

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelena B. Đoković

**Nanoemulzije kurkumina za parenteralnu
primenu: uticaj PEGilovanih fosfolipida na
fizičkohemijske karakteristike, dugoročnu
stabilnost i in vitro/in vivo performanse**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Jelena B. Đoković

**Nanoemulzije kurkumina za parenteralnu
primenu: uticaj PEGilovanih fosfolipida na
fizičkohemijske karakteristike, dugoročnu
stabilnost i *in vitro/in vivo* performanse**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Jelena B. Đoković

**Curcumin-loaded parenteral nanoemulsions:
the impact of PEGylated phospholipids on
physicochemical characteristics, long-term
stability and in vitro/in vivo performance**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Delovi eksperimentalnog rada su urađeni na Katedri za farmaceutsku hemiju i Katedri za farmakologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Tehnološkom fakultetu u Leskovcu Univerziteta u Nišu, Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard–Karls Univerziteta u Tibingenu (Nemačka), kao i na Institutu za hemijsku biologiju Nacionalne helenske istraživačke fondacije u Atini (Grčka).

MENTOR

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

ČLANOVI KOMISIJE

1. _____

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

2. _____

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

3. _____

Dr Bojan Marković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

4. _____

Dr Danijela Randelović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

5. _____

Dr sc. Sanela Savić, naučni saradnik,
DCP Hemigal – Sektor za istraživanje i razvoj, Leskovac

Datum odbrane _____

Strana sa izrazima zahvalnosti, odnosno posvetom

Ma koliko su za izradu doktorata potrebni lična želja, mukotrpan trud i zalaganje, za njegov uspešan završetak je neophodna podrška čitave zajednice. Stoga prvo dugujem zahvalnost svom mentoru, profesorki Snežani Savić, za svu pomoć prilikom izrade i pisanja disertacije. Članovima komisije, prof. dr Ivani Pantelić, prof. dr Miroslavu Saviću, prof. dr Bojanu Markoviću, naučnom savetniku Danijeli Ranđelović i naučnom saradniku Saneli Savić zahvaljujem na dugogodišnjoj saradnji tokom koje su mi uvek izlazili u susret, spremni da razgovaraju oko svake nedoumice i problema koji su se u toku rada javili kako bi poboljšali kvalitet, ne samo dobijenih rezultata, već i mog sveukupnog naučnog obrazovanja.

Duboku zahvalnost dugujem svim kolegama sa Katedre za Farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju za dugogodišnju saradnju, kolegijalnost, podršku i neprocenjiva iskustva koje sam stekla u radu sa njima. Posebno sam zahvalna svojim kolegama Mirjani Krstić i Nikoli Pešiću koji su provodili dane u laboratoriji sa mnom i ostajali nakon svog radnog vremena kako bih ja uspešno završila svoje eksperimente. Hvala dr Anji Santrač na nesebičnoj pomoći, pruženom znanju i primeru kako se odnositi prema kolegama. Duboku zahvalnost dugujem i svojim saradnicima sa Katedre za farmakologiju za pruženu pomoć prilikom rada sa ekperimentalnim životinjama, i mnogim satima provedenim u radu i dobroj atmosferi. Sa njima su mi dugi dani brzo proleteli. Kolegama sa Instituta za hemijsku biologiju Nacionalne helenske istraživačke fondacije, *Sortiria Demisli* i *Vassiliki Papadimitrou* hvala na ogromnoj pomoći u primeni EPR metode i tumačenju njenih rezultata, a profesorki Jeleni Antić-Stanković zahvaljujem na divnoj saradnji u eksperimentima na ćelijskim linijama.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici za nesebičnu podršku, ljubav i motivaciju za rad koju mi celoga života pružaju. Zahvalna sam svojim roditeljima, Blagomiru i Zorici Đoković za svu podršku i poverenje. Čast mi je što sam njihova ćerka. Hvala mojoj baki i deki, Dragici i Ljubu Jakić, koji su uvek podsticali moju radoznalost, kao i Zoranu, Aleksandri i Andreju Jakiću za svu podršku. Na kraju, izrada ovog doktorata ne bi bila moguća bez moje sestre Ljubice, kojoj ga i posvećujem.

Za Bula

Nanoemulzije kurkumina za parenteralnu primenu: uticaj PEGilovanih fosfolipida na fizičko-hemijske karakteristike, dugoročnu stabilnost i *in vitro/in vivo* performanse

SAŽETAK

Upotreba nanotehnologije u medicini je do sada uglavnom bila fokusirana na terapiju kancera, pa je njen pun potencijal u lečenju infektivnih oboljenja, genetskih bolesti, bolesti oka, ali i različitih stanja koja zahvataju nervni sistem tek potrebno istražiti. Kako bi se omogućilo da lekovita supstanca dospe do centralnog nervnog sistema, odnosno uspešno prođe krvno-moždanu barijeru, pre svega treba odabrati adekvatan put primene, ali i modifikovati sistem za njenu isporuku. PEGilovanje je strategija koja podrazumeva pokrivanje površine nanonosača lancima polietilenglikola koji smanjuju interakciju sa proteinima plazme i produžavaju vreme cirkulacije, dajući nosaču dovoljno vremena da dođe do ciljnog mesta delovanja. Kao model aktivna supstanca u ovom istraživanju je korišćen kurkumin, supstanca koja ima potencijal za lečenje različitih stanja i bolesti, ali i nepovoljne fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine koje onemogućavaju dostizanje ciljnog mesta delovanja.

Osnovni cilj ove disertacije je razvoj PEGilovanih nanoemulzija sa kurkuminom za parenteralnu primenu, njihova detaljna fizičko-hemijska i strukturna analiza, kao i dugoročno praćenje stabilnosti. Radi sveobuhvatne procene uticaja procesnih parametara i faktora formulacije na karakteristike dobijenih nanoemulzija korišćena je metodologija eksperimentalnog dizajna. Posebna pažnja je posvećena određivanju uticaja izbora masne faze (sojinog ili ribljeg ulja) na karakteristike razvijenih formulacija, kao i proceni efikasnosti PEGilovanja, odnosno određivanju koncentracije PEGilovanih fosfolipida koja obezbeđuje optimalnu zaštitu površine kapi. Na kraju je procenjena neškodljivost i efikasnost razvijenih formulacija na ćelijskim kulturama, kao i uticaj PEGilovanja na sudbinu kurkumina nakon intravenske primene formulacija na eksperimentalnim životinjama.

U sprovedenim istraživanjima je pokazano da je PEGilovanje poboljšalo dugoročnu stabilnost razvijenih nanoemulzija, bez negativnih uticaja na fizičko-hemijske karakteristike ili antioksidativnu aktivnost. Dodatno je pokazano da kurkumin deluje kao stabilizator formulacija sa ribljim uljem, ali da upotreba ribljeg ulja ne doprinosi povećanju ukupnog antioksidativnog efekta formulacija. U analizama na ćelijskim kulturama je potvrđena njihova neškodljivost i efikasnost. Pilot studija farmakokinetike je pokazala da PEGilovanje pruža povećanje koncentracije kurkumina u plazmi i da može biti dobra opcija za povećanje isporuke u mozak.

Ključne reči: kurkumin, PEGilovane nanoemulzije, parenteralna primena, eksperimentalni dizajn, efikasnost PEGilovanja, elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija, injektibilnost, antioksidativna aktivnost, dugoročna stabilnost, pilot studija farmakokinetike.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

UDK broj:

Curcumin-loaded parenteral nanoemulsions: the impact of PEGylated phospholipids on physicochemical characteristics, long-term stability and in vitro/in vivo performance

ABSTRACT

The use of nanotechnology in medicine has so far been mainly focussed on cancer therapy, but its full potential in the treatment of infectious, genetic, and eye diseases, as well as various conditions affecting the nervous system is yet to be fully explored. In order for the active substance to reach the central nervous system, and pass through the blood-brain barrier, a suitable route of administration must first be selected, and the drug delivery system should also be modified. PEGylation is a strategy in which the surface of a nanocarrier is covered with polyethylene glycol chains that reduce the carrier's interaction with plasma proteins and prolong its circulation time enabling sufficient opportunities to reach the site of action. Curcumin, a model drug used in this research, has the potential to treat various conditions and diseases, but also possesses unfavourable physicochemical and pharmacokinetic properties that prevent it from reaching the target site of action.

The main objective of this dissertation is the development of PEGylated nanoemulsions containing curcumin for parenteral administration, their detailed physicochemical and structural analysis and monitoring of long-term stability. A design of experiments methodology was used to comprehensively evaluate the influence of process parameters and formulation factors on the properties of the nanoemulsions obtained. Particular attention was paid to determining the influence of the oil phase selection (soybean or fish oil) on the properties of the developed formulations and to evaluating the effectiveness of PEGylation, i.e. determining the concentration of PEGylated phospholipids that ensures optimum protection of the droplet surface. Finally, the safety and efficacy of the developed formulations on different cell cultures and the influence of PEGylation on the fate of curcumin after intravenous administration to animal models were evaluated.

The results showed that PEGylation improved the long-term stability of the developed nanoemulsions without any negative effects on their physicochemical properties or antioxidant activity. In addition, it was shown that curcumin acts as a stabiliser of formulations containing fish oil, but that the use of fish oil does not contribute to increasing the overall antioxidant activity of the formulations. Analyses on cell cultures confirmed its safety and efficacy. A pilot pharmacokinetic study showed that PEGylation leads to an increase in curcumin concentration in plasma and could be a good option for improving brain delivery.

Keywords: curcumin, PEGylated nanoemulsions, parenteral administration, experimental design, PEGylation efficacy, electron paramagnetic resonance spectroscopy, injectability, antioxidant activity, long-term stability, pilot study of pharmacokinetics

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical technology

UDK N°:

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Primena nanotehnologije u medicini.....	1
1.2. Ciljna isporuka lekova u mozak.....	2
1.2.1. Putevi primene	2
1.2.2. Nanonosaiči za ciljnu isporuku lekova u mozak.....	3
1.3. Nanoemulzije za parenteralnu primenu.....	6
1.3.1. Komponente masne i vodene faze.....	6
1.3.2. Stabilizatori parenteralnih nanoemulzija.....	7
1.3.3. Tehnike dobijanja parenteralnih nanoemulzija	8
1.3.4. Parenteralne nanoemulzije na tržištu	9
1.4. PEGilovanje	10
1.4.1. Biološka sudbina nanonosaiča nakon parenteralne primene.....	10
1.4.2. PEGilovani derivati.....	11
1.4.3. Bezbednost primene PEG derivata.....	13
1.4.4. Procena efikasnosti PEGilovanja kod nanonosaiča	14
1.5. Kurkumin	18
1.5.1. Fizičko-hemijske karakteristike.....	19
1.5.2. Biološka raspoloživost kurkumina.....	19
1.5.3. Sistemi za poboljšanu isporuku kurkumina	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	23
3. EKSPERIMENTALNI DEO	25
3.1. Materijali	25
3.2. Metode.....	25
3.2.1. Rastvorljivost	25
3.2.2. Priprema nanoemulzija.....	25
3.2.3. Sterilizacija formulacija	26
3.2.4. Analiza veličine kapi.....	26
3.2.5. Zeta potencijal.....	27
3.2.6. pH vrednost i provodljivost.....	27
3.2.7. Osmolalnost.....	27
3.2.8. Viskozitet i injektabilnost	27
3.2.9. Eksperimentalni dizajn.....	28

3.2.10. Mikroskopske analize.....	30
3.2.11. Sadržaj kurkumina i efikasnost inkapsulacije	30
3.2.12. Analitička LC-MS/MS metoda	31
3.2.13. Antioksidantni testovi	31
3.2.14. Studije stabilnosti	32
3.2.15. <i>In vitro</i> oslobađanje kurkumina	32
3.2.16. Elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija.....	33
3.2.17. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	34
3.2.18. Infracrvena spektroskopija sa Furijerovom transformacijom (FTIR).....	34
3.2.19. Interakcije sa proteinima	34
3.2.20. Hemolitički potencijal.....	35
3.2.21. Citotoksična aktivnost.....	36
3.2.22. Obrada biološkog materijala sa kurkuminom	36
3.2.23. Pilot farmakokinetička studija.....	38
3.2.24. Statistička analiza.....	38
4. REZULTATI I DISKUSIJA	39
4.1. Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada	39
4.1.1. Priprema i karakterizacija nanoemulzija	39
4.1.2. Eksperimentalni dizajn.....	39
4.1.3. Fizičko-hemijska karakterizacija i stabilnost pripremljenih nanoemulzija.....	44
4.1.4. Laserska difrakcija i uticaj aseptične filtracije.....	47
4.1.5. Mikroskopske analize.....	48
4.1.6. Antioksidantni testovi	50
4.1.7. <i>In vitro</i> studija oslobađanja kurkumina iz nanoemulzija	51
4.2. Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada	54
4.2.1. Rastvorljivost i elektron paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija	54
4.2.2. Eksperimentalni dizajn.....	56
4.2.3. Fizičko-hemijska karakterizacija.....	61
4.2.4. Mikroskopske analize.....	65
4.2.5. Antioksidantni testovi	68
4.2.6. Oslobađanje kurkumina iz nanoemulzija	69
4.2.7. Viskozitet i injektabilnost	74
4.3. Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada	76

4.3.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	76
4.3.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijerovom transformacijom (FTIR).....	76
4.3.3. Elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija.....	77
4.3.4. Uticaj PEGilovanja na interakcije sa proteinima	79
4.4. Rezultati i diskusija četvrte faze eksperimentalnog rada	88
4.4.1. Citotoksični i hemolitički potencijal nanoemulzija.....	88
4.4.2. Metoda za obradu biološkog materijala sa kurkuminom	89
4.4.3. Farmakokinetička analiza.....	91
5. ZAKLJUČAK	93
5.1. Zaključak prve faze eksperimentalnog rada.....	93
5.2. Zaključak druge faze eksperimentalnog rada.....	94
5.3. Zaključak treće faze eksperimentalnog rada	95
5.4. Zaključak četvrte faze eksperimentalnog rada	97
5.5. Opšti zaključak.....	97
6. LITERATURA	98
BIOGRAFIJA	110

1. UVOD

1.1. Primena nanotehnologije u medicini

Termin nanotehnologija se prvi put javlja u knjizi *Engines of creation: the coming era of nanotechnology* Erika Drekslera (Drexler, 1986). Prvobitno je korišćena za hemijske sinteze i skladištenje informacija na atomskom nivou, a potom i u tretmanu otpadnih voda, tekstilnoj industriji i proizvodnji baterija visokih performansi (Farjadian i sar., 2019). U polju medicine je dovela do pojave nove oblasti – nanomedicine, koja se bavi primenom nanonauke u prevenciji, lečenju i dijagnozi bolesti. Novi lekovi iz ove oblasti, nanoterapeutici, imaju značajne prednosti nad konvencionalnim, pre svega zahvaljujući svojoj maloj veličini, velikoj specifičnoj površini i mogućnosti njene modifikacije, pa tako u odnosu na njih imaju nižu toksičnost, povećanu biološku raspoloživost, unapređene farmakokinetičke parametre i bolju terapijsku efikasnost (Zhang i sar., 2020).

Razvojni put nanomedicine se može podeliti u tri faze. Prva obuhvata konceptualni razvoj i opisivanje struktura različitih nanonosaa, kao što su liposomi, dendrimeri i polimerni nosači, ali i otkrića različitih bioloških fenomena, kao što je efekat povećane penetracije i permeacije (engl. *enhanced permeability and retention effect*, EPR), koji su omogućili bolje razumevanje njihovih efekata. Druga faza počinje stavljanjem prvog nanoterapeutika na tržište, doksorubicina inkorporiranog u liposome (Doxil[®]), koji je Američka agencija za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrila 1995. godine (Zhang i sar., 2020). Sledećih desetak godina na tržište su dospevali novi lekovi iz grupe nanoterapeutika, kao što su nanokristali sirolimusa (Rapamune[®]), paklitaksel vezan za nanočestice albumina (engl. *nanoparticle albumin-bound paclitaxel*, Nab-paclitaxel) (Abraxane[®]) i polimerne micide paklitaksela (Genexol-PM[®]). Od 2008. godine do danas traje treća faza, koja podrazumeva razvoj novih nanoterapeutika, ali i funkcionalizaciju površine postojećih vrsta, kako bi se obezbedila ciljana isporuka aktivnih sastojaka uz što manje neželjenih dejstava (Zhang i sar., 2020).

Budućnost nanomedicine je dovedena u pitanje početkom 2019. godine kada je Američki nacionalni institut za istraživanje kancera (engl. *U.S. National Cancer Institute*, NCI) objavio prekid finansiranja nekih Centara izvrsnosti u istraživanju primene nanotehnologije u lečenju kancera (engl. *Centers of Cancer Nanotechnology Excellence*, CCNEs). Tada se profesor Park u okviru svog editorijala u časopisu *Journal of Controlled Release* pitao da li je došao kraj pomame za nanomedicinom i naveo da se nakon toliko godina istraživanja i razvoja i dalje govori o obećanjima koje ova grana medicine nudi, ali da su konkretni rezultati, u vidu lekova na tržištu izostali (Park, 2019). Ovo je izazvalo debatu među naučnicima u ovoj oblasti koji su izneli svoje neslaganje sa mišljenjem profesora Parka i smatrali da je razlog za ukidanje navedenih CCNE suprotan, odnosno da je broj konkretnih rezultata, kao što su broj nanolekova na tržištu (preko 50), *start up* kompanija posvećenih novim istraživanjima (više od 100), ali i publikacija posvećenih ovoj oblasti (preko 3400) znak da je sama industrija dovoljno jaka i da ovakvi centri, značajni pre svega u početnim stadijumima razvoja oblasti, gube na značaju (Germain i sar., 2020; Martins i sar., 2020). Ipak, i istraživači koji se protive zaključcima koje je profesor Park izneo, priznaju da je do sada nanomedicina uglavnom bila fokusirana na lečenje kancera, i da ima dosta prostora u istraživanju upotrebe nanolekova u drugim indikacijama, kao što su infektivna oboljenja, lečenje genetskih bolesti, bolesti oka, i lečenju različitih stanja koja zahvataju nervni sistem (Germain i sar., 2020).

1.2. Ciljna isporuka lekova u mozak

Kada je reč o ciljnoj isporuci lekova u mozak koristi se veći broj strategija, kao što su modifikacija same aktivne supstance, sistema za njenu isporuku, ili promena integriteta i zaobilazanje krvno-moždane barijere (KMB). Različiti pristupi korišćeni za postizanje povećanog prolaska lekovitih supstanci u mozak su predstavljeni na **Slici 1.2.1**. U tehnološkom smislu, povećanu isporuku lekova u mozak možemo postići pre svega odabirom adekvatnog puta primene i odgovarajućeg nosača.



Slika 1.2.1. Strategije za isporuku lekova u mozak (preuzeto i prilagođeno iz Partridge i sar., (2022)). RMT – receptorima posredovana transcitoza (engl. *receptor-mediated transcytosis*); a.s. – aktivna supstanca.

1.2.1. Putevi primene

Jedno od prvih razmatranja prilikom razvoja novog terapijskog sistema je željeni put njegove primene. Kada je reč o isporuci lekova u mozak, najčešće se govori o parenteralnoj i intranazalnoj primeni. U literaturi se pominje i injektovanje željenog preparata direktno u ciljno mesto delovanja u mozgu, ali premda se ova praksa pokazala efikasnom u prekliničkim studijama na životinjama, u kliničkoj praksi nije doživela sličan uspeh, pre svega zbog velike invazivnosti procedure, brzog klirensa i degradacije aktivnih supstanci. Intranazalni put primene se smatra povoljnim zbog mogućnosti zaobilazanja KMB, ali efikasnost isporuke lekovite supstance umnogome zavisi od nazalne sluzokože i potencijalnih interakcija aktivne supstance sa njom. Parenteralni put isporuke, iako invazivan i bolan, i dalje je prvi izbor kada je reč o isporuci aktivnih supstanci u mozak, pre svega zbog postizanja visoke bioraspoloživosti aktivnih supstanci (Ilić i sar., 2023).

Farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država/Američka farmakopeja (USP46 - NF 41) definiše parenteralne preparate kao one namenjene za injektovanje kroz kožu ili druga spoljna tkiva sa ciljem isporuke leka direktno u krvne sudove, organe, tkiva ili lezije. Ovaj put primene je posebno značajan za pacijente koji se leče u bolničkim uslovima i u potpunosti zavise od parenteralnog unosa, ne samo lekova, već i nutrijenasa, tečnosti i elektrolita. Na ovaj način se postiže brz početak delovanja, visoka efikasnost primenjenih lekova, reproducibilna farmakokinetika, kao i 100%-tna biološka raspoloživost, čime se ostvaruje

prednost u odnosu na oralno davanje lekova. Parenteralna primena obuhvata intravensko, intramuskularno, intradermalno ili subkutano davanje lekova, najčešće u formi rastvora, suspenzija i emulzija. Međutim, ograničena rastvorljivost aktivnih supstanci, nestabilnost preparata i želja za postizanjem kontrolisanog oslobađanja aktivnih supstanci su stvorila potrebu za razvojem novih terapijskih sistema koji bi omogućili ostvarivanje ovih ciljeva (Gulati i Gupta, 2011).

1.2.2. Nanonosači za ciljnu isporuku lekova u mozak

Mnogi koloidni nosači, kao što su: liposomi, eksozomi, polimerne ili neorganske nanočestice su istraživani u cilju povećanja isporuke supstanci u mozak (Wang i sar., 2023). Među njima se posebno ističu lipidni nanonosači, koji, za razliku od polimernih nanočestica, pokazuju dobru biokompatibilnost, biodegradabilnost i nisku imunogenost. Nanoemulzije, liposomi, čvrste lipidne nanočestice i nanostrukturirani lipidni nosači su naročito značajni, budući da imaju dugu istoriju primene kao sistemi za isporuku supstanci koje su slabo rastvorljive u vodi (Ilić i sar., 2023). Dodatno, zahvaljujući razvoju inovativnih ekscipijenasa, koji su predstavljeni u **Tabeli 1.2.1.**, a koji se vezuju za receptore na KMB, pomenuti nosači omogućavaju ciljnu i kontrolisanu isporuku lekovitih supstanci u mozak.

Liposomi su među najčešće korišćenim nosačima za isporuku lekova u mozak. Sastoje se iz jednog ili više fosfolipidnih dvosloja unutar kojih se nalazi vodeno jezgro, što znači da mogu da služe za isporuku i hidrofилnih i lipofilnih supstanci. Za pripremu liposoma se najčešće koriste fosfolipidi soje i jajeta, uz dodatak holesterola za povećanje rigidnosti stabilizacionog sloja i fizičko-hemijske stabilnosti. Nanostrukturirani lipidni nosači su vrsta lipidnih nanočestica čije je jezgro sastavljeno iz mešavine čvrstog i tečnog lipida, i za razliku od čvrstih lipidnih nanočestica, čije jezgro čine samo čvrsti lipidi, omogućavaju inkorporaciju većeg udela aktivnih supstanci, povećanu stabilnost i smanjeno curenje sadržaja tokom čuvanja. Kao čvrsti lipidi koriste se cetilpalmitat, glicerilmonostearat, stearinska kiselina i gliceril distearat, a kao tečni trigliceridi srednje dužine lanca (Ilić i sar., 2023).

Nanoemulzije (NE) su tečni sistemi kod kojih je jedna tečna faza (unutrašnja ili disperzna) dispergovana u vidu kapi u spoljšnjoj (kontinuiranoj) fazi. U zavisnosti od rasporeda faza, emulzije u osnovi mogu biti ulje u vodi (U/V), voda u ulju (V/U) ili mešovito tipa (Wilson i sar., 2022). U odnosu na druge lipidne nanonosače lekova, glavne prednosti nanoemulzija su mogućnost inkorporiranja veće količine aktivnih supstanci, kao i dobra dugotrajna stabilnost bez potrebe za dodatnim postupcima obrade. Većina sastojaka NE se već dugo koristi u parenteralnoj isporuci lekova, a same emulzije sprečavaju adsorpciju aktivnih supstanci na plasične infuzione setove i štite ih od hidrolize i oksidacione degradacije (Hörmann i Zimmer, 2016).

Tabela 1.2.1. Ligandi koji omogućavaju povećani prolazak aktivnih supstanci inkorporiranih u lipidne nanočestice kroz KMB (preuzeto i prilagođeno iz Ilić i sar., (2023))

Ligandi	Lekovite supstance	Mehanizam kojim ligandi obezbeđuju povećani prolazak kroz KMB	Napomene	Reference
Liposomi				
Glutation i PEG2000-DSPE	metotreksat	ciljanje glutationskih transportera eksprimiranih na KMB	uspešnost isporuke u mozak zavisi od izbora glavnog fosfolipida	(Hu i sar., 2019)
Katjonski lipidi (DDAB)	andrografolid	prolazak kroz KMB je omogućen apsorpcijom posredovanom transcitozom (verovatno zahvaljujući elektrostatičkim interakcijama sa negativno naelektrisanim proteinima ćelijskih membrana)	može da se koristi samostalno ili u kombinaciji sa drugim solubilizatorima	(Piazzini i sar., 2018)
Peptid RVG29	N-3,4-bis(pivaloiloksi)-dopamin	specifično vezivanje za acetilholinske receptore na endotelnim ćelijama moždanih kapilara i dopaminergičnih ćelija	peptid se vezuje za površinu liposoma reakcijom kuplovanja između PEG2000-DSPE-malimida i tiola	(Qu i sar., 2018)
Aptameri (TfRA15T)	obidoksim	vezivanje za transferinske receptore	modifikacijom sa 3'-invertovanim deoksitimidinom se poboljšava stabilnost u serumu	(Zhang i sar., 2021)
Nanoemulzije				
Polisorbat 80	risperidon, cefuroksim, hloramfenikol, aripiprazol, valproinska kiselina	povećanje preuzimanja aktivne supstance pomoću adsorpcijom posredovane endocitoze preko lipoproteinskih receptora niske gustine lociranih na enotelnim ćelijama mozga; Inhibicija P-glikoproteina	/	(Đorđević i sar., 2015; Harun i sar., 2018; Musa i sar., 2013; Samiun i sar., 2016; Tan i sar., 2017)

Ligandi	Lekovite supstance	Mehanizam kojim ligandi obezbeđuju povećani prolazak kroz KMB	Napomene	Reference
Laktoferin (Lf) (katjonski protein koji se vezuje za gvožđe) i njegove modifikacije – konjugat tiolizovanog laktoferina sa mPEG5000-MAL	indinavir, tanšinson I	receptori na nivou KMB omogućavaju laktoferinu ulazak u mozak preko endocitoze	neophodan je izvor karboksilnih grupa na stabilizacionom sloju kapi za vezivanje laktoferina	(Karami i sar., 2019; Wu i sar., 2019)
Nanočestice				
Trifenilfosfin (TPP) i RVG29	resveratrol	vezivanje za acetilholinske receptore (RVG29) i mitohondrije (preko TPP) u mozgu	kako bi se izbegla upotreba organskih rastvarača, ligandi su vezani za mPEG-DSPE	(Han i sar., 2020)
Transferin (Tf)	rapamicin, kurkumin, kvercetin	Tf se vezuje za transferinske receptore na površini endotelne ćelije	karboksilne grupe transferina se vezuju za NH ₂ grupe stearilamina, DSPE, PEG-NH ₂	(Khonsari i sar., 2021; Neves i sar., 2021; Pinheiro i sar., 2020)
OX26 konjugovan sa 3beta-[N-(N0,N0-dimetilaminoetan) karbamoi] holesterolom kao katjonskim lipidom	baikalin	OX26 monoklonsko antitelo se ciljano vezuje za transferinske receptore	OX26 je konjugovan sa katjonskim lipidom na površini PEGilovanih čvrstih lipidnih nanočestica	(Liu i sar., 2015b, 2015a)
RVG29	kvercetin	vezivanje za nikotinske acetilholinske receptore eksprimirane na endotelnim ćelijama KMB	tiolne grupe RVG29 reaguju sa maleamidskim grupama DSPE-PEG-MAL	(Pinheiro i sar., 2020)
Lf	riluzol; nimodipin	vezivanje za laktoferinske receptore eksprimirane na endotelnim ćelijama KMB	Lf se vezuje za površinu NLC preko stearinske kiseline/DSPE-PEG2000-COOH	(Teixeira i sar., 2022; Zhao i sar., 2018)

PEG2000-DSPE – 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin-N-metoksi-(polietilenglikol)-2000; DDAB – didecildimetilamonijum bromid; mPEG5000-MAL – metoksi polietilen glikol 5000 maleimid

1.3. Nanoemulzije za parenteralnu primenu

Nanoemulzije, mikro ili submikronske emulzije za parenteralnu isporuku se uglavnom formulišu kao U/V formulacije, naročito ako se radi o intravenskoj primeni. U literaturi i dalje postoji debata oko prihvatljive veličine kapi ovih sistema, mada se najčešće sreće podatak da se ona nalazi u opsegu između 100 nm i 500 nm, sa relativno uskom raspodelom veličina (Czerniel i sar., 2023). Kod intravenski primenjenih formulacija USP navodi zahtev da maksimalno 0,05% kapi može biti veće od 5 μm (USP <729>), kako bi se izbegla mogućnost pojave masne embolije (Hörmann i Zimmer, 2016). Posebna pažnja se mora posvetiti odabiru sastojaka koji ulaze u njihov sastav, pre svega zbog bezbednosti primene, a zatim i zbog postizanja ciljne isporuke. Često se kod parenteralnih formulacija pribegava korišćenju male količine solubilizatora ili organskih rastvarača kako bi se obezbedilo rastvaranje aktivnih supstanci. Međutim, ovi sastojci često dovode do pojave neželjenih reakcija. U tom kontekstu, primena nanoemulzija može poboljšati bezbednost primene lekova zato što se aktivna supstanca najčešće rastvara u ulju koje se kasnije uz dodatak vodene faze i različitih stabilizatora formuliše u biološki prihvatljive nanoemulzije. Odabir adekvatnih sastojaka masne, vodene faze i stabilizatora je ključan za postizanje ciljnih karakteristika nanoemulzionog sistema. Dodatno, formulacioni faktori i fizičko-hemijske karakteristike nanoemulzija su odgovorne i za njihovu biološku sudbinu nakon primene (Hörmann i Zimmer, 2016).

1.3.1. Komponente masne i vodene faze

Razvoj nanoemulzija počinje traženjem adekvatnog načina da se pacijentima koji se ne mogu normalno hraniti omogući unos esencijalnih masnih kiselina. Zato se u sastavu komercijalno dostupnih formulacija za ovu namenu najčešće nalaze ulja koja su bogata trigliceridima dugog lanca, odnosno onima sa ostacima masnih kiselina od 14 i više ugljenikovih atoma, kao što su sojino, riblje, maslinovo i suncokretovo ulje. Zbog postizanja adekvatnih fizičko-hemijskih karakteristika nanoemulzija, pre svega male veličine kapi, ova ulja se često kombinuju sa uljima manje gustine koja pokazuju veoma dobru tolerabilnost kod pacijenata, čak i prilikom primene velike količine formulacija (Keck i sar., 2012). Prilikom razvoja nanoemulzionih formulacija tipa U/V, jedno od prvih razmatranja jeste rastvorljivost aktivne supstance u različitim uljima, radi odabira adekvatne masne faze, čiji sastav dalje utiče na odabir ostalih sastojaka.

- **Sojino ulje** je među prvim i najčešće korišćenim uljima u formulacijama za parenteralnu primenu. Bogato je polinezasićenim masnim kiselinama, a u njegovom sastavu je najzastupljenija oleinska kiselina, koja se dodatno koristi i kao stabilizator emulzionih sistema (Kalogianni i sar., 2017; Raman i sar., 2017). Korišćenje nanoemulzija koje kao masnu fazu sadrže samo sojino ulje je dovelo do pojave bilijarne holestaze i povećanog rizika od sepse, a zahvaljujući velikom sadržaju omega-6 masnih kiselina, i do pojave imunosupresivnih efekata. Zato se u nanoemulzionim formulacijama novije generacije uglavnom kombinuje sa trigliceridima srednje dužine lanca (Raman i sar., 2017).
- **Trigliceridi srednje dužine lanca** se uglavnom izoluju iz kokosovog ulja. Oni pokazuju dobru stabilnost ka peroksidaciji, imaju manje proinflatornih efekata u poređenju sa drugim uljima i lako se metabolišu. Sa druge strane, poseduju nisku koncentraciju esencijalnih masnih kiselina pa se kod formulacija za parenteralnu ishranu najčešće kombinuju sa uljima koja sadrže trigliceride dugog lanca (Raman i sar., 2017). Prednost triglicerida srednje dužine lanca leži i u manjoj gustini u odnosu

na trigliceride dugog lanca, što znači da je gustina masne faze u koju su uključeni manja, što najčešće rezultuje manjom veličinom kapi finalne formulacije.

- **Riblje ulje** je jedini predstavnik ulja sa visokim sadržajem eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA) koje su značajne za fetalni razvoj i održavanje adekvatne kardiovaskularne funkcije (Raman i sar., 2017; Swanson i sar., 2012). Ovaj sastav obezbeđuje optimalni odnos omega-3 i omega-6 masnih kiselina što, sem osnovne funkcije isporuke esencijalnih masnih kiselina, omogućava i ostvarivanje različitih povoljnih efekata na organizam. Korisnost ovog ulja je pokazana i u terapiji holestaze kod novorođenčadi sa malom težinom na rođenju, kao i u poboljšanju postoperativne koagulacije (Wang i sar., 2021; Zou i sar., 2022).

Pored ulja, u sastav masne faze često ulaze i antioksidansi, kao što su butilhidroksitoluen (BHT) ili α -tokoferol, koji štite masne kiseline u sastavu ulja ili stabilizatora od oksidacije tokom skladištenja (Czerniel i sar., 2023). U masnu fazu se mogu dodati i korastvarači, kao što je benzil alkohol (Đorđević i sar., 2015), kako bi se omogućila povećana rastvorljivost aktivne supstance i obezbedilo povećanje njenog sadržaja u formulaciji. Preporuka regulatornih tela je da se za izradu parenteralnih formulacija koristi voda za injekcije (Komitet za medicinske proizvode za humanu upotrebu (CHMP) i Komitet za medicinske proizvode za veterinarsku upotrebu (CVMP), 2020). Međutim, u literaturi se veoma često može naći podatak da se u postupku razvoja formulacije umesto nje koristi visokoprečišćena (Milli-Q[®]) ili čak destilovana voda. Visoko prečišćena voda se dobija korišćenjem jonoizmenjivačkih i organskih filtera koji obezbeđuju niži sadržaj jona u odnosu na prečišćenu vodu, kao i bolji mikrobiološki kvalitet. Dodatno, u vodenoj fazi se takođe nalaze i sredstva za podešavanje toničnosti preparata, kao što su glicerol, natrijum-hlorid, manitol, kalijum-hlorid ili dekstroza. U vodenoj fazi ovih formulacija se još mogu naći i pufferi, kao i sredstva za podešavanje pH vrednosti preparata.

