičkih parametara dobijenih nakon primene različitih tretmana (Lu i sar., 2016).

Pri intramuskularnoj ili intraperitonealnoj primeni nanokristala, sa druge strane, očekuje se veća biološka raspoloživost u odnosu na primenu mikrosuspencije, što može uticati i na efikasnost lekova, osim u nekim slučajevima visokopotentnih lekovitih supstanci (Müller i sar., 2001).

Peroralna primena. Povećanje brzine rastvaranja i adhezivnosti za zid gastrointestinalnog trakta se smatraju najznačajnijim faktorima ovih formulacija koji dovode do povećanja biološke raspoloživosti nakon peroralne primene. Brzina rastvaranja održava koncentracioni gradijent što povećava brzinu apsorpcije. Međutim nekoliko faktora mogu uticati na stabilnost nanokristalnih čestica u gastrointestinalnom traktu – različite pH vrednosti u različitim delovima gastrointestinalnog trakta, povećana jonska jačina, prisustvo hrane, žučnih soli i slično (Gao i sar.,

2012; Shah i sar., 2016a). Na primer, kisela sredina u želucu može izazvati agregaciju nanokristala i umanjiti efekat smanjene veličine čestica na apsorpciju (Li i sar., 2021). Hrana može imati pozitivan ili negativan uticaj na apsorpciju slaborastvorljivih lekovitih suspstanci, međutim, eliminisanje efekta hrane je poželjno sa aspekta kliničke efikasnosti. U mnogim studijama je pokazano da nanokristali uspešno smanjuju varijacije u apsorpciji kada se primene na sito ili gladno. U stanju sitosti uglavnom je povećana sekrecija žučnih soli, što menja brzinu rastvaranja. Ove varijacije, zajedno sa interindividualnim varijacijama dovode do varijabilne apsorpcije. Kod mikroniziranih ili neusitnjenih čestica lekovite supstance, povećanje apsorpcije u stanju sitosti je verovatno posledica povećanja rastvorljivosti zahvaljujući formiranju micela žučnih kiselina/soli. U slučaju nanokristala, naprotiv, u osnovi povećane apsorpcije je povećanje brzine rastvaranja koja se zasniva na velikoj površini čestica, te ne zavisi od stanja sitosti/gladi (Shah i sar., 2016a).

Pored povećanja brzine rastvaranja, veliki značaj ima dobro poznata mukoadhezivnost nanočestičnih sistema. Adhezija za mukus zida gastrointestinalnog trakta dovodi do višeg koncentracionog gradijenta i produženog vremena zadržavanja, što vodi povećanju stepena apsorpcije. Modifikacijom formulacije nanočestičnih sistema mogu se postići jače interakcije sa mukozom. U tom smislu, površina čestica se oblaže katjonskim polimerima koji stupaju u elektrostatičke interakcije sa negativno naelektrisanom mukozom ili se nanokristali leka inkorporiraju u mukoadhezivne polimere (Gao i sar., 2012).

Povećanje oralne apsorpcije u literaturi je objašnjeno i mnogim drugim mehanizmima, kao što je povećanje permeabilnosti (Imono i sar., 2020), ali i preuzimanje nanokristala endocitozom i transcelularni transport kroz epitelne ćelije tankog creva. Prva barijera u apsorpciji je permeacija kroz zaštitni mukusni sloj i može biti uslovljena oblikom čestica, zbog različite rotacije i smicanja oko mukusne mreže (Guo i sar., 2019). Naredni korak internalizacije u ćelije takođe zavisi od veličine čestica zbog različitih promena energije savijanja membrane. Čestice oblika diska zahtevaju snažnije deformacije membrane u poređenju sa igličastim ili sfernim nanočesticama. Posledično, brzina endocitoze bila je najveća za sferne, zatim igličaste i na kraju čestice oblika diska (Li i sar., 2012; Li i sar., 2015).

Pored veličine čestica, veliku ulogu imaju i stabilizatori, s obzirom da stupaju u interakciju sa površinom ćelija. Različiti stabilizatori aktiviraju različite puteve internalizacije, a zatim i transport kroz ćeliju zbog različitih interakcija sa organelama (Tian i sar., 2022). Međutim, transcelularni transport je i dalje predmet debate, s obzirom da mnoge studije pokazuju da se supstance ipak apsorbuju u molekulskom obliku, pre nego u vidu nanokristalnih čestica (Zhang i sar., 2021). Interesantno je da u određenom stepenu postoji i mogućnost enterohepatične cirkulacije. Nanokristali mogu biti prepoznati i preuzeti od strane fagocitnih ćelija, koji zatim deluju kao depoi aktivne supstance. Preuzeti nanokristali bi se sporo rastvarali u fagocitima i zatim bi oslobođeni lek difundovao izvan ćelija. Na taj način bi maksimalne koncentracije bile nižih vrednosti i kasnije postignute, a farmakokinetički profil u plazmi pokazao bimodalnu raspodelu (Zhu i sar., 2022). Tačan mehanizam apsorpcije nanokristala do sada nije utvrđen. On značajno zavisi od karakteristika same lekovite supstance i fizičko-hemijskih osobina nanočestica. Stoga, veliki značaj imaju studije sa fluorescentno obeleženim nanočesticama, u kojima se prati njihov put kroz gastrointestinalni sistem (McGuckin i sar., 2022).

1.3.6. Nanokristalne disperzije na tržištu

Iako se nanosuspensije intenzivno proučavaju za sve puteve primene, najveći broj registrovanih lekova je za peroralni put primene, dok samo su dva leka za parenteralni put. Osim Invega Sustena (prethodno napunjen špric) svi lekovi su u čvrstoj formi, što potvrđuje da je kratka stabilnost ovih sistema u tečnoj formi njihov najveći nedostatak.

Tabela 1.3.1. Pregled registrovanih lekova koji sadrže nanokristale

Naziv (proizvođač/ inventor)	Lekovita supstanca (indikacija)	Put primene (farmaceutski oblik)	Tehnologija	Ekscipijensi*	Postignuti rezultati	Referenca
Invega Sustena® (Janssen Pharmaceuticals)	paliperidon- palmitat (shizofrenija)	intramuskularna primena (suspencija za injekciju u prethodno napunjenom špricu)	NanoCrystal®	polisorbat 20, PEG 4000, limunska kiselina monohidrat, natrijum hidroksid, dinatrijum hidrogen fosfat anhidrovani, natrijum dihidrogenfosfat monohidrat	mala zapremina primene, smanjen bol pri primeni, depo formulacija – povećanje poluvremena eliminacije (primena 1 x mesečno)	Ahire i sar., 2018; Gadekar i sar., 2021
Ryanodex ® (Eagle Pharmaceuticals)	dantrolen- natrijum (maligna hipertermija)	intravenska primena, (prašak za injekciju)	/	polisorbat 80, PVP K12, manitol, natrijum hidroksid ili hlorovodonična kiselina	manja zapremina primene, brza rekonstitucija, brža primena	Patel i sar., 2020
Rapamune® (Pfizer, Wyeth Pharmaceuticals)	sirolimus (prevencija odbacivanja organa nakon transplantacije)	oralna primena (tableta)	NanoCrystal®	laktoza, saharoza, PEG 8000, PEG 20000, MCC, kalcijum sulfat, talk, magnezijum stearat, titanijum dioksid, poloksamer 188, PVP, glicerol monooleat, dl-alfa tokoferol, karnauba vosak	olakšana primena (tableta umesto rastvora), veća bioraspoloživost	Haeri i sar., 2018
Emend (Merck)	aprepitant (antiemetik)	oralna primena (kapsula i prašak za oralnu suspenciju)	NanoCrystal®	punjenje kapsule: saharoza, MCC, HPC, SLS prašak za oralnu suspenciju: HPC, SLS, saharoza, anhidrovana laktoza, gvožđe oksid, natrijum stearilfumarat	NCE, visoka bioraspoloživost (ograničen apsorpcioni prozor), odsustvo efekata hrane	Haeri i sar., 2018
Tricor® (Abbott Laboratories)	fenofibrat (hiperholeste- rolemija ili dislipidemija)	oralna primena (tableta)	NanoCrystal®	SLS, laktoza monohidrat, PVP, krospovidon, MCC, koloidni bezvodni silicijum dioksid, natrijum stearilfumarat	apsorpcija nezavisna od unosa hrane	Gadekar i sar., 2021

Naziv (proizvođač/ inventor)	Lekovita supstanca (indikacija)	Put primene (farmaceutski oblik)	Tehnologija	Ekscipijensi*	Postignuti rezultati	Referenca
Triglide® (Skyepharma)	fenofibrat (hiperholeste- rolemija ili dislipidemija)	oralna primena (tableta)	homogenizacija pod visokim pritiskom IDD-P®	krospovidon, laktoza monohidrat, manitol, maltodekstrin, CMC natrijum, lecitin iz jajeta, kroskarmeloza natrijum, SLS, koloidni silicijum dioksid, magnezijum stearat, natrijum fosfat monobazni	apsorpcija nezavisna od unosa hrane	Gadekar i sar., 2021
Megace® ES (PAR Pharmaceuticals)	megestrol acetat (stimulans apetita kod pacijenata na hemoterapiji ili HIV pacijenata)	oralna primena (oralna suspencija)	NanoCrystal®	alkohol, veštački ukus limuna, limunska kiselina monohidrat, dokuzat natrijum, HPMC, prečišćena voda, natrijum benzoat, natrijum citrat dihidrat, saharoza	odsustvo efekata hrane, povećana bioraspoloživost, veća jačina leka, manji viskozitet formulacije	Haeri i sar., 2018
Avinza® (King Pharmaceuticals)	morfin sulfat (analgezija)	oralna primena (kapsule)	NanoCrystal®	amonijum metakrilat, fumarna kiselina, PVP, SLS, granule skroba i šećera, talk	produženo oslobađanje u odnosu na rastvor (primena 1 x dnevno)	Bhalani i sar., 2022
Zanaflex Capsules® (Acorda)	tizanidin hidrohlorid (terapija spazama)	oralna primena (kapsule)	NanoCrystal®	HPMC, silicijum-dioksid, šećerne granule, titanijum dioksid	odsustvo efekata hrane	Bhalani i sar., 2022

*lista ekscipijenasa preuzeta je iz sažetaka karakteristika navedenih lekova; PEG – polietilenglikol, HPC – hidroksipropilceluloza, CMC – karboksimetilceluloza, HPMC – hidroksipropilmetilceluloza, PVP – polivinilpirolidon, MCC – mikrokristalna celuloza, SLS – natrijum-laurilsulfat

1.4. Lipidne nanočestice

1.4.1. Definicija, vrste i struktura lipidnih nanočestica

Lipidne nanočestice su čvrsti koloidni nosači koji se sastoje od lipidnog matriksa stabilizovanog određenim stabilizatorima. Razvijene su nakon što je ulje u nanoemulzijama zamenjeno čvrstim lipidom, zahvaljujući čemu je omogućeno kontrolisano oslobađanje supstance. Lipidne nanočestice su zadržale prednosti prethodnih nanonosaa (liposomi, polimerne nanočestice i nanoemulzije) kao što je visok solubilizacioni kapacitet za liposolubilne lekovite supstance i mogućnost ciljane isporuke, ali su i prevazišle nedostatke toksičnosti, otežane proizvodnje i korišćenja organskih rastvarača pri izradi (Wissing i sar., 2004). Iako su inicijalno razvijane za parenteralni put primene, danas se proučavaju za gotovo sve puteve primene uključujući oralni, dermalni, okularni i rektalni, kao i za različite terapijske oblasti (Joshi i Müller, 2009; Scioli Montoto i sar., 2020). Smatraju se netoksičnim, biorazgradivim i formulacijama lakim za proizvodnju (Scioli Montoto i sar., 2020).

Prvu generaciju lipidnih nanočestica predstavljaju čvrste lipidne nanočestice (engl. *solid lipid nanoparticles*, SLN) čiji se lipidni matriks sastoji samo iz čvrstog lipida. Zanimljivo je da su ih u isto vreme patentirala dva nezavisna istraživačka tima pritom opisujući različite načine njihove izrade. Tim prof. R. H. Müllera nanočestice je dobijao metodom homogenizacije pod visokim pritiskom. Na taj način dobijene su čestice sastava sličnog koloidnim emulzijama (Lucks i Müller, 1993). Drugi tim istraživača okupljenih oko prof. M. R. Gasco opisao je postupak dobijanja nanočestica iz mikroemulzija (Gasco, 1993). U SLN lekovita supstanca može biti homogeno distribuirana ili se prevashodno nalaziti u omotaču ili jezgru lipidne nanočestice, zavisno od njenih osobina, ali i načina izrade. Lokalizacija lekovite supstance unutar lipidnog matriksa utiče na njeno oslobađanje: lekovita supstanca koja se preraspodelila u lipidno jezgro će imati produženo oslobađanje, a lekovita supstanca koja se nalazi u omotaču trenutno i naglo oslobađanje (Müller i sar., 2000). Međutim, veliki nedostatak ovog tipa nosaa jeste ograničen prostor za inkorporiranje lekovite supstance, što dovodi do njene ekspanzije, veoma često brzo nakon izrade.

Kako bi se prevazišao nizak stepen opterećenja SLN, razvijeni su nanostrukturirani lipidni nosači (engl. *nanostructured lipid carriers*, NLC). Kod ovih nanočestica je u strukturu lipidnog matriksa uključen i tečni lipid ali čestice zadržavaju čvrsto stanje na sobnoj temperaturi i temperaturi tela. Zahvaljujući tome struktura lipidnog matriksa biva manje organizovana, a povećanje kapaciteta punjenja se postiže i zbog veće rastvorljivosti supstanci u uljima nego u čvrstom lipidu (Müller i sar., 2002a; Jennings i sar., 2000). U zavisnosti od sastava (vrste i udela tečnog lipida) razlikuju se tri tipa NLC (Agrawal i sar., 2020; Pardeike i sar., 2009; Wissing i sar., 2004):

1. Nesavršeni tip NLC koji nastaje mešanjem čvrstog lipida sa malom količinom tečnog lipida. Na ovaj način povećava se rastojanje između lanaca glicerida, i posledično prostor za inkorporiranje supstanci.
2. Amorfni tip NLC u kojima je sprečena kristalizacija lipida. Ovaj tip NLC se uglavnom dobija nakon mešanja čvrstog lipida sa izopropil miristatom, hidroksioktanosil hidrosi stearatom, i sl. Amorfno jezgro sprečava ekspanziju lekovite supstance tokom čuvanja zbog neuređene strukture koja ima veći prostor za inkapsulaciju supstanci.
3. Mešoviti tip NLC kod koga je prisutan veći udeo tečnog lipida. Zbog prekoračenja rastvorljivosti ulja u čvrstom lipidu stvaraju se nanokompartimenti ulja. Ovaj tip NLC je rezervisan za supstance koje se dobro rastvaraju u uljima – na ovaj način su i dalje zaštićene od degradacije iako su rastvorene u tečnom lipidu, a postiže se i produženo oslobađanje.

Alternativni pristup za povećanje solubilizacionog kapaciteta SLN je dodatak lecitina u relativno visokoj koncentraciji, tako da dolazi do formiranja reverzibilnih micela ili tečnih kristala. Ovaj pristup je iskorišćen za supstance različitih fizičko-hemijskih osobina kao što su pilokarpin baza i pilokarpin-hidrohlorid, 17 β -estradiol hemihidrat, mikonazol-nitrat i diklofenak-natrijum (Attama i

sar., 2008; Kenechukwu i sar., 2017; Friedrich i Müller-Goymann, 2003). Pokazano je da se količina solubilizovane lekovite supstance povećava linearno sa povećanjem koncentracije lecitina u lipidnoj smeši (Friedrich i Müller-Goymann, 2003). Dodatno, na primeru lipidnih nanočestica sa diklofenak-natrijumom pokazan je značajan uticaj fosfolipida na efikasnost inkapsulacije. Na taj način zaključeno je da lipidni matriks sadrži prostor za uključivanje supstance u prisustvu fosfolipida, pritom povećavajući i stabilnost ka ekspulziji (Attama i sar., 2008).

Detaljno su proučavane lipidne smeše sa i do 50% lecitina i pokazano je da lecitin utiče na kristalizaciju čvrstog lipida. Nakon kristalizacije u α -formu lipida, veoma brzo, u toku 24 h, dolazi do polimorfnog prelaza u β' oblik, koji dalje prelazi u β formu ali znatno sporije, tokom čuvanja. Povećanjem udela lecitina u lipidnoj smeši dolazi do povećanja kinetike kristalizacije. Međutim, lecitin u smeši nije molekularno inkorporiran u kristalnoj rešetki, već kristališe kao zasebna faza (Schubert i sar., 2005). Usled preraspodele lecitina na međupovršinu tokom pripreme nanočestica (posebno toplim postupkom homogenizacije pod visokim pritiskom), efikasnost inkapsulacije može biti smanjena kada se lipidna smeša prevede u nanometarske veličine. U nižim koncentracijama lecitin se nalazi na površini u formi monosloja, ali u višim koncentracijama može se formirati višeslojni omotač oko lipidnog jezgra. Sa koncentracijom lecitina iznad 30%, njegova interakcija sa površinom čestice može biti smanjena, što može dovesti do prelaska lecitina u vodenu fazu disperzije i formiranja liposoma i/ili mešovityh micela, ugrožavajući stabilnost i kapacitet punjenja nanočestica (Schubert i sar., 2006, Schubert i Müller-Goymann, 2005). Zaista, termalnom analizom je pokazano da je distribucija lecitina različita u dispergovanim i nedispergovanim sistemima (Schubert i sar., 2005). Stoga, prilikom razvoja ove vrste nosača neophodna je detaljna fizičko-hemijska, ali i strukturna karakterizacija lipidnih smeša, kao i dobijenih nanočestica.

1.4.2. Formulacija lipidnih nanočestica

Lipidi

Veliki broj lipida različitog sastava i osobina je proučavan pri razvoju lipidnih nanočestica, od triglicerida kao što su tripalmitin, tristearin, trilaurin, trimiristin, mono- i digliceridi kao što su gliceril monostearat, gliceril dibehenat i estri kao što je cetil palmitat. Mnogi komercijalno dostupni čvrsti lipidi zapravo predstavljaju smeše što može doprineti njihovoj funkcionalnosti. Jedan od primera je Precirol® ATO koji sadrži smešu gliceril distearata, gliceril tristearata, gliceril tripalmitata i gliceril dipalmitata. U istraživanjima lipidnih nanočestica sa visokim udelom lecitina intenzivno su proučavane smeše čvrstih triglicerida Softisan® 100 ili Softisan® 142 (hidrogenizovani kokogliceridi), a posebno Softisan® 154 (hidrogenizovano palmino ulje). Softisan® 154 (S154) predstavlja smešu triglicerida prirodnih, hidrogenizovanih linearnih masnih kiselina sa parnim brojem C-atoma (C_{10} - C_{18}).

Prilikom izbora lipida razmatraju se rastvorljivost leka u čvrstom lipidu, temperatura topljenja, njihova kristalizacija i kompatibilnost odnosno mešanje sa drugim ekscipijensima (Negi i sar., 2014). S obzirom da se većina načina izrade zasniva na topljenju čvrstog lipida neophodno je obezbediti kristalizaciju tokom hlađenja dispergovanog lipidnog matriksa. Kristalizacija kapljica emulzija koje su dobijene tokom homogenizacije zahteva hlađenje formulacije ispod kritične temperature kristalizacije. Ovaj parametar je karakterističan za korišćeni lipid, ali može biti modifikovan drugim ekscipijensima ili lekovitom supstancom. Za lipide sa izuzetno niskom kritičnom temperaturom kristalizacije, za kristalizaciju je neophodno obezbediti hlađenje u frižideru ili pri temperaturama ispod 0 °C, što može ugroziti stabilnost disperzije. Sa druge strane, korišćenje triglicerida sa različitim dužinama lanaca masnih kiselina uglavnom dovodi do povećanja temperature kristalizacije (Bunjies, 2011). Pored toga, korišćenje surfaktanata sa dugim zasićenim alkil lancima takođe može povećati temperaturu kristalizacije, odnosno promovisati kristalizaciju. Pokazano je da se trigliceridi na površini čestice stabilizovane polisorbitom 80 orijentišu paralelno

u odnosu na površinu čestice, ukazujući na kristalizaciju procesom tzv. *surface templating* (Arima i sar., 2009).

Trigliceridi inicijalno uglavnom kristališu u α oblik koji je metastabilan. Tokom čuvanja, veoma često u roku od nekoliko dana ili nedelja, dolazi do polimorfnog prelaza u β' i zatim u β oblik, a može se naći i intermedijarni oblik β_1 . Polimorfne tranzicije su uglavnom ubrzane kada je lipid dispergovan, a zavise i od sastava lipida (Bunjies, 2011). Na ovaj proces značajan uticaj imaju stabilizatori, pa je velika pažnja posvećena ovim istraživanjima (Sonoda i sar., 2006). Tako nezasićeni nejonski stabilizatori sa kratkim alkil lancima i fosfolipidi olakšavaju prelaz u stabilniji oblik. Suprotno, prilikom korišćenja fosfolipida sa zasićenim dugolančanim masnim kiselinama usporen polimorfni prelaz je verovatno povezan sa formiranjem rigidnog omotača očvrstlog fosfolipida oko nanočestice. Ovaj omotač može smanjiti prostor i mobilnost molekula, koji su potrebni za preuređenje tokom promene polimorfnog oblika. Sa druge strane, stabilizatori koji formiraju fluidniji sloj na površini nanočestica, nezasićeni fosfolipidi, mogu ubrzati promene oblika (Bunjies i Koch, 2005; Bunjies i sar., 2007, Salminen i sar., 2014).

Stabilizatori

Za stabilizaciju se koriste različiti surfaktanti kao što su poloksameri, polisorbati, natrijum-holat, polioksietilenski estri 12-hidroksistearinske kiseline (Solutol® HS15) i lecitini (Agrawal i sar., 2020). Njihova koncentracija uglavnom zavisi od udela masne faze. Veoma često se kombinuje više različitih stabilizatora, zbog boljeg pakovanja na površini nanočestica. Analogno nanoemulzijama, pri formulaciji lipidnih nanočestica stabilizovanim fosfolipidima, zbog velike zakrivljenosti površine čestice pogodan je dodatak uglavnom sternih kostabilizatora kao što su polisorbati. Fosfolipidi imaju tendenciju ka formiranju filma u ravnoj geometriji, pa dodatkom kostabilizatora se povećava fleksibilnost omotača (Klang i Valenta, 2011). Međutim, potreba za dodatnim stabilizatorom zavisi i od drugih konstituenata u formulaciji lipidnih nanočestica, pa se mogu dobiti nanočestice zadovoljavajućih osobina stabilizovane samo lecitinom (Savić i sar., 2017).

Na tržištu postoji veliki broj dostupnih lecitina različitog sastava. Iako se pojam lecitina vezuje za fosfolipide, on predstavlja zapravo smešu različitih fosfolipida i masnih kiselina (Klang i Valenta 2011). Od toga veoma zavise njihove osobine, ali i uticaj na strukturu lipidnih nanočestica (Bunjies i Koch, 2005). Fosfolipidi, zahvaljujući amfifilnoj strukturi formiraju različite termotropne i liotropne faze. Većina fosfolipida formira trodimenzionalnu strukturu lamelarnih tečnih kristala na niskim temperaturama ili pri niskom nivou hidratacije. Pored toga, mogu biti formirani drugi čvrsti dvodimenzioni lamelarni kristali ili gel faze. Fazne promene, koje mogu biti okarakterisane kao čvrsto-čvrsto, topljenje lanaca ili tečne fazne promene su uglavnom indukovane varijacijama temperature. Prilikom povećanja temperature iznad određene granice, ugljovodonični lanci postaju tečni, pa dolazi do promena iz faze nalik čvstom stanju u strukturu sličnu tečnoj. Temperatura pri kojoj dolazi do promena zavisi od vrste i dužine lanca fosfolipida: fazne promene su pomerene ka višim temperaturama sa povećanjem dužine lanca. U okviru tečnih struktura, fosfolipidi imaju tendenciju da formiraju dvosloje kada se nađu u vodi (vodeći ka formiranju vezikularnih struktura poznatih kao liposomi), a u uljima ova struktura se uglavnom odvaja na dva monosloja (Pichot i sar., 2013). U smeši sa lipidima, na mikrografijama dobijenim transmissionom elektronskom mikroskopijom, uočavali su se sferni agregati veličine oko 10-20 nm između slojeva. Ovaj nalaz je potvrdio prisustvo reverznih micela, čak i nakon hlađenja lipidne smeše. Pri povećanoj koncentraciji fosfolipida pretpostavlja se da se formiraju i drugi tipovi struktura lecitina u čvrstom stanju kao što su lamele ili njihova lokalizacija između molekula triglicerida (Friedrich i Müller-Goymann, 2003).

1.4.3. Metode izrade lipidnih nanočestica

Na početku istraživanja lipidnih nanočestica su predložene dve metode izrade - mikroemulziona tehnika i homogenizacija pod visokim pritiskom. Danas, u literaturi se pored pomenutih metoda sreću i nanoprecipitacija, ultrasonifikacija, tehnika emulzifikacije/evaporacije rastvarača i ekstruzija kroz pore membranskog filtera. Od svih pomenutih najčešće korišćena metoda je homogenizacija pod visokim pritiskom jer se već koristi u industriji za proizvodnju nanoemulzija (Agrawal i sar., 2020). Od razvoja vakcina za COVID-19, proizvodnja lipidnih nanočestica metodama mikrofluidizacije postaje fokus mnogih istraživanja, posebno pri razvoju lipidnih nanočestica sa nukleinskim kiselinama (Prakash i sar., 2022).

Homogenizacija pod visokim pritiskom se zasniva na propuštanju tečnosti pod veoma velikim pritiskom (100-2000 bar) kroz veoma uzak otvor (veličine nekoliko mikrometara) čime se na malom rastojanju postižu velike brzine (preko 1000 km/h). Dejstvom sila smicanja i kavitacionih sila, dobijaju se čestice submikronskih razmera (Mehnert i Mäder, 2001). Ovom metodom dobijaju se čestice male veličine sa uskom raspoделom veličina, a s obzirom na široku zastupljenost homogenizacije pod visokim pritiskom u proizvodnji nanoemulzija za parenteralnu ishranu, *scale-up* sa laboratorijskog na industrijski nivo ne predstavlja prepreku. Homogenizacija pod visokim pritiskom se može sprovesti na povišenoj temperaturi (topla homogenizacija pod visokim pritiskom) ili na sobnoj temperaturi (hladna homogenizacija pod visokim pritiskom).

Topla homogenizacija se sprovodi na temperaturama višim od temperature topljenja lipida. Najpre se pravi rastvor lekovite supstance u lipidnoj fazi uz zagrevanje na temperaturu koja je za 5-10 °C viša od temperature topljenja lipidne smeše. Zatim se mešanjem ovog rastvora sa vodenom fazom (vodeni rastvor surfaktanta uz eventualni dodatak drugih ekscipijenasa) zagrejanom na istoj temperaturi dobija pre-emulzija veličine kapi nekoliko mikrometara. Tako dobijena pre-emulzija se propušta kroz homogenizator pod visokim pritiskom na povišenoj temperaturi, pri čemu nastaje nanoemulzija. Homogenizacija se može vršiti u nekoliko ciklusa, uobičajeno za SLN i NLC 3-5 ciklusa pri pritisku 500-1500 bar, ali za izradu lipidnih nanočestica sa visokim udelom lecitina neophodno je propustiti formulaciju i do 20 puta. U cilju dobijanja lipidnih nanočestica, odnosno očvršćavanja lipidnog matriksa, dobijena nanoemulzija se hladi na sobnoj temperaturi ili u ledenom kupatilu, zavisno od karakteristika lipidne faze (Tapeinos i sar., 2017; Pottou i sar., 2020).

Hladni postupak homogenizacije pod visokim pritiskom je metoda izbora za izradu/proizvodnju lipidnih nanočestica sa supstancama koje su izrazito termolabilne jer će supstanca biti kraće izložena visokoj temperaturi. Ovaj postupak je takođe pogodan za supstance koje su hidrofilne jer se smanjuje kontakt sa vodenom fazom, a time i mogućnost preraspodele lekovite supstance u nju. Prva faza u hladnoj homogenizaciji - izrada rastvora lekovite supstance u lipidu, ista je kao u toplom postupku homogenizacije pod visokim pritiskom. Rastvor se zatim hladi u tečnom azotu i usitnjava do čestica mikrometarskih veličina (50-100 μm). Velika brzina hlađenja omogućuje homogeno distribuiranje lekovite supstance u lipidnoj fazi, pa je veća verovatnoća dobiti i nanočestice sa takvim rasporedom lekovite supstance. Mikročestice se disperguju u hladnoj vodenoj fazi, nakon čega se pre-suspenzija propušta kroz homogenizator pod visokim pritiskom na sobnoj temperaturi ili nižoj. Generalno, na ovaj način dobijaju se nanočestice nešto veće veličine i šire distribucije veličine nego toplim postupkom homogenizacije (Müller i sar., 2000; Mehnert i Mäder, 2001; Kumar i sar., 2022).

1.4.4. Farmakokinetički aspekti primene lipidnih nanočestica

Najveći broj lipidnih nanočestica se istražuje za parenteralni i oralni put primene (Scioli Montoto i sar., 2020). Nakon intravenske primene, veoma brzo nakon što nanočestice dospeju u cirkulaciju oko njih se formira omotač sastavljen od bioloških makromolekula, poznat kao protein korona. Ovaj omotač je sastavljen od dva sloja, u zavisnosti od vremena kontakta proteina i nanočestice. U

početku nastaje rastresit sloj, engl. *soft corona* sastavljen od proteina sa niskim afinitetom ali prisutnim u visokoj koncentraciji. Ovi proteini su u stalnoj ravnoteži između površine čestica i biološkog medijuma (proces poznat kao Vrumanov efekat, engl. *Vroman effect*). U drugom stadijumu, ovi proteini bivaju zamenjeni onim sa višim afinitetom ali prisutnim u manjem obimu u okruženju. Oni ostaju u asocijaciji sa nanočesticama u dužem vremenskom periodu, obrazujući čvrst korona omotač (engl. *hard corona*) (Baimanov i sar, 2019). Na ovaj način zapravo se fizičkohemijske osobine površine nanočestica menjaju u biološkom okruženju (Lima i sar., 2020, Yuan i sar., 2019). Vezivanje proteina, međutim, ne zavisi samo od njihovog afiniteta već i od karakteristika površine nanočestice, odnosno od stabilizatora. Adsorpcija proteina komplementa, poznatijih kao opsonini dovodi do prepoznavanja nanočestica od strane makrofaga i njihovog transporta u jetru, odnosno smanjenja vremena zadržavanja u cirkulaciji (Scioli Montoto i sar., 2020). Generalno, distribucija nanočestica u različita tkiva, zbog njihove veličine, biće pre vođena konvekcijom nego difuzijom, i vodiće akumuliranju u tkivima sa propustljivom vaskulaturom kao što su jetra, slezina i bubreg (Yuan i sar., 2019).

Veliki broj radova pokazao je povećanje biološke raspoloživosti nakon oralne primene lipidnih nanočestica, ali konkretan mehanizam kojim se to ostvaruje još uvek nije razjašnjen. Pretpostavlja se da je jedan od načina povećanja biološke raspoloživosti zaštita lekovite supstance od razgradnje u gastrointestinalnom traktu posredstvom enzima ili pod uticajem različite pH vrednosti, ali i smanjenje metaboličke razgradnje u jetri (Baek i Cho, 2017). Pored toga, hidrofobna površina lipidnih nanočestica ima tendenciju ka adheziji za mukozni sloj. Površina mukoznog sloja je kontinuirano i relativno brzo „ispirana” u cilju zaštite od patogena i čestica. Modifikacijom površine mogu se razviti mukoadhezivne čestice (engl. *mucoadhesive particles*, MAP) i mukus penetrirajuće čestice (engl. *mucus penetrating particles*, MPP). Pokazano je da MAP agregiraju u mukusu u centru lumena gastrointestinalnog trakta, daleko od epitelnog sloja, dok pri apsorpciji voda u gastrointestinalnom traktu brzo i ravnomerno transportuje MPP do epitelnih površina, uključujući dostizanje površina između resica u tankom crevu. To sugeriše da će isporuka lekovite supstance ne-mukoadhezivnim MPP može verovatno obezbediti poboljšanu distribuciju čestica, a time i isporuku leka (Maisel i sar., 2015).

Tokom zadržavanja lipidnih nanočestica u lumenu creva može doći do njihove razgradnje pod dejstvom lipolitičkih enzima pankreasa. Poznato je da simultana primena lipida i lekovite supstance dovodi do povećane apsorpcije. Lipidi imaju efekat unapređenja apsorpcije, što je iskorišćeno pri razvoju mnogih samo-emulgujućih sistema. Pod dejstvom enzima, lipidi se razgrađuju i formiraju mešovite micelle sa žučnim solima koji dovode do poboljšanja apsorpcije leka. Da bi lek bio efikasno i brzo solubilizovan u formiranim micelama, neophodno je da bude u blizini lipida, i po mogućstvu rastvoren u lipidnoj fazi. Degradacija i solubilizacija je brža ukoliko su lipidne kapi manje, poželjno nanometarske veličine (Müller i sar., 2006).

Suprotno, u odsustvu razgradnje, pretpostavlja se da intaktne lipidne nanočestice apsorbuju na neki od sledećih načina: paracelularno, transcelularno ili preko limfne cirkulacije. Paracelularnim prolaskom mogu se apsorbovati male, hidrofилne i naelektrisane čestice. Čvrste veze između ćelija blokiraju prolaz za čestice veće od 1 nm, stoga većina nanočestica ne može biti transportovana na ovaj način. I kada je u pitanju transcelularni transport, veliku ulogu ima veličina čestica. Na primer, čestice veličine oko 1 μm mogu biti preuzete fagocitozom, dok manje čestice mogu biti apsorbovane kroz M ćelije asociirane oko Pejerovih ploča. Nanočestice veličine manje od 200 nm mogu biti transportovane endocitozom kroz enterocite (Salah i sar., 2020).

Generalno, transcitoza se sprovodi kroz jedan od dva mehanizma - fagocitoza ili pinocitoza (koja može biti posredovana klatrinom i klaveolinom). Inicijalno, nanočestica biva zahvaćena ćelijskom membranom i formira se vezikula. Dalja sudbina čestice može biti: degradacija u lizozomima, preuzimanje od strane određenih organela, oslobađanje sadržaja u citosol ili izbacivanje u ekstracelularni prostor egzocitozom. Najveći broj nanočestica nakon preuzimanja biva

transportovan putem endolizozoma, u kojima se uglavnom razgrađuju, te samo 2,5% nanočestica biva transportovano do bazolateralne strane (Salah i sar., 2020; Scioli Montoto i sar., 2020; Neves i sar., 2016). Ovo je potvrđeno *in vivo* studijama posebnom metodom fluorescencije. Iako nanočestice u velikoj meri budu preuzete u ćelije, ne dolazi do njihove penetracije kroz ćelijski monosloj, već se koncentrišu na njegovoj površini (Hu i sar., 2016). Zbog toga, jedan od načina sprečavanja degradacije jeste zaobilazanje ovog puta ili izazivanje fuzije lizozoma ili endozoma sa membranom i izbacivanje sadržaja iz ćelije. Pokazano je da pozitivno naelektrisane čestice napuštaju lizosome, dok se negativno naelektrisane čestice u njima zadržavaju (Salah i sar., 2020).

Isporka lekovitih supstanci putem limfnog sistema imala bi velike prednosti uključujući zaobilazanje metabolizma prvog prolaza (Jawahar i sar., 2018). Dodatno, limfni kapilari epitela limfnih folikula su značajno više propustljivi od krvnih kapilara. Transport obuhvata paracelularni i transcelularni mehanizam, od kojih je najznačajnija transcitoza kroz M ćelije Pejerovih ploča. Ove ćelije poseduju veliku efikasnost transcitoze i smanjenu lizozomalnu aktivnost. Preuzimanje u limfu značajno zavisi od hidrofobnosti nanočestica, prirode lipida i dužine lanaca (Salah i sar., 2020). Međutim doprinos preuzimanja putem limfe u celokupnoj oralnoj bioraspoloživosti je uglavnom mali (Ma i sar., 2017). Jedan od razloga može biti razgradnja u želucu, koja se može prevazići zaštitom od kiselog okruženja enteričkim omotačem ili intraduodenalnom primenom, kako je pokazano na primeru klopazina (Venkateswarlu i Manjunath, 2004; Manjunath i Venkateswarlu, 2005).

1.4.5. Pregled registrovanih lekova koji sadrže lipidne nanočestice

Iako se intenzivno proučavaju skoro trideset godina, tek 2018. godine se prvi lek sa lipidnim nanočesticama našao na tržištu. U pitanju je Onpattro® (Alnylam Pharmaceuticals Inc, SAD) koji sadrži malu interferirajuću ribonukleinsku kiselinu (siRNK) koja se koristi u terapiji nasledne transtiretin amiloidoze (Gadekar i sar, 2021). On je kasnije poslužio kao osnova za razvoj formulacije vakcina za COVID-19, sa informacionom ribonukleinskom kiselinom (iRNK). Zbog toga što služe za isporuku RNK, sastav i struktura ovih lipidnih nanočestica su specifični. Svi sadrže četiri lipida: (1) jonizujući katjonski lipid, (2) 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoholin (DSPC), (3) holesterol i (4) konjugat polietilen glikola (PEG) i lipida koji treba da produži vreme cirkulacije. Najznačajniju ulogu imaju jonizujući katjonski lipidi koji omogućuju inkapsulaciju nukleinske kiseline (zahvaljujući elektrostatičkim interakcijama) i posreduju u remećenju membrane endozoma da bi se omogućilo oslobađanje nukleinske kiseline u citosol što predstavlja ključni momenat za efikasnost. Dodatno, mogu imati pozitivan uticaj na endozomalno preuzimanje ili zahvaljujući interakciji sa ćelijskom membranom koja je negativno naelektrisana ili vezivanjem za proteine plazme (Albertsen i sar., 2022).

Razlog za mali broj lekova na tržištu može se naći u *scale up*-u na industrijski nivo, toksikološkim aspektima, složenosti sistema i otežanoj karakterizaciji, ali i postojanju nedovoljno dokaza za njihovu uspešnost kada pređu u kliničke studije (Kumar i sar., 2022). Rastuće interesovanje farmaceutskih kompanija za nanolekove donelo je velika ulaganja u razvoj novih generacija lekova, stoga se očekuje da će dalje podstaći ulazak novih lekova koji sadrže nanočestice na tržište. Pored toga, pojava i razvoj generika postojećih odobrenih proizvoda takođe može doprineti rastu tržišta. Uprkos višestrukim izazovima u komercijalizaciji nanočestičnih lekova od istraživanja do tržišta, objavljivanje smernice za proizvode zasnovane na nanotehnologiji od strane FDA, bolje razumevanje složenosti nanočestica i njihove biološke interakcije, zajedno sa boljim alatima za karakterizaciju, doprineće u prevazilaženju ovih izazova i na taj način pomoći da se povećaju terapije zasnovane na nanolekovima (Gadekar i sar., 2021).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je razvoj nanoformulacija za primenu novosintetisanih deuterisanih pirazolohinolinonskih liganada DK-I-56-1 i DK-I-60-3, vođen fizičko-hemijskim karakteristikama ovih supstanci, na prvom mestu niskom rastvorljivošću. U toku (pre)formulacionog razvoja sprovedene su sveobuhvatna fizičko-hemijska, strukturna i *in vivo* karakterizacija sa ciljem procene mogućnosti primene dobijenih nano-nosača u farmakološkim prekliničkim istraživanjima ispitivanih liganada. Istraživanje je bilo podeljeno u četiri faze.

Cilj prve faze bio je fizičko-hemijsko profilisanje supstanci DK-I-56-1 i DK-I-60-3. S obzirom na nedostatak literaturnih podataka o osobinama supstanci, sprovedeni eksperimenti bili su usmereni ka dobijanju informacija od značaja za odabir odgovarajućih formulacionih pristupa za prevazilaženje slabe rastvorljivosti i posledično niske biološke raspoloživosti nakon primene. Najpre je okarakterisan prašak supstance u pogledu kristalnih osobina i veličine čestica mikroskopijom i difrakcijom X-zraka na uzorku praška. Zatim je ispitivana saturaciona rastvorljivost supstanci u vodi, odabranim puferima, kao i različitim uljima, korastvaračima i organskim rastvaračima. Odabir korastvarača u kojima je ispitana saturaciona rastvorljivost sprovedena je na osnovu mogućnosti njihovog uključivanja u parenteralne formulacije kako bi se izbeglo korišćenje organskih rastvarača u visokim koncentracijama. Dalje, termalnom analizom ispitano je ponašanje supstance pri zagrevanju, određena temperatura topljenja i procenjena mogućnost prevođenja supstanci u amorfni oblik. Detaljno su ispitane lipidne smeše, najpre čvrstog lipida (Softisan 154) i tečnog lipida (triglicerida srednje dužine lanca), a zatim i čvrstog lipida (Softisan 154) i lecitina soje i mogućnosti rastvaranja DK-I-60-3 u njima. Ovi eksperimenti uključivali su termalnu analizu i polarizacionu mikroskopiju. Na osnovu rezultata dobijenih iz ove faze, cilj je bio izvršiti odabir dva tipa nanoformulacija i načina njihove izrade uzimajući u obzir fizičko-hemijske osobine pomenutih supstanci, ali i bezbednost formulacije za parenteralni i oralni put primene i preporučenu efikasnu dozu za *in vivo* studije na animalnim modelima.

U drugoj fazi eksperimentalnog rada cilj je bio formulacija i sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija i procena stabilnosti nanokristalnih disperzija DK-I-60-3 i DK-I-56-1, namenjenih za oralnu i parenteralnu primenu, respektivno. Disperzije nanokristala pripremane su metodom kugličnog usitnjavanja u tečnom medijumu. Kroz odabir procesnih parametara (količina kuglica i vreme usitnjavanja) i formulacionih parametara (vrste i koncentracije stabilizatora – polisorbit 80, poloksamer 407, poloksamer 188, D- α -tokoferol polietilenglikol 1000 sukcinat, natrijum-laurilsulfat, polivinilpirolidon K25) cilj je bio razviti disperzije nanokristala male i ujednačene veličine čestica sa zadovoljavajućom kratkoročnom stabilnošću. Formulacije su detaljno okarakterisane u pogledu veličine čestica (metodama dinamičkog rasipanja svetlosti i laserskom difrakcijom), zeta potencijala, morfologije (mikroskopijom atomskih sila), osobina čvrstog stanja (diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom i difrakcijom X-zraka na uzorku praška) kao i rastvorljivosti i brzine rastvaranja (metoda sa dijaliznim vrećicama). Dodatno, kroz inkubiranje u odabranim puferima sa ili bez proteina, procenjeno je njihovo moguće ponašanje *in vivo* nakon primene.

Kao poseban deo ove faze, ispitivana je liofilizacija za prevođenje tečnih disperzija u čvrst oblik. Kroz praćenje stabilnosti dobijenih liofilizata, cilj je bio izbor odgovarajućih parametara procesa, kao i koncentracije krio-/lioprotektanata u kombinaciji sa sredstvom za dopunjavanje za dobijanje preparata zadovoljavajućih osobina. Najpre je ispitana efikasnost različitih koncentracija krio-/lioprotektanata samostalno i u kombinaciji sa puniocem u sprečavanju agregacije nanokristala tokom liofilizacije, a zatim i određena vrednost temperature staklastog prelaza maksimalno krio-koncentrovanog rastvora (T_g') diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom. Sprovedena su dva procesa liofilizacije – liofilizacija 1 sa primarnim sušenjem na temperaturi iznad T_g' i liofilizacija 2 sa primarnim sušenjem na temperaturi ispod T_g' sa odabranim koncentracijama krio-/lioprotektanata i punioca. Stabilnost liofilizata procenjena je na osnovu redisperzibilnosti nakon

čuvanja, kao i na osnovu analize čvrstog stanja dodatih ekscipijenasa. Dodatno, ispitana je morfologija liofilizata skenirajućom elektronskom mikroskopijom i polarizacionom mikroskopijom, i procenjen stepen interakcija između stabilizatora nanokristala i dodatih krio-/lioprotektanata.

Cilj treće faze doktorske disertacije bio je razvoj lipidnih nanočestica DK-I-60-3 za oralnu primenu. Na osnovu rezultata prve faze, odabran je lipidni matriks koji se sastoji od Softisan 154 i lecitina u visokoj koncentraciji. Lipidne nanočestice su dobijene toplom homogenizacijom pod visokim pritiskom, a kao stabilizator korišćen je polisorbat 80. Ispitan je uticaj broja ciklusa homogenizacije kao i udela lipidne faze na veličinu čestica i raspodelu veličine čestica. Odabrane formulacije sa i bez DK-I-60-3 okarakterisane su u pogledu veličine čestica i raspodele veličine čestica, zeta potencijala, pH vrednosti, električne provodljivosti i efikasnosti inkapsulacije nakon izrade i jednog meseca čuvanja u frižideru, kao i morfologije (mikroskopijom atomskih sila) i stabilnosti ka agregaciji u odabranim puferima. U cilju definisanja strukture ovih čestica, odnosno lokalizacije stabilizatora i DK-I-60-3 sprovedena je termalna analiza i spektroskopija nuklearne magnetne rezonance.

Četvrta faza eksperimentalnog rada uključivala je farmakokinetičke i farmakodinamske studije razvijenih formulacija u svrhu procene njihove pogodnosti za ove vrste ispitivanja u prekliničkim istraživanjima. Neurofarmakokinetičkom studijom i studijom biodistribucije ispitano je povećanje biološke raspoloživosti nanokristalne disperzije DK-I-60-3 u odnosu na grubu suspenziju nakon oralne primene. Ovim eksperimentom zapravo je cilj bio proceniti uticaj nanonizacije na apsorpciju DK-I-60-3. Eksperimenti su sprovedeni u stanju sitosti i stanju gladi tako da je istovremeno ispitivan uticaj prisustva hrane na apsorpciju. Nanokristalna formulacija je u drugoj neurofarmakokinetičkoj studiji upoređena sa disperzijom lipidnih nanočestica uzimajući u obzir različit sastav i strukturu, kao i fizičko stanje DK-I-60-3 što može dovesti do različitih mehanizama apsorpcije. Dodatno, procenjena je apsolutna bioraspoloživost u posebnoj studiji u odnosu na rastvor. Nanokristalna disperzija DK-I-56-1, namenjena za intraperitonealnu primenu u četvrtoj neurofarmakokinetičkoj studiji poređena je sa grubom disperzijom i rastvorom pre svega sa ciljem ispitivanja raspoloživosti supstance u mozgu nakon različitih tretmana, ističući karakteristike nanokristala koji su bitni za optimalnu isporuku u mozak. Bihevioralnim testom spontane lokomotorne aktivnosti testirana je pogodnost nanokristalne disperzije DK-I-56-1 za ovu vrstu farmakodinamskog ispitivanja. Ovim testom proverena je uspešnost disperzije nanokristala u isporuci efikasne koncentracije DK-I-56-1 u mozak i praćena aktivnost supstance uz proveru eventualnog uticaja ekscipijenasa na rezultate.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijal

Supstance DK-I-56-1 i DK-I-60-3 su sintetisane u Department of Chemistry and Biochemistry, University of Wisconsin—Milwaukee, SAD. Čvrst lipid Softisan® 154 je dobijen od IOI Oleo GmbH (Witten, Nemačka). Ostali ekscipijensi korišćeni pri formulaciji i ispitivanjima bili su farmakopejskog kvaliteta: trigliceridi srednje dužine lanca, (Fagron GmbH & KG, Nemačka), sojino ulje (Lipoid Purified Soybean Oil 700) i lecitin soje (Lipoid S75) (Lipoid GmbH, Nemačka), ricinusovo ulje, riblje ulje, benzilalkohol, polisorbit 80, poloksamer 188, D- α -tokoferol polietilenglikol 1000 sukcinat (TPGS), dimetilsulfoksid, polietilenglikol 400, natrijum-laurilsulfat, butilhidroksitoluen, saharoza, manitol (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Nemačka), poloksamer 407, Cremophor EL, polivinilpirolidon K25 (BASF Ludwigshafen, Nemačka), glicerol, $\geq 98\%$, trehaloza dihidrat (Carl Roth GmbH, Nemačka). Sveža visokoprečišćena voda dobijena je iz sistema TKA GenPure (TKA Wasseranbereitungssysteme GmbH, Nemačka). Rastvarači korišćeni za pripremu uzoraka bili su HPLC čistoće.

3.2. Metode

3.2.1. Saturaciona rastvorljivost DK-I-56-1 i DK-I-60-3 u odabranim rastvaračima

Rastvorljivost supstanci DK-I-56-1 i DK-I-60-3 u vodi, različitim organskim rastvaračima i uljima određena je *shake-flask* metodom. Zbog male količine dostupnih supstanci, metoda je modifikovana kako bi se smanjio utrošak supstanci, pa je mešanje rađeno u tubama na vorteksu. U 1 ml rastvarača (voda, trigliceridi srednje dužine lanca, sojino ulje, ricinusovo ulje, benzil alkohol, etanol, metanol, izopropanol, dimetilsulfoksid) dodata je supstanca DK-I-56-1 ili DK-I-60-3 u višku, a zatim vršeno mešanje na vorteksu 24 h na 25 °C. Uzorci su centrifugirani brzinom 10000 x g tokom 10 min na MiniSpin® plus centrifugi (Eppendorf, Nemačka), a koncentracija rastvorenih supstanci u izdvojenom supernatantu je određivana masenom spektroskopijom.

3.2.2. Izrada disperzija nanokristala

Disperzije nanokristala izrađene su modifikovanom metodom usitnjavanja u tečnom medijumu. Koncentracija DK-I-60-3, odnosno DK-I-56-1, u disperzijama bila je 0,2% (w/w). Nakon dispergovanja supstance u vodenom rastvoru stabilizatora, početno usitnjavanje i homogenizacija sprovedena je pomoću rotor-stator homogenizatora (IKA Ultra-Turrax® T25 digital, IKAR-Werke GmbH & Company KG, Nemačka) tokom 5 min, brzinom 10000 rpm. Dobijena gruba disperzija preneti je u Eppendorf® tube od 2 ml u kojima je prethodno odmeren medijum za usitnjavanje (itrijumom stabilizovane kuglice cirkonijum-oksida veličine 0,1–0,2 mm, SiLibeads® Typ ZY-S, Sigmund Lindner, Nemačka). Finalno usitnjavanje vršeno je pomoću uređaja za disrupciju ćelija (Disruptor Genie, Scientific Industries, SAD) korišćenjem maksimalnih brzina pokretanja. Dobijena disperzija nanokristala odvojena je od kuglica i sakupljena u staklene bočice u kojima je čuvana na 25 °C.

Za stabilizaciju disperzija nanokristala DK-I-60-3 namenjenih za oralnu primenu korišćeni su natrijum-laurilsulfat (SLS) i polivinilpirolidon K25 (PVP) u različitim koncentracijama i u različitim međusobnim odnosima (Tabela 3.1.1). Prilikom izrade ispitan je uticaj vremena usitnjavanja (30 min i 1 h) i zapremine medijuma za usitnjavanje (20, 40 i 60%, v/v, u odnosu na tubu u kojoj je vršeno usitnjavanje).

Tabela 3.1.1. Udeo stabilizatora u nanokristalnim disperzijama DK-I-60-3

Oznaka formulacije	SLS (% m/m)	PVP (% m/m)	Odnos SLS:PVP
F1	0,02	0,20	1:10
F2	0,02	0,08	1:4
F3	0,02	0,04	1:2
F4	0,02	0,02	1:1
F5	0,05	0,50	1:10
F6	0,05	0,20	1:4
F7	0,05	0,10	1:2
F8	0,05	0,05	1:1

Disperzije nanokristala DK-I-56-1 su razvijene za parenteralnu primenu te su korišćeni nejonski stabilizatori. U formulacijama NS1, NS2 i NS3, polisorbit 80 je korišćen u koncentraciji 25%, 50% i 100%, respektivno u odnosu na koncentraciju DK-I-56-1, dok su u NS4, NS5 i NS6 pored polisorbata 80 korišćeni poloksamer 407, poloksamer 188 i TPGS, respektivno u ukupnoj koncentraciji 50% u odnosu na DK-I-56-1 (polisorbit 80 : drugi stabilizator 1:1). U razvoju formulacija DK-I-56-1 varirano je vreme usitnjavanja (1 h i 2 h) i zapremina kuglica za usitnjavanje (40 i 60%, v/v, u odnosu na tubu u kojoj je vršeno usitnjavanje).

3.2.3. Liofilizacija

Formulacija NS4 je odabrana za liofilizaciju. Pre liofilizacije dodati su krio-/lioprotektant i sredstvo za dopunjavanje u 2 ml nanokristalne disperzije. Za liofilizaciju-1 dodati su sledeći ekscipijensi: manitol 5% (M 5%), manitol 10% (M 10%), saharoza 10% (S 10%), saharoza i manitol u odnosu 2:1 u ukupnoj koncentraciji 10% (S+M 2+1 10%), saharoza i manitol u odnosu 3:2 u ukupnoj koncentraciji 10% (S+M 3+2 10%), saharoza i manitol u odnosu 1:1 u ukupnoj koncentraciji 10% (S+M 1+1 10%) i saharoza i manitol u odnosu 2:1 u ukupnoj koncentraciji 6% (S+M 2+1 6%). U liofilizaciji-2 sledeće supstance su dodate u ukupnoj koncentraciji 10%: saharoza (S), saharoza i manitol u odnosu 1:1 (S+M 1+1), saharoza i manitol u odnosu 3+2 (S+M 3+2), trehaloza (T), trehaloza i manitol u odnosu 1:1 (T+M 1+1) i trehaloza i manitol u odnosu 3+2 (T+M 3+2).

Liofilizacija je sprovedena pod različitim uslovima. U liofilizaciji-1, uzorci su najpre zamrznuti na -80 °C tokom 3 h, a zatim sušeni smrzavanjem tokom 24 h u liofilizatoru Beta 1-8K (Martin Christ, Osterode am Harz, Nemačka). Primarno sušenje je sprovedeno na -10 °C, 0,340 mbar, a sekundarno sušenje na 25 °C. Nakon liofilizacije bočice su krimpovane i čuvane na 25 °C. Odmah nakon liofilizacije i nakon jednog meseca čuvanja na 25 °C je izvršena karakterizacija dobijenih uzoraka. U liofilizaciji-2 uzorci su zamrznuti na -50 °C tokom 3 h, primarno sušenje je sprovedeno na -45 °C pri pritisku 0,2 mbar tokom 21 h, a zatim i sekundarno sušenje na 20 °C tokom 30 h u liofilizatoru Telstar LyoBeta Mini (Španija). Vijale su zatvorene pod vakuumom, krimpovane i čuvane u frižideru (2-8 °C) 3 meseca. Karakterizacija je urađena odmah nakon liofilizacije i nakon jednog i tri meseca čuvanja.

3.2.4. Izrada disperzija lipidnih nanočestica

Disperzije lipidnih nanočestica pripremljene su toplom metodom homogenizacije pod visokim pritiskom. Smeša čvrstog lipida (Softisan® 154, S154) i lecitina u odnosu 7:3 sa dodatkom butilhidroksitoluena (koncentracija u finalnoj disperziji 0,05%) zagrevana je na 60 °C i mešana na magnetnoj mešalici preko noći dok se nije dobio bistar rastop. Za formulacije koje sadrže DK-I-60-3, supstanca je dodata u odgovarajućoj koncentraciji i mešanje je nastavljeno do njene

solubilizacije. Koncentracija masne faze u disperzijama bila je 10% (LNP10-PL) ili 15% (LNP15-PL), a koncentracija DK-I-60-3 bila je 0,1% (LNP10-DK) ili 0,15% (LNP15-DK). Broj u nazivu formulacije odnosi se na koncentraciju lipidne faze, PL je oznaka za placebo formulacije, a DK za formulacije sa DK-I-60-3. Kao vodena faza korišćen je vodeni rastvor polisorbata 80 u koncentraciji 2,0% (u formulacijama LNP10) ili 3,0% (u formulacijama LNP15), zagrejana na 65 °C. Nakon zagrevanja, vodena faza dodata je masnoj fazi i disperzija je homogenizovana na rotorstator homogenizeru (IKA Ultra-Turrax® T25 digital, IKAR-Werke GmbH & Company KG, Nemačka) tokom 5 min na 13000 rpm. Dobijena preemulzija je zatim propuštena kroz homogenizator pod visokim pritiskom (EmulsiFlex-C3, Avestin Inc, Kanada) u 20 ciklusa, diskontinuiranim procesom, na 800 bar. Emulzija je zatim prenetu u krimpovane staklene bočice, ohlađena na sobnu temperaturu i potom čuvana u frižideru (2-8 °C) tokom jednog meseca.