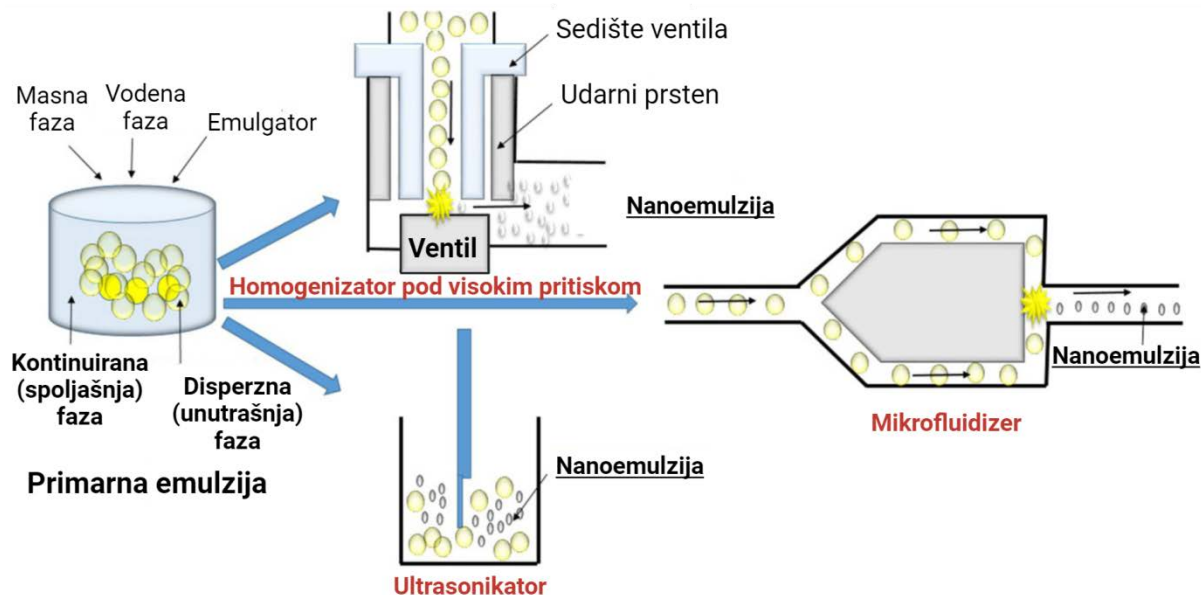
1.3.2. Stabilizatori parenteralnih nanoemulzija

U najvećem broju nanoemulzija na tržištu se kao emulgatori koriste fosfolipidi soje ili jajeta, bilo sami ili u kombinaciji sa kostabilizatorima. Fosfolipidi su molekuli prirodnog porekla koji čine deo ćelijskih membrana, a imaju i važnu ulogu u metabolizmu žuči. U tehnološkom smislu mogu da se koriste kao emulgatori, solubilizatori, pojačivači penetracije ili sredstva za kvašenje. Strukturno, fosfolipidi nastaju esterifikacijom glicerola masnim kiselinama u položaju sn-1 i sn-2, i fosfonom kiselinom dalje esterifikovanom nekim alkoholom u položaju sn-3. U zavisnosti od vrste korišćenog alkohola, fosfolipidi mogu biti: fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilglicerol ili fosfatidilserin i fosfatidilinozitol. Osim fosfolipida, emulgatori parenteralnih emulzija mogu biti i lecitini različitog porekla. Američka farmakopeja definiše lecitin kao složenu smešu koja se sastoji iz mešavine fosfolipida nerastorljivih u acetonu, kao što su fosfatidilholin, fosfatidiletanol, fosfatidilinozitol, fosfatidne kiseline i drugih materija kao što su trigliceridi, masne kiseline i ugljeni hidrati. Premda se u literaturi termini lecitin i fosfolipidi koriste gotovo kao sinonimi, predlog je da se izraz lecitin koristi kada proizvod ima manje od 80% fosfolipida u svom sastavu, a da se termin fosfolipid koristi za sastojak koji ima 80% – 100% fosfolipida. Fosfolipidi mogu biti biljnog porekla, najčešće iz različitih ulja kao što su sojino, suncokretovo ili ulje semenki lana, ili životinjskog, npr. iz jajeta ili mleka (Drescher i Van Hoogevest, 2020). Neka istraživanja su pokazala da je u toku skladištenja, lecitin jajeta skloniji hidrolizi u poređenju sa lecitinom soje, kao i da lecitin soje ima bolju oksidativnu stabilnost (Czerniel i sar., 2023). Ipak, u registrovanim preparatima je i dalje dominantno prisutan lecitin jajeta.

Koemulgatori omogućavaju dobijanje nanoemulzionih kapi male veličine, povećanje sadržaja aktivne supstance, i dodatno mogu da utiču na njeno oslobađanje, pa je pronalazak adekvatne kombinacije koemulgatora i emulgatora od velikog značaja za stabilnost i fizičko-hemijske karakteristike nanoemulzije. Sa bezbednosnog aspekta, koemulgatori mogu da izazovu hemolizu nakon intravenske primene formulacija, pa treba posebno voditi računa o koncentraciji u kojoj se koriste (Strickley, 2004). U literaturi se u kontekstu isporuke u mozak najčešće koriste polisorbitat 80 i poloksamer 188, za koje se smatra da mogu da doprinesu povećanom prolasku supstanci kroz KMB, zahvaljujući transcitozi ili endocitozi različitih proteina plazme koji se vezuju za površinu nanoemulzionih kapi nakon parenteralne primene (Đorđević i sar., 2015).

1.3.3. Postupci/tehnike za dobijanje/izradu parenteralnih nanoemulzija

Metode za dobijanje nanoemulzija mogu se podeliti na visoko i niskoenergetske postupke, u zavisnosti od količine utrošene mehaničke energije. Budući da je kod nanoemulzija za parenteralnu primenu dozvoljeno korišćenje relativno niske koncentracije stabilizatora, za njihovu pripremu se preporučuju tehnike kod kojih je potrebno uložiti značajnu mehaničku energiju za dobijanje kapi adekvatne veličine, odnosno visokoenergetske metode: mikrofluidizacija, ultrasonikacija i homogenizacija pod visokim pritiskom. Glavne prednosti ovih metoda su jednostavan *scale-up* za potrebe industrije, kao i mogućnost korišćenja bilo kog ulja, nezavisno od njegovog viskoziteta. Nedostaci leže u visokoj ceni uređaja i nastanku visokih temperatura tokom rada, što može imati negativan uticaj na termolabilne supstance (Singh i sar., 2017). Principi rada uređaja pomoću kojih se dobijaju nanoemulzije visokoenergetskim metodom su date na **Slici 1.3.1**. Kod svih ovih metoda prvo je potrebno pripremiti primarnu emulziju spajanjem masne i vodene faze. Dalje se kapi primarne, ili grube emulzije pod dejstvom različitih sila usitnjavaju do željenih veličina.



Slika 1.3.1. Dobijanje nanoemulzija visokoenergetskim metodama (preuzeto i prilagođeno iz Aswathanarayan i Vittal (2019)).

Kod pripreme nanoemulzija tehnikom mikrofluidizacije, primarna emulzija se pod visokim pritiskom, do 270 MPa, potiskuje kroz mikrokanale dimenzija 50 – 300 μm , gde dostiže brzinu protoka i do 400 m/s. Ovi kanali se dele na dve grane da bi se dobile Y ili T spojnice. U njima dolazi do sudara dve struje primarne emulzije koje se kreću u suprotnim smerovima (**Slika 1.3.1**). Ovi sudari generišu jake sile smicanja, kavitacije i turbulencije zahvaljujući

kojima dolazi do smanjenja kapi u odnosu na primarnu emulziju. Veličina kapi se može kontrolisati podešavanjem broja prolazaka kroz mikrokanale, kao i kontrolom korišćenog pritiska. Jedna od glavnih prednosti ove tehnike je mogućnost skaliranja zapremine formulacije (Aswathanarayan i Vittal, 2019; Kumar i sar., 2019; Singh i sar., 2017).

Kod metode ultrasonikacije nanoemulzije se dobijaju korišćenjem zvučnih talasa frekvencije veće od 20 kHz. Njihov izvor je piezoelektrična sonda sonikatora koja izaziva mehaničke vibracije i akustične kavitacije koje dovode do smanjenja veličine kapi (Aswathanarayan i Vittal, 2019). Nakon uranjanja u uzorak, sonda dovodi do nastanka mehurića kavitacije koji rastu sve dok ne implodiraju, što onda uzrokuje pojavu šok talasa, a generisani pritisak dovodi do smanjenja kapi. Amplituda i vreme sonikacije predstavljaju ključne procesne parametre ove metode. Ultrasonikacija se može prilagoditi različitim zapreminama formulacije koje se izrađuju odabirom sonde adekvatne veličine, ali za potrebe industrije postoje i komercijalno dostupni homogenizatori kod kojih formulacija prolazi kroz specijalnu kolonu koja generiše ultrazvučne talase (Singh i sar., 2017). Jedna od glavnih prednosti ove metode jeste lakoća čišćenja ultrazvučne sonde kao radnog elementa (Kumar i sar., 2019).

Tehnika homogenizacije pod visokim pritiskom je najčešće korišćeni način dobijanja nanoemulzija, pre svega zahvaljujući činjenici da se na ovaj način mogu pripremiti velike zapremine formulacije. Primarna emulzija se propušta kroz homogenizator, pod visokim pritiskom (10 – 100 MPa), a prilikom prolaska kroz otvor između ventila homogenizatora i njegovog sedišta (**Slika 1.3.1.**), sile turbulencije, kavitacije i hidrauličnog smicanja dovode do smanjenja veličine kapi (Kumar i sar., 2019). Formulacije se mogu pripremati kontinuiranim prolaskom kroz homogenizator, gde su kritični procesni parametri vreme homogenizacije i primenjeni pritisak, ili diskontinuiranim postupkom gde sem o pritisku homogenizacije, treba voditi računa i o broju ciklusa.

1.3.4. Parenteralne nanoemulzije na tržištu

Nanoemulzije predstavljaju atraktivan sistem za isporuku, pre svega, lipofilnih supstanci koje mogu biti solubilizovane u uljanim kapima, ali do sada nije registrovan veliki broj ovih formulacija namenjenih za parenteralnu primenu. Neke su navedene u **Tabeli 1.3.1.**

Tabela 1.3.1. Registrovane NE za parenteralnu isporuku aktivnih supstanci

Registrovani naziv	Aktivna supstanca	Indikacija	Proizvođač
Liple®	alprostadil palmitat	vazodilatacija, inhibicija agregacije trombocita	Mitsubishi Tanabe Pharma
Cleviprex®	klevidipin	blokator kalcijumovih kanala	The Medicines Company
Limethasone®	deksametazon palmitat	reumatoidni artritis	Mitsubishi Tanabe Pharma
Diazelmus®	diazepam	sedativ	Actavis Nordic
Etomidat-Lipuro®	etomidat	anestetik	Braun Melsungen
Lipfen®	flurbiprofen aksetil	nesteroidni analgetik	Green Cross
Diprivan®	propofol	anestetik	Astra Zeneca

Preuzeto i prilagođeno iz Hörmann i Zimmer (2016)

Glavne prepreke na putu ovih formulacija ka tržištu su vezane za njihov razvoj, *scale up*, i karakterizaciju finalnog proizvoda. Za dobijanje dozvole za stavljanje leka u promet je potrebno pre svega razviti robustan proces proizvodnje koji rezultuje dobijanjem malih kapi uniformne raspodele, pa se većina nanoemulzija prisutnih na tržištu dobija kombinacijom rotor stator homogenizacije i homogenizacije pod visokim pritiskom. Sve formulacije koje se stavljaju na tržište moraju biti adekvatno i detaljno okarakterisane u pogledu veličine kapi, površinskog napona, stabilnosti i sadržaja aktivne supstance. Specifični vodič FDA za intravenske emulzije klivedipina (engl. *Product Specific Guidelines*, PSG) preporučuje dvostruko ukrštene studije bioekvivalencije za generičke proizvode, ali navode da se *in vivo* ispitivanje bioekvivalencije može izbeći (*biowaiver*) u slučaju kvalitativno i kvantitativno sličnog proizvoda (*Q1/Q2*), na osnovu prihvatljive fizičko-hemijske karakterizacije, sprovedene populacione studije bioekvivalencije i testa poređenja *in vitro* oslobađanja testiranog i referentnog proizvoda (Panchal i sar., 2023).

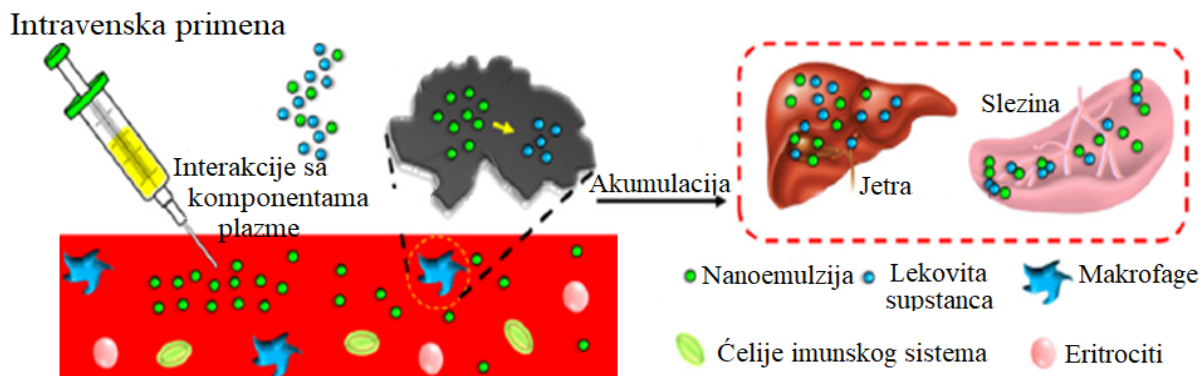
1.4. PEGilovanje

Derivati PEG su široko zastupljeni, pa ih sem u farmaceutskoj industriji, ima i u kozmetičkim proizvodima, kućnoj hemiji i procesovanoj hrani (Yang i sar., 2016). U farmaceutskoj industriji se koriste polietilenglikoli različitih molekulskih masa za različite namene: u lubrikaciji i granulaciji (PEG 1450-8000), kao laksativi (PEG 3350-4000), u izradi polučvrstih preparata (PEG 400-700) ili želatinskih kapsula (PEG 300-1450) (D'souza i Shegokar, 2016). PEGilovanje označava vezivanje polietilenglikola (PEG) za različite aktivne ili pomoćne supstance i predstavlja jednu od najčešće primenjivanih modifikacija sistema za isporuku lekovitih supstanci, pre svega u cilju postizanje produženog vremena cirkulacije aktivnih supstanci i povećanja njihove koncentracije na ciljnom mestu delovanja.

1.4.1. Biološka sudbina nanonosača nakon parenteralne primene

Jedan od glavnih razloga slabog uspeha nanoformulacija da nakon parenteralne primene isporuče aktivne supstance do ciljanog mesta delovanja je brzo uklanjanje iz sistemske cirkulacije. Smatra se da samo oko 1% injektovanih nanočestica i dospeva u mozak (Keck i sar., 2012). Kada se nanonosači nađu u krvnim sudovima nakon parenteralne primene, oni stupaju u interakcije sa različitim proteinima plazme i komponentama mononuklearnog fagocitnog sistema (MFS), koje ih prepoznaju kao strano telo i teže da ih uklone iz cirkulacije. Vrsta proteina koji se vezuju, kao i stepen njihovog vezivanja utiču na dalju biološku sudbinu nosača i zavise od njegove prirode – veličine, vrste stabilizatora i kostabilizatora koji dolaze u direktan kontakt sa proteinima. Obično se velike, nenaelektrisane ili pozitivne čestice brže uklanjaju iz cirkulacije u poređenju sa onima koje su manje ili negativno naelektrisane (Hörmann i Zimmer, 2016; Keck i sar., 2012).

Proteini koji se vezuju za površinu nanonosača nakon parenteralne primene čine njegovu proteinsku koronu, a proces vezivanja počinje vrlo brzo nakon ulaska čestica u cirkulaciju. Ako se za površinu nanonosača vežu opsonini, kao što su imunoglobulini, apolipoproteini ili komponente komplementa, onda ovakvi sistemi pokazuju veću sklonost ka fagocitozi i preuzimanju od strane cirkulišućih makrofaga i posledičnom brzom uklanjanju iz cirkulacije. Nakon fagocitoze, nanočestice se preuzimaju u organe mononuklearnog fagocitnog sistema, pre svega u jetru ili slezinu, i tu se akumuliraju (**Slika 1.4.1.**), čime se otežava isporuka aktivnih supstanci na mesto delovanja. Zato je potrebno pronaći način da se produži njihovo zadržavanje u cirkulaciji, a jedan od načina za ostvarivanje ovog cilja je PEGilovanje, odnosno korišćenje sastojaka koji sadrže jedinice polietilenglikola.



Slika 1.4.1. Sudbina nanoemulzija i inkorporirane lekovite supstance nakon parenteralne primene (preuzeto i prilagođeno iz Singh i sar. (2017))

1.4.2. PEGilovani derivati

Derivati polietilenglikola su nastali povezivanjem jedinica etilenglikola u linearne ili razgranate strukture različitih molekulskih masa. Ovi polimeri vezuju za sebe molekule vode i tako formiraju štit od delovanja opsonina plazme, enzimske degradacije, brzog uklanjanja iz cirkulacije i obezbeđuju smanjenje imunogenosti molekula za koji su vezani (Harris i Chess, 2003). Ova strategija je prvobitno korišćena u konjugaciji lanaca PEG i molekula aminokiselina, najčešće lizina, za čije se amino grupe vezuju nakon prethodne pripreme molekula karbonatnim, aldehidnim ili estarskim funkcionalnim grupama. Međutim, kod prve generacije PEGilovanih agenasa se često javljaju problemi u vidu formiranja izomera različitih molekulskih masa, pre svega zbog vezivanja za obe amino grupe lizina, što je uticalo na nedovoljnu reproducibilnost serija i pojavu loših kliničkih ishoda. Dodatno, ove proizvode je karakterisala i linearna priroda PEG, nestabilna veza između PEG i peptida, što je dovelo do pojave neaktivnih agregata, dok relativno mala molekulaska masa PEG polimera nije postizala adekvatnu *in vivo* zaštitu. Međutim, na tržištu se i dalje nalaze neki od proizvoda sa ovom generacijom PEG derivata, kao što je Adagen®, prvi registrovani PEGilovani proizvod koji je FDA odobrila 1990. za lečenje teške kombinovane imunodeficijencije (Swierczewska i sar., 2015). Drugu generaciju PEGilovanih proteina čine PEGilovani molekuli većih molekulskih masa koji imaju unapređene farmakokinetičke i farmakodinamske karakteristike u odnosu na prethodnike. Menja se i mesto PEGilovanja, koje je za novije derivate uglavnom tiolna grupa cisteina, ali i sama struktura PEG polimera koji su razgranati i imaju veću molekulsku masu u odnosu na ranije (do 60 kDa u poređenju sa 12 kDa) (Harris i Chess, 2003).

Nakon uspešnog korišćenja PEGilovanja kod proteina, isti pristup je primenjen i kod nanonosaa. U ovu svrhu se najčešće koriste PEGilovani fosfolipidi (PEG-FL), koji su površinski aktivni, budući da su za hidrofilnu glavu vezani lanci PEG, a lipofilni rep čine fosfolipidni ostaci. PEG-FL se koriste kao stabilizatori različitih nanonosaa, kao što su liposomi i lipidne nanočestice. Jedna od prvih liposomalnih formulacija na tržištu, Doxil®, ima u svom sastavu PEGilovani fosfolipid (PEG2000-DSPE), kao i Modernina vakcina za COVID-19 (PEG2000-DMG – dimiristoil glicerometoksi polietilenglikol-2000) (Tenchov i sar. 2023). Inkorporiranjem PEGilovanih fosfolipida u formulaciju formira se zaštitni omotač oko nanonosaa koji povećava njihovu fizičko-hemijsku stabilnost, smanjuje interakcije sa proteinima plazme, omogućava duže zadržavanje u cirkulaciji i povećava mogućnost isporuke aktivne supstance na ciljno mesto delovanja, odnosno postiže se pasivno ciljanje.

Kod nanoemulzija, PEGilovanje nije toliko često korišćeno, iako dosadašnja istraživanja pokazuju da PEGilovani fosfolipidi poboljšavaju stabilnost i farmakokinetičke performanse osnovnih formulacija. Primeri PEGilovanih ekscipijenasa korišćenih za modifikaciju nanoemulzija su dati u **Tabeli 1.4.1**. Kao što se može videti, PEGilovani fosfolipidi su korišćeni kako bi se poboljšale farmakokinetičke karakteristike aktivnih supstanci za različite indikacije, a tek je par istraživanja posvećeno istraživanju potencijala PEGilovanih fosfolipida u lečenju stanja koja zahvataju centralni nervni sistem, kao što je terapija demencije povezana sa infekcijom HIV, sa indinavirom kao aktivnom supstancom (Kandadi i sar., 2011), i hipoksično-ishemijske povrede mozga kod novorođenčadi, sa melatoninom kao aktivnim principom (Molska i sar., 2020), što ukazuje na potencijal ove vrste modifikacije nanoemulzija u ciljanoj isporuci lekova u mozak, ali i ostavlja prostora za dalje istraživanje.

Tabela 1.4.1. Derivati PEG korišćeni za PEGilovanje nanoemulzija

Derivat PEG	Aktivna supstanca	Željena terapijska primena	Reference
PEG2000-DSPE*	17- β -estradiol i C6-ceramid	Arterijska stenoza – deluje na glatke mišićne ćelije krvnih sudova	(Deshpande i sar., 2013)
	Hlorambucil	Adenokarcinom kolona	(Ganta i sar., 2010)
	Brucin	Karcinom	(Elsewedy i sar., 2021)
	Tokotrienolima bogata frakcija palminog ulja	Karcinom	(Alayoubi i sar., 2013)
	Citrusisani antigen (CitP) i rapamicin	Reumatoidni artritis	(Li i sar., 2021)
	Taksoid DHA-SBT-1214	Karcinom	(Ahmad i sar., 2018)
	Melatonin	Hipoksično-ishemijska povreda mozga kod novorođenčadi	(Molska i sar., 2020)
PEG2000-DSPE i PEG5000-DPPE**	Indinavir	Demencija povezana sa AIDS-om	(Kandadi i sar., 2011)
PEG2000-DSPE, PEG5000-DSPE i PEG10000-DSPE	Alprostadil (Prostaglandin E1)	Periferna arterijska okluzivna bolest, plućna arterijska hipertenzija, hipertenzija	(Cheng i sar., 2016)
PEG2000-DSPE i PEG2000-DSG***	Amfotericin B	Oportunističke gljivične infekcije	(Esson i Mecozzi, 2020)

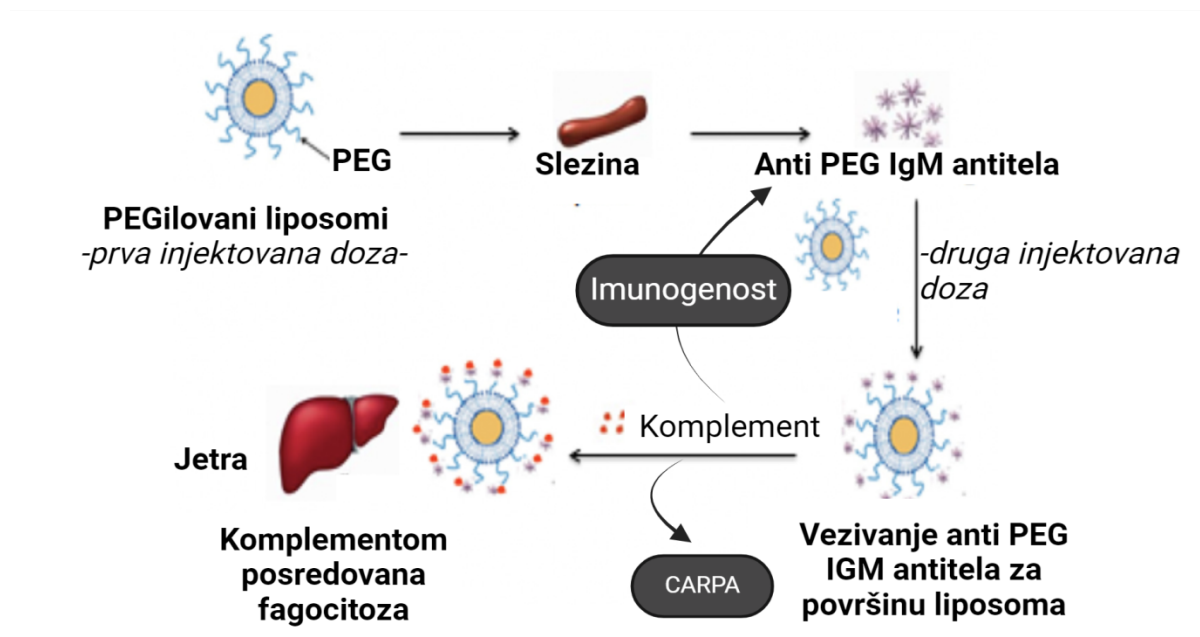
*PEG2000-DSPE – 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin-N-metoksi-(polietilenglikol)-2000; **PEG5000-DPPE- 1,2-dipalmitoil sn-glicero-3-fosfatidiletanolamin; 1,2-distearoil glicero-3-metilpolioksietilen

Najčešće korišćen PEGilovani fosfolipid u pripremi PEGilovanih nanoemulzija je PEG2000-DSPE, koji ima dugu istoriju primene kod formulacija prisutnih na tržištu (Tenchov i sar.,

2023). Liu i Liu (Liu i Liu, 1995) su pokazali da ova dužina lanca PEG pruža istu zaštitu kapima u cirkulaciji kao i molekul sa 5000 PEG jedinica, a bolju u odnosu na molekul sa 1000 ostataka PEG. Dodatno, veći broj PEG jedinica znači i veći viskozitet formulacija, otežanu injektabilnost i smanjenu bezbednost prilikom primene, pa je poželjno koristiti derivat sa najmanjim brojem PEG jedinica koji pruža adekvatnu zaštitu površine.

1.4.3. Bezbednost primene PEG derivata

Kod ponovljene intravenske primene formulacija sa PEGilovanim derivatima uočeno je smanjenje vremena cirkulacije aktivne supstance. Ovo se pripisuje pojavi neočekivanog imunološkog odgovora na PEG jedinice i označava se kao fenomen ubrzanog klirensa iz plazme (engl. *accelerated blood clearance*, ABC). Smatra se da se nakon prve primene javljaju antitela na PEG jedinice, pa se nakon ponovljene primene PEGilovane formulacije brže prepoznaju, uklanjaju iz cirkulacije i akumuliraju u jetri (**Slika 1.4.2**), čime se može smanjiti efikasnost inkorporiranog leka (Su i sar., 2018; Yang i sar., 2016). Međutim, anti-PEG antitela, anti-PEG IgG i anti-PEG IgM, su pronađena i kod osoba koje ranije nisu primale lekove sa PEGilovanim agensima, što se verovatno može pripisati njihovoj širokoj rasprostranjenosti. Interesantan je podatak da su anti-PEG antitela pronađena i u serumima sakupljenim između 1970. i 1999. godine, što ukazuje na dugovečnost ovog fenomena (Yang i sar., 2016).



Slika 1.4.2. Sudbina PEGilovanih nanonosaa (liposoma) nakon ponovljenog injektovanja i mehanizam imunogenosti i nastanka preosetljivosti (preuzeto i prilagođeno iz Kozma i sar. (2020)).

Smatra se da rastvor čistog PEG ne pokazuje značajnu imunogenost, već da se ona javlja nakon konjugacije PEG sa makromolekulima ili sistemima za isporuku lekovitih supstanci. Faktori koji utiču na imunski odgovor su dužina lanaca PEG, njihova razgranatost i hemijska priroda terminalnih grupa. Na prirodu imunogenog odgovora značajno utiče i molekul za koji su vezani, pa je on u slučaju PEG-ilovanih derivata proteina uglavnom zavisian od T-ćelija, dok je u slučaju sistema za isporuku lekovitih supstanci pretežno nezavisian od T-ćelija (Kozma i sar., 2020).

Osim ABC fenomena, nakon primene PEGilovanih derivata mogu se javiti i reakcije preosetljivosti, koje za posledicu imaju po život opasne (pseudo) alergijske reakcije. Jedan od mehanizama reakcija preosetljivosti je i pseudoalergija posredovana aktivacijom komplementa (engl. *C-activation-related pseudoallergy*, CARPA), (Slika 1.4.2), koja se može odvijati klasičnim, alternativnim i lecitinskim putem, u zavisnosti od prirode PEG derivata. Pojava ozbiljnih alergijskih reakcija je do sada dovela do povlačenja tri proizvoda sa tržišta. Međutim, iako PEGilovani derivati mogu dovesti do pokretanja imunskog odgovora, i dalje postoji veliki broj varijabli koje mogu da utiču na biološku sudbinu PEGilovanih nosača za isporuku lekova, kao što su karakteristike samog nosača i imunološki faktori pacijenata, pa je potrebno razmotriti svaku novu formulaciju radi razjašnjavanja kompleksne biološke sudbine PEGilovanih nosača. **Za sada je poznato da imunski odgovor zavisi od gustine derivata PEG na površini nosača, a da ga previsoka koncentracija može ubrzati** (Kozma i sar., 2020). Dodatno, **visoka koncentracija PEGilovanih fosfolipida može dovesti do porasta viskoziteta formulacija i problema prilikom injektovanja**. Zato je potrebno adekvatno opisati stepen zaštite koju lanci PEG pružaju površini čestica, odnosno odabrati optimalnu količinu PEG derivata koja će sa jedne strane zaštititi nosač, a sa druge neće izazvati snažan imunološki odgovor organizma. Stepen zaštite koju lanci PEG pružaju površini nosača naziva se **efikasnost PEGilovanja**.

1.4.4. Procena efikasnosti PEGilovanja kod nanonosaa

Uspeh strategije PEGilovanja zavisi pre svega od njihove gustine na površini nanonosaa. Stoga je jasna potreba za metodama koje će uspešno okarakterisati, bilo gustinu PEG derivata na nanonosaa ili njihovu konformaciju, u cilju obezbeđivanja adekvatne efikasnosti PEGilovanja. Krajnji cilj ovih metoda je odabir adekvatne koncentracije PEGilovanog ekscipijensa koji će obezbediti optimalne karakteristike nanonosaa.

1.4.4.1. Računska metoda – procena konformacije PEG lanaca

Lanci PEG na površini nanonosaa mogu zauzimati **konformaciju četke ili pećurke**, u zavisnosti od **debljine PEG omotača (L)**, **površine nanonosaa koju jedan lanac PEG može zaštititi (A)** i **rastojanja između mesta na kojima su lanci PEG usidreni za površinu nanonosaa (D)** (Slika 1.4.3.)

Vrednost ovih parametara se može izračunati preko **jednačina 1-3** (Alayoubi i sar., 2013):

$$L = \frac{N\alpha^{5/3}}{D^{2/3}} \quad (\text{jednačina 1})$$

$$A = \frac{6M_{PEG}}{dN_A f \rho} \quad (\text{jednačina 2})$$

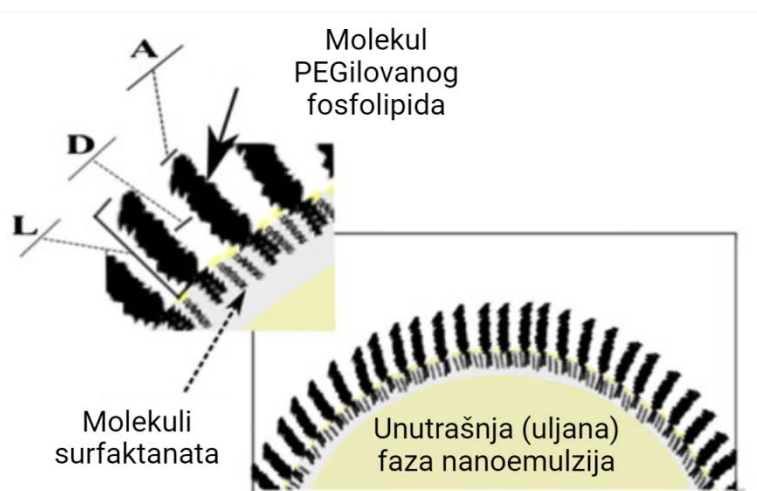
$$D = 2\sqrt{\frac{A}{\pi}} \quad (\text{jednačina 3})$$

Gde je N broj monomera u polimernom lancu, α dužina jednog monomera, M_{PEG} molekulska masa PEGilovanog dela molekula, d je prečnik čestica, N_A Avogadrov broj, f je maseni udeo PEG u kapi nanoemulzije, a ρ je njena gustina. Na osnovu ovih parametara može se izračunati Florijev prečnik (R_F) prema **jednačini 4**:

$$R_F = \alpha N^{3/5} \quad (\text{jednačina 4})$$

Konformacija koju zauzimaju PEG lanci može se odrediti na osnovu odnosa parametara R_F i D . Ako je $D < 2 R_F$ u pitanju je **konformacija pećurke** koja označava slabiju pokrivenost, dok $D < R_F$ ukazuje da se radi o **konformaciji četke**, odnosno da lanci PEG gusto prekrivaju površinu nanonosaa, pružajući bolju sternu zaštitu (Alayoubi i sar., 2013; Nicholas i sar.,

2000). Iako ova metoda omogućava procenu efikasnosti PEGilovanja pre izrade PEGilovanih formulacija, ona ima brojne nedostatke. Pre svega, veoma je teško izračunati parametre koju su od značaja za procenu konformacije – npr. PEGilovani derivati su polimeri varijabilne molekulske mase često izražene kao približna vrednost, pa je i udeo PEG ostatka u kapima NE (f) teško proceniti. Dodatno, podaci o prečniku kapi često variraju u zavisnosti od korišćene tehnike karakterizacije. Ova metoda ne uzima u obzir mogućnost prisustva aktivne supstance u stabilizacionom sloju formulacije, što može imati značajan uticaj na dodatke stabilizacione faktore, kao što su PEGilovani fosfolipidi.



Slika 1.4.3. Parametri na osnovu kojih se može izračunati konformacija lanaca PEG na površini nanoemulzija (preuzeto i prilagođeno iz Alayoubi i sar. (2013))

1.4.4.2. Merenje zeta potencijala

Zeta potencijal odražava elektrostatički potencijal na ravni smicanja između Sternovog sloja i difuznog sloja jona oko naelektrisanih nanonosaa i karakteriše površinsko naelektrisanje nanonosaa. Vrednosti zeta potencijala se računaju na osnovu Henrijeve jednačine (jednačina 5):

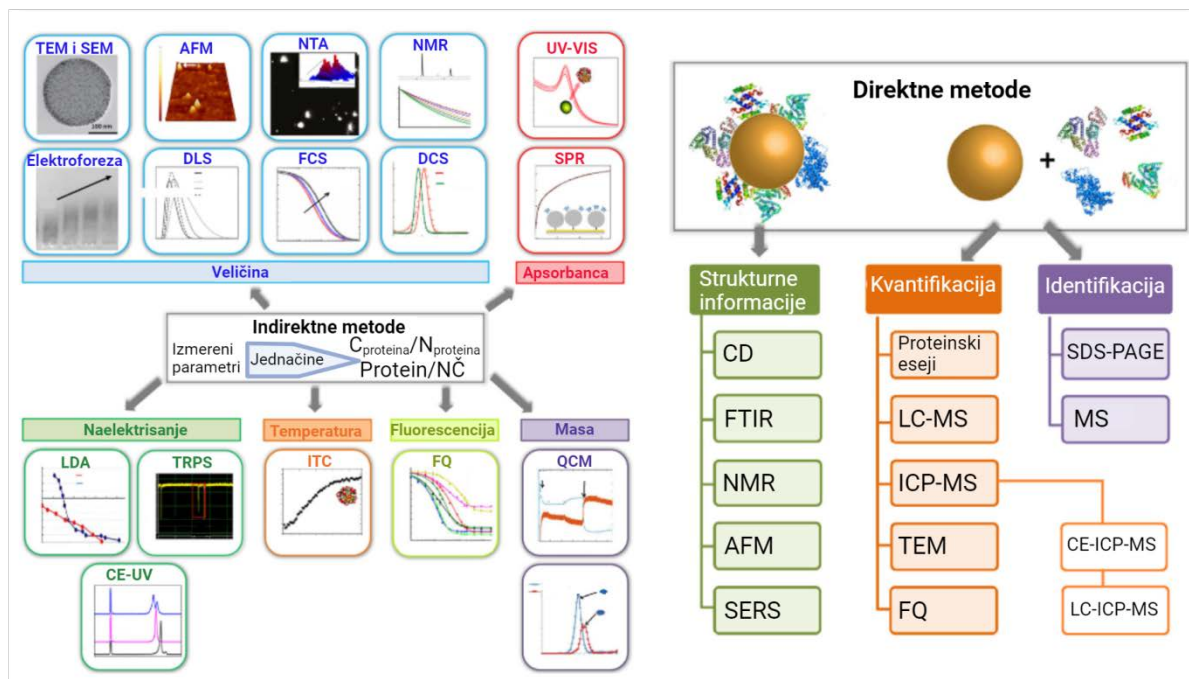
$$U_e = \frac{2\varepsilon z f(\kappa a)}{3\eta} \quad (\text{jednačina 5})$$

gde U_e predstavlja elektroforetsku pokretljivost nanonosaa, z je zeta potencijal, ε vrednost dielektrične konstante, κa je mera odnosa prečnika čestica i *Debye* dužine, $f(\kappa a)$ je Henrijeva funkcija, a η nulti viskozitet medijuma u kome se ispituje rastvorljivost, odnosno viskozitet medijuma kada brzina smicanja teži nuli (Clogston i Patri, 2011). Merenje zeta potencijala je jedna od standardnih metoda karakterizacije nanonosaa, a njegova apsolutna vrednost predstavlja dobar pokazatelj dugoročne stabilnosti formulacija. Kod nanoemulzija koje su napravljene sa lecitinom kao glavnim stabilizatorom očekuju se negativne vrednosti zeta potencijala, niže od -30 mV. Uvođenje PEGilovanih fosfolipida, odnosno PEG lanaca na površini kapi treba da dovede do sniženja apsolutnih vrednosti zeta potencijala, budući da PEG derivati pružaju sternu zaštitu kapi i izoluju negativno naelektrisanu površinu formulacija stabilizovanih fosfolipidima. Kako koncentracija jona u Sternovom sloju i pratećem difuzionom sloju opada, elektroforetska pokretljivost se smanjuje, a vrednosti zeta potencijala takođe opadaju. Najmanja koncentracija PEGilovanog fosfolipida koja dovodi do postizanja platoa vrednosti zeta potencijala predstavljala bi optimalnu koncentraciju tog PEGilovanog derivata (Devalapally i sar., 2015). Iako je ova metoda jednostavna i laka za izvođenje, nije dovoljno osetljiva, pa promene u koncentraciji PEGilovanih fosfolipida ne moraju uvek biti oslikane u vrednostima zeta potencijala, kako je i pokazano u studiji koju su

sproveli Kandadi i saradnici (Kandadi i sar., 2011), gde je porast udela PEGilovanih fosfolipida doveo do porasta apsolutnih vrednosti zeta potencijala.