3.2.5. Analiza veličine čestica

Metoda dinamičkog rasipanja svetlosti

Određivanje hidrodinamičkog prečnika čestica ($z\text{-ave}$) vršeno je tehnikom dinamičkog rasipanja svetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS) na uređaju Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Ovom metodom se detektuje intenzitet rasute svetlosti lasera koju izazivaju koloidne čestice. Usled njihovog konstantnog kretanja, dovode do pojave smetnji, te intenzitet rasute svetlosti fluktuirira tokom vremena. U DLS metodi, ove promene intenziteta se pomoću matematičkih jednačina softverski prevode u hidrodinamički prečnik čestica. Rezultati zavise od malog broja faktora (viskozitet rastvarača, temperature, indeksa refrakcije materijala i slično, pa se DLS široko koristi za analizu veličine čestica. Ovom metodom mogu se meriti čestice veličine 0,3 nm – 5,0 μm. Kada su čestice male veličine, rasuta svetlost nosi istu energiju kao upadna svetlost i ne zavisi od ugla upadne svetlosti (elastično rasipanje). (Bhattacharjee, 2016). Pored podataka o hidrodinamičkom prečniku čestice ($z\text{-ave}$), DLS metoda daje podatke i o raspodeli veličine čestica izraženju kao indeks polidisperznosti (PDI).

Merenja su vršena na 25 °C. Pre merenja uzorci disperzija bili su razblaženi visokoprečišćenom vodom 1:100 v/v (disperzije nanokristala) ili 1:500 v/v (disperzije lipidnih nanočestica). Uzorci liofilizata su pre merenja redispergovani u visokoprečišćenoj vodi tako da se dobije koncentracija DK-I-56-1 kao u polaznoj disperziji. Nakon toga disperzija je razblažena visokoprečišćenom vodom u odnosu 1:100 v/v. Za uzorke liofilizata, veličina čestica određena je pre i nakon liofilizacije odnosno pre i nakon smrzavanja i odmrzavanja i na osnovu rezultata izračunat je indeks redisperzibilnosti (RDI, jednačina 4):

$$RDI(\%) = \frac{z\text{-ave}_{pre\ liofilizacije}}{z\text{-ave}_{poste\ liofilizacije}} \times 100 \quad (\text{jednačina 4})$$

Laserska difrakcija

Zbog ograničenog dometa DLS metode, kao dodatna metoda za analizu čestica korišćena je laserska difrakcija, kao komplementarna tehnika. Laserska difrakcija zasniva se na Mie teoriji o raspršivanju većih čestica (Shekunov i sar, 2007). Ove čestice dovode do rasipanja svetlosti pod različitim uglovima u odnosu na njihovu veličinu: veće čestice intenzivnije rasipaju svetlost pod manjim uglovima, a manje čestice rasipaju svetlost pod većim uglovima. Rasipanje svetlosti je dakle izraženo kao funkcija ugla rasute svetlosti, koji je dalje korišćen za određivanje veličine čestica (Bhattacharjee, 2016). Merenja su rađena na uređaju Malvern Mastersizer 2000 (Malvern, Instruments Ltd., UK), nakon dispergovanja formulacije (disperzije nanokristala) u ultračistoj vodi, na 25 °C. Za softverske proračune, korišćena je vrednost indeksa refrakcije 1,4. Rezultati su predstavljeni kao vrednosti $D(v, 0,1)$, $D(v, 0,5)$ i $D(v, 0,9)$ koji označavaju 10%, 50% ili 90% zapremine uzorka ispod navedene veličine, respektivno.

3.2.6. Zeta potencijal

Površinsko naelektrisanje čestica, izraženo kao zeta potencijal (ZP) određeno je na uređaju Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo). Metoda se zasniva na elektroforetskoj mobilnosti čestica što dovodi do promene frekvence rasute svetlosti lasera. Ovaj pomeraj frekvence je proporcionalan brzini čestica, i određenim matematičkim operacijama se prevodi u zeta potencijal (Bhattacharjee, 2016). Merenja su sprovedena na 25 °C, nakon razblaženja 1:100 v/v (disperzije nanokristala) ili 1:500 v/v (disperzije lipidnih nanočestica) u visokoprečišćenju vodi čija je električna provodljivost podešena na 50 µS/cm natrijum-hloridom.

3.2.7. Merenje pH vrednosti i električne provodljivosti

pH vrednost i električna provodljivost disperzija lipidnih nanočestica bili su određeni pomoću uređaja pH metar (HI 2223; Hanna Instruments Inc., Ann Arbor, Michigan, SAD) i sensION™ + EC71 konduktometar (ShangHai Shilu Instruments Co., Ltd., Shanghai, Kina), respektivno. Određivanje je sprovedeno nakon uranjanja elektrode direktno u disperziju, na 25 °C.

3.2.8. Efikasnost inkapsulacije

Koncentracija DK-I-60-3 u vodenoj fazi disperzije lipidnih nanočestica, određena je LC-MS/MS metodom nakon separacije faza centrifugiranjem. Uzorci LNP10-DK i LNP15-DK su centrifugirani u Amicon Ultra-4 centrifugal filter units, 10 kDa (Merck Millipore Ltd, Irska) na 9000 x g tokom 90 min na 5 °C. Efikasnost inkapsulacije (EE) je izračunata pomoću jednačine 5:

$$EE(\%) = \frac{W_{ukupni\ DK} - W_{slobodni\ DK}}{W_{ukupni\ DK}} \times 100 \quad (\text{jednačina 5})$$

gde je $W_{ukupni\ DK}$ ukupna masa DK-I-60-3 u disperziji, a $W_{slobodni\ DK}$ masa DK-I-60-3 rastvorena u vodenoj fazi.

3.2.9. Termalne analize diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom

Termalna analiza rađena je metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC). U uređaju se meri protok toplote u uzorku (odmerenom u aluminijumskoj posudici) kada se zagreva, hladi ili zadržava na konstantnoj temperaturi. Pored ispitivanog uzorka, istovremeno se koristi i referentni uzorak, a termo-parovi u uređaju se koriste za detekciju razlika u transferu toplote između ova dva uzorka (tip uređaja sa fluksom toplote). Kao referentni uzorak se obično koristi prazna aluminijumska posudica. Na ovaj način može se odrediti temperatura topljenja i entalpija fuzije, polimorfizam, staklasti prelaz amorfnih materijala i slično. Metoda ima veliki značaj u analizi čvrstog stanja supstanci (Wagner, 2017).

Sva merenja rađena su na uređaju DSC 1 (Mettler-Toledo AG, Analytical, Švajcarska) u struji azota (50 ml/min). Dobijeni termogrami su analizirani pomoću softvera STAR® SW 12.10. Određeni su termoanalitički parametri: temperatura započinjanja termalnog događaja (T_{onset}), temperatura pika (T_{peak}), temperatura staklastog prelaza (T_g) i entalpija topljenja.

Metoda gašenja rastopa (engl. *melt-quenching*)

Metoda se zasniva na zagrevanju supstance do potpunog topljenja, brzog hlađenja i ponovnog zagrevanja. Oko 2 mg supstance (DK-I-56-1 ili DK-I-60-3) zagrevano je najpre do 330 °C brzinom zagrevanja 20 °C/min, potom hlađeno do 25 °C brzinom hlađenja 40 °C/min, i ponovo zagrejano do 330 °C brzinom 10 °C/min.

Termalna analiza lipidnih smeša

Ispitivanja su vršena na *bulk* S154 i očvrslom S154 nakon topljenja (rekristalisani S154) i različitim lipidnim smešama (LM): (1) S154 i triglicerida srednje dužine lanca (MCT) u odnosu 8:2, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7 i 2:8; (2) S154 i MCT u odnosu 4:6, 3:7 i 2:8 sa dodatkom 1,0% DK-I-60-3; (3) S154 i lecitina (L) u odnosu 7:3 (S154+L) i (4) S154 i lecitina u odnosu 7:3 uz dodatak 1,0% DK-I-60-3 (S154+L+1,0% DK) ili 1,5% DK-I-60-3 (S154+L+1,5% DK). Oko 10 mg smeše odmereno je u aluminijumskoj posudici i zagrejano do 80 °C brzinom zagrevanja 10 K/min. Uzorak S154+L+1,5% DK je bio zagrevan i do 350 °C istom brzinom zagrevanja. Indeks kristaličnosti (CI_{LM}) je izračunat pomoću jednačine 6:

$$CI_{LM}(\%) = \frac{entalpija_{LM}(J/g)}{entalpija_{bulk\ S154}(J/g)} \times 100 \quad (\text{jednačina 6})$$

Termalna analiza nanokristala

Uzorci su pripremljeni centrifugiranjem nanokristalnih disperzija i suspenzija na MiniSpin® plus centrifugi (Eppendorf, Nemačka) na 1000 × g tokom 10 min, odvojen je supernatant, a talog sušen na 25 °C tokom 24 h u vakuum sušnici VT 6025 (Thermo Heraeus, Fisher Scientific, UK). Oko 2 mg uzorka je zagrevano do 350 °C, brzinom zagrevanja 10 K/min.

Termalna analiza liofilizata

Tečni uzorci za liofilizaciju analizirani su u cilju određivanja temperature staklastog prelaza maksimalno krio-koncentrovanog rastvora (T_g). Oni su prvo hlađeni do -80 °C brzinom 0,5 K/min a zatim zagrevani do 50 °C brzinom 10 K/min. Prilikom ispitivanja liofilizata, 2-4 mg uzorka je odmereno i praškovi su prvo hlađeni do -30 °C (brzinom 10 K/min), a zatim je temperatura zadržana na ovoj vrednosti 1 min kako bi se osiguralo potpuno hlađenje celokupnog uzorka. Potom, uzorci su zagrevani do 230 °C, istom brzinom od 10 K/min. Termoanalitički događaji i parametri analizirani su sa treće krive zagrevanja.

Termalna analiza disperzija lipidnih nanočestica

Disperzije lipidnih nanočestica analizirane su u tečnom stanju, bez sušenja kako bi se izbegla eventualna kristalizacija lipida. Zbog visokog sadržaja vode u disperzijama lipidnih nanočestica, zagrevanje je vršeno brzinom 2 K/min, do 80 °C. Nakon određivanja termoanalitičkih parametara, indeks kristaličnosti (CI_{LNP}) izračunat je pomoću jednačine 7:

$$CI_{LNP}(\%) = \frac{entalpija_{LNP}(J/g)}{entalpija_{bulk\ S154}(J/g) \times 0,1 \text{ ili } 0,15} \times 100 \quad (\text{jednačina 7})$$

3.2.10. Difrakcija X-zraka na uzorku supstance u obliku praška

Difrakcija X-zraka na uzorku supstance u obliku praška (engl. *X-ray powder diffraction*, XRPD) sprovedena je u cilju određivanja kristaličnosti/amorfности različitih uzoraka. U osnovi metode je rasipanje X-zraka kada oni dospeju na površinu kristala. X-zraci se nalaze između UV i γ -zraka, a njihova talasna dužina se izražava u angstromima. Do rasipanja ovih zraka dolazi jer je talasna dužina zraka istog reda veličine kao rastojanja između atoma unutar kristalne rešetke nekog molekula. Dobijeni difraktogrami se sastoje od niza pikova koji su dobijeni pod različitim uglovima difrakcije. Kada supstanca nema uređenost na makro nivou, u slučaju amorfni supstanci, X-zraci se nekonzistentno rasipaju što se na difraktogramu ogleda u pojavi tzv. oreola (Bates, 2006; Gibson, 2016).

U preformulacionim studijama, merenja su rađena na uzorcima čistih supstanci (DK-I-56-1 i DK-I-60-3), lipidnih smeša S154 i MCT sa i bez DK-I-60-3. Za analizu čvrstog stanja nanokristala, uzorci

nanokristalnih disperzija su obrađeni na isti način kao pri pripremi za termalnu analizu. Fizičko stanje krioprotektanata i lioprotektanata ispitivano je na liofilizatima nakon liofilizacije i tri meseca čuvanja. Merenja su sprovedena na uređaju Rigaku Smartlab X-ray Diffractometer u θ - θ geometriji (uzorak u horizontalnom položaju) u parafokusiranoj Bragg-Brentano geometriji pomoću D/teX Ultra 250 strip detektora u 1D standardnom režimu sa $\text{CuK}\alpha_{1,2}$ izvorom radijacije ($U = 40 \text{ kV}$ i $I = 30 \text{ mA}$). Difraktogrami su prikupljeni u $3\text{-}40^\circ$ 2θ rasponu, sa korakom od $0,01^\circ$, i brzinom prikupljanja podataka $3^\circ/\text{min}$. Za minimiziranje pozadine korišćen je držač uzorka monokristalnog silikona niske pozadine.

3.2.11. Mikroskopske metode

Polarizaciona svetlosna mikroskopija (PLM)

Prašak bulk supstanci DK-I-56-1 i DK-I-60-3 je posmatran pod polarizacionim mikroskopom Olympus BX53-P (Olympus, Japan) pod uvećanjem 100 x, a zatim je veličina čestica određivana pomoću softvera cellSens. Lipidne smeše S154 i lecitina sa i bez DK-I-60-3, kao i liofilizati su posmatrani pod Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 mikroskopom (Zeiss, Nemačka) sa ukrštenim polarizatorima i $\frac{1}{4} \lambda$ -pločicom, opremljen digitalnom kamerom i odgovarajućim softverom. Uzorci su posmatrani pod uvećanjem 400 x.

Mikroskopija atomskih sila (AFM)

Morfologija razvijenih nanokristala i lipidnih nanočestica je analizirana primenom mikroskopije atomskih sila, na NTEGRA Prima Atomic Force Microscope (NT-MDT, Rusija). Pomoću ovakvog mikroskopa mere se privlačne i odbojne sile između vrha igle i uzorka. Tokom merenja, igla (sonda) se prevlači preko uzorka i uređaj detektuje njeno vertikalno pomeranje usled interakcija sa uzorkom, koje ukazuju na visinu uzorka (Gibson, 2016). Velika prednost ove metode je visoka rezolucija (čak do $0,01 \text{ nm}$) i dobijanje trodimenzionalnih dimenzija uzorka, što nije moguće postići elektronskim mikroskopima. Disperzije su razblažene visokoprečišćenom vodom u razblaženju korišćenom za određivanje veličine čestica metodom DLS, a zatim je $10 \mu\text{l}$ razblaženja preneto na mika pločicu i sušeno pod vakuumom na $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Merenja su sprovedena u naizmeničnom kontaktnom režimu korišćenjem NT-MDT NSGO1 silikonske sonde (N-tipa, obogaćene antimonom i obložene zlatom). Nominalna konstanta sile sonde bila je $5,1 \text{ N/m}$, a frekvencija oko 150 kHz . Dobijene mikrografije su dalje obrađene softverom Image Analysis 2.2.0 (NT-MDT) i Gwyddion 2.60.

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija liofilizata ispitana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Ova metoda se zasniva na formiranju snopa elektrona koji skenira uzorak. Slika koja se dobija potiče od elektrona koji su se formirali na površini uzorka ili od onih iz dubljih delova uzorka, a nastalih tako što je došlo do izbijanja iz orbitale pod uticajem ubrzanih elektrona usmerenih iz izvora. Moguće je postići značajno veliko uvećanje i rezoluciju, a dobijeni rezultati pružaju informaciju o izgledu površine, morfologiji, sastavu i mikrostrukturi, pa se izuzetno često koristi za snimanje malih čestica (Gibson, 2016). Za analizu, mala količina uzorka je postavljena na provodnu duplo-adhezivnu traku i analizirana pod mikroskopom Zeiss Ultra Plus 55 ili Zeiss DSM 940 A (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Nemačka). Fotomikrografije su napravljene pod različitim uvećanjem (5000 ili 20000 x). Tačno uvećanje i veličina oznake na mikrografiji su dati u opisu slike.

3.2.12. Ispitivanje brzine rastvaranja nanokristala

Brzina rastvaranja nanokristala ispitana je metodom sa dijaliznim vrećicama (*cellulose membrane* MW cut-off 12000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Za eksperiment sa nanokristalnim disperzijama primenjena je direktna metoda: dijalizne vrećice su napunjene sa 2 ml nanokristalne disperzije ili odgovarajuće suspenzije i uronjene u 200 ml medijuma (voda:izopropanol 9:1, v/v); u određenim vremenskim intervalima (5 min, 20 min, 1 h, 2 h, 4 h, i 8 h), 1 ml medijuma sa rastvornom supstancom je uzorkovano i zamenjeno sa 1 ml svežeg medijuma. Prilikom eksperimenta sa nanokristalnim disperzijama DK-I-56-1 rađena je reverzna metoda: dijalizne vrećice sa 5 ml medijuma (voda:izopropanol 9:1, v/v) uronjene su u 200 ml istog medijuma, u koji je zatim dodato 2 ml nanokristalne disperzije ili odgovarajuće suspenzije ili 4 mg praška DK-I-56-1; u određenim vremenskim tačkama (5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h i 3 h) uzorkovan je sadržaj vrećice. Oba eksperimenta su rađena na 37 ± 2 °C pri konstantnim mešanjem u šejker inkubatoru (ES-20 orbital shakerincubator, Biosan SIA, Letonija). Koncentracija supstance je određena LC-MS/MS metodom.

3.2.13. Određivanje rastvorljivosti nanokristala

Rastvorljivost supstanci kada su u formi nanokristala ispitana je na dva načina. Za nanokristale DK-I-60-3 rastvorljivost je određena na 37 °C. 300 µl nanokristalne disperzije dodato je u 1,5 ml visokoprečišćene vode (pH ~5,5), 0,1 M hlorovodonične kiseline (pH 1,2) ili fosfatnog pufera (pH 6,8) i mešano 24 h na 250 rpm. Nakon toga uzorci su centrifugirani ($14000 \times g$, MiniSpin® plus centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), supernatanti odvojeni i filtrirani kroz filtere sa veličinom pora 0,22 µm, i razblaženi u izopropanolu. Koncentracija je određena LC-MS/MS metodom.

Rastvorljivost nanokristala DK-I-56-1 određena je nakon separacije nanokristala od vehikuluma centrifugiranjem $1000 \times g$ tokom 10 min, filtriranja supernatanta (0,22 µm) i razblaživanja izopropanolom. Pored nanokristalnih disperzija, na isti način tretirana je suspenzija sastava istog kao formulacija NS2. Dodatno, u cilju određivanja uticaja stabilizatora na rastvorljivost supstance DK-I-56-1, višak supstance je dodat u rastvor polisorbata 80 (0,05%, 0,1% ili 0,2%), poloksamera 407 (0,05%), poloksamera 188 (0,05%) ili TPGS (0,05%), smeša je mešana 24 h, a zatim centrifugirana i odvojen je supernatant. Koncentracija DK-I-56-1 određena je LC-MS/MS metodom.

3.2.14. Ispitivanje stabilnosti razvijenih formulacija

Stabilnost tokom čuvanja

Sve formulacije su čuvane u krimpovanim staklenim bočicama. Nanokristalne disperzije su čuvane tokom tri meseca (DK-I-60-3), tri nedelje (DK-I-56-1) na sobnoj temperaturi, a disperzije lipidnih nanočestica mesec dana i liofilizati tri meseca u frižideru (2-8 °C). Tokom čuvanja ispitivani su odgovarajući fizičko-hemijski parametri, kako bi se procenila njihova stabilnost.

Stabilnost u puferima i interakcija sa proteinima

U cilju ispitivanja stabilnosti formulacija u različitim uslovima, imitirajući delimično uslove nakon primene, vršeno je inkubiranje disperzija u odgovarajućim medijumima i određivanje veličine čestica u određenim vremenskim intervalima. Inkubiranje je sprovedeno uz konstantno mešanje u šejker inkubatoru na 37 °C, a merenje veličine čestica je vršeno na Zetsizer ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) na 37 °C, uz odgovarajuće modifikacije metode. Zbog različitog puta primene, formulacije su inkubirane u različitim medijumima, u odnosima istim kao pri analizi veličine čestica. Nanokristalne disperzije DK-I-60-3 i disperzije lipidnih nanočestica

inkubirane su u 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini (pH 1,2), acetatnom puferu (pH 4,0) i fosfatnom puferu (pH 6,8), a uzorkovanje je vršeno inicijalno i nakon 10, 20, 60, 120, 240, 360 i 480 min. Nanokristalne disperzije DK-I-56-1 inkubirane su u fosfatnom puferu sa natrijum-hloridom (pH 7,4) sa i bez goveđeg serum albumina (BSA) tokom jednog sata, a merenje veličine čestica je rađeno u intervalima od 10 min.

3.2.15. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) predstavlja vibracionu tehniku pomoću koje se dobijaju informacije o kvantovanim energetskim nivoima u molekulu. Nakon izlaganja uzorka monohromatskom svetlu dolazi do apsorpcije upadnog zračenja i perturbacije sistema. Dobija se apsorpcioni spektar koji predstavlja kombinovanje upadnog svetla sa specifičnim transformacijama unutar molekula. Apsorpciona traka u spektru se uočava pri vibracijama koje su pokrenute infracrvenim zračenjem. Primenom Furijeovih transformacija prevaziđen je potencijalni problem koji se može javiti prilikom pripreme uzorka komprimovanjem. Kod ovakve metode nekoliko miligrama uzorka se disperguje u kalijum-bromidu, a zatim se spektar snima refleksijom svetlosti sa površine uzorka. FT-IR metoda se koristi za ispitivanje polimorfizma ali i interakcija između različitih atoma i analizu vodoničnih veza. Veoma često se koristi tehnika prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflectance*, ATR) koja se zasniva na merenju promena do kojih dolazi u molekulu usled usmeravanja potpuno reflektovane infracrvene svetlosti. Snop svetlosti se pod određenim uglom usmerava ka kristalu (najčešće dijamant) i nastaje prolazni talas koji prodire u uzorak. Na osnovu interakcije prolaznog talasa i uzorka dobijaju se informacije o vibracijama u molekulu (Gibson, 2016).

Interakcije između krio/lioprotektanata i stabilizatora nanokristala su analizirane infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom. Merenja su rađena na spektrometru Nicolet iS10 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) koji je opremljen ATR sistemom pojedinačne refleksije (Smart iTR, Thermo Scientific, SAD) sa dijamantskom pločom i cink-selenid sočivima. Spektri su prikupljeni u rasponu od 4000 cm^{-1} do 660 cm^{-1} u rezoluciji $0,5\text{ cm}^{-1}$.

3.2.16. Strukturna analiza lipidnih nanočestica nuklearnom magnetnom rezonancom

Struktura lipidnih nanočestica određena je pomoću nuklearne magnetne rezonance (NMR). Metoda se zasniva na izlaganju uzorka radiofrekventnom zračenju u jakom magnetnom polju. Bez primenjenog spoljašnjeg magnetnog polja, sva jezgra u molekulu se kreću u svim pravcima (smerovima) i imaju istu prosečnu energiju. Prilikom primene magnetnog polja dolazi do polarizacije momenata jezgara i njihove orijentacije. Malo više od polovine jezgara zauzima energetski povoljnije, alfa spinsko stanje, u smeru dejstva spoljašnjeg magnetnog polja, a ostala jezgra zauzimaju suprotan smer. Višak jezgara sa alfa spinom je veoma mali i izražava se u ppm (milioniti deo), i oni su odgovorni za apsorpciju elektromagnetnog zračenja kada se postigne rezonanca. Proces vraćanja jezgra u osnovno energetsko stanje koje je apsorpcijom elektromagnetnog zračenja bilo narušeno predstavlja relaksaciju jezgra. Ukoliko do relaksacije jezgra dođe u kratkom vremenskom intervalu, signal na NMR spektru je izrazit i oštar, a ukoliko je relaksacija jezgra spora, signal je širi i manjeg intenziteta. Mesto NMR apsorpcije naziva se hemijsko pomeranje i zavisi od elektronske gustine oko jezgra, a izražava se u neimenovanim jedinicama tzv. ppm (milionitim delovima). Na NMR spektrima dobijaju se signali intenziteta apsorbovanog zračenja na određenim vrednostima hemijskog pomeranja i tumačenjem spektara dobijaju se informacije o strukturi jedinjenja ali i eventualnim promenama okruženja pojedinih jezgara. Najveću primenu imaju protonski NMR spektri, ali se koriste i spektri drugih elemenata kao što su fosfor i azot.

Protonski (^1H NMR) i fosforni (^{31}P NMR) NMR spektri dobijeni su na Bruker Ascend 400 spektrometru (Bruker, Rheinstatten, Nemačka) na 400 MHz i 23 °C. Alikvot od 0,45 ml svakog

uzorka i 0,05 ml D₂O je napunjen u NMR kivetu i zatim postavljen u uređaj. Analiza je sprovedena na formulacijama lipidnih nanočestica (LNP15-PL, LNP15-DK i LNP10-DK), a kao referentni uzorci korišćene su vodene disperzije polisorbata 80 i lecitina i etanolni rastvor lecitina.

3.2.17. *In vivo* farmakokinetičke studije razvijenih nanoformulacija

Eksperimentalni protokoli

Sprovedene studije imale su različit dizajn u zavisnosti od formulacije koja je ispitivana. *In vivo* ispitivanja odobrena su od strane Etičke komisije za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede (rešenje broj 323-07-13805/2020-05 od 31.12.2020). Životinje su bile smeštene u kavezima (4-6 životinja po kavezu) u Vivarijumu Farmaceutskog fakulteta, u sobi sa cikličnim periodima svetlosti i mraka na 12 h (svetlo u 6 h ujutru) sa osvetljenošću 120 lx. Temperatura u prostoriji za životinje bila je podešena na 22 ± 1 °C, sa relativnom vlažnošću 40-70%. Životinjama je bila dostupna hrana i česmenska voda *ad libitum* tokom eksperimenata.

U prvom setu eksperimenata, ispitan je uticaj nanonizacije na apsorpciju DK-I-60-3 u stanju sitosti i stanju gladi. U istraživanju je korišćena nanokristalna disperzija DK-I-60-3 F5, a kao poredbeno formulacija pripremljena je odgovarajuća suspenzija S5 sa istim kvantitativnim i kvalitativnim sastavom. Obe formulacije su sadržale 2,0 mg/ml DK-I-60-3 i bile su primenjene oralno, gastričnom gavažom u zapremini 5 ml/kg kako bi se dostigla doza 10 mg/kg, u stanju sitosti i stanju gladi. Muški *Sprague-Dawley* pacovi mase 150-200 g bili su smešteni u kavezima (6 životinja po kavezu). Eksperimentalne životinje su podeljene u četiri grupe sa po 18 životinja (po tri životinje za svaku vremensku tačku): grupa I primila je F5 u stanju gladovanja, grupa II primila je F5 u stanju sitosti, grupa III primila je S5 u stanju gladovanja i grupa IV primila je S5 u stanju sitosti. U grupama koje su gladovale, uzimanje hrane ograničeno je 10 h pre i 4 h nakon primene tretmana, dok je voda bila dostupna *ad libitum*. U unapred određenim vremenskim tačkama nakon primene tretmana (15 min, 1 h, 4 h, 8 h, 16 h, i 36 h) životinje su anestetizirane ketamin-hidrohloridom i vršeno je uzorkovanje tkiva (krv, mozak, jetra i bubreg).

U drugom eksperimentu, disperzija lipidnih nanočestica je upoređena sa nanokristalnom disperzijom u cilju ispitivanja njihovog uticaja na apsorpciju DK-I-60-3 nakon oralne primene. Eksperimentalne životinje, muški *Sprague-Dawley* pacovi (250-350 g), podeljeni su u dve grupe prema tretmanima. U svakoj grupi bilo je 24 životinje (po tri životinje za svaku vremensku tačku, 8 vremenskih tačaka): grupa I primila je formulaciju lipidnih nanočestica (LNP), a grupa II primila je formulaciju nanokristala (NC). LNP je bila sa 10% masne faze, dok je NC formulacija odgovarala F5 formulaciji iz prethodne studije (isti odnos DK-I-60-3 i stabilizatora i međusobni odnos SLS i PVP, ali drugačija koncentracija DK-I-60-3). U obe formulacije koncentracija DK-I-60-3 bila je 0,8 mg/ml. Tretmani su primenjeni gastričnom sondom u volumenu 10,0 ml/kg, kako bi se dostigla doza od 8,0 mg/kg. U određenim vremenskim tačkama nakon primene (15 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h i 48 h) izvršeno je anestetiziranje životinja ketamin-hidrohloridom i uzorkovanje krvi i mozga.

U trećoj farmakokinetičkoj studiji poređene su nanokristalne disperzije DK-I-56-1 (NS2-G) sa suspenzijom (SUSP) i rastvorom (SOL) nakon intraperitonealne primene. NS2-G formulacija, stabilizovana polisorbatom 80, sadržala je i 2,5% glicerola kao sredstvo za izotonizaciju (toničnost je proverena osmometrom, Osmometer Model 3320, Advanced Instruments, Inc., SAD). Rastvor SOL dobijen je rastvaranjem DK-I-56-1 u smeši rastvarača koja se sastoji od 20% DMSO, 20% Cremophor EL i 60% fiziološkog rastvora (Fan i sar, 2018). U tretmanu SUSP, DK-I-56-1 je dispergovan u vehikulumu koji sadrži 1,0% polisorbata 80, 14% polietilenglikola i 85% vode (Knutson i sar, 2018). Studija je rađena na muškim C57BL/6 miševima (masa 23-33 g). Životinje su bile podeljene u 3 grupe, prema tretmanima, svaka je brojala 18 životinja (po tri životinje za svaku

vremensku tačku). Sve formulacije sadržale su 2,0 mg/ml DK-I-56-1 i bile primenjene intraperitonealno u zapremini 5 ml/kg u cilju postizanja doze 10 mg/kg. Nakon primene, u određenim vremenskim tačkama (5 min, 20 min, 1 h, 4 h, 16 h i 36 h) životinje su anestetizirane ketamin-hidrohloridom i vršeno je uzorkovanje krvi, mozga, jetre i bubrega.

Četvrta studija bila je posvećena određivanju apsolutne bioraspoloživosti nanokristalne formulacije (NC) DK-I-60-3 (NC) i lipidinih nanočestica (LNP) primenjenih oralno u odnosu na intravenski primenjen rastvor (SOL). LNP i NC su imale isti sastav kao u drugoj farmakokinetičkoj studiji. SOL je primenjen kao spora intravenska injekcija, u repnu venu, a sadržao je 1,0 mg/ml DK-I-60-3 rastvoren u smeši rastvarača 10% DMSO, 10% Cremophor EL, 30% polietilenglikola 400 i 50% fiziološkog rastvora. Sve životinje su tretirane istom dozom 8,0 mg/kg (zapremina tretmana LNP i NC bila je 10,0 ml/kg, a SOL 8,0 ml/kg). U deset vremenskih tačaka od aplikacije tretmana (5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h i 24 h) uzorci krvi (oko 300 µl) su uzorkovani iz potključne vene, prema protokolu Wang i sar. (2022). Nakon svakog uzorkovanja, uzorkovana zapremina krvi je zamenjena ekvivalentnim volumenom fiziološkog rastvora, kao intraperitonealna injekcija.

Priprema tkiva za LC-MS/MS

U prve tri studije, nakon anestetiziranja ketamin-hidrohloridom (90 mg/kg, 10% Ketamidol, Richter Pharma AG, Wels, Austrija) krv je sakupljena srčanom punkturom, a u četvrtoj studiji direktno iz potključne vene u heparinizovane tube i centrifugirana 10 min na 1000 × g (MiniSpin® plus centrifuge, Eppendorf, Nemačka), kako bi se izdvojila plazma. Uzorci ostalih tkiva (mozak, jetra i bubreg) su izmereni, a zatim prebačeni u tube sa 1,0 ml metanola i homogenizovani ultrazvučnom sondom (70% amplitude 2 x 20 s za mozak, 80% amplitude 3 x 20 s za jetru i bubreg). Homogenizati su potom centrifugirani 20 min na 3400 × g (MiniSpin® plus centrifuge, Eppendorf, Nemačka). Izdvojena plazma i supernatanti homogenizata su dalje procesuirani čvrsto-tečnom hromatografijom. Ekstrakcija je sprovedena na Oasis HLB kertridžima (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, SAD) i sastojala se iz prekondicioniranja metanolom i vodom, nanošenja uzorka (plazme ili supernatanta homogenizata) i rastvora internog standarda (SH u koncentraciji 100 µM), a zatim uklanjanja nečistoća vodom i eluiranja DK-I-60-3 ili DK-I-56-1 pomoću 1,0 ml metanola. Pri pripremi kalibracionih rastvora, korišćena su odgovarajuća tkiva netretiranih životinja i obrađena opisanim postupkom. Prilikom čvrsto-tečne ekstrakcije, nakon dodatka plazme odnosno supernatanta homogenizata, dodata je određena količina metanolnog rastvora DK-I-60-3 ili DK-I-56-1, a zatim rastvor internog standarda (minimalno šest kalibracionih tačaka). Ostatak postupka je bio isti kao pri ekstrakciji uzoraka tretiranih životinja. Koncentracija supstance DK-I-60-3 ili DK-I-56-1 u eluatima određena je LC-MS/MS metodom.

Izračunavanje farmakokinetičkih parametara

Farmakokinetički parametri u neurofarmakokinetičkim studijama su izračunati pomoću “PK Functions for Microsoft Excel” (<https://www.pharmpk.com/soft.html>), a u studiji bioraspoloživosti korišćen je Certara Phoenix WinNonlin softver za nekompartmensku analizu. Paramteri koji su korišćeni pri analizi rezultata su: C_{max} – maksimalna koncentracija, t_{max} – vreme postizanja maksimalne koncentracije, AUC_{0-24/36} – površina ispod krive od t = 0 do t = 24 ili 36 h i t_{1/2} – poluvreme eliminacije. Apsolutna bioraspoloživost (F) izračunata je na osnovu jednačine 6:

$$F(\%) = \frac{AUC_{0-24} \text{ oralna primena}}{AUC_{0-24} \text{ intravenska primena}} \times 100 \quad (\text{jednačina 6})$$

3.2.18. *In vivo* farmakodinamska studija sa nanokristalnom disperzijom DK-I-56-1

Ispitivanje spontane lokomotorne aktivnosti (engl. *spontaneous locomotor activity*, SLA) je sprovedeno na eksperimentalno naivnim muškim C57BL/6 miševima, starosti 9-11 nedelja, mase 20-26 g. Njihovo ponašanje je analizirano pomoću ANY-maze Video Tracking System (Stoelting Co, Wood Dale, IL, SAD). NS2-G, placebo (PLA) ili fiziološki rastvor (SAL) su primenjeni intraperitonealno u zapremini 5,0 ml/kg kako bi se dostigla doza od 10 mg/kg. Aktivnost pojedinačnih miševa u providnim komorama od pleksiglasa (dimenzije 40 × 25 × 35 cm) pod prigušenim crvenim svetlom (20 lx) snimljena je ukupno 90 min, bez ikakvog perioda aklimatizacije (Knutson i sar, 2018). Parametri koji su posmatrani bili su pređeni put i vreme imobilisanosti. Osetljivost za imobilnost je bila podešena na 65% (procenat životinje koja se zadržava u istom mestu kako bi se životinja smatrala imobilisanom).

3.2.19. *Analitička metoda*

Koncentracija DK-I-56-1 i DK-I-60-3 bila je određena korišćenjem metode tečne hromatografije-tandem masene spektrometrije (LC-MS/MS). Analiza je sprovedena na UHPLC hromatografu ACELLA (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD) povezan sa triplkvadrupolskim masenim detektorom TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD) sa interfejsom grejne elektrosprej jonizacije (HESI). Razdvajanje je vršeno na koloni XTerra MS C18 (150 mm x 2,1 mm, 3,5 μm veličina čestica). Kao mobilna faza korišćena je smeša acetonitrila i 0,1% rastvora mravlje kiseline u vodi u odnosu 50:50 (v/v) sa brzinom protoka 0,3 ml/min. Temperatura kolone je bila 35 °C, a zapremina injektovanja 10 μl. DK-I-56-1, DK-I-60-3 i interni standard (u *in vivo* studijama) su detektovani i kvantifikovani u pozitivnom HESI režimu ($m/z=325,3-307,2$ i $m/z=327,8-320,9$, za DK-I-56-1 i interni standard, respektivno, odnosno $m/z = 328,10-282,05$ i $m/z = 349,00-303,85$, za DK-I-60-3 i interni standard, respektivno).

3.2.20. *Statistička analiza*

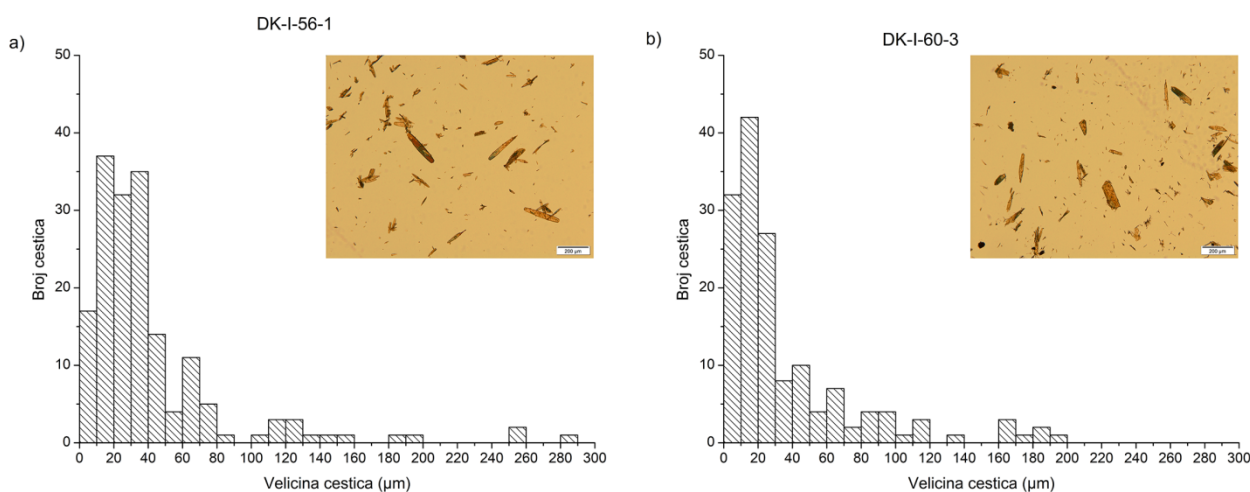
Merenja rađena u triplikatu su prikazana kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) ili srednja vrednost ± standardna greška (SEM). Statistička analiza podrazumevala je proveru normalnosti raspodele odgovarajućim testovima. U slučaju normalne raspodele podataka poređenja su vršena korišćenjem Student t-testa (za dve grupe podataka) ili ANOVA-e (za tri grupe podataka) sa Tukey HSD *post-hoc* testom. Ukoliko raspodela nije bila normalna, za poređenja su korišćeni Mann Whitney U test (za dve grupe podataka) i Kruskal-Wallis test (za tri grupe podataka). Statistička analiza rađena je pomoću softvera IBM SPSS Statistics (verzija 25). Izuzetak je *in vivo* farmakodinamska studija sa nanokristalnom disperzijom DK-I-56-1 u kojoj su korišćeni testovi jednofaktorske i dvofaktorske ANOVA-e sa SNK *post-hoc* testom pomoću programa SigmaPlot 12.0 (Chicago, SAD). U svim testovima vrednost P manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada

4.1.1. Mikroskopska analiza i određivanje veličine čestica

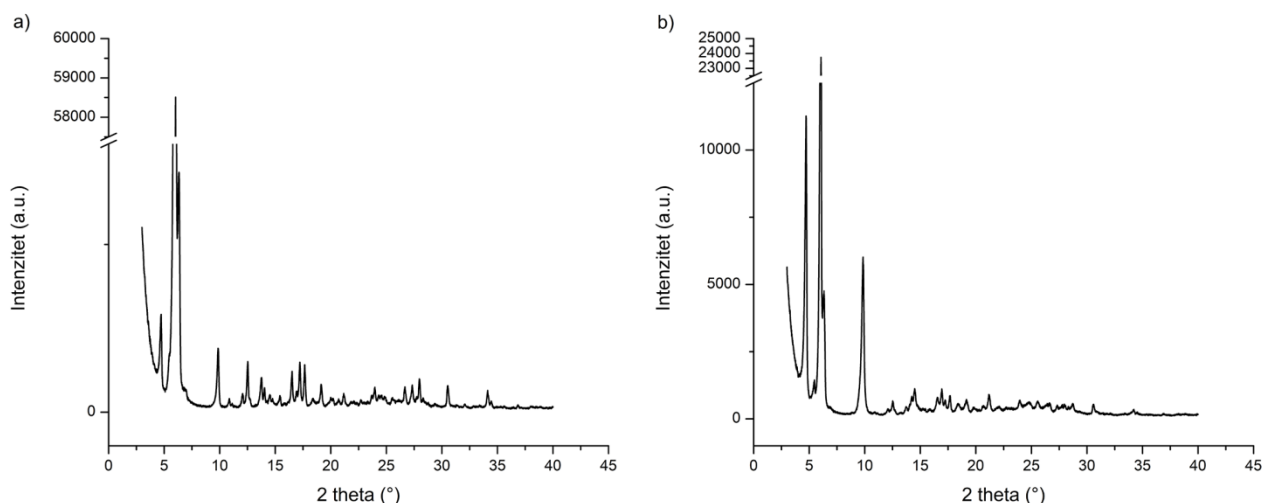
Supstance DK-I-56-1 i DK-I-60-3 se pod mikroskopom vide kao kristali veoma varijabilne veličine čestica. Kristali su igličaste strukture, žute boje i veoma kohezivni, te je korišćeno silikonsko ulje za njihovo razdvajanje za mikroskopsku analizu i omogućavanje merenja veličine. Veličina čestica merena je manuelno, pomoću softvera, i predstavlja njihovu dužinu. Kako rezultati ne prate normalnu raspodelu ($P < 0,05$, Kolmogorov-Smirnov test), određena je vrednost medijane i maksimalnih i minimalnih izmerenih vrednosti: za DK-I-56-1 29,83 (2,80-285,43) μm i za DK-I-60-3 20,17 (2,15-191,16) μm , a histogrami su prikazani na slici 4.1.1.



Slika 4.1.1. Histogrami veličine čestica i mikrografije supstanci a) DK-I-56-1 i b) DK-I-60-3.

4.1.2. Difrakcija X-zraka na uzorku praška

Kristalna priroda supstanci je potvrđena difrakcijom X-zraka na uzorku praška vizuelizacijom oštih pikova na difraktogramima karakterističnim za kristalne supstance. Kristalne supstance karakteriše visoka uređenost u svim pravcima, što je posledica strukturne organizacije atoma i molekula unutar kristala (Peltonen i Strachan, 2020). Talasna dužina X-zračenja je istog reda veličine kao i rastojanja među atomima unutar kristalne rešetke. Zbog toga, nakon što X-zraci dospeju na površinu kristalnog materijala dolazi do njihovog rasipanja u svim pravcima. Posledično, difraktogram koji se dobija se sastoji od pikova dobijenih pri različitim uglovima rasipanja (Gibson, 2016). U suprotnom, zbog neuređenosti na makro-nivou X-zraci se nekonzistentno rasipaju, te se dobija tzv. *oreol* difraktogram, tipičan za amorfne supstance (Bates i sar., 2006).



Slika 4.1.2. XRPD difraktogrami supstanci a) DK-I-56-1 i b) DK-I-60-3.

Difraktogrami DK-I-56-1 i DK-I-60-3 su slični, sa difrakcionim linijama na sličnim uglovima 2θ , zbog velike sličnosti u molekularnoj strukturi. Iako intramolekulske sile određuju oblik molekula, zamena vodonika deuterijumom uglavnom ne dovodi do drugačijeg „pakovanja” u kristalu, te ne dovodi do promena u izgledu difraktograma. Pikovi najvećeg intenziteta bili su na uglovima 2θ manjim od 10 ($4,73$; $6,03$ i $9,85$ °), dok na većim uglovima su bili znatno manje izraženi (slika 4.1.2.). Pored pomenutih, izdvojeni su pikovi na 2θ $14,51$; $16,95$; $17,66$ ° za praćenje u različitim uzorcima.

4.1.3. Studije rastvorljivosti

Prilikom preformulacionih studija novih potencijalnih kandidata za lekovite supstance, velika pažnja posvećuje se ispitivanju njihove rastvorljivosti u vodi i drugim rastvaračima. Dobijeni rezultati su od značaja za određivanje formulacionog puta u razvoju leka (Gibson, 2016). Rastvorljivost oba liganda u vodi je bila veoma niska, te se supstance prema farmakopeji mogu smatrati praktično nerastvorljivim. Zbog odsustva lako jonizujućih funkcionalnih grupa u oba molekula, rastvorljivost u vodi ne zavisi od pH vrednosti u fiziološkom opsegu, što je i pokazano na primeru DK-I-60-3 (rastvorljivost u 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini pH 1,2 $7,21 \pm 0,40$ $\mu\text{g/ml}$, odnosno u fosfatnom puferu pH 6,8 $7,75 \pm 1,09$ $\mu\text{g/ml}$). Ovo ujedno i isključuje mogućnost građenja soli kao načina za povećanje rastvorljivosti.

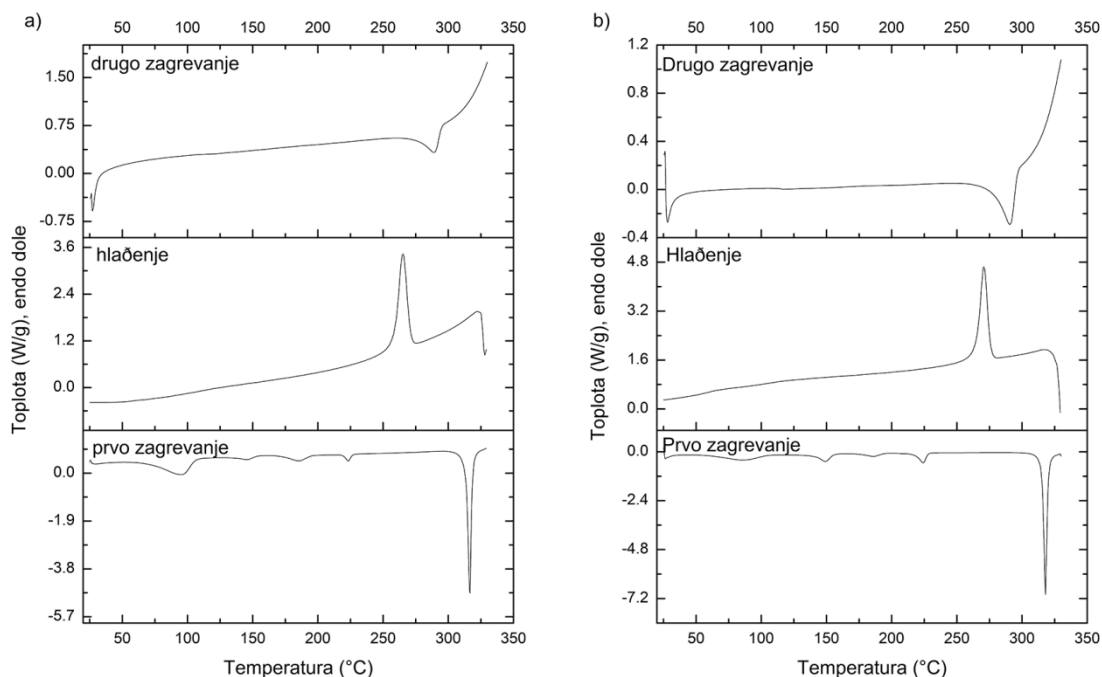
Tabela 4.1.1. Saturaciona rastvorljivost DK-I-56-1 i DK-I-60-3 u uobičajenim rastvaračima i korastvaračima.

Rastvarač	Rastvorljivost ($\mu\text{g/ml}$)	
	DK-I-56-1	DK-I-60-3
Voda (pH 5,23)	$6,27 \pm 0,74$	$6,34 \pm 1,14$
Trigliceridi srednje dužine lanca	$98,67 \pm 5,32$	$50,33 \pm 7,19$
Sojino ulje	$39,19 \pm 0,99$	$13,81 \pm 0,69$
Ricinusovo ulje	$537,91 \pm 51,60$	$57,96 \pm 1,79$
Benzil-alkohol	$7799,94 \pm 603,59$	$10373,53 \pm 371,41$
Izopropanol	$1034,72 \pm 23,03$	$1009,41 \pm 19,50$
Metanol	$795,69 \pm 120,58$	$802,86 \pm 103,43$
Etanol	$1157,36 \pm 56,36$ (70%, v/v)	$1807,70 \pm 21,67$ (96%, v/v)
Dimetil-sulfoksid	$137951,56 \pm 2897,67$	$166495,77 \pm 4075,05$

Rastvorljivost u uljima je takođe veoma niska, kao i u mnogim organskim rastvaračima, izuzev dimetilsulfoksida (Tabela 4.1.1). Na osnovu dobijenih rezultata, razvoj formulacija baziranih na korišćenju ulja bio je isključen. Dodatno, formulacija rastvora bila bi nemoguća bez korišćenja visokih koncentracija organskih rastvarača, što bi smanjilo bezbednost preparata. Iako je u prekliničkim ispitivanjima dimetilsulfoksid korišćen u koncentraciji do 20% u parenteralnim formulacijama, primena ovakvog preparata bi izazvala veliku zabrinutost kada se uzme u obzir njegov nizak maksimalni dozvoljeni limit određen od strane FDA (Williams i sar., 2013; FDA, 1998).

4.1.4. Termalna analiza supstanci

S obzirom na slabu rastvorljivost u vodi, ali i uljima i organskim rastvaračima, ispitivane supstance se mogu smatrati supstancama nalik na ciglenu prašinu (engl. *brick dust*). Za supstance iz ove grupe formulacioni pristupi za prevazilaženje slabe rastvorljivosti su amorfizacija ili dobijanje nanokristala (Bergström i sar., 2016; Peltonen i Hirvonen, 2018). Međutim nisu sve supstance dobri kandidati za prevođenje u amorfno stanje. Na osnovu sposobnosti vitrifikacije tokom hlađenja iz otopljenog stanja materijali mogu da se okarakterišu kao staklo-formirajuće (engl. *glass-forming*) ili ne-staklo-formirajuće (engl. *non glass-forming*) supstance. Veliki broj radova se bavio razvojem kompjuterskih programa kojima bi moglo da se predvidi kojoj grupi supstanci neki materijal pripada. Prepoznati su mnogi faktori koji mogu uticati na sposobnost materijala da se prevede u amorfno stanje, i mnogi od njih su vezani za molekulsku strukturu, odnosno podatke koji su dostupni u ranoj fazi razvoja leka, kao što je temperatura topljenja, molekulska masa ili logP, te su od posebnog značaja za razvoj formulacija novih potencijalnih kandidata za lek (Alhalaweh i sar., 2014; Mahlin i sar., 2011; Nurzyńska i sar., 2015). Na primer, aromatični prstenovi, kao rigidne strukture u molekulu doprinose gušćem pakovanju molekula u kristalnu rešetku, tako da povećavaju tendenciju ka kristalizaciji. Sa druge strane, supstance koje mogu preći u amorfno stanje imaju visok kapacitet za formiranje vodoničnih veza, veliku zapreminu molekula i broj rotirajućih veza. Prema molekulskoj masi, dobre staklo-formirajuće supstance imaju molekulska masu veću od 300, a one kojima je molekulska masa manja od 200 ne mogu preći u amorfno stanje nijednom tehnikom (Bergström i sar., 2016). Prema rezultatima istraživanja Alhalaweh i sar. (2014) može se pretpostaviti da DK-I-56-1 i DK-I-60-3 neće biti stabilne u amorfnom obliku, odnosno da će biti okarakterisane kao ne-staklo-formirajuće supstance. Ova pretpostavka je bazirana pre svega na molekulskoj strukturi, mada prema molekulskoj masi bi se očekivalo da ispitivane supstance mogu formirati amorfno stanje. Zbog toga, odlučeno je da se eksperimentalno proveriti sposobnost supstanci da postanu amorfne nakon hlađenja njihovog rastopa. Korišćena je metoda gašenja rastopa (engl. *melt-quenching*).



Slika 4.1.3. Termogrami dobijeni tokom zagrevanja, hlađenja i ponovnog zagrevanja (metoda gašenja rastopa) supstanci a) DK-I-56-1 i b) DK-I-60-3.

Metoda se zasniva na zagrevanju supstance do potpunog topljenja, nakon čega sledi hlađenje i ponovno zagrevanje na istu temperaturu kao u prvom delu eksperimenta. Rezultati su prikazani na slici 4.1.3. Oba liganda su u prvom ciklusu zagrevanja otopljena na temperaturi 316,01 °C (DK-I-56-1), odnosno 316,85 °C (DK-I-60-3). Endotermni pikovi topljenja su bili oštri, sa entalpijom 69,66 J/g (DK-I-56-1) i 74,62 J/g (DK-I-60-3). Ubrzo nakon početka hlađenja došlo je do kristalizacije (egzotermni pik na 273,71 °C za DK-I-56-1, odnosno 276,92 °C za DK-I-60-3). U trećem delu eksperimenta, relativno širok endotermni pik na 289,21 °C (DK-I-56-1), odnosno na 290,45 °C (DK-I-60-3) ukazao je na topljenje kristalizovanih supstanci. Kristalizacija supstanci tokom hlađenja ubrzo nakon njihovog topljenja karakteristika je supstanci koje pripadaju klasi I molekula sa visokom sklonošću ka kristalizaciji, odnosno ne-staklo-formirajućih supstanci (Baird i sar., 2010). Međutim, može se primetiti da nije celokupna količina supstance kristalisala, posebno kada se izračuna indeks kristalizacije na osnovu entalpija topljenja u prvom i drugom zagrevanju. Za DK-I-56-1 izračunati indeks kristalizacije je 58,05%, a za DK-I-60-3 57,34%. Ova niža kristaličnost može biti povezana sa formiranjem delimično neuređene kristalne rešetke, što se takođe može zaključiti i na osnovu širenja pika topljenja tokom trećeg dela eksperimenta. Zapravo, smatra se da se farmaceutske aktivne supstance prema uređenosti nalaze između nasumično raspoređenih molekula i savršenih kristala (Peltonen i Strachan, 2020).

4.1.5. Analiza lipidnih smeša i mogućnosti uključivanja DK-supstanci

Kako bi se ispitala mogućnost formulacije lipidnih nanočestica, ispitivana je rastvorljivost DK-I-60-3 u lipidnim smešama čvrstog lipida (Softisan® 154, S154) i triglicerida srednje dužine lanca ili lecitina.

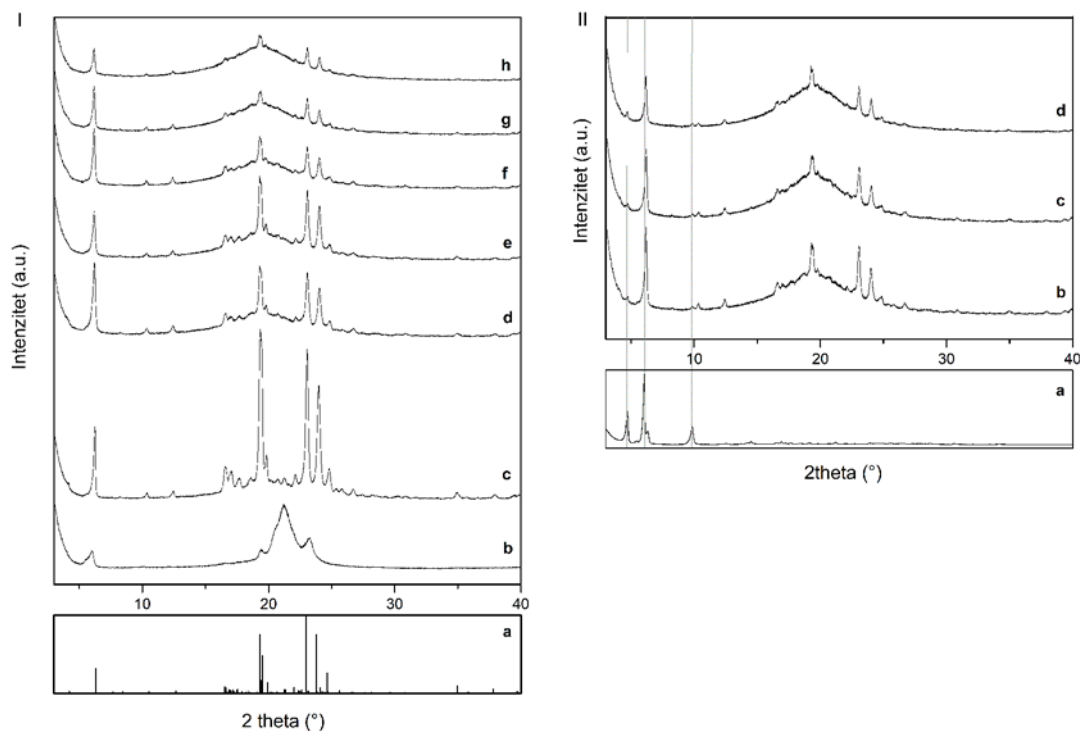
Lipidne smeše čvrstog i tečnog lipida

Inicijalno, analizirane su smeše čvrstog (S154) i tečnog lipida (trigliceridi srednje dužine lanca, MCT), kako bi se ispitalo njihovo mešanje. Nakon dodavanja MCT, kao što je i očekivano, temperatura topljenja i entalpija su smanjene, dok je razlika između početne (*onset*) i temperature pika povećana, sa povećanjem udela MCT u smeši (tabela 4.1.2.). Može se zaključiti da je tečni

lipid molekularski dispergovan u čvrstom lipidu, što dovodi do neuređenosti kristalne rešetke (Severino i sar., 2012). Ova neuređenost je povoljna sa aspekta inkorporiranja lekovite supstance i u osnovi je povećanja efikasnosti inkapsulacije NLC (Agrawal i sar., 2020).

Tabela 4.1.2. Termoanalitički parametri lipidnih smeša čvrstog (S154) i tečnog (MCT) lipida, sa i bez DK-I-60-3

Lipidna smeša	T_{onset} (°C)	T_{peak} (°C)	Entalpija topljenja (J/g)	CI_{LM} (%)
rekristalisani S154	54,4	57,3	137,6	89,9
S154:MCT 8:2	54,1	56,8	135,5	88,5
S154:MCT 6:4	53,4	56,3	117,8	77,0
S154:MCT 5:5	51,4	54,9	96,5	63,1
S154:MCT 4:6	47,9	53,8	72,5	47,4
S154:MCT 3:7	45,2	51,4	55,6	36,3
S154:MCT 2:8	42,5	49,5	36,1	23,6
S154:MCT 4:6 + 1,0% DK	47,3	53,4	70,6	46,1
S154:MCT 3:7 + 1,0% DK	46,8	51,6	55,0	35,9
S154:MCT 2:8 + 1,0% DK	45,9	48,6	35,9	23,5



Slika 4.1.4. XRPD difraktogrami I – lipidnih smeša: a) shematski prikaz β oblika triglicerida, b) S154, c) S154:MCT 8:2, d) S154:MCT 6:4, e) S154:MCT 5:5, f) S154:MCT 4:6, g) S154:MCT 3:7, h) S154:MCT 2:8; II – lipidnih smeša sa DK-I-60-3: a) DK-I-60-3, b) S154:MCT 4:6 + 1,0% DK-I-60-3, c) S154:MCT 3:7 + 1,0% DK-I-60-3, d) S154:MCT 2:8 + 1,0% DK-I-60-3.

Rezultati termalne analize potvrđeni su difrakcijom X-zraka (XRPD, slika 4.1.4.I). Difraktogram S154 pokazuje široke maksimume difrakcije koji ukazuju na nisku kristaliničnost sa 2θ karakterističnim za β' polimorfni oblik (i malim udelom β forme). Međutim, u smeši sa MCT, prisutan je isključivo β oblik triglicerida. Dobro je poznato da su trigliceridi prisutni u tri polimorfna oblika sa različitom termodinamičkom stabilnošću – α , β' i β . Polimorfne promene su usmerene od α kroz β' do β , kao termodinamički stabilnoj formi. Kada se razmatra mogućnost

inkorporiranja lekovite supstance, iako se α oblik može smatrati povoljnijim zbog manje uređenosti kristalne rešetke, poželjno je da čvrst lipid bude u β obliku koji ima veću stabilnost (Bunjes, 2011). Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da samostalan S154 rekristališe sporo, ali da MCT ubzava rekristalizaciju u termodinamički stabilan oblik. Pored toga, povećanje sadržaja MCT povećava količinu amorfnih regiona u smešama, što je vidljivo na difraktogramima kao povećanje bazne linije, ali i iz termodinamičkih parametara (širenje pika topljenja).

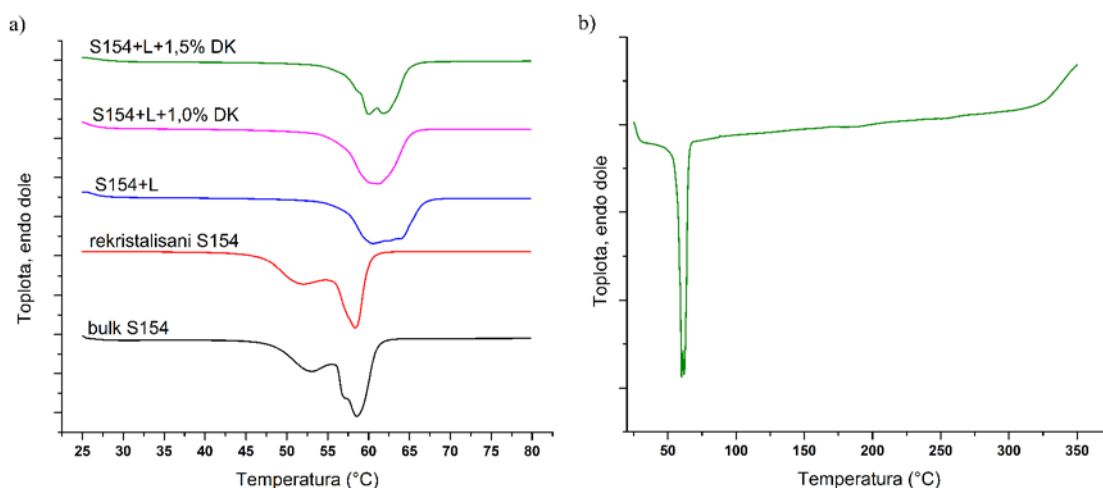
U drugoj etapi eksperimenata, u lipidne smeše dodat je DK-I-60-3 u koncentraciji 1,0%. Za ovo ispitivanje izabrane su smeše sa najvećim udelom tečnog lipida (60%, 70% i 80%), zbog pretpostavke da će imati najviše prostora za uključivanje supstance. Dobijene smeše bile su homogene, ali ne u potpunosti bistre. Početak topljenja, razlike između *onset* temperature i temperature pika i entalpija topljenja su bili neznatno izmenjeni, što ukazuje na nepromenjenu strukturu lipidne smeše (tabela 4.1.2.). Na DSC termogramima, ipak, pik topljenja supstance se nije mogao uočiti, verovatno zbog njene niske koncentracije i visoke temperature topljenja. Iz tog razloga, samo analizom termoanalitičkih parametara ne može se doći do valjanih zaključaka o stepenu dispergovanja DK-I-60-3 u lipidnim smešama. Na XRPD difraktogramima su detektovani karakteristični pikovi koji potiču od DK-I-60-3 (slika 4.1.4.), što ukazuje da je supstanca prisutna u kristalnom obliku i nije molekularno dispergovana u smeši. Na osnovu ovih rezultata, ispitivane smeše nisu smatrane pogodnim za dalji razvoj nanočestica.

Lipidne smeše čvrstog lipida i lecitina

Lipidne smeše S154 i lecitina sa i bez DK-I-60-3 su analizirane diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom. Termogrami su prikazani na slici 4.1.5, a izračunati termoanalitički parametri su navedeni u tabeli 4.1.3. Topljenje netretiranog S154 je ispoljeno kroz dva pika na 53 °C i 58 °C. To ukazuje na prisustvo različitih polimorfnih oblika, verovatno β' i β za prvi i drugi pik, respektivno (Schubert i sar., 2005). Nakon topljenja i očvršćavanja, S154 je kristalisao u gotovo isto stanje, što je pokazano nepromenjenim pikom topljenja sa indeksom kristaliniteta skoro 90%. Nakon dodatka lecitina (L), u koncentraciji 30%, pik na nižoj temperaturi je nestao, dok temperatura drugog pika nije značajno promenjena. Indeks kristaliniteta S154 u ovoj smeši bio je u dobroj korelaciji sa njegovim udelom, što znači da je čvrst lipid ostao prevashodno u kristalnom stanju (Schubert i Müller-Goymann, 2005), iako je njegova struktura narušena, što se može videti iz proširenog pika topljenja.

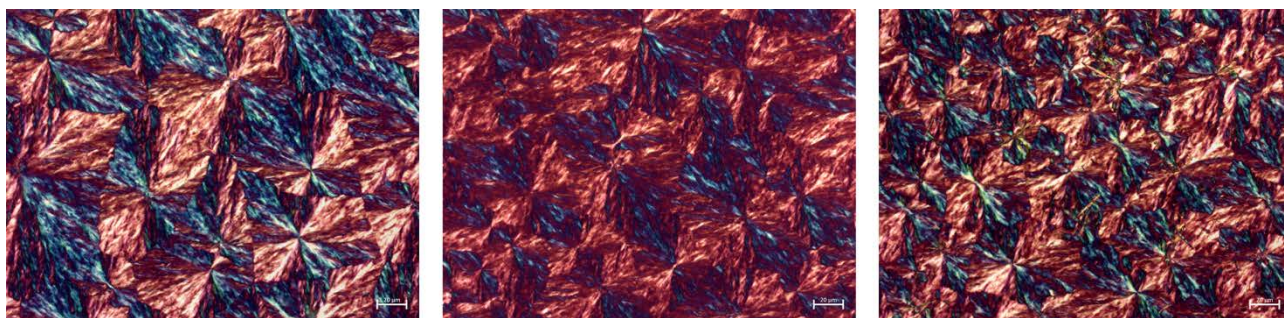
4.1.3. Termoanalitički parametri lipidnih smeša S154 i lecitina (L) sa i bez DK-I-60-3.

Lipidna smeša	T_{onset} (°C)	T_{peak} (°C)	Entalpija topljenja (J/g)	CI_{LM} (%)
bulk S154	55,1	58,0	140,6	-
rekristalisani S154	54,4	57,3	137,6	89,9
S154+L	56,4	59,6	101,4	72,1
S154+L + 1,0% DK	56,0	60,0	101,4	72,1
S154+L + 1,5% DK	56,3	59,6	100,5	71,5



Slika 4.1.5. a) Termogrami lipidnih smeša čvrstog lipida (S154) i lecitina (L) sa i bez DK-I-60-3; b) termogram lipidne smeše S154+L+1,5% DK, 25-350 °C.

Dalja ispitivanja smeša lipida i lecitina sprovedena su polarizacionom mikroskopijom (PLM). Homogena smeša S154 i lecitina je prikazana na slici 4.1.6 (levo). Dobro je poznato da lecitin kao amfifilna supstanca može formirati micelarne faze ili tečne kristale nakon hidratacije (lamelarne ili heksagonalne faze) ili usled promene temperature (različite forme termotropnih tečnih kristala) (Klang i Valenta, 2011). U ovoj studiji, nakon hlađenja smeše na sobnu temperaturu, na mikrografijama se mogu videti strukture koji podsećaju na Malteške krstove (slika 4.1.6.), a mogu se objasniti kao sferuliti (Sato i Ueno, 2011) rekristalisanog rastopa lipida i lecitina. Interesantno, u istraživanju Friedrich i Müller-Goymann (2003) u kojem su ispitivane slične smeše, sferni agregati veličine oko 10-20 nm između planarnih lipidnih slojeva su bili vidljivi na mikrografijama dobijenim transmissionom elektronskom mikroskopijom, i definisani kao reverzne micle lecitina. Sa druge strane, u sličnoj studiji Schubert-a i sar. (2006) nisu dobijeni isti rezultati. U svakom slučaju, lecitin je u svim istraživanjima bio homogeno distribuiran u okviru lipidnih smeša između triglicerida, značajno doprinoseći solubilizaciji slaborastvornih lekovitih supstanci kao što su estradiol-hemihidrat ili pilokarpin baza (Friedrich i Müller-Goymann, 2003).



Slika 4.1.6. Mikrografije dobijene polarizacionom mikroskopijom smeše S154+L (levo), S154+L+1,0% DK (sredina) i S154+L+1,5% DK (desno).

Lecitin koji je korišćen u ovom istraživanju sadrži oko 70% fosfatidilholina, kao i masne kiseline od kojih su u najvećem udelu linoleinska (C18:2) i palmitinska (C16:0). Zasićene masne kiseline se bolje prostorno uklapaju sa trigliceridima, zbog odsustva deformacije molekulske strukture. Sa druge strane, *cis* konformacija nezasićenih masnih kiselina može dovesti do formiranja dislokacija u lipidnom matriksu i posledično više mesta za uključivanje lekovite supstance. Ovo je posebno bitno za prospektivno inkorporiranje lekovite supstance, pošto je očekivano da će ona biti lokalizovana unutar dislokacija strukture lipid-fosfolipid tokom otapanja (Attama i Müller-Goymann, 2007).

Dodatak DK-I-60-3 u koncentraciji 1,0% nije značajno izmenio termalne karakteristike lipidne smeše, verovatno zbog male koncentracije liganda (slika 4.1.5, tabela 4.1.3.). Pik topljenja je bio diskretno proširen, usled inkorporiranja DK-I-60-3 u kristalnu rešetku. Ovo je bilo potvrđeno polarizacionom mikroskopijom – na mikrografijama nisu uočeni kristali liganda (slika 4.1.6, sredina). Međutim, kada je koncentracija DK-I-60-3 povećana na 1,5%, dobijeni rastop nije bio bistar. Uprkos tome, termalna analiza nije ukazala ni na kakve promene, verovatno zbog niske osetljivosti (slika 4.1.5.b). Na mikrografijama, pak, višak DK-I-60-3 bio je jasno vidljiv kao pojedinačni žuti kristali, neuspešno uključeni u lipidnu strukturu (slika, 4.1.6, desno). Na osnovu ovih eksperimenata, koncentracija od 1,0% je smatrana saturacionom rastvorljivošću DK-I-60-3 u lipidnoj smeši koja se sastoji od S154 i 30% lecitina.

4.2. Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada

4.2.1. Izrada nanokristalnih disperzija

Nanokristalne disperzije se mogu izraditi nekom od metoda usitnjavanja ili precipitacije, zavisno od osobina lekovite supstance. Zbog veoma slabe rastvorljivosti DK supstanci u većini organskih rastvarača, otežano je formulisanje početnog rastvora iz kojeg bi se sprovela precipitacija, te je izabrano da nanokristali budu pripremljeni nekom od *top down* metoda (Van Eerdenbrugh i sar., 2008). Kako je za eksperimente bila dostupna mala količina supstanci, nanokristali su pripremljeni modifikovanom metodom kugličnog usitnjavanja u tečnom stanju, korišćenjem uređaja za lizu ćelija, prema proceduri sličnoj metodi opisanoj u radu Corrias i sar. (2017). Pritom su varirani različiti parametri u cilju definisanja formulacionih i procesnih uslova za dobijanje nanokristala zadovoljavajućih fizičkohemijskih karakteristika.

4.2.1.1. Ispitivanje uticaja procesnih i formulacionih parametara na veličinu čestica nanokristala DK-I-60-3 namenjenih za oralnu primenu

Procesni parametri

Jedan od najznačajnijih procesnih parametara koji utiče na kinetiku smanjenja veličine čestica je trajanje usitnjavanja (Siewert i sar., 2018). Na osnovu rezultata merenja veličine čestica i njihove distribucije odmah nakon izrade, vreme mlevenja je imalo značajnog uticaja na oba posmatrana parametra u svim formulacijama – veličinu čestica (z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI) ($P < 0,05$, ANOVA) (Tabela 4.2.1). Nakon produženja usitnjavanja, veličina čestica je smanjena za 50 nm ili više, bez obzira na količinu kuglica za usitnjavanje. PDI je takođe smanjen nakon jednog sata mlevenja što ukazuje da je dobijena disperzija sa ujednačenijom veličinom čestica, iako u nekim formulacijama promena nije bila izražena. Kako se vreme usitnjavanja produžava, mogućnost sudara čestica lekovite supstance i kuglica se povećava pa je veća verovatnoća za lom čestica. Dodatno, više vremena je dostupno za interakciju između čestica lekovite supstance i stabilizatora, odnosno stabilizaciju novonastalih površina lekovite supstance nakon usitnjavanja. Ipak, mnogi radovi ukazuju da, nakon određenog vremena, veličina čestica dostiže konstantan nivo, te produženo vreme usitnjavanja ne dovodi do daljeg smanjenja čestica, moguće zbog povećanja verovatnoće za međučestične sudare (Peltonen i Hirvonen, 2010).

Kao drugi procesni parameter praćen je efekat količine kuglica cirkonijum-oksida (medijum za usitnjavanje) na veličinu čestica i distribuciju veličine čestica. U eksperimentima je korišćeno 60%, 40% ili 20% kuglica, u odnosu na zapreminu tube u kojoj je vršeno usitnjavanje. Primećena zavisnost nije bila direktna kao u slučaju vremena usitnjavanja i zavisila je ujedno i od drugih parametara. Uzimajući u obzir tehnološki proces koji se odvija u tubi, prisutna su tri tipa interakcija: kuglica-DK-I-60-3, kuglica-kuglica i DK-I-60-3-DK-I-60-3. Za efikasnu nanonizaciju, sudar između DK-I-60-3 i medijuma za usitnjavanje (kuglica) treba da bude dominantan, što bi bilo omogućeno dodatkom odgovarajuće količine kuglica (Peltonen i Hirvonen, 2010). Zapravo, zapremina medijuma za usitnjavanje je imala značajan uticaj na veličinu čestica u svim formulacijama ($P < 0,001$, ANOVA), i razlike u veličini su bile proporcionalne razlici u zapremini kuglica, tj. efekat je bio izraženiji u slučaju promene zapremine sa 20% na 40%. Može se primetiti da nakon jednog sata usitnjavanja, dvostruko uvećanje zapremine kuglica je dovelo do smanjenja veličine čestica za 30-60 nm, a dodatno povećanje zapremine na 60% veličina čestica je smanjena za dodatnih 20 nm u većini formulacija (Tabela 4.2.1).

Tabela 4.2.1. Veličina čestica (z-ave), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal (ZP) nanokristalnih disperzija nakon 30 min i jednog sata usitnjavanja pri korišćenju različite zapremine medijuma za usitnjavanje (srednja vrednost \pm SD, n=3).

Formulacija	Zapremina medijuma za usitnjavanje (% v/v)	Usitnjavanje 30 min		Usitnjavanje 60 min		
		z-ave (nm)	PDI	z-ave (nm)	PDI	ZP (mV)
F1	60	239,5 \pm 4,0	0,253 \pm 0,018	195,8 \pm 1,7	0,238 \pm 0,029	-17,5 \pm 1,6
	40	282,5 \pm 5,9	0,287 \pm 0,027	236,7 \pm 1,9	0,208 \pm 0,002	
	20	308,9 \pm 5,9	0,408 \pm 0,052	233,6 \pm 2,7	0,260 \pm 0,007	
F2	60	186,9 \pm 3,6	0,224 \pm 0,033	137,7 \pm 2,2	0,226 \pm 0,015	-16,8 \pm 0,5
	40	232,8 \pm 4,2	0,229 \pm 0,020	165,5 \pm 4,3	0,226 \pm 0,011	
	20	309,6 \pm 12,1	0,299 \pm 0,032	229,9 \pm 4,9	0,205 \pm 0,012	
F3	60	348,0 \pm 7,5	0,341 \pm 0,009	235,1 \pm 4,2	0,273 \pm 0,044	-28,0 \pm 1,2
	40	382,2 \pm 2,8	0,374 \pm 0,032	239,3 \pm 3,3	0,251 \pm 0,017	
	20	425,1 \pm 11,7	0,441 \pm 0,016	298,6 \pm 9,1	0,301 \pm 0,019	
F4	60	197,1 \pm 4,1	0,274 \pm 0,007	155,6 \pm 2,3	0,258 \pm 0,040	-19,2 \pm 0,7
	40	231,5 \pm 4,5	0,287 \pm 0,057	176,0 \pm 3,1	0,250 \pm 0,040	
	20	322,6 \pm 7,9	0,348 \pm 0,032	233,1 \pm 6,2	0,277 \pm 0,016	
F5	60	190,4 \pm 1,3	0,230 \pm 0,022	148,7 \pm 2,5	0,231 \pm 0,010	-21,8 \pm 5,6
	40	218,4 \pm 0,7	0,271 \pm 0,017	174,1 \pm 0,6	0,231 \pm 0,015	
	20	284,7 \pm 1,6	0,318 \pm 0,028	222,8 \pm 3,3	0,253 \pm 0,021	
F6	60	182,8 \pm 2,8	0,181 \pm 0,017	138,7 \pm 2,3	0,225 \pm 0,011	-31,9 \pm 1,8
	40	196,4 \pm 3,5	0,186 \pm 0,017	153,1 \pm 1,8	0,197 \pm 0,021	
	20	237,3 \pm 4,6	0,194 \pm 0,003	185,3 \pm 1,5	0,179 \pm 0,012	
F7	60	198,0 \pm 5,1	0,211 \pm 0,007	151,6 \pm 4,3	0,206 \pm 0,012	-36,8 \pm 1,1
	40	227,2 \pm 3,5	0,200 \pm 0,016	170,2 \pm 2,4	0,220 \pm 0,008	
	20	278,3 \pm 6,2	0,274 \pm 0,009	214,2 \pm 5,5	0,205 \pm 0,022	
F8	60	188,7 \pm 3,8	0,210 \pm 0,015	143,6 \pm 1,4	0,231 \pm 0,006	-38,1 \pm 1,9
	40	211,1 \pm 2,5	0,224 \pm 0,012	160,4 \pm 3,1	0,208 \pm 0,014	
	20	242,9 \pm 1,8	0,217 \pm 0,014	182,7 \pm 1,2	0,202 \pm 0,011	

Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da interakcija između oba posmatrana parametra – vreme usitnjavanja i zapremina kuglica, ima značajan efekat na PDI ($P < 0,05$) u svim formulacijama osim u slučaju F3 i F4. Zanimljivo je da je PDI u ove dve formulacije bio veći od 0,250, što je već ukazalo na potencijalnu smanjenu stabilnost nanokristala. Kako bi se procenio pojedinačni uticaj zapremine kuglica nakon jednočasovnog usitnjavanja, korišćena je jednofaktorska analiza varijanse. Značajan uticaj ovog parametra primećen je kod formulacija F1, F6 i F8, međutim nakon primene dodatnih statističkih testova, značajne razlike su primećene samo kada su poređene zapremine kuglica 20% i 60% (F6 i F8) ili 20% i 40% (F1). Kada se analiziraju vrednosti PDI, rezultati nisu konzistentni tako da je bilo teško izvesti generalni zaključak za sve formulacije. Na primer, u formulacijama F1 i F5, u kojima je odnos stabilizatora bio 1:10, PDI je bio najviši pri korišćenju najmanje zapremine kuglica. Suprotno, u formulacijama u kojima je odnos stabilizatora 1:4, najviši PDI je dobijen kada je korišćeno 60% kuglica. Može se pretpostaviti da je u ovom slučaju sa povećanjem količine kuglica došlo do intenzivnijeg mlevenja te i do formiranja populacije čestica malih veličina što je proširilo distribuciju veličine čestica. U formulacijama F3 i F4 dobijene su vrednosti PDI veće od 0,250, a najbolji rezultati su postignuti kada je korišćeno 40% kuglica.

S obzirom da je cilj ovog dela istraživanja bio da se utvrde najbolji uslovi za dobijanje disperzija sa malom veličinom čestica i prihvatljivom distribucijom veličina, zaključeno je da je potrebno da usitnjavanje traje jedan sat. Odabir količine kuglica je bio kompleksniji zadatak. Generalno, razlike između disperzija izrađenih sa 40% i 60% kuglica su bile suptilne, pa je za dalja istraživanja izabrano da količina kuglica bude 40%, s obzirom da su u tom slučaju u svim formulacijama dobijeni dobri rezultati merenja veličine čestica. Dodatna tehnička prednost korišćenja manje zapremine kuglica je smanjenje gubitaka tokom odvajanja disperzije od njih.

Formulacioni parametri

Pregledom literature, za stabilizaciju nanokristala proučavano je korišćenje različitih stabilizatora iz grupe surfaktanata, polimera, pojedinačno ili u kombinacijama. Prednost korišćenja dva mehanizma za stabilizaciju za dobijanje stabilnih koloidnih disperzija objašnjava se smanjenjem međusobnog odbijanja molekula jonskih surfaktanata u prisustvu sternih stabilizatora što dovodi do boljeg pakovanja molekula na površini čestica (Wu i sar., 2011). Kao jonski surfaktant korišćen je natrijum-laurilsulfat (SLS) u koncentraciji ispod kritične micelarne koncentracije, tako da prema preporukama za uspešnu stabilizaciju nije uticao na rastvorljivost DK-I-60-3 (Li i sar., 2021). Da bi se proverila ova tvrdnja, određena je saturaciona rastvorljivost u vodenim rastvorima stabilizatora (SLS i PVP) u koncentracijama koje odgovaraju onim prisutnim u formulacijama F5-8. Dobijeni rezultati ($5,52 \pm 1,22$; $3,47 \pm 0,25$; $4,32 \pm 0,05$ i $3,05 \pm 0,82$ $\mu\text{g/ml}$ za rastvore stabilizatora u koncentraciji kao u F5, F6, F7 i F8, respektivno) pokazuju da rastvorljivost nije bila veća od rastvorljivosti u vodi. Sa druge strane, preporuka prilikom izbora polimernog stabilizatora je odabir odgovarajuće molekulske mase. Ovaj parametar se pokazao kao značajan za prevazilaženje privlačnih *Van der Waals*-ovih sila, a dodatno i za prevenciju agregacije čestica usled formiranja mostova stabilizatora. Pokazano je da molekulska masa treba da bude između 5000 i 25000 g/mol (Peltonen i Hirvonen, 2010). Izabran je polivinilpirolidon (PVP) K25 sa molekulskom masom 24000 g/mol.

Poređenjem veličine i raspodele veličine čestica u formulacijama sa različitim koncentracijama SLS ali istim odnosima SLS i PVP, veličina čestica je bila značajno manja ($P < 0,05$, Student t-test) kada je korišćena veća koncentracija SLS, osim u slučaju odnosa stabilizatora 1:4, gde je razlika u veličini čestica bila samo 10 nm (Tabela 4.2.1). Dobro je poznato da smanjenjem veličine čestica do nanometarskih veličina, odnos površine i zapremine dramatično raste, te su nastale nanočestice sklone agregaciji u cilju prekrivanja novonastalih hidrofobnih površina. Iz tog razloga se dodaju amfifilne supstance ili polimeri u odgovarajućim koncentracijama, u cilju pokrivanja novih regiona na česticama i očuvanja nanometarskih veličina (Wang i sar., 2013). Ukoliko je koncentracija stabilizatora nedovoljna, čestice lekovite supstance ne mogu biti efikasno obložene, dok dodatak stabilizatora u višku može dovesti do agregacije ili vezivanja više čestica za isti lanac stabilizatora (Li i sar., 2021). Jasno je da koncentracija stabilizatora u formulacijama F1-F4 nije bila dovoljna da se osigura stabilizacija čestica, što je rezultiralo dobijanjem disperzija veće veličine čestica nakon izrade. Kada je koncentracija stabilizatora povećana (u formulacijama F5-F8) veličina čestica nakon izrade bila je manja od 200 nm, sa relativno uskom distribucijom ($\text{PDI} < 0,250$).

Merenje zeta potencijala doprinelo je razumevanju stabilizacije razvijenih nanokristala. U formulacijama F1-F4, sa nižom koncentracijom stabilizatora, apsolutne vrednosti zeta potencijala bile su veoma niske bez obzira na odnos SLS i PVP. Zeta potencijal nanokristala u formulaciji F5 je bio takođe oko -20 mV, međutim sa povećanjem odnosa SLS i PVP, apsolutne vrednosti zeta potencijala su se takođe povećale. Objašnjenje se može pronaći u sastavu omotača nanokristalnih čestica. Sloj adsorbovanih molekula polimera na površini čestica pomera smicajnu ravan na veću udaljenost, što rezultuje smanjenjem zeta potencijala (Pardeike i Müller, 2010). Kada je koncentracija polimera niska, površina čestica nije gusto obložena polimerom i jonski surfaktant može lakše da dostigne površinu nanokristala. Posledično, zeta potencijal raste sa povećanjem udela SLS u formulaciji (Peltonen i Hirvonen, 2010).

Studija stabilnosti tokom čuvanja

Osnovni parametri koji pokazuju stabilnost disperzija – veličina i raspodela veličine čestica i zeta potencijal formulacija F5-F8 su mereni nakon jednog i tri meseca čuvanja na sobnoj temperaturi. U poređenju sa inicijalnim vrednostima, veličina čestica nakon jednomesečnog čuvanja se povećala za oko 10 nm, a zatim ostala nepromenjena narednih dva meseca (Tabela 4.2.2). Izuzetak je formulacija F7, kod koje je promena veličine čestica bila izraženija (oko 40 nm) sa značajnom promenom PDI ($F(2,6) = 8,951$, $P < 0,05$, ANOVA). Studija stabilnosti je pokazala značaj PVP kao stabilizatora, kao i odnosa SLS i PVP za očuvanje veličine čestica.

Tabela 4.2.2. Veličina čestica (z-ave), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal (ZP) nanokristalnih disperzija nakon jednog i tri meseca čuvanja (srednja vrednost \pm SD, $n=3$).

Formulacija	z-ave (nm)		PDI		ZP (mV)	
	1 mesec	3 meseca	1 mesec	3 meseca	1 mesec	3 meseca
F5	183,5 \pm 4,2	181,2 \pm 3,3	0,227 \pm 0,024	0,212 \pm 0,008	-18,0 \pm 0,3	-20,7 \pm 1,5
F6	162,2 \pm 4,2	161,8 \pm 5,1	0,204 \pm 0,007	0,212 \pm 0,010	-35,3 \pm 1,2	-30,4 \pm 0,8
F7	212,0 \pm 5,3	214,2 \pm 5,9	0,238 \pm 0,004	0,220 \pm 0,005	-36,7 \pm 1,1	-40,7 \pm 1,1
F8	175,4 \pm 4,1	175,8 \pm 5,2	0,208 \pm 0,021	0,257 \pm 0,081	-41,8 \pm 2,6	-38,3 \pm 1,0

4.2.1.2. Ispitivanje uticaja procesnih i formulacionih parametara na veličinu čestica nanokristala DK-I-56-1 namenjenih za parenteralnu primenu

Procesni parametri

S obzirom na prethodna iskustva procene uticaja procesnih parametara na veličinu i raspodelu veličine čestica nanokristala, u razvoju parenteralnih nanodisperzija ovaj deo ispitivanja rađen je u smanjenom obimu. Rezultati su prikazani u tabeli 4.2.3. Kako je pokazano da se pri korišćenju 20% kuglica ne dobijaju disperzije zadovoljavajućih osobina, variranje količine kuglica je ograničeno na 40% i 60%. Pri korišćenju veće zapremine medijuma za usitnjavanje, odvajanje disperzija od kuglica bilo je praktično nemoguće. U poređenju sa formulacijama nanokristala za oralnu primenu, uticaj zapremine kuglica na veličinu čestica bio je jasniji prilikom ispitivanja parenteralnih disperzija. Značajne razlike u veličini čestica bile su primećene kod sve tri formulacije ($P < 0,05$, Student t-test) iako indeks polidisperznosti nije zavisio od posmatranog parametra. Pri korišćenju 60% kuglica dobijane su čestice manje veličine za 20-30 nm. Ovaj podatak ukazuje na značaj ispitivanja uticaja procesnih parametara za razvoj formulacija optimalnih karakteristika, posebno kada je u fokusu mala veličina čestica.

Tabela 4.2.3. Veličina čestica (z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI) nanokristalnih disperzija nakon 60 min i 120 min usitnjavanja pri korišćenju različite zapremine medijuma za usitnjavanje (srednja vrednost \pm SD, $n=3$).

Formulacija	Zapremina medijuma za usitnjavanje (% v/v)	Usitnjavanje 60 min		Usitnjavanje 120 min	
		z-ave (nm)	PDI	z-ave (nm)	PDI
NS2	40	163,1 \pm 2,4	0,210 \pm 0,023	/	/
	60	143,1 \pm 1,5	0,219 \pm 0,008	/	/
NS5	40	312,6 \pm 8,4	0,267 \pm 0,029	361,6 \pm 7,1	0,206 \pm 0,042
	60	281,2 \pm 0,6	0,214 \pm 0,013	398,5 \pm 1,0	0,271 \pm 0,008
NS6	40	248,6 \pm 3,9	0,191 \pm 0,019	286,6 \pm 1,9	0,215 \pm 0,026
	60	211,5 \pm 5,1	0,189 \pm 0,011	232,1 \pm 0,6	0,194 \pm 0,027

Prilikom razvoja preparata za parenteralnu primenu neophodno je odgovoriti na strože zahteve u pogledu veličine čestica (Wang i sar., 2017a). Iz tog razloga ispitivan je uticaj dodatnog produženja

vremena usitnjavanja u odnosu na uslove postavljene pri razvoju formulacija za oralnu primenu. Međutim, suprotno početnim očekivanjima, dodatno vreme za usitnjavanje dovelo je do povećanja veličine čestica u ispitivanim formulacijama bez obzira na količinu kuglica (Tabela 4.2.3). Moguće objašnjenje za ovakve rezultate jeste povećana međusobna interakcija čestica DK-I-56-1, zbog čega su formirani agregati sa većom veličinom čestica (Peltonen i Hirvonen, 2010). Smanjenje PDI koje je primećeno u dva slučaja može biti posledica ujednačavanja veličine čestica, zbog smanjenja populacije manjih čestica.

Formulacioni parametri

Parenteralni put primene ograničava broj stabilizatora koji se mogu koristiti. Za ovaj put primene odobreni su tipični nejonski stabilizatori iz grupe polisorbata i poloksamera, te su oni i korišćeni u formulacionim istraživanjima. Dodatno, iako TPGS još uvek nije zvanično odobren za parenteralnu primenu, njegova učestala primena kao stabilizatora za nanokristalne disperzije, kao i porast interesovanja za proučavanje korišćenja u formulacijama za ovaj put primene (Ahire i sar., 2018), bili su razlozi za njegovo uključivanje u eksperimente. Generalno, stabilizatori se mogu koristiti u velikom rasponu koncentracija – od stotog dela koncentracije lekovite supstance do one jednake koncentraciji lekovite supstance (Van Eerdenbrugh i sar., 2009). Iz tog razloga, prvo je ispitan uticaj samog polisorbata 80 u različitim koncentracijama na veličinu čestice, a potom je deo polisorbata 80 zamenjen drugim stabilizatorom – poloksamerom 407, poloksamerom 188 ili TPGS-om.

Tabela 4.2.4. Veličina čestica (z-ave), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal (ZP) razvijenih nanokristalnih disperzija nakon jednog sata i jednog dana od izrade (srednja vrednost \pm SD, n=3).

Formulacija	1 h		1 dan		
	z-ave (nm)	PDI	z-ave (nm)	PDI	ZP (mV)
NS1	308,5 \pm 9,1	0,201 \pm 0,032	428,0 \pm 4,5	0,222 \pm 0,035	-
NS2	274,9 \pm 6,4	0,218 \pm 0,023	208,7 \pm 3,6	0,221 \pm 0,004	-26,9 \pm 2,1
NS3	240,3 \pm 1,7	0,228 \pm 0,049	540,0 \pm 15,5	0,442 \pm 0,049	-
NS4	249,2 \pm 4,8	0,218 \pm 0,016	220,7 \pm 1,3	0,215 \pm 0,019	-19,8 \pm 0,5
NS5	248,0 \pm 5,1	0,249 \pm 0,026	250,6 \pm 5,8	0,231 \pm 0,016	-27,2 \pm 0,9
NS6	234,8 \pm 5,7	0,228 \pm 0,224	236,0 \pm 0,6	0,224 \pm 0,006	-25,5 \pm 0,8

Rezultati formulacionih ispitivanja prikazani su u tabeli 4.2.4. Očekivano, sa povećanjem koncentracije polisorbata 80 (NS1, NS2 i NS3), veličina čestica odmah nakon izrade se smanjila (Van Eerdenbrugh i sar., 2009). Međutim, nakon jednog dana u formulacijama NS1 i NS3 došlo je do izražene aglomeracije praćene sedimentacijom, dok je u formulaciji NS2 veličina čestica ostala oko 200 nm. Moguće je da koncentracija stabilizatora u formulaciji NS1 nije bila dovoljna za uspešnu stabilizaciju. Interakcija između molekula stabilizatora i čestica lekovite supstance tokom usitnjavanja rezultira njihovom adsorpcijom na površinu čestica. Preporučljivo je da se koriste stabilizatori u koncentracijama ispod kritične micelarne koncentracije (KMK), kako bi se izbeglo formiranje micela. U koncentracijama značajno iznad KMK, micelle se takmiče u adsorpciji na površini čestica, tako da se ukupna pokrivenost čestica stabilizatorom smanjuje (Deng i sar., 2010). Ovo može objasniti određene nestabilnosti uočene u formulaciji NS3. Posledično, formulacije NS1 i NS3 su isključene iz daljih eksperimenata.

Dalja formulaciona istraživanja bila su usmerena ka proučavanju efikasnosti drugih stabilizatora u kombinaciji sa polisorbitom 80. Poloksamer 188 i poloksamer 407 su korišćeni u koncentracijama nižim od KMK na 25 °C (Kabanov i sar., 2002), a TPGS je korišćen u koncentraciji većoj od KMK (Zhang i sar., 2012a). Merenje veličine čestica pokazalo je da se ispitivani sterni stabilizatori adsorbuju na površinu čestica i tako povećavaju stabilnost nanokristala (Tabela 4.2.4). Dakle, dodatak još jednog stabilizatora formulaciji NS1 doprinosi boljoj stabilnosti formulacije što je

rezultovalo očuvanjem veličine čestica tokom vremena. To je takođe potvrdilo prethodno iznetu pretpostavku o nedovoljnoj koncentraciji stabilizatora u NS1. Kako su formulacije namenjene za parenteralni put primene, a tehnika dinamičkog rasipanja svetlosti (DLS) ne daje pouzdane podatke o eventualnom prisustvu čestica nanokristala većih od 1 μm , veličina čestica je određena i primenom laserske difrakcije. Usled različitih principa na kojima se zasniva određivanje veličine čestica metodom DLS i laserske difrakcije, očekivano je da se rezultati dobijeni iz istih uzoraka međusobno razlikuju (Bhattacharjee, 2016). S obzirom da su vrednosti $D(v, 0.9)$ bile daleko ispod 1 μm (Tabela 4.2.5), formulacije NS2, NS4, NS5 i NS6 smatrane su prihvatljivim za pomenuti put primene (Wang i sar, 2017).

Tabela 4.2.5. Rezultati merenja veličine čestica metodom laserske difrakcije (srednja vrednost \pm SD, n=3).

Formulacija	D(v, 0.1) (μm)	D(v, 0.5) (μm)	D(v, 0.9) (μm)
NS2	0,0233 \pm 0,0016	0,0851 \pm 0,0130	0,3660 \pm 0,0141
NS4	0,0266 \pm 0,0021	0,0778 \pm 0,0082	0,2300 \pm 0,0379
NS5	0,0227 \pm 0,0003	0,0704 \pm 0,0007	0,2300 \pm 0,0000
NS6	0,0205 \pm 0,0007	0,0778 \pm 0,0082	0,2417 \pm 0,0099

Kao još jedan indikator stabilnosti, određen je zeta potencijal odabranih formulacija (Tabela 4.2.4). Vrednosti oko -20 mV se smatraju markerima dobre stabilnosti za koloidne disperzije stabilizovane nejonskim stabilizatorima (Bhattacharjee, 2016). S obzirom da zeta potencijal nije dovoljan za procenu stabilnosti tokom čuvanja, sprovedena je kombinovana analiza sa rezultatima određivanja veličine čestica.

Studija stabilnosti tokom čuvanja

Formulacije su čuvane na sobnoj temperaturi tokom tri nedelje, a njihova stabilnost procenjena je na osnovu merenja veličine čestica, PDI i zeta potencijala nakon dve i tri nedelje od izrade (Tabela 4.2.6). Hidrodinamički prečnik odabranih formulacija se neznatno promenio tokom tri nedelje čuvanja bez značajne promene vrednosti PDI ($F(1,4) = 0,604$, $P = 0,480$). Sa uskom raspodelom veličine čestica, razlike u rastvorljivosti su bile minimalne što je zajedno sa slabom rastvorljivošću DK-I-56-1 u vodi verovatno sprečilo Ostvaldovo sazrevanje (Wang i sar., 2013). Vrednosti zeta potencijala ostale su gotovo nepromenjene. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da su razvijene disperzije pokazale dobru kratkoročnu stabilnost, zadovoljavajuću iz aspekta primene formulacije u fazi prekliničkih istraživanja (Merisko-Liversidge i Liversidge, 2011). Ipak, rast veličine čestica tokom vremena je neizbežan problem nanokristalnih disperzija tako da je njihova stabilnost uglavnom ograničena na kratke periode od dve nedelje (Sharma i sar., 2011), jedan mesec (Pardeike i Müller, 2010) ili šest nedelja (Dolenc i sar., 2009). Iz tog razloga, prevođenje disperzija u čvrsto stanje bi bio naredni korak u očuvanju stabilnosti. Osim za čuvanje, ovaj proces bio bi značajan za studije određivanja raspona doze, koje su obavezne za nove lekovite supstance (Ayad, 2015; Chen i sar., 2017).

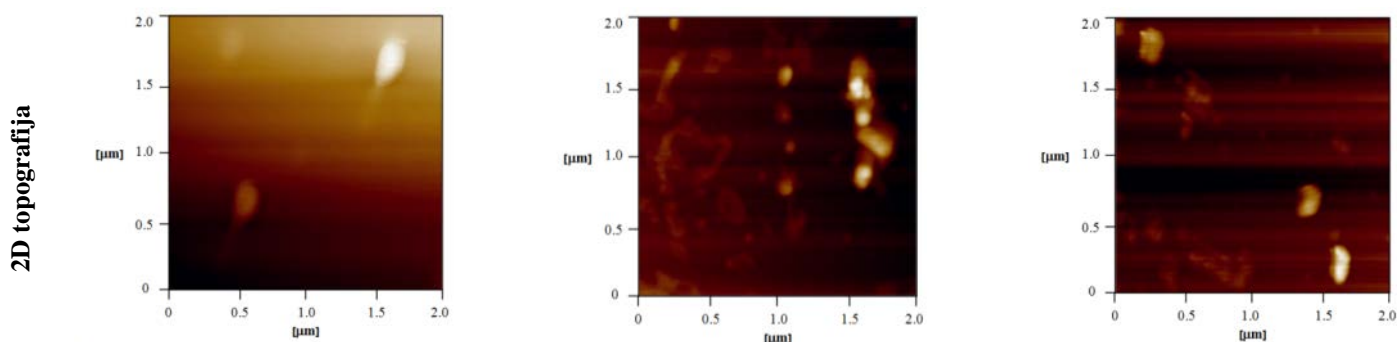
Tabela 4.2.6. Veličina čestica (z-ave), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal (ZP) razvijenih nanokristalnih disperzija nakon dve i tri nedelje čuvanja (srednja vrednost \pm SD, n=3).

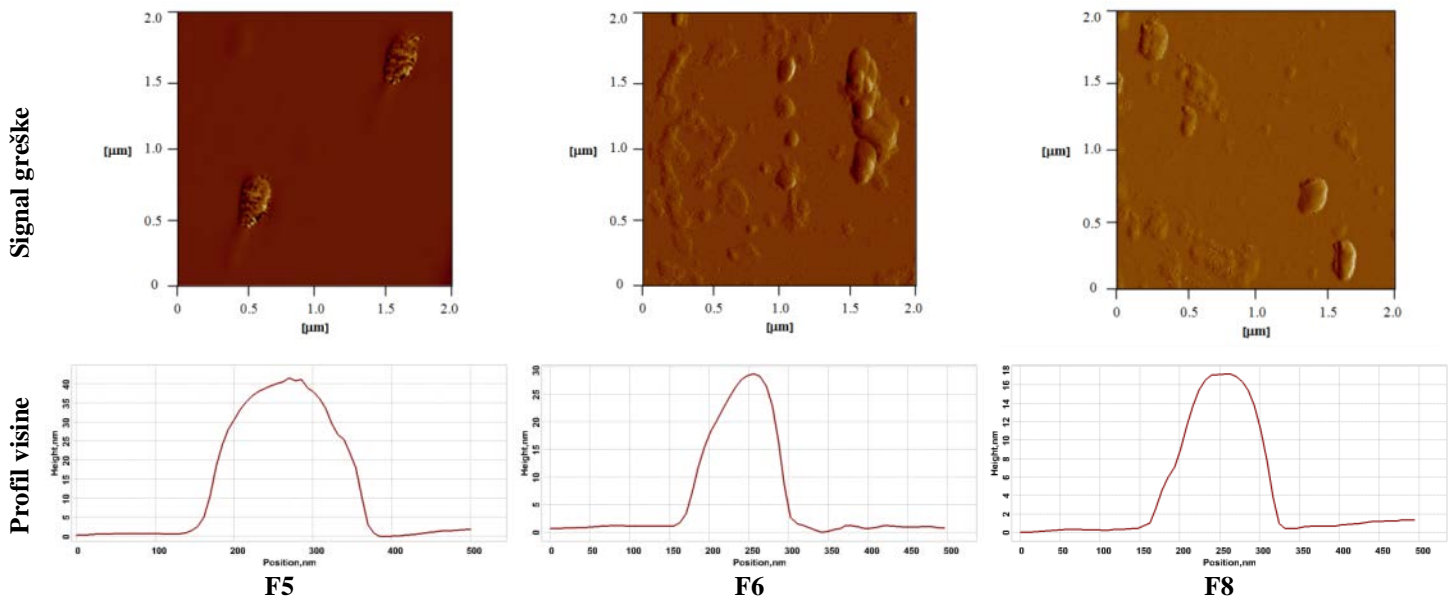
Formulacija	z-ave (nm)		PDI		ZP (mV)	
	2 nedelje	3 nedelje	2 nedelje	3 nedelje	2 nedelje	3 nedelje
NS2	219,4 ± 1,2	221,7 ± 3,0	0,245 ± 0,021	0,244 ± 0,009	-31,0 ± 0,9	-32,5 ± 3,0
NS4	235,9 ± 1,6	234,8 ± 4,4	0,219 ± 0,011	0,230 ± 0,008	-27,5 ± 1,3	-20,4 ± 1,2
NS5	252,6 ± 5,9	247,9 ± 2,9	0,239 ± 0,024	0,236 ± 0,030	-33,4 ± 0,6	-24,0 ± 0,9
NS6	246,9 ± 5,0	250,9 ± 8,9	0,197 ± 0,021	0,212 ± 0,004	-26,7 ± 0,7	-28,7 ± 0,4

4.2.2. Morfologija nanokristala mikroskopijom atomskih sila (AFM)

Iako dinamičko rasipanje svetlosti (DLS) predstavlja moćnu metodu za određivanje veličine čestica submikronskih dimenzija, primena ove metode limitirana je na sferne objekte, s obzirom da obezbeđuje informacije o hidrodinamičkom prečniku. Za čestice koje nisu sfernog oblika, DLS će dati vrednost hidrodinamičkog radijusa čestice koja se kreće istom brzinom kao nesferna čestica (Bhattacharjee, 2016), što se mora uzeti u obzir prilikom tumačenja rezultata. Na primer, u slučaju nanoiglica mogu se dobiti dva pika na dijagramu intenziteta koji bi odgovarali longitudinalnoj i transverzalnoj dimenziji (Pan i sar., 2007). Dodatno, iako je pogodna za detektovanje značajnih problema povezanih sa integritetom i stabilnošću uzoraka, zbog njene niske rezolucije, nije primenljiva kao jedina metoda za određivanje veličine nanočestica i polidisperznosti formulacija (Caputo i sar., 2019). Zbog toga, za uzorke kod kojih se očekuje prisustvo nesfernih čestica, vizuelizacija nekom mikroskopskom metodom je neophodna za pravilno tumačenje rezultata. Mikroskopija atomskih sila (AFM) se smatra kao značajna za karakterizaciju nanokristala pošto daje informacije o obliku i strukturi čestica u nanometarskoj rezoluciji (Li i sar., 2021).

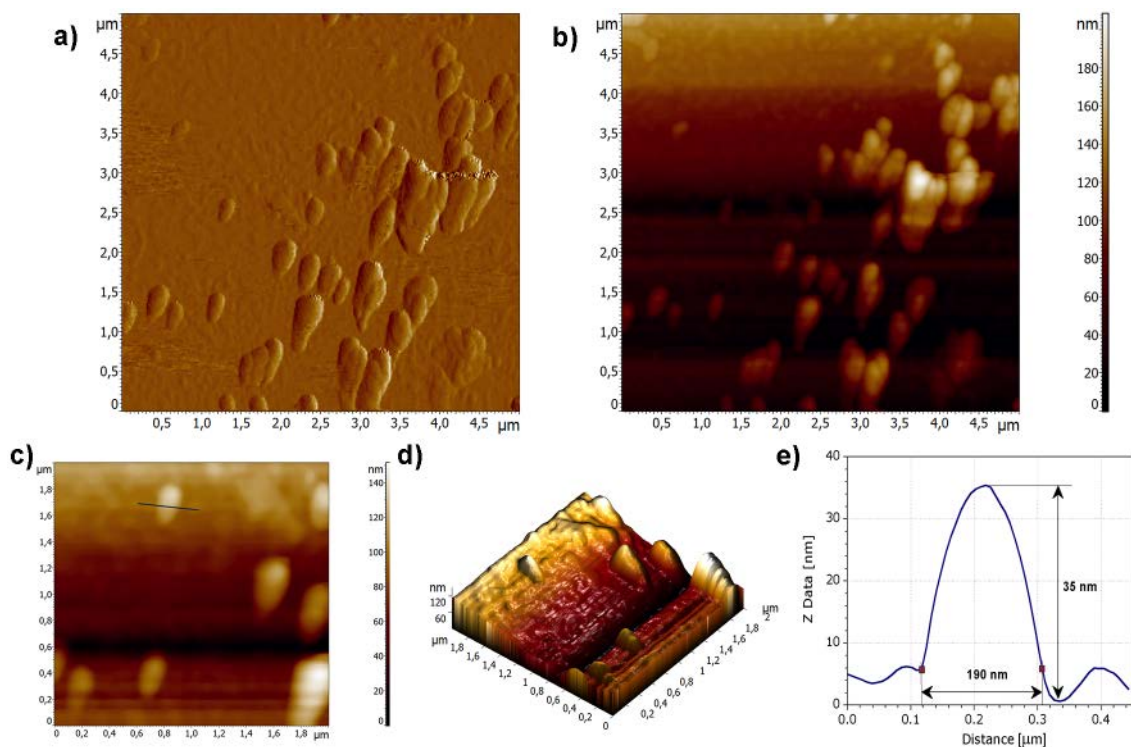
AFM slike uzoraka F5, F6 i F8 (disperzije nanokristala DK-I-60-3) su predstavljene na slici 4.2.1. Može se videti da su nanokristali bili ujednačene veličine i oblika, i da su rezultati bili u korelaciji sa onim dobijenim DLS tehnikom. U prvom uzorku čestice su bile dobro dispergovane sa dimenzijama oko 180 nm (širina), 400 nm (dužina) i 40 nm (visina). U uzorku F6 sa druge strane, mogu se uočiti pojedinačne čestice, ali i agregati formirani verovatno tokom pripreme uzorka (sušenja). Čestice su bile široke oko 130 nm. Slično je primećeno u uzorku F8.





Slika 4.2.1. Mikrografije dobijene mikroskopijom atomskih sila uzoraka F5 (prva kolona), F6 (druga kolona) i F8 (treća kolona): 2D topografija uzorka površine $2 \times 2 \mu\text{m}$ (prvi red), greška signal uzorka površine $2 \times 2 \mu\text{m}$ (drugi red) i profile visine izdvojenih čestica (treći red).

Na AFM slikama (slika 4.2.2) uzorka NS2 (disperzija nanokristala DK-I-56-1) se takođe može uočiti veliki broj pojedinačnih čestica ali i formiranih agregata tokom isparavanja vode. Čestica koja je označena na slici 4.2.2c elipsoidnog oblika imala je dimenzije oko 190 nm (širina), 400 nm (dužina) i 35 nm (visina). Kada se uporedi sa hidrodinamičkim prečnikom $249,6 \pm 3,4 \text{ nm}$, pomeranje veličine čestica se može povezati sa njihovim oblikom. Uzimajući u obzir da niska rezolucija DLS otežava razdvajanje pojedinačnih dimenzija čestice, može se smatrati da su rezultati AFM u dobroj usaglašenosti sa rezultatima DLS merenja.



Slika 4.2.2. Mikrografije dobijene mikroskopijom atomskih sila uzorka NS2: (a) greška signal uzorka površine $5 \times 5 \mu\text{m}$; (b) 2D topografija uzorka površine $5 \times 5 \mu\text{m}$; (c) 2D topografija uzorka

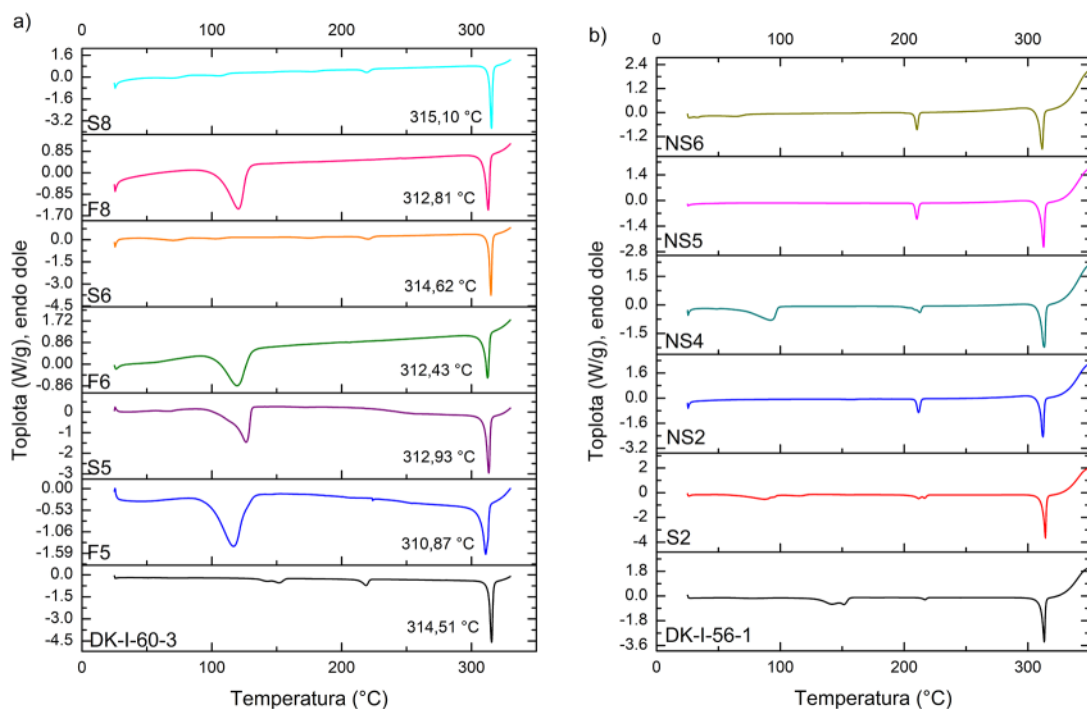
površine 2x2 μm sa linijom koja označava česticu izdvojenju za merenje površine; (d) 3D topografija uzorka površine 2x2 μm i (e) profil veličine označene čestice.