1.4.4.3. Vezivanje za proteine

Budući da je jedan od glavnih ishoda PEGilovanja zaštita površine kapi od interakcija sa proteinima, efikasnost PEGilovanja se može proceniti i na osnovu vrste i količine proteina koji se vezuju za površinu nosača, odnosno na osnovu formirane proteinske korone. Metode koje se koriste za njenu karakterizaciju su predstavljene na **Slici 1.4.4.**



Slika 1.4.4. Direktna i indirektna metoda korišćene za procenu proteinske korone nanočestica (NČ). AFM – mikroskopija atomskim silama; CD – cirkularni dihiroizam, DCS – diferencijalna centrifugalna sedimentacija; DLS – dinamičko rasipanje svetlosti; FCS – fluorescentna korelaciona spektroskopija; FTIR – infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom; FQ – gašenje fluorescencije; ICP – induktivno spregnuta plazma; ITC – izotermalna titraciona kalorimetrija; LDA – laser-dopler anemometrija; MS – masena spektrometrija; NMR – nuklearna magnetna rezonanca; NTA – analiza praćenja nanočestica; SDS-PAGE – elektroforeza u poliakrilamidnom gelu; QCM – kvarcna mikrovaga; SDS – natrijum dodecil sulfat; SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija; SERS – površinski pojačana ramanska spektroskopija; SPR – površinska plazmonska rezonanca; TEM – transmisiona elektronska mikroskopija; TRPS – *tunable resistive pulse sensing* (preuzeto i prilagođeno iz Zarei i Aalaie (2019))

Od svih pomenutih metoda, tehnika gel elektroforeze se izdvaja po tome što je jednostavna, jeftina i laka za upotrebu, a posebno se sistemi elektroforeze sa natrijum dodecil sulfatom (SDS) u poliakrilamidnom gelu često koriste za identifikaciju proteina vezanih za nanočestice (Elsewedy i sar., 2021; Schmidt i Muller, 2003). Ova metoda se može povezati sa masenom spektrometrijom radi dobijanja kvantitativnih informacija o sastavu korone (Zarei i Aalaie, 2019). Vezivanje proteina za površinu nanonosaa se najbolje procenjuje nakon inkubacije sa mešavinom sa više različitih vrsta proteina, zato što se za površinu nosača prvo vezuju proteini prisutni u najvećoj koncentraciji, koji kasnije tokom inkubacije bivaju zamenjeni proteinima sa većim afinitetom za površinu nanonosaa, prisutnim u nižoj koncentraciji u matriksu (Vromanov efekat). Obrazac adsorbovanih proteina se može analizirati tehnikom

dvodimenzionalne poliakrilamidne gel elektroforeze (engl. *two-dimensional gel electrophoresis*, 2D PAGE), koja omogućava razdvajanje proteina vezanih za nanonosae na osnovu njihove molekulske mase i izoelektrične tačke (engl. *isoelectric point*, pI) (Keck i sar., 2012; Li i sar., 2010). Ova tehnika je zahtevna, pre svega zbog mogućih artefakata koji mogu da otežaju analizu i tumačenje rezultata. Neki od ključnih koraka u analizi su (Keck i sar., 2012):

1. **Izbor inkubacionog medijuma:** idealno, puna krv, naročito ako se radi o formulacijama za intravensku primenu. Međutim, sa jedne strane je teško razdvojiti krvne ćelije od nanoemulzionih kapi, a sa druge, monociti pune krvi mogu dovesti do fagocitoze nanoemulzija i dati lažnu sliku vezivanja za proteine. Što se tiče izbora između plazme i seruma, prednost se obično daje plazmi, zbog manjeg uticaja komponenata komplementa i fibrinogena na adsorpciju proteina u odnosu na serum. Preporučuje se izbegavanje korišćenja makromolekula, kao što je heparin, za sprečavanja koagulacije, pošto se i oni mogu vezati za površinu nosača i sprečiti vezivanje proteina plazme, pa se prednost u ovom slučaju daje puferima, npr. citratnom.
2. **Odabir životinjske vrste za uzorkovanje biološkog materijala:** proteinski sastav plazme se razlikuje od vrste do vrste, pa je preporučljivo raditi sa plazmom životinja sa kojima se planira prospektivna *in vivo* studija.
3. **Odnos formulacije i inkubacionog medijuma:** kako bi se doneo relevantan zaključak, potrebno je koristiti odgovarajući odnos formulacije i biološkog medijuma, radi sticanja realne slike o sudbini nanonosaa nakon parenteralne primene. Posebnu pažnju treba obratiti na udeo nanoemulzionih kapi u formulaciji, a za nanoemulzije gde je udeo masne faze 10 – 20 %, *m/V*, preporučuje se odnos formulacije i plazme 1:3, *v/v*.
4. **Vreme inkubacije:** jedan od ključnih parametara koji utiče na dobijeni obrazac vezivanja proteina, ovo vreme se odnosi ne samo na inicijalni kontakt sa plazmom, nego i na vreme potrebno za sprovođenje ostalih koraka, kao što je uklanjanje viška biološkog materijala i ispiranje, budući da i tokom njih može doći do promena u vezivanju proteina. Stoga je potrebno obezbediti isto vreme inkubacije za sve uzorke, a najčešće inicijalno vreme kontakta između nanoemulzija i plazme traje 5 minuta.
5. **Tehnika separacije:** nakon inkubacije, potrebno je ukloniti višak biološkog materijala, odnosno proteine koji se nisu vezali za nanonosaa. U tu svrhu se koristi više metoda, kao što su hromatografske tehnike ili odvajanje magnetnim poljima, ali najčešće centrifugiranje. U ovoj fazi može doći do otežanog formiranja taloga/peleta, naročito ako se radi o kapima male veličine koje se ne mogu lako istaložiti, čak ni u kompleksu sa proteinima.
6. **Medijum za ispiranje i broj ispiranja:** pelet zaostao nakon centrifugiranja je potrebno isprati kako bi se uklonili svi tragovi viška biološkog materijala. Izbor medijuma igra važnu ulogu – neki proteini su manje rastvorljivi u vodi, pa ako se u ispiranju koristi samo voda, to može navesti na pogrešne zaključke o vrsti proteina koji se vezuju za nanoemulzione kapi. U ovu svrhu se prvenstveno koristi fosfatni pufer pH vrednosti 7,4.
7. **Broj ponavljanja:** kako bi se obezbedila veća pouzdanost dobijenih rezultata, potrebno je raditi više ponavljanja za jedan uzorak. Zbog cene metode i njene kompleksnosti, obično su 3 ponavljanja dovoljna.

Nakon odvajanja proteina, dodatno se može sprovesti i kvantitativna analiza pomoću različitih softverskih paketa (Li i sar., 2010). Koncentracija PEGilovanog agensa sa kojom formulacija ostvaruje najmanje interakcija sa proteinima bila bi optimalna za dalja istraživanja. Iako je rasvetljavanje vrste i količine proteina koji se vezuju za površinu

nanonosaa ključno za njihovu sudbinu nakon primene i postizanje ciljnog efekta, ova metoda nije pogodna za rutinsko izvođenje u fazi formulacionog razvoja, odnosno za procenu efikasnosti PEGilovanja.

1.4.4.4. Farmakokinetičke studije

Studije farmakokinetike podrazumevaju primenu formulacija na eksperimentalnim životinjama i praćenje koncentracije aktivne supstance u tkivima ili organima od interesa u određenom vremenskom periodu. One predstavljaju zlatni standard za procenu doprinosa formulacije sudbini lekovite supstance u organizmu. Efikasnost PEGilovanja se može proceniti nakon injektovanja PEGilovanih formulacija sa različitim koncentracijama PEGilovanih fosfolipida i analize dobijenih farmakokinetičkih parametara kao što su maksimalna koncentracija leka u plazmi, ili površina ispod krive (engl. *area under the curve*, AUC), volumen distribucije ili klirens. Ovaj pristup je primenjen kod parenteralnih nanoemulzija sa danazolom, gde je **koncentracija PEG2000-DSPE koja postiže najmanji klirens i volumen distribucije, a najveću AUC vrednost aktivne supstance smatrana za optimalnu, odnosno za onu sa najboljom efikasnošću PEGilovanja** (Devalapally i sar., 2015). Sprovođenje farmakokinetičke studije, iako neophodno za sagledavanje biološke sudbine formulacije, treba čuvati za procenu optimizovanih formulacija, u skladu sa 3R principima (engl. *replacement, reduction, refinement*, 3R) (Hubrecht i Carter, 2019).

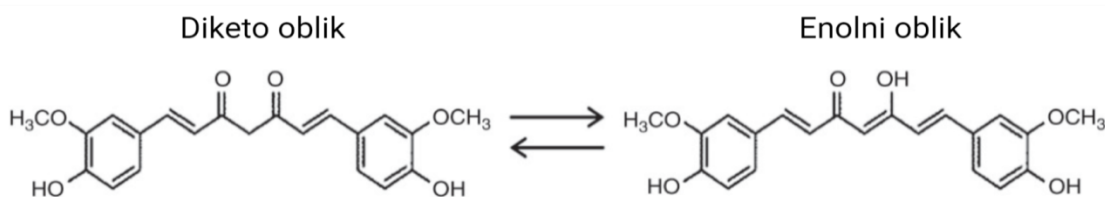
1.5. Kurkumin

Kurkuma je začin poreklom iz rizoma biljke *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*), koja ima dugu istoriju primene u tradicionalnoj indijskoj i kineskoj medicini. Glavni aktivni principi kurkume su kurkuminoidi: kurkumin (oko 75 % kurkuminoida), demetoksi kurkumin (oko 15 %) i bisdemetoksi kurkumin (oko 5 %). U Evropskoj farmakopeji su oficinalne dve biljne droge koje sadrže kurkumin - *Curcuma xanthorrhizae rhizoma* i *Curcuma longae rhizoma* (Ph. Eur. 11.5). Prema podacima Evropske agencije za lekove, one se tradicionalno upotrebljavaju za ublažavanje simptoma digestivnih tegoba, nadutosti i otežanog varenja zahvaljujući holagoškom delovanju, najčešće u formi biljnog čaja ili čvrstih/tečnih oblika biljnih preparata za oralnu primenu (*Community herbal monograph on Curcuma xanthorrhiza Roxb. (C. xanthorrhiza D. Dietrich), rhizoma*). Američka agencija za hranu i lekove mu je dodelila GRAS status (engl. *generally recognized as safe*, GRAS) (Yallapu i sar., 2015). Kurkumin je predmet naučnog interesovanja zahvaljujući svojim antiinflamatornim, antioksidantnim, antidepresivnim, antineoplastičnim, antiepileptičkim, neuroprotektivnim, imunomodulatornim, antivirusnim i antiproliferativnim efektima (Babaei i sar., 2020; Mandal i sar., 2020). Njegov terapijski potencijal je ispitivan, između ostalog, kod više vrsta kancera, plućnih bolesti, Alchajmerove bolesti, sepse i infekcije korona virusom (Babaei i sar., 2020; Feng i sar., 2017; Karimi i sar., 2016; Lelli i sar., 2017; Tang i Taghibiglou, 2017). Efikasnost kurkumina kao aktivne supstance je ispitana u većem broju kliničkih studija, kojih je samo u poslednjih 5 godina (od 1.1.2018. do 31.12.2023. godine) bilo 159 (https://clinicaltrials.gov/search?intr=Curcumin&start=2018-01-01_&viewType=Table&page=1). Upotreba kurkumina u lečenju različitih bolesti i stanja se može objasniti njegovim efektima na mnogobrojne signalne puteve i receptore (Mandal i sar., 2020). Sa druge strane, poslednjih godina sve više pažnje posvećuje se i nepovoljnim karakteristikama kurkumina kao aktivne supstance, pa se u literaturi označava kao pan-esej interferirajuća supstanca (engl. *pan-assay interference compound*, PAINS) i metabolički nevažeci lek (engl. *invalid meabolic panaceas*, IMPs). Smatra se da kurkumin pripada PAINS grupi jedinjenja zbog sklonosti ka heliranju jona metala, strukturnoj degradaciji, disrupciji membrana i interferenciji sa fluorescencijom, zbog čega treba posebno voditi

računa o uslovima u kojima se sam kurkumin, ili njegove formulacije ispituju, kako bi se doneli pravi zaključci o ostvarenim efektima (Nelson i sar., 2017).

1.5.1. Fizičko-hemijske karakteristike

Kurkumin je bis- α,β -nezasićeni β keton hemijskog imena (*E,E*)-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion, mada je komercijano dostupan kurkumin najčešće u smeši sa demetoksi i bisdemetoksi derivatima. Osetljiv je na svetlost, nestabilan u neutralnoj i baznoj sredini i podleže keto-enolnoj tautomeriji (**Slika 1.5.1.**) (Subramani i sar., 2017). U fizološkim uslovima enolni i diketo oblik kurkumina su u ravnoteži. U čvrstom obliku, kao i pod neutralnim i kiselim uslovima, dominira keto oblik, koji deluje kao donor vodonikovih jona, dok je u alkalnoj sredini (pH 8) dominantno prisutna enolna forma gde fenolna grupa deluje kao donor elektrona. Zahvaljujući konjugovanim dvostrukim vezama kurkumin apsorbuje svetlost u vidljivom delu spektra (408 nm – 500 nm). Njegova molekulska masa je 368,38 g/mol, a temperatura topljenja 179 – 183 °C, mada termostabilnost zavisi od pH vrednosti sredine (Subramani i sar., 2017). Istraživanja su pokazala da na temperaturi od 37 °C kurkumin degradira za 10 minuta u slabo baznoj sredini (pH 7,2) (Nelson i sar., 2017), dok je u formulaciji nanoemulzije pri pH 3 bio stabilan mesec dana tokom čuvanja na 55 °C (Kharat i sar., 2017). Kurkumin je nestabilan na temperaturama 70 °C – 90 °C (Chuacharoen i sar., 2019), na šta posebno treba obratiti pažnju tokom pripreme formulacija. Gotovo je nerastvorljiv u vodi, a zbog svoje hidrofobne prirode se dobro rastvara u organskim rastvaračima, kao što su etanol, metanol, aceton i dimetil sulfoksid (DMSO) (Subramani i sar., 2017).



Slika 1.5.1. Keto-enolna tautomerija kurkumina

1.5.2. Biološka raspoloživost kurkumina

Kako bi aktivna supstanca mogla da ostvari svoje efekte, potrebno je da prvo dođe na ciljno mesto delovanja, odnosno mora joj se obezbediti adekvatna biološka raspoloživost. Neadekvatna isporuka na ciljno mesto delovanja je često posledica niske intrinzične aktivnosti, loše apsorpcije, obimnog metabolizma, neaktivnih metabolita, ili brze eliminacije. Budući da kurkumin ima jaku intrinzičnu aktivnost, razlozi za njegovu slabu biološku raspoloživost se mogu naći u lošim farmakokinetičkim performansama (Anand i sar., 2007).

Apsorpcija predstavlja ograničavajući faktor za postizanje adekvatne biološke raspoloživosti kurkumina. U studijama na pacovima je pokazano da je nakon oralne primene kurkumina u dozama do 2 g/kg izmereno maksimalno $1,35 \pm 0,23 \mu\text{g/ml}$, dok su kod ljudi izmerene značajno niže koncentracije ($0,006 \pm 0,005 \mu\text{g/ml}$) nakon primene iste doze (Anand i sar., 2007). Kliničke studije su pokazale da i nakon oralnog unosa od 12 g/danu, kod većine učesnika nije bilo moguće detektovati kurkumin u serumu. Ovo se može objasniti njegovom niskom permeabilnošću, što je i pokazano merenjima na Caco-2 ćelijama, gde je koeficijent permeabilnosti P_{app} za kurkumin bio $3,18 \times 10^{-6} \pm 1,08 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, a smatra se da su slabo permeabilne sve supstance sa P_{app} vrednostima manjim od $5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ (Nelson i sar., 2017). Ovi podaci ukazuju na potrebu za korišćenjem posebnih sistema za isporuku kurkumina kako

bi se obezbedila adekvatna biološka raspoloživost nakon oralne primene, ili treba razmišljati o promeni puta primene supstance.

Iako je distribucija aktivnih supstanci veoma značajna u ostvarivanju potencijalnih efekata, relativno mali broj studija se bavio raspodelom kurkumina u tkiva i organe. Postojeće studije su uglavnom sprovedene na glodarima, dok podataka o distribuciji kod ljudi gotovo da i nema (Nelson i sar., 2017). Nakon intraperitonealne primene 0,1 g/kg kod miševa, najveća koncentracija kurkumina je pronađena u tankom crevu (117 µg/g), zatim u slezini (26,1 µg/g), jetri (26,9 µg/g) i bubrezima (7,5 µg/g), dok je u mozgu pronađeno svega 0,4 µg/g. U drugoj studiji je otkriveno da su nakon oralne primene 400 mg kod pacova pronađene samo male količine kurkumina u jetri i bubrezima (Anand i sar., 2007). Varijabilnosti u pokazanoj distribuciji u tkivima verovatno potiču od različitih sistema koji su korišćeni za njegovu isporuku, metoda za obradu biološkog materijala i detekciju kurkumina. U ovu svrhu se najčešće koristi HPLC metoda, bez dodatne potvrde identifikacije supstance masenim detektorom, što može da dovede do pogrešnih zaključaka, naročito kod bioloških analita koji imaju složen sastav (Nelson i sar., 2017).

Smatra se da je metabolička transformacija kurkumina glavni ograničavajući faktor u postizanju adekvatne biološke raspoloživosti. U žuči pacova su nađeni metaboliti nastali redukcijom, odnosno delovanjem alkoholne dehidrogenaze - tetrahidrokurkumin (engl. *tetrahydrocurcumin*, THC) i heksahidrokurkumin (engl. *hexahydrocurcumin*, HHC), a u manjim količinama i dihidroferulinska i ferulinska kiselina. Nakon apsorpcije su dominantne reakcije konjugacije, bilo samog kurkumina ili redukovanih metabolita, sa molekulima glukuronske ili sumporne kiseline. Podaci o biološkoj aktivnosti metabolita se razlikuju, pa dok se u nekim studijama tvrdi da oni poseduju manju aktivnost od kurkumina, druge tvrde da THC ima jači antidijabetski i antioksidativni efekat od početnog jedinjenja (Anand i sar., 2007; Nelson i sar., 2017).

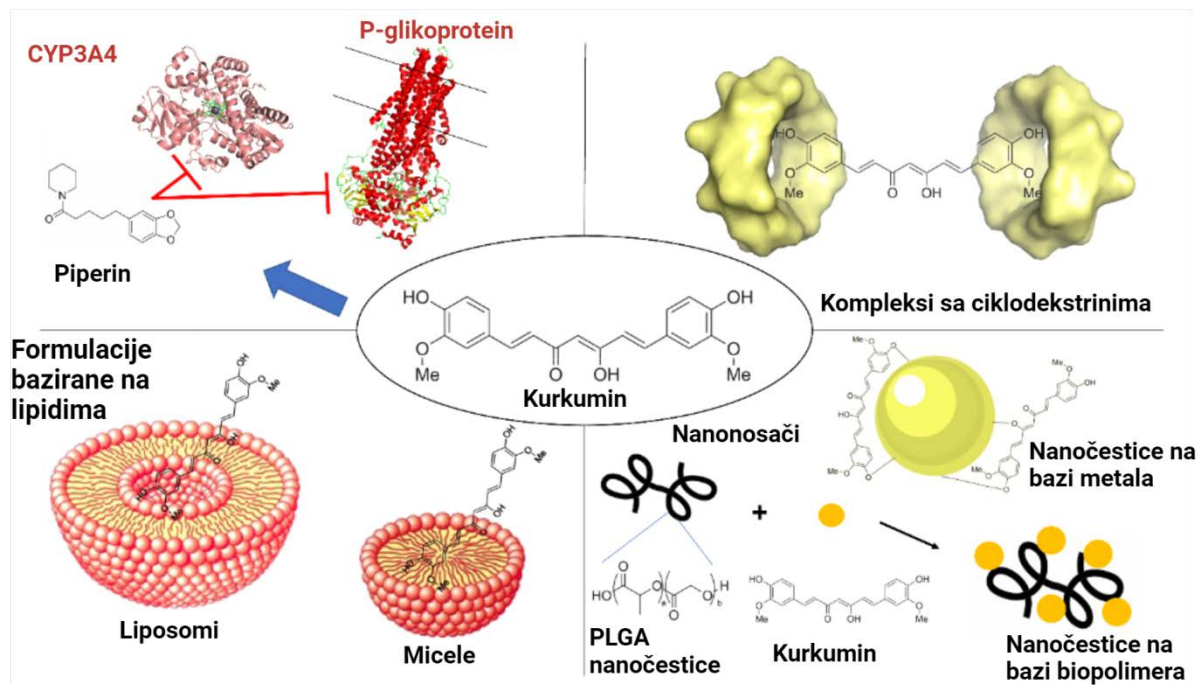
Najveći broj studija kod pacova je pokazao da se nakon oralne primene kurkumin prevashodno izlučuje putem fecesa, dok su glukuronidi i sulfati detektovani u plazmi. Kod ljudi su dobijeni varijabilni podaci, pa je u nekim studijama kurkumin detektovan samo u fecesu, dok u urinu i krvi nije otkriveno prisustvo ni njega ni njegovih metabolita, ali su u drugim istraživanjima oni pronađeni. Jedno od mogućih objašnjenja je korišćenje različitih metoda za prikupljanje i obradu biološkog materijala, ali i određivanje sadržaja kurkumina. Jedan od uzroka detekcije čistog kurkumina u fecesu može biti izostanak apsorpcije, pa se na ovaj način supstanca direktno eliminisala (Nelson i sar., 2017).

Osim brojnih pozitivnih efekata koje kurkumin može da ostvari, postoji i mogućnost pojave toksičnih reakcija. Tako se inhibicijom hERG kanala može javiti kardiotoksičnost, dok se inhibicijom citohroma CYP450 i glutation S-transferaze (GST) može smanjiti detoksifikacija organizma i izazvati potencijalno toksična interakcija sa drugim lekovima. Pored toga, kurkumin može da vezuje gvožđe u organizmu, što je naročito značajno kod pacijenata sa deficijencijama ovog metala. Toksični efekti kurkumina nisu do kraja ispitani, pa iako je delovanje kurkumina često proučavano na kancerskim ćelijskim linijama, postoji malo podataka o njegovom uticaju na zdrave ćelije, što svakako zahteva dodatna istraživanja (Nelson i sar., 2017).

1.5.3. Sistemi za poboljšanu isporuku kurkumina

Kako bi se prevazišli problemi vezani za slabu biološku raspoloživost kurkumina, pokušani su različiti pristupi, kao što je korišćenje strukturnih analoga, biokonjugata, ili adjuvanasa, odnosno piperina koji može da poboljša apsorpciju kurkumina i smanji njegovu metaboličku degradaciju. Ipak, ovi pokušaji nisu bili uspešni u prevazilaženju problema loše isporuke

supstance na ciljno mesto delovanja (Mandal i sar., 2020; Tabanelli i sar., 2021). U ovu svrhu su ispitivane i različite nanoformulacije sa kurkuminom, kao što su liposomi, dendrimeri, polimerne nanočestice, nanokristali, čvrste lipidne nanočestice i nanogelovi (Mandal i sar., 2020) koje uspevaju da prevaziđu probleme slabe rastvorljivosti, fizičko-hemijske nestabilnosti i loše biološke raspoloživosti. Neke od strategija ispitivanih u cilju poboljšanja isporuke kurkumina su predstavljene na **Slici 1.5.2.**



Slika 1.5.2. Strategije za poboljšanje biorasploživosti kurkumina (preuzeto i prilagođeno iz Tabanelli i sar. (2021)).

1.5.3.1. Nanoformulacije za poboljšanu isporuku kurkumina

Jedna od glavnih prednosti nanonosaiča leži u njihovoj mogućnosti da stabilizuju kurkumin u vodenoj sredini. U ovu svrhu su ispitivani različiti sistemi, kao što su liposomi, nanočestice i nanoemulzije, koji omogućavaju isporuku lipofilnih supstanci za različite puteve primene. Smatra se da se kurkumin, zahvaljujući svojim hidrofobnim osobinama, u liposomima nalazi inkorporiran u fosfolipidni dvosloj. Pokazano je da liposomi poboljšavaju stabilnost kurkumina u formulacijama namenjenim za parenteralnu isporuku. Najveći broj istraživanja posvećenih liposomalnom kurkuminu se bavio povećanjem biološke raspoloživosti nakon oralne primene. Tako je pokazano da sami liposomi, ali i dodatno oblaganje N-trimetil hitozan hloridom, karbomerom ili kombinacijom mikrosfera hitozana i tripolifosfata povećavaju biološku raspoloživost kurkumina nakon oralne primene. Sa druge strane, kombinacija hijaluronana, fosfolipida i kopolimera metakrilne kiseline i metil metakrilata obezbeđuje produženo zadržavanje kurkumina u gastrointestinalnom traktu u cilju ostvarivanja lokalnog delovanja. Kod dermalne isporuke kurkumina, pokazano je da liposomi sa pozitivnim površinskim naelektrisanjem, uz korišćenje stearilamina, postižu željeno usporeno i odloženo oslobađanje kurkumina, u odnosu na negativno naelektrisane formulacije bez njega. Liposomalni kurkumin doveo je do poboljšanja biološke raspoloživosti i nakon parenteralne primene, ali su u cilju obezbeđivanja produženog zadržavanja nosaiča u cirkulaciji korišćeni različiti polimeri, kao što su derivati PEG ili kombinacija PEG i polietilenimina. Bez obzira na put primene, najveći broj radova se bavio proučavanjem efekta liposomalnog kurkumina na različite vrste kancera (Feng i sar., 2017).

Nanočestice veličine manje od 100 nm su raznovrsna grupa nanonosča za isporuku lekovitih supstanci koji omogućavaju produženo i odloženo oslobađanje aktivnih supstanci, štite ih od degradacije u sistemskoj cirkulaciji i menjaju njihovu biodistribuciju. Za isporuku kurkumina su razvijene različite nanočestice sa poli(butilcijanoakrilatom) (PBCA), poli(laktid-koglikolidom) (PLGA), hitozanom, albuminom ili čvrstim lipidima. PBCA nanočestice su obezbedile postizanje veće koncentracije kurkumina u mozgu u poređenju sa rastvorom, dok je dodatak apolipoproteina E3 unapredio terapijski efekat kurkumina protiv β -amiloida, što je posebno značajno u potencijalnoj primeni kod Alchajmerove bolesti. Nanočestice sa PLGA su obezbedile povećanu biološku raspoloživost kurkumina u odnosu na dodatak piperina kao pojačivača apsorpcije i inhibitora metabolizma, i dodatno su pokazale veći efekat na supresiju kancerskih ćelija različitih linija u poređenju sa slobodnom supstancom. Primena kurkumina u formulaciji nanočestica sa hitozanom je pokazala bolji efekat u terapiji malarije nakon oralne primene u poređenju sa čistom supstancom. Nanočestice sa hitozanom su nakon inkubacije u ekstrastetikularnim Sertolijevim ćelijama pokazale povećanu distribuciju u plućima posle intravenske primene. Čvrste lipidne nanočestice su povećale biološku raspoloživost kurkumina nakon oralne primene, dok je dodatno oblaganje sa transferinom povećalo njegovu antikancersku aktivnost protiv MCF-7 ćelijske linije raka dojke (Sun i sar., 2012).

Nanoemulzije su takođe istraživane kao mogući sistemi za isporuku kurkumina. Pokazano je da su intravenski primenjene nanoemulzije kurkumina sa tokoferil-acetatom kao masnom fazom efikasan sistem za parenteralnu isporuku kurkumina u organe MFS, jetru i slezinu, kod terapije sepse (Shukla i sar., 2014). Kombinovana primena kurkumina i paklitaksela u nanoemulzijama je pokazala veću citotoksičnost u modelu karcinoma jajnika i predstavlja moguću strategiju za lečenje multirezistentnih tumora (Ganta i Amiji, 2009). Nikolić i saradnici (Nikolic i sar., 2018) su razvili visokokompatibilne niskoenergetske nanoemulzije sa kurkuminom za dermalnu primenu, za koje su pokazali antigenotoksične efekte. Nakon oralne primene nanoemulzija sa veličinom kapi od 100 nm, postignute su veće koncentracije kurkumina u serumu miševa, u odnosu na formulacije sa kapima od 50 nm i 200 nm, čime je postignut i veći antiinflamatorni i antialergijski efekat (Onodera i sar., 2015). Iako se u nekim studijama ispituje potencijal nanoemulzija kao sistema za isporuku kurkumina u mozak (Marques i sar., 2022; Sheng i sar., 2023), one do sada nisu ispitane u kombinaciji sa metodom PEGilovanja.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ove doktorske disertacije je bio razvoj i karakterizacija PEGilovanih nanoemulzija kao sistema za parenteralnu isporuku i povećanje biološke raspoloživosti kurkumina, radi prospektivne isporuke u mozak. U svrhu ostvarivanja ovog cilja sprovedena su različita fizičko-hemijska, strukturna, *in vitro* i *in vivo* ispitivanja kako bi se procenile karakteristike sistema, njegova dugoročna stabilnost, pogodnost za parenteralnu primenu, neškodljivost i efikasnost isporuke u mozak. Ovaj cilj je ostvaren kroz četiri faze istraživanja.

U **prvoj fazi** istraživanja cilj je bio razvoj i karakterizacija parenteralnih nanoemulzija sa kurkuminom i procena uticaja dodatka PEGilovanih fosfolipida na karakteristike sistema. Dodatno, cilj je bio i odabir formulacije sa adekvatnim kombinacijama faktora formulacije i procesnih parametara koje daju najmanje kapi sa najužom raspodelom veličine, što je procenjeno korišćenjem metodologije eksperimentalnog dizajna. Najpre je na osnovu rastvorljivosti kurkumina u različitim uljima i njihovim smešama odabran sastav masne faze koji omogućava inkorporiranje najvećeg sadržaja kurkumina, a ostali sastojci formulacije su odabrani na osnovu sastava masne faze, dok su nanoemulzije pripremljene tehnikom homogenizacije pod visokim pritiskom. U optimizovane formulacije su dodati PEGilovani fosfolipidi različite dužine PEG lanca kako bi se procenio njihov uticaj na fizičko-hemijske karakteristike sistema i njegovu dugoročnu stabilnost. Formulacije su okarakterisane u pogledu veličine i raspodele veličine kapi, zeta potencijala, pH vrednosti i provodljivosti, inicijalno nakon izrade i posle 2 godine čuvanja na sobnoj temperaturi. Ispitan je i uticaj PEGilovanih fosfolipida na sadržaj kurkumina, kao i na njegovu antioksidativnu aktivnost u formulacijama pomoću dva komplementarna eseja.

U **drugoj fazi** istraživanja cilj je bila procena uticaja izbora masne faze (sojinog ili ribljeg ulja) na fizičko-hemijske karakteristike, dugoročnu stabilnost, strukturu stabilizacionog sloja, injektabilnost i antioksidativne performanse optimizovanih PEGilovanih nanoemulzija. Ovaj cilj je realizovan kroz detaljnu fizičko-hemijsku i strukturnu karakterizaciju pripremljenih nanoemulzija, inicijalno i nakon dve godine čuvanja na sobnoj temperaturi. U ovu svrhu je korišćena elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR), kako bi se ispitaio uticaj različitih ulja i prisustva kurkumina na karakteristike stabilizacionog sloja nanoemulzija. Istovremeni uticaj masne faze, prisustva kurkumina, vrste i koncentracije PEGilovanih fosfolipida je analiziran korišćenjem eksperimentalnog dizajna. Kako bi se procenilo ponašanje nanoemulzija tokom injektovanja, u prospektivnoj studiji na animalnim modelima, razvijena je metoda za procenu injektabilnosti formulacija na osnovu merenja sile potrebne da se one istisnu iz šprica. Poseban cilj ove faze je izbor optimalnih formulacija, odnosno sastava masne faze za dalja istraživanja.

Cilj **treće faze** istraživanja je odabir koncentracije PEGilovanih fosfolipida koja omogućava optimalnu zaštitu površine nanoemulzionih kapi, odnosno procena efikasnosti PEGilovanja. U tu svrhu korišćene su strukturne analize: EPR, diferencijalna skenirajuća kalorimetrija i infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom. Sa druge strane, procenjena je i interakcija razvijenih nanoemulzija sa albuminom, ili fetalnim goveđim serumom. Ove interakcije su okarakterisane na osnovu praćenja promene veličine i raspodele veličine kapi nakon inkubacije korišćenjem tehnike dinamičkog rasipanja svetlosti i mikroskopije atomskim silama, ili kroz praćenje oslobađanja kurkumina. Ova faza istraživanja je bila posebno značajna imajući u vidu lokalizaciju kurkumina u nanoemulzionom sistemu, kao i nedostatke prihvaćenih metoda za procenu efikasnosti PEGilovanja.

U **četvrtoj fazi** istraživanja cilj je bila procena efekta PEGilovanja na *in vitro* i *in vivo* performanse nanoemulzija sa kurkuminom, a posebno na njihovu neškodljivost i efikasnost. U ovu svrhu procenjen je efekat odabranih nanoemulzija, sa i bez kurkumina, na ćelijskim

linijama normalnih humanih fibroblasta i ćelijama humanog karcinoma debelog creva. Poseban cilj ove faze je bila procena uticaja PEGilovanih fosfolipida na biološku raspoloživost kurkumina. Prvo je ispitan hemolitički potencijal nanoemulzija, a zatim i razvijan protokol za obradu biološkog materijala sa kurkuminom, u cilju izolovanja supstance iz tkivnog matriksa. Akcenat je stavljen na odabir metode prečišćavanja homogenizata tkiva. Nakon toga, sprovedena je pilot studija farmakokinetike na pacovima kako bi se procenio uticaj PEGilovanja na koncentraciju kurkumina u plazmi, mozgu, jetri i slezini.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

Kurkumin, riblje ulje, polisorbat 80, butilhidroksitoluen (BHT), benzil alkohol (BA), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), gvožđe (III) hlorid (FeCl_3), 5-, 12-, 16-doksil stearinska kiselina (5-DSA, 12-DSA i 16-DSA, respektivno), goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA), fetalni goveđi serum (engl. *foetal bovine serum*, FBS), dimetilsulfoksid, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid) (MTT), makrogol 400 (PEG400), propilenglikol, difluorosirćetna kiselina (DFA), trifluoroetanol (TFE) i hlorovodonična kiselina su nabavljene od Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, SAD). Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Nemačka) je obezbedio PEGilovane fosfolipide – PEG2000-DSPE (N-(karbonil-metoksipolietilenglikol-2000)-1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin, natrijumova so) i PEG5000-DPPE (N-(karbonil-metokspolietilenglikol-5000)-1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin, natrijumova so), lecitin soje (*Lipoid S75*), natrijum-oleat (*Sodium oleate B*) i sojino ulje (*Lipoid purified soybean oil 700*). Glicerol je nabavljen od Merck KgaA (Darmstadt, Nemačka), a trigliceridi srednje dužine lanca (engl. *medium chain trycerides*, MCT) od Fagron GmbH & KG (Barsbüttel, Nemačka). Visoko prečišćena voda korišćena za izradu formulacija dobijena je pomoću GenPure aparature (TKA Wasseranfbereitungssysteme GmbH, Neiderelbert, Nemačka), dok su svi ostali reagensi bili farmaceutske ili HPLC čistoće i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja.