4.2.3. Analiza čvrstog stanja nanokristala diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) i difrakcijom X-zraka na uzorku supstance u obliku praška (XRPD)

Usitnjavanje u tečnom medijumu je visokoenergetski process koji može dovesti do stvaranja poremećaja ili cepanja kristalne rešetke lekovite supstance na najslabijim mestima, ili čak da prouzrokuje amorfizaciju (Steckel i sar., 2003; Wang i sar., 2017a). Održavanje kristalčnosti lekovite supstance u nanokristalnim disperzijama je korisno za njihovu stabilnost, jer razlika u rastvorljivosti može izazvati rast kristala u sistemima koji sadrže smešu amorfne i kristalne forme (Chin i sar., 2014; Wang i sar., 2013). Zbog toga neophodno je ispitati da li je tokom procesa pripreme disperzija došlo do formiranja defekata kristalne rešetke, polimorfne tranzicije i/ili amorfizacije lekovite supstance u nanokristalnim disperzijama. Uobičajeno se karakterizacija čvrstog stanja vrši diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) i difrakcijom X-zraka na uzorku supstance u obliku praška (XRPD).

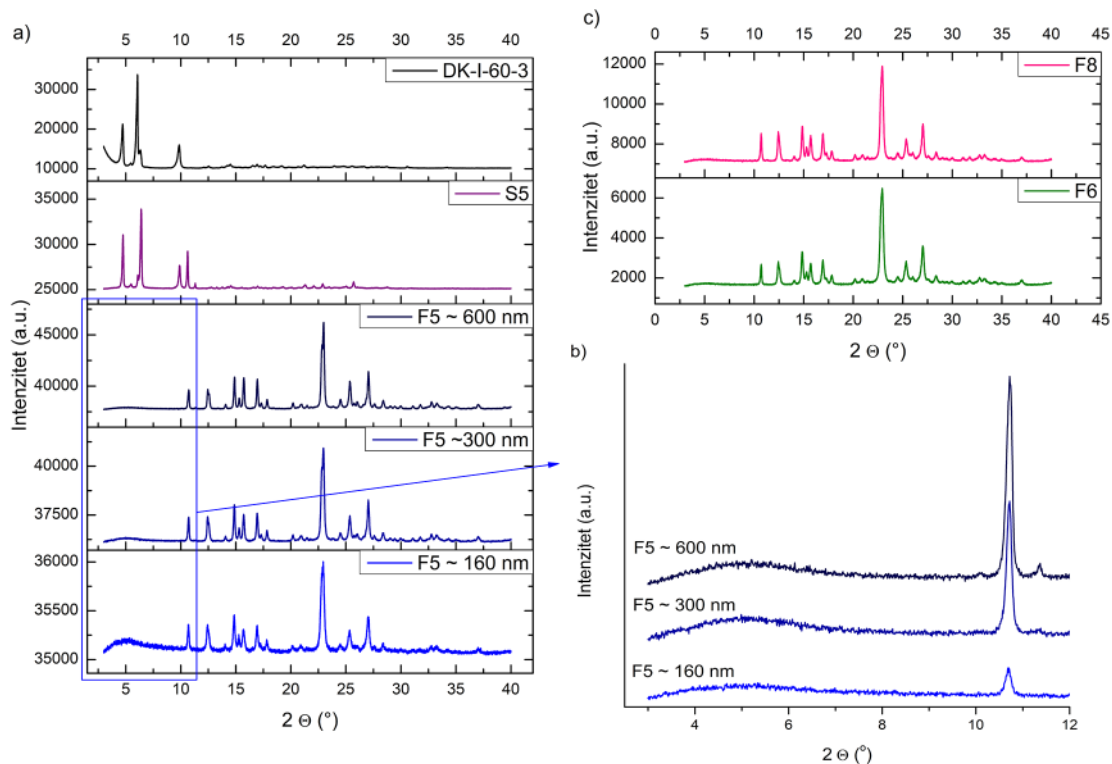
Rezultati termalne analize uzoraka nanokristala DK-I-60-3 metodom DSC prikazani su na slici 4.2.3a. S obzirom da je u pitanju kristalna supstanca, DK-I-60-3 se brzo topi nakon zagrevanja sa oštrim pikom topljenja vidljivim na DSC termogramu. Temperatura pika je bila oko 314 °C, i slični rezultati su dobijeni u slučaju fizičkih smeša S6 i S8. Pik topljenja DK-I-60-3 u fizičkoj smeši S5 je bio za 2 °C niži, verovatno zbog interakcija između DK-I-60-3 i ekscipijensa, s obzirom da je njihova koncentracija bila najviša u ovoj formulaciji. Pik topljenja u nanokristalnim formulacijama F5, F6 i F8 je bio za oko 2 °C niži u poređenju sa odgovarajućom fizičkom smešom, što se može objasniti manjom veličinom čestica (Medarević i sar., 2018). Smanjenje temperature topljenja može takođe biti povezano sa formiranjem defekata kristalne rešetke tokom usitnjavanja, kao visokoenergetskog procesa (Yang i sar., 2014). Dodatni široki pik na 120 °C na termogramima uzoraka S5, F5, F6 i F8 može biti povezan sa rezidualnom vodom i prisustvom PVP.

Slični rezultati dobijeni su pri zagrevanju nanokristalnih disperzija DK-I-56-1 (slika 4.2.3b). Ova supstanca se topi na temperaturi oko 312 °C, što se vidi na termogramu. Na DSC krivama uzoraka pripremljenih iz suspenzije (S2) i nanokristalnih disperzija (NS2, NS4, NS5 i NS6) vidi se oštar pik topljenja na temperaturama od 311,38 do 312,80 °C. Ove minimalne razlike u temperaturi pika mogu se objasniti normalnim varijacijama pri merenjima, a ne promenama polimorfne forme DK-I-56-1.



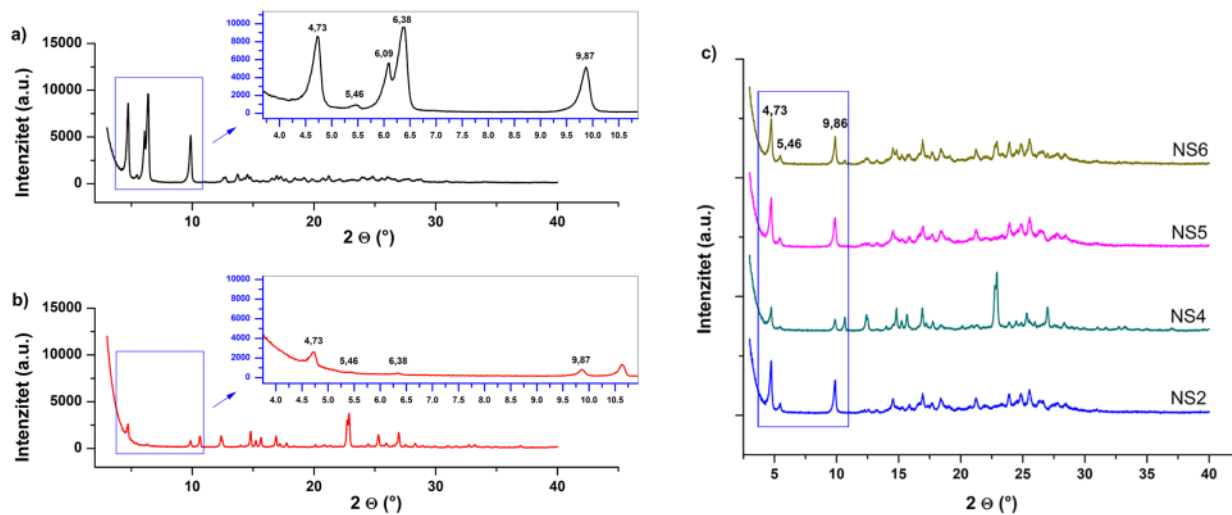
Slika 4.2.3. Termogrami dobijeni diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom uzoraka čiste supstance, fizičkih smeša (uzorci S) i odgovarajućih nanokristalnih disperzija (uzorci F, odnosno NS) supstanci (a) DK-I-60-3 i (b) DK-I-56-1.

Da bi se dobio detaljniji uvid u fizičko stanje dobijenih nanokristala, sprovedena je difrakcija X-zraka na uzorcima pripremljenim na isti način kao za DSC. Rezultati su pokazali da je uzorak S5 (suspenzija istog sastava kao formulacija F5) sadržao pretežno kristalni DK-I-60-3, ali ne i SLS (slika 4.2.4a). Ovo se može objasniti amorfnim stanjem SLS, ili uklanjanjem SLS tokom pripreme uzorka zbog nepotpunog vezivanja za površinu čestice. Promene intenziteta refleksije za kristale DK-I-60-3 u čistom prašku supstance i S5 mogu se pripisati preferencijalnoj orijentaciji kristala (prizmatičnoj do igličastoj) u dva uzorka. Proces usitnjavanja smanjio je prosečnu veličinu kristalita i doveo do povećanja formiranih defekata u kristalnoj rešetki u F5, što je tipično za nanokristale (Peltonen i Strachan, 2020). Posledično, sa produženjem usitnjavanja i smanjenjem veličine čestica, refleksije na XRPD difraktogramima su bile raširene (Bates i sar., 2006). Refleksije visokog intenziteta ispod 10° (2θ) izgubile su značajnu količinu intenziteta u uzorcima nanokristala. Ipak, prilično široka refleksija oko 5° (2θ) može se primetiti u uzorcima sa različitim veličinama čestica. Kao što se može videti na slici 4.2.4b, sa povećanjem intenziteta usitnjavanja, jačina široke refleksije se smanjila, ukazujući da je nanonizacija bila veoma intenzivan proces. Slični zaključci su izvedeni za uzorke F6 i F8, slika 4.2.4c.



Slika 4.2.4. Difraktogrami dobijeni metodom difrakcije X-zraka na uzorku supstance u obliku praška: (a) difraktogrami *bulk* DK-I-60-3, suspenzije S5 i nanokristalne disperzije F5 različite veličine čestica; (b) difraktogrami nanokristalne disperzije F5 različite veličine čestica u rasponu 2θ od 3° do 12° ; (c) difraktogrami nanokristalnih disperzija F6 i F8.

U uzorcima sa DK-I-56-1 (slika 4.2.5), takođe su prisutne promene zbog smanjenja veličine čestica. Visoka bazna linija u nanokristalnim uzorcima bila je verovatno uzrokovana postojanjem amornog sloja polisorbata 80 na osušenim uzorcima (Ali i sar., 2011). Oštri pikovi na 2θ $4,73^\circ$; $5,46^\circ$; $9,87^\circ$; $16,95^\circ$ i $17,66^\circ$ vidljivi na difraktogramu čiste supstance bili su prisutni na XRPD obrascima uzorka suspenzije i nanokristala. Ovi pikovi su bili korišćeni za potvrdu zadržane kristalne strukture DK-I-56-1 u ispitivanim uzorcima. Kao i u uzorcima DK-I-60-3, širenje pikova u uzorcima nanokristala u poređenju sa fizičkom smešom i čistom supstancom može biti okarakterisano kao posledica smanjenja veličine čestica, odnosno postojanja nanokristalne faze (Bates i sar., 2006). Interesantno je da se dva bliska pika na difraktogramu sirovog DK-I-56-1 na 2θ $6,09^\circ$ i $6,38^\circ$ (slika 4.2.5a) ne mogu videti na difraktogramima nanokristalnih uzoraka. Nestanak ovih signala može se objasniti efektom razblaživanja (Huang i sar., 2013) zajedno sa efektom smanjenja veličine čestica (Bates i sar., 2006). Ova tvrdnja može biti podržana rezultatima XRPD fizičke smeše (S2) u kojem se može detektovati samo širok pik veoma malog intenziteta, na $6,38^\circ$ (slika 4.2.5b). Moguće je da se u nanokristalnom uzorku difrakciona linija dodatno širi, usled nanonizacije, i potanja ispod bazne linije.



Slika 4.2.5. Difraktogrami dobijeni metodom difrakcije X-zraka na uzorku supstance u obliku praška: (a) *bulk* DK-I-56-1; (b) suspenzije S2 i (c) odabranih nanokristalnih disperzija (NS2, NS4, NS5 i NS6).

Otežana analiza XRPD rezultata posledica je nedostatka podataka iz literature vezanih za kristalnu strukturu DK-I-60-3 i DK-I-56-1, kao ni mogućim različitim polimornim oblicima. Međutim, zajedno rezultati DSC i XRPD nesumnjivo su potvrdili kristalno stanje ovih supstanci nakon nanonizacije. Takođe, značajno je odsustvo signala itrijuma ili cirkonijum-oksida, koji bi poticali od kuglica korišćenih za usitnjavanje, što ukazuje da nema onečišćenja od ovih materijala. Kontinuirano širenje pikova koje se javlja kod nanokristalne faze nekada može otežati interpretaciju rezultata. Međutim, kombinacijom ove metode sa metodom DSC može se razlikovati nanokristalna od amorfne faze, u zavisnosti od prisustva staklastog prelaza na termogramu (Gibson, 2016). Nanokristali se mogu smatrati kao međufaza između pravih kristala i amorfni materijala, čije fizičke osobine zavise od veličine kristala (Peltonen i Strachan, 2020).

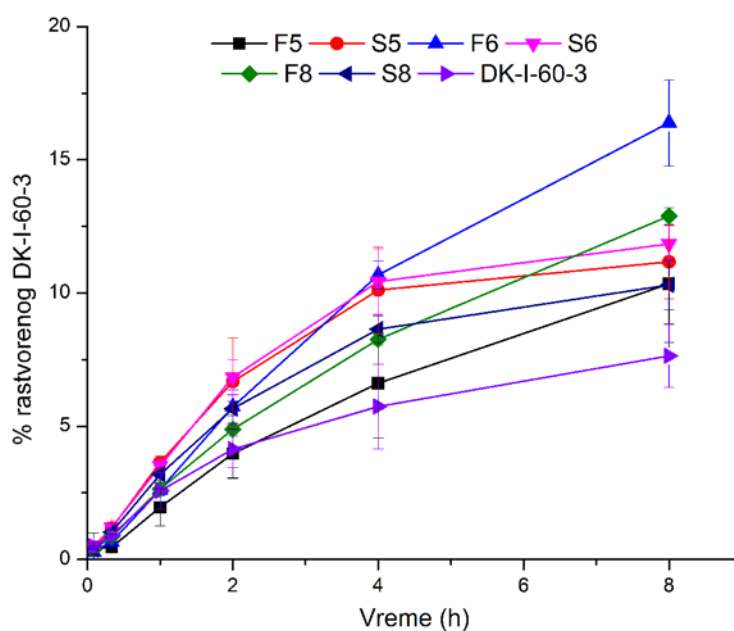
4.2.4. Ispitivanje brzine rastvaranja

Smanjenjem veličine čestica, povećava se brzina rastvaranja supstanci, u skladu sa Noyes-Whitney jednačinom (Dolenc i sar., 2009; Yang i sar., 2014). Međutim prilikom analize brzine rastvaranja nanokristala, najveća prepreka je razdvajanje nerastvorenih čestica od rastvorene lekovite supstance (Chen i sar., 2017). Metoda sa dijaliznim vrećicama, kao separaciona metoda je pogodna za prevazilaženje pomenute prepreke. Ova metoda se može sprovesti na dva načina – kao direktna i reverzna. Kod direktne metode, uzorak se postavlja u dijaliznu vrećicu, a uzorkovanje se vrši iz akceptorskog medijuma u unapred određenim vremenskim tačkama. Indirektna metoda podrazumeva punjenje dijalizne vrećice medijumom i postavljanje u veću količinu medijuma u koju se zatim dodaje uzorak koji se ispituje. Koncentracija rastvorene lekovite supstance se zatim određuje u medijumu iz dijalizne vrećice. U oba slučaja prolazak rastvorene lekovite supstance iz, odnosno u dijaliznu vrećicu vođen je difuzijom (Chidambaram i Burgess, 1999; Moreno-Bautista i Tam, 2011). Razvojem reverzne metode, zapravo se postiže razblaživanje disperzije, pa nanokristali postaju izloženi velikoj količini medijuma čime se oponašaju uslovi nakon parenteralne primene (Levy i Benita, 1990).

Prilikom odabira medijuma, kao što je već rečeno u uvodu, neophodno je omogućiti sporo rastvaranje lekovite supstance, kako bi se mogle uočiti razlike među formulacijama (Liu i sar., 2013). Kako je rastvorljivost DK supstanci u vodi veoma niska, za medijum je korišćena smeša prečišćene vode i izopropanola, kako bi se sprečili problemi pri detektovanju koncentracija u uzorcima usled velikih razblaženja. Koncentracija izopropanola je podešena tako da se spreči trenutno rastvaranje čitave količine formulacije, uzimajući u obzir i razblaženje u reverznoj metodi.

Nakon što je dodatak izopropanola u koncentraciji 20% u potpunosti rastvorio formulaciju nanokristala u roku od nekoliko minuta, smanjenjem koncentracije na 10% je postignut željeni cilj. Dobijeni medijum se ne može smatrati biorelevantnim, tako da se sprovedena ispitivanja mogu tumačiti samo u smislu međusobnog poređenja različitih formulacija nanokristalnih disperzija i poređenja nanokristalnih disperzija sa odgovarajućim grubim disperzijama ili čistom supstancom.

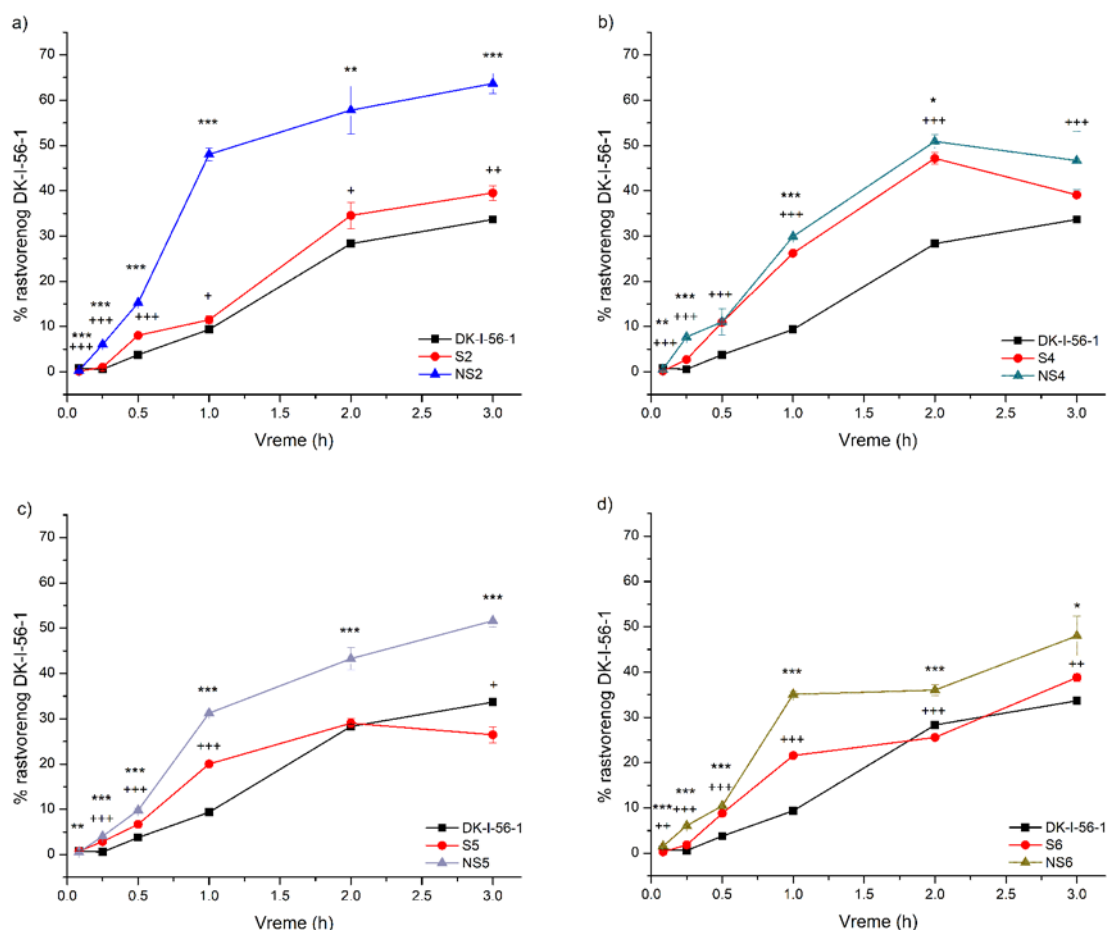
Profili brzine rastvaranja nanokristalnih disperzija (F5, F6 i F8), korespondentnih suspenzija (S5, S6 i S8), ali i čiste supstance DK-I-60-3 prikazani su na slici 4.2.6. Sadržaj DK-I-60-3 u pomenutim formulacijama nanokristala bio je $93,79 \pm 2,86\%$, $94,89 \pm 1,36\%$ i $92,32 \pm 2,99\%$, respektivno, izraženo u procentima u odnosu na teorijsku koncentraciju. Iz rezultata ispitivanja brzine rastvaranja može se primetiti da razlike između suspenzije i odgovarajuće nanosuspenzije nisu bile izražene, što bi se, prema Noyes–Whitney jednačini, moglo očekivati. Razlog se može pronaći u samoj primenjenoj metodologiji u kojoj se dijalizna membrana ponaša kao barijera za prolazak rastvorene supstance, ili u veoma slaboj rastvorljivosti DK-I-60-3 u korišćenom medijumu ($17,12 \pm 0,07$ g/ml) (Liu i sar., 2013). Veličina čestica nanokristala u dijaliznim vrećicama nakon eksperimenta nije bila značajno promenjena ($P > 0,05$, Student t-test, Tabela 4.2.7) što potvrđuje izražen uticaj dijalizne membrane na rastvaranje. Stoga, metoda ispitivanja brzine rastvaranja sa dijaliznim vrećicama najverovatnije nije dala istinski profil rastvaranja, što je i upozoreno u radu Moreno-Bautista i Tam (2011) za koloidne sisteme. Ipak, ovo ispitivanje može poslužiti za poređenje različitih formulacija. Iako se mogu uočiti samo diskretne razlike između profila rastvaranja na slici 4.2.6, postoji očigledan različit trend u kinetici rastvaranja između nanokristalnih disperzija i fizičkih smeša. Dok je kod suspenzija plato postignut nakon četiri sata ispitivanja, brzina rastvaranja nanokristala nije promenjena.



Slika 4.2.6. Profili ispitivanja brzine rastvaranja nanokristalnih disperzija (F5, F6 i F8). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, $n=3$ ($P < 0,05$: F5 vs. S5 (20 min), F5 vs. S5 (60 min); F6 vs. S6 (20 min), F6 vs. S6 (60 min), F6 vs. S6 (8 h); F8 vs. S8 (60 min), F8 vs. S8 (2 h), F8 vs. S8 (8 h); F5 vs. F6 (4 h), F5 vs. F6 (8 h); F6 vs. F8 (4 h), F6 vs. F8 (8 h); F5 vs. DK (20 min); F6 vs. DK (20 min), F6 vs. DK (2 h), F6 vs. DK (4 h), F6 vs. DK (8 h); F8 vs. DK (8 h), univarijantna ANOVA).

Tabela 4.2.7. Veličina čestica (z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI) pre i nakon ispitivanja brzine rastvaranja (srednja vrednost \pm SD, n=3).

Formulacija	z-ave (nm)		PDI	
	Pre eksperimenta	Posle eksperimenta	Pre eksperimenta	Posle eksperimenta
F5	164,1 \pm 5,2	166,7 \pm 2,8	0,208 \pm 0,013	0,195 \pm 0,014
F6	150,5 \pm 3,1	147,9 \pm 0,4	0,196 \pm 0,007	0,236 \pm 0,009
F8	176,4 \pm 6,1	186,3 \pm 1,6	0,186 \pm 0,012	0,185 \pm 0,015



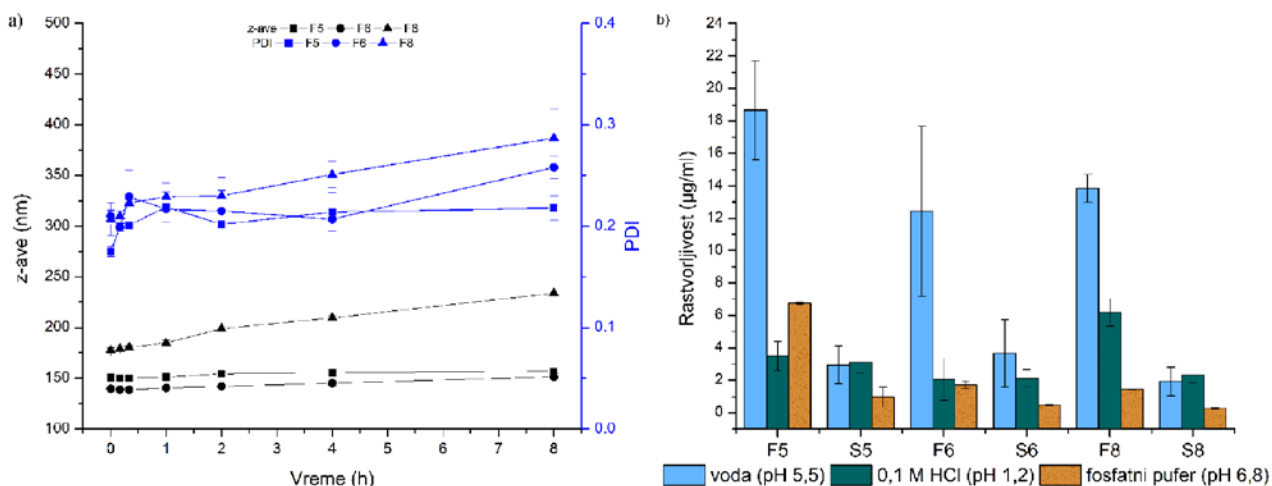
Slika 4.2.7. Profili brzine rastvaranja *bulk* DK-I-56-1, nanokristalnih disperzija i odgovarajućih suspenzija a) NS2 i S2; NS4 i S4; NS5 i S5; NS6 i S6. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, n=3; *, ** i ***: P < 0,05; P < 0,01 i P < 0,001 za NS vs. S; +, ++ i +++: P < 0,05; P < 0,01 i P < 0,001 za S vs. DK-I-56-1, respektivno.

Profili brzine rastvaranja čiste supstance DK-I-56-1, nanokristalnih disperzija (NS2, NS4, NS5 i NS6) i korespondirajućih fizičkih smeša (S2, S4, S5 i S6) su prikazani na slici 4.2.7. Rastvaranje DK-I-56-1 iz fizičkih smeša je neznatno zavisilo od pomoćnih supstanci, kada se uporedi sa rastvaranjem čistog DK-I-56-1. Slični rezultati mogu se naći za supstance kao što su aripiprazol (Xu i sar., 2012), herpetrion (Guo i sar., 2013), fenofibrat (Yang i sar., 2014) i ritonavir (Karakucuk i sar., 2019). Sa druge strane, nanonizacija je povećala brzinu rastvaranja u formulacijama NS2, NS5 i NS6, ali ne i u NS4, kad se uporedi sa odgovarajućim fizičkim smešama. Moguće je da je došlo do agregacije čestica u NS4 prilikom razblaživanja na 37 °C, što je dovelo do slične brzine rastvaranja nanosuspenzije i odgovarajuće grube disperzije. Zaista, Deng i saradnici (2010) primetili su u jednoj od formulacija nanokristala paklitaksela stabilizovanih poloksamerom 407, da je došlo do povećanja veličine čestica nakon razblaženja i inkubacije na 37 °C. Dobijene rezultate

objasnili su inhibicijom adsorpcije ovog surfaktanta na površinu nanokristala na višim temperaturama, što povećava sklonost ka agregaciji. Od svih formulacija, najveći uticaj nanonizacije na brzinu rastvaranja je bio u slučaju formulacije NS2. Ipak, uprkos značajnom dvostrukom povećanju, rastvaranje je i dalje bilo ograničeno veoma slabom rastvorljivošću (Ganta i sar., 2009; Yang i sar., 2014) pri čemu je oko 63% DK-I-56-1 bilo rastvoreno za 3 h. Opisani rezultati razlike brzine rastvaranja mogu bez sumnje biti povezani sa manjom veličinom čestica.

4.2.5. Ispitivanje stabilnosti nanokristala DK-I-60-3 u fosfatnom puferu

Dobro je poznato da stabilnost nanokristala može biti narušena u gastrointestinalnom traktu. Elektrostatičko odbijanje nanokristala može biti inhibirano pri visokim koncentracijama kiselina što dovodi do agregacije čestica (Li i sar., 2021). Iz tog razloga je ispitivana stabilnost nanokristala DK-I-60-3 u različitim medijumima. Praćeni su veličina čestica i indeks polidisperznosti kao osnovni indikatori stabilnosti ka agregaciji, tokom inkubiranja odabranih nanokristalnih disperzija (F5, F6 i F8) u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8, imitirajući na taj način biološke uslove u tankom crevu. Rezultati su prikazani na slici 4.2.8a. Veličina čestica se značajno menjala nakon jednog (F6 i F8) ili dva sata (F5) od početka inkubiranja ($P < 0,05$), mada praktično izraženo povećanje veličine čestica bilo je detektovano samo u formulaciji F8. U ovom uzorku nakon osam časova inkubiranja veličina čestica povećala se za oko 50 nm. Povećanje veličine čestica bilo je praćeno povećanjem PDI. Zanimljivo je da, uprkos očiglednom povećanju vrednosti indeksa polidisperznosti i statističke značajnosti kada se posmatra celokupan eksperiment ($F(6,12) = 10,390$; $P < 0,001$, ANOVA sa ponavljanjem), povećanje ovog parametra bilo je postepeno, usled čega se ne detektuju statistički značajne razlike između susednih vremenskih tačaka ($P > 0,05$). U formulaciji F5 povećanje PDI je primećeno na samom početku eksperimenta, a zatim je ovaj parametar bio gotovo konstantan do kraja praćenja, zadržavajući vrednosti ispod 0,220. Može se zaključiti da je formulacija F5 pokazala dobru stabilnost tokom osmočasovnog inkubiranja u fosfatnom puferu, verovatno, zahvaljujući odgovarajućoj kombinaciji stabilizatora. Ova formulacija sadrži najveću koncentraciju PVP, čime je potvrđen značaj korišćenja kombinacije jonskog surfaktanta i polimernog stabilizatora u zadržavanju stabilnosti.



Slika 4.2.8. (a) Veličina čestica (z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI) odabranih nanokristalnih formulacija (F5, F6 i F8) tokom inkubiranja u fosfatnom puferu (pH 6,8); (b) rastvorljivost DK-I-60-3 u nanokristalnim disperzijama (F5, F6 i F8) i odgovarajućih suspenzija (S5, S6 i S8) u različitim medijumima na 37 °C.

4.2.6. Ispitivanje rastvorljivosti nanokristala

Rastvorljivost DK-I-60-3 u obliku nanokristalne disperzije, kao i u formi odgovarajuće grube disperzije određena je u visokoprečišćenoj vodi (pH ~ 5,5), 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini (pH 1,2) i u fosfatnom puferu (pH 6,8) nakon dodavanja određene količine uzorka odgovarajućem medijumu i inkubiranju na 37 °C tokom 24 h. Rezultati su prikazani na slici 4.2.8b. U preformulacionim istraživanjima pokazano je da rastvorljivost čistog praška DK-I-60-3 nije značajno zavisila od pH vrednosti, i ovo je potvrđeno i kod uzoraka suspenzija. Sa druge strane, rastvorljivost nanokristala je bila značajno drugačija u različitim medijumima. U visokoprečišćenoj vodi rastvorljivost je bila tri do devet puta veća u odnosu na suspenziju sa istim sastavom ($P < 0,05$, Student t-test). Slični rezultati publikovani su za nanosuspenziju cefdinira (Sawant i sar., 2016). Povećanje saturacione rastvorljivosti je očekivano prema Ostwald–Freundlich jednačini (Müller i sar., 2011) zbog smanjenja veličine čestica, ali takođe i kao posledica promena u energiji kristalne rešetke (Sawant i sar., 2016).

U druga dva ispitivana medijuma, pak rastvorljivost je značajno smanjena što je ukazalo na narušenu stabilnost zbog niske pH vrednosti i/ili visoke jonske jačine. Zanimljivo je da je rastvorljivost DK-I-60-3 u 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini u uzorcima nanokristala bila smanjena na vrednosti slične kao u uzorcima suspenzije ($P = 0,563$ i $0,965$ za F5 vs. S5, i F6 vs. S6, respektivno, Student t-test) osim u slučaju F8 ($P < 0,01$, Student t-test). U ovoj formulaciji rastvorljivost DK-I-60-3 u 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini je bila iznenađujuće visoka. Najviša rastvorljivost u fosfatnom puferu je postignuta u slučaju F5 formulacije, u kojoj je koncentracija PVP bila najviša. Dodatak polimernih stabilizatora se smatra povoljnim za smanjenje uticaja jona na stabilnost nanokristala (Liversidge i Cundy, 1995). Dobijeni rezultati su u skladu i sa rezultatima inkubiranja nanokristala u fosfatnom puferu.

Promena rastvorljivosti DK-I-56-1 kada je supstanca u formi nanokristala procenjena je na drugi način. Nanokristalne disperzije su centrifugirane i koncentracija DK-I-56-1 je određena u supernatantu LC-MS metodom. Pored toga, napravljena je poredbena gruba disperzija (S2) istog sastava kao formulacija NS2, i tretirana je na isti način. Značajno je povećana rastvorljivost u svim formulacijama nanokristalnih disperzija, što je verovatno posledica smanjenja veličine čestica, u skladu sa Ostwald-Freundlich jednačinom (Tabela 4.2.8). Iznenadjuće, koncentracija DK-I-56-1 u gruboj disperziji bila je niža od saturacione rastvorljivosti u vodi ($6,27 \pm 0,74 \mu\text{g/ml}$), verovatno jer nije postignuta maksimalna rastvorljivost. Naime, suspenzija je centrifugirana relativno brzo nakon pripreme, pa nije postignuta rastvorljivost kao u *shake-flask* metodi koja podrazumeva mešanje uzorka tokom 24 h.

Tabela 4.2.8. Rastvorljivost DK-I-56-1 u suspenziji S2, nanokristalnim disperzijama (NS2, NS4, NS5 i NS6) i rastvorima stabilizatora u različitim koncentracijama (srednja vrednost \pm SD, $n=3$).

Formulacija	Rastvorljivost ($\mu\text{g/ml}$)	Rastvor stabilizatora	Rastvorljivost ($\mu\text{g/ml}$)
S2	$0,52 \pm 0,04$	polisorbata 80 (0,2%)	$63,61 \pm 1,91$
NS2	$147,00 \pm 2,20$	polisorbata 80 (0,1%)	$56,42 \pm 4,07$
NS4	$109,51 \pm 1,90$	polisorbata 80 (0,05%)	$14,73 \pm 0,49$
NS5	$96,18 \pm 0,94$	poloksamer 407 (0,05%)	$7,12 \pm 0,18$
NS6	$96,99 \pm 4,25$	poloksamer 188 (0,05%) TPGS (0,05%)	$8,79 \pm 0,30$ $13,66 \pm 0,52$

S obzirom na to da do povećanja rastvorljivosti može doći i usled formiranja micela stabilizatora i posledične micelarne solubilizacije, određena je saturaciona rastvorljivost DK-I-56-1 u rastvorima stabilizatora istih koncentracija kao u nanokristalnim formulacijama. Kao što je očekivano, rastvorljivost je bila povećana u rastvorima sa stabilizatorima u koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije (polisorbata 80 i TPGS), dok je u rastvorima poloksamera rastvorljivost bila

bliska onoj u vodi. Dodatno sa povećanjem koncentracije polisorbata 80, rasla je i rastvorljivost DK-I-56-1. Međutim, u svim ispitivanim uslovima, rastvorljivost je i dalje bila značajno manja nego u nanokristalnim formulacijama. Iako doprinos micelarne solublizacije može objasniti veće vrednosti u formulaciji NS2 u odnosu na druge formulacije, i dalje je smanjenje veličine čestica dovelo do najmanje 10 puta veće rastvorljivosti DK-I-56-1 u vodi u odnosu na supstancu *in bulk*.

4.2.7. Ispitivanje stabilnosti nanokristala DK-I-56-1 u prisustvu proteina

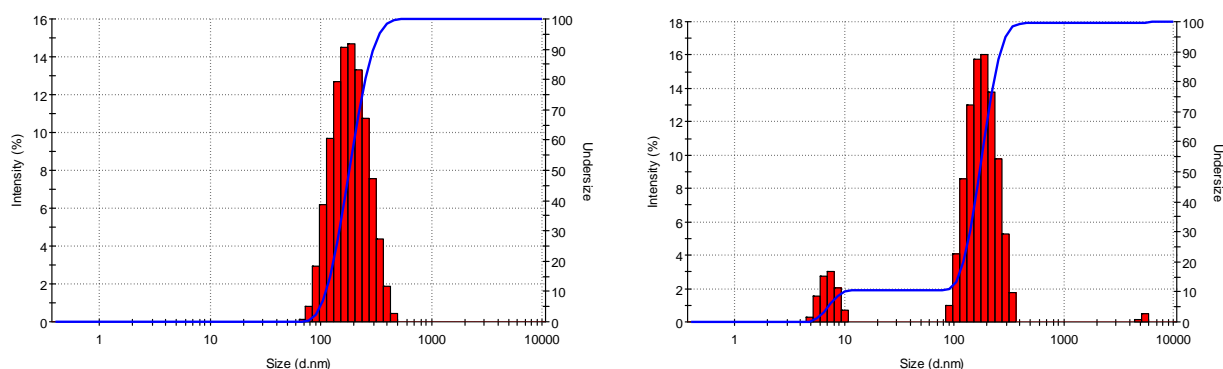
Jedan od značajnih aspekata prilikom razvoja parenteralnih formulacija jeste proučavanje njihovog ponašanja u biorelevantnom medijumu, posebno medijumu obogaćenom proteinima. Stabilnost u takvim medijumima predstavlja i jedan od predloženih koraka prilikom ispitivanja sklonosti nanočestica ka agregaciji (Calzolari, 2016). Nakon parenteralne primene, veoma brzo, u roku od nekoliko sekundi ili minuta, nanočestice mogu interagovati sa različitim proteinima, pri čemu se formira omotač nazvan proteinska korona. Ova promena fizičko-hemijskih osobina može promeniti površinske karakteristike i potencijalno izazvati imunski odgovor, modifikovati biodistribuciju, toksičnost i ciljanu isporuku. Adsorpcija proteina zavisi od veličine i oblika čestica, ali i od molekularnih interakcija hemijskih grupa sa površine čestica, odnosno stabilizatora i ostataka aminokiselinskih grupa proteina. Ova ispitivanja se mogu sprovoditi sa fetalnim goveđim serumom, ili se mogu koristiti različiti proteini, kao što su albumin (negativno naelektrisan na fiziološkoj pH vrednosti) i lizozim (pozitivno naelektrisan na fiziološkoj pH vrednosti) ili čak humana plazma. S obzirom da je u plazmi najzastupljeniji protein albumin, očekivano je da on najviše doprinese formiranju proteinske korone (Agrahari i sar., 2019), te je on izabran za ispitivanja, konkretnije goveđi serum albumin (BSA).

Vezivanje proteina može se analizirati metodom dinamičkog rasipanja svetlosti, nakon inkubiranja nanočestica sa proteinima u fosfatnom puferu na 37 °C (Dong i sar., 2011). Rezultati su prikazani u tabeli 4.2.9 i na slici 4.2.9. Inicijalno, proučavana je veličina BSA u fosfatnom puferu (PBS, pH 7,4). Na dijagramu su se nalazila dva pika, jedan većeg intenziteta na $6,3 \pm 0,3$ nm i drugi značajno manjeg intenziteta na $65,3 \pm 0,3$ nm koji verovatno potiče od agregata. Formulacije NS2 i NS4 su odabrane za ispitivanja, i inkubirane u PBS-u, odnosno medijumu koji se sastoji od 0,1% ili 1,0% BSA u PBS tokom jednog sata na 37 °C. Merjenja su rađena u intervalima od 10 minuta. Obe formulacije su bile stabilne u PBS-u, tokom celokupnog ispitivanja, sa neznatnim promenama u z-ave i PDI (Tabela 4.2.9.). Parametri veličine čestica u PBS-u razlikovali su se od izmerenih vrednosti u visoko prečišćenoj vodi (za NS2 z-ave $158,0 \pm 2,3$ nm, PDI $0,203 \pm 0,019$; za NS4 z-ave $241,6 \pm 3,8$, PDI $0,210 \pm 0,023$) zbog promene jonske jačine i vrste vehikuluma u kojem je rađeno merenje (Bhattacharjee, 2016). Tokom inkubiranja sa disperzijama proteina u PBS-u, pri nižoj koncentraciji BSA (0,1%), nije primećena značajna promena posmatranih parametara, u poređenju sa istim parametrima u samom PBS-u. Ovakav rezultat može ukazati na odsustvo vezivanja proteina, ali s obzirom da pik koji potiče od samog BSA nije uočen na dijagramima, takođe može biti posledica niske rezolucije korišćene metode.

Tabela 4.2.9. Veličina čestica (z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI) pre i nakon inkubiranja nanokristalnih disperzija NS2 i NS4 u različitim medijumima (srednja vrednost \pm SD, n=3).

Formulacija	0 h		1 h	
	z-ave (nm)	PDI	z-ave (nm)	PDI
NS2 u PBS	$153,9 \pm 1,6$	$0,202 \pm 0,008$	$163,0 \pm 0,5$	$0,187 \pm 0,009$
NS2 u 0,1% BSA/PBS	$153,8 \pm 1,2$	$0,181 \pm 0,019$	$161,6 \pm 2,1$	$0,186 \pm 0,016$
NS2 u 1,0% BSA/PBS	$161,0 \pm 1,3$	$0,251 \pm 0,020$	$165,2 \pm 0,6$	$0,250 \pm 0,009$
NS4 u PBS	$206,9 \pm 5,5$	$0,205 \pm 0,032$	$205,2 \pm 2,1$	$0,201 \pm 0,002$
NS4 u 0,1% BSA/PBS	$199,3 \pm 4,5$	$0,224 \pm 0,034$	$186,9 \pm 2,2$	$0,188 \pm 0,010$
NS4 u 1,0% BSA/PBS	$146,1 \pm 8,9$	$0,457 \pm 0,068$	$145,2 \pm 0,8$	$0,358 \pm 0,004$

Međutim, pri korišćenju veće koncentracije BSA (1,0%), pokazale su se značajne razlike u ponašanju ispitivanih formulacija (Tabela 4.2.9). Kod formulacije NS2 došlo je do povećanja veličine čestica i PDI, što je ukazalo na vezivanje albumina (Slika 4.2.9, levo). Pošto se parametri nisu menjali tokom vremena, adsorpcija se može smatrati trenutnim procesom. U slučaju formulacije NS4 pak, z-ave je bio smanjen, a PDI značajno povećan, ukazujući na veoma široku distribuciju veličina. Na dijagramu veličine mogao se primetiti pik koji potiče od nevezanog albumina (na oko 7 nm) i od nanokristala (na oko 180 nm, slika 4.2.9, desno), što objašnjava dobijene vrednosti z-ave i PDI. Dakle, prilikom inkubiranja NS4 formulacije nije došlo do adsorpcije albumina. S obzirom da je razlika u ispitivanim formulacijama bila samo u korišćenim stabilizatorima, može se zaključiti da su oni ključni za interakciju sa proteinima. Dobro je poznato da polisorbitat 80 olakšava vezivanje apolipoproteina A-I i/ili E, i na taj način doprinosi endocitozi posredovanoj receptorima kroz krvno-moždanu barijeru (Agrahari i sar., 2019). Daljim ispitivanjem bi se procenio značaj ovih razlika u formulacijama nakon primene *in vivo*.

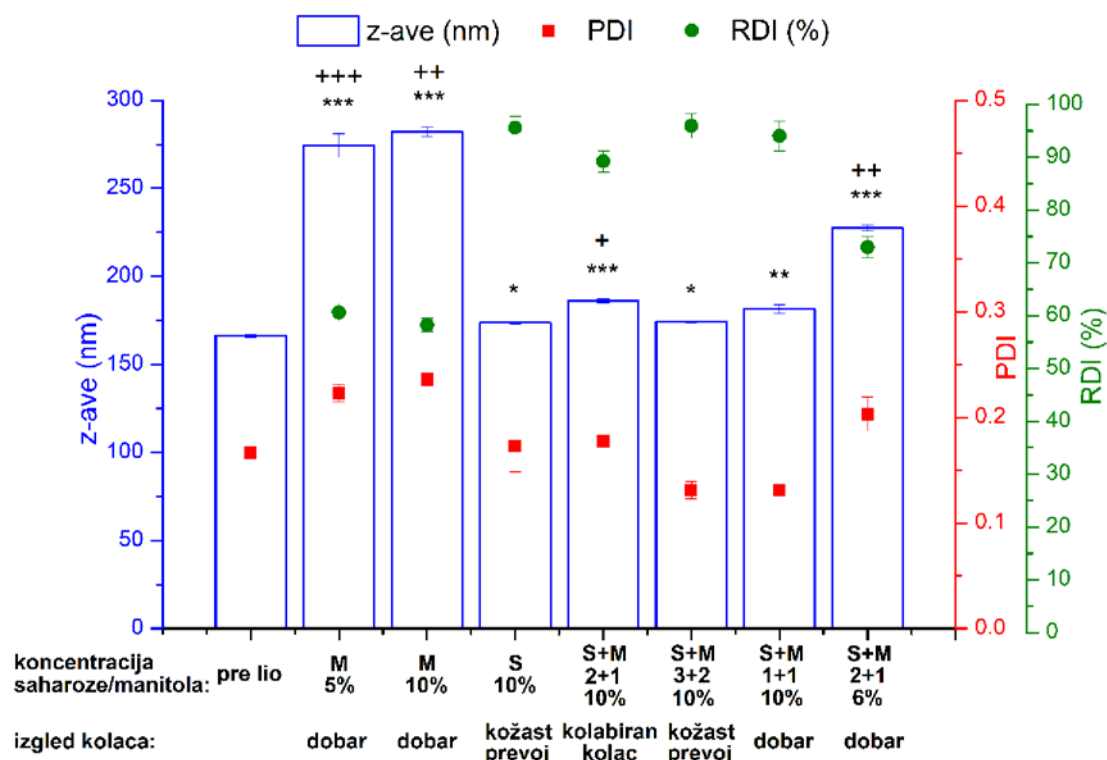


Slika 4.2.9. Dijagrami veličine čestica dobijeni metodom dinamičkog rasipanja svetlosti nanokristalnih disperzija NS2 (levo) i NS4 (desno) u medijumu sa 1,0% BSA u PBS-u.

4.2.8. Liofilizacija nanokristalnih disperzija DK-I-56-1

Odabir koncentracije lioprotektanta i sredstva za dopunjavanje

Različiti faktori mogu uticati na redisperzibilnost nanokristala sušenih smrzavanjem. Kako bi se sprečila agregacija nanočestica tokom liofilizacije, dodaju se krioprotektanti i lioprotektanti u različitim koncentracijama. U tu svrhu uobičajeno se dodaju disaharidi kao što je saharoza ili trehaloza, i ovi ekscipijensi najčešće istovremeno imaju ulogu i krioprotektanta i lioprotektanta. Stoga, radi lakšeg praćenja rezultata saharoza i trehaloza će biti označene kao lioprotektanti. Pokazano je da vrsta i koncentracija ovih ekscipijenasa imaju snažan uticaj na redisperzibilnost (Jakubowska i sar., 2022), te je odabir lioprotektanta bio prvi korak u preliminarnoj studiji. Formulacija koja je korišćena (NS4) je namenjena za parenteralnu primenu tako da ove pomoćne supstance mogu istovremeno imati ulogu sredstva za izotonizaciju, s obzirom da nanokristali kao nerastvorene čestice ne doprinose značajno toničnosti formulacije. Stoga je inicijalna koncentracija bila podešena na onu koncentraciju koja daje izotoničan rastvor. Rezultati analize veličine čestica nakon redispergovanja su prikazani na slici 4.2.10. Mantiol nije sprečio agregaciju (RDI oko 60%) ni u jednoj koncentraciji (5% i 10%), što je i bilo očekivano uprkos njegovom čestom korišćenju u liofilizaciji nanokristala. Manitol se može pre smatrati sredstvom za dopunjavanje nego lioprotektantom, pa efekti stabilizacije nisu izraženi (Trenkensuh i Friess, 2021).



Slika 4.2.10. Srednji hidrodinamički prečnik (z-ave), indeks polidisperznosti (PDI) i indeks redisperzibilnosti (RDI) pre i nakon liofilizacije sa različitim odnosima saharoze i manitola (z-ave: *, ** i *** za $P < 0,05$, $0,01$ i $0,001$, respektivno, PDI: +, ++ i +++ za $P < 0,05$, $0,01$ i $0,001$, respektivno).

Naprotiv, kada je saharoza korišćena samostalno (S 10%) nije došlo do agregacije, PDI nije bio značajno promenjen, a RDI je bio oko 95%. Šećeri, kao što je saharoza su lioprotektanti izbora za mnoge nanočestične formulacije. Fleksibilna struktura disaharida doprinosi stabilizacionom mehanizmu vitrifikacije ili izolacije čestica kao i zamene vode (Yue i sar., 2013; Yue i sar., 2014). Koncentracija 10% saharoze je takođe bila pogodna za stabilizaciju različitih nanočestičnih formulacija (Trenkenschuh i sar., 2021). Primećen kožast prevoj na površini kolača ne podrazumeva nužno neadekvatan kvalitet ukoliko su drugi parametri nepromenjeni (u ovom slučaju ukoliko nije došlo do agregacije). Moguće je da je obrazovana struktura formirana tokom separacije faza u toku smrzavanja, ne utičući na dinamiku sušenja (Patel i sar., 2017).

Kao što je prethodno rečeno, manitol se retko koristi kao krioprotektant zbog visoke tendencije ka kristalizaciji. Češće se koristi kao sredstvo za dopunjavanje, omogućujući mehaničku potporu kolaču (Trenkenschuh i Friess, 2021). Stoga, ispitan je dodatak manitola u različitim koncentracijama i efekat na stabilnost. Kada su korišćene različite kombinacije saharoze i manitola u ukupnoj koncentraciji 10% (S+M 2+1 10%, S+M 3+2 10% i S+M 1+1 10%) nije došlo do agregacije. Veličina čestica je ostala gotovo ista i PDI je bio niži od 0,200, što je znak ujednačene veličine čestica. Međutim kada je odnos saharoze i manitola bio 2:1 (S+M 2+1 10%), kolač je kolabirao što je bio razlog da se ova formulacija ne uključi u naredne eksperimente. U ovom slučaju, moguće je, da sa nižom koncentracijom manitola u smeši sa saharozom manitol nije potpuno kristalisao tokom smrzavanja, što je dovelo do kolapsa. Kako bi se ovo sprečilo preporučuje se uključivanje koraka temperiranja (engl. *annealing step*) tokom sušenja smrzavanjem (Johnson i sar, 2002).

Nakon rekonstitucije proverena je osmolalnost formulacija S 10%, S+M 1+1 10% i S+M 3+2 10%. Dobijene vrednosti bile su 345, 495 i 475 mOsm/kg, za navedene formulacije, respektivno. U cilju dobijanja izotoničnih formulacija ukupna koncentracija aditiva je smanjena na 6% (S+M 2+1 6%).

U ovoj formulaciji uprkos dobrom izgledu kolača veličina čestica i PDI su bili značajno povećani, a RDI je smanjen na vrednosti ispod 80%, što je ukazalo na nedovoljnu koncentraciju saharoze. Ovo je označeno kao neprihvatljivo, pa pomenuta formulacija nije dalje ispitivana. Iako je poželjno koristiti izotonične formulacije, primena parenteralnih hipertoničnih preparata je prihvatljiva, posebno kada se stabilnost formulacija oslanja na ekscipijense koji doprinose toničnosti (Wang, 2015). Na osnovu rezultata ovog dela istraživanja za studiju stabilnosti izabrane su tri formulacije: S 10%, S+M 1+1 10% i S+M 3+2 10%.

Određivanje temperature staklastog prelaza maksimalno krio-koncentrovanog rastvora (Tg')

Temperatura staklastog prelaza maksimalno krio-koncentrovanog rastvora (Tg') je određena diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom. Ovaj parametar je bio procenjen u vodenim rastvorima lioprotektanata i punioca u istoj koncentraciji kao u formulacijama nanokristala (označenim kao placebo) ili u uzorcima spremnim za liofilizaciju (označenim kao nanokristalne disperzije). Vrednosti Tg' u uzorcima sa saharozom prikazane u tabeli 4.2.10 su odgovarale literaturnim podacima (Meng-Lund i sar., 2019). Termalni događaj koji bi mogao biti okarakterisan kao eutektička temperatura nije bio detektovan ni u jednom uzorku. Vrednosti Tg' nisu se značajno razlikovale između placebo uzoraka i nanokristalnih disperzija. Iako u nekim slučajevima dodatak nanokristala može dovesti do manjih promena Tg' (Gol i sar., 2018), one uglavnom nisu značajne. Čestice nanokristala treba da budu prisutne u krio-koncentrovanom regionu tokom smrzavanja (Yue i sar., 2014), međutim one bi ostale dispergovane kao kristalne strukture, odvojene od zamrznutog rastvora krioprotektanata. U tom smislu, parametar Tg' bi zavisio samo od krioprotektanata (Holzer i sar., 2009).

Tabela 4.2.10. Temperatura staklastog prelaza maksimalno krio-koncentrovanog rastvora (Tg') uzoraka bez nanokristala (placebo) i sa nanokristalima (nanokristalna disperzija).

Formulacija	Tg' (°C)	
	placebo	nanokristalna disperzija
S 10%	-32,00	-32,00
S+M 1+1 10%	-39,00	-38,96
S+M 3+2 10%	-38,96	-38,58

Tokom smrzavanja, kako se temperatura snižava dolazi do separacije faza i formiranja dva regiona u uzorku – kristali leda i krio-koncentrovani (ili nano-koncentrovani) deo. U drugom delu, odnosno u krio-koncentrovanom rastvoru, rastojanje između čestica se smanjuje i povećava mogućnost za agregaciju. U prisustvu krioprotektanata, na temperaturi ispod Tg' ova faza se transformiše u staklasto stanje u kome su čestice imobilisane. Stoga, za efikasnu stabilizaciju, faza smrzavanja treba da bude sprovedeno ispod Tg' (Abdelwahed i sar., 2006b; Yue i sar., 2014) i ovaj uslov je ispunjen u oba procesa liofilizacije, dok se brzina smrzavanja može smatrati sličnom. Primarno sušenje takođe se oslanja na ovaj parametar. U ovoj fazi liofilizacije, temperatura formulacije treba da bude ispod kritične temperature formulacije (CFT). Na ovoj temperaturi, unutrašnja struktura uzorka se menja, dovodeći do značajnih promena u specifičnoj površini u strukturi kolača ili do gubitka strukture. Smatra se da je CFT uglavnom za oko 2-5 °C viša od odgovarajuće Tg'. Međutim, pokazano je da je dizajn formulacije takođe bitan faktor za stabilnost, posebno kada je obezbeđena sterna zaštita stabilizatorima nanokristala (Beirowski i sar., 2011b). Štaviše, dodatak sredstva za dopunjavanje omogućuje sprovođenje primarnog sušenja na temperaturi iznad Tg' ili CFT. U tom slučaju, amorfni materijal nije dovoljno rigidan da podrži sopstvenu masu, te mehanička potpora obezbeđena kristalnim konstituentom sprečava makroskopski kolaps (L Remmele i sar., 2012).

U ovom istraživanju nije primećen kolaps kolača u uzorku koji je sadržao samo saharozu, uprkos visokoj temperaturi primarnog sušenja (-10 °C). Za ekscipijense kao što je manitol koji su skloni kristalizaciji, primarno sušenje se može sprovesti na temperaturi odmah ispod eutektičke tačke (-1,5 °C), tako da kombinacija saharoze i manitola može imati prednosti oba sistema. Sa dovoljno manitola (minimum 30%) struktura kolača je obezbeđena kristalnom rešetkom čak i kada se primarno sušenje sprovodi na temperaturi -10 °C, dok bi amorfna saharoza obezbedila stabilizaciju nanokristala (Johnson i sar., 2002). Kolaps kolača u uzorku S+M 2+1 10% je u skladu sa ovim objašnjenjem. U ovom uzorku manitol verovatno nije bio u potpunosti kristalan zbog niske koncentracije (Kim i sar., 1998).

Procena stabilnosti u studiji zamrzavanja i odmrzavanja

Kao poslednji korak u preliminarnoj studiji, procenjena je stabilnost nanokristala pri smrzavanju, s obzirom da je ovaj korak okarakterisan kao kritična faza u liofilizaciji mnogih nanočestičnih sistema. Formulacije su nakon dodatka odabranih koncentracija saharoze i manitola zamrznute na -80 °C tri sata, a nakon toga spontano odmrznute na sobnoj temperaturi (25 °C). Veličina čestica je određena pre zamrzavanja i nakon odmrzavanja, a zatim je, radi lakšeg poređenja različitih formulacija, izračunat indeks redisperzibilnosti (RDI). Rezultati su prikazani u tabeli 4.2.11. Uslovi ovog ispitivanja odgovaraju uslovima u procesu liofilizacije-1. U liofilizaciji-2 smrzavanje se sprovodi na višoj temperaturi (-50 °C) tokom istog perioda vremena (3 h). Međutim, kao što je prethodno objašnjeno, obe temperature smrzavanja su ispod određene Tg', a brzina smrzavanja se može smatrati sličnom, pa se ne očekuju velike varijacije u rezultatima ovom promenom (Lee i sar., 2006). Vreme zamrzavanja odgovara preporučenim uslovima za ispitivanu visinu uzorka (oko 1 cm) (Abdelwahed i sar., 2006a).

Tabela 4.2.11. Srednji hidrodinamički prečnik (z-ave), indeks polidisperznosti (PDI) i indeks redisperzibilnosti (RDI) odabranih formulacija pre zamrzavanja na -80 °C tokom 3 h i nakon odmrzavanja (srednja vrednost ± SD, n=3).

Formulacija	Pre zamrzavanja		Posle odmrzavanja		RDI (%)
	z-ave (nm)	PDI	z-ave (nm)	PDI	
S 10%	170,7 ± 1,1	0,213 ± 0,018	176,3 ± 1,8	0,199 ± 0,018	96,83 ± 0,74
S+M 1+1 10%	241,6 ± 2,2	0,207 ± 0,019	254,3 ± 5,0	0,242 ± 0,033	95,03 ± 2,21
S+M 3+2 10%	241,6 ± 2,2	0,207 ± 0,019	250,8 ± 1,2	0,233 ± 0,013	96,35 ± 1,34

U proseku, porast veličine čestica za poređene formulacije bio je samo oko 10 nm, te su dobijene visoke vrednosti RDI (iznad 95%). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim pri odabiru koncentracije lioprotektanta i sredstva za dopunjavanje (slika 4.2.10), gde su dobijene slične vrednosti (94-96%) za posmatrane formulacije. Stoga, može se izvesti zaključak da su nanokristali stabilni pri smrzavanju i da njihova veličina posle smrzavanja ostaje gotovo nepromenjena u kasnijim fazama liofilizacije (primarno i sekundarno sušenje). Kada se uporede vrednosti PDI pre i posle smrzavanja može se primetiti blagi pad kod formulacije S 10% i porast kod druge dve formulacije (S+M 1+1 10% i S+M 3+2 10%). U prvoj formulaciji, može se pretpostaviti da je došlo do ujednačavanja veličine čestica, pa su čestice male veličine moguće formirale agregate veličina jednakih prosečnoj veličini čestica. U druga dva slučaja, međutim, ne treba isključiti formiranje većih agregata. Sa povećanjem koncentracije saharoze, formulacija ima veću stabilnost što potvrđuje njen krioprotektivni efekat.

Analiza veličine čestica i studija stabilnosti

U istraživanju su upoređena dva procesa liofilizacije u kojima je primarno sušenje sprovedeno iznad ili ispod T_g ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ u liofilizaciji-1 i $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ u liofilizaciji-2, respektivno), u pogledu zadržavanja veličine čestica tokom procesa sušenja i stabilnosti tokom čuvanja. Na osnovu rezultata dobijenih u skrining studiji tri formulacije su odabrane za studiju stabilnosti. Rezultati veličine čestica nakon sušenja smrzzavanjem na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (liofilizacija-1) su prikazani u tabeli 4.2.12. Nakon liofilizacije, veličina čestica ostala je manje-više nepromenjena, sa blagim porastom za oko 10 nm i nepromenjenim PDI, dok je RDI bio iznad 94% za sve tri formulacije. Ovi nalazi su potvrdili rezultate skrining studije. Liofilizati su čuvani u krimpovanim bočicama na $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom jednog meseca. Nakon rekonstitucije, veličina čestica se značajno povećala u svim formulacijama ($P < 0,001$), uprkos dobroj redisperzibilnosti odmah nakon liofilizacije. Veličina čestica se povećala dva puta, smanjujući RDI na oko 50% ili niže vrednosti, sa visokim vrednostima PDI koje su ukazale na široku distribuciju veličine.

Tabela 4.2.12. Srednji hidrodinamički prečnik (z-ave), indeks polidisperznosti (PDI), indeks redisperzibilnosti (RDI) i izgled kolača nanokristalne disperzije pre liofilizacije-2, posle rekonstitucije odmah nakon liofilizacije i nakon jednog meseca čuvanja liofilizata na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (srednja vrednost \pm SD, n=3).

Formulacija	z-ave (nm)	PDI	RDI (%)	Izgled kolača*
pre lio	$166,1 \pm 3,2$	$0,123 \pm 0,018$	-	-
S 10%				
posle lio	$173,7 \pm 0,7$	$0,173 \pm 0,025$	$95,61 \pm 2,15$	kožast prevoj
jedan mesec	$485,1 \pm 27,3$	$0,483 \pm 0,036$	$34,28 \pm 1,24$	kožast prevoj
S+M 1+1 10%				
posle lio	$176,7 \pm 2,0$	$0,135 \pm 0,015$	$94,04 \pm 2,81$	dobar
jedan mesec	$299,7 \pm 2,1$	$0,258 \pm 0,002$	$55,43 \pm 0,77$	dobar
S+M 3+2 10%				
posle lio	$173,1 \pm 0,9$	$0,143 \pm 0,016$	$95,95 \pm 2,31$	kožast prevoj
jedan mesec	$353,3 \pm 7,0$	$0,350 \pm 0,013$	$47,02 \pm 0,84$	kožast prevoj

*opis zasnovan na terminologiji objašnjenjenu u Patel i sar. (2017)

Aglomeracija je potvrđena laserskom difrakcijom, detekcijom čestica većih od $1\text{ }\mu\text{m}$ (tabela 4.2.13). Čini se da je nestabilnost primećena u ovom delu istraživanja bila pre kinetički nego termodinamički proces, i verovatno uzrokovana bliskom interakcijom nanočestica, što je dovelo do ireverzibilne agregacije. To može biti posledica vitifikacije sternih stabilizatora ili neodgovarajuće strukture kolača. Agregacija koja se desila tokom čuvanja može biti uzrokovana promenom staklastog stanja sternih stabilizatora (polisorbat 80 i/ili poloksamer 407) u stanje nalik gumi. U tom slučaju, nanočestice bi postale pokretne i mogu formirati čvrste agregate. Opisan proces je olakšan na višim temperaturama čuvanja i u prisustvu visokog sadržaja vlage (Yue i sar., 2016).

Tabela 4.2.13. Rezultati merenja veličine čestica metodom laserske difrakcije odabranih uzoraka liofilizata (liofilizacija-1) nakon jednog meseca čuvanja (srednja vrednost \pm SD, n=3).

Formulacija	D(v, 0,1) (μm)	D(v, 0,5) (μm)	D(v, 0,9) (μm)	D[4,3] (μm)
S+M 1+1 10%	$0,33 \pm 0,00$	$0,47 \pm 0,00$	$0,73 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,24$
S+M 3+2 10%	$0,31 \pm 0,01$	$0,49 \pm 0,02$	$1,03 \pm 0,17$	$0,84 \pm 0,07$

Interesantno je da saharoza nije bila efikasna kao stabilizator u liofilizaciji sa primarnim sušenjem na $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, kada se koristila kao jedini stabilizator (tabela 4.2.13). Aglomeracija nanokristala ogledala se u povećanju veličine čestica za više od 100 nm i visokoj PDI vrednosti (više od 0,300). Populacija čestica većih od $1\text{ }\mu\text{m}$ bila je detektovana laserskom difrakcijom nakon jednog meseca

čuvanja, što je potvrdilo rezultate DLS metode (tabela 4.2.15). Nakon dodatnog meseca čuvanja došlo je do kolapsa kolača što je ukazalo na nestabilnu strukturu liofilizata. Stoga, dodatak manitola se pokazao kao neophodan. U formulacijama sa saharozom i manitolom u odnosu 1:1 (S+M 1+1), veličina čestica je bila značajno povećana za oko 30 nm ($P < 0,01$), smanjujući RDI na oko 80%. Sa druge strane, u formulacijama sa saharozom i manitolom u odnosu 3:2 (S+M 3+2), veličina čestica je ostala gotovo nepromenjena ($P = 0,089$). PDI nije bio značajno promenjen ni u jednoj formulaciji ($P > 0,05$), ostao je ispod 0,200, što je ukazalo na odsustvo izražene aglomeracije uprkos povećanju veličine čestica u uzorku S+M 1+1. U ovim formulacijama veličina čestica je ostala u nanometarskom opsegu nakon sušenja smrzanjem što je potvrđeno laserskom difrakcijom nakon jednog meseca čuvanja (tabela 4.2.15). Tokom tromesečnog čuvanja veličina čestica i PDI se nisu dalje značajno menjali (tabela 4.2.14).

Tabela 4.2.14. Srednji hidrodinamički prečnik (z-ave), indeks polidisperznosti (PDI), indeks redisperzibilnosti (RDI) i izgled kolača nanokristalne disperzije pre liofilizacije-2 sa saharozom kao lioprotektantom, posle rekonstitucije odmah nakon liofilizacije i nakon jednog i tri meseca čuvanja liofilizata na 2-8 °C (srednja vrednost \pm SD, n=3).

Formulacija	z-ave (nm)	PDI	RDI (%)	Izgled kolača*
pre lio	181,5 \pm 3,2	0,174 \pm 0,005	-	-
S				
posle lio	355,8 \pm 9,7	0,389 \pm 0,063	51,02 \pm 1,56	dobar
jedan mesec	295,1 \pm 2,1	0,332 \pm 0,045	61,50 \pm 1,46	delimičan kolaps
tri meseca	-	-	-	kolaps
S+M 1+1				
posle lio	216,6 \pm 3,3	0,117 \pm 0,012	83,78 \pm 0,30	dobar
jedan mesec	213,8 \pm 2,7	0,167 \pm 0,023	84,97 \pm 2,36	dobar
tri meseca	227,3 \pm 7,0	0,098 \pm 0,044	79,89 \pm 3,06	dobar
S+M 3+2				
posle lio	188,0 \pm 2,0	0,132 \pm 0,035	96,54 \pm 1,15	dobar
jedan mesec	189,8 \pm 2,6	0,147 \pm 0,020	95,65 \pm 2,87	dobar
tri meseca	191,3 \pm 3,4	0,165 \pm 0,018	94,88 \pm 3,01	dobar

*opis zasnovan na terminologiji objašnjenj u Patel i sar. (2017)

Tabela 4.2.15. Rezultati merenja veličine čestica metodom laserske difrakcije uzoraka liofilizata (liofilizacija-2) nakon jednog meseca čuvanja (srednja vrednost \pm SD, n=3).

Formulacija	D(v, 0,1) (μ m)	D(v, 0,5) (μ m)	D(v, 0,9) (μ m)	D[4,3] (μ m)
S	0,168 \pm 0,000	0,379 \pm 0,005	12,465 \pm 0,092	3,596 \pm 0,035
S+M 1+1	0,168 \pm 0,000	0,251 \pm 0,000	0,383 \pm 0,000	0,265 \pm 0,001
S+M 3+2	0,148 \pm 0,000	0,206 \pm 0,000	0,308 \pm 0,000	0,219 \pm 0,000
T	0,207 \pm 0,001	0,357 \pm 0,001	0,595 \pm 0,003	0,382 \pm 0,001
T+M 1+1	0,197 \pm 0,001	0,318 \pm 0,001	0,503 \pm 0,001	0,336 \pm 0,001
T+M 3+2	0,164 \pm 0,000	0,244 \pm 0,000	0,385 \pm 0,000	0,261 \pm 0,000

U liofilizaciji-2 pored saharoze je kao lioprotektant korišćena trehaloza. Rezultati veličine čestica su prikazani u tabeli 4.2.16. Veličina čestica u formulacijama sa trehalozom je bila povećana u većem obimu tokom liofilizacije, pogotovu u formulacijama sa samom trehalozom i trehalozom i manitolom u odnosu 1:1 ($P < 0,001$), iako PDI nije bio značajno promenjen. Razlike između uzoraka sa saharozom i trehalozom mogu se objasniti različitim faznim separacijama tokom liofilizacije u prisustvu ovih ekscipijenasa. U studiji sa proteinima, saharoza je bila efikasnija od trehaloze tokom primarnog sušenja. Pokazano je da su regioni bogati trehalozom indukovali veće površine u kojima lizozim nije bio zaštićen od leda i sublimacije leda (Starciuc i sar., 2020). Isto rezonovanje bi se moglo primeniti u ovoj studiji. Nakon tri meseca čuvanja, veličina čestica se nije

značajno promenila ($P = 0,997$ i $0,951$ za T+M 1+1, nakon jednog i tri meseca, respektivno; $P = 0,260$ i $0,937$ za T+M 3+2, nakon jednog i tri meseca, respektivno), osim u slučaju sa samom trehalozom u kojoj je primećen dodatni porast veličine čestica za oko 20 nm nakon tri meseca čuvanja ($P < 0,05$). Rezultati laserske difrakcije nakon jednog meseca čuvanja su u skladu sa rezultatima dinamičkog rasipanja svetlosti (tabela 4.2.15). Stoga, uprkos inicijalnom povećanju veličine čestica, nanokristali su ostali u nanometarskim veličinama sa relativno uskom distribucijom veličine tokom čuvanja.

Tabela 4.2.16. Srednji hidrodinamički prečnik (z-ave), indeks polidisperznosti (PDI), indeks redisperzibilnosti (RDI) i izgled kolača nanokristalne disperzije pre liofilizacije-2 sa trehalozom kao lioprotektantom, posle rekonstitucije odmah nakon liofilizacije i nakon jednog i tri meseca čuvanja liofilizata na 2-8 °C (srednja vrednost \pm SD, n=3).

Formulacija	z-ave (nm)	PDI	RDI (%)	Izgled kolača*
pre lio	205,5 \pm 4,6	0,161 \pm 0,051	-	-
T				
posle lio	289,9 \pm 2,7	0,150 \pm 0,017	73,43 \pm 1,79	izlomljen kolač
jedan mesec	286,8 \pm 4,8	0,140 \pm 0,020	71,66 \pm 0,74	izlomljen kolač
tri meseca	299,6 \pm 5,7	0,186 \pm 0,032	68,60 \pm 2,22	dobar
T+M 1+1				
posle lio	279,9 \pm 1,6	0,155 \pm 0,045	73,41 \pm 1,42	dobar
jedan mesec	280,7 \pm 2,6	0,155 \pm 0,017	73,21 \pm 1,02	dobar
tri meseca	278,7 \pm 7,4	0,153 \pm 0,038	73,78 \pm 3,14	dobar
T+M 3+2				
posle lio	227,9 \pm 1,3	0,176 \pm 0,021	90,18 \pm 1,60	dobar
jedan mesec	236,1 \pm 5,8	0,180 \pm 0,006	87,11 \pm 3,87	dobar
tri meseca	238,4 \pm 6,6	0,186 \pm 0,023	86,26 \pm 3,82	dobar

*opis zasnovan na terminologiji objašnjenju u Patel i sar. (2017)

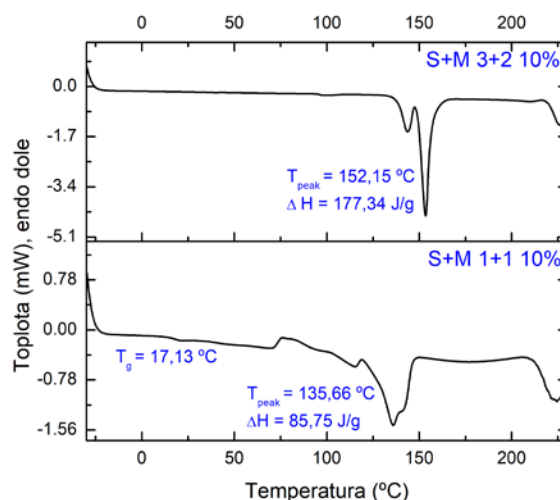
Kako bi se olakšalo poređenje veličine čestica u različitim formulacijama izračunat je indeks redisperzibilnosti (RDI). Ovaj parametar obezbeđuje lakše razumevanje promena u veličini čestica pošto pokazuje relativnu promenu veličine u posmatranom periodu. Nakon liofilizacije-1 dobijen je RDI oko 95% u svim formulacijama, ali se spustio na 30-50% nakon samo jednog meseca čuvanja što je okarakterisano kao gubitak nanokristalne strukture. Najviša vrednost RDI u liofilizaciji-2 je dobijena kada su saharoza i manitol korišćeni u odnosu 3:2, i ostala je oko 95% kroz ceo period čuvanja. U formulaciji sa trehalozom kao lioprotektantom, najviši RDI je takođe postignut za isti odnos sa manitolom (3:2), mada je bio ispod 90%. Ovi rezultati su ukazali da je pomenut odnos lioprotektanta i punioca bio najbolja opcija za održavanje veličine čestica nanokristala.

U uzorcima koji su liofilizovani procesom sa primarnim sušenjem na -45 °C (liofilizacija-2), dobijene vrednosti RDI su bile generalno niže, ali konstantne tokom dužeg perioda. To je sugerisalo da je do promena došlo tokom procesa liofilizacije, dok je rigidna struktura kolača sprečila problem nestabilnosti tokom čuvanja. Izuzetak je uzorak isključivo sa saharozom, koji je kolabirao sa gubitkom strukture, uprkos tome što je primarno sušenje sprovedeno ispod Tg'. Kolaps je negativno uticao na kvalitet liofilizata. Redisperzibilnost je najznačajniji parametar koji ukazuje na stabilnost tokom čuvanja i nanokristali se smatraju stabilnim ako njihova redisperzibilnost nije značajno promenjena tokom čuvanja (Beirowski i sar., 2011b). S obzirom da su formulacije namenjene za parenteralnu primenu, disperzije treba da se redispersuju brzo i zadrže nanometarsku veličinu čestica. Sve formulacije dobijene postupkom liofilizacije-2, sa izuzetkom uzorka S ispunjavaju ove uslove i produžuju rok trajanja za period duži više od tri puta, kada se uporede sa tečnim formulacijama.

Analiza čvrstog stanja

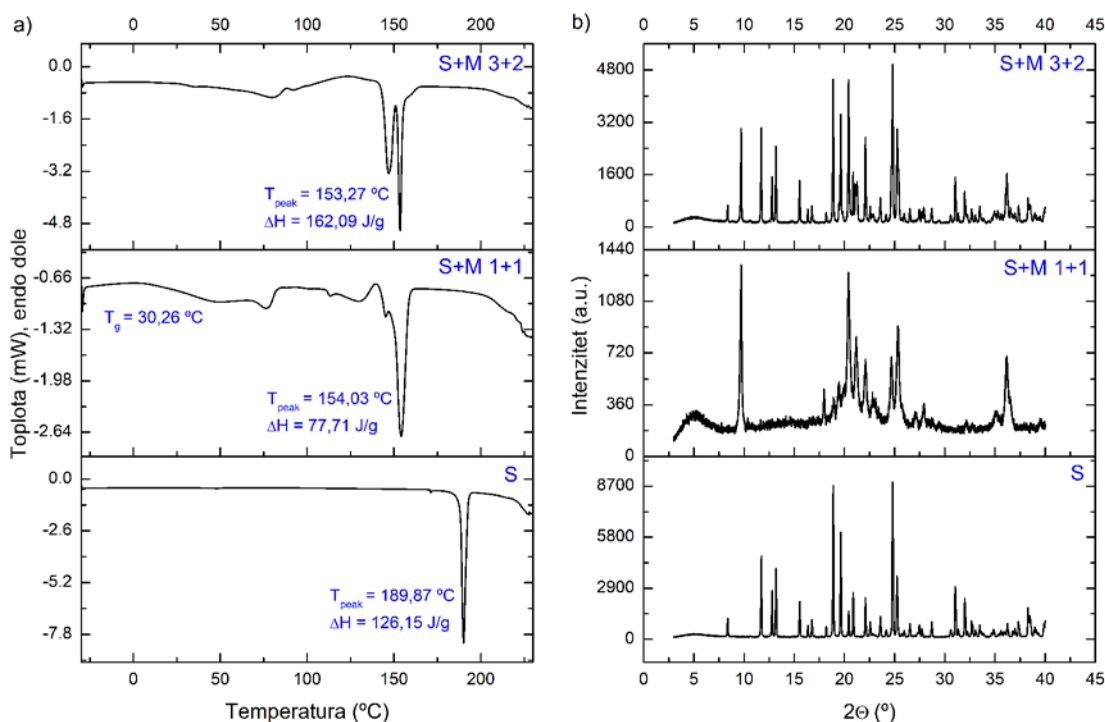
Analiza čvrstog stanja liofilizata uključila je diferencijalnu skenirajuću kalorimetriju (DSC) i difrakciju X-zraka na uzorku praška (XRPD). Procena fizičkog stanja ekscipijenasa je bio glavni fokus ovog dela istraživanja. DK-I-56-1 ima visoku tačku topljenja, što je više od temperature degradacije šećera. Zajedno sa niskom koncentracijom DK-I-56-1, ovo je bio razlog zašto fizičko stanje DK-I-56-1 nije bilo analizirano metodom DSC. Dodatno, DK-I-56-1 nije bilo moguće detektovati metodom XRPD usled niske koncentracije i niskog intenziteta difrakcionih linija kada se nalazi u nanokristalnom obliku. Kristalna struktura DK-I-56-1 u nanokristalnoj formulaciji je potvrđena u prethodnim eksperimentima i verovatno nije promenjena tokom liofilizacije.

Osnovni nedostatak liofilizacije na višim temperaturama je mogućnost formiranja nestabilnog manitol hemihidrata (Johnson i sar., 2002). Pojava ove forme manitola u uzorku S+M 1+1 10% bila je dokazana karakterističnim obrascem na termogramu koji pokazuje dehidraciju i posledičnu kristalizaciju na temperaturi oko 80 °C (slika 4.2.11), slično kao u istraživanju Anko i sar. (2019) i Liao i sar. (2007). Na osnovu rezultata termalne analize i uzimajući u obzir primećen staklasti prelaz i nisku entalpiju, ovaj uzorak je bio delimično kristalan. Međutim, temperatura staklastog prelaza je bila veoma niska, tako da je stabilnost kolača na 25°C verovatno bila ugrožena visokom temperaturom čuvanja. Nakon jednog meseca čuvanja, kolač je bio potpuno kristalan, što je potvrđeno podacima iz XRPD, u kojima je detektovana samo δ forma manitola. Niska količina vezane vode, koja je mogla biti oslobođena tokom transformacije manitol hemihidrata može imati efekat plastifikacije i negativno uticati na stabilnost preparata (Liao i sar., 2007). Formulacija koja je sadržala saharozu i manitol u odnosu 3:2 je bila potpuno kristalna odmah nakon liofilizacije sa dominantno prisutnom δ formom manitola u kolaču (slika 4.2.11) i ostala u ovom stanju tokom čuvanja.



Slika 4.2.11. DSC termogrammi liofilizata dobijenih postupkom liofilizacije-1.

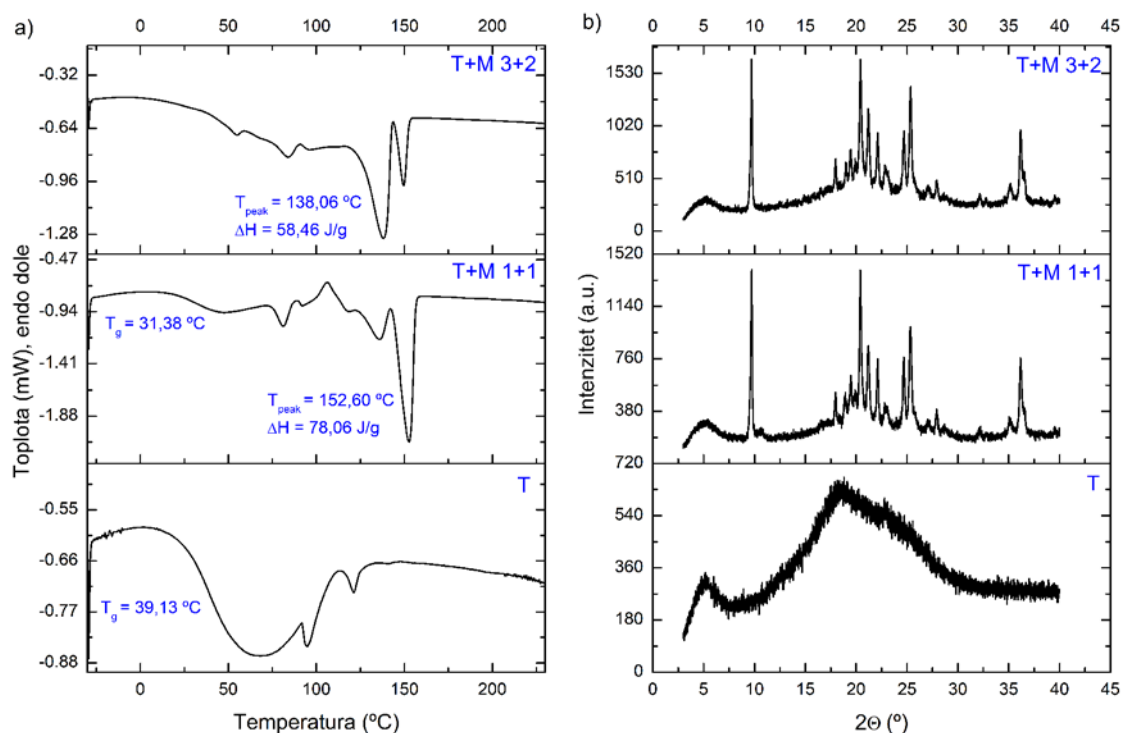
U formulacijama sa saharozom dobijenim liofilizacijom-2, kristaličnost saharoze je bila različita kada je korišćena samostalno ili u različitim kombinacijama sa manitolom (slika 4.2.12). Kako se može videti iz veoma oštrog pika topljenja i dobro definisanih difrakcionih signala, saharoza je bila u kristalnom stanju kada je korišćena samostalno. Ovo je bilo neočekivano s obzirom da je temperatura tokom smrzavanja i primarnog sušenja bila ispod T_g' ($-32 \text{ }^\circ\text{C}$). Ipak, moguće je da je uprkos kontrolisanoj temperaturi police na $-45 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura uzorka bila zapravo bliska T_g' . Drugo moguće objašnjenje može biti u samoj formulaciji. Kristalna struktura nanokristala bi mogla promovisati kristalizaciju saharoze. Uprkos kristalnoj strukturi uzorka, kolač se skupio i došlo je do njegovog kolapsa tokom čuvanja. Prema merenjima XRPD metodom, pozicija i širina signala se promenila u uzorku čuvanom tri meseca što je ukazalo na smanjenje jedinične ćelije kao i smanjenje dimenzije kristalita saharoze za oko 20%.



Slika 4.2.12. DSC termogrami (a) i XRPD difraktogrami liofilizata sa saharozom kao lioprotektantom dobijeni liofilizacijom-2

Kada je manitol dodat u jednakoj količini (S+M 1+1), saharoza je bila amorfna što je pokazano raširenim difrakcionim signalima i pojavom oreola karakterističnim za amorfne materijale (slika 4.2.12). Manitol je, sa druge strane, bio niskog stepena kristaliniteta sa oštrim signalima niskog intenziteta. U suprotnosti sa uzorkom sušenim smrzavanjem na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, manitol je bio prisutan u δ polimorfnom obliku, sa karakterističnim signalom na $9,7^{\circ} 2\theta$. Delimična kristalizacija manitola može negativno uticati na stabilnost kolača i uzrokovati njegov kolaps (Johnson i sar., 2002). Dodatno, manitol se može takođe ponašati kao plastifikator (Kim i sar., 1998), dok oslobađanje vezane vode tokom kristalizacije može negativno uticati na stabilnost (Jena i sar., 2016). Ipak, u uzorcima nisu primećeni makroskopski znaci kolapsa niti je došlo do promene fizičkog stanja tokom tromesečnog čuvanja. Ovakvi rezultati mogu biti posledica dobro izabrane temperature čuvanja koja je bila više od $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ispod temperature staklastog prelaza, kao što je preporučeno u Abdelwahed i sar. (2006a). U trećem uzorku, sa odnosom saharoze i manitola 3:2 (S+M 3+2) oba ekscipijensa bila su u kristalnom stanju odmah nakon liofilizacije (slika 4.2.12). Ipak, nakon tri meseca čuvanja, podaci dobijeni metodom XRPD su ukazali na nižu kristaličnost uzorka sa tragovima amorfne saharoze. Ovo može biti razlog odlične stabilnosti u pogledu zadržavanja veličine čestica nanokristala.

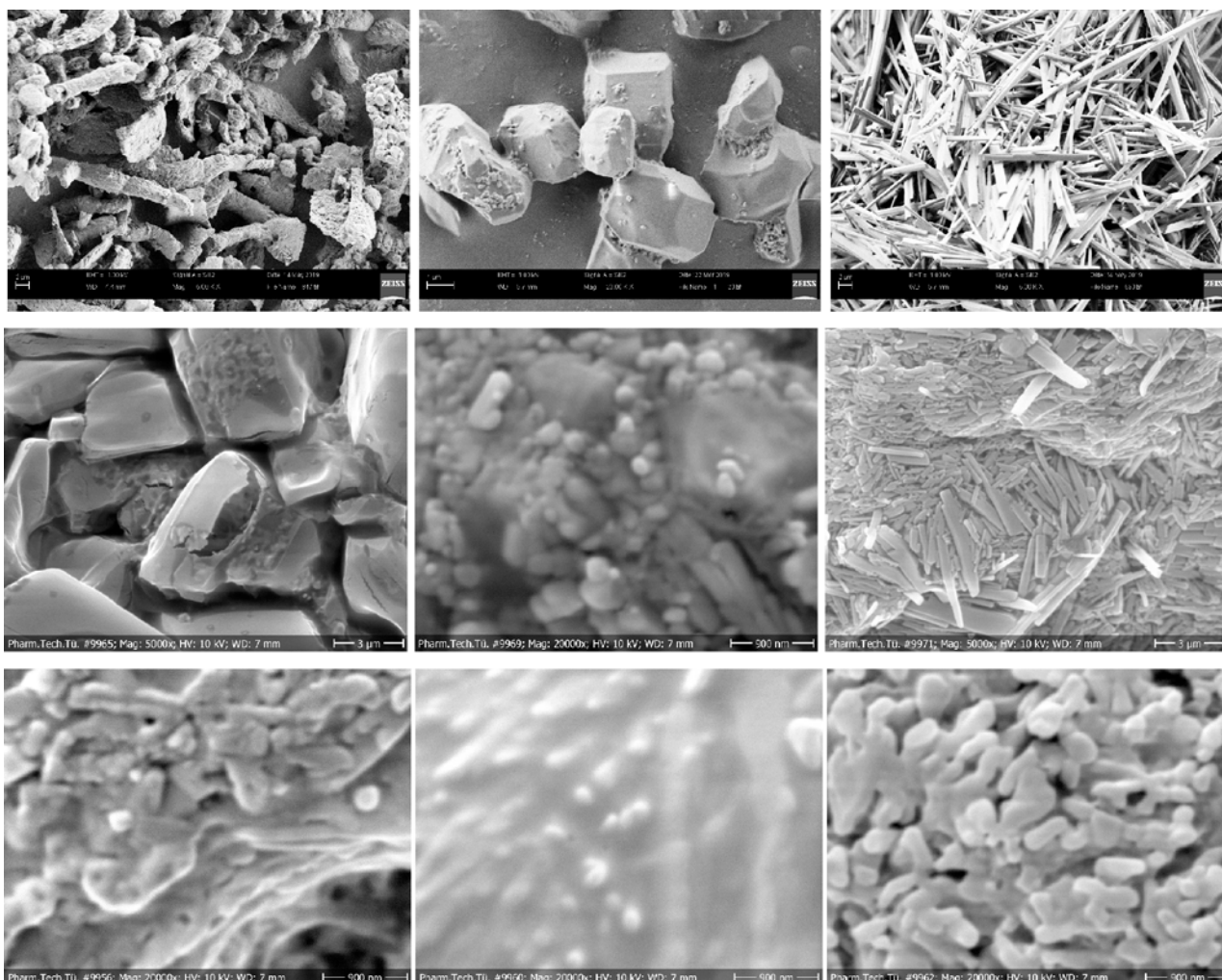
Kada je trehaloza korišćena kao lioprotektant, bila je amorfna u svim uzorcima verovatno zbog više vrednosti T_g' ($-29,8\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Meng-Lund i sar., 2019) (slika 4.2.13). Manitol u kombinaciji sa trehalozom je bio niskog stepena kristaliniteta u oba uzorka. Trehaloza može imati uticaja na kristalizaciju manitola i obrnuto, i priroda ove interakcije uglavnom zavisi od njihovog odnosa. U studiji Jena i sar. (2016) na zamrznutim sistemima, manitol je kristalisao u uzorcima sa visokim odnosom manitol: trehaloza, dok je trehaloza ostala u amorfnom stanju. Ovo je smatrano idealnim uslovom gde je lioprotektant amorfan i samim tim dostupan za interakcije sa nanočesticama, dok kristalni punilac obezbeđuje elegantan izgled i čvrstu strukturu kolača.



Slika 4.2.13. DSC termogrami (a) i XRPD difraktogrami liofilizata sa trehalozom kao lioprotektantom dobijeni liofilizacijom-2

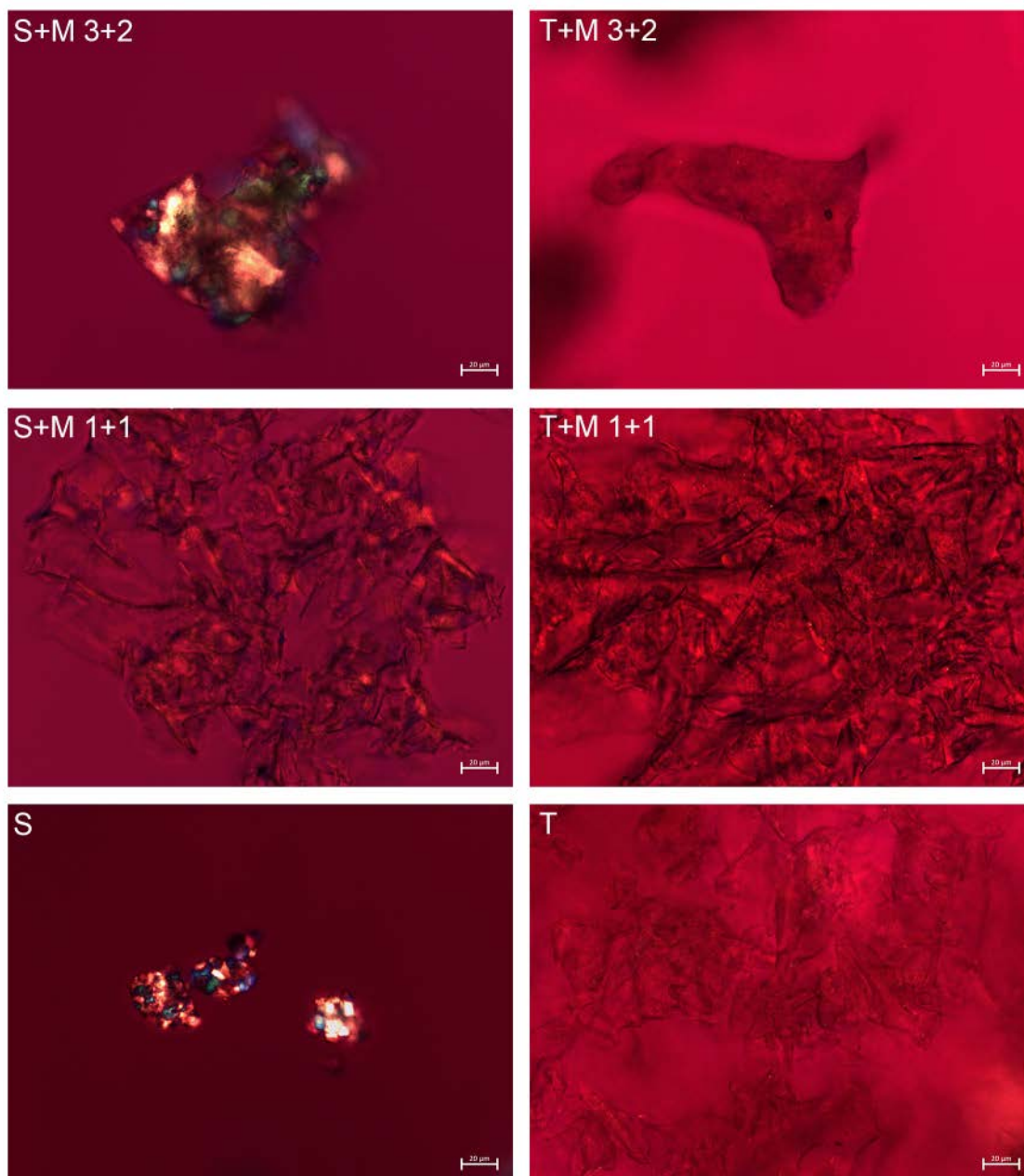
Morfologija liofilizata

Za ispitivanje morfologije korišćene su skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i polarizaciona mikroskopija (PLM). Slike dobijene metodom SEM su prikazane na slici 4.2.14. U uzorku osušene disperzije bez dodatih stabilizatora kao što su saharoza i manitol mogu se primetiti izdužene strukture i agregati pojedinačnih nanočestica (slika 4.2.14. gore levo). Ovako zbijeni grozdovi nanočestica ne mogu obezbediti dobro redispergovanje. Formulacije sušene procesom liofilizacije-1 (slika 4.2.14. gore, sredina i desno) su bile kompletno kristalne što je otežalo vizuelizaciju nanokristalnih čestica. Saharozu je bila prisutna u vidu velikih kristala dok je manitol bio u formi igličastih struktura tipičnih za δ polimorfni oblik. Agregati nanokristala se mogu uočiti na površini kristala saharoze u uzorcima koji sadrže samo saharozu kao lioprotektant (S 10%, slika 4.2.14. gore sredina), a u uzorku S+M 3+2 10% se može videti samo nekoliko agregata između kristala manitola (slika 4.2.14. gore desno). Očigledno je da su nanokristalne čestice bile u bliskom međusobnom kontaktu što je mogao biti razlog pojave ireverzibilne agregacije tokom čuvanja.



Slika 4.2.14. Slike dobijene skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) liofilizata: gore liofilizati dobijeni liofilizacijom-1 – bez stabilizatora, 5000 \times , skala 2 μm (levo); sa saharozom 10% (S 10%), 20000 \times , skala 1 μm (sredina) i sa saharozom i manitolom (S+M 3+2 10%), 5000 \times , skala 2 μm (desno); sredina liofilizati dobijeni liofilizacijom-2 – sa saharozom (S) 5000 \times , skala 3 μm (levo); sa saharozom i manitolom (S+M 1+1), 20000 \times , skala 900 nm (sredina) i (S+M 3+2), 5000 \times , skala 3 μm (desno); dole liofilizati dobijeni liofilizacijom-2 – sa trehalozom (T) (levo); sa trehalozom i manitolom T+M 1+1 (sredina) i T+M 3+2 (desno), uvećanje 20000 \times , skala 900 nm.

Slično, agregati nanočestica su bili vidljivi na kristalima saharoze u uzorcima koji su stabilizovani samo saharozom i dobijeni liofilizacijom-2 (slika 4.2.14, sredina levo). Kada su saharoza i manitol korišćeni u jednakim količinama (S+M 1+1), na mikrografijama su se mogle videti pojedinačne čestice kao i agregati (slika 4.2.14, srednji red, sredina). Ovaj uzorak je bio homogeniji od prethodnih verovatno zbog prisustva amorfne saharoze i veoma niskog kristaliniteta manitola. Uzorak S+M 3+2 je bio više kristalan, što je rezultovalo preovladavanjem kristala manitola na mikrografijama (slika 4.2.14, srednji red, desno). Ove opservacije su bile posebno izražene na slikama dobijenim polarizacionom mikroskopijom (slika 4.2.15, levo). Na ovim mikrografijama je ponovo pokazana visoka kristaličnost uzorka S i S+M 3+2, dok je S+M 1+1 bio gotovo potpuno amorfan. Određeni kristalni delovi uzorka mogu se pripisati manitolu i nanokristalima.



Slika 4.2.15. Mikrografije dobijene polarizacionom mikroskopijom (PLM) liofilizata dobijenih liofilizacijom-2; uvećanje 400 \times , skala 20 μm .

Uzorci sa trehalozom kao lioprotektantom su se razlikovali od liofilizata koji su sadržali saharozu. Usled amornog stanja trehaloze i niske kristaličnosti manitola, svi uzorci su imali homogen matriks vidljiv na slikama dobijenim SEM i PLM metodama (slika 4.2.14, dole; slika 4.2.15, desno). Ovo je posebno vidljivo na mikrografiji uzorka T+M 1+1, gde su pojedinačne nanočestice okružene matriksom (slika 4.2.14, dole, sredina). Amorfan matriks je potvrđen slikama polarizacione mikroskopije na kojima su nanočestice takođe vidljive kao kristalni grozdovi raspoređeni po uzorku (slika 4.2.15, desno). Svi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim metodama DSC i XRPD.

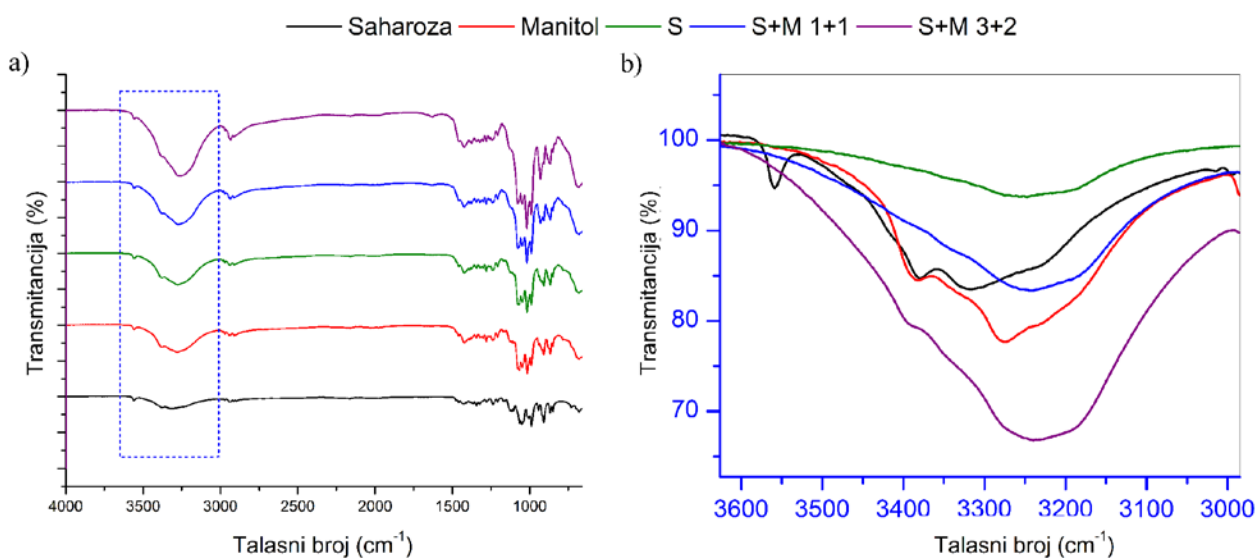
Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Prema hipotezi zamene vode, u cilju dobijanja neagregiranih nanokristala neophodno je formiranje vodoničnih veza između lioprotektanata i stabilizatora nanokristala (Trenkenschuh i Friess, 2021). Jedna od tehnika kojom se mogu analizirati ove interakcije je infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) (Kumar i sar., 2014). Informacije o formiranju vodoničnih

veza mogu biti izvedene iz položaja i širine traka istezanja O-H grupe u FT-IR spektru (Sritham i Gunasekaran, 2017). U ovoj studiji, analiza je uključila tumačenje transmisionih spektara neobrađenih ekscipijenasa (saharoza, trehaloza i manitol) i šest liofilizata dobijenih postupkom liofilizacije-2 (S, S+M 1+1, S+M 3+2, T, T+M 1+1, i T+M 3+2). FT-IR spektri su prikazani na slikama 4.2.16 i 4.2.17. Iako je snimanje pokazalo brojne dobro definisane transmisione trake u uzorku neusitnjenog DK-I-56-1, ovi signali nisu mogli biti izdvojeni u spektrima uzoraka liofilizata zbog niske koncentracije ove supstance u formulaciji. Iz istog razloga stabilizatori nanokristala (polisorb 80 i poloksamer 407) nisu bili vidljivi.

FT-IR spektri saharoze, trehaloze i manitola *in bulk* su bili u skladu sa spektrima pronađenim u odgovarajućoj literaturi (Brizuela i sar., 2012; Wolkers i sar., 2004; Bruni i sar., 2009). Transmisioni spektar saharoze karakterišu veoma oštre i dobro definisane trake. Traka istezanja O-H grupe se nalazi na oko 3316 cm^{-1} , što je tipično za ugljene hidrate dok je izdvojen pik na oko 3500 cm^{-1} verovatno povezan sa slabim vodoničnim vezama između molekula šećera. Pet traka u regionu koji se odnosi na istezanje C-H veza bili su lokalizovani na oko 2941 cm^{-1} . U takozvanom *fingerprint* regionu između 1500 i 800 cm^{-1} nalaze se različite i delimično preklopljene trake koje potiču od istezanja C-O i C-C veza kao i vibracija savijanja C-OH veza (Sritham i Gunasekaran, 2017).

U liofilizatu S, koji se sastoji samo od saharoze kao lioprotektanta, pozicija trake istezanja O-H veze je bila pomerena ka nižim talasnim brojevima. U druga dva uzorka, S+M 1+1 i S+M 3+2, pomeranje je bilo izraženije i trake su bile većeg intenziteta (slika 4.2.16b). Promenjen položaj ove trake je povezan sa promenjenim okruženjem pomenute funkcionalne grupe. Smanjenje prosečne dužine vodonične veze u matriksu šećera dovodi do smanjenja talasnog broja trake istezanja O-H grupe (Wolkers i sar., 2004). Hidroksilna grupa koja učestvuje u formiranju vodonične veze bi imala nižu konstantu vezivanja usled delokalizacije elektrona u strukturama koje su vezane vodoničnim vezama (Ottenhof i sar., 2002). Stoga, stepen pomeranja trake može biti povezan sa jačinom vodonične veze. Pokazano je da je interakcija izraženija kada je dodat manitol, a kada se uporede dva uzorka sa kombinacijom saharoze i manitola, viši odnos saharoza-manitol je favorizovao formiranje vodoničnih veza. Ovo ukazuje da bi interakcije mogle biti promovisane u prisustvu manitola, dok je za interakcije odgovorna pre svega saharoza. Iako prisustvo vlage takođe može dovesti do pomeranja talasnog broja trake istezanja O-H veze (Sritham and Gunasekaran, 2017), sadržaj vlage je bio sličan u svim uzorcima (oko 3%), pa njen uticaj može biti isključen kada se porede različiti liofilizati.

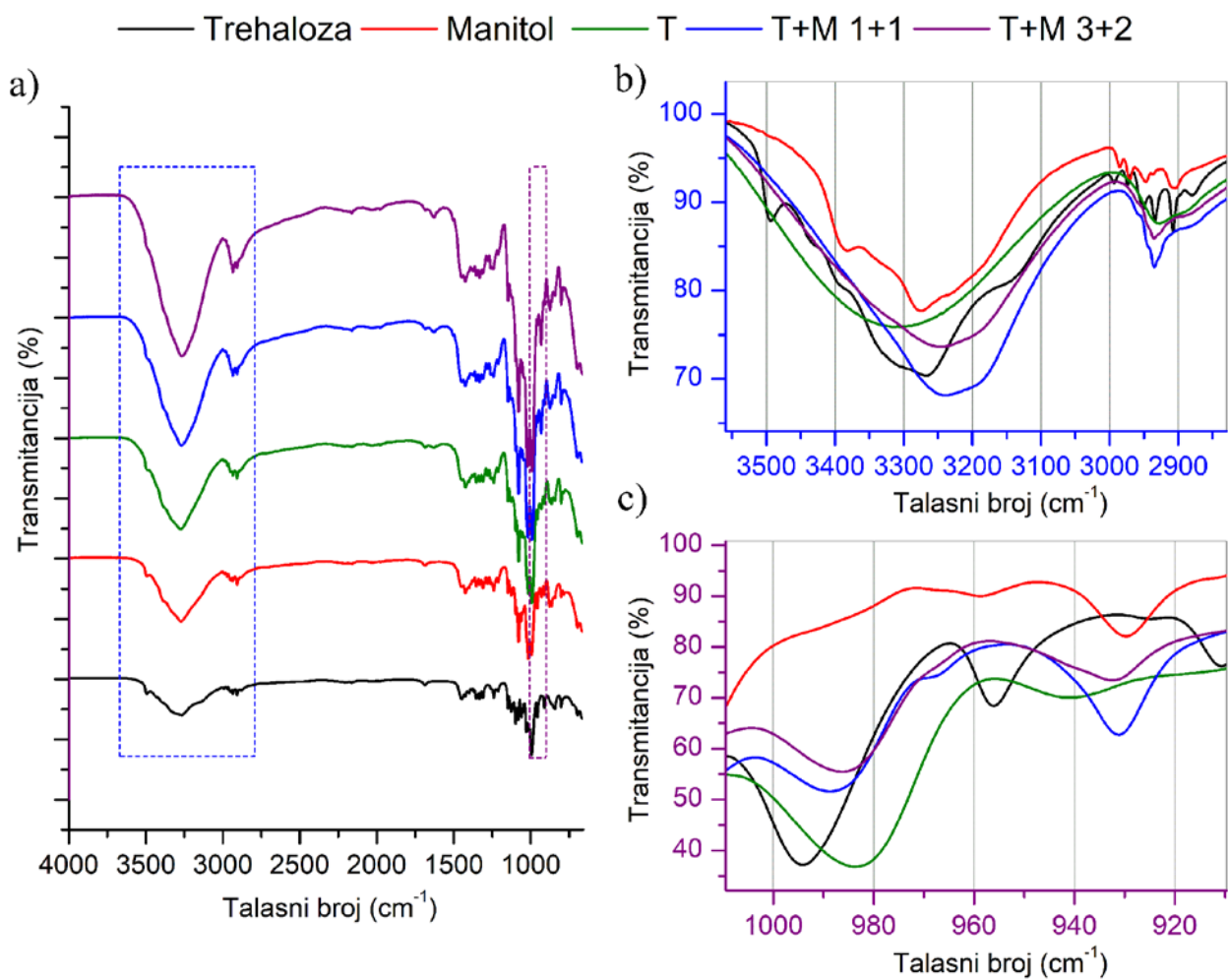


Slika 4.2.16. FT-IR spektri liofilizata sa saharozom kao lioprotektantom: od 4000 cm^{-1} do 660 cm^{-1} (a) i region od interesa od 3600 cm^{-1} do 3000 cm^{-1} (b).

FT-IR spektar trehaloze dihidrata *in bulk* je bio karakterističan za kristalne supstance, sa istim spektralnim regionima kao spektar saharoze. Oštri pikovi visokog intenziteta dolaze od visokog stepena homogenosti intermolekularnih interakcija, što rezultuje prisustvom manje difuznih vibracionih nivoa. Ipak, mnogo šire transmisionne trake se uočavaju u uzorcima koji sadrže amorfnu trehalozu (liofilizati T, T+M 1+1 i T+M 3+2). Širina trake je uglavnom povezana sa distribucijom dužina i orijentacija formiranih veza (Sritham i Gunasekaran, 2017). Traka na 3500 cm^{-1} u spektru netretirane trehaloze koja odgovara vibracijama istezanja dva kristalno vezana molekula vode u dihidratu je nestala u spektru liofilizata, slično kao u Jakubowska i sar. (2022) (slika 4.2.17b). Dodatno, pik koji je povezan sa kristalnom vodom trehaloze dihidrata na 1680 cm^{-1} pomeren je na 1640 cm^{-1} u uzorcima sušenim smrzavanjem (4.2.17a). Ova zapažanja su jasno ukazala na prisustvo amornog materijala sa vodom adsorbovanom na površini (Akao i sar., 2001). Uz to, šest traka oko 2900 cm^{-1} (C-H istezanje) u kristalnoj trehalози (netretiran materijal) su zamenjeni širokim signalom u liofilizatu T, slično kao u studiji Wolkers i sar. (2004).

Pozicija trake istezanja O-H veze je pomerenjena sa 3268 cm^{-1} na 3316 cm^{-1} u uzorku sa samostalnom trehalozom (uzorak T), što je suprotno od pomeranja trake u uzorcima sa saharozom gde je primećeno pomeranje ka nižim talasnim brojevima. Ovaj nalaz je ukazao na povećanje dužine vodoničnih veza i široke distribucije njihovih orijentacija (Sritham i Gunasekaran, 2017, Wolkers i sar., 2004). Suprotno, pomeranje ka nižim talasnim brojevima je primećeno u uzorcima T+M 1+1 i T+M 3+2 (slika 4.2.17b). S obzirom da pomeranje nije bilo izraženo kao u uzorcima saharoze, ovaj podatak ukazuje na niži stepen interakcija sa nanokristalima.

Dva pika vidljiva na spektrima *in bulk* trehaloze, na 994 i 956 cm^{-1} mogu odgovarati vibracionim modulima (antisimetrična i simetrična istezanja) glikozidne veze. U različitim formama trehaloze ove trake mogu biti pomerene zbog drugačijih konformacija oko glikozidne veze. Molekuli šećera mogu biti u različitim konformacionim položajima u kojima hidroksilne grupe trehaloze mogu formirati vodonične veze sa vodom (Akao i sar., 2001). U uzorku T, trake na 984 i 941 cm^{-1} mogu ukazati na otvorenu strukturu molekula trehaloze, koja ipak ne može da formira značajan broj vodoničnih veza. Za druga dva uzorka (T+M 1+1 i T+M 3+2), položaj traka na 989 i 931 cm^{-1} , i 986 i 932 cm^{-1} , za prvi i drugi uzorak, respektivno ukazuju na zatvoreniju konformaciju (slika 4.2.17c). Rezultujući niži afinitet trehaloze ka vodi može biti povoljan sa aspekta čuvanja. Pokazano je da veći afinitet ka vodi može smanjiti mobilnost matriksa i tako doprineti stabilnosti tokom čuvanja. Međutim, u uslovima sa visokim sadržajem zaostale vlage može doći do kristalizacije trehaloze (Starciuc i sar., 2020). Ovo može objasniti odličnu stabilnost liofilizata sa skoro nepromenjenim vrednostima RDI uprkos visokom nivou rezidualne vlage (oko 3,4%), koja nije mogla biti smanjena ni pri produženom sekundarnom sušenju.