3.2. Metode

3.2.1. Rastvorljivost

Za određivanje rastvorljivosti kurkumina u sojinom ulju, MCT, ribljem ulju, i mešavinama ribljeg ili sojinog ulja sa MCT u odnosu 1:1 i 4:1, *m/m*, sa ili bez 2 %, *m/m*, lecitina, ili benzil alhoholu, korišćena je *shake-flask* metoda. Kurkumin je dodat u višku u 5 g medijuma i smeše su ostavljene da se mešaju na 250 rpm/min na orbitalnom šejkeru (IKA® KS 260 basic, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Nemačka) tokom 24 h na 25 ± 2 °C, zaštićeno od svetlosti. Nakon toga, uzorci su centrifugirani na MPV-56 centrifugi (MPV Med. Instruments, Varšava, Poljska), tokom 30 min, na 5000 rpm/min. Koncentracija kurkumina je određena razblaživanjem alikvota supernatanta u metanolu i merenjem apsorbancija dobijenih rastvora na 425 nm na spektrofotometru (Evolution 300, Thermo Fisher Scientific, Kembridž, UK).

3.2.2. Priprema nanoemulzija

Nanoemulzije su pripremljene tehnikom homogenizacije pod visokim pritiskom (HPH), uz zagrevanje. Masna faza je dobijena mešanjem sojinog ulja, triglicerida srednje dužine lanca, lecitina soje, butilhidroksitoluena i benzil alkohola, na magnetnoj mešalici, na 50 °C, do potpunog rastvaranja lecitina. Vodena faza je dobijena rastvaranjem polisorbata 80, natrijum-oleata i glicerola u visoko prečišćenoj vodi, uz mešanje na magnetnoj mešalici na 50 °C do rastvaranja svih komponenti. Detaljan sastav formulacija je dat u **Tabeli 3.2.1**. Hlorovodonična kiselina (0,1 M rastvor) je korišćena za podešavanje pH vodene faze ispod 7, radi poboljšanja stabilnosti kurkumina. PEGilovane nanoemulzije su pripremljene dodavanjem 0,1% ili 0,3% PEG2000-DSPE u masnu fazu ili iste koncentracije PEG5000-DPPE u vodenu fazu. Vodena faza je dodata uljanoj fazi i mešana na 11000 rpm tokom 1 min koristeći rotor-stator homogenizator (IKA Ultra-Turrax® T25 digital, IKA®-Werke GmbH and Co. KG, Štaufen, Nemačka). Primarna emulzija je dalje propuštena kroz homogenizator

pod visokim pritiskom (EmulsiFlex-C3, Avestin Inc., Otava, ON, Kanada) tokom 5, 10, ili 15 diskontinuiranih ciklusa na 500 bar ili 800 bar. Nanoemulzije sa kurkuminom su pripravljene rastvaranjem kurkumina u benzil alkoholu, radi dobijanja koncentracije od 0,075 % (*m/m*) u finalnoj formulaciji. Dobijeni rastvor je dodat u ostatak masne faze pre spajanja sa vodenom fazom.

U drugoj fazi su, nakon optimizacije procesnih parametara, pripravljene NE sa ribljim uljem kao sastojkom masne faze (umesto sojinog ulja), uz povećanje udela emulgatora, polisorbata 80 i lecitina soje na 2,3 % (*m/m*), smanjenje udela glicerola na 0,8 % (*m/m*), i korišćenje dodatne koncentracije od 0,6 % (*m/m*) PEGilovanih ekscipijenasa. Analogno prvoj fazi, nanoemulzije korišćene u drugoj fazi istraživanja su imale oznake PS, PS21, PS23, PS26, PS51, PS53 i PS56 za placebo formulacije sa sojinim uljem, odnosno KS, KS21, KS23, KS26, KS51, KS53 i KS56 za formulacije sa kurkuminom. Placebo formulacije sa ribljim uljem su imale oznaku PR, PR21, PR23, PR26, PR51, PR53 i PR56, a sa kurkuminom KR, KR21, KR23, KR26, KR51, KR53 i KR56.

Tabela 3.2.1. Sastav nanoemulzija korišćenih u prvoj fazi istraživanja

Sastav (% <i>m/m</i>)	Formulacije nanoemulzija									
	Placebo					Sa kurkuminom				
	NPEG	P21	P23	P51	P53	KNPEG	K21	K23	K51	K53
Masna faza										
MCT	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0
Sojino ulje	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
LS75	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
BHT	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
BA	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Kurkumin	–	–	–	–	–	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
P2	–	0,1	0,3	–	–	–	0,1	0,3	–	–
Vodena faza										
P80	2,0	2,0	–	–	–	–	–	–	–	–
Glicerol	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	–	–
NO	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	–	–
P5	–	–	–	0,1	0,3	–	–	–	0,1	0,3
Visoko prečišćena voda do	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

MCT – trigliceridi srednje dužine lanca; LS75 – lecitin soje; BHT – butilhidroksitoluen; BA – benzilalkohol; P2 – PEG2000-DSPE; P80 – polisorbitat 80; P5 – PEG5000-DPPE; NO – natrijum-oleat

3.2.3. Sterilizacija formulacija

Budući da toplotne metode nisu bile primenjive zbog termolabilnosti kurkumina, za sterilizaciju nanoemulzija je korišćena aseptična filtracija i formulacije su filtrirane kroz sterilne membranske celulozno-acetatne filtere dimenzije pora 0,20 μm (Rotilabo, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Nemačka).

3.2.4. Analiza veličine kapi

3.2.4.1. Dinamičko rasipanje svetlosti (DLS)

Veličina kapi pripremljenih nanoemulzija je određena tehnikom dinamičkog rasipanja svetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS), korišćenjem uređaja ZetasizerNano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) i izražena kao hidrodinamički prečnik kapi

(engl. *intensity-weighted mean diameter, Z-Ave*) i raspodela veličine kapi, odnosno indeks polidisperznosti (PDI). Uzorci nanoemulzija su pre merenja razblaženi sa visokoprečišćenom vodom u odnosu 1:500 (v/v), a merenja su vršena na 25 °C, pri fiksnom uglu rasipanja svetlosti od 90°, korišćenjem He-Ne lasera na 633 nm, u triplikatu.

3.2.4.2. Laserska difrakcija (LD)

Laserska difrakcija je korišćena kao metoda komplementarna dinamičkom rasipanju svetlosti, za određivanje prisustva populacije većih kapi u uzorcima nanoemulzija. Ova merenja su u prvoj fazi istraživanja sprovedena na univerzalnom tečnom modulu (ULM) Beckman Coulter LS 13 320 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, Kalifornija, SAD) uređaja. Optički model Intralopid.rf780d se koristio zajedno sa PIDSTM podacima (engl. *Polarization Intensity Differential Scattering, PIDS*) kako bi se dobile informacije o postojanju kapi veličine 0,04 – 2000 μm. Brzina pumpe i stepen opskuracije PIDS postavljeni su na 50%. Za opisivanje veličina kapi su korišćeni volumenski prečnici kapi: d10, d50, d90 i d100. U drugoj fazi je za procenu veličine kapi tehnikom laserske difrakcije korišćen Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK), i volumenski prečnici d (0,5), d (0,9) i D [4,3] kao parametri veličine.

3.2.5. Zeta potencijal

Površinsko naelektrisanje nanoemulzionih kapi je određeno na osnovu merenja elektroforetske pokretljivosti kapi, i izraženo kao zeta potencijal (ZP). Merenja su vršena na uređaju ZetasizerNano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Uzorci su pripremljeni razblaživanjem nanoemulzija u visokoprečišćenju vodi čija je provodljivost podešena na 50 μS/cm dodavanjem 0,9% rastvora NaCl, u odnosu 1:500 (v/v). Merenja su obavljena na 25 °C u triplikatu.

3.2.6. pH vrednost i provodljivost

Provodljivost i pH vrednost nanoemulzija su izmerene direktnim uranjanjem elektroda pH metra (Hanna Instruments Inc., Ann Arbor, MI, SAD) i konduktometra (sensIONTM + EC71, ShangHaiShilu Instruments Co., Ltd., Šangaj, Kina) u uzorke. Sva merenja su obavljena na sobnoj temperaturi u triplikatu.

3.2.7. Osmolalnost

Osmolalnost nanoemulzija je određena pomoću osmometra (The Advanced® Model 3320 Micro-Osmometer, Advanced Instruments, Inc., Norvud, MA, SAD), na osnovu merenja tačke mržnjenja uzoraka. Uzorci nanoemulzija su pomoću Ease-EjectTM Sampler-a postavljeni u ležište instrumenta i umetnuti u komoru za zamrzavanje.

3.2.8. Viskozitet i injektabilnost

Reološka analiza nanoemulzija je sprovedena pomoću MCR 302 reometra (Anton Paar, Grac, Austrija), opremljenog sistemom rotirajućih cilindara (CC27 sa C-PTD 180/Air), pri brzini smicanja od 0,1–100 s⁻¹ na 20 °C. Dodatno je procenjena i injektabilnost formulacija, definisana kao sila potrebna za pomeranje klipa šprica u funkciji istisnute zapremine. Kako bi se simulirali uslovi pri intravenskoj primeni formulacija, oko 10 ml formulacije je preuzeto u špric od 10 ml i istisnuto kroz infuzioni set sa veličinom igle od 25 G (Romed, Vilnis, Holandija) u rastvor glicerola u vodi, pripremljen tako da mu viskozitet i proticanje oponašaju cirkulišuću krv. Nanoemulzije su istisnute iz šprica brzinom od 1 mm/s na analizatoru tekture (EZ-LX Compact Table-top testing machine, Shimadzu, Japan), a podaci su prikupljeni i analizirani pomoću 1.5 verzije TrapeziumX softvera.

3.2.9. Eksperimentalni dizajn

U prvoj fazi eksperimentalnog rada metodologija eksperimentalnog dizajna je korišćena za procenu odgovarajućih uslova za pripremu NE, odnosno za odabir kombinacije formulacionih faktora i procesnih parametara koja daje optimalne PEGilovane NE za dalje inkorporiranje kurkumina. D-optimalan faktorski dizajn je primenjen radi identifikacije faktora formulacije, parametara procesa homogenizacije pod visokim pritiskom i njihovih interakcija koje utiču na kritične atribute kvaliteta pripremljenih NE – veličinu i raspodelu veličine kapi. Ovi parametri se smatraju ključnim za fizičko-hemijsku stabilnost formulacija, njihovu biodistribuciju i potencijalne neželjene efekte, npr. pojavu masne embolije usled prisustva većih kapi (Floury i sar., 2000; Floyd, 1999; Hörmann i Zimmer, 2016; Schuh i sar., 2014; Tamilvanan, 2004). Za eksperimentalni dizajn su odabrane četiri nezavisne promenljive (ulazne varijable) koje su varirane na različitim nivoima: (A) vrsta PEGilovanog fosfolipida (PEG-FL) - PEG2000-DSPE/PEG5000-DPPE; (B) koncentracija PEG-FL - 0,1%/0,3%; (C) pritisak HPH - 500 bar/800 bar; i (D) broj HPH ciklusa - 5/10/15. Veličina kapi (Z-Ave) i indeks polidisperznosti (PDI) su odabrani kao odgovori sistema, ili zavisne varijable. Procesni parametri, pritisak homogenizacije pod visokim pritiskom (C) i broj ciklusa homogenizacije (D) odabrani su zbog poznatog uticaja na veličinu i raspodelu veličine kapi (Chong i sar., 2018; Floury i sar., 2000; Ruiz-Montañez i sar., 2017), dok su dva faktora formulacije, vrsta i koncentracija PEG-FL, određeni na osnovu pregleda literature (Devalapally i sar., 2015; Kandadi i sar., 2011; Syed i Veerabrahma, 2013). Šema matrice D-optimalnog dizajna korišćenog u prvoj fazi eksperimentalnog rada data je u **Tabeli 3.2.2**.

Tabela 3.2.2. Šema D-eksperimentalnog dizajna korišćenog u prvoj fazi eksperimentalnog rada

Broj eksperimenata	Nezavisne promenljive									
	A: Vrsta PEG-FL		B: Koncentracija PEG-PL		C: Pritisak HPH		D: Broj ciklusa HPH			
	Stvarni nivo	Kodirani nivo	Stvarni nivo	Kodirani nivo	Stvarni nivo	Kodirani nivo	Stvarni nivo	Kodirani nivo		
1*	PEG2000-DSPE	-1	0,1%	-1	500 bar	-1	5	{-1 1}		
2							10	{0 -2}		
3					800 bar		+1	10	{0 -2}	
4*								15	{1 1}	
5					0,3%	+1	500 bar	-1	5	{-1 1}
6									15	{1 1}
7							800 bar		+1	5
8									10	{0 -2}
9									15	{1 1}
10*	PEG5000-DPPE	+1	0,1%	-1	500 bar	-1	5	{-1 1}		
11							10	{0 -2}		
12							15	{1 1}		
13						800 bar	+1	5	{-1 1}	
14									10	{0 -2}
15									15	{1 1}
16					0,3%	+1	500 bar	-1	5	{-1 1}
17									10	{0 -2}
18*										15
19					800 bar	+1	5	{-1 1}		
20*								10	{0 -2}	

*ponovljeni eksperimenti; PEG-FL – PEGilovani fosfolipidi; HPH – Homogenizacija pod visokim pritiskom

U drugoj fazi eksperimentalnog rada metodologija eksperimentalnog dizajna je korišćena u cilju procene uticaja izbora masne faze, odnosno prisustva ribljeg ulja, na fizičko-hemijske karakteristike PEGilovanih NE, sa i bez kurkumina. Odabrane su četiri nezavisne promenljive koje su varirane na više nivoa: (A) vrsta PEG-FL - PEG2000-DSPE/PEG5000-DPPE; (B) koncentracija PEG-FL - 0,1%/0,3%/0,6%; (C) vrsta ulja - riblje ulje/sojino ulje; i (D) prisustvo kurkumina - ne (odsustvo)/da (prisustvo), dok su kao odgovori sistema praćeni veličina kapi (Z -ave) i indeks polidisperznosti (PDI). Nivoi variranja nezavisnih promenljivih su odabrani na osnovu prethodnih iskustava i pregleda literature. Šema D-eksperimentalnog dizajna korišćenog u drugoj fazi istraživanja predstavljena je u **Tabeli 3.2.3**.

Tabela 3.2.3. Šema D-eksperimentalnog dizajna korišćenog u drugoj fazi eksperimentalnog rada

Broj eksperimenata	Nezavisne promenljive							
	A: Vrsta PEG-FL		B: Koncentracija PEG-PL	C: Vrsta ulja		D: Prisustvo kurkumina		
	Stvarni nivo	Kodirani nivo	Stvarni nivo	Kodirani nivo	Stvarni nivo	Kodirani nivo	Stvarni nivo	
1*	PEG2000-DSPE	-1	0,1%	SU	-1	Ne	-1	
2*				RU	+1	Da	+1	
3			0,3%	SU	-1	Ne	-1	
4*						Da	+1	
5				RU	+1	Ne	-1	
6						Da	+1	
7			0,6%	SU	-1	Ne	-1	
8						Da	+1	
9				RU	+1	Ne	-1	
10						Da	+1	
11	PEG5000-DPPE	+1		0,1%	SU	-1	Ne	-1
12							Da	+1
13*			0,3%	RU	+1	Ne	-1	
14						Da	+1	
15				SU	-1	Ne	-1	
16				RU	+1	Ne	-1	
17					Da	+1		
18			0,6%	SU	-1	Ne	-1	
19*				Da	+1			
20			RU		Ne	-1		

*ponovljeni eksperimenti; PEG-FL – PEGilovani fosfolipidi; SU – sojino ulje; RU – riblje ulje; Ne – placebo formulacije; Da – formulacije sa kurkuminom.

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni pomoću *Design-Expert*® softvera (verzija 9.0.1 Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, SAD). Eksperimentalni podaci su inkorporirani u polinomski model prvog reda, a optimalni model je izabran na osnovu značajnih komponenti modela ($p < 0,05$), neznačajne vrednosti *lack of fit*, najvećih vrednosti koeficijenata višestruke korelacije (R^2) i prilagođenih koeficijenata višestruke korelacije ($R^2_{adjusted}$), uz optimalnu adekvatnu vrednost, koja predstavlja meru odnosa signala i šuma, kod koje vrednosti iznad 4 ukazuju na korisnost modela u datom eksperimentalnom prostoru (*design space*). U prvoj fazi istraživanja je sprovedena i numerička optimizacija radi dobijanja formulacija sa najmanjom veličinom kapi i najužom raspodelom veličine na osnovu najvećeg indeksa poželjnosti (*desirability value*). Radi lakšeg opisivanja interakcija između nezavisnih promenljivih na definisane zavisne promenljive konstruisani su odgovarajući grafici.

3.2.10. Mikroskopske analize

3.2.10.1. Polarizaciona mikroskopija

Optička (polarizaciona) mikroskopija je korišćena za vizuelizaciju potencijalno prisutnih kristala kurkumina, kao i pojedinačnih većih kapi nanoemulzija kod formulacija nakon 2 godine čuvanja na sobnoj temperaturi. Svi ispitivani uzorci su bili nerazblaženi, a za prvu fazu istraživanja korišćeno je uveličanje od 1000×, a uzorci su analizirani pomoću Motic digitalnog DMB3-22ASC mikroskopa (Motic GmbH, Wetzlar, Nemačka), opremljenog Motic Images Plus softverom (verzija 2.0), sa ili bez polarizacije. U drugoj fazi istraživanja formulacije su analizirane na Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 mikroskopu (Zeiss, Göttingen, Nemačka), koji je opremljen AxioCam 105 kamerom i Zen Imaging softverom, na uvećanju od 400×.

3.2.10.2. Mikroskopija atomskih sila

Za mikroskopiju atomskih sila uzorci NE su razblaženi u visokoprečišćenoj vodi u odnosu 1:1000, v/v. Potom je 10 µl razblaženih formulacija stavljeno na okrugle pločice od liskuna (V1 grade, Ted Pella Inc., Redding, Kalifornija, SAD) i uzorci su osušeni pod vakuumom da bi se uklonio višak vode. Za analizu morfologije, oblika i veličine NE kapi korišćen je NTEGRA prima mikroskop atomskih sila (NT-MDT). Zbog fragilnosti uzoraka merenja su izvršena primenom tapkajućeg AFM moda. Za snimanje su korišćene NT-MDT NSGO1 pravougaone silicijumske gredice sa zlatnim reflektujućim filmom. Nominalna rezonantna frekvencija gre dica je 150 kHz, dok je nominalna konstanta sile 5,1 N/m. Slike su obrađene pomoću Image Analysis 2.2.0 (NT-MDT) i Gwyddion 2.61 (Free and Open Source software, Czech Metrology Institute) softvera.

3.2.10.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Skenirajuća elektronska mikroskopija je korišćena u prvoj fazi istraživanja u cilju procene efekta PEGilovanih fosfolipida na morfologiju nanoemulzionih kapi. Za analizu je 5 µl razblaženja nanoemulzija (1:500, v/v) u visokoprečišćenoj vodi, nanoseno na držač uzoraka. Ova razblaženja su potom sušena u vakuumu radi uklanjanja viška vode. Pre merenja je na vrh svakog uzorka nanosen zlatni sloj debljine 20 nm, primenom High Vacuum Sputter Coater-a (Leica microsystems, Nemačka), a uzorci su vizuelizovani pomoću emisionog skenirajućeg elektronskog mikroskopa sa termičkim poljem JSM-7001F (Jeol, Japan).

3.2.11. Sadržaj kurkumina i efikasnost inkapsulacije

Sadržaj kurkumina u nanoemulzijama je određen rastvaranjem formulacija u metanolu u odnosu 1:1000, v/v, u cilju procene uticaja postupka izrade na fizičko-hemijsku stabilnost kurkumina, kao i mogućnosti dizajniranih formulacija da očuvaju njegovu stabilnost tokom dve godine čuvanja. Analize su sprovedene u triplikatu. Efikasnost inkapsulacije (EE) kurkumina u nanoemulzionim kapima je procenjena pomoću Amicon Ultra-4 filtera, sa *cut off* vrednosti od 10 kDa (Merck Millipore, Burlington, MA, SAD). Za ovu analizu je 2 ml formulacije stavljeno u navedene filtere i centrifugirano na 2000 × g tokom 90 min. Dobijeni filtrat je razblažen sa istom zapreminom metanola, a sadržaj kurkumina je određen pomoću LC-MS/MS metode. Efikasnost inkapsulacije je određena na osnovu **jednačine 6**:

$$EE (\%) = \frac{A_{\text{formulacija}} - A_{\text{filtrat}}}{A_{\text{formulacija}}} \times 100 \quad (\text{jednačina 6})$$

gde $A_{\text{formulacija}}$ predstavlja količinu kurkumina u dodatoj zapremini uzorka nanoemulzije, a A_{filtrat} označava količinu kurkumina u filtratu. Ovi eksperimenti izvedeni su u duplikatu.

3.2.12. Analitička LC-MS/MS metoda

Analize su izvedene na sistemu tečne hromatografije *Accela* 1000 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, SAD), koji se sastoji iz autosamplera i pumpe, dok su uslovi razdvajanja bili unapred definisani. Za razdvajanje uzoraka na 25 °C korišćena je Xterra® MS C18 kolona (3,5 µm 2,1 × 150 mm; Waters Corporation, Dablin, Irska). Mobilna faza, koja se sastojala iz acetonitrila i 0,1% vodenog rastvora mravlje kiseline pomešanih u odnosu 70:30, v/v, je korišćena za izokratsko eluiranje, pri brzini protoka od 0,3 ml/min, i vremenu rada od 5 min. Masene analize su sprovedene na TSQ Quantum Access MAX trostrukom kvadrupolskom masenom spektrometru sa elektrosprej izvorom jonizacije (ESI) i azotom visoke čistoće kao gas-nosačem. Parametri izvora ESI i masene spektrometrije su imali sledeće vrednosti: napon spreja - 5000 V; temperatura isparivača - 400 °C; pritisak gasa u omotaču - 30 arbitrarnih jedinica; pritisak gasa koji obezbeđuje uklanjanje jona - 0 jedinica; pritisak pomoćnog gasa - 15 arbitrarnih jedinica; temperatura kapilare koja obezbeđuje prenos jona - 250 °C; kapilarni *offset* - 35 jedinica; *skimmer offset* - 0 jedinica; koliziona energija - 22 V; širina pika - 0,7; vreme skeniranja - 200 ms. Podaci su prikupljeni pri radu uređaja u pozitivnom režimu (modu), a praćena je jonska tranzicija m/z 369.2 → 177.0. Podaci su obrađeni preko Xcalibur softvera (verzije 2.1.0.1139, Thermo Fisher Scientific).

3.2.13. *In vitro* testovi za procenu antioksidantnog potencijala

Antioksidativna aktivnost razvijenih formulacija je procenjena kroz dva komplementarna testa: DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), zasnovan na sposobnosti formulacija ili molekula da uklone ovaj slobodni radikal, i FRAP (engl. *ferric ion reducing antioxidant power*) testa koji se odnosi na sposobnost redukovanja jona gvožđa.

3.2.13.1. DPPH

Za procenu sposobnosti kurkumina, tokoferola i BHT u uklanjanju slobodnih radikala pripremljeni su rastvori koncentracija od 0,0188 mg/ml, 0,0375 mg/ml, 0,0563 mg/ml, 0,0750 mg/ml, 0,1125 mg/ml i 0,1313 mg/ml razblaživanjem u izopropanolu. Tokoferol je izabran zbog strukturne sličnosti sa kurkuminom, dok je BHT dodat u pripremljene nanoemulzije da spreči oksidaciju korišćenih ulja i lecitina, pa je bilo značajno ispitati njegov doprinos antioksidativnom potencijalu formulacija. Test je izveden dodavanjem 400 µl svakog razblaženja u 3600 µl 0,1 mM izopropanolnog rastvora DPPH, pri čemu su dobijeni rastvori sa finalnom koncentracijom antioksidansa od 0,00188 mg/ml, 0,00375 mg/ml, 0,00563 mg/ml, 0,00750 mg/ml, 0,01125 mg/ml i 0,01313 mg/ml. Svaka koncentracija je pripremljena u triplikatu. Apsorbancija je merena na talasnoj dužini od 517 nm na UV/VIS spektrofotometru (Evolution 300, Thermo Fisher Scientific, Kembridž, UK), nakon 30 min inkubacije na tamnom mestu, na sobnoj temperaturi. Izmerene vrednosti apsorbancija za sve rastvore kretale su se u opsegu između 0,3 i 0,8. Kontrola je pripremljena sa 400 µl izopropanola umesto razblaženja antioksidanasa. Antioksidativni potencijal nanoemulzija je izražen kao procenat inhibicije apsorbance DPPH, kao slobodnog radikala, na osnovu **jednačine 7**:

$$\% I = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100 \quad \text{(jednačina 7)}$$

gde I označava procenat inhibicije, Ac apsorbanciju kontrole, a As apsorbanciju ispitivanog uzorka. Procenat inhibicije je izračunat za svaku korišćenu koncentraciju, a zatim je i konstruisan grafik zavisnosti procenta inhibicije od koncentracije antioksidanasa. Za svaki uzorak je pomoću linearne regresione analize izračunata IC50 vrednost, odnosno koncentracija koja dovodi do smanjenja apsorbancije DPPH za 50%. Aktivnost razvijenih formulacija protiv slobodnih radikala je ispitana nakon razblaživanja u visokoprečišćenoj

vodi, radi dobijanja iste koncentracije kurkumina kao u prethodno opisanim izopropanolnim rastvorima antioksidanasa, a zatim je ponovljen isti postupak kao i sa pojedinačnim supstancama.

3.2.13.2. FRAP

Za ovaj test je pomešano 100 μ l razblaženja nanoemulzija u visokoprečišćenoj vodi, u odnosu 1:20, *v/v* i 3 ml sveže pripremljenog FRAP reagensa (25 ml 300 mM acetatnog pufera (pH 3,6); 2,5 ml 10 mM rastvora TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) u 40 mM HCl; 2,5 ml 20 mM rastvora $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ u prečišćenoj vodi). Pripremljene disperzije su inkubirane u mraku, na temperaturi od 37 °C tokom 30 min, a zatim je izmerena apsorbancija na talasnoj dužini od 593 nm pomoću UV/VIS spektrofotometra (Evolution 300, Thermo Fisher Scientific, Cambridge, UK). Slepe probe su pripremljene na isti način, ali umesto formulacija sa kurkuminom su korišćene odgovarajuće placebo nanoemulzije. Poređenja radi, isti test je sproveden i sa metanolnim rastvorima kurkumina, tokoferola i BHT, a kao slepa proba je korišćena smeša 100 μ l metanola i 3 ml FRAP reagensa. Antioksidantni potencijal formulacija (FRAP vrednost) je izračunat na osnovu kalibracione krive koja predstavlja zavisnost apsorbancije smeša pripremljenih od 100 μ l standardnih rastvora $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (raspon koncentracija od 25 do 1200 $\mu\text{mol/l}$) i 3 mL FRAP reagensa, i izražen kao mmol Fe^{2+} /g suve materije. Koncentracija kurkumina, BHT i tokoferola (0,0375 mg/ml) izabrana je na osnovu izmerene apsorbancije.

3.2.14. Studije stabilnosti

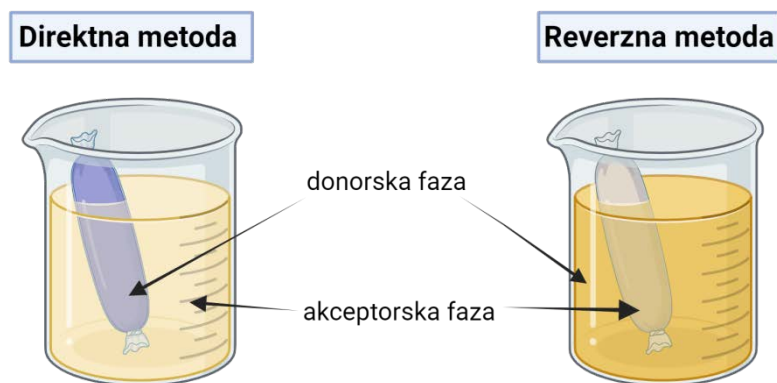
Stabilnost pripremljenih formulacija je procenjena merenjem veličine i raspodele veličine kapi, zeta potencijala, pH vrednosti, provodljivosti, sadržaja kurkumina i antioksidantnog potencijala (DPPH i FRAP test), poređenjem vrednosti koje su izmerene inicijalno nakon izrade i nakon dve godine čuvanja na sobnoj temperaturi.

3.2.15. *In vitro* oslobađanje kurkumina

Oslobađanje kurkumina iz razvijenih formulacija je analizirano tehnikom dijaliznih vrećica. U prvoj fazi istraživanja je korišćena reverzna tehnika, a pored praćenja oslobađanja kurkumina iz pripremljenih nanoemulzija analiziran je i etanolni rastvor kurkumina iste koncentracije kao u NE, radi procene ograničavajućeg faktora membrane. Za analizu su korišćene dijalizne vrećice od celuloze, sa *cut off* vrednošću od 12000 Da (D-9527, Sigma Aldrich). Dijalizne vrećice su pre analize preko noći potopljene u medijum za oslobađanje, mešavinu visoko prečišćene vode i koncentrovanog etanola u odnosu 1:1, *v/v*. Ovaj medijum je odabran kako bi se obezbedila adekvatna solubilizacija kurkumina i sprečila njegova degradacija (Kakkar i sar., 2011; Nikolic i sar., 2018). U prvoj fazi istraživanja dijalizne vrećice su napunjene sa 5 ml medijuma za oslobađanje i zatvorene odgovarajućim zatvaračima. Ovako pripremljene vrećice su postavljene u hemijsku čašu sa 200 ml medijuma i prekrivene aluminijumskom folijom kako bi se sprečilo isparavanje etanola. Pripremljeni sistemi su prvo ekvilibrirani u ES-20 orbitalnom šejkeru-inkubatoru (Biosan SIA, Riga, Letonija) na 37 °C. Nakon ekvilibracije, u čašu (donorsku fazu) je dodato 2 ml uzorka nanoemulzije, uz mešanje na 100 rpm, pri temperaturi od 37 °C. Dijalizna vrećica (akceptorska faza) je izvađena iz čaše nakon 5, 10, 30, 60, 90 i 180 minuta i analizirana na sadržaj kurkumina. Ova tehnika se smatra naročito pogodnom za proučavanje oslobađanja supstanci iz tečnog medijuma, zato što se njenim korišćenjem može obezbediti oslobađanje supstance pod optimalnim *sink* uslovima. Jedna od njenih glavnih prednosti je izloženost nanoemulzionih kapi velikoj zapremini medijuma, što oponaša uslove nakon intravenske primene. Glavni nedostatak ove metode leži u činjenici da se za svaku vremensku tačku i ponavljanje moraju pripremiti novi sistemi medijuma u dijaliznim vrećicama, što produžava

vreme analize i troškove rada i nije praktično pri poređenju većeg broja uzoraka kod kojih se prati oslobađanje relativno nestabilnih supstanci.

U drugoj fazi istraživanja je korišćena direktna metoda, u kojoj je 2 ml nanoemulzije dodato u dijaliznu vrećicu (donorska faza), pa je potom ovaj sistem dodat u hemijsku čašu sa 200 ml medijuma. Uzorci su uzeti iz hemijske čaše (akceptorska faza) nakon 5, 20, 40 60, 120 i 240 min inkubacije i analizirani na sadržaj kurkumina pomoću LC-MS/MS metode. Nakon uzimanja 1 ml uzorka, u akceptorsku fazu je dodata ista zapremina medijuma, kako bi se održali *sink* uslovi. Analize su sprovedene u triplikatu. Oslobađanje kurkumina je grafički predstavljeno kao zavisnost kumulativnog procenta oslobođene supstance u jedinici vremena. Kinetika oslobađanja kurkumina je procenjena na osnovu uklapanja eksperimentalno dobijenih vrednosti u odabrane kinetičke matematičke modele: nultog i prvog reda, Higuchi, Korsmeyer–Peppas, Baker–Lonsdale i Hixon–Crowell, pomoću DDSolver dodatka za Microsoft Excel. Za svaki model je izračunata konstanta brzine oslobađanja (K), koeficijent determinacije (R^2), prilagođeni koeficijent determinacije (R^2_{adjusted}) i Akaike informacioni kriterijum. Šematski prikaz direktne i reverzne metode dijaliznih vrećica je predstavljen na Slici 3.2.1.



Slika 3.2.1. Metoda dijaliznih vrećica u analizi brzine oslobađanja supstanci

3.2.16. Elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija

Elektron paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija sa spinskim probama je korišćena radi procene efekta različitih masnih faza, odnosno sojinog ili ribljeg ulja i prisustva kurkumina na dinamiku stabilizacionog sloja nanoemulzija. Dodatno je analiziran i uticaj rastućih koncentracija PEGilovanih fosfolipida, kako bi se procenila efikasnost PEGilovanja. U ovoj metodi se meri apsorpcija mikrotalasa od strane paramagnetnih centara sa jednim ili više nesparenih elektrona. Za ovo istraživanje su korišćene tri spinske probe (5-DSA, 12-DSA i 16-DSA) koje predstavljaju derivate doksistearinske kiseline sa nesparenim spin elektronima na položajima 5-, 12- i 16- alifatičnog lanca, a koji omogućavaju proučavanje stabilizacionog sloja na različitim nivoima, tako da proba 5-DSA daje informacije o delu stabilizacionog sloja najbližeg vodenoj, a 16-DSA o delu najbližeg masnoj fazi. Ova metoda pruža ključne informacije značajne za razumevanje dinamike monosloja surfaktanata koji stabilizuju NE i daje preciznije podatke o lokalizaciji inkapsuliranog kurkumina. EPR merenja su obavljena pomoću EMX EPR spektrometra (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Nemačka) na X-traci (9,8 GHz) koristeći ravnu kvarcnu ćeliju za vodene uzorke (Wilmad-LabGlass, Cortecnet Europe, Voisins-Le-Bretonneuk, Francuska). Podešavanja instrumenta su bila: centralno polje 0,348 T, opseg skeniranja 0,01 T, pojačivač prijemnika $5,64 \times 10^4$, vremenska konstanta 10,24 ms, vreme konverzije 5 ms i modulaciona amplituda 0,4 mT za 5- i 16-DSA. Za spektar probe 12-DSA, pojačivač prijemnika (*receiver gain*) je bio $5,64 \times 10^3$,

a vreme konverzije 5,12 ms. Za analizu su najpre pripremljeni 1 mM osnovni rastvori spinskih proba u apsolutnom etanolu. Zatim je u ependorfice dodato 15 μ l osnovnog rastvora spinske probe i nakon uparavanja etanola do suva, u ependorficu dodat 1 ml NE. Ova smeša je inkubirana jedan dan na sobnoj temperaturi kako bi se omogućila inkorporacija spinskih proba u stabilizacioni sloj nanoemulzija. Konačna koncentracija spinskih proba u nanoemulzijama je bila 0,015 mM. Za obradu i analizu podataka je korišćen Bruker WinEPR softver (Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Nemačka). Na osnovu dobijenih EPR spektara izračunati su sledeći parametri: rotaciono korelaciono vreme (τR), parametar reda (S) i konstanta izotropno hiperfinog sprezanja (α_N) na osnovu sledećih jednačina:

$$\tau R = 6 \times 10^{-10} \left[\left(\frac{h_0}{h_{+1}} \right)^{1/2} + \left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right) - 2 \right] \Delta H_0 \quad (\text{jednačina 8})$$

$$S = \frac{(A_{||} - A_{\perp})}{A_{ZZ} - \frac{1}{2}(A_{XX} - A_{YY})} \times \frac{\alpha_N}{a'_N} \quad (\text{jednačina 9})$$

$$\alpha_N = 1/3(A_{||} + 2A_{\perp}) \quad (\text{jednačina 10})$$

gde je ΔH_0 širina centralnog pika, h_{+1} , h_0 i h_{-1} su intenziteti niskog, centralnog i visokog pika, respektivno; A_{XX} , A_{YY} i A_{ZZ} su *single-crystal* vrednosti spinske probe, $A_{||}$ odgovara polovini rastojanja od spoljašnjeg maksimuma cepanja, A_{\perp} se izračunava kao $A_{\perp} = A_{min} + 1.4(1 - S^{app})$, a $S^{app} = (A_{max} - A_{min})/[A_{ZZ} - 1/2(A_{XX} + A_{YY})]$, gde je A_{min} odgovara polu-rastojanju unutrašnjeg minimuma hiperfinog cepanja.