Slika 4.2.17. FT-IR spektri liofilizata sa trehalozom kao lioprotektantom: od 4000 cm⁻¹ do 660 cm⁻¹ (a); regioni od interesa od 3600 cm⁻¹ do 3000 cm⁻¹ (b); regioni i od 1000 cm⁻¹ do 920 cm⁻¹ (c).

4.3. Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada

4.3.1. Fizičko-hemijska karakterizacija lipidnih nanočestica

Lipidne nanočestice izrađene su metodom tople homogenizacije pod visokim pritiskom. Udeo lipidne faze bio je 10% ili 15%, a nanočestice su bile stabilizovane polisorbatom 80. Odnos masne faze i polisorbata 80 je zadržan na 5:1. Pri izradi je primenjen diskontinuirani proces koji podrazumeva sprovođenje disperzije kroz uređaj u ciklusima i omogućuje izučavanje uticaja broja ciklusa homogenizacije na veličinu čestica. Kao što je i očekivano, produžena homogenizacija je dovela do smanjenja veličine čestica (z-ave) i indeksa polidisperznosti (PDI) (Tabela 4.3.1). Promena veličine čestica bila je izraženija na početku procesa homogenizacije, te su submikronske veličine čestica dobijene već nakon pet ciklusa homogenizacije. Daljim propuštanjem disperzije, energija se koristi za razbijanje većih čestica i na taj način smanjivanje distribucije njihove veličine (Kovačević i sar., 2020). Rezultat ovog procesa bio je smanjenje PDI ispod 0,3 nakon 20 ciklusa homogenizacije (Tabela 4.3.2.). Dobijene disperzije su bile sa z-ave ispod 100 nm, zbog čega su bile gotovo transparentne, posebno one koje su imale 10% masne faze.

Tabela 4.3.1. Veličina čestica (z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI) formulacija izrađenih različitim brojem ciklusa homogenizacije (srednja vrednost \pm SD, n=3).

Broj ciklusa homogenizacije	LNP10-PL		LNP15-PL	
	z-ave (nm)	PDI	z-ave (nm)	PDI
5	201,9 \pm 1,3	0,387 \pm 0,055	246,2 \pm 3,4	0,384 \pm 0,033
10	102,3 \pm 1,6	0,407 \pm 0,013	148,5 \pm 1,6	0,346 \pm 0,050
15	81,35 \pm 2,40	0,323 \pm 0,054	104,2 \pm 2,7	0,299 \pm 0,001

Dodatak DK-I-60-3 je doveo do malih promena veličine čestica i njihove distribucije (Tabela 4.3.2). U formulaciji sa 10% lipidne faze (LNP10-DK), PDI je bio smanjen nakon uključivanja DK-I-60-3, dok je veličina čestica ostala nepromenjena. Kada se uporede dve formulacije sa DK-I-60-3, formulacija koja je imala 15% masne faze (LNP15-DK) imala je za oko 15 nm veću veličinu čestica u poređenju sa LNP10-DK, dok PDI nije bio različit. Zbog veće količine lipidne faze u LNP15-DK, manje energije za dispergovanje je dostupno po jedinici lipida, što je rezultovalo dobijanjem čestica veće veličine (Müller i sar., 2002b), mada je veličina čestica bila slična u odgovarajućim placebo formulacijama. Ipak, distribucija veličine čestica u obe formulacije sa inkorporiranim DK-I-60-3 bila je prihvatljiva ukazujući na nisku tendenciju ka agregaciji. Dodatno, pH vrednost i električna provodljivost bili su slični u svim formulacijama i nisu značajno zavisili od inkorporacije DK-I-60-3 (tabela 4.3.2).

Tabela 4.3.2. Fizičko-hemijske karakteristike razvijenih formulacija nakon jednog dana i jednog meseca čuvanja na 2-8 °C (srednja vrednost \pm SD, n=3).

Formulacija	Vreme čuvanja (dani)	z-ave (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)	pH vrednost	Električna provodljivost (μ S/cm)	Efikasnost inkapsulacije (%)
LNP10-PL	1	74,09 \pm 0,80	0,300 \pm 0,006	-50,5 \pm 0,7	5,56 \pm 0,03	145,9 \pm 1,5	-
	30	69,70 \pm 0,27	0,289 \pm 0,006	-37,1 \pm 1,3	5,37 \pm 0,02	144,4 \pm 0,3	-
LNP15-PL	1	74,58 \pm 1,12	0,264 \pm 0,007	-39,2 \pm 1,8	5,20 \pm 0,01	200,8 \pm 1,9	-
	30	89,14 \pm 0,74	0,303 \pm 0,011	-39,0 \pm 0,8	5,10 \pm 0,01	206,9 \pm 6,3	-
LNP10-DK	1	70,37 \pm 0,15	0,233 \pm 0,008	-41,3 \pm 0,9	4,41 \pm 0,01	158,0 \pm 0,6	99,91 \pm 0,01
	30	76,56 \pm 0,48	0,227 \pm 0,011	-37,3 \pm 1,3	4,20 \pm 0,01	162,4 \pm 0,5	99,91 \pm 0,00
LNP15-DK	1	91,87 \pm 1,50	0,271 \pm 0,006	-34,0 \pm 2,0	5,42 \pm 0,03	184,8 \pm 3,5	99,97 \pm 0,00
	30	98,69 \pm 3,35	0,280 \pm 0,028	-35,4 \pm 0,6	5,12 \pm 0,01	179,3 \pm 2,4	99,59 \pm 0,34

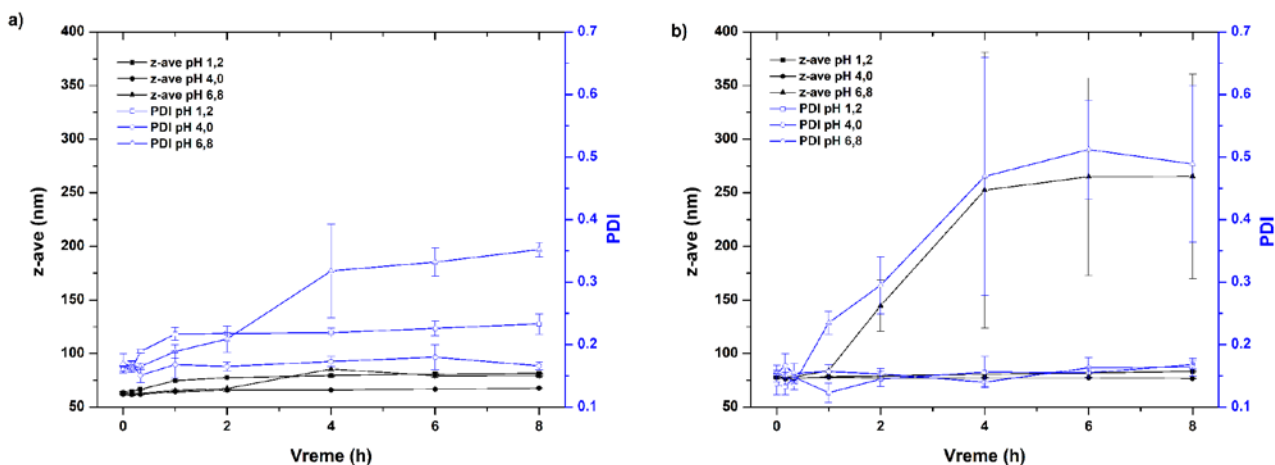
Zeta potencijal karakteriše potencijal na smicajnoj ravni koloidne čestice i može dati indicije o njihovoj stabilnosti. Generalno, vodiči klasifikuju nanočestice sa apsolutnom vrednošću zeta potencijala iznad 30 mV kao visoko stabilne, mada i drugi parametri kao što su sterno odbijanje nejonskih stabilizatora moraju biti uzeti u razmatranje (Bhattacharjee, 2016). Razvijene lipidne nanočestice imale su apsolutne vrednosti zeta potencijala veće od 30 mV (tabela 4.3.2), ukazujući na dobru stabilnost. Negativne vrednosti zeta potencijala potiču od negativno naelektrisanih fosfolipida i posebno od slobodnih masnih kiselina u sastavu lecitina (Klang i Valenta, 2011).

Stabilnost formulacija je bila procenjena nakon jednomesečnog čuvanja u krimpovanim staklenim bočicama u frižideru (2-8 °C). Uslovi čuvanja bili su odabrani na osnovu preliminarnih studija u kojima je uočena pojava taloga supstance DK-I-60-3 nakon jednog dana čuvanja na sobnoj temperaturi. Nakon jednog meseca čuvanja u frižideru nije došlo do masivne aglomeracije ni u jednoj od formulacija (tabela 4.3.2). Iako je razlika u veličini čestica bila statistički značajna ($P < 0,05$), promena nije bila praktično relevantna s obzirom da je bila u opsegu 5-8 nm. PDI je ostao nepromenjen u svim formulacijama osim u LNP15-PL ($P < 0,01$). Najniža vrednost PDI je bila u formulaciji LNP10-DK (ispod 0,250) što se smatra uskom distribucijom veličine. Zeta potencijal je ostao u opsegu između -35 do -40 mV, te se može pretpostaviti da nije došlo do promena u površinskim karakteristikama, iako blagi pad pH vrednosti može biti povezan sa parcijalnom hidrolizom lecitina (Savić i sar., 2019).

Efikasnost inkapsulacije bila je izračunata iz koncentracije DK-I-60-3 u vodenoj fazi nakon njene separacije centrifugiranjem. Visoka vrednost efikasnosti inkapsulacije u obe formulacije (tabela 4.3.2) ukazuje da je DK-I-60-3 lociran većinom u lipidnoj fazi disperzije. Nakon jednog meseca, međutim, tragovi supstance su bili vidljivi na dnu boce, iako primećena ekspulzija nije bila praćena promenama u fizičko-hemijskim parametrima. Objašnjenje može biti pronađeno u smanjenom kapacitetu lipidnog matriksa za inkorporaciju zbog strukturnih promena tokom homogenizacije i očvršćavanja nanočestica tokom hlađenja (Schubert i sar., 2006). Zanimljivo je da, uprkos vizuelnoj opservaciji isključivanja supstance, efikasnost inkapsulacije je i dalje bila visoka (tabela 4.3.2). Do ovakvih rezultata je došlo zbog veoma slabe rastvorljivosti DK-I-60-3 u vodi, supstanca je u vodenoj fazi verovatno bila prisutna u vidu nerastvorenih čestica, koje kao takve ne mogu proći kroz filter. Kada je koncentracija DK-I-60-3 smanjena za 20%, odnosno sa 1,0 mg/ml na 0,8 mg/ml u LNP10 formulaciji, stabilnost ka ekspulziji je bila povećana, te nije došlo do sedimentacije tokom jednog meseca čuvanja, što je potvrdilo našu teoriju. Ova promena koncentracije nije uticala na fizičko-hemijske parametre (z-ave, PDI, zeta potencijal, pH vrednost, električna provodljivost) razvijenih nanočestica.

4.3.2. Stabilnost u odabranim puferima

Stabilnost nanočestica, posebno onih sa naelektrisanom površinom, može biti narušena u medijumima sa niskom pH vrednošću ili visokom jonskom jačinom. Uzimajući u obzir uslove u različitim delovima gastrointestinalnog trakta (Sjögren i sar., 2014), razvijene formulacije su inkubirane u tri različita uslova tokom 8 h: 0,1M hlorovodonična kiselina (pH 1,2), acetatni pufer (pH 4,0) i fosfatni pufer (pH 6,8) na 37 °C, i z-ave i PDI određeni u nekoliko vremenskih tačaka. Veličina čestica LNP10-DK u svim medijumima je ostala gotovo nepromenjena tokom vremena inkubiranja, sa povećanjem za oko 20 nm. PDI u 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini i acetatnom puferu ostala je ispod 0,250 tokom celokupnog eksperimenta, međutim u fosfatnom puferu je došlo do povećanja nakon četiri sata, ukazujući na neki oblik nestabilnosti (Slika 4.3.1a). U ovoj vremenskoj tački tokom DLS merenja na dijagramu je primećen pik na oko 200 nm, što može objasniti veći z-ave i PDI. U naredne dve vremenske tačke na dijagramu je vidljiv samo jedan pik i z-ave je smanjen za 5-6 nm. Moguće je da je došlo do ujednačavanja veličine čestica između četiri i šest sati inkubiranja, dostižući neku formu ravnotežnog stanja.

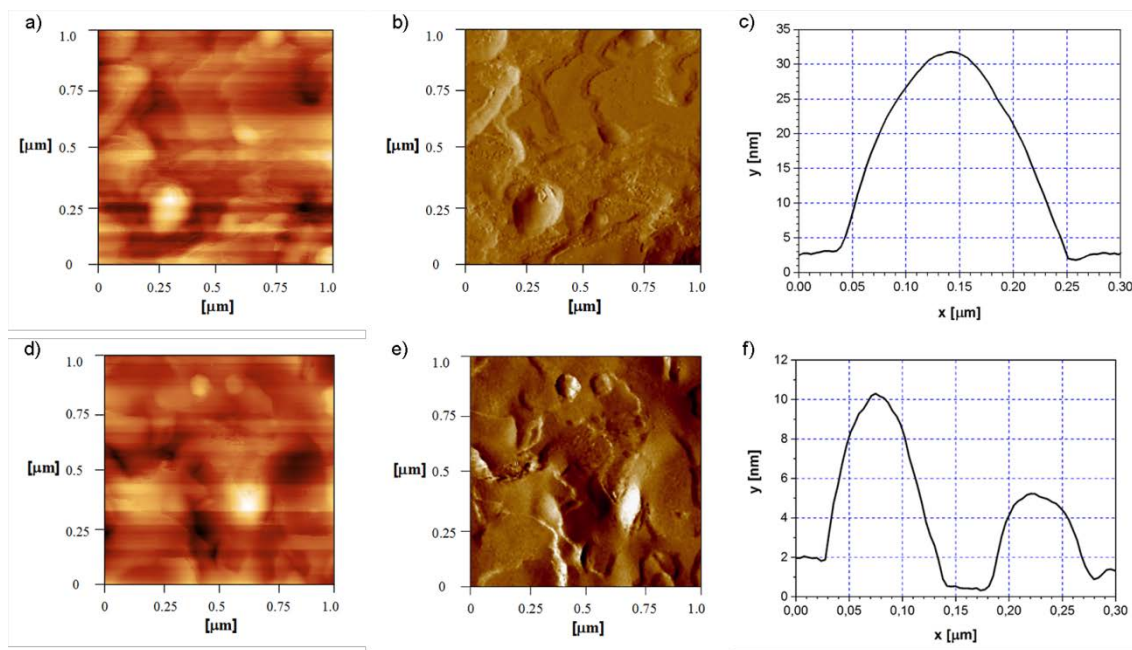


Slika 4.3.1. Veličina čestica (z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI) formulacija LNP10-DK (a) i LNP15-DK (b) tokom inkubiranja u 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini (pH 1,2), acetatnom puferu (pH 4,0) i fosfatnom puferu (pH 6,8).

Čestice LNP15-DK su bile stabilne u 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini i acetatnom puferu u pogledu veličine čestica i PDI, zadržavajući ove parametre konstantnim tokom celog eksperimenta. U fosfatnom puferu, primećena je aglomeracija nakon samo jednog sata inkubiranja (Slika 4.3.1.b). Nakon toga, veličina čestica se udvostručila u svakoj vremenskoj tački, i zatim nakon četiri sata ostala nepromenjena do kraja eksperimenta. Zeta potencijal je bio smanjen na nulte vrednosti u obe formulacije, pa se može zaključiti da elektrostatičko odbijanje koje potiče od lecitina nije stabilizovalo nanočestice u ispitivanim medijumima. Ovaj nalaz ističe ulogu polisorbata 80 kao sternog stabilizatora u ovim uslovima (Wang i sar., 2017b). Bolja stabilnost LNP10-DK u odabranim puferima može biti značajna za prospektivnu oralnu primenu. S obzirom da pojedine studije predlažu internalizaciju lipidnih nanočestica u epitelne ćelije endocitozom kao metodu njihove apsorpcije (Shah i sar., 2016b), za uspešno preuzimanje njihov integritet ne sme biti narušen u gastrointestinalnim tečnostima.

4.3.3. Ispitivanje morfologije lipidnih nanočestica mikroskopijom atomskih sila

Uzimajući u obzir nisku rezoluciju DLS metode za merenje veličine čestica, i uporedo malom verovatnoćom da formulisane čestice imaju sferni oblik, njihova morfologija je analizirana mikroskopijom atomskih sila (AFM). AFM je potvrdila submikronsku i relativno ujednačenu veličinu čestica. Okrugle, pojedinačne čestice oblika diska su primećene, međutim veličina mnogih veoma sitnih čestica nije mogla biti izmerena jer nisu bile dobro izdvojene od okruženja zbog njihove male visine. U uzorku LNP10-DK izdvojena čestica imala je veličinu oko 200 nm, i visinu oko 35 nm (Slika 4.3.2a, b, c), a u uzorku LNP15-DK izmerena je veličina dve manje, dobro definisane čestice (Slika 4.3.2d, e, f). U oba uzorka, čestice su bile okružene matriksom koji može biti sastavljen od lamela lecitina. Ovo se posebno uočava na slici 4.3.2b, na kojoj sloj oko čestice nije bio potpun. Izmerena debljina ovog sloja bila je oko 2 nm i pretpostavlja se da on predstavlja stabilizacioni omotač nanočestica. Slično, mek omotač surfaktanata je takođe vidljiv na AFM mikrografijama kao tamne ivice oko čestica u slučaju SLN sa paliperidonom (Kumar i Randhawa, 2013).

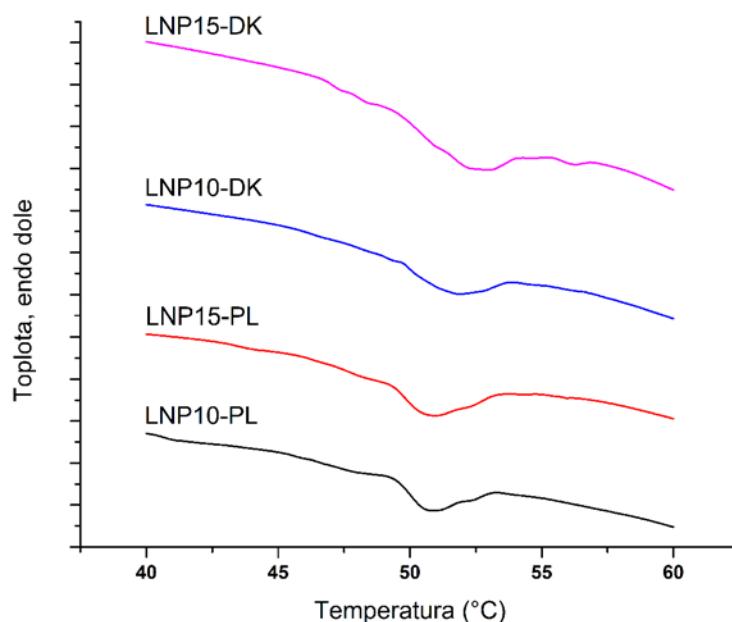


Slika 4.3.2. Mikrografije dobijene mikroskopijom atomskih sila za formulacije LNP10-DK (a, b, c) i LNP15-DK (d, e, f): 2D topografija na površini uzorka 1 x 1 μm (a i d), greška signal na površini uzorka 1 x 1 μm (b i e) i profili visine odabranih nanočestica (c i f).

4.3.4. Strukturna analiza lipidnih nanočestica

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Termalna analiza i analiza fizičkog stanja lipidnih nanočestica je sprovedena diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC). Kristalna forma lipidnog matriksa nanočestica je od velike važnosti za njihovu stabilnost. Ukoliko nije kristalisao, čvrst lipid može ostati u tzv. superohlađenom stanju sa lošom stabilnošću. Iz toga razloga, u ispitivanjima čvrstog stanja lipidnih nanočestica, analiza metodom DSC je neophodan korak. Da bi se sprečila kristalizacija tokom sušenja, preporučuje se sprovođenje merenja u tečnim uzorcima. Pik topljenja je bio prisutan na termogramima svih formulacija, ukazujući na kristalno stanje lipidnog matriksa (slika 4.3.3). Zbog submikronske veličine čestica (Bunjies i sar., 1996), temperatura pika topljenja bila je za skoro 10 $^{\circ}\text{C}$ niža od odgovarajuće lipidne smeše (Tabela 4.3.3). Međutim, uprkos smanjenju temperature topljenja, topljenje je započelo na temperaturi iznad 40 $^{\circ}\text{C}$, ukazujući da bi nanočestice ostale u čvrstom stanju nakon primene.



Slika 4.3.3. Termogrami formulacija lipidnih nanočestica

Tabela 4.3.3. Termoanalitički parametri formulacija lipidnih nanočestica.

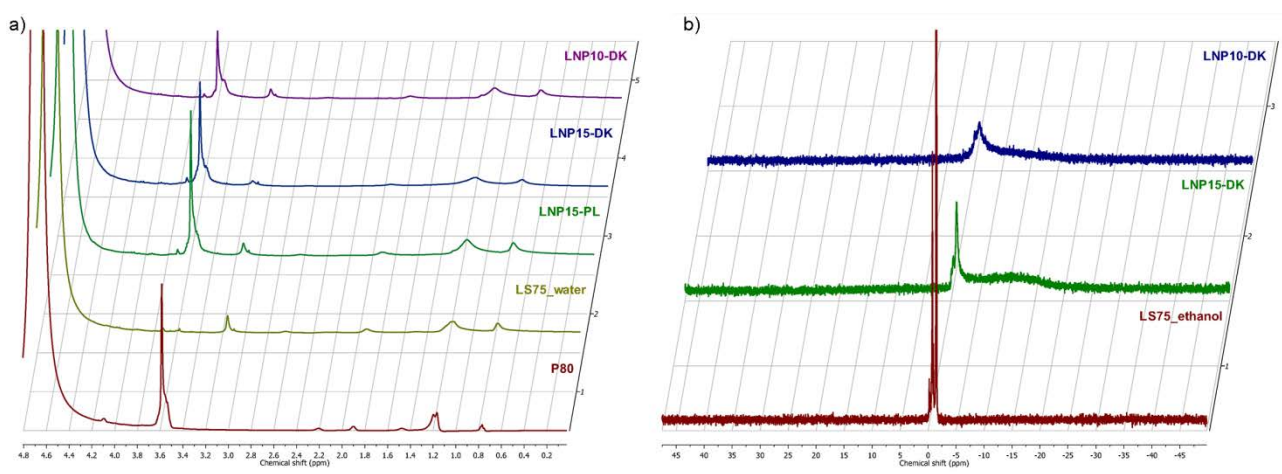
Formulacija	T_{onset} (°C)	T_{peak} (°C)	Entalpija topljenja (J/g)	CI_{LNP} (%)
LNP10-PL	49,2	50,5	6,1	41,8
LNP15-PL	48,6	50,6	10,3	48,6
LNP10-DK	48,8	51,4	10,9	77,6
LNP15-DK	48,7	51,9	16,8	79,6

Smanjenje temperature topljenja u disperzijama praćeno je smanjenjem entalpije i posledično indeksa kristaličnosti (Tabela 4.3.3). Ovi nalazi mogu biti pripisani Kelvinovom efektu koji objašnjava da je potrebna manja količina energije za disrupciju kristalnog lipidnog matriksa u česticama manje veličine (Ali i sar., 2010). Zanimljivo je da je indeks kristaličnosti disperzija koje sadrže DK-I-60-3 (LNP10-DK i LNP15-DK) bio viši od odgovarajućih placebo formulacija (LNP10-PL i LNP15-PL) označavajući pozitivan efekat DK-I-60-3 na kristalizaciju. Isto nije bilo primećeno u nedispergovanim lipidnim smešama u kojima DK-I-60-3 nije uticao na kristaličnost smeše (tabela 4.1.3). Međutim, zbog malog udela DK-I-60-3 prisutnog u disperzijama, metoda DSC nije korišćena za određivanje fizičkog stanja ove supstance u formulacijama.

Nuklearna magnetna rezonanca

Nuklearna magnetna rezonanca (NMR) korišćena je za analizu strukture razvijenih lipidnih nanočestica. Definisane njihove strukture značajno je sa stanovišta stabilnosti i *in vivo* ponašanja nakon primene. Posebna pažnja posvećena je lokalizaciji stabilizatora (polisorbata 80 i lecitina) i supstance DK-I-60-3. Da bi se osigurala detekcija, zbog velikog sadržaja vode, pre svega su korišćene lipidne nanočestice sa 15% masne faze, a zatim je rađena uporedna analiza sa formulacijom sa nižim sadržajem masne faze (LNP10-DK). Protonska studija NMR (1H NMR) je sprovedena na sveže pripremljenim placebo (LNP15-PL) i napunjenim (LNP15-DK) disperzijama lipidnih nanočestica i referentnim uzorcima stabilizatora sa istim koncentracijama kao u pomenutim formulacijama. Poredbeni uzorci bili su vodene disperzije polisorbata 80 (P80) ili lecitina (LS75_water) u koncentraciji 3,0 % ili 4,5%, respektivno. Vodena disperzija lecitina je dobijena nakon dispergovanja lecitina u vodi uz pomoć ultrazvuka i dobijena vrednost z-ave za vezikule bila je $156,0 \pm 2,0$ nm, a PDI $0,257 \pm 0,006$.

Na NMR spektrima, širina linije na polovini visine signala ukazuje na mobilnost molekula. Kada je mobilnost ograničena, signali postaju široki i sa nižim amplitudama. Štaviše, u čvrstom stanju signali ne mogu biti detektovani zbog njihovog veoma kratkog vremena relaksacije (Schubert i sar., 2006). Stoga, signali koji potiču od čvrstog lipida (S154), odnosno triglicerida nisu bili detektovani, zbog njihove kristalizacije, što je potvrdilo rezultate dobijene metodom DSC. Što se tiče lokalizacije molekula stabilizatora, referentni uzorci su analizirani pod istim uslovima kao i uzorci lipidnih nanočestica, a zatim su poređeni dobijeni rezultati. Polisorbat 80 je amfifilna supstanca pa se određeni signali mogu pripisati hidrofobnom ili hidrofilnom delu molekula. Hemijsko pomeranje protona hidrofилnog dela na ~ 3,585 ppm je bio jasno vidljivo u poredbenom P80 uzorku, kao i u uzorcima lipidnih nanočestica, sa nepromenjenim intenzitetom (slika 4.3.4a). Međutim, signali na oko 2,210 ppm i 1,478 ppm povezani sa hidrofobnim delom polisorbata 80 bili su kompletno ugušeni u uzorcima lipidnih nanočestica, ukazujući na potpunu restrikciju mobilnosti ovog dela molekula verovatno usled njegovog inkorporiranja unutar nanočestice. Ovi nalazi su podržali pretpostavku pozicije polisorbata 80 blizu površine čestice, sa hidrofilnim delom slobodnim u vodenoj fazi.



Slika 4.3.4. (a) ¹H NMR spektri referentnih uzoraka (P80 – vodena disperzija polisorbata 80, LS75_water – vodena disperzija lecitina) i razvijenih disperzija (LNP15-PL, LNP15-DK i LNP10-DK); (b) ³¹P NMR spektri referentnog uzorka (LS75_ethanol – etanolni rastvor lecitina) i razvijenih formulacija (LNP15-DK i LNP10-DK).

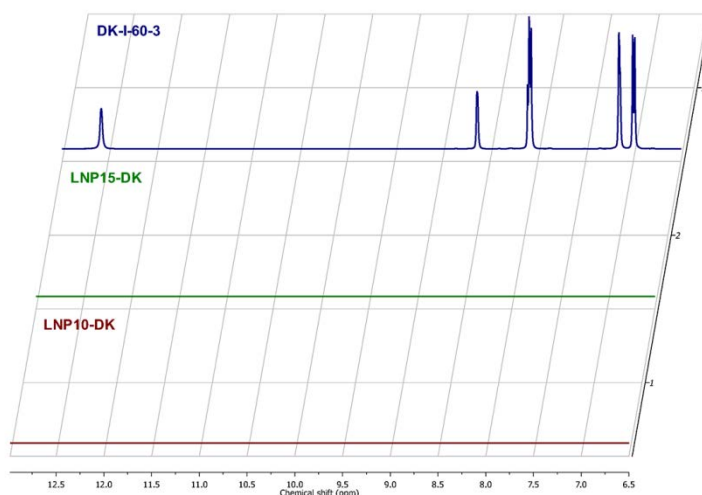
Analiza signala uzorka lecitina u vodi (LS75_water) bila je kompleksnija zbog sastava ovog ekscipijensa, ali i lokalizacije u lipidnim nanočesticama. Kao što je prethodno rečeno, lecitin koji je korišćen u ovoj studiji sadrži fosfolipide uključujući fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin fosfatidilinozitol i fosfatidnu kiselinu, ali i visok udeo masnih kiselina. Ovakva smeša može doprineti boljoj stabilnosti nanoemulzija i nanočestica, pošto može obezbediti negativno površinsko naelektrisanje i posledično, elektrostatičko odbijanje (Klang i Valenta, 2011). Stoga, očekivano je da se ovi molekuli nađu na međupovršini nanočestice. Signali na oko 1,90 ppm, 1,14 ppm i 0,75 ppm u LS75_water (slika 4.3.4a) potiču od ugljovodoničnih lanaca masnih kiselina fosfolipida, ali i slobodnih masnih kiselina. Pomenuti signali su veće širine i sa smanjenim intenzitetom u uzorcima lipidnih nanočestica. Smanjena amplituda signala može biti povezana sa snažnom interakcijom ovih molekula sa lipidnim jezgrom, dovodeći do delimične imobilizacije pomenutih delova molekula (Jores i sar., 2003).

Signal na ~ 3,128 ppm (slika 4.3.4.a) povezan je sa protonima metil grupe u okviru trimetilamonijum grupe, pa se smatra kao veoma značajan za analizu jer predstavlja signal koji potiče samo od fosfolipida. Ovaj signal je veoma širok i sa niskim intenzitetom u uzorcima lipidnih nanočestica, potvrđujući pomenutu hipotezu. Slični rezultati publikovani su za lipidne nanočestice sa visokim sadržajem Phospholipon® 90G, koji sadrži najmanje 90% fosfatidilholina (Schubert i

sar., 2006). U trenutnoj studiji smanjenje signala nije bilo izraženo kao u pomenutom istraživanju verovatno zbog različitog sastava lecitina. Dalje objašnjenje može biti pronađeno u povećanom bubrenju lamelarne tečnokristalne faze fosfatidilholina u prisustvu fosfatidiletanolamina i fosfatidilinozitola i drugačijem pakovanju na međupovršini (Klang i Valenta, 2011).

Kako bi se preciznije ispitala pozicija fosfolipida, primenjena je ^{31}P NMR metoda (slika 4.3.4b). Imajući u vidu da se atom fosfora može naći samo u strukturi fosfolipida, tačnije u njegovom hidrofilnom delu, ^{31}P NMR može dati podatke o lokalizaciji ovog dela lecitina u nanočesticama. Kao poredbeni uzorak korišćen je etanolni rastvor lecitina u koncentraciji 4,5% (LS75_ethanol). Oštar i dobro definisan signal na oko $-1,48$ ppm vidljiv je na spektru pomenutog rastvora. U disperziji LNP15-DK signal je bio pomeren na $-0,97$ ppm zbog zamene rastvarača. Ovaj signal je bio veoma širok sa niskim intenzitetom pokazujući jaku interakciju između lecitina i triglicerida i imobilizaciju u nekom stepenu (Schubert i sar., 2006). Dok zasićeni fosfolipidi uglavnom formiraju čvrst omotač oko trigliceridnog jezgra nanočestica, očekivano je fluidno stanje visoko nezasićenih fosfolipida (kao što su oni prisutni u lecitinu korišćeni u ovoj studiji) (Bunjes i Koch, 2005; Salminen i sar., 2014). Signal je dodatno smanjenog intenziteta u LNP10-DK, zbog manje koncentracije lecitina u ovoj formulaciji.

Reprezentativni signali DK-I-60-3 (Knutson i sar., 2018) nisu detektovani ni u jednoj formulaciji koja sadrži ovu supstancu, pokazujući totalnu imobilizaciju molekula (Slika 4.3.5). Zahvaljujući visokoj efikasnosti inkapsulacije i odsustvu tragova DK-I-60-3 na zidovima bočice pretpostavlja se da je supstanca lokalizovana uglavnom unutar lipidnih nanočestica. Međutim, uzimajući u obzir generalno nizak kapacitet triglicerida za uključivanje supstance i kompleksnu strukturu lipidnih nanočestica, DK-I-60-3 verovatno nije bio homogeno distribuiran unutar njih. Iako višak lecitina može destabilisati koloidne disperzije i dovesti do formiranja vezikula fosfolipida u vodenoj fazi, njegovo prisustvo može biti povoljno za povećanje solubilizacije lekovite supstance (Klang i Valenta, 2011). U ovom istraživanju, svi signali koji potiču od lecitina u uzorcima lipidnih nanočestica bili su dodatno prošireni nakon dodatka DK-I-60-3 (slika 4.3.4a). Stoga, DK-I-60-3 je verovatno bio lokalizovan u blizini faze lecitina (Chantaburanan i sar., 2017).



Slika 4.3.5. ^1H NMR spektri DK-I-60-3 (rastvoren u DMSO) i razvijenih disperzija (LNP15-DK i LNP10-DK)

U istraživanju Yucel i sar. (2013), elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija je korišćena za lokalizaciju hidrofobne probe u SLN stabilizovane lecitinom. Pokazano je da je kristalizacija lipidnog jezgra rezultovala redistribucijom hidrofobne probe u fazu bogatu lecitinom, ističući ulogu lecitina. Slično razmišljanje može se primeniti na ovaj eksperiment. Iako je nedispergovani lipidni matriks bio homogen, očekivano je da se tokom tople homogenizacije pod visokim pritiskom

molekuli fosfolipida redistribuiraju na površini čestice zbog amfifilne prirode. Pošto se smatra da čvrsti lipidi imaju nizak kapacitet za punjenje, moguće je da se tokom izrade formulacije DK-I-60-3 takođe pomerio ka površini čestice. Veliki broj ciklusa homogenizacije takođe doprinosi ovoj vrsti preraspodele (Klang i Valenta, 2011). Ovo može objasniti i ekspulziju supstance nakon jednomesečnog čuvanja kada je korišćena u saturacionoj koncentraciji.

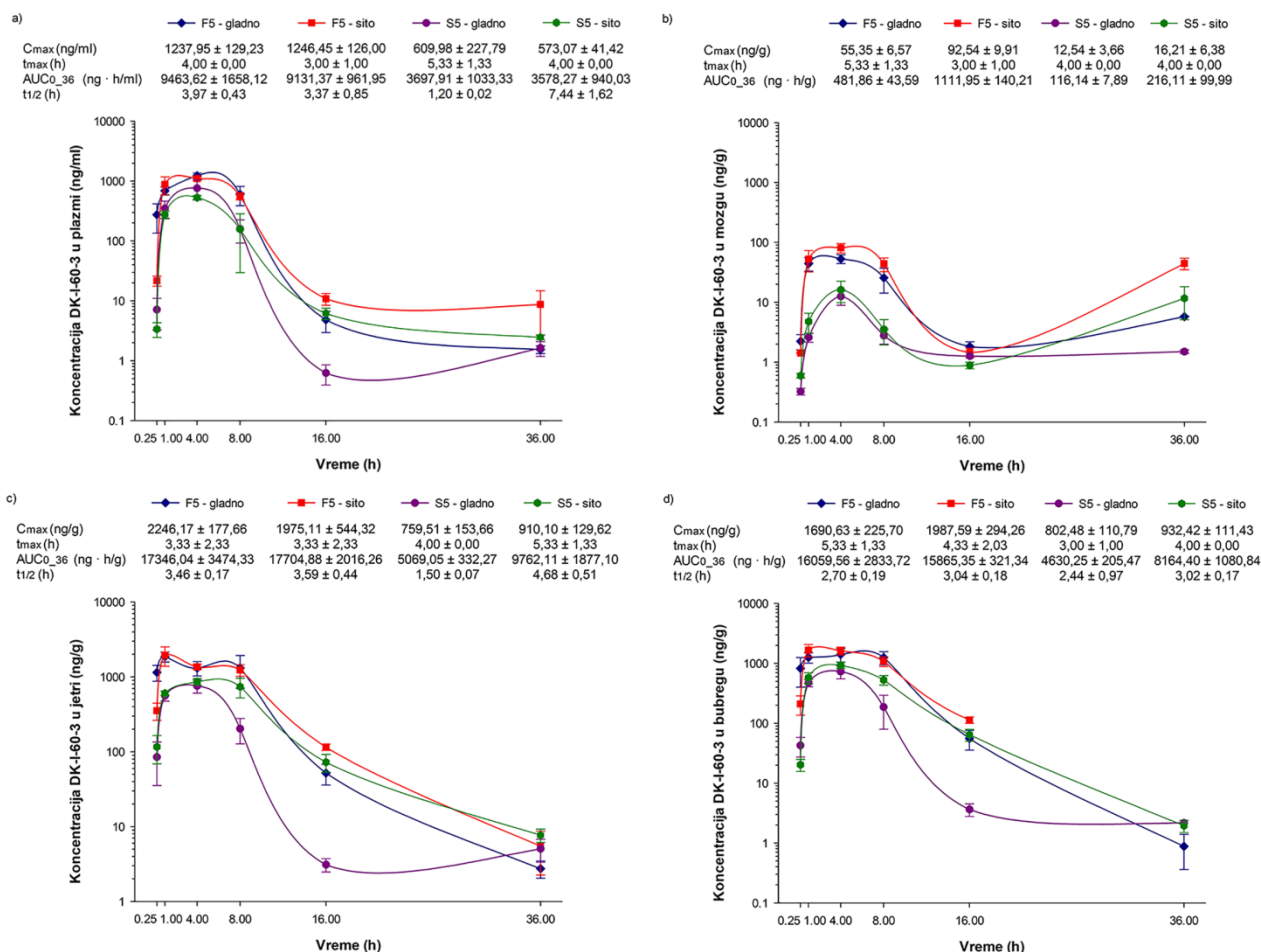
Uzimajući u obzir sve rezultate ovog dela istraživanja, najverovatnije je reč o slojevitoj strukturi nanočestica, sličnoj onoj opisanoj u Schubert i sar. (2006). Lipidno jezgro je verovatno dominantno izgrađeno od kristalisanih triglicerida čvrstog lipida. Jezgro je obloženo fosfolipidima koji su u snažnoj interakciji sa lipidom, ali delimično fluidni i omogućuju elektrostatičku stabilizaciju. Moguće je da su formirali lamelarne strukture oko jezgra (vidljive na mikrografijama AFM-a, slika 4.3.2). DK-I-60-3 je najverovatnije lokalizovan u omotaču, fazi koja se sastoji od lecitina. Dodatno, iako je hidrofobni deo polisorbata 80 imobilisan u čestici, polarne glave su bile pokretne u vodenoj fazi, doprinoseći stabilizaciji sternim efektom. Pošto su slični rezultati dobijeni za formulaciju LNP10-DK, očekuje se ista struktura nanočestica u ovim disperzijama.

4.4. Rezultati i diskusija četvrte faze eksperimentalnog rada

4.4.1. Neurofarmakokinetička studija i studija biodistribucije nanokristalnih disperzija DK-I-60-3

Krive zavisnosti koncentracije od vremena u plazmi, mozgu, jetri i bubregu nakon primene nanokristalne disperzije (F5) i odgovarajuće suspenzije (S5) u stanju gladi i sitosti su prikazani na slici 4.4.1. Kao što se može videti, nakon primene suspenzije, farmakokinetički parametri maksimalne koncentracija (C_{max}) i površine ispod krive (AUC) u plazmi bili su slični u stanju gladi i sitosti ($P = 0,998$ i $0,100$ za C_{max} i AUC, respektivno, Student t-test). U drugim ispitivanim tkivima, iako su srednje vrednosti AUC izgledale drugačije, čak dva puta više u grupi sitih životinja, razlika nije bila statistički značajna ($P = 0,933$; $0,484$ i $0,719$ za mozak, jetru i bubreg respektivno, Student t-test), verovatno usled izraženih interindividualnih razlika. Izračunate ukupne vrednosti AUC (suma AUC vrednosti u ispitivanim matriksima) u grupama životinja koje su bile nahranjene bile su 1,5 puta više u poređenju sa ukupnim AUC životinja koje su gladovale, verovatno zbog smanjene brzine eliminacije. Sa druge strane, u obe grupe životinja koje su primile nanokristalnu disperziju, svi farmakokinetički parametri u setu životinja (triplikatu) bili su slični sa manjim standardnim devijacijama ukazujući na manje varijacije u apsorpciji DK-I-60-3. Slične opservacije vezane za uloge nanokristala u smanjivanju interindividualnih razlika bile su potvrđene u slučaju nanosuspenzije itrakonazola (Mou i sar., 2011). Ujednačenja apsorpcija nakon nanokristala može biti posledica male i uniformne veličine čestica, dovodeći do manje ili više iste biodistribucije u obe grupe životinja, nahranjene i gladne.

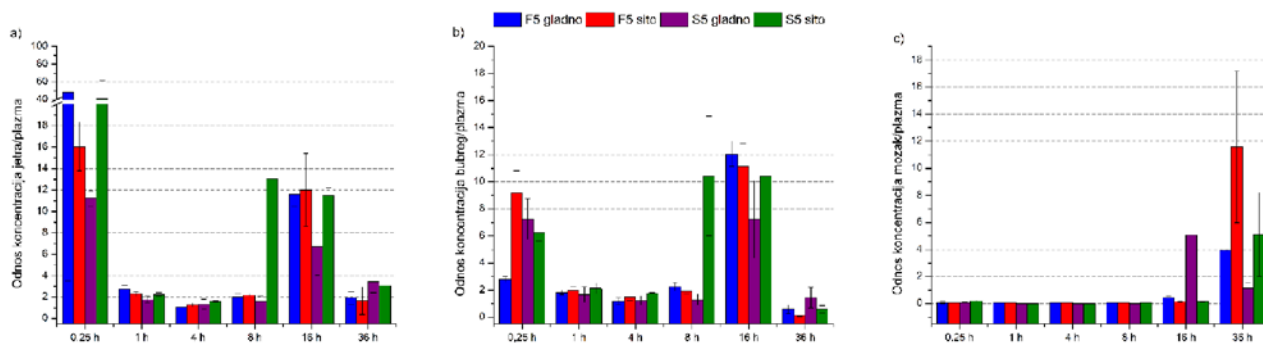
Pri poređenju dva tretmana – nanokristalna i gruba disperzija, C_{max} i AUC u svim ispitivanim matriksima bili su dva do tri puta veći nakon primene nanokristala, bez obzira na unos hrane (slika 4.4.1). Značajna razlika u AUC u plazmi nakon različitih tretmana ($P < 0,05$, ANOVA) dokazala je povećan obim apsorpcije nakon primene nanokristala. Iako rezultati rastvorljivosti nanokristala (slika 4.2.8b) nisu obećavali poboljšanje farmakokinetičkog profila, drugi faktori kao što je povećanje permeabilnosti mogu doprineti boljoj apsorpciji (Imono i sar., 2020). Štaviše, pH vrednost u praznom i punom želucu pacova je u opsegu 4-5 (Sjögren i sar., 2014), pa smanjenje rastvorljivosti neće biti toliko izraženo kao što se isprva očekivalo. Evidentno je da, uprkos brojnim *in vivo* studijama, način na koji nanokristali poboljšavaju biološku raspoloživost nakon oralne primene i dalje ostaje nejasan. Moguće je da se rastvaranje i endocitoza dešavaju simultano (Lu i sar., 2019). Dodatno, solubilizacija DK-I-60-3 posredstvom žučnih soli i interakcija između žučnih soli i SLS ne može biti zanemarena (Sjögren i sar., 2014). Povećanje bioraspoloživosti u čvrstim tkivima bilo je posebno značajno u kontekstu isporuke u mozak, kao ciljni organ. Iako je preuzimanje u mozak bilo u malom obimu, isporuka je bila relativno brza te su maksimalne koncentracije postignute veoma brzo nakon dostizanja istih u plazmi. Relativno povišene koncentracije u mozgu 36 h nakon primene mogu ukazati na moguće formiranje depoa DK-I-60-3 u telu. Ovo je dovelo do visokih vrednosti AUC u mozgu nakon primene F5 formulacije u grupama koje su bile u stanju sitosti. Tačan razlog za dobijanje ovakvih rezultata je, ipak, i dalje nedovoljno jasan.



Slika 4.4.1. Krive zavisnosti koncentracije od vremena i izračunati farmakokinetički parametri nanokristalne disperzije (F5) i suspenzije (S5) u (a) plazmi, (b) mozgu, (c) jetri i (d) bubregu nakon oralne primene kod pacova u dozi 10,0 mg/kg u stanju sitosti i gladi. C_{max} – maksimalna koncentracija, t_{max} – vreme postizanja maksimalne koncentracije, AUC₀₋₃₆ – površina ispod krive od t = 0 do t = 36 h, t_{1/2} – poluvreme eliminacije (srednja vrednost ± standardna greška, n = 3).

Poluvreme eliminacije u mozgu nije izračunato zbog nepravilnog profila koncentracija.

Distribucija lekovite supstance nakon primene je uglavnom zavisna od nadmetanja preuzimanja između krvi i tkiva kao i raspodele između pojedinačnih tkiva (Daniel, 2003). Nakon izračunavanja odnosa između koncentracije u jetri i plazmi u svakoj vremenskoj tački (slika 4.4.2a), može se uvideti da DK-I-60-3 ima afinitet ka zadržavanju u ovom organu (izračunati odnos bio je veći od jedan). Kao što je očekivano, 15 min nakon primene tretmana, najviše koncentracije su određene u jetri. Eliminacija iz ovog organa bila je sporija nego iz bubrega, na primer, na osnovu podataka o poluvremenu eliminacije (slika 4.4.1c i d) što može ukazati na retenciju supstance u jetri u određenom obimu. Formiranje depoa u jetri može biti pretpostavljeno takođe i iz izrazito povećanog odnosa koncentracije u jetri u odnosu na plazmu 16 h nakon tretmana.



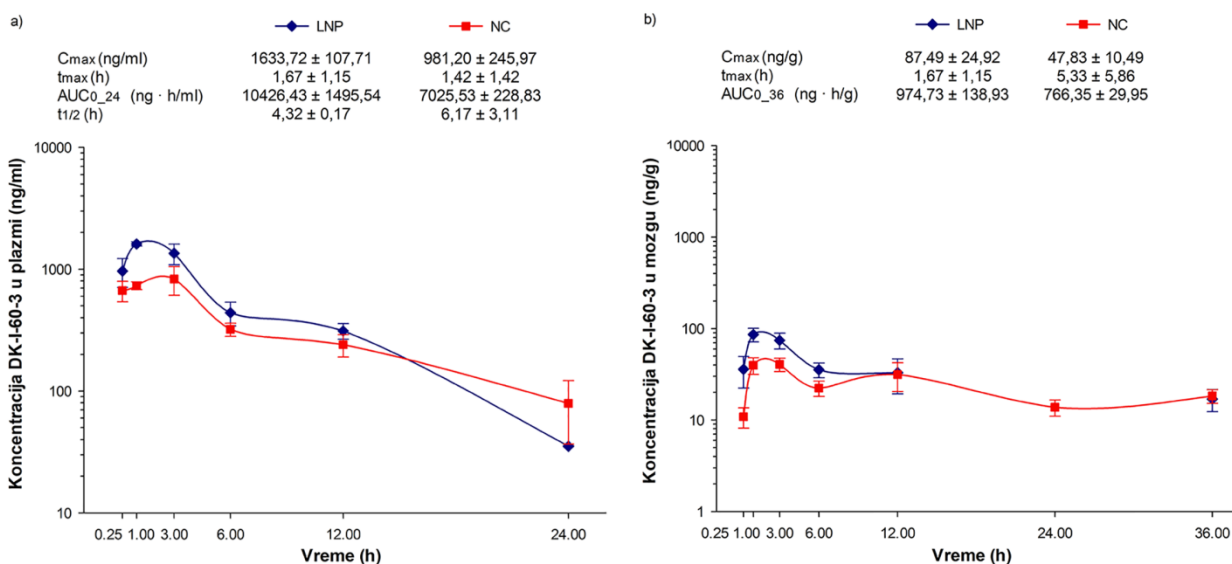
Slika 4.4.2. Odnos između koncentracije DK-I-60-3 u (a) jetri, (b) bubregu ili (c) mozgu i plazmi u svakoj vremenskoj tački.

Sa druge strane, zbog krvno-moždane barijere, koncentracije u mozgu bile su manje od onih u plazmi u prvih 5 vremenskih tačaka uzorkovanja (slika 4.4.2.c). Ipak, u poslednjoj vremenskoj tački, 36 h nakon primene, koncentracija DK-I-60-3 u mozgu bila je dva do tri puta veća, ukazujući na sporiju eliminaciju iz ovog organa. Izuzetak je u slučaju suspenzije primenjene u stanju sitosti gde su više koncentracije primećene nakon 16 h, a zatim počele da opadaju. U ovom trenutku, stoga, nije u potpunosti jasno šta je dovelo do povećanja koncentracije u mozgu u poslednjoj vremenskoj tački uzorkovanja. Ono može biti posledica nepravilne ili spore distribucije, formiranja depoa u telu, potencijalne interakcije sa lipidima mozga ili kombinacija više faktora. Struktura krvno-moždane barijere svakako je još jedan deo složene slagalice, kada se ispituje isporuka u mozak. Zanimljivo je da su slični profili koncentracije u odnosu na vreme dobijeni za obe formulacije (nanokristalna disperzija i suspenzija), ukazujući na sličnu distribuciju. Stoga, može se zaključiti da su više koncentracije u mozgu nakon oralne primene posledica povećane apsorpcije usled smanjene veličine čestica, ali da je distribucija bila vođena osobinama supstance.

4.4.2. Neurofarmakokinetička studija lipidnih nanočestica DK-I-60-3

U ovoj neurofarmakokinetičkoj studiji poređene su dve formulacije nanonosaa DK-I-60-3: nanokristalna disperzija (NC) i lipidne nanočestice (LNP). U obe formulacije koncentracija DK-I-60-3 bila je 0,8 mg/ml. LNP je u sastavu imala 10% masne faze, dok je kvalitativni i kvantitativni sastav NC odgovarao formulaciji F5 (sa proporcionalno smanjenim koncentracijama DK-I-60-3 i stabilizatora). Odgovarajući fizičkohemijski parametri za NC bili su z-ave $190,1 \pm 2,4$ nm i PDI $0,241 \pm 0,018$, a za LNP z-ave $69,3 \pm 2,0$ nm i PDI $0,279 \pm 0,006$.

Rezultati maksimalne koncentracije (C_{max}) i površine ispod krive (AUC_{0-24}) u plazmi nakon NC bile su slične vrednostima dobijenim u prethodnoj studiji, uzimajući u obzir drugačiju primenjenu dozu (8,0 mg/kg u ovom eksperimentu, 10 mg/kg u prethodnom). Kada se uporede tretmani NC i LNP, pomenuti farmakokinetički parametri C_{max} i AUC_{0-24} bili su oko 1,5 puta veći nakon LNP (slika 4.4.3a). Objašnjenje za ove rezultate može se naći u različitoj sudbini ove dve vrste nanočestica u gastrointestinalnom traktu. Iako neki radovi predlažu da nanokristali mogu proći intestinalnu barijeru netaknuti, drugi tvrde da bi se najverovatnije lekovita supstanca apsorbovala nakon rastvaranja (Zhang i sar., 2021). Generalno, endocitoza nanočestica bi zavisila od više faktora uključujući oblik, veličinu i sastav (strukturu) čestica.



Slika 4.4.3. Krive zavisnosti koncentracije od vremena i izračunati farmakokinetički parametri disperzije lipidnih nanočestica (LNP) i nanokristalne disperzije (NC) u (a) plazmi i (b) mozgu, nakon oralne primene kod pacova u dozi 8,0 mg/kg. C_{max} – maksimalna koncentracija, t_{max} – vreme postizanja maksimalne koncentracije, AUC_{0-24} ili AUC_{0-36} – površina ispod krive od $t=0$ do $t=24$ ili 36 h, $t_{1/2}$ – poluvreme eliminacije (srednja vrednost ± standardna devijacija, $n = 3$). Poluvreme eliminacije u mozgu nije izračunato zbog nepravilnog profila koncentracija.

Uticaj sastava formulacije na mehanizam apsorpcije nanočestica bio je proučavan u mnogim radovima, pošto bi verovatno bio najodgovorniji za interakcije između nanočestica i zida intestinalnog trakta (Tian i sar., 2022). Kada su u pitanju stabilizatori korišćeni u formulaciji NC, PVP može povećati permeabilnost lekovite supstance, dok su efekti SLS na permeabilnost nekonzistentni u literaturi (Ruiz-Picazo i sar., 2020). Sa druge strane, efekti lecitina i polisorbata 80, korišćenih u LNP bili su opširno istraženi. Ovi stabilizatori mogu olakšati difuziju kroz površinski vodeni sloj (Zhang i sar., 2012b) i afinitet i bioadheziju nanočestica za membranu tankog creva (Li i sar., 2009). Dodatno, značajna uloga lipida na apsorpciju pokazana je na primeru sakvinavira. Čelijsko preuzimanje bilo je poboljšano kada su nanokristali obloženi lipidima, zbog njihove veće biokompatibilnosti u poređenju sa čistim nanokristalima stabilizovanim polimernim stabilizatorima. Ovo je rezultovalo višim vrednostima C_{max} i AUC nakon primene modifikovanih nanokristala, u poređenju sa grubom suspenzijom i čistim nanokristalima (Xia i sar., 2018). Stoga lipidi, zajedno sa lecitinom i polisorbitom 80 u formulaciji LNP su verovatno unapredili apsorpciju što je dovelo do viših C_{max} i AUC nakon oralne primene.

Drugi mehanizam apsorpcije leka nakon primene lipidnih nanočestica uključuje njihovu degradaciju posredstvom enzima lipaze u kombinaciji sa kolipazom. Proizvodi razgradnje triglicerida, monogliceridi i digliceridi formiraju micle koji solubilizuju lekovitu supstancu. Dodatno, interakcija sa žučnim solima dovodi do formiranja mešovityh micela koje olakšavaju apsorpciju leka. Preduslov za pomenut proces degradacije je bliska povezanost lekovite supstance sa molekulima lipida, koja bi trebalo da bude molekulski dispergovana (rastvorena) u lipidnoj fazi formulacije. Značajan faktor je i tip stabilizatora na površini čestice. Smatra se da sloj stabilizatora na površini nanočestica diktira brzinu degradacije. Dok lecitin omogućuje brzu degradaciju, sterni stabilizatori mogu da je odlože. U istraživanju sa ciklosporinom formulisanim kao nanokristali ili lipidne nanočestice bilo je jasno da su različiti procesi u gastrointestinalnom traktu doveli do razlika u bioraspoloživosti nakon oralne primene (Müller i sar., 2006). Ovaj iskaz može biti primenjen i na trenutni eksperiment. Iako se u ovom trenutku ne može sa sigurnošću tvrditi koji od predloženih mehanizama (endocitoza ili degradacija) je bio odgovoran za povećanje farmakokinetičkih parametara nakon LNP, lipidi i stabilizatori su nesumnjivo imali najznačajniju ulogu.

Kao što se može videti iz profila koncentracije u zavisnosti od vremena, distribucija DK-I-60-3 u mozak nije bila zavisna od formulacije (slika 4.4.3b). Obim u kom su C_{max} i AUC povećani nakon primene LNP bio je isti u plazmi kao u mozgu, pokazujući da je povećanje ovih parametara bilo dominantno posledica povećane apsorpcije. Lekovita supstanca je verovatno bila oslobođena iz nanočestice rastvaranjem ili nakon degradacije nanočestica, tako da biodistribucija u tom slučaju zavisi od osobina lekovite supstance. Kada se pogleda farmakokinetički profil u mozgu, koncentracije su bile gotovo konstantne tokom ispitivanog vremena u slučaju nanokristalne disperzije (NC). Nakon što je postignuta maksimalna koncentracija, došlo je do neznatnog pada, a zatim ponovnog rasta nakon 24 h. Iako su vremenske tačke bile drugačije od onih korišćenih u prethodnom istraživanju, odgovarajuće krive koncentracije u odnosu na vreme su dobro korespondirale. Profil koncentracija nakon LNP bio je veoma sličan kao nakon NC, ali sa višim koncentracijama u prve četiri vremenske tačke. Nakon toga, koncentracije su bile slične, ili čak niže (vremenska tačka 24 h). Interesantno je da uprkos niskim koncentracijama u pretposlednjoj vremenskoj tački u plazmi (36 h), ispod vrednosti koje obuhvata kalibraciona kriva, one su bile relativno visoke u mozgu. Formiranje depoa u mozgu, stoga, može biti veoma verovatno. Međutim, kao što je bilo očekivano, u poslednjoj tački eksperimenta (48 h) koncentracije su bile ispod najniže tačke kalibracione krive u oba matriksa.

4.4.3. Studija biološke raspoloživosti nanokristalne disperzije i lipidnih nanočestica DK-I-60-3

Studija određivanja biološke raspoloživosti obuhvatala je određivanje farmakokinetičkih profila nakon ponovljenog uzorkovanja krvi životinja koje su primile NC ili LNP oralno, ili rastvor (SOL) intravenski. Vrednosti odabranih farmakokinetičkih parametara prikazane su u tabeli 4.4.1. Kao što je očekivano, maksimalne koncentracije bile su značajno više i postignute ranije u uzorcima životinja koje su primile intravenski SOL u odnosu na obe oralne formulacije DK-I-60-3. Poluvremena eliminacije nanočestičnih formulacija, LNP i NC, bila su značajno manje u neurofarmakokinetičkoj studiji, u kojoj je svaka životinja doprinela samo jednoj vrednosti koncentracije u plazmi, u poređenju sa studijom biološke raspoloživosti sa ponovljenim uzorkovanjem iz pojedinačne životinje. Metodologija korišćena u drugoj studiji je korišćena kao standardna metoda za prikupljanje i analizu farmakokinetičkih podataka (Kang i sar., 2022), koja sugeriše da je farmakokinetičko ponašanje DK-I-60-3 nakon oralne primene testiranih formulacija odgovarajuće za primenu jednom dnevno u budućim eksperimentima sa ponovljenim primenama tretmana.

Tabela 4.4.1. Farmakokinetički parametri disperzije lipidnih nanočestica (LNP, oralna primena), nanokristalne disperzije (NC, oralna primena) i rastvora (SOL, intravenska primena) u plazmi nakon primene kod pacova u dozi 8,0 mg/kg.

	C_{max} (ng/ml)	t_{max} (h)	AUC ₀₋₂₄ (ng·h/ml)	$t_{1/2}$ (h)	F (%)
LNP	1345,35 ± 357,86	3,13 ± 2,39	14164,44 ± 5462,42	17,29 ± 19,01	34,71 ± 12,43
NC	1018,19 ± 546,88	2,81 ± 2,67	11775,82 ± 6443,16	10,47 ± 9,45	24,46 ± 7,81
SOL	5197,97 ± 2043,49	0,12 ± 0,08	45790,81 ± 11459,86	3,76 ± 1,77	

C_{max} – maksimalna koncentracija, t_{max} – vreme postizanja maksimalne koncentracije, AUC₀₋₂₄ – površina ispod krive od $t=0$ do $t=24$ h, $t_{1/2}$ – poluvreme eliminacije, F – apsolutna biološka raspoloživost (srednja vrednost ± standardna devijacija, $n = 3$).

ANOVA je pokazala da se AUC₀₋₂₄ razlikuje u zavisnosti od puta primene ($F(2,11) = 21,343$, $P < 0,001$). Sistemska izloženost bila je značajno veća nakon intravenske primene, u poređenju sa oralnom primenom ($P < 0,01$), dok se LNP i NC nisu značajno razlikovale ($P = 0,912$). Iako je bioraspoloživost obe formulacije bila očigledno različita (LNP je imala oko 1,42 veće vrednosti od NC), statistička značajnost nije dostignuta ($P = 0,212$, Student t-test), po svojoj prilici usled relativno visoke interindividualne varijabilnosti. Ovaj tip metodološke prepreke može se prevazići u budućim studijama primenom ukrštenog (engl. *crossover*) dizajna (Králóvičová i sar., 2022).

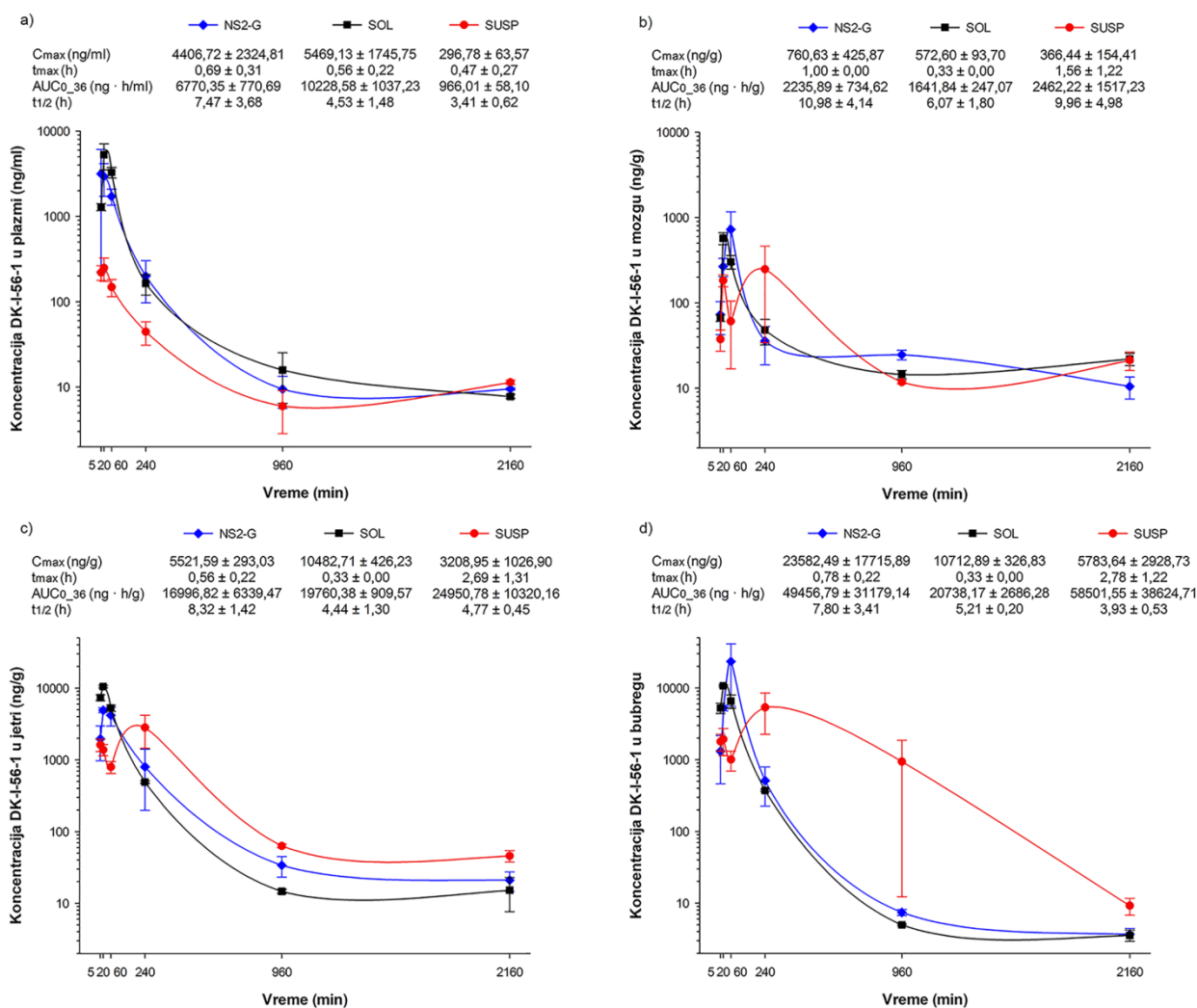
4.4.4. Neurofarmakokinetička studija i studija biodistribucije nanokristalnih disperzija DK-I-56-1

Farmakokinetička studija je sprovedena u cilju procene *in vivo* sudbine razvijene nanokristalne disperzije DK-I-56-1 nakon intraperitonealne primene na miševima u dobro tolerisanoj dozi (Knutson i sar., 2018, Vasović i sar., 2018) i ispitivanja pogodnosti ove formulacije za prekliničke farmakokinetičke studije. U skladu sa opštim preporukama za parenteralne preparate da se zadrži najjednostavniji kvalitativni i kvantitativni sastav, nanokristalna disperzija stabilizovana polisorbatom 80 je izabrana za *in vivo* eksperimente, sa dodatkom glicerola kao sredstva za izotonizaciju (formulacija označena kao NS2-G). Nakon pripreme, NS2-G formulacija imala je z-ave $273,3 \pm 2,2$ nm i PDI $0,263 \pm 0,017$. Formulacija je bila pogodna za parenteralnu primenu sa niskom koncentracijom polisorbata 80, malom veličinom čestica i osmolalnošću 289 mOsm/kg. Rastvor (SOL) je bio žut, providan, bez separacije faza (taloženja supstance), dok se suspenzija (SUSP) lako redispersovala u homogenu disperziju mućkanjem i primenom ultrazvuka neposredno pre primene. Raspodela veličine čestica u SUSP bila je široka sa $D(v, 0,1) 1,40 \pm 0,01$ μm , $D(v, 0,5) 12,97 \pm 0,58$ μm i $D(v, 0,9) 87,33 \pm 2,63$ μm .

Tri formulacije DK-I-56-1 (NS2-G, SOL i SUSP) primenjene su intraperitonealno (i.p.) i njihovi farmakokinetički profili kao i biodistribucija DK-I-56-1 su prikazani na slici 4.4.4. Generalno, nakon i.p. primene klirens lekovite supstance iz peritonealne šupljine je vođen difuzijom u okolna tkiva, nakon čega se lek prenosi kapilarnom krvlju ili limfom, metaboliše enzimima tkiva ili vezuje za protein tkiva, što rezultuje relativno brzom apsorpcijom (Claassen, 1994). Vrednosti površine ipod krive (AUC_{0-36}), koja odražava raspoloživost izračunatu na osnovu krive koncentracije u plazmi u zavisnosti od vremena, bile su različite za primenjene formulacije ($F(2,6) = 39,280$, $P < 0,001$). Nakon primene, najviše koncentracije DK-I-56-1 u plazmi postignute su nakon SOL, zatim NS2-G i SUSP, respektivno, i isti trend je primećen za AUC_{0-36} u plazmi (slika 4.4.4a). Cremophor EL i DMSO su verovatno povećali brzinu apsorpcije, omogućujući više nivoe DK-I-56-1 u plazmi nakon primene SOL (Buggins i sar., 2007).

Uzimajući u obzir visoke koncentracije pomenutih ekscipijenasa u ovoj formulaciji (molarni odnos DK-I-56-1/DMSO/Cremophor EL bio je 1/413/236), može se pretpostaviti da će oni imati uticaj i na distribuciju DK-I-56-1. Cremophor EL je široko korišćen solubilizator za brojne slaborastvorljive lekovite supstance u parenteralnim formulacijama, ali može izazvati mnoge biološke efekte, uključujući promene u dispoziciji leka (Gelderblom i sar., 2001). Poznato je da Cremophor EL, menjajući interakcije leka i proteina utiče na distribuciju paklitaksela i doksorubicina (Badary i sar., 1998; Sykes i sar., 1994).

Raspoloživost u mozgu nakon SOL nije bila veća nego nakon NS2-G i SUSP ($H(2) = 0,622$, $P = 0,733$), uprkos superiornijim nivoima u plazmi (slika 4.4.4b). U visokim koncentracijama DMSO može otvoriti krvno-moždanu barijeru, omogućujući veći prolaz leka u mozak, iako literaturni podaci nisu konzistentni po ovom pitanju (Buggins i sar., 2007). Međutim u ovom istraživanju, samo $3,12 \pm 0,38\%$ od ukupnog AUC_{0-36} (suma AUC_{0-36} u četiri ispitivana kompartmana) je dostigla mozak nakon SOL, i ovaj udeo DK-I-56-1 je bio sličan i u slučaju druge dve formulacije $3,79 \pm 1,48\%$ i $3,48 \pm 2,21\%$, za NS2-G i SUSP, respektivno), što ukazuje na odsustvo efekata DMSO na permeabilnost krvno-moždane barijere. Dodatno, prema poluvremenu eliminacije, DK-I-56-1 se zadržao u mozgu duže vremena kada je primenjen kao nanokristalna disperzija, u odnosu na rastvor.



Slika 4.4.4. Krive zavisnosti koncentracije od vremena i izračunati farmakokinetički parametri nanokristalne disperzije (NS2-G), rastvora (SOL) i suspenzije (SUSP) u (a) plazmi, (b) mozgu, (c) jetri i (d) bubregu nakon intraperitonealne primene kod miševa u dozi 10,0 mg/kg. C_{max} – maksimalna koncentracija, t_{max} – vreme postizanja maksimalne koncentracije, AUC₀₋₃₆ – površina ispod krive od t = 0 do t = 36 h, t_{1/2} – poluvreme eliminacije (srednja vrednost ± standardna greška, n = 3).

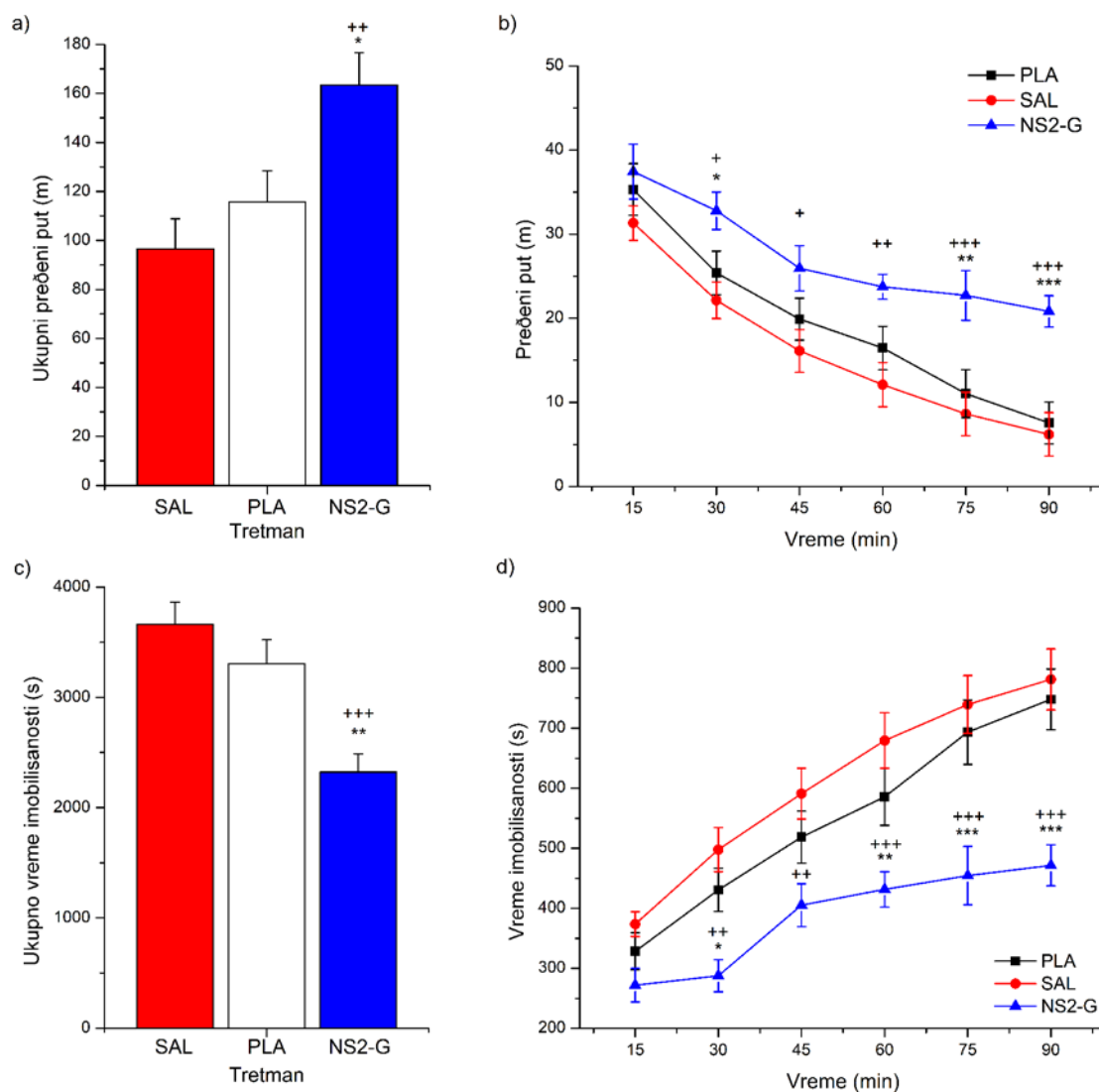
Vrednosti AUC₀₋₃₆ u jetri i bubregu nisu bili značajno različiti između primenjenih formulacija (F(2,6) = 0,332, P = 0,730 i H(2) = 0,356, P = 0,837, respektivno) i profili koncentracija nakon NS2-G i SOL su bili slični (slika 4.4.4c i d). Zapravo, viši procenat ukupnog AUC₀₋₃₆ je zaostao u plazmi nakon SOL (19,52 ± 1,11%, u poređenju sa 11,83 ± 4,75% i 1,43 ± 0,48% nakon NS2-G i SUSP, respektivno), dok su izračunate vrednosti u tkivima bile slične nakon sve tri formulacije (oko 3% u mozgu, 40% u jetri i 50% u bubregu). Ovo potvrđuje teoriju da uticaj Cremophor EL na distribuciju može biti izražen jedino u centralnom kompartmentu, odnosno krvi (Gelderblom i sar., 2001). Zanimljivo je da je ukupan AUC₀₋₃₆ u plazmi i organima nakon SOL bio značajno niži nego nakon NS2-G i SUSP (52368,97 ± 4502,09; 75459,86 ± 26699,73 i 86880,56 ± 29533,80 ng·h/ml, respektivno), ukazujući da je sastav SOL formulacije potpomogao povećanu eliminaciju iz tela. Poznati su slučajevi nefrotoksičnosti DMSO i Cremophor EL, sa nekrozom tubularnih ćelija i oligurijom (Pestel i sar., 2006; Buggins i sar., 2007), koji mogu doprineti nefziološkom postupanju DK-I-56-1 iz SOL. Iz tog razloga, jednostavna formulacija NS2-G, bez organskih rastvarača i sa niskom koncentracijom surfaktanata, može se smatrati glavnom prednošću u odnosu na SOL, izbegavanjem mogućnosti za nepravilno farmakokinetičko ponašanje i toksičnost uzrokovanu ekscipijensima.

Manja veličina čestica nanokristalne disperzije, i stoga povećanje površine dostupne za rastvaranje bio je najverovatniji razlog za bržu apsorpciju i višu sistemsku ekspoziciju DK-I-56-1 nakon nanokristalne disperzije kada se uporedi sa primenom suspenzije. Ova tvrdnja je bila podržana rezultatima *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja (slika 4.2.7). Slično, u istraživanju Sigfridsson i sar. (2013) AUC i C_{max} novih supstanci AC88 i BA99 bili su skoro dvostruko veći u životinja koje su primile nanokristalnu disperziju u poređenju sa onim koje su primile mikrosuspenziju intraperitonealnim putem. Sa druge strane, AUC₀₋₃₆ u mozgu nakon NS2-G i SUSP bili su slični ($P = 0,733$). Međutim, koncentracioni profil u mozgu nakon primene SUSP je pokazao bimodalnu distribuciju veličina, sa padom koncentracije nakon 1 h od primene (slika 4.4.4b), i isto ponašanje ove formulacije može se primetiti u jetri i bubregu (slika 4.4.4 c i d). Objašnjenje za ovu pojavu može se naći u formiranju depoa DK-I-56-1 na mestu primene usled malih količina tečnosti dostupnih za rastvaranje, što dovodi do nepravilne apsorpcije i distribucije, kao što je primećeno u slučajevima intramuskularnih i subkutanih injekcija (Zuidema i sar., 1994). Zbog ovakvog farmakokinetičkog profila, uprkos visokim AUC u tkivima, koncentracija DK-I-56-1 u mozgu nakon primene suspenzije bila je niža nego nakon druga dva tretmana u većini vremenskih tačaka, što može ugroziti efikasnost. Osnovna prednost NS2-G u odnosu na SUSP bi stoga bila mala veličina čestica i uža distribucija veličina, vodeći ka pouzdanijoj bioraspoloživosti i pravilnijoj farmakokinetici, što je značajno u prekliničkim studijama kandidata za lek sa slabom rastvorljivošću.

4.4.5. Farmakodinamska studija sa nanokristalnom disperzijom DK-I-56-1

Studije motornih aktivnosti mogu objasniti efekte primenjenih lekovitih supstanci na ponašanje eksperimentalnih životinja i predstavljaju jedan od fundamentalnih pristupa tokom ispitivanja psihofarmakoloških lekovitih supstanci (Savić i sar., 2006). Test spontane lokomotorne aktivnosti (engl. *spontaneous locomotor activity*, SLA) je jedan od bihevioralnih testova korišćenih za ispitivanje aktivnosti lekovitih supstanci na GABA_A receptore (Savić i sar., 2010; Savić i sar., 2008). Pojam spontane lokomotorne aktivnosti odnosi se na grupu neuslovljenih testova u kojima se prate parametri kretanja. Na osnovu uticaja na lokomotornu aktivnost u glodara, mnoge psihotropne supstance se definišu kao stimulansi ili depresori (Geyer, 1990). Hiperlokomocija nakon primene DK-I-56-1 na pacovima već je pokazana u radu Knutson i sar. (2018). Specifični mehanizam ovakvog ponašanja nije još u potpunosti objašnjen, što zahteva dalja nastojanja da se identifikuje osnovni biološki supstrat. Međutim, nanoemulzija koja je korišćena kao nosač DK-I-56-1 u pomenutom radu takođe je imala blagu bihevioralnu aktivnost, moguće zbog kompleksnog sastava i korišćenja DMSO i benzilalkohola, što je komplikovalo tumačenje rezultata. Stoga, SLA analiza je sprovedena kako bi se procenilo korišćenje nanokristalne disperzije u farmakodinamskoj karakterizaciji DK-I-56-1, posebno u smislu potencijalnog uticaja nosača na dobijene rezultate.

Rezultati su prikazani na slici 4.4.5. Statistička analiza pokazala je značajan uticaj NS2-G tretmana na ukupni pređeni put tokom 90 min praćenja ($F(2,29) = 7,126$, $P = 0,003$). Kao što je prikazano na slici 4.4.5a, hiperlokomotoni efekat DK-I-56-1 u NS2-G bio je značajan u poređenju sa placebo (PLA), kao i u odnosu na kontrolu (fiziološki rastvor, SAL), dok značajne razlike nisu pronađene između placeba i fiziološkog rastvora ($P = 0,289$). Ovi nalazi dokazali su da je primećena hiperlokomocija bila posledica samo aktivnosti DK-I-56-1, bez doprinosa korišćenog vehikuluma. Kombinovani elektrofiziološki i farmakokinetički rezultati prikazani u Knutson i sar. (2018) sugerišu da slobodna (nevezana) koncentracija DK-I-56-1 u mozgu u rangu bliskom 100 nM je dovoljno visoka da poseduje farmakološke efekte. Stoga, sproveden SLA test potvrdio je rezultate farmakokinetičke studije u isporuci efektivnih koncentracija DK-I-56-1 u mozak nakon intraperitonealne primene nanokristalne formulacije.



Slika 4.4.5. Efekti nanokristalne disperzije (NS2-G) na (a) ukupni pređeni put, (b) pređeni put, (c) ukupno vreme imobilisanosti i (d) vreme imobilisanosti kod miševa nakon intraperitonealne primene u dozi 10 mg/kg. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. Post hoc značajne razlike su označene kao: *, ** i ***, $P < 0,05$; $P < 0,01$ i $P < 0,001$ vs. PLA; +, ++ i ***, $P < 0,05$; $P < 0,01$ and $P < 0,001$ vs. SAL, respektivno. SAL – fiziološki rastvor, PLA – placebo.

Rezultati su takođe pokazali da je hiperlokomotorni efekat DK-I-56-1 bio više izražen tokom poslednjih 45 min eksperimenta ($F(2,145) = 7,126$, $P = 0,003$; $F(5,145) = 92,474$, $P < 0,001$, vs. PLA i SAL, respektivno) (slika 4.4.5b), što sugerise da nije pretežno zasnovan na uticajima na navikavanje/stresnu reakciju na novost. Kada su životinje izložene novom okruženju, one pokazuju radoznalost i strah, što deluje kao istraživački pogon. Međutim, nakon navikavanja, ovaj istraživački pogon se smanjuje i emitovano ponašanje može pre da odražava opštu, spontanu lokomotornu aktivnost (Savić i sar., 2006). Ovo je bilo posebno očigledno za ukupno vreme imobilisanosti (slika 4.4.5c), parametar prepoznat kao robusniji u odnosu na ukupni pređeni put. Ovaj parametar je od specifičnog interesa kada životinja prestane sa promenom lokacije, ali nastavlja sa pomeranjima delova tela (na primer pomeranje glave). Uticaj tretmana na ukupno vreme imobilisanosti je bilo slično kao na ukupni pređeni put ($F(2,29) = 11,887$, $P < 0,001$), i razlike između NS2-G i druga dva tretmana bile su više izražene u drugoj polovini eksperimenta ($F(2,145) = 11,885$, $P < 0,001$; $F(5,145) = 74,265$, $P < 0,001$; $F(10,145) = 2,938$, $P = 0,002$, vs. PLA, SAL i interakcija vreme x tretman, respektivno; slika 4.4.5d). Stoga, očuvanje

hiperlokomocije, koja je primećena nakon navikavanja životinja koje su primile NS2-G predstavljalo je jasan dokaz samostalne aktivnosti DK-I-56-1.

5. ZAKLJUČAK

5.1. Zaključak prve faze eksperimentalnog rada

Prva faza istraživanja bila je posvećena preformulacionim ispitivanjima DK-I-60-3 i DK-I-56-1. Obe supstance se nalaze u formi žutog kristalnog praška, neujednačene veličine čestica. Pod mikroskopom uočeni su igličasti kristali različite veličine koji veoma lako formiraju agregate, prašak je kohezivan. Metodom difrakcije X-zraka je potvrđena kristalna struktura sa dominantnim signalima pri nižim 2θ , dok su na 2θ većim od 10° difrakcione linije bile značajno nižeg intenziteta. Kako nisu dostupni podaci o parametrima kristalne rešetke supstanci, dobijeni difraktogrami su služili za praćenje kristalne strukture supstanci u ostalim ispitivanjima.

Studije rastvorljivosti su pokazale da su obe supstance sličnih osobina, prašak supstanci je bio veoma hidrofoban, a dobijene vrednosti rastvorljivosti pokazale su da su DK-I-56-1 i DK-I-60-3 praktično nerastvorljive u vodi (rastvorljivost oko $6 \mu\text{g/ml}$). Usled odsustva lako jonizujućih grupa u strukturi supstanci, njihova rastvorljivost se nije značajno menjala pri promeni pH vrednosti u fiziološki prihvatljivom opsegu, te je isključena mogućnost promene osobina u različitim delovima tela (npr. različiti delovi gastrointestinalnog trakta). Pored slabe rastvorljivosti u vodi, rastvorljivost je bila niska i u uljima, što je isključilo formulaciju lipidnih nosača kao što su emulzije. Rastvorljivost u organskim rastvaračima je bila oko 1 mg/ml , osim u dimetil-sulfoksidu. Iako se mogu formulirati preparati sa ovim rastvaračem, njegova koncentracija mora biti ograničena na maksimalno 20%, što otežava formulaciju biokompatibilnog rastvora.

Termalna analiza pokazala je visoku temperaturu topljenja (316°C), karakterističnu za kristalne supstance sa visokom energijom kristalne rešetke. Supstance su bile stabilne pri zagrevanju, isključujući polimorfne prelaze, i degradaciju. Brzim hlađenjem rastopa supstance su gotovo u potpunosti kristalisale, mada se ne isključuje mogućnost formiranja strukture manjeg stepena uređenosti od supstance *in bulk*. Visoka temperatura topljenja u kombinaciji sa nemogućnošću dobijanja stabilnog amornog oblika isključili su formulaciju amornih sistema kao što su čvrste disperzije. Na osnovu svih ispitivanja kao formulacioni pristup za prevazilaženje niske rastvorljivosti izabrane su nanokristalne formulacije.

Iako supstanca nije idealan kandidat za klasične lipidne formulacije kao što su emulzioni sistemi, zbog niske rastvorljivosti u uljima, u poslednjem delu prve faze istraživanja sprovedena je procena mogućnosti formulacije lipidnih sistema sa čvrstim lipidima. Kako se povećanje rastvorljivosti u lipidnom matriksu prvenstveno postiže dodatkom ulja, analiza ovakvih lipidnih smeša bila je prvi korak. Rastvorljivost DK-I-60-3 bila je suviše niska uprkos korišćenju visokih koncentracija ulja u smeši, što je praktično onemogućilo formulaciju nanostrukturiranih lipidnih nosača sa odgovarajućom koncentracijom DK-I-60-3 u finalnoj formulaciji relevantnoj za farmakološka istraživanja. Dodatak 30% lecitina u čvrst lipid, sa druge strane je omogućio solubilizaciju DK-I-60-3 i dobijanje homogenih lipidnih matriksa koji se mogu koristiti u formulaciji lipidnih nanočestica. Lecitin je sa čvrstim lipidom formirao strukture koje omogućuju uključivanje lekovite supstance u maksimalnoj koncentraciji 1%. Ovakav lipidni matriks je korišćen u izradi lipidnih nanočestica DK-I-60-3, namenjenih za oralnu primenu.

Preformulaciona istraživanja u prvoj fazi istraživanja pokazala su generalno slabu rastvorljivost ispitivanih supstanci, DK-I-56-1 i DK-I-60-3, u vodi i najčešće korišćenim korastvaračima, kao i kristalnu strukturu praška supstanci sa visokom temperaturom topljenja. Na osnovu dobijenih rezultata, kao jedan od rešenja za prevazilaženje niske rastvorljivosti izabrane su nanokristalne disperzije. Pored toga, ispitivanje lipidnih smeša sa visokom koncentracijom lecitina pokazalo je mogućnost formulacije lipidnih nanočestica sa DK-I-60-3, namenjenih za oralnu primenu.

5.2. Zaključak druge faze eksperimentalnog rada

Druga faza istraživanja obuhvatala je razvoj i fizičko-hemijsku karakterizaciju nanokristalnih disperzija ispitivanih liganada, DK-I-56-1 i DK-I-60-3, u koncentraciji 2 mg/ml. Najpre je sprovedena formulaciona studija u kojoj su odabrani formulacioni i procesni parametri koji obezbeđuju pripremu disperzija male i ujednačene veličine čestica. Razvoj nanokristalnih disperzija DK-I-60-3 bio je usmeren ka dobijanju oralnih formulacija, pa su kao stabilizatori korišćeni natrijum-laurilsulfat (SLS) i polivinilpirolidon (PVP) u različitim kombinacijama, a kao formulacioni parametri varirani su trajanje usitnjavanja i zapremina kuglica cirkonijum-oksida. Ovi parametri su analizirani simultano, pošto su međusobno zavisili jedni od drugih. Analiza veličine čestica i sveobuhvatna statistička analiza pokazala je da produženje trajanja usitnjavanja na sat vremena dovodi do smanjenja veličine čestica i distribucije veličine. Količina kuglica imala je različit uticaj na veličinu čestica u zavisnosti od formulacije, generalno sa povećanjem zapremine kuglica dolazilo je do smanjenja veličine čestica usled veće mogućnosti za kontakt čestice supstance sa kuglicom. Međutim, kako razlike u veličini nisu bile izražene kada je zapremina kuglica sa 40% povećana na 60%, za dalji razvoj odabrana je zapremina od 40%. Pri izboru koncentracije stabilizatora, utvrđeno je da ispitivane koncentracije natrijum-laurilsulfata i polivinilpirolidona ne utiču značajno na rastvorljivost DK-I-60-3, što predstavlja jedan od preduslova za uspešnu stabilizaciju. Povećanje koncentracije SLS je dovelo do smanjene veličine čestica, što je ukazalo na povećanje pokrivenosti površina nanokristala ovim stabilizatorom. Ova tvrdnja je potvrđena i merenjem zeta potencijala, apsolutne vrednosti ovog parametara su rasle sa povećanjem koncentracije SLS i odnosa SLS i PVP. Dobijene odabrane formulacije imale su prosečnu veličinu čestica < 220 nm, indeks polidisperznosti $< 0,250$ i apsolutnu vrednost zeta potencijala > 30 mV sa izuzetkom jedne formulacije sa najnižim odnosom SLS: PVP (F5). Stabilnost odabranih formulacija F5-F8 (odnos SLS: PVP 1:10, 1:4, 1:2 i 1:1, za F5, F6, F7 i F8, respektivno, odnos DK-I-60-3: SLS 1:4) potvrđena je nakon jednog i tri meseca čuvanja na 25 °C. Kao najstabilnija formulacija pokazala se F5 sa najvišom koncentracijom PVP što je ukazalo na značaj dodatka polimernog stabilizatora.

Formulacije nanokristalnih disperzija DK-I-56-1 razvijene su za parenteralnu primenu. S obzirom na strože zahteve u pogledu veličine čestica parenteralnih formulacija, prilikom izbora procesnih parametara ispitano je produženje trajanja usitnjavanja na dva sata, uz variranje zapremine kuglica. Analiza veličine čestica pokazala je da produženje vremena usitnjavanja zapravo dovodi do povećanja veličine čestica i distribucije veličine, dok povećanje zapremine kuglica na 60% dovodi do značajnog smanjenja ovih parametara. Stoga je vreme usitnjavanja zadržano na sat vremena, ali je količina kuglica povećana na 60% zapremine tube u kojoj se vrši usitnjavanje. Kao stabilizatori korišćeni su polisorbata 80 samostalno ili u kombinaciji sa poloksamerom 407, poloksamerom 188 i D- α -tokoferol polietilenglikol 1000 sukcinatom. Kako se i očekivalo, sa povećanjem koncentracije polisorbata 80, došlo je do smanjenja veličine čestica. Međutim, formulacije sa najnižom i najvišom koncentracijom ovog stabilizatora su bile nestabilne već jedan dan nakon izrade. Druga strategija za povećanje stabilnosti bilo je kombinovanje drugih pomenutih stabilizatora sa polisorbatom 80 i dobijene su formulacije zadovoljavajuće stabilnosti. Zaključeno je da ukupna koncentracija stabilizatora treba da odgovara polovini koncentracije DK-I-56-1, a odnos polisorbata 80 i drugog stabilizatora 1:1. Ove formulacije su imale veličinu čestica < 250 nm i indeks polidisperznosti $< 0,250$, a zeta potencijal bio je oko -20 mV. Nanometarska veličina čestica potvrđena je metodom laserske difrakcije, a formulacije su se pokazale stabilnim tokom tri nedelje čuvanja na 25 °C.

Kako bi se procenila morfologija čestica nanokristala korišćena je mikroskopija atomskih sila. Na mikrografijama su se izdvojile izdužene pljosnate čestice nanometarskih veličina koje odgovaraju veličini dobijenoj drugim tehnikama merenja veličine (dinamičko rasipanje svetlosti i laserska difrakcija). Analiza čvrstog stanja bila je otežana oskudnim podacima o kristalnoj strukturi DK-I-56-1 i DK-I-60-3 dostupnim u literaturi. Termalna analiza diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom pokazala je zadržavanje kristalne strukture sa diskretno nižom tačkom topljenja (za

oko 2 °C) koja je posledica smanjene veličine čestica. Dodatno, difrakcija X-zraka na uzorku praška je pokazala značajno smanjenje intenziteta difrakcionih linija karakteristično za nanokristalne faze. Obe supstance su ostale u kristalnom obliku, mada se ne isključuje mogućnost promene parametara jedinične ćelije usled usitnjavanja.

Prema definiciji, nanonizacijom supstanci povećava se brzina rastvaranja i rastvorljivost. Kako bi se uspešno odvojila rastvorena supstanca od nanokristalnih čestica, ispitivanje brzine rastvaranja je sprovedeno metodom sa dijaliznim vrećicama. Pokazano je povećanje brzine rastvaranja u odnosu na grubu disperziju i čistu supstancu, ali i mogući metodološki problem uticaja dijaliznih vrećica na eksperiment. Značajan nalaz jeste postizanje platoa brzine rastvaranja suspenzija, dok je kinetika rastvaranja nanokristalnih disperzija ostala nepromenjena. Tokom ispitivanja brzine rastvaranja nanokristala DK-I-56-1, pokazano je povećanje brzine u poređenju sa čistim DK-I-56-1, dok su razlike između nanokristalne i grube disperzije bile diskretnije i zavisile su od ispitivanih formulacija. S obzirom da postoji mogućnost ispoljavanja nestabilnosti nakon primene, sprovedeno je ispitivanje stabilnosti formulacije DK-I-60-3 u fosfatnom puferu (pH 6,8). Ispitivane su tri formulacije od kojih je formulacija F5, sa najvišom koncentracijom PVP pokazala najbolju stabilnost. Analizom rastvorljivosti formulacija DK-I-60-3 u vodi, 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini (pH 1,2) i fosfatnom puferu (pH 6,8), utvrđena je zavisnost od pH vrednosti i jonske jačine. Kako sama supstanca nema pH-zavisnu rastvorljivost, a ni grube suspenzije (istog sastava kao nanosuspenzije), objašnjenje za dobijene rezultate nalazi se u agregaciji čestica tokom ispitivanja. To je bilo posebno izraženo prilikom ispitivanja rastvorljivosti u 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini (pH 1,2) gde su se i vizuelno mogle uočiti rastresite flokule čestica. Najviša rastvorljivost u vodi i fosfatnom puferu postignuta je kod formulacije F5, što je u skladu sa rezultatima ispitivanja stabilnosti u ovom medijumu. Prilikom ispitivanja rastvorljivosti nanokristala DK-I-56-1 velika pažnja posvećena je diferenciranju povećanja rastvorljivosti usled micelarne solubilizacije od povećanja rastvorljivosti usled usitnjavanja. Iz tog razloga je rastvorljivost ispitana i u rastvorima stabilizatora. Rastvorljivost DK-I-56-1 u rastvorima stabilizatora je bila povećana kada su oni korišćeni u koncentraciji iznad kritične micelarne koncentracije, međutim očigledan je bio doprinos i usitnjavanja veličine čestica pa su dobijene vrednosti veće najmanje 10 puta u odnosu na neobrađenu supstancu. Pošto su ove formulacije namenjene za parenteralnu primenu, sprovedeno je ispitivanje stabilnosti nanokristala DK-I-56-1 u fosfatnom puferu i u prisustvu goveđeg serum albumina. Ispitivane su dve formulacije – NS2 stabilizovana samo polisorbatom 80 i NS4 stabilizovana kombinacijom polisorbata 80 i poloksamera 407. Iako su formulacione razlike bile suptilne, one su se značajno odrazile na ponašanje nanokristala u prisustvu proteina, te je prva formulacija stupala u interakcije, dok kod druge do adsorpcije albumina nije došlo.

U cilju povećanja stabilnosti, razmotrena je liofilizacija nanokristalnih disperzija. Prevođenje nanokristalne disperzije u čvrst oblik liofilizacijom je sprovedeno na primeru formulacije NS4 (nanokristalna disperzija DK-I-56-1 stabilizovana polisorbatom 80 i poloksamerom 407). Inicijalno je sproveden skrining koncentracije lioprotektanata i sredstva za dopunjavanje, uzimajući u obzir veličinu čestica i indeks polidisperznosti nakon liofilizacije kao i indeks redisperzibilnosti i izgled kolača. Odabrane su tri formulacije sa ukupnom koncentracijom ekscipijenasa 10%: saharoza, saharoza i manitol 1:1 i saharoza i manitol 3:2. Ove formulacije su imale zadržanu veličinu čestica, indeks polidisperznosti < 0,200 i visok stepen redisperzibilnosti (oko 95%). Kao procesni parametri definisani su temperatura smrzavanja i temperatura primarnog sušenja, na osnovu određivanja temperature staklastog prelaza maksimalno krio-koncentrovanog rastvora (T_g'). S obzirom da su nanokristali u formulaciji prisutni kao nerastvorene čestice, njihovo prisustvo nije uticalo na vrednost ovog parametra. Za uspešnu stabilizaciju krioprotektantima, smrzavanje treba biti sprovedeno na temperaturi ispod T_g' , što je i dokazano ispitivanjem stabilnosti u studiji smrzavanja-odmrzavanja. Sve tri formulacije su bile stabilne u ovoj studiji, sa indeksom redisperzibilnosti nakon spontanog odmrzavanja od oko 95%. Primarno sušenje može biti sprovedeno na temperaturi iznad i ispod T_g' , posebno kada se pored lioprotektanta nalazi i kristalno

sredstvo za dopunjavanje kao što je manitol. Stoga su nanokristalne disperzije sušene primenom dva alternativna procesa – liofilizacija-1 sa primarnim sušenjem na -10 °C i liofilizacija-2 sa primarnim sušenjem na -45 °C. U oba procesa temperatura smrzavanja je bila ispod Tg'.

Stabilnost liofilizata dobijenih liofilizacijom-1 je procenjena nakon jednog meseca čuvanja na 25 °C, gde je primećen značajan porast veličine čestica i smanjenje indeksa redisperzibilnosti na 30-50%, a agregati veličine veće od 1 µm su bili detektovani laserskom difrakcijom. Sa druge strane, liofilizati dobijeni liofilizacijom-2 su praćeni tokom tri meseca čuvanja na 2-8 °C. U ovom procesu liofilizacije pored formulacija sa saharozom kao lioprotektantom korišćena je i trehaloza. U svim uzorcima je došlo do promene veličine čestica tokom liofilizacije, dok je ta promena bila najmanje izražena kod odnosa saharoza ili trehaloza: manitol 3:2. Zanimljivo je da kada je kao lioprotektant korišćena trehaloza, veličina čestica se inicijalno značajno povećala ali je zatim ostala konstantna tokom celokupnog perioda praćenja. Tokom čuvanja je došlo do kolapsa kolača sa saharozom kao jedinim stabilizatorom što je potvrdilo značaj dodatka manitola. Nanometarske veličine u ostalim uzorcima su bile potvrđene laserskom difrakcijom. Stoga, liofilizacijom je postignuto produženje stabilnosti oko tri puta u odnosu na tečne disperzije.

Analiza čvrstog stanja je ukazala na značajne razlike u uzorcima kada se posmatra stepen kristaličnosti ekscipijenas. Dok su liofilizacijom-1 dobijeni pretežno kristalni liofilizati, liofilizacijom-2 se u određenim uzorcima nalazio delimično ili potpuno amorfan materijal. Manitol je u ovim uzorcima bio niskog stepena kristaliniteta, posebno u kombinaciji sa trehalozom. Međutim, nije došlo do promene morfologije ovih uzoraka tokom posmatranog perioda čuvanja. Na mikrografijama dobijenim skenirajućom elektronskom mikroskopijom i polarizacionom mikroskopijom mogli su se videti agregati nanokristala kao i pojedinačne čestice. Homogeniji uzorci dobijeni su kada je kao lioprotektant korišćena trehaloza, i na mikrografijama su se mogli uočiti pojedinačni nanokristali uronjeni u matriks stabilizatora. Međutim, stepen interakcija analiziranih infracrvenom spektroskopijom sa Furijevom transformacijom bio je veći kada je korišćena saharoza, kada se uzmu u obzir vodonične veze koje se formiraju između disaharida i stabilizatora nanokristala. Time se objašnjavaju rezultati merenja veličine čestica odmah nakon liofilizacije. Sa druge strane, zahvaljujući smanjenom afinitetu prema vodi, specifična konformacija trehaloze omogućila je dobru stabilnost tokom čuvanja, sa gotovo nepromenjenom veličinom čestica.

Sumirano, u drugoj fazi eksperimentalnog rada pokazano je uspešno formulisanje nanokristalnih disperzija DK-I-60-3 i DK-I-56-1 namenjenih za oralnu i parenteralnu primenu, respektivno. Dobijene formulacije imale su submikronsku uniformnu veličinu čestica, i obezbedile su povećanu brzinu rastvaranja i rastvorljivost ispitivanih supstanci, zadržavajući njihova kristalna svojstva. Liofilizacijom nanokristalnih disperzija DK-I-56-1, uz odabir odgovarajuće koncentracije saharoze/trehaloze i manitola, kao i parametara procesa značajno je povećana stabilnost tokom čuvanja. U ovoj fazi su odabrane formulacije za analizu farmakokinetičkih svojstava supstanci u četvrtoj fazi eksperimentalnog rada.

5.3. Zaključak treće faze eksperimentalnog rada

U trećoj fazi istraživanja razvijene su lipidne nanočestice DK-I-60-3, koristeći lipidni matriks određen u prvoj fazi istraživanja i izvršena je njihova fizičko-hemijska karakterizacija. Razvijene su formulacije sa 10% i 15% lipidne faze, stabilizovane polisorbitom 80, sa koncentracijom DK-I-60-3 1,0 mg/ml i 1,5 mg/ml, respektivno. Inicijalno, u eksperimentima sa placebo formulacijama određeni su procesni parametri homogenizacije pod visokim pritiskom – 20 ciklusa i pritisak 750 bar. Veličina čestica formulacija bila je manja od 100 nm, a indeks polidisperznosti < 0,300, tako da su dobijene formulacije bile u određenom stepenu transparentne. Fizičko-hemijska karakterizacija obuhvatala je i određivanje zeta potencijala (od -34 do -50 mV), pH vrednosti (od 4,2 do 5,5) i električne provodljivosti (od 145 do 200 µS/cm) nakon jednog dana i 30 dana od izrade. Posmatrane

formulacije su se smatrale stabilnim tokom navedenog perioda čuvanja u frižideru (2-8 °C). Kao dodatni parametar koji definiše stabilnost formulacija određena je efikasnost inkapsulacije, a dobijene vrednosti veće od 99% ukazale su na prevashodnu lokalizaciju DK-I-60-3 u lipidnom matriksu nanočestica. Međutim, tokom čuvanja je primećena sedimentacija dela supstance na dnu bočice koja je ukazala na određeni vid nestabilnosti koji nije mogao biti uočen praćenjem fizičko-hemijskih karakteristika. Stoga je koncentracija DK-I-60-3 u formulacijama smanjena za 20%, a dobijene disperzije su imale iste karakteristike kao inicijalno razvijene formulacije, dok do sedimentacije tokom čuvanja nije došlo. Stabilnost formulacija je praćena i u odabranim puferima, relevantnim za predloženi oralni put primene. Čestice sa 10% masne faze su bile stabilnije, posebno u 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini (pH 1,2) i acetatnom puferu (pH 4,0), dok je do povećanja veličine čestica u fosfatnom puferu (pH 6,8) došlo nakon četiri sata inkubiranja. Dobra stabilnost u ovim uslovima je posledica pre svega sterne stabilizacije koja potiče od polisorbata 80, s obzirom da je elektrostatičko odbijanje bilo minimalno, prema izmerenim nultim vrednostima zeta potencijala.

S obzirom na kompleksan sastav i strukturu lipidnog matriksa, velika pažnja posvećena je ispitivanju morfologije i strukture dobijenih nanočestica. Na mikrografijama dobijenim mikroskopijom atomskih sila, uočene su pojedinačne čestice malih veličina uronjene u okruženje, sa omotačem debljine oko 2 nm koji verovatno potiče od stabilizatora. Termalnom analizom je potvrđeno kristalno stanje lipidnog matriksa sa temperaturom topljenja iznad 40 °C, dok je poređenjem placebo formulacija sa onim koje sadrže DK-I-60-3 utvrđen pozitivan uticaj liganda na kristalizaciju lipida. Strukturna analiza nuklearnom magnetnom rezonancom dala je značajna saznanja o strukturi nanočestica. Na osnovu rezultata predložena je slojevita struktura nanočestica sa lipidnim jezgrom sastavljenim od triglicerida čvrstog lipida i ovojnicom u kojoj se primarno nalaze fosfolipidi lecitina i uklopljen ligand DK-I-60-3. Ovaj omotač je delimično fluidan, i verovatno se sastoji od više lamelarnih slojeva, kako je i primećeno na mikrografijama, i obezbeđuje elektrostatičku stabilizaciju nanočestica. Polisorbat 80 je bio hidrofobnim delom molekula uronjen u lipidni matriks dok je hidrofilna glava mobilna u vodenoj fazi što značajno doprinosi stabilnosti sistema.

Ukratko, u trećoj fazi eksperimentalnog rada pokazan je uspešan razvoj lipidnih nanočestica DK-I-60-3 sastavljenih od matriksa sastavljenog od čvrstog lipida sa visokom koncentracijom lecitina. Dobijene nanočestice imale su nanometarsku veličinu, zadovoljavajuću jednomesečnu stabilnost i visoku efikasnost inkapsulacije. Strukturna analiza pokazala je slojevitu strukturu nanočestica sa lecitinskim omotačem obogaćenim supstancom DK-I-60-3. Razvijena formulacija je namenjena za oralnu primenu, pa će uticaj stepena dispergovanja supstance, njene lokalizacije i sastava preparata na apsorpciju biti ispitan u narednoj fazi eksperimentalnog rada.

5.4. Zaključak četvrte faze eksperimentalnog rada

U četvrtoj fazi sprovedene su *in vivo* farmakološke studije na eksperimentalnim životinjama. U prvom eksperimentu je sprovedena neurofarmakokinetička studija na pacovima pri čemu je upoređivana nanokristalna disperzija DK-I-60-3 (F5) sa odgovarajućom grubom disperzijom nakon oralne primene, u stanju sitosti i stanju gladi. Koncentracija DK-I-60-3 je praćena u krvi (plazmi), mozgu kao ciljnom organu, i jetri i bubregu kao glavnim ekskretornim organima. Rezultati su pokazali manje interindividualne varijacije u odnosu na stanje sitosti ili gladi nakon primene nanokristalne formulacije. Dodatno pokazan je pozitivan uticaj usitnjavanja liganda na bioraspoloživost, pa su dobijene dva do tri puta veće vrednosti maksimalne koncentracije i površine ispod krive u plazmi i mozgu. S obzirom da su poređene formulacije imale isti kvalitativni i kvantitativni sastav, dobijeni rezultati su isključivo posledica povećanja apsorpcije usled smanjene veličine čestica. Duže zadržavanje DK-I-60-3 u mozgu i jetri je ukazalo na moguće formiranje depoa u ovim organima. Slični profili koncentracije dobijeni su za obe formulacije (nanokristalna disperzija i suspenzija), ukazujući na sličnu distribuciju DK-I-60-3 koja je bila vođena osobinama liganda, pre nego formulacionim aspektima.

Kako bi se procenio doprinos druge vrste nanočestične formulacije apsorpciji DK-I-60-3, sprovedena je neurofarmakokinetička studija u kojoj su upoređene nanokristalna disperzija i disperzija lipidnih nanočestica. Lipidne nanočestice su povećale stepen apsorpcije u odnosu na nanokristale, prema rezultatima maksimalne koncentracije u plazmi i površine ispod krive, a ovo povećanje je bilo praćeno povećanjem koncentracija u mozgu u istom obimu. Iako tačan mehanizam povećanja obima apsorpcije nije razjašnjen, verovatno je značajnu ulogu imao sam sastav lipidnih nanočestica, sa lipidima i stabilizatorima (lecitin i polisorbitat 80) koji na različite načine povećavaju apsorpciju lekovitih supstanci. S obzirom da je koncentracija DK-I-60-3 u mozgu povećana u istom obimu kao u plazmi, nanočestice verovatno nisu apsorbirane kao intaktne čestice, već je došlo do njihove degradacije. Međutim, ponovo kao u prethodnom eksperimentu, došlo je do produženog zadržavanja u mozgu DK-I-60-3, što može uticati na režim doziranja potencijalnih lekova koji bi sadržali ispitivane sisteme.

Kako bi se bolje procenio uticaj razvijenih sistema na povećanje biorasploživosti, sprovedena je studija biološke rasploživosti pri čemu je apsolutna biorasploživost nanokristala i lipidnih nanočestica procenjena u odnosu na intravenski rastvor. Sistemska izloženost je bila značajno veća nakon primene rastvora u odnosu na oralno primenjene nanoformulacije. Apsolutna biorasploživost nanokristala bila je $24,46 \pm 7,81\%$ dok je nakon lipidnih nanočestica bila oko 1,4 puta veća ($34,71 \pm 12,43\%$). Iako nije postignuta statistička značajnost ove razlike, verovatno zbog interindividualnih razlika, ova studija je opravdala razvoj lipidnih nanočestica kao složenijih formulacija za povećanje biološke rasploživosti DK-I-60-3 nakon oralne primene.

Neurofarmakokinetička studija na miševima nakon intraperitonealne primene nanokristala DK-I-56-1 u odnosu na rastvor i uobičajeno korišćenu grubu disperziju pokazala je značaj jednostavne formulacije razvijenog preparata. Dok je smanjenje veličine čestica dovelo do povećanja biorasploživosti u krvi i mozgu u odnosu na suspenziju, odsustvo organskih rastvarača i visokih koncentracija surfaktanata je bilo ključno za povećanje biokompatibilnosti formulacije i smanjenja negativnih uticaja ekscipijenasa na farmakokinetiku DK-I-56-1. Koncentracija DK-I-56-1 u mozgu nakon nanokristalne formulacije bila je komparabilna sa rezultatima nakon primene rastvora koji je, zbog niske rastvorljivosti DK-I-56-1 imao visoku koncentraciju dimetil sulfoksida i Cremphor EL. Sa druge strane, nakon primene suspenzije dobijen je bimodalni profil koncentracije u mozgu, što upućuje na nepouzdanost ove formulacije u prekliničkom ispitivanju DK-I-56-1. Stoga je nanokristalna disperzija DK-I-56-1 prepoznata kao omogućujuća formulacija za farmakokinetička preklinička ispitivanja ovog liganda.

Kompatibilnost razvijene formulacije nanokristala DK-I-56-1 u sklopu farmakodinamskih ispitivanja pokazana je testom spontane lokomotorne aktivnosti. Hiperlokomocija, koja je primećena u miševa koji su tretirani nanokristalnom disperzijom u odnosu na placebo i fiziološki rastvor, jasno je ukazala na samostalno delovanje liganda, bez uticaja komponenata formulacije (ekscipijenasa) na rezultate. S obzirom da su razlike između tretmana u pređenom putu i vremenu imobilnosti bile više izražene u drugom delu eksperimenta, kada prestaje istraživački pogon životinja, dobijeni rezultati ukazuju da je održanje hiperlokomocije bilo posledica aktivnosti DK-I-56-1, bez negativnih uticaja ekscipijenasa primećenih prilikom korišćenja nanoemulzija. Na taj način potvrđena je hipoteza korišćenja nanokristalnih disperzija u farmakodinamskom profilisanju ispitivane supstance.