3.2.17. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Termička studija je sprovedena kako bi se utvrdilo fizičko stanje kurkumina u formulacijama, odnosno potvrdila njegova solubilizacija, ali i radi inicijalne procene efikasnosti PEGilovanja. U tu svrhu su individualni sastojci formulacija, NE sa kurkuminom i 0,6 % disperzija PEG2000-DSPE u vodi analizirani tehnikom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC), pomoću Mettler DSC 820 instrumenta (Mettler Toledo GmbH Analytical, Gisen, Nemačka). Približno 10 mg uzorka je stavljeno u aluminijumski pen koji je potom hermetički zatvoren i zagrevan od 25 °C do 220 °C, pri brzini zagrevanja od 2 K/min, uz konstantni protok azota. Iako se isparavanje vode iz NE može razlikovati od drugih događaja, radi sprečavanja uticaja pika isparavanja vode na tačnost dobijenih rezultata, dodatno su ispitani uzorci NE osušeni na vazduhu, pri brzini zagrevanja od 5 K/min. Prazan aluminijumski pen je korišćen kao referentni uzorak. Termoanalitički parametri su izračunati korišćenjem Mettler Toledo STARe softvera.

3.2.18. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektroskopija je korišćena za istraživanje mogućih hemijskih interakcija između kurkumina, PEG2000-DSPE i ostalih komponenata NE. Spektri pojedinačnih komponenti i NE su snimljeni FTIR spektrofotometrom BOMEM Hartmann & Braun MB-Series (ABB Bomem Inc., Kvebek, Kanada). Uzorci pojedinačnih supstanci su pripremljeni tehnikom sa KBr (KBr pastile), dok je za pripremu uzorka formulacija 10 μ l nanoemulzije postavljeno na KRS-5 ploču i osušeno u vakuumu. Za svaki spektar je korišćeno 10 skeniranja u opsegu između 4000 i 400 cm^{-1} , sa rezolucijom od 4 cm^{-1} .

3.2.19. Interakcije sa proteinima

Procena interakcija između optimizovanih nanoemulzija i različitih proteinskih medijuma (BSA i FBS u fosfatnom puferu, pH vrednosti 7,4) je sprovedena korišćenjem komplementarnih metoda: DLS, UV-VIS spektroskopija, AFM i praćenjem oslobađanja kurkumina iz formulacija inkubiranih u medijumu sa proteinima. Ova istraživanja su

sprovedena radi procene uticaja različitih koncentracija PEGilovanog fosfolipida (PEG2000-DSPE) na interakciju sa proteinima, odnosno da bi se odredila koncentracija koja pruža optimalnu zaštitu površine od vezivanja proteina, što bi nakon prospektivne *in vivo* primene dalo najduže zadržavanje kapi u cirkulaciji, bez pratećih neželjenih efekata. Za DLS i UV-VIS analize uzorci NE inkubirani su tokom 24 h u medijumu sa proteinima (30 mg/ml BSA ili 10 %, v/v, FBS u fosfatnom puferu pH 7,4 (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ × 12 H₂O, i 1,8 mM KH₂PO₄), u odnosu 1:500, v/v. Kod DLS tehnike, veličina (Z-ave) i raspodela veličine kapi (PDI) izmerene su na ZetasizerNano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) uređaju, inicijalno, nakon 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h i 24 h inkubacije na 37 °C, u triplikatu. Radi izolovanja efekata samog medijuma, sve formulacije su takođe inkubirane u čistom fosfatnom puferu, i analizirane pod istim uslovima. Apsorpcioni spektri formulacija su snimljeni na početku i nakon 24 h inkubacije na 37 °C na UV-VIS spektrofotometru (Evolution 300, Thermo Fisher Scientific, Cambridge), a kao slepe probe su korišćene disperzije proteina u fosfatnom puferu koje su inkubirane u istom vremenskom periodu kao i uzorci NE. Dodatno su snimljeni spektri analiziranih proteina u PBS uz korišćenje fosfatnog pufera kao slepe probe. Radi direktne vizuelizacije kapi nakon inkubacije u gore pomenutim proteinskim medijumima, odabrani uzorci (KS i KS21) su snimljeni mikroskopijom atomskim silama, nakon razblaženja u odnosu 1:1000, v/v, i sušenja pod vakuumom. Ostali uslovi snimanja su opisani u delu 3.2.10.2. Dodatno je ispitan uticaj medijuma sa FBS na oslobađanje kurkumina iz NE pomoću direktne metode sa dijaliznim vrećicama opisane u delu 3.2.15., ali je kod ove analize u dijalizne vrećice dodata smeša 1 ml NE i 3 ml 10 %, v/v, FBS u PBS. Sadržaj kurkumina je određen nakon 5, 20, 40, 60, 120 i 240 minuta pomoću LC-MS/MS metode. Oslobađanje kurkumina je grafički predstavljeno kao zavisnost kumulativnog procenta oslobođenog kurkumina u funkciji vremena. Analize su sprovedene u triplikatu.

3.2.20. Hemolitički potencijal

Hemolitički potencijal odabranih nanoemulzija je procenjen pomoću modifikovane metode koje su predhodno opisali Amin i Dannenfelser (Amin i Dannenfelser, 2006), kao i Devalapalli i saradnici (Devalapally i sar., 2015). Ukratko, 0,1 ml nanoemulzija i 0,9 ml citratne pune krvi pacova je pomešano i ekvilibrisano tokom 2 min na sobnoj temperaturi. Kao kontrole, umesto NE, korišćeni su fiziološki rastvor (FR) i 2% rastvor natrijum dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) kao 0% i 100% hemolize, respektivno. Nakon završetka inkubacije, u uzorke je dodato 5 ml fiziološkog rastvora. Ovi inkubati su kratko vorteksirani, a potom i centrifugirani tokom 5 min na 3000 rpm (Hermle Z 206 A, Vehingen, Nemačka). Ovaj korak je ponovljen četiri puta, uz odbacivanje supernatanta. Na kraju je 4 ml visoko prečišćene vode dodato u formirani pelet sastavljen uglavnom od crvenih krvnih zrnaca, kako bi došlo do njihove lize i oslobađanja preostalog hemoglobina. Uzorci su ponovo kratko vorteksirani i centrifugirani 5 min na 3000 rpm. Apsorbancija finalnog supernatanta je izmerena na spektrofotometru (Evolution 300, Thermo Fisher Scientific, Cambridge), na talasnoj dužini od 540 nm, a izmerene vrednosti apsorbancija su bile proporcionalne količini neoštećenih crvenih krvnih zrnaca. Hemolitički potencijal nanoemulzija je izražen kao % hemolize i izračunat na osnovu **jednačine 11**:

$$\% \text{ hemolize} = \frac{A_{FR} - A_U}{A_{FR} - A_{SDS}} \times 100 \quad (\text{jednačine 11})$$

gde je A_{FR} vrednost apsorbance za uzorke sa fiziološkim rastvorom, A_U je apsorbancija za uzorke NE, a A_{SDS} je apsorbancija za uzorke sa natrijum dodecil sulfatom. Formulacije kod kojih je procenat hemolize manji od 10% se smatraju bezbednim (nehemolitičkim), dok

dobijene vrednosti veće od 25% ukazuju na značajan hemolitički potencijal (Amin i Dannenfelser, 2006).

3.2.21. Citotoksična aktivnost

Ćelije humanog karcinoma debelog creva (LS-174) i normalne ćelije humanih fibroblasta pluća (MRC5) su bile poklon od strane Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije i održavane su u jednoslojnoj kulturi u RPMI (*Rosvell Park Memorial Institute*) 1640 hranljivoj podlozi (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, SAD), pripremljenoj u sterilnoj dejonizovanoj vodi, uz dodatak penicilina (100 U/ml), streptomocina (100 mg/ml), 4-(2-hidroksietil) piperazin-1-etansulfonske kiseline (HEPES) (25 mM), L-glutamina (3 mM) i 10% toplotom inaktiviranog fetalnog telećeg seruma (engl. *fetal calf serum*, FCS) pH vrednosti 7,2. Ćelije su uzgajane na 37 °C u 5% CO₂ i vlažnom vazduhu. Ćelije su zasejane na ploče sa 96 bunarića (Nunc) - LS-174 (7000 ćelija/bunariću) i MRC5 (5000 ćelija/bunariću) u medijumu za ćelijsku kulturu, u ukupnoj zapremini od 100 µl i uzgajane tokom 24 h. Sledećeg dana, ćelije su nakon adherencije tretirane pripremljenim razblaženjima odabranih nanoemulzija ili čistog kurkumina. Ukratko, nanoemulzije sa kurkuminom i odgovarajuće placebo formulacije su filtrirane kroz nepirogeni sterilni filter od 0,22 µm (Sarstedt, Nemačka) i razblažene hranljivim medijumom u odnosu 1:4, v/v. Rastvor kurkumina je pripremljen rastvaranjem kurkumina u dimetilsulfoksidu (DMSO) i razblaživanjem u istom hranljivom medijumu kako bi se dobila ista koncentracija kurkumina kao i u razblaženim NE. Finalna koncentracija DMSO u ćelijama je bila manja od 1%. Svi uzorci su dodatno razblaženi hranljivim medijumom, a u bunariće je dodato 50 µl dobijenih radnih rastvora. Konačne koncentracije kurkumina nanete na ćelijske linije su bile: 3,125; 6,25; 12,5 i 25 µg/ml. U sve bunariće su dodavane disperzije različitih koncentracija, izuzev u kontrolne gde je dodavana samo hranljiva podloga. Svi testovi su izvedeni u triplikatu. Kao slepa proba je korišćena hranljiva podloga sa odgovarajućim koncentracijama agenasa, ali bez ciljnih ćelija, pripremljena takođe u triplikatu.

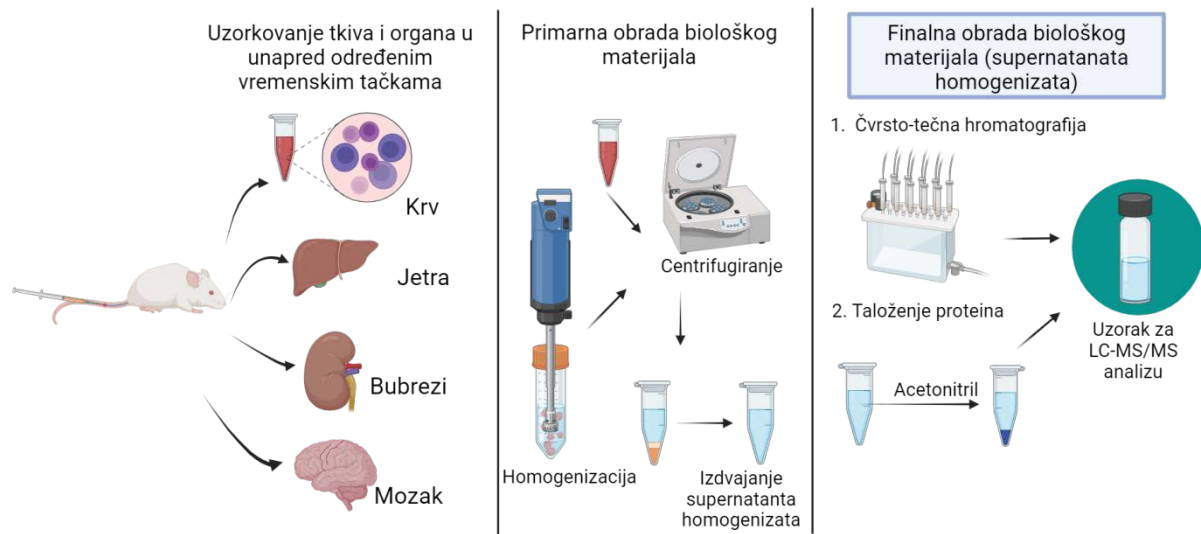
Preživljavanje ćelija je analizirano 48 h nakon tretmana, pomoću MTT testa. Ukratko, 20 µl rastvora MTT reagensa u fosfatnom puferu sa natrijum-hloridom (pH 7,2) koncentracije 5 µg/l je dodato u svaki bunarić. Uzorci su zatim inkubirani 4 h na 37 °C u 5% CO₂, pri vlažnoj vazdušnoj atmosferi. Zatim je u bunariće dodato 100 µl 10% natrijum dodecil sulfata i ploče su držane preko noći u CO₂ inkubatoru u vlažnoj atmosferi, nakon čega je izmerena apsorbancija na 570 nm. Step en ćelijskog preživljavanja, izražen u % je izračunat na osnovu jednačine 12:

$$\% \text{ preživljavanja} = \frac{A_{\text{uzorak}} - A_{\text{slepa proba}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{slepa proba}}} \times 100 \quad (\text{jednačina 12})$$

3.2.22. Obrada biološkog materijala sa kurkuminom

U cilju procene distribucije kurkumina u različita tkiva i organe nakon *in vivo* primene (PEGilovanih) nanoemulzija, prvo je bilo potrebno obraditi uzorke biološkog materijala kako bi se dobili adekvatni uzorci za LC-MS/MS analizu. Kritičan deo procesa je bilo finalno prečišćavanje supernatata homogenizata organa. U tu svrhu su testirana dva različita postupka, čvrsto-tečna hromatografija i taloženje proteina acetonitrilom. Radi dobijanja biološkog materijala životinje su anestetizirane ketamin-hidrohloridom (90 mg/kg, 10% Ketamidol, Richter Pharma AG, Vels, Austrija), a potom su uzeti uzorci krvi (punkcijom srca pomoću heparinizovanih špricova), jetre, bubrega i mozga. Plazma je izolovana nakon 10 min centrifugiranja na 1000 × g (MiniSpin® plus centrifuga, Eppendorf, Nemačka). Uzorci jetre, bubrega i mozga su homogenizovani u 5 ml metanola ili 80%, v/v, vodenom rastvoru acetonitrila u odnosu 1:3 (m/v, g/ml) pomoću rotor-stator homogenizatora (IKA Ultra-

Turrax® T25 digital, IKA®-Werke GmbH and Co. KG, Štaufen, Nemačka) tokom 1 min na oko 16000 rpm. Supernatanti homogenizata su izolovani nakon 20 min centrifugiranja na 4000 rpm (Hermle Z 206 A, Vehingen, Nemačka). Šema protokola za obradu biološkog materijala sa kurkuminom je data na **Slici 3.2.2.**



Slika 3.2.2. Šema obrade biološkog materijala sa kurkuminom

3.2.22.1. Čvrsto-tečna ekstrakcija

Protokol čvrsto-tečne ekstrakcije je podrazumevao propuštanje pripremljenih supernatanta kroz Oasis HLB kolone (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, SAD), a zatim eluiranje kurkumina različitim zakišljenim eluatima kako bi se obezbedilo adekvatno ispiranje sa kolone. U ovu svrhu su korišćeni metanolni rastvori sa 2% ili 4%, v/v, sirćetne kiseline, ili 0,5 %, m/m, rastvora difluorosirćetne kiseline ili trifluoroetanol. Kroz kolonu je najpre propušteno 1 ml metanola, zatim dva puta po 1 ml prečišćene vode, 250 μ l plazme ili supernatanta homogenizata solidnih organa, 50 μ l rastvora za kalibraciju (različite koncentracije metanolnih rastvora kurkumina), 50 μ l rastvora internog standarda i ponovo dva puta po 1 ml prečišćene vode, kako bi se uklonio višak tkivnog materijala, zatim 50 μ l metanola da započne elucija, a zatim po 1 ml eluata za ispiranje kurkumina sa kolone. U cilju procene zadržavanja kurkumina na kolonama, ali i uticaja tkivnog matriksa, postupak čvrsto-tečne ekstrakcije je ponovljen više puta sa 0,5 μ M rastvorom kurkumina kako bi se utvrdila ponovljivost rezultata. Koncentracija kurkumina u dobijenim eluatima je određena pomoću LC-MS/MS metode.

3.2.22.2. Taloženje proteina acetonitrilom

Metoda taloženja proteina podrazumeva precipitaciju proteina dodavanjem acetonitrila u plazmu ili supernatante homogenizata organa. U ovoj metodi je za pripremu kalibracija korišćeno 170 μ l neopterećenog biološkog materijala, 30 μ l rastvora za kalibraciju (metanolni 0,5; 1; 2; 2,5; 3; i 3,5 μ M rastvori kurkumina za uzorke plazme, bubrega i mozga i 0,25; 0,5; 1; 2; 3 i 3,5 μ M za uzorke jetre), 15 μ l internog standarda i 385 μ l acetonitrila. U slučaju biološkog materijala sa kurkuminom u 170 μ l prečišćenog tkivnog materijala je dodato 15 μ l internog standarda i 415 μ l acetonitrila. Dobijeni uzorci su vorteksirani 60 s, a potom centrifugirani 10 min na $12000 \times g$ (Eppendorf 5424, Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka), pri temperaturi od 4 $^{\circ}$ C, kako bi se istaložili prisutni proteini. Koncentracija kurkumina u supernatantima je određena pomoću LC-MS/MS metode.

3.2.23. Pilot farmakokinetička studija

Farmakokinetičke studije su sprovedene nakon intravenske primene nanoemulzija i rastvora kurkumina (0,075% kurkumina, 5% DMSO, 5% PEG 400, 2% polisorbata 80, 14% propilenglikola i visoko prečišćene vode do 100%). Mužjaci pacova *Sprague-Dawley* soja, starosti 8 - 10 nedelja, prosečne težine 170 - 200 g, su bili smešteni u kaveze sa po četiri životinje, uz smenu režima svetlosti i tame na 12 h, sa uključivanjem svetla u 6.00 h ujutru. U sobi za životinje je održavana temperatura od 22 ± 1 °C, uz relativnu vlažnost vazduha od 40 - 70%, i osvetljenost od 120 lx. Na osnovu pozitivnog mišljenja Etičke komisija za rad sa oglednim životinjama Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, studiju je odobrila Uprava za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede (rešenje broj 323-07-13806/2020-05 od 31.12.2020). Eksperimentalne životinje su podeljene u četiri grupe na osnovu primenjenog tretmana (KNPEG, K21, K51 i rastvor kurkumina), a svaka grupa je imala po četiri životinje (dve životinje po vremenskoj tački za svaku formulaciju). Formulacije su primenjene intravenski, kroz repnu venu pacova, pomoću špic pumpe (Stoelting Co., Wood Dale, IL, SAD), u zapremini od 6,67 ml/kg, kako bi se postigla željena doza od 5 mg/kg. Životinje su anestetizirane ketamin-hidrohloridom (90 mg/kg, 10% Ketamidol, Richter Pharma AG, Vels, Austrija) u datim vremenskim tačkama (5 minuta ili 24 h nakon primene tretmana), a uzorci biološkog materijala su obrađeni na način opisan u poglavlju 3.2.22., uz finalno prečišćavanje odabranom optimalnom metodom.

3.2.24. Statistička analiza

Statistička analiza je obavljena uz pomoć IBM SPSS Statistics softvera (verzija 23 Čikago, IL, SAD). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti posmatranih parametara \pm standardna devijacija (SD), kad god je bilo moguće. Statistička analiza razlika u vrednostima izmerenih fizičko-hemijskih parametara: inicijalno nakon pripreme i nakon dve godine čuvanja na sobnoj temperaturi, između PEGilovanih i ne-PEGilovanih formulacija, nanoemulzija sa i bez kurkumina, nakon inkubacije u čistom PBS i PBS obogaćenom proteinima (BSA ili FBS) za svaku posmatranu vremensku tačku, kao i između inicijalnih i FRAP vrednosti izmerenih nakon 2 godine, procenjena je korišćenjem Studentovog t-testa. Za analizu rezultata dobijenih u *in vitro* testiranju oslobađanja kurkumina, kao i za procenu stabilnosti NE u PBS i medijumima sa proteinima je korišćena jednofaktorska ANOVA, praćena Tukey *post hoc* testom, a kada osnovne pretpostavke ANOVA analize nisu bile ispunjene (varijanse grupe nisu bile jednake), korišćen je neparametarski Kruskal-Wallis test (jednofaktorska ANOVA po rangu), zajedno sa neparametarskim Mann-Whitney U testom, za poređenja između grupa, u slučaju dobijenih značajnih razlika. Vrednost p od 0,05 je uzeta kao značajna.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada

4.1.1. Priprema i karakterizacija nanoemulzija

Jedno od inicijalnih razmatranja prilikom razvoja nanoemulzija kao sistema za isporuku lekovitih supstanci jeste rastvorljivost supstance u uljima (Hörmann i Zimmer, 2016). Rastvorljivost kurkumina je ispitana u čistom sojinom ulju i njegovim kombinacijama sa trigliceridima srednje dužine lanca, budući da su ova ulja najčešće korišćeni sastojci masne faze komercijalno dostupnih parenteralnih nanoemulzija (Ganta i sar., 2014). Nanoemulzije pripremljene samo sa sojinim uljem, koje je bogato trigliceridima dugog lanca, se odlikuju većom veličinom nanoemulzionih kapi u poređenju sa NE čiju masnu fazu čini kombinacija sojinog ulja i MCT. Ovo se može objasniti razlikom u viskozitetu između masnih faza, budući da formulacije pripremljene sa mešavinom triglicerida srednjeg i dugog lanca imaju manji viskozitet, pa se njihove kapi mogu lakše usitniti primenom homogenizacije pod visokim pritiskom (Yao i sar., 2019). Fiksna koncentracija masne faze od 20%, *m/m*, je izabrana zbog većeg sadržaja triglicerida u ovim emulzijama u poređenju sa onima koje sadrže 10% masne faze, tj. nižeg odnosa fosfolipida i triglicerida, i manje interferencija sa aktivnostima lipoproteinske lipaze (Ton i sar., 2005). Cilj ovog dela istraživanja je pronalaženje masne faze koja bi obezbedila maksimalnu inkorporaciju kurkumina u formulacije, imajući na umu prospektivne *in vivo* studije, ali i činjenicu da ne postoji konsenzus za preporučeni raspon doza.

Rastvorljivost kurkumina u čistom sojinom ulju, ali i u mešavinama sa MCT, nije bila zadovoljavajuća (< 1,5 mg/ml), dok je dodavanje lecitina rezultiralo nešto većom, ali i dalje niskom rastvorljivošću (< 4 mg/ml). Uz fiksnu koncentraciju masne faze od 20%, sadržaj kurkumina u formulacijama bio bi nizak (< 0,50 mg/ml). Kako bi se obezbedilo povećanje sadržaja kurkumina u formulacijama, dodat je benzil alkohol, korastvarač koji se meša sa uljima. Budući da je rastvorljivost kurkumina u benzil alkoholu bila veća u poređenju sa uljima i njihovim mešavinama sa lecitinom, (25 mg/ml), bilo je moguće postići koncentraciju od 0,75 mg/ml kurkumina u NE. Na kraju je za masnu fazu korišćena mešavina sojinog ulja i MCT u odnosu 1:4, *m/m*, na osnovu pregleda literature, budući da je ova kombinacija omogućila dobijanje NE male veličine kapi, dobre dugotrajne stabilnosti i niskog viskoziteta (Đorđević i sar., 2015; Đorđević i sar., 2013). Sastav vodene faze je izabran na osnovu sastava masne faze. Natrijum-oleat je korišćen kao kostabilizator, budući da su se formulacije bez njega raspale u roku od jedne sedmice. Njegov dodatak je povećao pH vrednost formulacija na oko 8, što je bilo nepovoljno za stabilnost kurkumina (Kharat i sar., 2017; Sharma i sar., 2005), pa je pH vodene faze NE podešena na oko 7 pomoću 0,1 M HCl, dok je glicerol dodat kao sredstvo za izotonizaciju.

4.1.2. Eksperimentalni dizajn

U skladu sa šemom eksperimentalnog dizajna datoj u **Tabeli 3.2.2.** pripremljeno je 25 placebo nanoemulzija metodom homogenizacije pod visokim pritiskom, koje su okarakterisane u pogledu veličine i raspodele veličine kapi i zeta potencijala. Prosečna veličina kapi (*Z-ave*) pripremljenih NE je bila u rasponu od 106 – 171 nm, što sa PDI ispod 0,2 i vrednostima *ZP* oko - 40 mV, ukazuje da pripremljene formulacije mogu biti pogodni sistemi za parenteralnu primenu. *Z-ave* i PDI su odabrane kao zavisne promenljive budući da imaju presudan uticaj na sudbinu nanoemulzija nakon parenteralne primene, njihovu dugoročnu stabilnost i uspeh aseptične filtracije, dok raspodela veličine kapi ima poseban značaj za bezbednosni profil NE (Floury i sar., 2000; Floyd, 1999; Schuh i sar., 2014).

Strategija eksperimentalnog dizajna je korišćena za proučavanje uticaja parametra procesa i faktora formulacije na Z-ave i PDI, sa ciljem pronalaženja optimalne kombinacije zavisnih promenljivih koja daje NE sa najmanjim vrednostima Z-ave i PDI. Ovaj pristup je pokazao uticaj formulacionih faktora (vrste i koncentracije PEG-FL) i procesnih parametara (pritiska HPH i broja ciklusa) na odabrane zavisne promenljive, ali je i ukazao na moguće interakcije između nezavisnih varijabli, što nije bilo moguće sagledati variranjem jednog po jednog parametra. Na osnovu primenjenog D-optimalnog eksperimentalnog dizajna (**Tabela 3.2.2.**), predloženo je ukupno 25 formulacija (15 na osnovu modela, 5 da bi se procenio *lack of fit*, uz dodatnih 5 ponavljanja), koje su pripremljene nasumično. Za zavisne promenljive, Z-ave i PDI, izračunati su efekti koji odgovaraju nezavisnim promenljivama i njihovim interakcijama. Faktori i interakcije koje nisu imale značajan uticaj na odgovore, odnosno zavisne promenljive, $p > 0,05$, su isključene iz dobijenih modela, osim onih koji su potrebni za održavanje hijerarhije. Dobijeni su redukovani faktorski modeli čije su jednačine, sa kodiranim faktorima, date u **jednačinama 12** (Z-ave) i **13** (PDI):

$$Z - ave = +127,88 + 1,43 A + 1,88 B - 12,37 C - 16,64 D(1) + 2,47 D(2) - 2,17 AC + 1,86 AD(1) + 0,38 AD(2) - 1,15 BC + 7,10 CD(1) + 0,58 CD(2)$$

(jednačina 12)

$$PDI = +0,14 + 0,009 B - 0,016 C - 0,007 D(1) - 0,001 D(2) + 0,008 CD(1) + 0,006 CD(2)$$

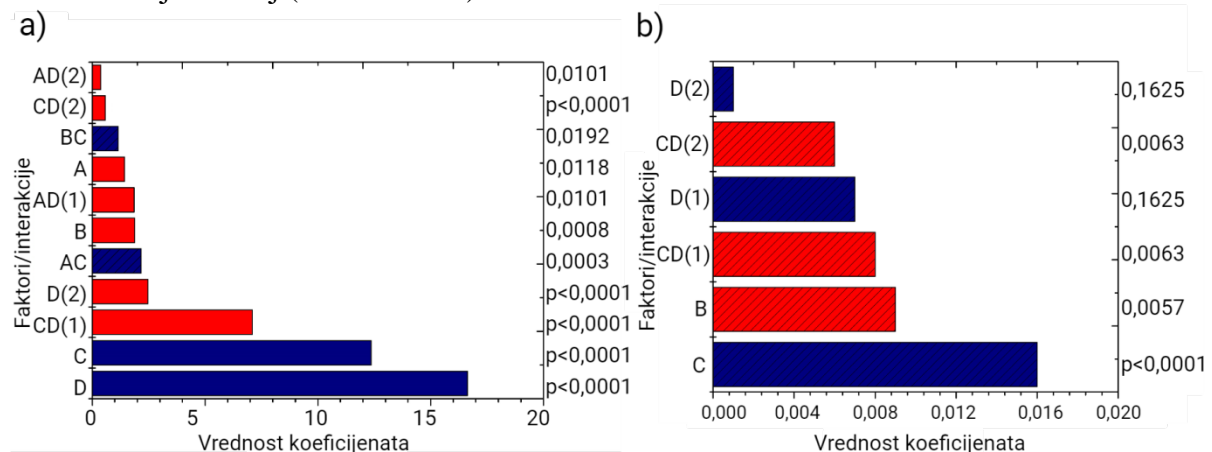
(jednačina 13)

ANOVA analiza je pokazala da su generisani modeli za Z-Ave ($F = 266,99$) i PDI ($F = 9,22$) bili značajni ($p < 0,05$) uz neznačajan *lack of fit*. Predloženi modeli su imali zadovoljavajuće vrednosti koeficijenta višestruke korelacije (R^2), prilagođenog koeficijenta višestruke korelacije ($R^2_{adjusted}$), i adekvatne vrednosti preciznosti, za Z-Ave: 0,9956; 0,9919; 47,903; a za PDI: 0,7546, 0,6728, 10,195, respektivno, što ukazuje da su odgovori dobro opisani predloženim modelima koji se mogu koristiti za navigaciju kroz eksperimentalni prostor.

Na **Slici 4.1.1.** su predstavljeni dijagrami koji ilustruju uticaj pojedinačnih faktora i njihovih interakcija na Z-ave (**Slika 4.1.1.a**) i PDI (**Slika 4.1.1.b**) pripremljenih NE. Veća vrednost koeficijenta ukazuje na izraženiji efekat na ispitivani odgovor, pri čemu znak ispred koeficijenta označava pravac uticaja, pa tako negativni predznak znači antagonistički, a pozitivni sinergistički efekat. Kao što se vidi na **Slici 4.1.1.a**, na Z-ave su značajno ($p < 0,05$) uticali svi individualni faktori u sledećem redosledu: broj HPH ciklusa (D) > pritisak HPH (C) > koncentracija PEG-FL (B) > vrsta PEG-FL (A). Parametri procesa (D i C) su imali veći efekat u poređenju sa faktorima formulacije (A i B), pri čemu su oba imala antagonistički efekat, pa je povećanje pritiska homogenizacije i broja ciklusa dovelo do smanjenja Z-ave, zbog generisanja većih sila smicanja i turbulencije tokom izrade (Floury i sar., 2000). Sa druge strane, povećanje koncentracije PEG-FL i upotreba PEG5000-DPPE (umesto PEG2000-DSPE) je rezultovalo povećanjem veličine kapi (sinergistički efekat). Štaviše, pokazano je da su na Z-ave značajno uticali ($p < 0,05$) ne samo istraživani faktori, već i njihove interakcije: pritisak HPH / broj HPH ciklusa (CD); vrsta PEG-FL / pritisak HPH (AC); koncentracija PEG-FL / pritisak HPH (BC); vrsta PEG-FL / broj ciklusa HPH (AD), pri čemu je CD interakcija bila najznačajnija (**Slika 4.1.1.a**).

S druge strane, na PDI je značajno ($p < 0,05$) uticao pritisak HPH (C) i koncentracija PEG-FL (B) (**Slika 4.1.1.b**). Koncentracija PEG-FL je imala sinergistički efekat, što znači da je raspodela veličine kapi bila šira kada je korišćeno 0,3% PEG-FL u poređenju sa 0,1%. Naprotiv, povećanje pritiska homogenizacije rezultovalo je užim (željenim) PDI (antagonistički efekat). Broj ciklusa homogenizacije (D) kao individualni faktor nije značajno

uticao na PDI, ali je zadržan u modelu jer je interakcija između njega i pritiska HPH (CD) imala značajan uticaj (**Slika 4.1.1.b**).

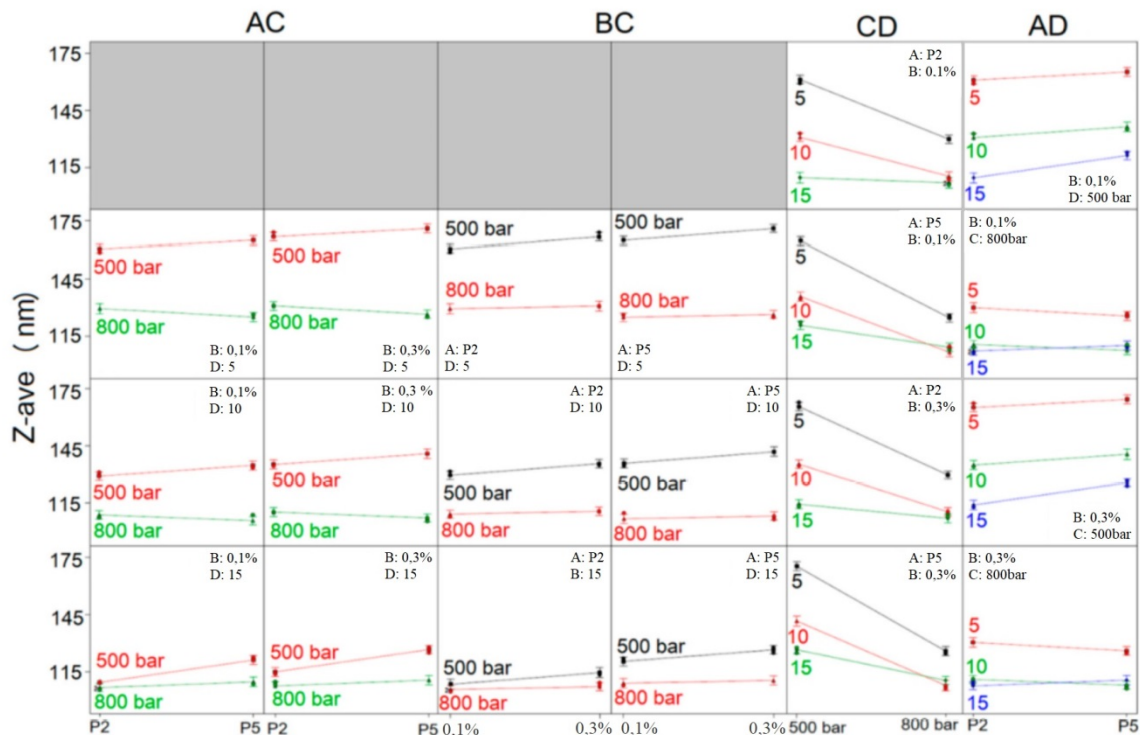


Slika 4.1.1. Uticaj individualnih faktora i njihovih interakcija na: a) Z-ave i b) PDI sa označenim vrednostima koeficijenata i p vrednostima za svaku komponentu modela. A – vrsta PEG-FL; B – koncentracija PEG-FL; C – pritisak HPH; D – broj ciklusa HPH

Radi adekvatne analize uticaja istraživanih faktora na veličinu i raspodelu veličine NE kapi interakcije između nezavisnih promenljivih su detaljno proučene, a dijagrami interakcija za Z-ave i PDI su predstavljeni na **Slikama 4.1.2. i 4.1.3.** Kod AC interakcije (**Slika 4.1.2.**) se može videti da je veličina kapi NE bila manja kada je pritisak homogenizacije bio 800 bar, u poređenju sa 500 bar, bez obzira na vrstu i koncentraciju PEG-FL, ili broj ciklusa homogenizacije. Razlika u Z-ave vrednostima NE izrađenih pri dva različita pritiska homogenizacije je bila izraženija kada je korišćeno manje ciklusa HPH, 5 ili 10 u odnosu na 15. Štaviše, Z-ave NE pripremljenih sa PEG2000-DSPE na 500 bar je bio niži u odnosu na NE formulisane sa PEG5000-DPPE, bilo da je korišćeno 0,1 % ili 0,3 % PEG-FL. Sa druge strane, Z-ave NE izrađenih sa PEG5000-DPPE, na 800 bar, je bio nešto niži nakon 5 i 10 ciklusa homogenizacije, ali viši nakon 15, u poređenju sa NE izrađenim sa PEG2000-DSPE, bez obzira na upotrebljenu koncentraciju PEG-FL. Preko dijagrama koji opisuju uticaj BC interakcije na Z-ave (**Slika 4.1.2.**), može se videti da Z-ave NE pripremljenih sa bilo kojom vrstom PEG-FL, pri pritisku HPH od 500 bar, raste sa porastom koncentracije PEG-FL sa 0,1% na 0,3%, bez obzira na broj ciklusa homogenizacije. Kada je korišćen pritisak homogenizacije od 800 bara, Z-ave dobijenih NE se nije značajno menjao sa povećanjem koncentracije PEG-FL.

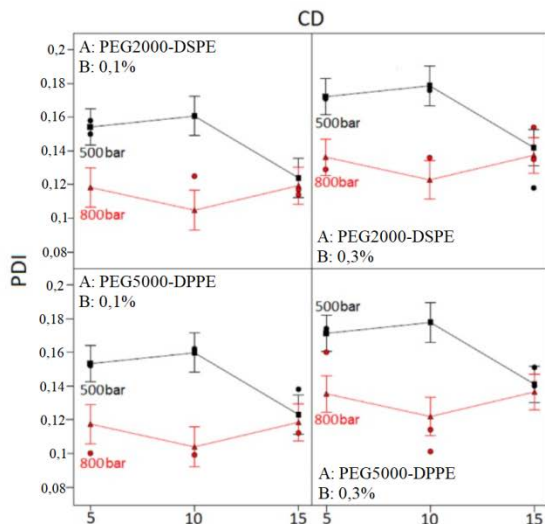
Proučavanjem CD interakcije (**Slika 4.1.2.**), može se videti da se korišćenjem bilo ispitivane vrste i koncentracije PEG-FL dobijaju kapi manje veličine pri pritisku od 800 bar u poređenju sa 500 bar, bez obzira na broj ciklusa homogenizacije. Smanjenje Z-ave sa povećanjem pritiska je bilo izraženije kod 5 i 10, u poređenju sa 15 ciklusa, posebno kada je korišćen PEG2000-DSPE. Štaviše, kombinacija procesnih parametara od 800 bar i 10 ciklusa je dala NE sa najmanjim Z-ave vrednostima u slučaju NE formulisanih sa PEG5000-DPPE, dok kod nanoemulzija sa PEG2000-DSPE nije primećena značajna razlika u veličini kapi nakon 10 i 15 ciklusa homogenizacije na 800 bar. Proučavanjem AD interakcije (**Slika 4.1.2.**) može se primetiti da se, bez obzira na koncentraciju PEG-FL, povećavanjem broja ciklusa homogenizacije sa 5 na 15, Z-ave smanjuje u slučaju NE sa PEG2000-DSPE. Ovo smanjenje je izraženije kod pritiska od 500 bar u poređenju sa 800 bar. Isto se dešavalo sa NE pripremljenim sa PEG5000-DPPE pri pritisku od 500 bar, Z-ave se smanjivao sa porastom broja ciklusa homogenizacije. Neznatno odstupanje od ovog trenda je uočeno kod NE

pripremljenih sa PEG5000-DPPE na 800 bara, gde je najmanja veličina kapi dobijena sa 10 ciklusa homogenizacije.



Slika 4.1.2. Interakcije koje utiču na veličinu kapi (Z-Ave) ispitivanih placebo nanoemulzija: P2 – PEG2000-DSPE; P5 – PEG5000-DPPE; AC – interakcija između vrste PEG-FL i pritiska HPH; BC – interakcija između koncentracije PEG-FL i pritiska HPH; CD interakcija između pritiska i broja ciklusa HPH ; AD – interakcija između vrste PEG-FL i broja ciklusa HPH.

Posmatranjem uticaja CD interakcije na raspodelu veličine NE kapi (Slika 4.1.3.), može se primetiti da je PDI bio niži pri pritisku od 800 bar, bez obzira na broj ciklusa HPH, vrstu i koncentraciju PEG-FL, u poređenju sa PDI vrednostima formulacija pripremljenih na 500 bar. Razlika u PDI između NE izrađenih na 500 i 800 bara je bila izraženija kod primenjenih 5 i 10 ciklusa homogenizacije, dok je kod 15 ciklusa ova razlika postala zanemarljiva. Pri pritisku homegenizacije od 500 bar, povećanje broja ciklusa homogenizacije sa 5 na 10 je dovelo do povećanja PDI, dok je dalje povećanje broja ciklusa homogenizacije sa 10 na 15 dovelo do smanjenja PDI. Sa druge strane, pri pritisku homogenizacije od 800 bar, pad PDI vrednosti sa povećanjem broja ciklusa homogenizacije sa 5 na 10 je praćen povećanjem PDI pri korišćenju 15 umesto 10 ciklusa, bez obzira na vrstu i koncentraciju PEG-FL. Upotreba veće koncentracija PEG-FL je dovela do povećanja PDI, nezavisno od vrste PEG-FL, broja ciklusa i pritiska homogenizacije. Na kraju, najniži PDI je primećen pri pritisku od 800 bar sa 10 ciklusa homogenizacije, bez obzira na vrstu ili koncentraciju PEG-FL.



Slika 4.1.3. Interakcije koje utiču na PDI pripremljenih nanoemulzija; P2 – PEG2000-DSPE; P5 – PEG5000-DPPE; CD – interakcija između pritiska i broja ciklusa HPH

Uzimajući u obzir sve pojedinačne faktore i njihove interakcije, urađena je numerička optimizacija kako bi se odabrale formulacije sa najmanjim Z-ave i PDI vrednostima. Program je izabrao 10 najboljih formulacija (od ukupno 25 mogućnosti, uključujući i ponovljene formulacije, **Tabela 3.2.9.1.**) i svakoj dodelio indeks poželjnosti. Veće vrednosti indeksa poželjnosti ukazuju na bolju usklađenost sa postavljenim ciljevima, odnosno na formulacije sa najmanjim Z-ave i PDI vrednostima (**Tabela 4.1.1.**). Na osnovu dobijenih rezultata, oba PEGilovana fosfolipida (PEG2000-DSPE i PEG5000-DPPE) bi mogla da se koriste u obe predložene koncentracije (0,1% i 0,3%), a kao optimalni procesni parametri su izabrani pritisak homogenizacije od 800 bar i 10 ciklusa homogenizacije. Ovi uslovi su korišćeni za pripremu formulacija sa kurkuminom.

Tabela 4.1.1. Numerička optimizacija formulacija odabranih prema eksperimentalnom dizajnu

	Vrsta PEG-FL	Koncentracija PEG-FL (% , <i>m/m</i>)	Pritisak homogenizacije (bar)	Broj ciklusa homogenizacije	Indeks poželjnosti
1	PEG5000-DPPE	0,1	800	10	0,761
2	PEG2000-DSPE	0,1	800	10	0,666
3	PEG2000-DSPE	0,1	800	15	0,636
4	PEG5000-DPPE	0,1	800	15	0,559
5	PEG5000-DPPE	0,3	800	10	0,556
6	PEG2000-DSPE	0,1	500	15	0,552
7	PEG2000-DSPE	0,3	800	10	0,476
8	PEG2000-DSPE	0,3	800	15	0,385
9	PEG5000-DPPE	0,3	800	15	0,332
10	PEG2000-DSPE	0,3	500	15	0,188

PEG-FL – PEGilovani fosfolipidi

Za proveru validnosti optimalnih parametara i izračunatih odgovora, odnosno za potvrdu dobijenog modela, izabrane su tri optimizovane nanoemulzije (formulacije 1, 2 i 5; **Tabela**

4.1.1.) Pripremljene su tri serije svake formulacije i dobijeni eksperimentalni podaci za Z-ave i PDI su upoređeni sa predviđenim. Uočene eksperimentalne vrednosti u testu provere validnosti su bile u okviru izračunatog intervala predviđanja, tj. u skladu sa predviđenim vrednostima (**Tabela 4.1.2.**), što sugerise da se razvijeni eksperimentalni dizajn može uspešno koristiti za evaluaciju i optimizaciju sastava nanoemulzionih formulacija i postupka izrade, u okviru realnog eksperimentalnog prostora.

Tabela 4.1.2. Potvrda modela – poređenje predviđenih i izmerenih vrednosti veličine i raspodele veličine kapi nanoemulzija

Vrednosti faktora				Odgovori	Srv _{pred}	SE _{pred}	95% PI _n	95% PI _v	Izmerene Srv ± SD
Vrsta PEG-FL	PEG-FL konc.	Pt HPH	Broj ciklusa HPH						
P5	0,1%	800 bar	10	Z-ave (nm)	107,2	1,7	103,5	110,8	107,7 ± 1,1
				PDI	0,105	0,01	0,082	0,127	0,084 ± 0,01
P2	0,1%	800 bar	10	Z-ave (nm)	110,2	1,8	106,3	114,1	106,9 ± 0,8
				PDI	0,105	0,01	0,083	0,127	0,085 ± 0,013
P5	0,3%	800 bar	10	Z-ave (nm)	108,6	1,6	105,2	112,1	109,4 ± 0,8
				PDI	0,123	0,01	0,101	0,144	0,102 ± 0,009

PEG-FL – PEGilovani fosfolipidi; Pt HPH – pritisak homogenizacije pod visokim pritiskom; P2 – PEG2000-DSPE; P5 – PEG5000-DPPE; Srv_{pred} – predviđene srednje vrednosti; SE_{pred} – predviđena standardna greška; PI_n – najniža vrednost u okviru intervala predviđanja; PI_v – najviša vrednost u okviru intervala predviđanja; SD – standardna devijacija

4.1.3. Fizičko-hemijska karakterizacija i stabilnost pripremljenih nanoemulzija

Na osnovu rezultata eksperimentalnog dizajna pripremljene su nanoemulzije sa kurkuminom, uz dodatak 0,1% i 0,3% PEG2000-DSPE (**Tabela 3.2.1.**, formulacije K21 i K23, respektivno) u masnu fazu ili 0,1% i 0,3% PEG5000-DPPE (**Tabela 3.2.1.**, formulacije K51 i K53, respektivno) u vodenu fazu. Sve formulacije su izrađene tehnikom homogenizacije pod visokim pritiskom na 800 bar, kroz 10 diskontinuiranih ciklusa. Pripremljene NE kurkumina, uključujući i referentnu ne-PEGilovanu formulaciju (KNPEG) su okarakterisane u pogledu njihovih fizičko-hemijskih osobina i morfologije, a dodatno je ispraćena i dvogodišnja stabilnost tokom čuvanja na sobnoj temperaturi. Sve NE sa kurkuminom su nakon pripreme bile žute boje i homogenog izgleda. Prosečna veličina kapi u svim NE je bila između 101 i 108 nm, sa uskom distribucijom veličina (PDI < 0,15), što ukazuje da su pripremljene formulacije adekvatne za prospektivnu parenteralnu primenu (Müller i sar., 2004). Apsolutne vrednosti ZP su bile veće od 30 mV (**Tabela 4.1.3.**), pH vrednosti su bile između 6,76 i 6,89, a viskozitet u opsegu 23 – 46 mPa*s (**Tabela 4.1.3.**). Izmerene vrednosti osmolalnosti formulacija: KNPEG, K21, K23, K51 i K53 su bile 556 mOsm/kg, 555 mOsm/kg, 531 mOsm/kg, 562 mOsm/kg i 543 mOsm/kg, respektivno. Ove vrednosti upućuju na dobru podnošljivost pri potencijalnoj parenteralnoj primeni, budući da vrednosti veće od 600 mOsm/kg dovode do smežuranja eritrocita i pojave plazmolize i pojave bola prilikom injektovanja, dok vrednosti manje od 150 mOsm/kg mogu izazvati hemolizu (Roethlisberger i sar., 2017).

Poređenjem veličina kapi ne-PEGilovane formulacije i PEGilovanih NE sa kurkuminom (**Tabela 4.1.3.**), može se videti da dodatak PEGilovanih fosfolipida dovodi do neznatnog (manje od 10 nm), ali statistički značajnog povećanja veličine kapi (t-test, p < 0,001). Ovi rezultati ukazuju da je maksimalno smanjenje veličine kapi već postignuto i da dalje dodavanje stabilizatora (PEG-FL) ne može dovesti do dodatnog smanjenja kapi. Štaviše, zbog hidrofilne prirode PEG lanaca koji pokrivaju površinu kapi, hidrodinamički radijus, koji se određuje tehnikom dinamičkog rasipanja svetlosti i izražava kao Z-ave, se povećava

(Bhattacharjee, 2016; Kandadi i sar., 2011). Nije bilo statistički značajnih razlika u Z-ave vrednostima između placebo formulacije i odgovarajućih NE sa kurkuminom, osim kada je korišćeno 0,3% PEG-FL (t-test, $p < 0,001$, K23 u odnosu na P23; $p < 0,01$, K53 u odnosu na P53), kada je dodatak kurkumina doveo do smanjenja prosečne veličine kapi. Ovo može da ukaže na interakcije između kurkumina i stabilizacionog sloja nanoemulzija u slučaju NE K23 i K53 (Klang i Valenta, 2011). Apsolutne vrednosti ZP od oko 40 mV su ukazivale na prospektivno dobru dugoročnu stabilnost. Najveća apsolutna vrednost zeta potencijala je izmerena kod ne-PEGilovane NE sa kurkuminom (KNPEG), dok je dodatak PEG-FL doveo do smanjenja vrednosti zeta potencijala kod PEGilovanih NE sa kurkuminom (**Tabela 4.1.3.**). Ovo bi se moglo objasniti činjenicom da PEG lanci obezbeđuju sternu zaštitu površine kapi, čime se apsolutne vrednosti zeta potencijala smanjuju u poređenju sa KNPEG, što znači da izmerene vrednosti ZP ne ukazuju na smanjenu stabilnost PEGilovanih NE (Bhattacharjee, 2016). U NE stabilizovanim sa 0,1% PEG-FL, dodatak kurkumina je doveo do promene vrednosti ZP, i to do smanjenja apsolutnih vrednosti ZP kod NE K21 u odnosu na P21, a povećanja kod formulacije K51 u odnosu na P51 (t-test, $p < 0,05$). Razlike u ZP između drugih placebo NE i odgovarajućih formulacija sa kurkuminom nisu bile statistički značajne (**Tabela 4.1.3.**).

Tabela 4.1.3. Z-ave, PDI i ZP placebo formulacija i nanoemulzija sa kurkuminom izmereni inicijalno nakon pripreme i nakon 2 godine čuvanja na sobnoj temperaturi

	Z-ave (nm)		PDI		ZP (mV)	
	Inicijalno	2 god	Inicijalno	2 god	Inicijalno	2 god
KNPEG	101,4 ± 0,2	135,0 ± 2,7 ^{###}	0,076 ± 0,018	0,061 ± 0,020	-48,9 ± 4,2	-41,1 ± 0,4
K21	103,6 ± 0,3 ^{***}	112,7 ± 1,3 ^{###}	0,073 ± 0,012	0,121 ± 0,029	-38,7 ± 0,2	-44,9 ± 1,4 [#]
K23	107,7 ± 0,1 ^{***}	112,2 ± 2,3	0,102 ± 0,003	0,148 ± 0,016 [#]	-41,5 ± 0,3	-43,3 ± 1,7
K51	103,4 ± 0,1 ^{***}	111,0 ± 2,4 [#]	0,048 ± 0,008	0,099 ± 0,003 ^{###}	-39,6 ± 1,0	-37, ± 1,0
K53	107,4 ± 0,6 ^{***}	113,3 ± 2,3 [#]	0,068 ± 0,017	0,117 ± 0,019 [#]	-36,3 ± 0,9 ^{**}	-40,8 ± 0,8 [#]
NPEG	102,9 ± 1,2	128,7 ± 1,9	0,055 ± 0,019	0,094 ± 0,014	-46,6 ± 0,6	-45,0 ± 2,2
P21	104,8 ± 1,2	109,7 ± 1,4	0,053 ± 0,015	0,100 ± 0,026	-47,3 ± 1,2 ⁺⁺⁺	-44,0 ± 0,6
P23	103,5 ± 0,4 ⁺	110,1 ± 0,6	0,066 ± 0,012 ⁺⁺	0,116 ± 0,027	-39,2 ± 1,8	-43,1 ± 1,40
P51	104,5 ± 0,8	114,9 ± 0,5	0,053 ± 0,019	0,108 ± 0,022	-37,5 ± 0,8 ⁺	-40,1 ± 0,5
P53	105,3 ± 0,4 ⁺⁺	111,5 ± 1,0	0,074 ± 0,011	0,110 ± 0,013	-34,3 ± 0,9	-38,1 ± 0,5

Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± sd (n = 3); *, **, *** , $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u poređenju sa KNPEG; #, ## i ###, $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u poređenju sa inicijalno izmerenim vrednostima za nanoemulzije sa kurkuminom; +, ++ i +++ , $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,001$ kod poređenja između NE sa kurkuminom i odgovarajućih placebo formulacija.

Stabilnost pripremljenih NE sa kurkuminom je praćena tokom dve godine, što je bilo naročito značajno budući da je, na osnovu podataka iz sažetaka karakteristika lekova (SmPC), to rok upotrebe nekih komercijalno dostupnih NE koje služe kao sistemi za isporuku aktivnih supstanci, npr Diazemuls[®], emulzije za injekcije, 5 mg/ml (Accord Healthcare Limited, Harrov, UK) ili Diprivan[®], emulzije za injekcije ili infuziju 20 mg/ml (Aspen Pharma Trading Limited, Dublin, Irska). Nakon 2 godine čuvanja na sobnoj temperaturi se nisu pojavili znaci odvajanja faza. Iako je promena prosečne veličine kapi bila statistički značajna za sve NE sa kurkuminom (t-test, $p < 0,05$), izuzev za K21, čak i nakon povećanja Z-ave vrednosti (do 10 nm za PEGilovane NE i oko 30 nm za KNPEG) vrednosti su i dalje prihvatljive za parenteralnu primenu (**Tabela 4.1.3.**). Ovi nalazi su pokazali da su PEG-FL

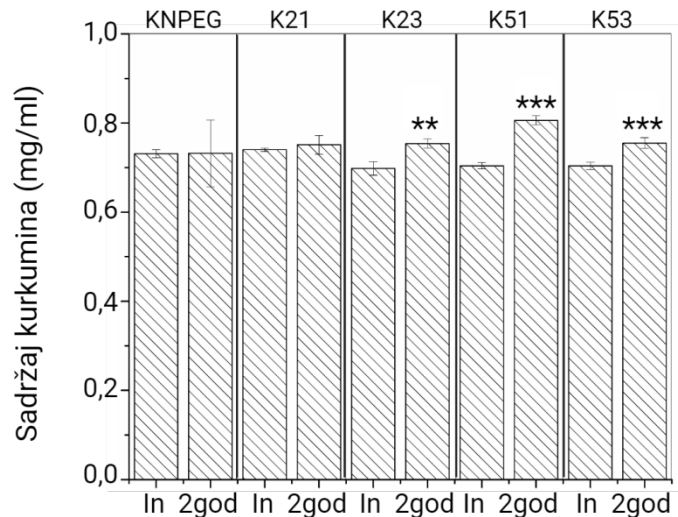
bili efikasni u stabilizaciji NE tokom dugotrajnog čuvanja. Vrednosti PDI su i nakon 2 godine ostale ispod 0,25 (**Tabela 4.1.3.**), što ukazuje na usku raspodelu veličina kapi i odsustvo koalescencije. Apsolutne vrednosti ZP NE sa kurkuminom neznatno su se promenile tokom skladištenja (t-test, $p < 0,05$), ali su i dalje ostale iznad 30 mV (**Tabela 4.1.3.**).

Posle dve godine skladištenja, pH vrednosti ispitivanih NE su pale za približno jednu pH jedinicu, sa oko 7 na oko 6 (**Tabela 4.1.4.**). Uz izuzetak K53, pad pH vrednosti je bio najizraženiji kod formulacije KNPEG, što se može pripisati činjenici da su lanci PEG na površini kapi obezbedili zaštitu od razgradnje lecitina i oslobađanja slobodnih masnih kiselina, što dovodi do pada pH vrednosti nanoemulzija sa lecitinom tokom čuvanja (Klang i Valenta, 2011). Provodljivost i viskoznost formulacija sa kurkuminom se takođe smanjila tokom skladištenja (**Tabela 4.1.4.**), što se nije smatralo značajnim po bezbednost nanoemulzija. Osmolalnost KNPEG, K21, K23, K51 i K53 je nakon 2 godine bila 538 mOsm/kg, 547 mOsm/kg, 539 mOsm/kg, 543 mOsm/kg i 546 mOsm/kg, respektivno, odnosno ostala je u istom, hipertoničnom, ali prihvatljivom opsegu. Sadržaj kurkumina se nije značajno smanjio tokom dve godine čuvanja, što ukazuje na stabilnost pripremljenih NE (**Slika 4.1.4.**). Blago povećanje veličine je verovatno posledica pojave većih kapi tokom čuvanja, a koje se nije moglo uočiti korišćenim metodama, zbog razblaživanja uzoraka.

Tabela 4.1.4. pH, provodljivost i viskozitet placebo formulacija i nanoemulzija sa kurkuminom izmereni inicijalno nakon pripreme i nakon 2 godine čuvanja na sobnoj temperaturi

	pH		Provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		Viskozitet ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)	
	Inicijalno	2 god	Inicijalno	2 god	Inicijalno	2 god
KNPEG	$6,84 \pm 0,03$	$5,53 \pm 0,01^{###}$	$239,33 \pm 1,53$	$175,90 \pm 1,21^{###}$	28,476	5,599
K21	$6,89 \pm 0,01$	$5,80 \pm 0,03^{###}$	$229,33 \pm 0,58^{***}$	$164,33 \pm 2,47^{###}$	23,405	13,949
K23	$6,86 \pm 0,02$	$5,85 \pm 0,02^{###}$	$301,00 \pm 1,73^{***}$	$212,00 \pm 1,73^{###}$	26,432	12,463
K51	$6,76 \pm 0,04$	$6,02 \pm 0,01^{###}$	$254,67 \pm 1,16^{***}$	$176,17 \pm 0,32^{###}$	28,250	17,391
K53	$6,76 \pm 0,02^*$	$4,78 \pm 0,02^{###}$	$232,00 \pm 1,73^{**}$	$198,67 \pm 1,60^{###}$	45,790	10,927
NPEG	$6,78 \pm 0,02$	$5,49 \pm 0,01^+$	$155,87 \pm 2,70^{+++}$	$152,43 \pm 1,50$	–	–
P21	$6,89 \pm 0,02$	$5,79 \pm 0,01$	$162,40 \pm 0,53^{+++}$	$155,73 \pm 0,67$	–	–
P23	$6,85 \pm 0,02$	$5,90 \pm 0,01$	$178,83 \pm 0,67^{+++}$	$241,00 \pm 3,46$	–	–
P51	$6,77 \pm 0,03$	$5,52 \pm 0,03$	$157,20 \pm 0,92^{+++}$	$261,33 \pm 2,31$	–	–
P53	$6,70 \pm 0,02$	$5,48 \pm 0,03^+$	$175,70 \pm 2,23^{+++}$	$164,50 \pm 2,10$	–	–

Sve vrednosti (izuzev viskoziteta) su prikazane kao srednje vrednosti \pm sd ($n = 3$); *, **, i ***, $p < 0,05$; p < 0,01 i p < 0,001 u poređenju sa KNPEG; ###, p < 0,001 u poređenju sa inicijalno izmerenim vrednostima za nanoemulzije sa kurkuminom; +, i +++, p < 0,05 i p < 0,001 kod poređenja NE sa kurkuminom i odgovarajućih placebo formulacija.



Slika 4.1.4. Sadržaj kurkumina u nanoemulzijama izmeren inicijalno nakon pripreme (In) i nakon 2 godine čuvanja na sobnoj temperaturi (2 god). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm sd ($n = 3$)

4.1.4. Laserska difrakcija i uticaj aseptične filtracije

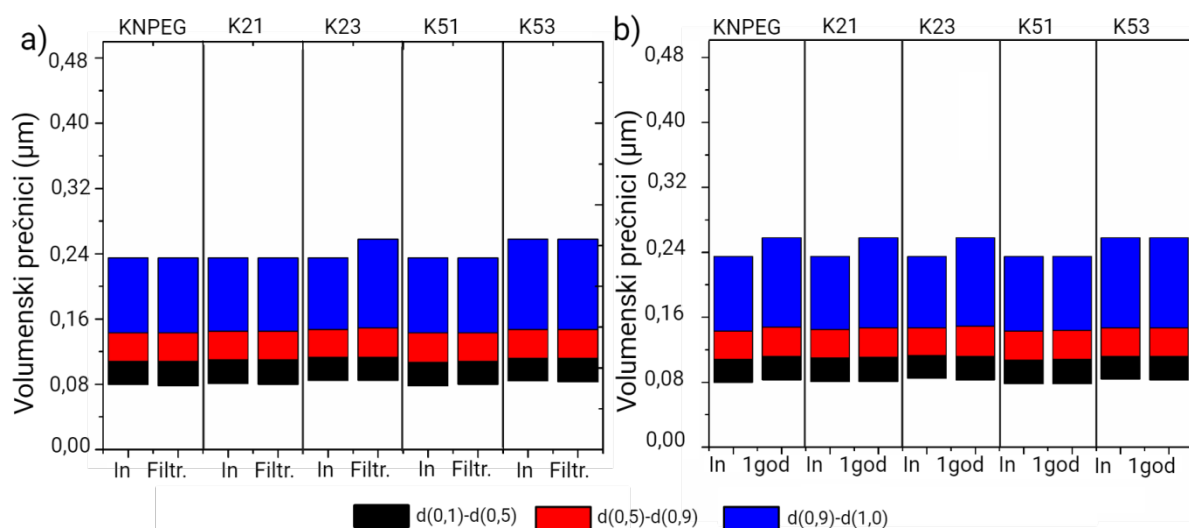
S obzirom na prospektivnu parenteralnu primenu pripremljene formulacije bi trebalo sterilisati. Budući da termalne metode sterilizacije nisu opcija zbog termolabilnosti kurkumina, aseptična filtracija je metoda izbora. Veličina pora filtera za aseptičku filtraciju je $0,22 \mu\text{m}$, što znači da bi veličina kapi trebala da bude ispod 200 nm kako bi se izbegao gubitak kapi, odnosno aktivne supstance. Veličina ($Z\text{-ave}$) i raspodela veličine kapi (PDI) su izmereni pre i posle filtracije kako bi se utvrdio uticaj postupka sterilizacije, a rezultati su prikazani u **Tabeli 4.1.5**. Iako su primećene statistički značajne razlike u $Z\text{-ave}$ i PDI vrednostima kod nekih formulacija, dodatna merenja metodom laserske difrakcije su potvrdila odsustvo većih kapi (**Slika 4.1.5. a**), što pokazuje da aseptična filtracija nije značajnije uticala na fizičko-hemijske karakteristike formulacija.

Tabela 4.1.5. Uticaj aseptične filtracije na veličinu ($Z\text{-ave}$) i raspodelu veličine kapi (PDI)

	$Z\text{-ave}$ (nm)		PDI	
	Pre filtracije	Posle filtracije	Pre filtracije	Posle filtracije
KNPEG	$101,4 \pm 0,2$	$102,1 \pm 0,3^*$	$0,076 \pm 0,018$	$0,072 \pm 0,017$
K21	$103,6 \pm 0,3$	$104,5 \pm 0,3^*$	$0,073 \pm 0,012$	$0,078 \pm 0,011$
K23	$107,7 \pm 0,1$	$105,6 \pm 0,6^{**}$	$0,102 \pm 0,003$	$0,064 \pm 0,004^{***}$
K51	$103,4 \pm 0,1$	$106,4 \pm 0,4^{***}$	$0,048 \pm 0,008$	$0,100 \pm 0,008^{***}$
K53	$107,4 \pm 0,6$	$108,3 \pm 0,8$	$0,068 \pm 0,017$	$0,105 \pm 0,013^*$

Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm sd ($n = 3$); *, **, i ***, $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u poređenju sa vrednostima pre filtracije

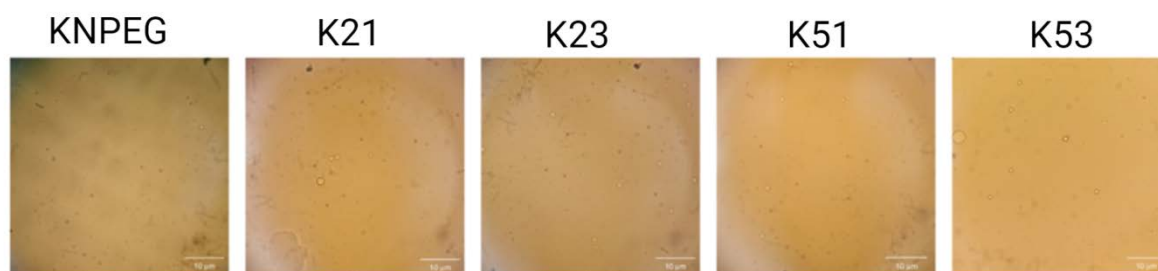
Metoda laserske difrakcije je dodatno korišćena kako bi se videlo da li u pripremljenim formulacijama postoje veće kapi koje nije bilo moguće uočiti metodom dinamičkog rasipanja svetlosti. Potvrđeno je odsustvo kapi većih od $1 \mu\text{m}$ sa d_{100} ispod $0,258 \mu\text{m}$ kod inicijalno pripremljenih formulacija. Rezultati merenja nakon godinu dana čuvanja nisu pokazala značajne promene u veličini kapi (**Slika 4.1.5. b**), a nisu ni uočene populacije većih kapi.



Slika 4.1.5. Veličina kapi izmerena metodom laserske difrakcije: a) inicijalno (In) i nakon aseptične filtracije; b) inicijalno (In) i nakon godinu dana čuvanja na sobnoj temperaturi (1god)

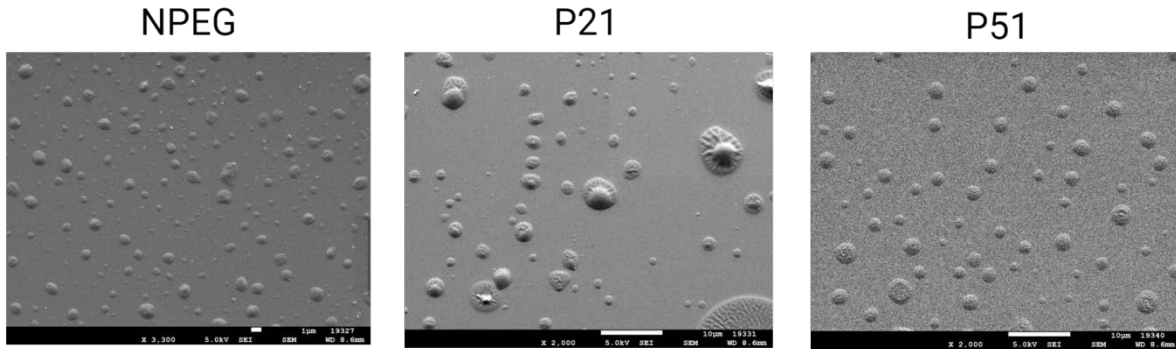
4.1.5. Mikroskopske analize

Prethodno korišćene metode procene veličine kapi (DLS i LD) su podrazumevale određeno razblaženje formulacija, pa je metoda optičke mikroskopije korišćena kako bi se potvrdilo odsustvo kristala kurkumina i većih kapi NE u nerazblaženim formulacijama nakon dve godine čuvanja, pri uveličanju od $1000\times$ (**Slika 4.1.6.**). Ovo ispitivanje je bilo posebno važno imajući u vidu da je pokazano da kurkumin kristališe tokom čuvanja u vodenom okruženju, kao što su nanoemulzije tipa U/V (Kharat i sar., 2017). Kod ispitivanih uzoraka NE se mogu videti neke veće kapi, što može biti očekivano kod korišćene metode pripreme formulacija, pa zajedno sa rezultatima dobijenim drugim tehnikama karakterizacije, nije protumačeno kao znak nestabilnosti. Dodatno, nisu uočeni kristali kurkumina.



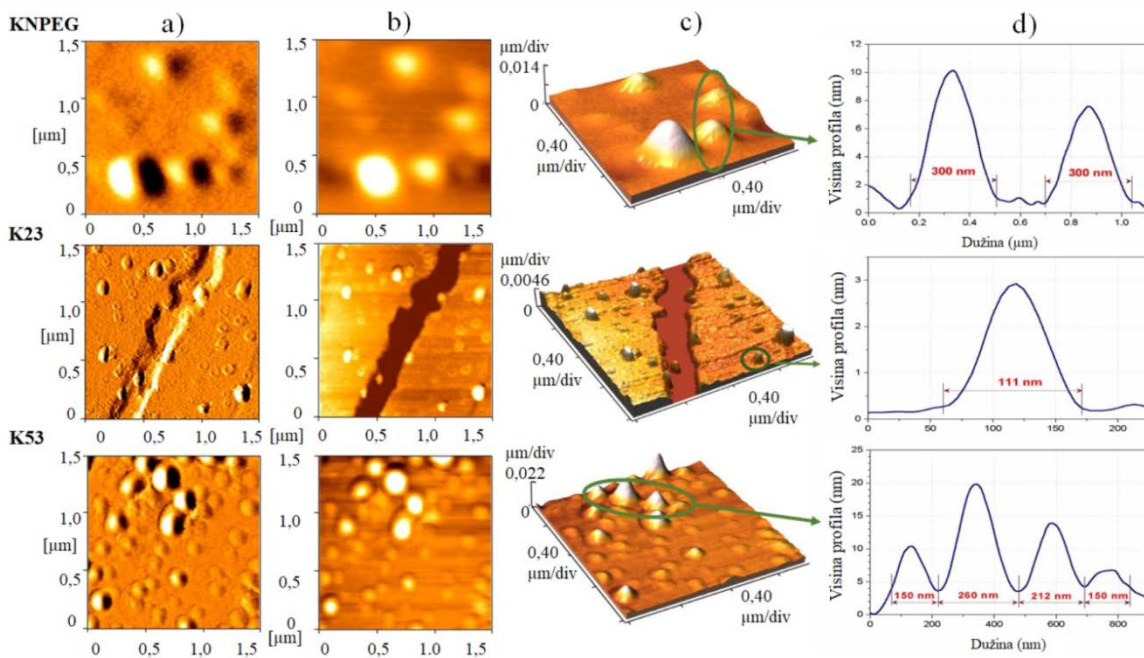
Slika 4.1.6. Mikrografije nanoemulzija sa kurkuminom snimljene na optičkom mikroskopu nakon dve godine čuvanja na sobnoj temperaturi. Korišćeno je uveličanje $1000\times$

Dodatna analiza placebo NE skenirajućom elektronskom mikroskopijom je pokazala razliku između PEGilovanih formulacija i ne-PEGilovane NE i potvrdila da se i sa koncentracijom od 0,1% formira zaštitni omotač oko kapi (**Slika 4.1.7.**) Različite veličine kapi NE u različitim uzorcima se mogu objasniti različitim uveličanjima korišćenim za snimanje, a veća veličina kapi u odnosu na prethodno dobijene rezultate se verovatno može pripisati načinu pripreme uzoraka, odnosno sušenju, koje može dovesti do spajanja kapi.



Slika 4.1.7. Mikrografije dobijene skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Korišćena su uveličanja: 3300×(NPEG); 2000×(P21 i P51).

Mikroskopija atomskim silama je korišćena za dobijanje dodatnih informacija o veličini, raspodeli veličine i morfologiji kapi nanoemulzija sa kurkuminom. AFM mikrografije odabranih uzoraka: ne-PEGilovane NE (KNPEG) i dve PEGilovane formulacije – (K23 i K53) su prikazane na **Slici 4.1.8.** AFM mikrografije su pokazale nešto veći prečnik kapi kod uzorka KNPEG nego što je dobijeno pomoću DLS i LD analiza, verovatno zbog postupka sušenja koje može izazvati spajanje kapi. Sa druge strane, na mikrografijama PEGilovanih uzoraka se vide kapi čija veličina odgovara rezultatima dobijenim u DLS i LD merenjima. Dodatno je pokazano da su kapi uzorka K23 bile sfernog oblika, dok su kapi formulacije K53 bile eliptične. Pored toga, kapi nanoemulzije K23 su bile bolje definisane u poređenju sa druga dva uzorka, što verovatno ukazuje da je kompaktniji stabilizacioni sloj formiran pomoću PEG2000-DSPE u poređenju sa PEG5000-DPPE (**Slika 4.1.8.**). Slično se može primetiti i kod mikrografije placebo uzorka P21 (**Slika 4.1.7.**). Međutim, ovu pretpostavku treba dalje istražiti drugim metodama, kao što je elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija. Dodatno, ni pomoću ove metode nisu otkriveni nerastvorni kristali kurkumina.