Posmatrano zajedno, rezultati farmakokinetičkih studija pokazali su osnovne prednosti nanočestičnih sistema u odnosu na konvencionalne formulacije – povećanje biološke rasploživosti i posledično povećanje koncentracija u mozgu kao ciljnom organu, uz istovremeno odsustvo negativnog uticaja ekscipijenasa na distribuciju supstanci. Farmakodinamska studija potvrdila je isporuku ispitivanih supstanci u mozak u efikasnim koncentracijama, ali i pogodnost nanokristalnih disperzija za bihejvioralna ispitivanja. Stoga, četvrta faza eksperimentalnog rada dokazala je razvoj

nanokristalnih disperzija i lipidnih nanočestica kao omogućujućih formulacija za farmakološko profilisanje ispitivanih supstanci DK-I-56-1 i DK-I-60-3.

5.5. Opšti zaključak

Rezultati doktorske disertacije prikazali su uspešan razvoj dve vrste nanočestičnih sistema namenjenih za isporuku dva novosintetisana liganda, DK-I-56-1 i DK-I-60-3: nanokristala i lipidnih nanočestica. Poznavanje fizičko-hemijskih osobina supstanci je od presudnog značaja za odabir formulacionih strategija za prevazilaženje niske rastvorljivosti, posebno kada su u fokusu novosintetisane supstance. Sa druge strane, razvoj formulacija koje bi se koristile u prekliničkim studijama treba da uzme u obzir jednostavan sastav sistema i nisku koncentraciju ekscipijenasa, kako bi se omogućilo ispitivanje osobina supstanci nakon primene. U tom smislu, dobijene formulacije su obezbedile povećanje bioraspoloživosti ali istovremeno i distribuciju liganada vođenu njihovim osobinama. Nanokristalne formulacije imaju prednost zbog niske koncentracije stabilizatora, međutim njihova stabilnost prilikom oralne primene može biti narušena, smanjujući efekte nanometarskih veličina čestica. Stoga, lipidne nanočestice mogu poslužiti kao alternativan pristup, uprkos njihovoj kompleksnijoj strukturi. Naredni korak u istraživanju razvijenih sistema bio bi razvoj nanočestica za ciljanu isporuku DK-I-56-1 i DK-I-60-3 u mozak, kao ciljni organ, kao i razvoj disperzija odgovarajuće dugoročne stabilnosti koje bi mogle biti osnov za preparate koji bi se primenjivali u kliničkoj fazi razvoja.

6. LITERATURA

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Fessi, H., 2006b. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *Eur J Pharm Biopharm* 63(2), 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.01.015>
- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H., 2006a. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev.* 58(15), 1688-1713. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>
- Agrahari, V., Burnouf, P.A., Burnouf, T., Agrahari, V., 2019. Nanoformulation properties, characterization, and behavior in complex biological matrices: Challenges and opportunities for brain-targeted drug delivery applications and enhanced translational potential. *Adv Drug Deliv Rev.* 148, 146-180. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.02.008>
- Agrawal, M., Saraf, S., Saraf, S., Dubey, S.K., Puri, A., Patel, R.J., Ravichandiran, V., Murty, U.S., Alexander, A., 2020. Recent strategies and advances in the fabrication of nano lipid carriers and their application towards brain targeting. *J Control Release.* 321, 372-415. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.02.020>
- Ahire, E., Thakkar, S., Darshanwad, M., Misra, M., 2018. Parenteral nanosuspensions: a brief review from solubility enhancement to more novel and specific applications. *Acta Pharm. Sin. B.* 8(5), 733-755. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.07.011>
- Akao, K.I., Okubo, Y., Asakawa, N., Inoue, Y., Sakurai, M., 2001. Infrared spectroscopic study on the properties of the anhydrous form II of trehalose. Implications for the functional mechanism of trehalose as a biostabilizer. *Carbohydr. Res.* 334(3), 233-241. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(01\)00182-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(01)00182-3)
- Albertsen, C.H., Kulkarni, J., Witzigmann, D., Lind, M., Petersson, K., Simonsen, J.B., 2022. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 114416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114416>
- Alhalaweh, A., Alzghoul, A., Kaialy, W., Mahlin, D. and Bergström, C.A., 2014. Computational predictions of glass-forming ability and crystallization tendency of drug molecules. *Mol Pharm.* 11(9), 3123-3132. <https://doi.org/10.1021/mp500303a>
- Ali, H., El-Sayed, K., Sylvester, P.W., Nazzal, S., 2010. Molecular interaction and localization of tocotrienol-rich fraction (TRF) within the matrices of lipid nanoparticles: evidence studies by differential scanning calorimetry (DSC) and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR). *Colloids Surf B Biointerfaces.* 77(2), 286-297. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.02.003>
- Ali, H.S., York, P., Ali, A.M., Blagden, N., 2011. Hydrocortisone nanosuspensions for ophthalmic delivery: a comparative study between microfluidic nanoprecipitation and wet milling. *J. Control. Release* 149(2), 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.10.007>
- Al-Kassas, R., Bansal, M. and Shaw, J., 2017. Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs. *J Control Release.* 260, 202-212. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.06.003>
- Allison, S.D., dC Molina, M. and Anchordoquy, T.J., 2000. Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1468(1-2), 127-138. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00251-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00251-0)
- Alsenz, J. and Kansy, M., 2007. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv Drug Deliv Rev.* 59(7), 546-567. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.007>

- Anko, M., Bjelošević, M., Planinšek, O., Trstenjak, U., Logar, M., Grabnar, P.A., Brus, B., 2019. The formation and effect of mannitol hemihydrate on the stability of monoclonal antibody in the lyophilized state. *Int. J. Pharm.* 564, 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.044>
- Aramwit, P., Kerdcharoen, T. and Qi, H., 2006. In vitro plasma compatibility study of a nanosuspension formulation. *PDA J. Pharm. Sci.* 60(4), 211-217.
- Arima, S., Ueno, S., Ogawa, A., Sato, K., 2009. Scanning microbeam small-angle X-ray diffraction study of interfacial heterogeneous crystallization of fat crystals in oil-in-water emulsion droplets. *Langmuir*, 25(17), 9777-9784. <https://doi.org/10.1021/la901115x>
- Attama, A.A., Müller-Goymann, C.C., 2007. Investigation of surface-modified solid lipid nanocontainers formulated with a heterolipid-templated homolipid. *Int J Pharm.* 334(1-2), 179-189. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.032>
- Attama, A.A., Reichl, S., Müller-Goymann, C.C., 2008. Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. *Int. J. Pharm.* 355(1-2), 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.12.007>
- Ayad, M.H. 2015. Rational formulation strategy from drug discovery profiling to human proof of concept. *Drug Deliv.* 22 (6), 877–884. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.898714>
- Badary, O.A., Al-Shabanah, O.A., Al-Gharably, N.M., Elmazar, M.M., 1998. Effect of Cremophor EL on the Pharmacokinetics, Antitumor Activity and Toxicity of Doxorubicin in Mice. *Anticancer Drugs* 9(9), 809-815. <https://doi.org/10.1097/00001813-199810000-00011>
- Baek, J.S., Cho, C.W., 2017. Surface modification of solid lipid nanoparticles for oral delivery of curcumin: Improvement of bioavailability through enhanced cellular uptake, and lymphatic uptake. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 117, 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.04.013>
- Baimanov, D., Cai, R. Chen, C., 2019. Understanding the chemical nature of nanoparticle–protein interactions. *Bioconjug. Chem.* 30(7), 1923-1937. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00348>
- Baird, J.A., Van Eerdenbrugh, B., Taylor, L.S, 2010. A classification system to assess the crystallization tendency of organic molecules from undercooled melts. *J. Pharm. Sci.* 99, 3787–3806. <https://doi.org/10.1002/jps.22197>
- Bates, S., Zografi, G., Engers, D., Morris, K., Crowley, K., Newman, A., 2006. Analysis of amorphous and nanocrystalline solids from their X-ray diffraction patterns. *Pharm. Res.* 23 (10), 2333–2349. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9086-2>
- Beirowski, J., Inghelbrecht, S., Arien, A. and Gieseler, H., 2012. Freeze-drying of nanosuspensions, part 3: investigation of factors compromising storage stability of highly concentrated drug nanosuspensions. *J. Pharm. Sci.* 101(1), 354-362. <https://doi.org/10.1002/jps.22745>
- Beirowski, J., Inghelbrecht, S., Arien, A., Gieseler, H., 2011a. Freeze-drying of nanosuspensions, 1: freezing rate versus formulation design as critical factors to preserve the original particle size distribution. *J. Pharm. Sci.* 100(5), 1958-1968. <https://doi.org/10.1002/jps.22425>
- Beirowski, J., Inghelbrecht, S., Arien, A., Gieseler, H., 2011b. Freeze drying of nanosuspensions, 2: the role of the critical formulation temperature on stability of drug nanosuspensions and its practical implication on process design. *J. Pharm. Sci.* 100(10), 4471-4481. <https://doi.org/10.1002/jps.22634>

- Benedetto Tiz, D., Bagnoli, L., Rosati, O., Marini, F., Santi, C., Sancineto, L., 2022. FDA-Approved Small Molecules in 2022: Clinical Uses and Their Synthesis. *Pharmaceutics*. 14(11), 2538. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112538>
- Bergström, C.A., Charman, W.N., Porter, C.J., 2016. Computational prediction of formulation strategies for beyond-rule-of-5 compounds. *Adv Drug Deliv Rev*. 101, pp.6-21. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.02.005>
- Bergström, C.A., Wassvik, C.M., Johansson, K., Hubatsch, I., 2007. Poorly soluble marketed drugs display solvation limited solubility. *J. Med. Chem.* 50(23), 5858-5862. <https://doi.org/10.1021/jm0706416>
- Bhalani, D.V., Nutan, B., Kumar, A., Singh Chandel, A.K., 2022. Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines*. 10(9), 2055. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092055>
- Bhattacharjee, S., 2016. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *J Control Release*. 235, 337-351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bisso, S., Leroux, J.C., 2020. Nanopharmaceuticals: a focus on their clinical translatability. *Int. J. Pharm.* 578, 119098. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119098>
- Bobo, D., Robinson, K.J., Islam, J., Thurecht, K.J. and Corrie, S.R., 2016. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm. Res.* 33(10), 2373-2387. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>
- Brizuela, A.B., Bichara, L.C., Romano, E., Yurquina, A., Locatelli, S., Brandán, S.A., 2012. A complete characterization of the vibrational spectra of sucrose. *Carbohydr. Res.* 361, pp.212-218. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.009>
- Bruni, G., Berbenni, V., Milanese, C., Girella, A., Cofrancesco, P., Bellazzi, G., Marini, A., 2009. Physico-chemical characterization of anhydrous D-mannitol. *J. Therm. Anal. Calorim* 95(3), 871-876. <https://doi.org/10.1007/s10973-008-9384-5>
- Buggins, T. R., Dickinson, P. A., Taylor, G., 2007. The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59(15), 1482-1503. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.017>
- Bunjes, H., 2011. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci* 16(5), 405-411. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.06.007>
- Bunjes, H., Koch, M.H., 2005. Saturated phospholipids promote crystallization but slow down polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *J Control Release*. 107(2), 229-243. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.06.004>
- Bunjes, H., Steiniger, F., Richter, W., 2007. Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications. *Langmuir*, 23(7), 4005-4011. <https://doi.org/10.1021/la062904p>
- Bunjes, H., Westesen, K., Koch, M.H., 1996. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *Int J Pharm.* 129(1-2), 159-173. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04286-5](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04286-5)
- Calzolari, L. EUNCL SOP PCC-021 measuring the NP stability against aggregation as a function of time and buffers with batch-mode DLS, <https://www.euncl.org/about-us/assay-cascade/PDFs/PCC/EUNCL-PCC-021.pdf?m=1468937870&> (datum pristupa: 25.01.2023.)
- Caputo, F., Clogston, J., Calzolari, L., Rösslein, M., Prina-Mello, A., 2019. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-

- NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *J Control. Release*, 299, 31-43. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.030>
- Chantaburanan, T., Teeranachaideekul, V., Chantasart, D., Jintapattanakit, A., Junyaprasert, V.B., 2017. Effect of binary solid lipid matrix of wax and triglyceride on lipid crystallinity, drug-lipid interaction and drug release of ibuprofen-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for dermal delivery. *J Colloid Interface Sci.* 504, 247-256. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.05.038>
- Chen, M.L., John, M., Lee, S.L., Tyner, K.M., 2017. Development considerations for nanocrystal drug products. *AAPS J.* 19(3), 642-651. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0064-x>
- Chidambaram, N., Burgess, D.J., 1999. A novel in vitro release method for submicron-sized dispersed systems. *AAPS PharmSciTech* 1, 32-40. <https://doi.org/10.1208/ps010311>
- Chin, W.W., Parmentier, J., Widzinski, M., Tan, E.H.; Gokhale, R., 2014. A brief literature and patent review of nanosuspensions to a final drug product. *J. Pharm. Sci.* 103(10), 2980-2999. <https://doi.org/10.1002/jps.24098>
- Chung, N.O., Lee, M.K. and Lee, J., 2012. Mechanism of freeze-drying drug nanosuspensions. *Int. J. Pharm.* 437(1-2), 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.068>
- Claassen, V., 1994. Intraperitoneal drug administration. *Neglected Factors in Pharmacology and Neuroscience Research. Techniques in the Behavioral and Neural Sciences*, 12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81871-3.50010-2>
- Corrias, F., Schlich, M., Sinico, C., Pireddu, R., Valenti, D., Fadda, A.M., Marceddu, S., Lai, F., 2017. Nile red nanosuspensions as investigative model to study the follicular targeting of drug nanocrystals. *Int. J. Pharm.* 524 (1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.042>.
- Daniel, W.A., 2003. Mechanisms of cellular distribution of psychotropic drugs. Significance for drug action and interactions. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27(1), 65-73. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(02\)00317-2](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(02)00317-2)
- Deng, J., Huang, L., Liu, F., 2010. Understanding the Structure and Stability of Paclitaxel Nanocrystals. *Int. J. Pharm.* 390(2), 242-249. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.013>
- Divović Matović, B., Knutson, D., Mitrović, J., Stevanović, V., Stanojević, B., Savić, S., Cook, J.M., Savić, M.M., 2022. Behavioural interaction of pyrazoloquinolinone positive allosteric modulators at $\alpha 6$ GABAA receptors and diazepam in rats: Anti-diazepam-induced ataxia action as a structure-dependent feature. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 131(6), 514-524. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13801>
- Dolenc, A., Kristl, J., Baumgartner, S., Planinšek, O., 2009. Advantages of celecoxib nanosuspension formulation and transformation into tablets. *Int. J. Pharm.* 376, 204-212. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.038>
- Dong, Z., Mao, J., Yang, M., Wang, D., Bo, S., Ji, X., 2011. Phase behavior of poly (sulfobetaine methacrylate)-grafted silica nanoparticles and their stability in protein solutions. *Langmuir* 27(24), 15282-15291. <https://doi.org/10.1021/la2038558>
- Fan, P.C., Lai, T.H., Hor, C.C., Lee, M.T., Huang, P., Sieghart W., Ernst, M., Knutson, D.E., Cook, J., Chiou, L.C., 2018. The $\alpha 6$ subunit-containing GABA A receptor: A novel drug target for inhibition of trigeminal activation. *Neuropharmacology* 140, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.07.017>
- FDA, Guidances, appendix 6. toxicological data for class 3 solvents. U. S. Food & Drug Administration, 1998.

- Fonte, P., Reis, S., Sarmiento, B., 2016. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *J Control Release*. 225, 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.034>
- Friedrich, I., Müller-Goymann, C.C., 2003. Characterization of solidified reverse micellar solutions (SRMS) and production development of SRMS-based nanosuspensions. *Eur J Pharm Biopharm*. 56(1), 111-119. [https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(03\)00043-2](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(03)00043-2)
- Gadekar, V., Borade, Y., Kannaujia, S., Rajpoot, K., Anup, N., Tambe, V., Kalia, K., Tekade, R.K., 2021. Nanomedicines accessible in the market for clinical interventions. *J Control Release*. 330, 372-397. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.034>
- Ganta, S., Paxton, J.W., Baguley, B.C., Garg, S., 2009. Formulation and pharmacokinetic evaluation of an asulacrine nanocrystalline suspension for intravenous delivery. *Int. J. Pharm*. 367(1-2), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.022>
- Gao, L., Liu, G., Ma, J., Wang, X., Zhou, L., Li, X., 2012. Drug nanocrystals: in vivo performances. *J Control Release*. 160(3), 418-430. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.013>
- Gasco, M.R., Gasco Maria R., 1993. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. U.S. Patent 5,250,236.
- Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., Sparreboom, A., 2001. Cremophor EL: The Drawbacks and Advantages of Vehicle Selection for Drug Formulation. *Eur. J. Cancer* 37(13), 1590-1598. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(01\)00171-x](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(01)00171-x)
- George, M., Ghosh, I., 2013. Identifying the correlation between drug/stabilizer properties and critical quality attributes (CQAs) of nanosuspension formulation prepared by wet media milling technology. *European J. Pharm. Sci.* 48(1-2), 142-152. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.004>
- Geyer, M.A., 1990. Approaches to the characterization of drug effects on locomotor activity in rodents. In: Adler, M.W., Cowan, A. editors. *Modern Methods in Pharmacology Vol. 6 Testing and Evaluation of Drug Abuse*, Wiley Liss; 81-100.
- Gibson, M. ed., 2016. *Pharmaceutical preformulation and formulation: a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form*. CRC Press.
- Gol, D., Thakkar, S. and Misra, M., 2018. Nanocrystal-based drug delivery system of risperidone: lyophilization and characterization. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44(9), 1458-1466. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1460377>
- Guo, J.J., Yue, P.F., Lv, J.L., Han, J., Fu, S.S., Jin, S.X., Jin, S.Y., Yuan, H.L., 2013. Development and in vivo/in vitro evaluation of novel herpentrione nanosuspension. *Int. J. Pharm*. 441(1-2), 227-233. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.11.039>
- Guo, M., Wei, M., Li, W., Guo, M., Guo, C., Ma, M., Wang, Y., Yang, Z., Li, M., Fu, Q., Yang, L., 2019. Impacts of particle shapes on the oral delivery of drug nanocrystals: mucus permeation, transepithelial transport and bioavailability. *J Control Release*. 307, 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.015>
- Haeri, A., Osouli, M., Bayat, F., Alavi, S., Dadashzadeh, S., 2018. Nanomedicine approaches for sirolimus delivery: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 46, 1-14. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1408123>
- Holzer, M., Vogel, V., Mäntele, W., Schwartz, D., Haase, W., Langer, K., 2009. Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *Eur J Pharm Biopharm* 72(2), 428-437. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.02.002>

- Hu, X., Fan, W., Yu, Z., Lu, Y., Qi, J., Zhang, J., Dong, X., Zhao, W., Wu, W., 2016. Evidence does not support absorption of intact solid lipid nanoparticles via oral delivery. *Nanoscale*, 8(13), 7024-7035. <https://doi.org/10.1039/c5nr07474f>
- Huang, Y., Luo, X., You, X., Xia, Y., Song, X., Yu, L., 2013. The preparation and evaluation of water-soluble SKLB610 nanosuspensions with improved bioavailability. *AAPS PharmSciTech* 14(3), 1236–1243. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0005-7>
- Imono, M., Uchiyama, H., Yoshida, S., Miyazaki, S., Tamura, N., Tsutsumimoto, H., Kadota, K., Tozuka, Y., 2020. The elucidation of key factors for oral absorption enhancement of nanocrystal formulations: In vitro–in vivo correlation of nanocrystals. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 146, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.12.002>
- Jakubowska, E., Bielejewski, M., Milanowski, B., Lulek, J., 2022. Freeze-drying of drug nanosuspension–study of formulation and processing factors for the optimization and characterization of redispersible cilostazol nanocrystals. *J Drug Deliv Sci Technol* 74, 103528. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103528>
- Jawahar, N., Hingarh, P.K., Arun, R., Selvaraj, J., Anbarasan, A., Sathianarayanan, S., Nagaraju, G., 2018. Enhanced oral bioavailability of an antipsychotic drug through nanostructured lipid carriers. *Int. J. Biol. Macromol.* 110, 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.121>
- Jena, S., Suryanarayanan, R., Aksan, A., 2016. Mutual influence of mannitol and trehalose on crystallization behavior in frozen solutions. *Pharm. Res.* 33, 1413-1425. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1883-7>
- Jenning, V., Thünemann, A.F., Gohla, S.H., 2000. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharm.* 199(2), 167-177. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00378-1)
- Jennings, T.A., 1999. *Lyophilization: introduction and basic principles*. CRC press.
- Jermain, S.V., Brough, C., Williams III, R.O., 2018. Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery—an update. *Int. J. Pharm.* 535(1-2), 379-392. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.051>
- Johnson, R.E., Kirchhoff, C.F., Gaud, H.T., 2002. Mannitol–sucrose mixtures—versatile formulations for protein lyophilization. *J. Pharm. Sci.* 91(4), 914-922. <https://doi.org/10.1002/jps.10094>
- Jores, K., Mehnert, W., Mäder, K., 2003. Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: a nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study. *Pharm Res.* 20(8), 1274-1283. <https://doi.org/10.1023/a:1025065418309>
- Joshi, M.D., Müller, R.H., 2009. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur J Pharm Biopharm.* 72(2), 161-172. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.003>
- Juenemann, D., Jantratid, E., Wagner, C., Reppas, C., Vertzoni, M., Dressman, J.B., 2011. Biorelevant in vitro dissolution testing of products containing micronized or nanosized fenofibrate with a view to predicting plasma profiles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77(2), 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.10.012>
- Jünemann, D., Dressman, J., 2012. Analytical methods for dissolution testing of nanosized drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 64(7), 931-943. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01520.x>
- Junghanns, J.U.A., Müller, R.H., 2008. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine* 3(3), 295. <https://doi.org/10.2147/ijn.s595>

- Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Alakhov, V.Y., 2002. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J. Control. Release* 82(2-3), 189-212. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00009-3](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00009-3)
- Kalepu, S., Nekkanti, V., 2015. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm. Sin. B.* 5(5), 442-453. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>
- Kang, D.W., Kim, J.H., Kim, K.M., Cho, S.J., Jang, H.W., Chang, J.W., Dong, S.M., Lim, J.W., Kim, J.S. and Cho, H.Y., 2021. Pre-clinical pharmacokinetic characterization, tissue distribution, and excretion studies of novel edaravone oral prodrug, TEJ-1704. *Pharmaceutics*. 13(9), 1406. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091406>
- Karakucuk, A., Teksin, Z.S., Eroglu, H., Celebi, N., 2019. Evaluation of improved oral bioavailability of ritonavir nanosuspension. *European J. Pharm. Sci.* 131, 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.02.028>
- Kawasaki, H., Shimanouchi, T. and Kimura, Y., 2019. Recent development of optimization of lyophilization process. *J. Chem.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9502856>
- Kenechukwu, F.C., Attama, A.A., Ibezim, E.C., 2017. Novel solidified reverse micellar solution-based mucoadhesive nano lipid gels encapsulating miconazole nitrate-loaded nanoparticles for improved treatment of oropharyngeal candidiasis. *J. Microencapsul.* 34(6), 592-609. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1370029>
- Kim, A.I., Akers, M.J., Nail, S.L., 1998. The physical state of mannitol after freeze-drying: effects of mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallizing cosolute. *J. Pharm. Sci.* 87(8), 931-935. <https://doi.org/10.1021/js980001d>
- Klang, V., Valenta, C., 2011. Lecithin-based nanoemulsions. *J Drug Deliv Sci Technol.* 21(1), 55-76. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(11\)50006-1](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50006-1)
- Knutson, D.E., Kodali, R., Divović, B., Treven, M., Stephen, M.R., Zahn, N.M., Dobričić, V., Huber, A.T., Meirelles, M.A., Verma, R.S., et al., 2018. Design and synthesis of novel deuterated ligands functionally selective for the γ -aminobutyric acid type a receptor (GABAAR) $\alpha 6$ subtype with improved metabolic stability and enhanced bioavailability. *J Med Chem.* 61 (6), 2422–2446. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01664>
- Kojima, T., Karashima, M., Yamamoto, K., Ikeda, Y., 2018. Combination of NMR methods to reveal the interfacial structure of a pharmaceutical nanocrystal and nanocrystal in the suspended state. *Mol Pharm.* 15(9), 3901-3908. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00360>
- Kovačević, A.B., Müller, R.H., Keck, C.M., 2020. Formulation development of lipid nanoparticles: Improved lipid screening and development of tacrolimus loaded nanostructured lipid carriers (NLC). *Int J Pharm.* 576, 118918. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118918>
- Královičová, J., Bartůněk, A., Hofmann, J., Křížek, T., Kozlík, P., Roušarová, J., Ryšánek, P., Šíma, M. and Slanař, O., 2022. Pharmacokinetic variability in pre-clinical Studies: sample study with abiraterone in rats and implications for short-term comparative pharmacokinetic study designs. *Pharmaceutics*. 14(3), 643. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030643>
- Kumar, R., Dkhar, D.S., Kumari, R., Mahapatra, S., Dubey, V.K., Chandra, P., 2022. Lipid based nanocarriers: Production techniques, concepts, and commercialization aspect. *J Drug Deliv Sci Technol* 103526. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103526>
- Kumar, S., Gokhale, R., Burgess, D.J., 2014. Sugars as bulking agents to prevent nano-crystal aggregation during spray or freeze-drying. *Int. J. Pharm.* 471(1-2), 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.060>

- Kumar, S., Randhawa, J.K., 2013. Preparation and characterization of Paliperidone loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 102, 562-568. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.052>
- L Remmele, R., Krishnan, S. and J Callahan, W., 2012. Development of stable lyophilized protein drug products. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13(3), 471-496. <https://doi.org/10.2174/138920112799361990>
- Lee, J., Cheng, Y., 2006. Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions. *J Control Release*. 111(1-2), 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.12.003>
- Lee, M.K., Kim, M.Y., Kim, S., Lee, J., 2009. Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: effect of freezing rate. *J. Pharm. Sci.* 98(12), 4808-4817. <https://doi.org/10.1002/jps.21786>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90381-D](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90381-D)
- Li, H., Zhao, X., Ma, Y., Zhai, G., Li, L., Lou, H., 2009. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *J Control Release*. 133(3), 238-244. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.10.002>
- Li, J., Wang, Z., Zhang, H., Gao, J., Zheng, A., 2021. Progress in the development of stabilization strategies for nanocrystal preparations. *Drug Deliv.* 28(1), 19-36. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1856224>
- Li, P., Zhao, L., 2007. Developing early formulations: practice and perspective. *Int. J. Pharm.* 341(1-2), 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.05.049>
- Li, Y., Kröger, M., Liu, W.K., 2015. Shape effect in cellular uptake of PEGylated nanoparticles: comparison between sphere, rod, cube and disk. *Nanoscale*, 7(40), 16631-16646. <https://doi.org/10.1039/C5NR02970H>
- Li, Y., Yue, T., Yang, K., Zhang, X., 2012. Molecular modeling of the relationship between nanoparticle shape anisotropy and endocytosis kinetics. *Biomaterials* 33(19), 4965-4973. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.044>
- Liao, X., Krishnamurthy, R., Suryanarayanan, R., 2007. Influence of processing conditions on the physical state of mannitol—implications in freeze-drying. *Pharm. Res.* 24(2), pp.370-376. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9158-3>
- Lima, T., Bernfur, K., Vilanova, M., Cedervall, T., 2020. Understanding the lipid and protein corona formation on different sized polymeric nanoparticles. *Sci. Rep.* 10(1), 1129. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57943-6>
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 23(1-3), 3-25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)
- Liu, P., De Wulf, O., Laru, J., Heikkilä, T., van Veen, B., Kiesvaara, J., Hirvonen, J., Peltonen, L., Laaksonen, T., 2013. Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. *AAPS PharmSciTech* 14(2), 748-756. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-9960-2>
- Liversidge, G.G., Cundy, K.C., 1995. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int. J. Pharm.* 125, 91-97. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)00122-Y](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)00122-Y)

- Lu, Y., Lv, Y., Li, T., 2019. Hybrid drug nanocrystals. *Adv. Drug Del. Rev.* 143, 115-133. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.06.006>
- Lu, Y., Ye, L., Wei, W., 2016. Injected nanocrystals for targeted drug delivery. *Acta Pharm Sin B* 6,106-113. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.11.005>
- Lucks, S., Müller, R., Medac Gesellschaft Für Klinische Spezialpräparate Gmbh, 1993. Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen (feste Lipidnanosphären (SLN)).
- Ma, Y., He, H., Xia, F., Li, Y., Lu, Y., Chen, D., Qi, J., Lu, Y., Zhang, W., Wu, W., 2017. In vivo fate of lipid-silybin conjugate nanoparticles: implications on enhanced oral bioavailability. *Nanomedicine: Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 13(8), 2643-2654. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.07.014>
- Mahlin, D., Ponnambalam, S., Heidarian Höckerfelt, M.m Bergström, C.A., 2011. Toward in silico prediction of glass-forming ability from molecular structure alone: a screening tool in early drug development. *Mol Pharm.* 8(2), 498-506. <https://doi.org/10.1021/mp100339c>
- Maisel, K., Ensign, L., Reddy, M., Cone, R., Hanes, J., 2015. Effect of surface chemistry on nanoparticle interaction with gastrointestinal mucus and distribution in the gastrointestinal tract following oral and rectal administration in the mouse. *J Control Release.* 197, 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.10.026>
- Manjunath, K.m Venkateswarlu, V., 2005. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. *J Control Release.* 107(2), 215-228. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.06.006>
- McGuckin, M.B., Wang, J., Ghanma, R., Qin, N., Palma, S.D., Donnelly, R.F., Paredes, A.J., 2022. Nanocrystals as a master key to deliver hydrophobic drugs via multiple administration routes. *J Control Release.* 345, 334-353. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.03.012>
- Medarević, D., Djuriš, J., Ibrić, S., Mitrić, M., Kachrimanis, K., 2018. Optimization of formulation and process parameters for the production of carvedilol nanosuspension by wet media milling. *Int. J. Pharm.* 540(1-2), 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.011>
- Mehnert, W., Mäder, K., 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug. Del. Rev.* 47, 165-196. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00105-3)
- Meng-Lund, H., Holm, T.P., Poso, A., Jorgensen, L., Rantanen, J., Grohgan, H., 2019. Exploring the chemical space for freeze-drying excipients. *Int. J. Pharm.* 566, 254-263. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.065>
- Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G., 2011. Nanosizing for Oral and Parenteral Drug Delivery: A Perspective on Formulating Poorly-Water Soluble Compounds Using Wet Media Milling Technology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63(6), 427-440. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.12.007>
- Mohammady, M. and Yousefi, G., 2020. Freeze-drying of pharmaceutical and nutraceutical nanoparticles: the effects of formulation and technique parameters on nanoparticles characteristics. *J. Pharm. Sci.* 109(11), 3235-3247. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.07.015>
- Moreno-Bautista, G., Tam, K.C., 2011. Evaluation of dialysis membrane process for quantifying the in vitro drug-release from colloidal drug carriers. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 389, 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.07.032>
- Möschwitzer, J.P., 2013. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int. J. Pharm.* 453(1), 142-156. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.09.034>

- Mou, D., Chen, H., Wan, J., Xu, H., Yang, X., 2011. Potent dried drug nanosuspensions for oral bioavailability enhancement of poorly soluble drugs with pH-dependent solubility. *Int. J. Pharm.* 413(1-2), 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.034>
- Müller, R.H., Gohla, S., Keck, C.M., 2011. State of the art of nanocrystals—special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.007>
- Müller, R.H., Jacobs, C., Kayser, O., 2001. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev.* 47(1), 3-19. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00118-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00118-6)
- Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S., 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 161-177. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00087-4)
- Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., 2002a. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.* 242, 121-128. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00180-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00180-1)
- Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., 2002b. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev.* 54, S131–S155. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00118-7)
- Müller, R.H., Runge, S., Ravelli, V., Mehnert, W., Thünemann, A.F., Souto, E.B., 2006. Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. *Int J Pharm.* 317(1), 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.02.045>
- Negi, L.M., Jaggi, M., Talegaonkar, S., 2014. Development of protocol for screening the formulation components and the assessment of common quality problems of nano-structured lipid carriers. *Int. J. Pharm.* 461(1-2), 403-410. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.006>
- Nelson, S.D., Trager, W.F., 2003. The use of deuterium isotope effects to probe the active site properties, mechanism of cytochrome P450-catalyzed reactions, and mechanisms of metabolically dependent toxicity. *Drug Metab. Dispos.* 31(12), 1481-1497. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.12.1481>
- Neves, A.R., Queiroz, J.F., Lima, S.A.C., Figueiredo, F., Fernandes, R., Reis, S., 2016. Cellular uptake and transcytosis of lipid-based nanoparticles across the intestinal barrier: relevance for oral drug delivery. *J. Colloid Interface Sci.* 463, 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.10.057>
- Niu, L., Panyam, J., 2017. Freeze concentration-induced PLGA and polystyrene nanoparticle aggregation: Imaging and rational design of lyoprotection. *J Control Release.* 248, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.019>
- Nurzyńska, K., Booth, J., Roberts, C.J., McCabe, J., Dryden, I., Fischer, P.M., 2015. Long-term amorphous drug stability predictions using easily calculated, predicted, and measured parameters. *Mol Pharm.* 12(9), 3389-3398. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00409>
- Ottenhof, M.A., MacNaughtan, W., Farhat, I.A., 2003. FTIR study of state and phase transitions of low moisture sucrose and lactose. *Carbohydr. Res.* 338(21), 2195-2202. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(03\)00342-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(03)00342-2)
- Pan, B., Cui, D., Xu, P., Li, Q., Huang, T., He, R., Gao, F., 2007. Study on interaction between gold nanorod and bovine serum albumin. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 295(1-3), 217-222. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.09.002>

- Pardeike, J., Hommoss, A., Müller, R.H., 2009. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int. J. Pharm.* 366: 170-184. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>
- Pardeike, J., Müller, R.H., 2010. Nanosuspensions: a promising formulation for the new phospholipase A2 inhibitor PX-18. *Int. J. Pharm.* 391(1-2), 322-329. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.002>
- Patel, D., Zode, S.S., Bansal, A.K., 2020. Formulation aspects of intravenous nanosuspensions. *Int. J. Pharm.* 586, 119555. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119555>
- Patel, S.M., Nail, S.L., Pikal, M.J., Geidobler, R., Winter, G., Hawe, A., Davagnino, J. Gupta, S.R., 2017. Lyophilized drug product cake appearance: what is acceptable?. *J. Pharm. Sci.* 106(7), 1706-1721. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.014>
- Peltonen, L., Hirvonen, J., 2010. Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods. *J. Pharm. Pharmacol.* 62(11), 1569-1579. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01022.x>
- Peltonen, L., Hirvonen, J., 2018. Drug nanocrystals—versatile option for formulation of poorly soluble materials. *Int. J. Pharm.* 537(1-2), 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.005>
- Peltonen, L., Strachan, C.J., 2020. Degrees of order: A comparison of nanocrystal and amorphous solids for poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 586, 119492. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119492>
- Pestel, S., Martin, H.J., Maier, G.M., Guth, B., 2006. Effect of commonly used vehicles on gastrointestinal, renal, and liver function in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 54(2), 200-214. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.02.006>
- Pichot, R., Watson, R.L., Norton, I.T., 2013. Phospholipids at the interface: current trends and challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 14(6), 11767-11794. <https://doi.org/10.3390/ijms140611767>
- Pottoo, F.H., Sharma, S., Javed, M.N., Barkat, M.A., Harshita, Alam, M.S., Naim, M.J., Alam, O., Ansari, M.A., Barreto, G.E., Ashraf, G.M., 2020. Lipid-based nanoformulations in the treatment of neurological disorders. *Drug Metab. Rev.* 52(1), 185-204. <https://doi.org/10.1080/03602532.2020.1726942>
- Prakash, G., Shokr, A., Willemen, N., Bashir, S.M., Shin, S.R., Hassan, S., 2022. Microfluidic fabrication of lipid nanoparticles for the delivery of nucleic acids. *Adv Drug Deliv Rev.* 114197. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114197>
- Rainbow, B., Kipp, J., Papadopoulos, P., Wong, J., Glosson, J., Gass, J., Sun, C.S., Wielgos, T., White, R., Cook, C., Barker, K., 2007. Itraconazole IV nanosuspension enhances efficacy through altered pharmacokinetic in the rat. *Int J Pharm*, 339, 251-60. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.02.030>
- Ruiz-Picazo, A., Gonzalez-Alvarez, M., Gonzalez-Alvarez, I., Bermejo, M., 2020. Effect of common excipients on intestinal drug absorption in wistar rats. *Mol Pharm.* 17(7), 2310-2318. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00023>
- Saez, A., Guzman, M., Molpeceres, J. and Aberturas, M.R., 2000. Freeze-drying of polycaprolactone and poly (D, L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50(3), pp.379-387.
- Salah, E., Abouelfetouh, M.M., Pan, Y., Chen, D. and Xie, S., 2020. Solid lipid nanoparticles for enhanced oral absorption: A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 196, p.111305.

- Salminen, H., Helgason, T., Aulbach, S., Kristinsson, B., Kristbergsson, K., Weiss, J., 2014. Influence of co-surfactants on crystallization and stability of solid lipid nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 426, 256-263. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.04.009>
- Sato, K., Ueno, S., 2011. Crystallization, transformation and microstructures of polymorphic fats in colloidal dispersion states. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 16(5), 384-390. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.06.004>
- Savić, M. M., Clayton, T., Furtmüller, R., Gavrilović, I., Samardžić, J., Savić, S., Huck, S., Sieghart, W., Cook, J. M., 2008. PWZ-029, a compound with moderate inverse agonist functional selectivity at GABA(A) receptors containing alpha5 subunits, improves passive, but not active, avoidance learning in rats. *Brain Res.* 1208, 150–159. doi: 10.1016/j.brainres.2008.02.020
- Savić, M. M., Majumder, S., Huang, S., Edwankar, R. V., Furtmüller, R., Joksimović, S., Clayton, T., Sr, Ramerstorfer, J., Milinković, M. M., Roth, B. L., Sieghart, W., Cook, J. M., 2010. Novel positive allosteric modulators of GABAA receptors: do subtle differences in activity at alpha1 plus alpha5 versus alpha2 plus alpha3 subunits account for dissimilarities in behavioral effects in rats?. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 34(2), 376–386. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.01.004
- Savić, M. M., Obradović, D. I., Ugresić, N. D., Cook, J. M., Yin, W., Van Linn, M., Bokonjić, D. R., 2006. Benzodiazepine site inverse agonists and locomotor activity in rats: bimodal and biphasic influence. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84(1), 35–42. doi: 10.1016/j.pbb.2006.04.001
- Savić, V., Ilić, T., Nikolić, I., Marković, B., Čalija, B., Cekić, N., Savić, S., 2019. Tacrolimus-loaded lecithin-based nanostructured lipid carrier and nanoemulsion with propylene glycol monocaprylate as a liquid lipid: Formulation characterization and assessment of dermal delivery compared to referent ointment. *Int J Pharm.* 569, 118624. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118624>
- Savić, V., Todosijević, M., Ilić, T., Lukić, M., Mitsou, E., Papadimitriou, V., Avramiotis, S., Marković, B., Cekić, N. and Savić, S., 2017. Tacrolimus loaded biocompatible lecithin-based microemulsions with improved skin penetration: Structure characterization and in vitro/in vivo performances. *Int. J. Pharm.* 529(1-2), pp.491-505.
- Sawant, K.K., Patel, M.H. and Patel, K., 2016. Cefdinir nanosuspension for improved oral bioavailability by media milling technique: formulation, characterization and in vitro–in vivo evaluations. *Drug development and industrial pharmacy*, 42(5), pp.758-768.
- Schubert, M.A., Harms, M., Müller-Goymann, C.C., 2006. Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *Eur J Pharm Sci.* 27(2-3), 226-236. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.10.004>
- Schubert, M.A., Müller-Goymann, C.C., 2005. Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier. *Eur J Pharm Biopharm.* 61(1-2), 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.006>
- Schubert, M.A., Schicke, B.C., Müller-Goymann, C.C., 2005. Thermal analysis of the crystallization and melting behavior of lipid matrices and lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *Int J Pharm.* 298(1), 242-254. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.014>
- Scioli Montoto, S., Muraca, G., Ruiz, M.E., 2020. Solid lipid nanoparticles for drug delivery: Pharmacological and biopharmaceutical aspects. *Front Mol Biosci.* 7, 587997. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587997>

- Severino, P., Andreani, T., Macedo, A.S., Fangueiro, J.F., Santana, M.H.A., Silva, A.M., Souto, E.B., 2012. Current state-of-art and new trends on lipid nanoparticles (SLN and NLC) for oral drug delivery. *J Drug Deliv.* 2012, 750891 <https://doi.org/10.1155/2012/750891>
- Shah, D.A., Murdande, S.B., Dave, R.H., 2016a. A review: pharmaceutical and pharmacokinetic aspect of nanocrystalline suspensions. *J. Pharm. Sci.* 105(1), 10-24. <https://doi.org/10.1002/jps.24694>
- Shah, R.M., Eldridge, D.S., Palombo, E.A., Harding, I.H., 2016b. Encapsulation of clotrimazole into solid lipid nanoparticles by microwave-assisted microemulsion technique. *Appl Mater Today.* 5, 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2016.09.010>
- Sharma, P., Zujovic, Z.D., Bowmaker, G.A., Marshall, A.J., Denny, W.A., Garg, S., 2011. Evaluation of a crystalline nanosuspension: polymorphism, process induced transformation and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 408(1-2), 138-151. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.032>
- Shegokar, R., Müller, R.H., 2010. Nanocrystals: industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int. J. Pharm.* 399(1-2), 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.044>
- Sieghart, W., Chiou, L.C., Ernst, M., Fabjan, J., Savić, M.M., Lee, M.T., 2022. α 6-Containing GABAA Receptors: Functional Roles and Therapeutic Potentials. *Pharmacol Rev.* 74(1), 238-270. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000293>
- Siewert, C., Moog, R., Alex, R., Kretzer, P., Rothenhäusler, B., 2018. Process and scaling parameters for wet media milling in early phase drug development: A knowledge based approach. *Eur. J. Pharm. Sci.* 115, 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.022>
- Sigfridsson, K., Lundqvist, A., Strimfors, M., 2013. Evaluation of exposure properties after injection of nanosuspensions and microsuspensions into the intraperitoneal space in rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39(11), 1832-1839. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.738684>
- Sjögren, E., Abrahamsson, B., Augustijns, P., Becker, D., Bolger, M.B., Brewster, M., Brouwers, J., Flanagan, T., Harwood, M., Heinen, C. and Holm, R., 2014. In vivo methods for drug absorption—comparative physiologies, model selection, correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation/API/excipient characterization including food effects. *Eur J Pharm Sci.* 57, 99-151. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.02.010>
- Sonoda, T., Takata, Y., Ueno, S., Sato, K., 2006. Effects of emulsifiers on crystallization behavior of lipid crystals in nanometer-size oil-in-water emulsion droplets. *Cryst. Growth Des.* 6(1), pp.306-312. <https://doi.org/10.1021/cg050045h>
- Sritham, E., Gunasekaran, S., 2017. FTIR spectroscopic evaluation of sucrose-maltodextrin-sodium citrate bioglass. *Food Hydrocoll.* 70, 371-382. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.023>
- Starciuc, T., Malfait, B., Danede, F., Paccou, L., Guinet, Y., Correia, N.T., Hedoux, A., 2020. Trehalose or sucrose: which of the two should be used for stabilizing proteins in the solid state? A dilemma investigated by in situ micro-Raman and dielectric relaxation spectroscopies during and after freeze-drying. *J. Pharm. Sci.* 109(1), 496-504. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.055>
- Steckel, H., Rasenack, N., Villax, P., Müller, B.W., 2003. In vitro characterization of jet-milled and in-situ-micronized fluticasone-17-propionate. *Int. J. Pharm.* 258(1-2), 65–75. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(03\)00153-4](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(03)00153-4)
- Sykes, E., Woodburn, K., Decker, D., Kessel, D., 1994. Effects of Cremophor EL on Distribution of Taxol to Serum Lipoproteins. *Br. J. Cancer* 70(3), 401-404. <https://doi.org/10.1038/bjc.1994.317>

- Tapeinos, C., Battaglini, M., Ciofani, G., 2017. Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *J Control Release*. 264, 306-332. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.033>
- Tian, Z., Zhao, Y., Mai, Y., Qiao, F., Guo, J., Dong, L., Niu, Y., Gou, G. and Yang, J., 2022. Nanocrystals with different stabilizers overcome the mucus and epithelial barriers for oral delivery of multicomponent Bufadienolides. *Int. J. Pharm.* 616, 121522. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121522>
- Tian, Z., Zhao, Y., Mai, Y., Qiao, F., Guo, J., Dong, L., Niu, Y., Gou, G., Yang, J., 2022. Nanocrystals with different stabilizers overcome the mucus and epithelial barriers for oral delivery of multicomponent Bufadienolides. *Int J Pharm.* 616, 121522. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121522>
- Trenkenschuh, E., Friess, W., 2021. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. *Eur J Pharm Biopharm* 165, 345-360. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.024>
- Trenkenschuh, E., Savšek, U., Friess, W., 2021. Formulation, process, and storage strategies for lyophilizates of lipophilic nanoparticulate systems established based on the two models paliperidone palmitate and solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 606, 120929. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120929>
- Van Eerdenbrugh, B., Van den Mooter, G., Augustijns, P., 2008. Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *Int. J. Pharm.* 364(1), 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.023>
- Van Eerdenbrugh, B., Vermant, J., Martens, J.A., Froyen, L., Humbeek, J.V., Van den Mooter, G., Augustijns, P., 2010. Solubility increases associated with crystalline drug nanoparticles: methodologies and significance. *Mol Pharm.* 7(5), 1858-1870. <https://doi.org/10.1021/mp100209b>
- Van Eerdenbrugh, B., Vermant, J., Martens, J.A., Froyen, L., Van Humbeek, J., Augustijns, P., Van den Mooter, G., 2009. A screening study of surface stabilization during the production of drug nanocrystals. *J. Pharm. Sci.* 98(6), 2091-2103. <https://doi.org/10.1002/jps.21563>
- Vasović, D., Divović, B., Treven, M., Knutson, D.E., Steudle, F., Scholze, P., Obradović, A., Fabjan, J., Brković, B., Sieghart, W., et al., 2019. Trigeminal neuropathic pain development and maintenance in rats are suppressed by a positive modulator of $\alpha 6$ GABAA receptors. *Eur. J. Pain* 23(5), 973-984. <https://doi.org/10.1002/ejp.1365>
- Venkateswarlu, V., Manjunath, K., 2004. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *J Control Release.*, 95(3), 627-638. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.01.005>
- Verma, S., Gokhale, R., Burgess, D.J., 2009. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. *Int. J. Pharm.* 380(1-2), 216-222. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.005>
- Wagner, M. ed., 2017. *Thermal analysis in practice: fundamental aspects*. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG.
- Wang, L., Du, J., Zhou, Y., Wang, Y., 2017a. Safety of nanosuspensions in drug delivery. *Nanomedicine* 13(2), 455-469. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.007>
- Wang, L., Guo, J., Zhong, X., Zhang, J., Sheng, Y., Lai, Q., Song, H. and Yang, W., 2022. Repetitive Blood Sampling from the Subclavian Vein of Conscious Rat. *J Vis Exp.* (180). <https://doi.org/10.3791/63439>

- Wang, T., Xue, J., Hu, Q., Zhou, M., Luo, Y., 2017b. Preparation of lipid nanoparticles with high loading capacity and exceptional gastrointestinal stability for potential oral delivery applications. *J Colloid Interface Sci.* 507, 119-130. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.07.090>
- Wang, W., 2015. Tolerability of hypertonic injectables. *Int. J. Pharm.* 490(1-2), 308-315. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.069>
- Wang, Y., Zheng, Y., Zhang, L., Wang, Q., Zhang, D., 2013. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J Control Release.* 172(3), 1126-1141. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.006>
- Wassvik, C.M., Holmén, A.G., Bergström, C.A., Zamora, I., Artursson, P., 2006. Contribution of solid-state properties to the aqueous solubility of drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 29(3-4), 294-305. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.05.013>
- Wassvik, C.M., Holmén, A.G., Draheim, R., Artursson, P., Bergström, C.A., 2008. Molecular characteristics for solid-state limited solubility. *J. Med. Chem.* 51(10), 3035-3039. <https://doi.org/10.1021/jm701587d>
- Williams, H.D., Trevaskis, N.L., Charman, S.A., Shanker, R.M., Charman, W.N., Pouton, C.W., Porter, C.J., 2013. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol. Rev.* 65 (1), 315-499. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005660>
- Wissing, S.A., Kayser, O., Müller, R.H., 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* 56, 1257-1272. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.12.002>
- Wolkers, W.F., Oliver, A.E., Tablin, F., Crowe, J.H., 2004. A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. *Carbohydr. Res.* 339(6), 1077-1085. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.01.016>
- Wu, L., Zhang, J., Watanabe, W., 2011. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.*, 63(6), 456-469. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.001>
- Xia, D., He, Y., Li, Q., Hu, C., Huang, W., Zhang, Y., Wan, F., Wang, C., Gan, Y., 2018. Transport mechanism of lipid covered saquinavir pure drug nanoparticles in intestinal epithelium. *J Control Release.* 269, 159-170. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.012>
- Xu, Y., Liu, X., Lian, R., Zheng, S., Yin, Z., Lu, Y., Wu, W., 2012. Enhanced dissolution and oral bioavailability of aripiprazole nanosuspensions prepared by nanoprecipitation/homogenization based on acid-base neutralization. *Int. J. Pharm.* 438(1-2), 287-295. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.09.020>
- Yang, H., Teng, F., Wang, P., Tian, B., Lin, X., Hu, X., Zhang, L., Zhang, K., Zhang, Y., Tang, X., 2014. Investigation of a nanosuspension stabilized by Soluplus® to improve bioavailability. *Int. J. Pharm.* 477(1-2), 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.025>
- Yuan, D., He, H., Wu, Y., Fan, J., Cao, Y., 2019. Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 108(1), 58-72. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.10.037>
- Yucel, U., Elias, R.J., Coupland, J.N., 2013. Localization and reactivity of a hydrophobic solute in lecithin and caseinate stabilized solid lipid nanoparticles and nanoemulsions. *J Colloid Interface Sci.* 394, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.12.042>
- Yue, P., Xiao, M., Xie, Y., Ma, Y., Guan, Y., Wu, Z., Hu, P., Wang, Y., 2016. The roles of vitrification of stabilizers/matrix formers for the redispersibility of drug nanocrystals after solidification: a case study. *AAPS PharmSciTech* 17, 1274-1284. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0461-3>

- Yue, P.F., Li, G., Dan, J.X., Wu, Z.F., Wang, C.H., Zhu, W.F., Yang, M., 2014. Study on formability of solid nanosuspensions during solidification: II novel roles of freezing stress and cryoprotectant property. *Int. J. Pharm.* 475(1-2), 35-48. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.041>
- Yue, P.F., Li, Y., Wan, J., Yang, M., Zhu, W.F., Wang, C.H., 2013. Study on formability of solid nanosuspensions during nanodispersion and solidification: I. Novel role of stabilizer/drug property. *Int. J. Pharm.* 454(1), 269-277. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.050>
- Zhang, G., Wang, Y., Zhang, Z., He, Z., Liu, Y., Fu, Q., 2021. FRET imaging revealed that nanocrystals enhanced drug oral absorption by dissolution rather than endocytosis: A case study of coumarin 6. *J Control Release.* 332, 225-232. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.025>
- Zhang, Z., Gao, F., Bu, H., Xiao, J., Li, Y., 2012b. Solid lipid nanoparticles loading candesartan cilexetil enhance oral bioavailability: in vitro characteristics and absorption mechanism in rats. *Nanomedicine.* 8(5), 740-747. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.08.016>
- Zhang, Z., Tan, S., Feng, S.S., 2012a. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery. *Biomaterials* 33(19), 4889-4906. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.046>
- Zhu, Y., Fu, Y., Zhang, A., Wang, X., Zhao, Z., Zhang, Y., Yin, T., Gou, J., Wang, Y., He, H., Tang, X., 2022. Rod-shaped nintedanib nanocrystals improved oral bioavailability through multiple intestinal absorption pathways. *Eur. J. Pharm. Sci.* 168, 106047. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106047>
- Zuidema, J., Kadir, F., Titulaer, H.A.C., Oussoren, C., 1994. Release and absorption rates of intramuscularly and subcutaneously injected pharmaceuticals (II). *Int. J. Pharm.* 105(3), 189-207. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90103-1](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90103-1)

BIOGRAFIJA

Jelena Mitrović rođena je 17. novembra 1992. u Čačku. Osnovnu školu *Ratko Mitrović* i *Gimnaziju u Čačku* završila je kao nosilac diplome *Vuk Karadžić*. Integrisane akademske studije (studijski program farmacija) na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2011/2012. godine, a u septembru 2016. godine stekla je zvanje magistra farmacije. Nakon završetka studija, obavila je pripravnički staž u ZUA BENU i bolničkoj apoteci Urgentnog centra Kliničkog centra Srbije, i maja 2017. godine položila stručni ispit za farmaceute.

Doktorske akademske studije (modul farmaceutska tehnologija) upisala je školske 2017/2018. godine. Na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju zaposlena je prvo kao stručni saradnik, zatim kao istraživač-pripravnik i istraživač-saradnik, a od februara 2022. kao asistent. Učestvuje u realizaciji praktične nastave na predmetima farmaceutska tehnologija 1, farmaceutska tehnologija 2 i kozmetologija.

Do sada učestvovala je u realizaciji sledećih projekata: projekat Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja - *Razvoj mikro- i nanosistema kao nosačaza lekove sa antiinflamatornim delovanjem i metoda za njihovu karakterizaciju* (TR34031), H2020 IMI2-2017-13-10 - *Improving the preclinical prediction of adverse effects of pharmaceuticals on the nervous system (NeuroDeRisk)*, Projekat bilateralne saradnje sa Univerzitetom u Tibingenu (Nemačka) - *Inovativne nanoformulacije za isporuku lekova u mozak/kožu* i projekta Fonda za nauku u okviru poziva IDEJE - *Neuroimmune aspects of mood, anxiety and cognitive effects of leads/drug candidates acting at GABAA and/or sigma-2 receptors: In vitro/in vivo delineation by nano- and hiPSCbased platforms (NanoCellEmoCog)*.

Tokom doktorskih studija boravila je četiri nedelje na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Univerziteta u Tibingenu avgusta 2021. godine i na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani (Slovenija) u okviru *CEEPUS* programa mobilnosti u periodu mart-maj 2019. U novembru 2019. godine kao deo projekta *Boosting Capacities for Advanced Characterization of Nano-Dispersed Drug-Delivery Systems (NanoDiction)* boravila je nedelju dana u *JRC Nanobiotechnology Laboratory, Joint Research Centre* u Ispri (Italija). Godine 2018. završila je obuku i položila ispit iz predmeta *Principi rada sa eksperimentalnim životinjama*.

Autor je tri rada u međunarodnim časopisima i preko 10 saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima. Na skupu *NanoBioMed* u Gracu (Austrija) 2019. godine osvojila je treću nagradu od strane *Erwin Schrödinger Society for Nanosciences*. Dobitnik je druge nagrade na Godišnjoj nagradi za naučnoistraživačke radove studenata poslediplomskih studija 2020. godine.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Митровић

Број индекса 15/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Преклиничка испитивања дисперзија нанокристала и липидних наночестица деутерисаних
пиразолохинолинонских лиганада – физичкохемијски и биолошки аспекти

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 7.7.2023.

J. Mitrović

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Митровић

Број индекса 15/2017

Студијски програм Докторске академске студије, модул Фармацеутска технологија

Наслов рада Преклиничка испитивања дисперзија нанокристала и липидних наночестица деутерисаних пиразолохинолинонских лиганата – физичкохемијски и биолошки аспекти

Ментор Снежана Савић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 7.7.2023.

J. Mitrović

Изјава о коришћењу

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

Преклиничка испитивања дисперзија нанокристала и липидних наночестица деутерисаних пиразолохинолинонских лиганата – физичкохемијски и биолошки аспекти

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 7.7.2023.

J. Mijarobak

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.