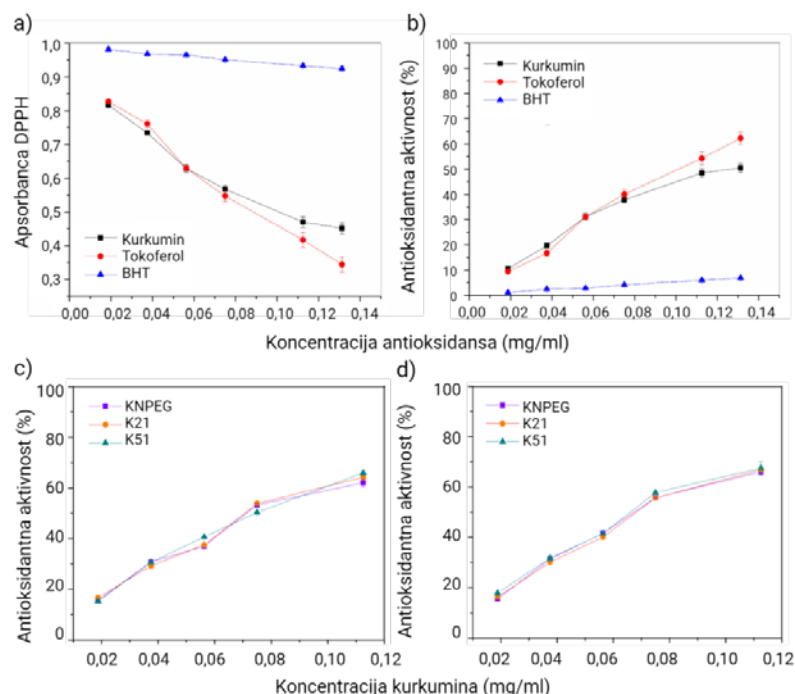


Slika 4.1.8. AFM mikrografije nanoemulzija sa kurkuminom: a) signal greške za površinu uzorka od $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$; b) 2D topografija; c) 3D topografija; d) profili visine odabranih nanoemulzionih kapi.

4.1.6. In vitro testovi za procenu antioksidantnog potencijala

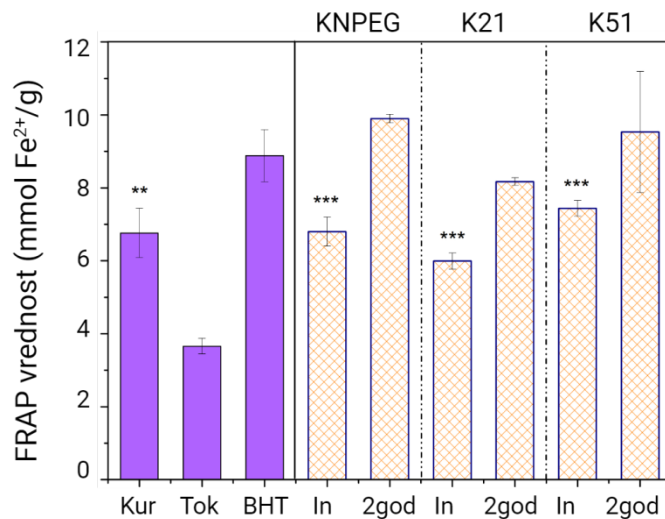
Budući da je većina antioksidanasa multifunkcionalna, potrebno je koristiti više od jednog testa za procenu njihove aktivnosti kako bi se uzeli u obzir različiti mehanizmi delovanja (Li i sar., 2018). DPPH test se zasniva na redukciji DPPH slobodnog radikala u prisustvu antioksidanasa koji mogu da budu donori vodonika, što rezultuje formiranjem stabilnog oblika DPPH (DPPH-H), i manifestuje se gubitkom ljubičaste boje (Ak i Gülçin, 2008). Stepen diskoloracije odgovara potencijalu antioksidansa da ukloni slobodni radikal (Nikolić i sar., 2020). Procena antioksidativnog efekta kurkumina, tokoferola i BHT pomoću DPPH testa je pokazala da kurkumin i tokoferol imaju slični antioksidativni potencijal (**Slika 4.1.9. a i b**), što je verovatno posledica njihove slične strukture. Izračunate IC₅₀ vrednosti za kurkumin i tokoferol su bile $0,1195 \pm 0,0015$ mg/ml i $0,1023 \pm 0,0045$ mg/ml, respektivno, što se poklapa sa rezultatima prethodnih istraživanja (Nikolic i sar., 2018). Međutim, u poređenju sa njima antioksidativna aktivnost BHT je bila dosta niža (**Slika 4.1.9. b**), verovatno zato što BHT ima manju sposobnost doniranja vodonika u poređenju sa tokoferolom (Kurechi i sar., 1980), a što predstavlja glavni mehanizam antioksidativnog delovanja koji se ispituje u ovom testu.

Procena antioksidativnog potencijala nanoemulzija sa kurkuminom (KNPEG, K21, K51) pomoću DPPH testa je pokazala da je antioksidativna aktivnost kurkumina u formulacijama očuvana (**Slika 4.1.9. c**). Ovo je potkrepljeno IC₅₀ vrednostima dobijenim nakon analiziranja inicijalno pripremljenih formulacija, koje su za KNPEG, K21 i K51 iznosile $0,0807 \pm 0,0019$, $0,0788 \pm 0,0006$ i $0,0779 \pm 0,0007$, respektivno. Nakon dve godine čuvanja na sobnoj temperaturi ove vrednosti se nisu značajno promenile i iznosile su $0,0748 \pm 0,0010$, $0,0750 \pm 0,0007$ i $0,0725 \pm 0,0019$ za KNPEG, K21 i K51, respektivno (**Slika 4.1.9. d**). Može se primetiti da su IC₅₀ vrednosti odabranih NE niže u poređenju sa čistim kurkuminom, odnosno da poseduju veći antioksidativni efekat, što se može objasniti prisustvom BHT.



Slika 4.1.9. a) Apsorbancija DPPH nakon dodataka antioksidanasa; b) odgovarajuća antioksidantna aktivnost datih antioksidanasa; c) inicijalna antioksidantna aktivnost NE; d) antioksidantna aktivnost NE nakon 2 godine čuvanja na sobnoj temperaturi.

S druge strane, FRAP test se zasniva na sposobnosti antioksidanasa da redukuju feri (Fe^{3+}) tripiridil triazinski kompleks u fero (Fe^{2+}) tripiridil triazin, pri niskim pH vrednostima (Nikolic i sar., 2018). Dodatna razlika između ova dva testa je činjenica da se FRAP test izvodi u vodenom okruženju gde je struktura kapi očuvana. FRAP vrednosti za tokoferol ($3,66 \pm 0,22 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$) su bile značajno niže u poređenju sa čistim kurkuminom ($6,76 \pm 0,68 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$) i njegovim nanoemulzionim formulacijama (KNPEG, K21 i K51) - $6,80 \pm 0,40 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$, $5,99 \pm 0,22 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$ i $7,44 \pm 0,22 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$, respektivno ($p < 0,05$, Studentov t-test). Ovo se verovatno može objasniti fenolnom strukturom kurkumina, za koju je poznato da utiče na FRAP vrednosti (M. Li i sar., 2018). Razlike između FRAP vrednosti kurkumina i njegovih NE nisu bile statistički značajne ($p = 0,937$; $p = 0,135$ i $p = 0,175$ za kurkumin u odnosu na KNPEG, K21 i K51, respektivno, Studentov t-test). FRAP vrednosti formulacija se nisu smanjile nakon dve godine čuvanja, što potvrđuje očuvanje antioksidativnog potencijala tokom skladištenja. Antioksidativna aktivnost formulacija nakon 2 godine je iznosila 145,56%, 136,36% i 128,09% u odnosu na inicijalno izmerene vrednosti za KNPEG, K21 i K51, respektivno **Slika 4.1.10**. Ove vrednosti su se smatrale prihvatljivim na osnovu literaturnih podataka dobijenih analizom antioksidantnog potencijala različitog voća tokom čuvanja (Patthamakanokporn i sar., 2008).

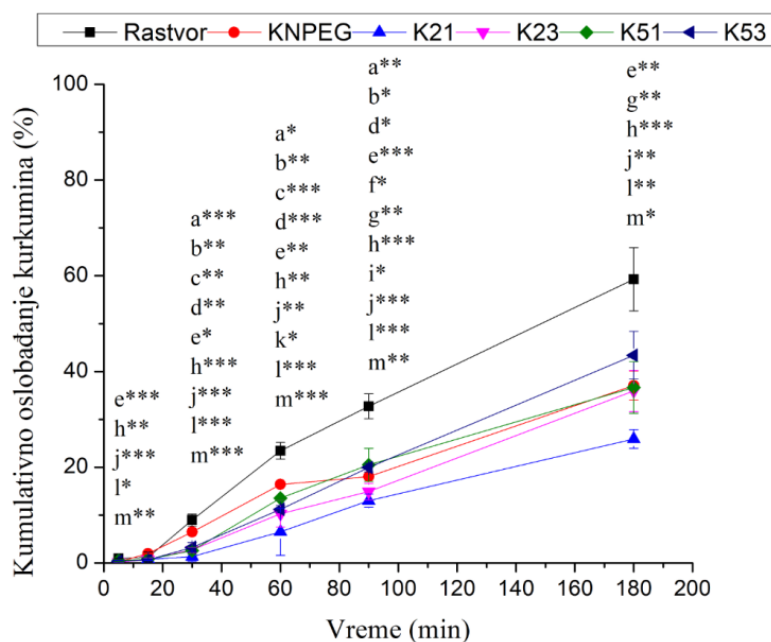


Slika 4.1.10. FRAP vrednosti kurkumina (Kur), tokoferola (Tok) i BHT i nanoemulzija sa kurkuminom određene inicijalno (In) i nakon 2 godine čuvanja (2god). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm sd ($n = 3$); ** i *** $p < 0,01$; $p < 0,001$, u poređenju sa tokoferolom

4.1.7. In vitro studija oslobađanja kurkumina iz nanoemulzija

Oslobađanje kurkumina iz odabranih NE je ispitano reverznom tehnikom dijaliznih vrećica, za koju se smatra da oponaša uslove nakon intravenske primene NE i drugih koloidnih sistema (De Andrade i sar., 2015; Levy i Benita, 1990; Washington, 1989). Na osnovu profila oslobađanja kurkumina prikazanih na **Slici 4.1.11**, može se videti da se posle 60 min najviše kurkumina oslobodi iz ne-PEGilovane NE, KNPEG, i to $16,38 \% \pm 0,23 \%$, u poređenju sa $6,49 \% \pm 4,93 \%$, $10,28 \% \pm 2,79 \%$, $13,51 \% \pm 0,48 \%$ i $11,20 \% \pm 0,80 \%$ kurkumina koji se oslobodi iz K21, K23, K51 i K53, respektivno. Ovaj trend je bio očekivan, budući da lanci PEG formiraju omotač oko kapi koji usporava oslobađanje kurkumina iz PEGilovanih NE (Kandadi i sar., 2011). Zanimljivo je da se nakon 90 minuta više kurkumina oslobodilo iz formulacije K53 u poređenju sa KNPEG ($19,92 \% \pm 0,89 \%$ naspram $18,04 \% \pm 0,17 \%$, $p < 0,05$), ali posle 180 min nije bilo statistički značajnih razlika u frakciji oslobođenog kurkumina između KNPEG i PEGilovanih NE. Jedina statistički značajna razlika u ovoj vremenskoj tački je bila između K21 i K53 ($25,88 \% \pm 1,97 \%$ naspram $43,38 \% \pm 4,99 \%$, p

< 0,05). Treba napomenuti da je frakcija kurkumina oslobođena iz svih NE bila značajno niža ($p < 0,05$) u poređenju sa rastvorom kurkumina (Rastvor) u svakoj vremenskoj tački, osim nakon 15 minuta kada nije bilo statistički značajne razlike u procentu oslobođenog kurkumina između formulacija (Slika 4.1.11.). Ovi rezultati se mogu objasniti inkapsulacijom kurkumina u nanoemulzije, što znači da on prvo mora da izađe iz kapi, a tek zatim da prođe kroz membranu dijaliznih vrećica, dok je kod rastvora jedini ograničavajući faktor stepen difuzije kroz membranu. Razlika u frakciji oslobođenog kurkumina između rastvora i nanoemulzija dodatno ukazuje na efikasnost nanoemulzija u inkapsulaciji kurkumina. Zanimljivo je da povećanje koncentracije PEG2000-DSPE sa 0,1% na 0,3% nije dodatno usporilo oslobađanje kurkumina iz K21 i K23, respektivno. Štaviše, oslobađanje kurkumina iz NE K21 je bilo niže u poređenju sa K23, dok isti trend nije uočen kod NE sa PEG5000-DPPE, K51 i K53, gde nije bilo statistički značajnih razlika između frakcija oslobođenog kurkumina, izuzev nakon 60 minuta (t-test, $p < 0,05$). Stoga se može zaključiti da, iako su obe vrste PEG-FL doprinele manjem oslobađanju kurkumina iz KNPEG u poređenju sa PEGilovanim NE, PEG2000-DSPE je imao veći uticaj u poređenju sa PEG5000-DPPE. Uticaj koncentracije PEG-FL na oslobađanje kurkumina nije bio toliko jasan, imajući u vidu da je uticaj na K51 i K53 bio mali, a da je povećanje koncentracije PEG2000-DSPE dovelo do povećanog oslobađanja kurkumina. S obzirom da povećanje koncentracije PEGilovanih fosfolipida nije dodatno usporilo oslobađanje kurkumina iz PEGilovanih formulacija, za dalja istraživanja na ćelijskim kulturama i animalnim modelima su izabrane NE K21 i K51.



Slika 4.1.11. Kumulativno oslobađanje kurkumina iz nanoemulzija ($t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm sd ($n = 3$); a^* $p < 0,05$, a^{**} $p < 0,01$, a^{***} $p < 0,001$, KNPEG vs. K21; b^* $p < 0,05$, b^{**} $p < 0,01$, KNPEG vs. K23; c^{**} $p < 0,01$, c^{***} $p < 0,001$, KNPEG vs. K51; d^* $p < 0,05$, d^{**} $p < 0,01$, d^{***} $p < 0,001$, KNPEG vs. K53; e^* $p < 0,05$, e^{**} $p < 0,01$, e^{***} $p < 0,001$, KNPEG vs. Rastvor; f^* $p < 0,05$, K21 vs. K51; g^{**} $p < 0,01$, K21 vs. K53, h^{**} $p < 0,01$, h^{***} $p < 0,001$, K21 vs. Rastvor; i^* $p < 0,05$, K23 vs. K53, j^{**} $p < 0,01$, j^{***} $p < 0,001$, K23 vs. Rastvor; k^* $p < 0,05$, K51 vs. K53; l^* $p < 0,05$, l^{**} $p < 0,01$, l^{***} $p < 0,001$, K51 vs. Rastvor; m^* $p < 0,05$, m^{**} $p < 0,01$, m^{***} $p < 0,001$, K53 vs. Rastvor.

Za sticanje dubljeg uvida u kinetiku oslobađanja kurkumina iz ispitivanih NE, eksperimentalno dobijeni podaci su uklopljeni u različite matematičke modele, a parametri

modela su navedeni u **Tabeli 4.1.6.** Optimalni modeli su izabrani na osnovu najviših vrednosti koeficijenta determinacije (R^2) i prilagođenog koeficijenta determinacije (R^2_{adjusted}), a najnižih vrednosti Akaike informacionih kriterijuma (AIC) (Cascone, 2017; Costa i Sousa Lobo, 2001). Pokazano je da Hixson Crowell model najbolje opisuje oslobađanje kurkumina iz KNPEG, dok se oslobađanje iz PEGilovanih NE najbolje opisuje kinetikom nultog reda (**Tabela 4.1.6.**). Analizom konstante brzine oslobađanja kurkumina iz PEGilovanih nanoemulzija, može se zaključiti da je brzina oslobađanja kurkumina iz K21 i K23 bila značajno niža u poređenju sa K51 (t-test, $p < 0,05$, K21 vs. K51) i K53 (t-test, $p < 0,05$, K21 vs. K53 i K23 vs. K53) (**Tabela 4.1.6.**). Ovo je verovatno posledica kompaktnijeg i čvršćeg međupovršinskog sloja koji DSPE kao lipidno sidro PEG2000-DSPE molekula pruža u odnosu na DPPE, moguće zbog toga što u sastav DSPE ulazi stearinska kiselina sa 18 ugljenikovih atoma, a DPPE čini palmitinska kiselina sa 16 ugljenikovih atoma (Kandadi i sar., 2011). Ove pretpostavke bi trebalo potkrepiti daljim eksperimentima. Oslobađanje iz PEGilovanih nanoemulzija se najbolje opisuje kinetikom nultog reda koja se koristi za ilustraciju oslobađanja iz doziranih oblika koji se ne dezintegrišu, što ukazuje da se kapi PEGilovanih nanoemulzije nisu raspale tokom testiranja, čime se obezbeđuje kontrolisano oslobađanje (Cascone, 2017; Costa i Sousa Lobo, 2001). Budući da se oslobađanje kurkumina iz ne-PEGilovane NE najbolje opisuje Hixson Crowell modelom, nanoemulziona kapi KNPEG NE su se verovatno raspale tokom analize, pa je brzina oslobađanja bila ograničena brzinom rastvaranja kurkumina, a ne difuzijom kroz stabilizacioni sloj. Ovo dalje potvrđuje stabilizacione efekte PEG-FL na nanoemulzije.

Tabela 4.1.6. Modeli *in vitro* oslobađanja kurkumina iz ispitivanih nanoemulzija

Kinetički model	Parametri	Nanoemulzije				
		KNPEG	K21	K23	K51	K53
Nulti red	K	0,2100	0,1386	0,1881	0,2064	0,2294
	R^2	0,9784	0,9388	0,9656	0,9670	0,9711
	R^2_{adjusted}	0,9784	0,9388	0,9656	0,9670	0,9711
	AIC	19,8022	21,7451	22,2229	22,6885	23,9795
Prvi red	K	0,0025	0,0016	0,0023	0,0025	0,0029
	R^2	0,9804	0,9263	0,9402	0,9600	0,9378
	R^2_{adjusted}	0,9804	0,9263	0,9402	0,9600	0,9378
	AIC	19,4865	22,7199	25,5555	24,2437	28,3969
Higuchi	K	2,2064	1,3987	1,8956	2,1276	2,3119
	R^2	0,8274	0,7047	0,7168	0,7695	0,7210
	R^2_{adjusted}	0,8274	0,7047	0,7168	0,7695	0,7210
	AIC	32,5210	31,9964	35,4076	34,7768	37,7045
Baker–Lonsdale	K	0,0002	0,0001	0,0001	0,0002	0,0002
	R^2	0,6206	0,4166	0,3697	0,5346	0,3601
	R^2_{adjusted}	0,6206	0,4166	0,3697	0,5346	0,3601
	AIC	37,2116	36,0487	40,1841	38,9333	42,6476
Korsmeyer–Peppas	K	0,0272	0,0392	0,001	0,0337	0,0179
	N	1,4866	1,2867	1,6296	1,3817	1,5398
	R^2	0,4218	0,9148	0,8314	0,9405	0,9686
	R^2_{adjusted}	0,2772	0,8935	0,7893	0,8806	0,9607
	AIC	40,8994	26,4862	32,7895	30,1642	23,9326
Hixson Crowell	K	0,0008	0,0005	0,0007	0,0008	0,0008
	R^2	0,9814	0,9312	0,9502	0,9641	0,9641
	R^2_{adjusted}	0,9814	0,9312	0,9502	0,9641	0,9641
	AIC	19,1794	22,3467	24,4452	23,5250	23,5250

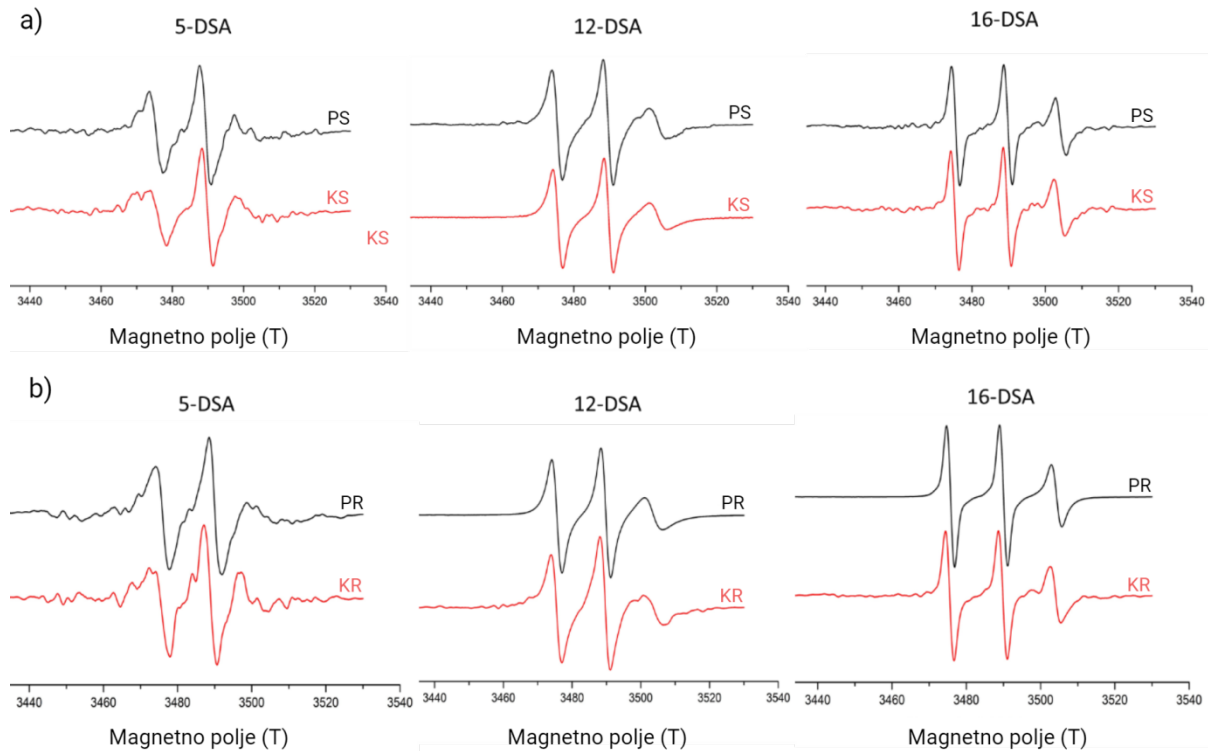
R^2 – koeficijent determinacije; R^2_{adjusted} – prilagođeni koeficijent determinacije; AIC – Akaike informacioni kriterijum; N – eksponent oslobađanja

4.2. Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada

4.2.1. Rastvorljivost i elektron paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija

Cilj ispitivanja rastvorljivosti kurkumina u čistom ribljem ulju i kombinaciji ribljeg ulja i MCT je bilo utvrđivanje uticaja prisustva ribljeg ulja na sadržaj kurkumina u NE. Rastvorljivost je bila nešto niža u ribljem nego u sojinom ulju, 0,5715 mg/ml u odnosu na 0,7551 mg/ml. Međutim, u smeši sojinog/ribljeg ulja i MCT (1:4, *m/m*), koja je korišćena u prvoj fazi istraživanja, rastvorljivost kurkumina bila je 1,3870 mg/ml u smeši sa sojinim uljem i 1,4526 mg/ml u smeši sa ribljim uljem, tako da je zaključeno da riblje ulje može da zameni sojinu u NE bez uticaja na sadržaj kurkumina.

EPR spektroskopija je korišćena za proučavanje uticaja izbora masne faze na strukturu stabilizacionog sloja NE. Pokazano je da izbor masne faze, tačnije masne kiseline koje ulaze u sastav različitih ulja, mogu značajno da utiču na međufazu NE kapi, i posledično na njihovu stabilnost, fizičko-hemijske karakteristike i biološke performanse (Klang i Valenta, 2011; Nikolic i sar., 2020). Stoga je važan aspekt ovog dela istraživanja bila EPR analiza NE sa različitim sastavom masne faze. U ovu svrhu su korišćene tri različite ambifilne spinske probe: 5-, 12- i 16-DSA, koje predstavljaju spinski obeležene analoge stearinske kiseline sa paramagnetnom N-O• grupom na respektivnim položajima C-5, C-12 i C-16 ugljovodoničnog lanca. U zavisnosti od položaja paramagnetne grupe u ugljovodoničnom lancu, spinska proba pruža informacije o različitim dubinama monosloja surfaktanata, tako je 5-DSA lociran blizu polarnih glava surfaktanata, a 16-DSA daje informacije o delu stabilizacionog sloja bližem uljanom jezgru (Avramiotis i sar., 2007; Hatzara i sar., 2004). Dobijeni EPR spektri, nejednakih visina i širina, su karakteristični za doksil derivate delimično imobilisane u membranama. U ovom delu istraživanja je analizirano ponašanje ne-PEGilovanih formulacija sa kurkuminom - KS i KR, i respektivnih placebo PS i PR. Spektri spinskih proba u ispitivanim nanoemulzijama su prikazani na **Slici 4.2.1**.



Slika 4.2.1. EPR spektri spinskih proba u nanoemulzijama sa: a) sojinim uljem i b) ribljim uljem; placebo formulacije (crna linija), formulacije sa kurkuminom (crvena linija).

U okviru analize dobijenih spektara su izračunati i njihovi parametri: rotaciono korelaciono vreme (τ_R), parametar reda (S) i konstanta izotropno hiperfinog sprežanja (αN) (**Tabela 4.2.1.**), koji pružaju informacije o dinamici međupovršinskog sloja surfaktanata i lokalizaciji kurkumina (Kalaitzaki i sar., 2013). Bez obzira na vrstu ulja ili prisustvo kurkumina, τ_R i S vrednosti su opadale sledećim redosledom: 5-DSA, 12-DSA i 16-DSA (**Tabela 4.2.1.**). Ovi rezultati ukazuju da se spinska proba 5-DSA, locirana bliže površini kapi i vodenoj fazi, nalazila u oblasti gde su surfaktanti bili čvršće organizovani, dok je okruženje bliže uljanoj kapi bilo fleksibilnije (Demisli i sar., 2020). EPR spektri nanoemulzija sa sojinim uljem (**Slika 4.2.1.a**) i izračunati parametri (**Tabela 4.2.1.**) su pokazali da je dodatak kurkumina izazvao promene u stabilizacionom sloju, što se odrazilo na τ_R vrednosti 5-DSA probe, koje su sa $2,18 \pm 0,60$ ns opale na $1,66 \pm 0,61$ ns. Spektri druge dve spinske probe se nisu značajno promenile dodatkom kurkumina, izuzev blagog pada τ_R . S druge strane, u slučaju nanoemulzija sa ribljim uljem, dodatak kurkumina je izazvao povećanje τ_R vrednosti kod svih spinskih proba, što je bilo posebno izraženo kod 5-DSA, gde se menjaju i parametar reda i konstanta izotropnog hiperfinog sprežanja. Ovi rezultati ukazuju na presudan uticaj vrste ulja, ne samo na strukturu stabilizacionog sloja, već i na lokalizaciju aktivne komponente. Potvrđena je lokalizacija kurkumina u stabilizacionom sloju NE, što je u skladu sa literaturnim podacima (Demisli i sar., 2020; Nikolic i sar., 2020), ali da u zavisnosti od izbora masne faze ima različit efekat. U slučaju formulacije sa sojinim uljem, KS, smanjenje τ_R vrednosti u odnosu na placebo PS kod 5-DSA probe ukazuje da dodatak kurkumina dovodi do formiranja manje krutog stabilizacionog sloja. Međutim, dodatak kurkumina u NE sa ribljim uljem (KR), rezultuje većim τ_R vrednostima za sve probe, odnosno čvršćim stabilizacionim slojem, što pokazuje da kurkumin promovira stabilizaciju kod NE sa ovom masnom fazom. Kod formulacije KS, dodatak kurkumina utiče pre svega na 5-DSA probu, što ukazuje na njegovu lokalizaciju u delu stabilizacionog sloja koji je bliži površini kapi i vodenoj fazi, dok je u nanoemulziji KR kurkumin raspoređen po čitavom stabilizacionom sloju. Povećanje parametra reda (S) kod formulacija sa ribljim uljem za 5-DSA probu se

može objasniti smanjenjem veličine kapi nakon dodavanja kurkumina (**Tabela 4.2.2.**) i posledično većom zakrivljenošću stabilizacionog sloja (Demisli i sar., 2020). Konstanta izotropno hiperfinog spreznja (α_N) pruža informacije o polarnosti stabilizacionog sloja, a u slučaju nanoemulzija sa ribljim uljem dodatak kurkumina dovodi do smanjenja polarnosti u delu stabilizacionog sloja koji je bliži vodenoj fazi (**Tabela 4.2.1.**). Budući da EPR analiza daje kvalitativne podatke o lokalizaciji kurkumina unutar NE kapi, dodatno je sprovedena i studija efikasnosti inkapsulacije kako bi se dobili kvantitativni podaci o količini kurkumina koja je vezana za kapi NE. Budući da je količina kurkumina prisutna u filtratu bila ispod granice kvantifikacije, efikasnost inkapsulacije je bila veća od 99% kod obe NE.

Tabela 4.2.1. Parametri izračunati na osnovu EPR spektara

Spinske probe	EPR vrednosti	Formulacije			
		PS	KS	PR	KR
5-DSA	τ_R (ns)	$2,18 \pm 0,60$	$1,66 \pm 0,61$	$1,19 \pm 0,10$	$2,96 \pm 0,81$
	S	$0,22 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,11$	$0,17 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,03$
	$\alpha_N (\times 10^{-4} T)$	$12,79 \pm 0,37$	$13,14 \pm 0,80$	$14,17 \pm 0,38$	$12,79 \pm 0,52$
12-DSA	τ_R (ns)	$1,95 \pm 0,07$	$1,81 \pm 0,06$	$1,63 \pm 0,13$	$2,27 \pm 0,19$
	S	$0,11 \pm 0,001$	$0,11 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,001$
	$\alpha_N (\times 10^{-4} T)$	$14,29 \pm 0,55$	$14,08 \pm 0,02$	$14,33 \pm 0,10$	$14,33 \pm 0,11$
16-DSA	τ_R (ns)	$0,63 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,07$	$0,72 \pm 0,07$
	S	$0,05 \pm 0,001$	$0,05 \pm 0,001$	$0,04 \pm 0,001$	$0,04 \pm 0,001$
	$\alpha_N (\times 10^{-4} T)$	$14,77 \pm 0,02$	$14,64 \pm 0,01$	$14,75 \pm 0,05$	$14,67 \pm 0,06$

τ_R – rotaciono korelaciono vreme; S – parametar reda; α_N – konstanta izotropno hiperfinog spreznja.

4.2.2. Eksperimentalni dizajn

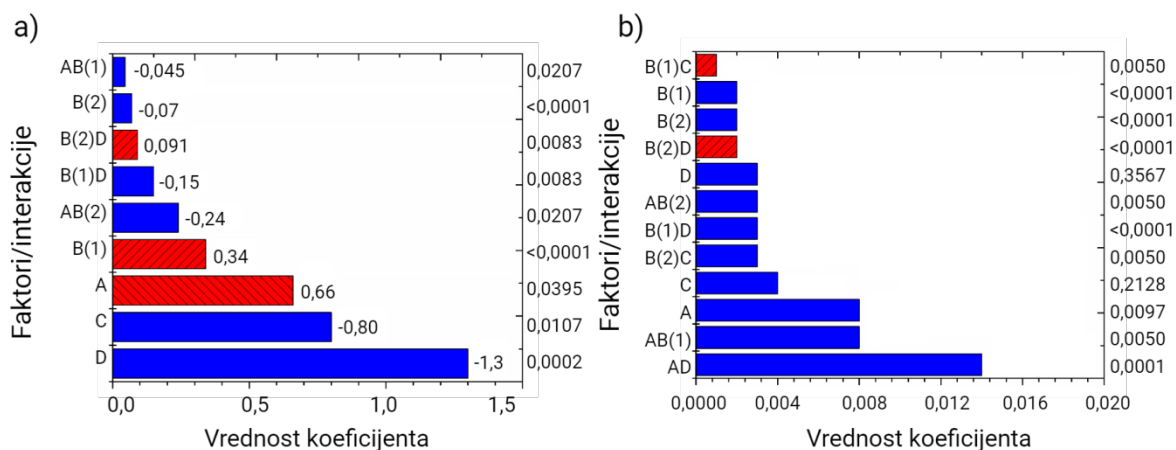
Cilj eksperimentalnog dizajna je bila procena uticaja masne faze, prisustva kurkumina, vrste i koncentracije PEGilovanih fosfolipida na izabrane kritične attribute kvaliteta, tj. veličinu i raspodelu veličina kapi nanoemulzija. U skladu sa matricom eksperimentalnog dizajna (**Tabela 3.2.9.2.**), pripremljeno je 25 PEGilovanih nanoemulzija (15 na osnovu modela, 5 za procenu *lack of fit*, i dodatnih 5 replikata). Veličina kapi svih pripremljenih formulacija je bila između 95 i 108 nm, a PDI ispod 0,2, što ukazuje na pogodnost za parenteralnu primenu. Izračunati su efekti analiziranih faktora i njihovih interakcija na zavisne promenljive (Z-ave i PDI), a svi faktori i interakcije koji nisu bili statistički značajni ($p > 0,05$) su isključeni iz generisanih modela, osim ako nisu bili potrebni za održavanje hijerarhije. U **jednačinama 14 i 15** su respektivno predstavljani modeli za Z-ave i PDI, preko kodiranih faktora.

$$Z = +100,83 + 0,66 A + 0,34 B(1) - 0,07 B(2) - 0,80 C - 1,30 D - 0,045 AB(1) - 0,24 AB(2) - 0,15 B(1)D + 0,091 B(2)D \quad (\text{jednačina 14})$$

$$PDI = +0,14 - 0,008 A + 0,002 B(1) + 0,002 B(2) - 0,004 C - 0,003 D - 0,008 AB(1) - 0,003 AB(2) - 0,014 AD + 0,001 B(1)C - 0,003 B(2)C - 0,003 B(1)D + 0,002 B(2)D \quad (\text{jednačina 15})$$

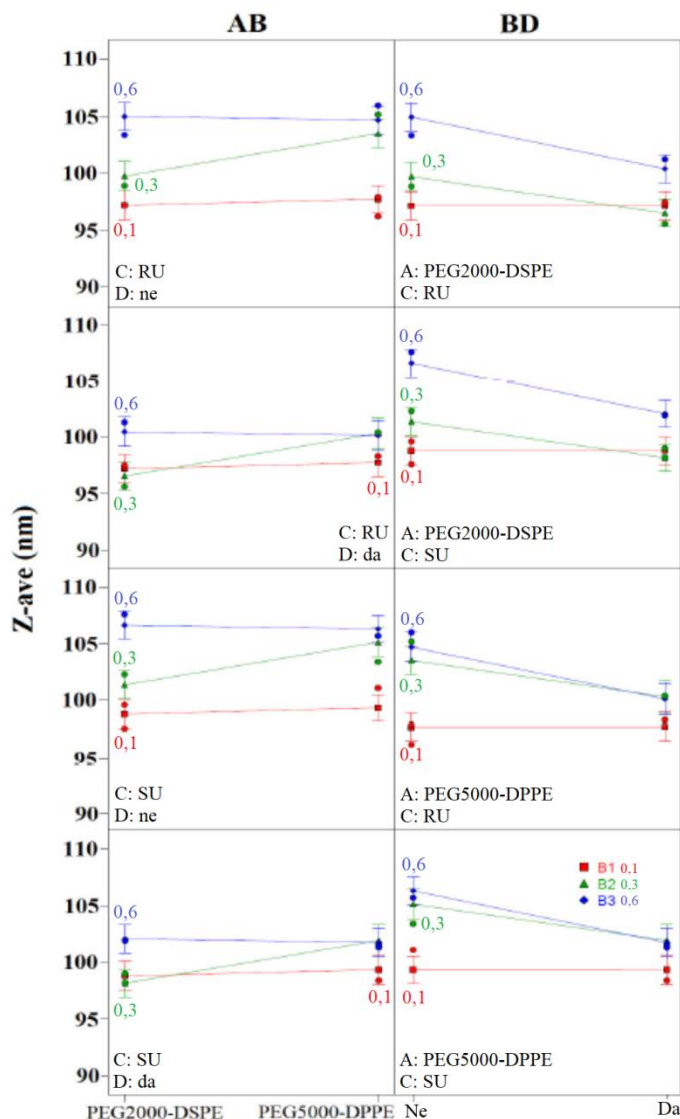
ANOVA analiza je pokazala da su generisani modeli za Z-ave i PDI bili statistički značajni ($p < 0,05$) sa F vrednostima od 15,40 i 14,76, respektivno, i neznačajnim *lack of fit* vrednostima. Koeficijent višestruke korelacije (R^2), prilagođeni koeficijent višestruke korelacije (R^2_{adjusted}) i adekvatne vrednosti preciznosti za predložene modele su za Z-ave bile: 0,9023, 0,8437 i 12,471, a za PDI: 0,9366, 0,8737 i 12,367, respektivno, što ukazuje na adekvatnost predloženih modela u opisivanju zavisnih promenljivih i stoga bi mogli da se koriste za navigaciju u eksperimentalnom prostoru. Na **Slici 4.2.2.** je prikazan uticaj različitih

faktora i njihovih interakcija na veličinu kapi (Z-ave) (**Slika 4.2.2. a**) kao i na PDI. (**Slika 4.2.2. b**). Svi ispitivani faktori su značajno uticali na Z-ave ($p < 0,05$) po sledećem redosledu: prisustvo kurkumina (D) > vrsta masne faze (C) > vrsta PEG-FL (A) > koncentracija PEG-FL (B). Izbor uljne faze je imao antagonistički efekat na Z-ave, što znači da su nanoemulzije sa ribljim uljem (KR21, KR23, KR26, KR51, KR53 i KR56) imale manju veličinu kapi u poređenju sa formulacijama sa sojinim uljem (KS21, KS23, KS26, KS51, KS53 i KS56). PEGilovanje je takođe uticalo na veličinu kapi, tako da su i vrsta i koncentracija PEGilovanih fosfolipida imali sinergistički efekat na Z-ave, što znači da su manje kapi dobijene uz korišćenje PEG2000-DSPE u poređenju sa PEG5000-DPPE, dok je povećanje koncentracije PEG-FL dovelo do stvaranja većih kapi. Od individualnih faktora, statistički značajni efekat ($p < 0,05$) na PDI su imali samo vrsta PEG-FL (A) i njihova koncentracija (B), s tim što je vrsta PEG-FL imala izraženiji uticaj (**Slika 4.2.2. b**). Antagonistički efekat vrste PEGilovanih fosfolipida je značio da se manje vrednosti PDI mogu postići korišćenjem PEG5000-DPPE umesto PEG2000-DSPE, dok je sinergistički efekat koncentracije PEG-FL pokazao da povećanje koncentracija dovodi do povećanja PDI.



Slika 4.2.2. Uticaj individualnih faktora i njihovih interakcija na: a) Z-ave i b) PDI sa označenim vrednostima koeficijenata i p vrednostima za svaku komponentu modela. A – vrsta PEG-FL; B – koncentracija PEG-FL; C – vrsta masne faze; D – prisustvo kurkumina

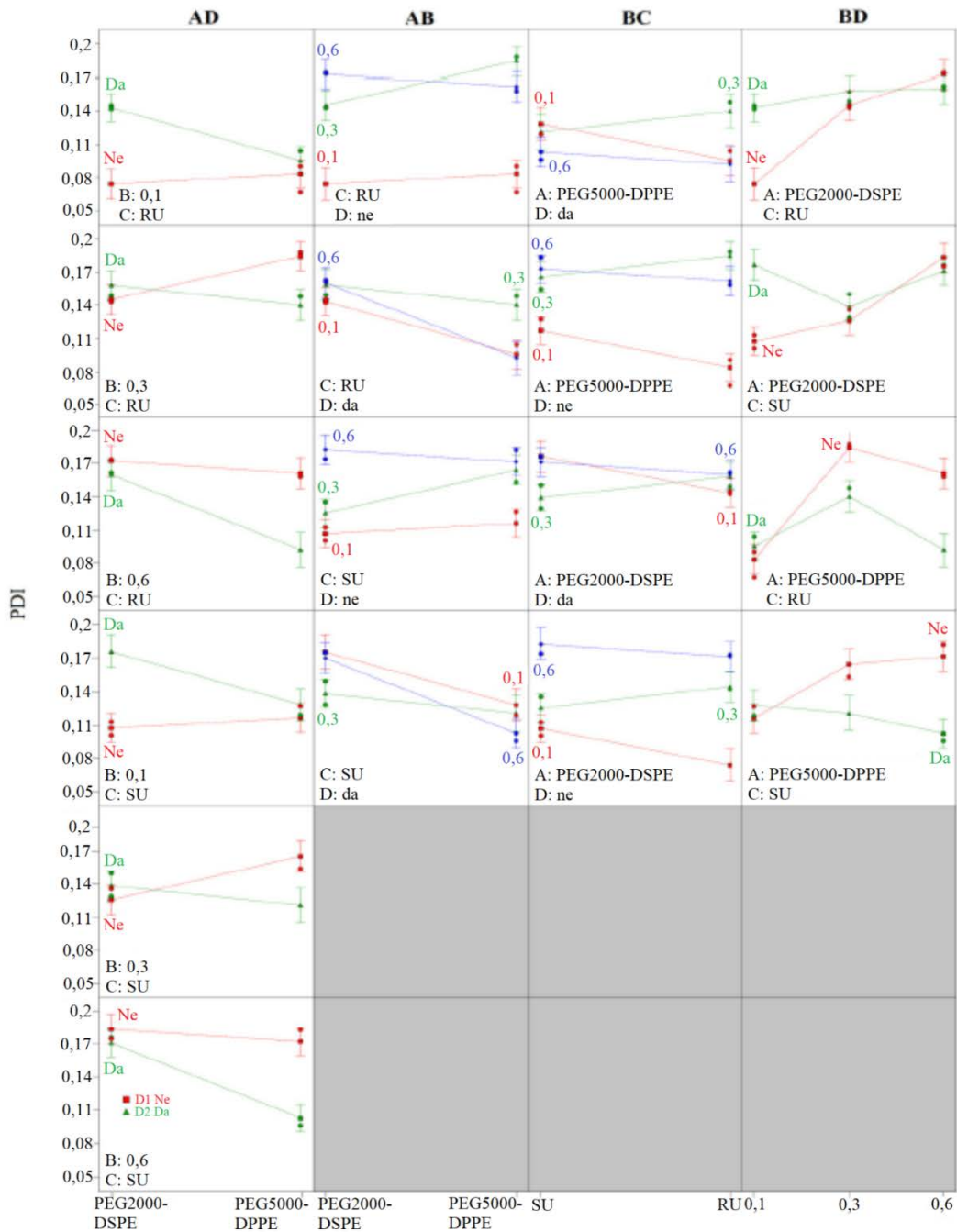
Iako su pojedinačni faktori imali značajniji uticaj na Z-ave (**Slika 4.2.2. a**), pokazano je da i interakcije između vrste PEG-FL/koncentracije PEG-FL – AB, i koncentracije PEG-FL/prisustva kurkumina – BD, takođe utiču na veličinu kapi nanoemulzija na statistički značajnom nivo ($p < 0,05$). Analizom AB interakcije može se zaključiti da su veličine kapi bile slične kada se koristilo 0,1% ili 0,6% PEG2000-DSPE ili PEG5000-DPPE. S druge strane, upotreba 0,3% PEG5000-DPPE je rezultovala pojavom većih kapi u poređenju sa istom koncentracijom PEG2000-DSPE, bez obzira na sastav masne faze ili prisustvo kurkumina (**Slika 4.2.3.**). Proučavanjem BD interakcije je zaključeno da je prisustvo kurkumina dovelo do pojave manjih kapi, bez obzira na sastav masne faze i vrstu PEGilovanih fosfolipida, ali ovaj efekat bio je izraženiji sa 0,3% ili 0,6% PEG-FL.



Slika 4.2.3. Interakcije koje utiču na veličinu kapi (Z-Ave) PEGilovanih nanoemulzija. RU – masna faza sa ribljim uljem; SU – masna faza sa sojinim uljem; da – formulacije sa kurkuminom; ne – placebo formulacije; AB – interakcija između vrste PEG-FL i koncentracije PEG-FL; BD – interakcija između koncentracije PEG-FL i prisustva kurkumina.

Za razliku od veličine kapi, na PDI su pretežno uticale interakcije između faktora formulacije: vrste PEG-FL/prisustva kurkumina – AD; vrste PEG-FL/koncentracije PEG-FL – AB; koncentracije PEG-FL /vrste masne faze –BC i koncentracije PEG-FL/prisustva kurkumina – BD. Analiza AD interakcije je pokazala da je kod formulacija sa 0,1% oba PEGilovana fosfolipida prisustvo kurkumina dovelo do povećanja PDI vrednosti u poređenju sa placebo formulacijama, s tim što se niže vrednosti dobijaju sa PEG5000-DPPE u poređenju sa PEG2000-DSPE (Slika 4.2.4.). Sa 0,3% PEG2000-DSPE, dobijaju se slične, ali malo niže vrednosti PDI kod placebo formulacija u poređenju sa NE sa kurkuminom, dok se kod NE sa PEG5000-DPPE dobijaju niže PDI vrednosti kod formulacija sa kurkuminom. Kod nanoemulzija sa 0,6% PEGilovanih fosfolipida dobijaju se veće PDI vrednosti kod placebo formulacija, dok se, bez obzira na izbor masne faze, niže vrednosti PDI dobijaju sa PEG5000-DPPE u poređenju sa PEG2000-DSPE. Analiza AB interakcije (Slika 4.2.4.) je pokazala da se najniži PDI za placebo formulacije može dobiti sa 0,1% PEG-FL, bez obzira na izbor masne faze, dok je dodavanje kurkumina rezultovalo sličnim PDI vrednostima za NE

sa 0,1% ili 0,6% PEG2000-DSPE za obe masne faze. Sličan trend, samo sa nižim PDI vrednostima, se javlja i kod NE kod PEG5000-DPPE. BC interakcija (**Slika 4.2.4.**) je pokazala da se upotrebom ribljeg ulja umesto sojinog PDI vrednosti smanjuju za formulacije sa 0,1% i 0,6% PEG2000-DSPE ili PEG5000-DPPE, dok je dodavanje 0,3% PEG-FL dovelo do povećanja PDI. Analiza BD interakcije ukazuje da povećanje koncentracije PEGilovanih fosfolipida dovodi do povećanja PDI za formulacije sa PEG2000-DSPE i ribljim uljem, sa izraženijim efektom na placebo formulacije. U slučaju sojinog ulja, upotreba 0,3% PEG2000-DSPE je dovela do smanjenja PDI u poređenju sa druge dve koncentracije. Za formulacije sa PEG5000-DPPE, koncentracija od 0,3% je dovela do najviših PDI vrednosti kod NE sa ribljim uljem, bez obzira na prisustvo kurkumina, dok je kod formulacija sa sojinim uljem povećanje koncentracije PEGilovanog fosfolipida dovelo do smanjenja PDI vrednosti za NE sa kurkuminom i povećanja za placebo formulacije (**Slika 4.2.4.**).



Slika 4.2.4. Interakcije koje utiču na PDI. RU – masna faza sa ribljim uljem; SU – masna faza sa sojinim uljem; da – formulacije sa kurkuminom; ne – placebo formulacije. AD – interakcija između vrste PEG-FL i prisustva kurkumina; AB – interakcija između vrste PEG-FL i koncentracije PEG-FL; BC – interakcija između koncentracije PEG-FL i izbora masne faze; BD – interakcija između koncentracije PEG-FL i prisustva kurkumina

Dizajn eksperimenata je pokazao da prisustvo kurkumina dovodi do smanjenja veličine kapi, a zajedno sa nalazima EPR strukturne analize ukazuje da prisustvo kurkumina u stabilizacionom sloju NE povećava njihovu stabilnost (Hidajat i sar., 2020). Pored toga, potvrđen je i uticaj odabranih masnih faza na Z-ave, što se može pripisati sastavu masnih kiselina u uljima, a posebno oleinskoj kiselini, koja je prisutna u višoj koncentraciji u sojinom ulju, a može i da se koristi kao dodatni stabilizator nanoemulzija (Kalogianni i sar., 2017; Shi i sar., 2015), što objašnjava manju veličinu kapi formulacija sa sojinim uljem. Iako na Z-ave

prvenstveno utiču pojedinačni faktori, na kvalitet nanoemulzija (raspodelu veličine kapi) utiču i interakcije između ulaznih promenljivih, što znači da je za dobijanje NE sa najmanjim PDI posebno potrebno razmotriti izbor PEGilovanih fosfolipida, njihove koncentracije i sastav masne faze.

4.2.3. Fizičko-hemijska karakterizacija

Inicijalno izmerene vrednosti fizičko-hemijskih parametara za sve formulacije korišćene u ovoj fazi istraživanja su date u **Tabeli 4.2.2.** Veličina kapi (< 200 nm), indeks polidisperznosti ($< 0,2$), zeta potencijal (oko -30 mV do -40 mV), pH (oko $7,4$) i vrednosti provodljivosti (oko $180 \mu\text{S}/\text{cm}$) ukazuju na pogodnost formulacija za parenteralnu primenu (Đorđević i sar., 2015; Floyd, 1999; Müller i sar., 2004; Roethlisberger i sar., 2017). Stabilnost nanoemulzija je procenjena nakon 2 godine čuvanja formulacija na sobnoj temperaturi kako bi se procenio dugoročni uticaj ulaznih parametara eksperimentalnog dizajna na karakteristike NE. Izbor masne faze je imao značajni uticaj na stabilnost ne-PEGilovanih formulacija. Najveća promena prosečne veličine kapi je uočena kod placebo NE sa ribljim uljem (PR), kod koje je došlo i do statistički značajnog povećanja PDI ($p < 0,01$) (**Tabela 4.2.2.**). Imajući u vidu da ove promene nisu bile toliko izražene kod formulacije sa kurkuminom (KR), može se zaključiti da kurkumin deluje kao stabilizator NE, što je i pokazano EPR analizom. Ovaj zaključak je potkrepljen rezultatima merenja ZP, budući da su promene bile značajne za sve ne-PEGilovane formulacije ($p < 0,01$), izuzev za KR. Povećanje apsolutnih vrednosti zeta potencijala (**Tabela 4.2.2.**) je verovatno posledica hidrolize triglicerida koji ulaze u sastav lecitina, odnosno nastanka slobodnih masnih kiselina (Klang i Valenta, 2011), što bi objasnilo i smanjenje pH vrednosti ($p < 0,01$), a povećanje provodljivosti ($p < 0,001$), budući da su proizvodi hidrolize lecitina rastvorljiviji u vodi. Smanjenje pH i povećanje provodljivosti je bilo manje izraženo kod formulacija sa kurkuminom (KS i KR) u poređenju sa odgovarajućim placebo uzorcima (PS i PR) (**Tabela 4.2.2.**), što dodatno naglašava stabilizaciona svojstva kurkumina. Sve u svemu, promene u posmatranim fizičko-hemijskim parametrima pokazuju da dodatak kurkumina i njegova lokalizacija u stabilizacionom sloju imaju poseban stabilizacioni efekat kod NE sa ribljim uljem, što je u skladu sa EPR nalazima.

Dodatak PEG-FL je doveo do povećane stabilnosti NE u poređenju sa ne-PEGilovanim formulacijama, bez obzira na vrstu ulja ili prisustvo kurkumina, što je bilo posebno izraženo kod merenja veličine kapi, gde je nakon dve godine skladištenja došlo do blagog povećanja u Z-ave (manje od 10 nm). Promene Z-ave, PDI i ZP vrednosti su bile posebno izražene kod formulacija sa $0,1\%$ PEG2000-DSPE (PR21 i KR21), gde su sva tri navedena parametra značajno promenjena tokom čuvanja, dok su ove promene bile manje izražene u formulacijama sa sojinim uljem (**Tabela 4.2.2.**). Povećana stabilnost PEGilovanih formulacija sa sojinim uljem dalje je potvrđena kroz merenja pH vrednosti i provodljivosti, gde je statistički značajna razlika između vrednosti izmerenih na početku i nakon dve godine skladištenja primećena kod svih PEGilovanih formulacija (**Tabela 4.2.2.**), ali su promene bile manje izražene u poređenju sa NE sa ribljim uljem, kod kojih je ovaj efekat bio izraženiji u placebo formulacijama.

Tabela 4.2.2. Fizičko-hemijski parametri nanoemulzija analiziranih u drugoj fazi istraživanja izmereni inicijalno (In) i nakon 2 godine čuvanja (2god)

NE	Z-ave (nm)		PDI		ZP (mV)		pH		Provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	
	In	2god	In	2god	In	2god	In	2god	In	2god
Nanoemulzije sa sojinim uljem										
PS	98,54 ± 2,32	130,90 ± 1,65***	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,02	-43,00 ± 1,25	-53,50 ± 1,25**	7,31 ± 0,01	4,95 ± 0,01***	173,93 ± 0,67	205,67 ± 2,08***
KS	95,57 ± 0,32	131,10 ± 1,65***	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,02	-31,80 ± 1,30	-46,50 ± 1,37***	6,95 ± 0,05	5,52 ± 0,01***	174,17 ± 2,40	182,67 ± 1,00**
PS21	97,58 ± 1,82	101,10 ± 2,69	0,11 ± 0,01	0,06 ± 0,01*	-41,00 ± 0,99	-49,30 ± 3,39*	7,34 ± 0,01	5,44 ± 0,01***	176,17 ± 1,55	212,67 ± 2,08***
KS21	95,86 ± 1,17	107,60 ± 1,88**	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,02	-39,10 ± 0,17	-44,20 ± 2,82	7,08 ± 0,01	5,44 ± 0,00***	186,33 ± 0,74	204,67 ± 3,51**
PS23	102,30 ± 2,46	102,40 ± 0,67	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,02	-44,00 ± 1,07	-44,90 ± 0,21	7,42 ± 0,03	5,58 ± 0,01***	198,67 ± 1,53	213,00 ± 1,73***
KS23	99,03 ± 0,87	99,74 ± 1,15	0,15 ± 0,02	0,12 ± 0,02	-37,00 ± 1,39	-42,00 ± 0,59**	6,78 ± 0,03	5,54 ± 0,01***	223,33 ± 1,53	228,67 ± 1,53*
PS26	107,60 ± 1,82	105,90 ± 1,55	0,18 ± 0,00	0,17 ± 0,02	-40,60 ± 0,60	-49,80 ± 2,25*	7,34 ± 0,02	5,31 ± 0,01***	220,00 ± 1,00	237,33 ± 1,53***
KS26	101,90 ± 1,52	102,70 ± 0,95	0,18 ± 0,03	0,17 ± 0,01	-42,20 ± 2,50	-43,00 ± 1,31	7,27 ± 0,02	5,62 ± 0,03***	241,67 ± 2,52	258,33 ± 2,31**
PS51	101,10 ± 1,75	110,60 ± 1,66**	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,00	-37,30 ± 1,35	-46,70 ± 1,16**	7,26 ± 0,01	4,70 ± 0,01***	165,37 ± 0,93	190,87 ± 1,07***
KS51	98,41 ± 0,64	109,60 ± 1,28***	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,02	-37,50 ± 1,60	-38,50 ± 0,61	7,14 ± 0,02	5,55 ± 0,01***	176,03 ± 0,75	186,17 ± 0,87***
PS53	103,40 ± 1,95	103,10 ± 0,38	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,01	-32,50 ± 1,39	-43,80 ± 0,49***	7,32 ± 0,02	5,39 ± 0,01***	173,10 ± 1,21	200,10 ± 1,85***
KS53	97,89 ± 0,61	98,34 ± 1,25	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,01	-34,20 ± 0,75	-49,30 ± 0,83***	7,17 ± 0,01	5,60 ± 0,01***	181,80 ± 0,50	211,67 ± 1,15***
PS56	105,70 ± 1,78	99,93 ± 1,11**	0,18 ± 0,02	0,08 ± 0,03**	-29,40 ± 1,35	-36,70 ± 1,15**	7,43 ± 0,02	5,41 ± 0,01***	179,90 ± 1,93	209,67 ± 3,06***
KS56	101,50 ± 0,29	105,70 ± 0,81**	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,01**	-32,40 ± 1,67	-33,80 ± 0,57	7,40 ± 0,01	5,69 ± 0,01***	198,40 ± 1,01	211,33 ± 1,15***
Nanoemulzije sa ribljim uljem										
PR	99,57 ± 2,42	283,40 ± 1,88***	0,13 ± 0,01	0,06 ± 0,02**	-42,20 ± 0,76	-51,50 ± 0,50***	7,41 ± 0,01	3,35 ± 0,01***	166,07 ± 1,10	458,67 ± 1,53***
KR	94,35 ± 1,68	126,20 ± 1,99***	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,01	-44,10 ± 0,57	-44,60 ± 0,35	7,37 ± 0,03	4,06 ± 0,01***	181,07 ± 0,61	196,20 ± 0,61***
PR21	98,23 ± 2,02	102,10 ± 1,22*	0,15 ± 0,01	0,08 ± 0,01**	-40,20 ± 0,47	-48,10 ± 0,23***	7,46 ± 0,03	3,39 ± 0,01***	177,07 ± 1,11	280,00 ± 2,65***
KR21	97,33 ± 0,17	104,20 ± 1,36**	0,15 ± 0,00	0,09 ± 0,01***	-42,40 ± 1,05	-45,30 ± 1,46*	7,36 ± 0,02	3,97 ± 0,00***	187,40 ± 1,00	217,33 ± 2,08***
PR23	98,86 ± 1,34	103,10 ± 1,14*	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,02	-37,60 ± 0,55	-55,90 ± 1,40***	7,43 ± 0,01	3,30 ± 0,00***	212,00 ± 0,00	318,67 ± 0,58***
KR23	95,56 ± 0,58	99,35 ± 1,31*	0,15 ± 0,02	0,10 ± 0,01*	-47,30 ± 2,72	-45,40 ± 0,92	7,31 ± 0,01	3,85 ± 0,02***	203,00 ± 2,00	264,67 ± 2,52***

NE	Z-ave (nm)		PDI		ZP (mV)		pH		Provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	
	In	2god	In	2god	In	2god	In	2god	In	2god
PR26	103,40 \pm 1,23	109,10 \pm 1,80 *	0,17 \pm 0,03	0,13 \pm 0,03	-47,70 \pm 2,58	-53,70 \pm 0,76 *	7,26 \pm 0,05	3,28 \pm 0,01 ***	229,67 \pm 2,52	357,00 \pm 1,00 ***
KR26	103,30 \pm 0,35	105,90 \pm 1,06 **	0,16 \pm 0,02	0,13 \pm 0,03	-42,40 \pm 1,34	-47,90 \pm 1,97 *	7,34 \pm 0,03	3,64 \pm 0,02 ***	235,33 \pm 4,04	317,00 \pm 2,65 ***
PR51	96,21 \pm 1,51	107,40 \pm 1,25 **	0,07 \pm 0,02	0,09 \pm 0,03	-39,00 \pm 1,03	-54,60 \pm 0,91 ***	7,17 \pm 0,01	3,21 \pm 0,02 ***	169,43 \pm 1,46	305,67 \pm 1,15 ***
KR51	98,28 \pm 1,14	109,60 \pm 2,25 **	0,10 \pm 0,04	0,08 \pm 0,02	-38,30 \pm 1,79	-44,30 \pm 0,46 **	7,25 \pm 0,01	3,74 \pm 0,01 ***	179,20 \pm 1,30	216,67 \pm 0,55 ***
PR53	105,20 \pm 0,31	105,60 \pm 2,37	0,19 \pm 0,02	0,12 \pm 0,03 *	-35,90 \pm 2,02	-48,70 \pm 0,27 **	7,31 \pm 0,01	3,26 \pm 0,02 ***	177,03 \pm 0,12	299,00 \pm 1,00 ***
KR53	100,40 \pm 0,30	99,91 \pm 1,67	0,15 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01 *	-38,90 \pm 4,62	-41,12 \pm 0,46	7,24 \pm 0,00	3,63 \pm 0,02 ***	180,07 \pm 0,25	242,33 \pm 1,53 ***
PR56	106,00 \pm 2,35	106,80 \pm 1,01	0,16 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02 *	-32,60 \pm 1,15	-48,60 \pm 1,29 ***	7,30 \pm 0,01	3,21 \pm 0,01 ***	180,50 \pm 0,40	319,67 \pm 2,08 ***
KR56	98,43 \pm 0,58	101,40 \pm 1,10 *	0,09 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	-35,20 \pm 0,80	-45,00 \pm 0,85 ***	7,36 \pm 0,00	3,46 \pm 0,01 ***	189,20 \pm 0,17	290,33 \pm 3,06 ***

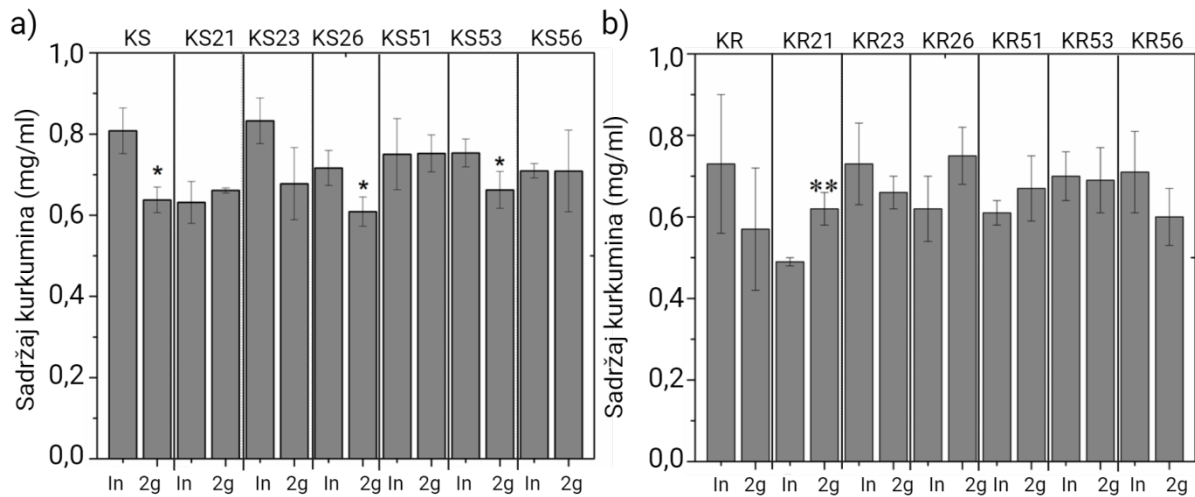
Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti \pm sd (n = 3); *, ** i ***, p < 0,05, p < 0,01 i p < 0,001 u poređenju sa početno izmerenim vrednostima.

Pozitivan uticaj prisustva kurkumina na stabilnost NE sa ribljim uljem je dalje potvrđen merenjima veličine kapi tehnikom LD, gde je prisustvo većih kapi nakon dve godine čuvanja detektovano samo kod placebo formulacija - PR, PR53 i PR56, što se može videti na osnovu povećanja vrednosti D [4,3] (**Tabela 4.2.3.**). Odsustvo većih kapi u formulacijama sa sojinim uljem nakon istog vremenskog perioda dodatno naglašava značaj adekvatnog izbora masne faze na dugoročnu stabilnost nanoemulzija.

Tabela 4.2.3. Veličina kapi izmerena metodom laserske difrakcije nakon 2 godine čuvanja na sobnoj temperaturi

	d (10) (nm)	d (50) (nm)	d (90) (nm)	D [4,3] (nm)
PS	78	116	173	122
KS	78	117	173	122
PS21	76	114	173	120
KS21	76	113	168	118
PS23	74	109	163	115
KS23	75	112	166	117
PS26	74	109	163	115
KS26	75	111	165	117
PS51	76	113	169	118
KS51	76	113	168	118
PS53	74	109	164	115
KS53	75	112	167	117
PS56	73	106	159	112
KS56	76	112	166	117
PR	224	309	421	317
KR	78	116	173	121
PR21	74	109	163	115
KR21	76	112	167	118
PR23	73	106	159	112
KR23	76	114	171	120
PR26	74	109	162	114
KR26	76	112	167	117
PR51	76	112	167	118
KR51	76	113	168	118
PR53	79	122	207	1378
KR53	76	112	167	117
PR56	79	120	195	1897
KR56	76	112	167	117

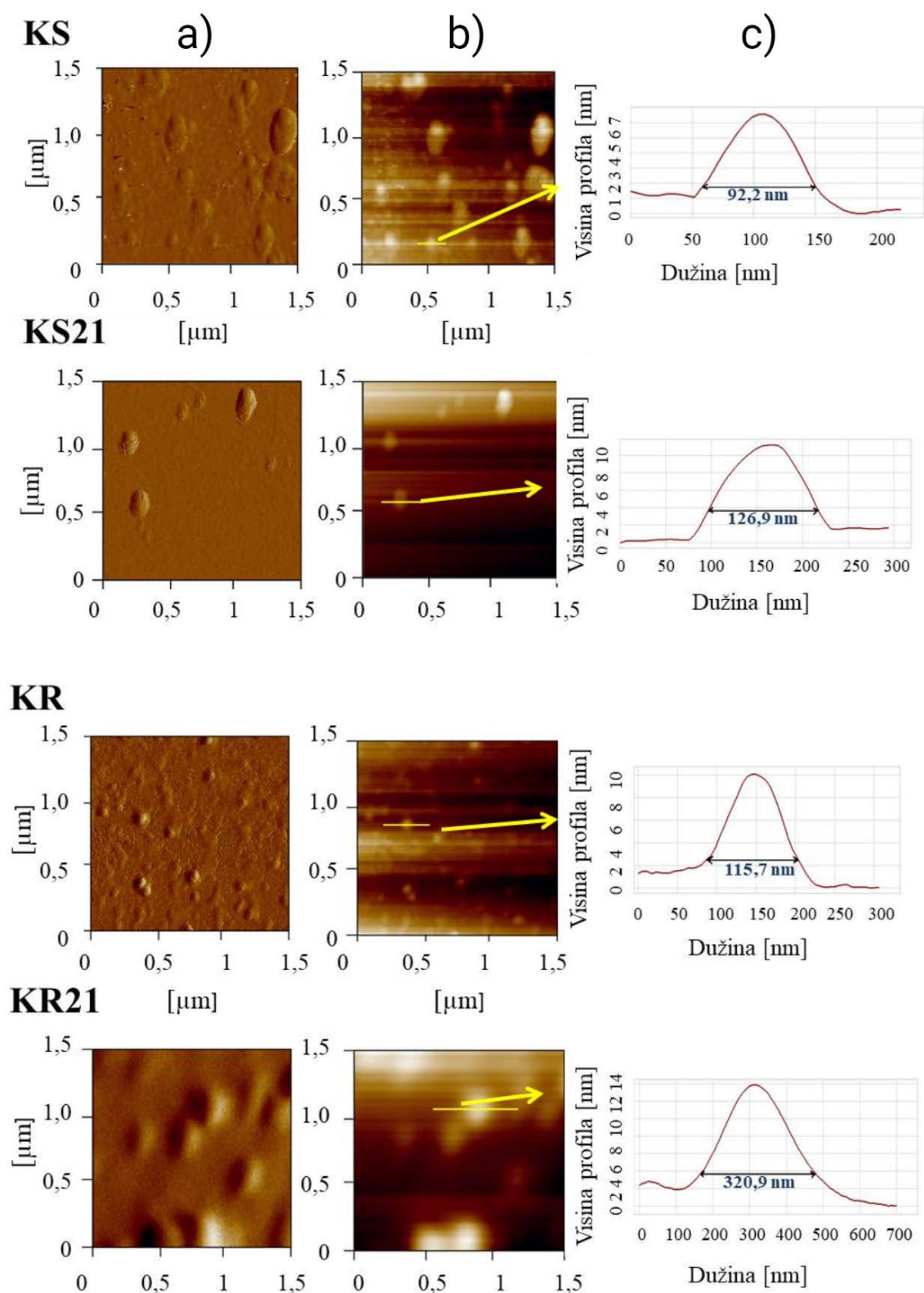
Sadržaj kurkumina se promenio kod nekih formulacija tokom skladištenja (KS, KS26, KS53 i KR51), ali nije značajno opao, pogotovu imajući u vidu period čuvanja (**Slika 4.2.5.**). Dodatak PEGilovanih fosfolipida nije uticao na efikasnost inkapsulacije kurkumina, koja je za sve formulacije bila > 99%.



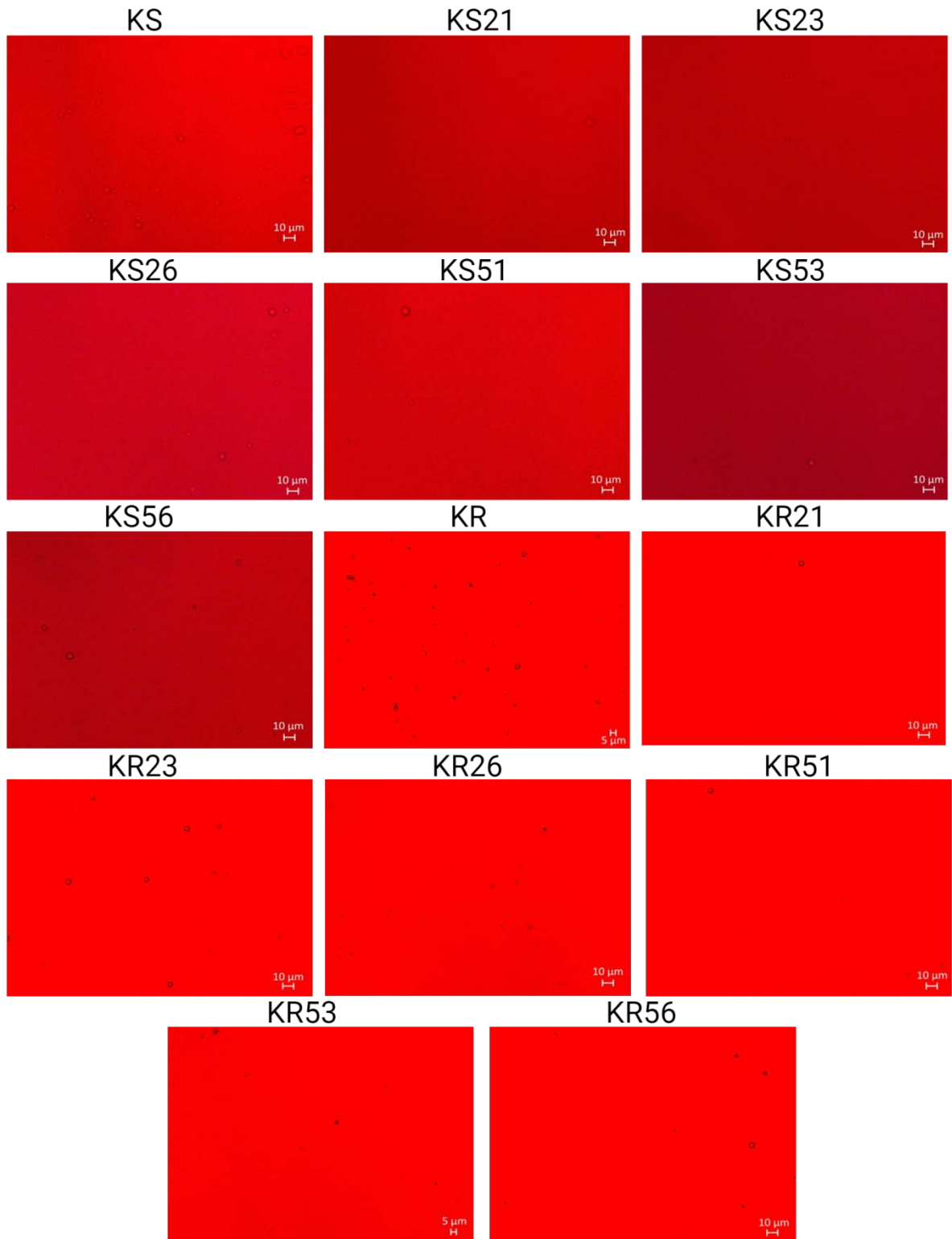
Slika 4.2.5. Sadržaj kurkumina u nanoemulzijama sa a) sojinim uljem; b) ribljim uljem određen inicijalno nakon izrade (In) i nakon 2 godine čuvanja (2g). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm sd (n = 3).

4.2.4. Mikroskopske analize

Mikroskopija atomskih sila je pokazala da u uzorku KR postoje male, sferne kapi prečnika oko 100 nm. Dodatak 0,1% PEG2000-DSPE kod formulacije KR21 utiče na karakteristike nanoemulzije tokom sušenja, pa su u ovom uzorku mogle da se uoče samo veće kapi, prečnika oko 300 nm (**Slika 4.2.6.**). Sa druge strane, postupak sušenja nije imao značajniji efekat na ispitivane NE sa sojinim uljem, KS i KS21, te su dobijene mikrografije pokazale kapi sličnih veličina i izduženog oblika (**Slika 4.2.6.**). Mikrografije snimljene pomoću polarizacionog mikroskopa pokazuju prisustvo većih kapi kod nekih formulacija nakon 2 godine skladištenja, što je bilo posebno izraženo kod ne-PEGilovanih NE KS i KR, ali se to može očekivati kod formulacija pripremljenih tehnikom homogenizacije pod visokim pritiskom (**Slika 4.2.7.**). Dodatno, kristali kurkumina nisu uočeni ni kod jedne analizirane formulacije, što pokazuje da su obe vrste masne faze mogle da obezbede očuvanje stabilnosti kurkumina u vodenom okruženju.



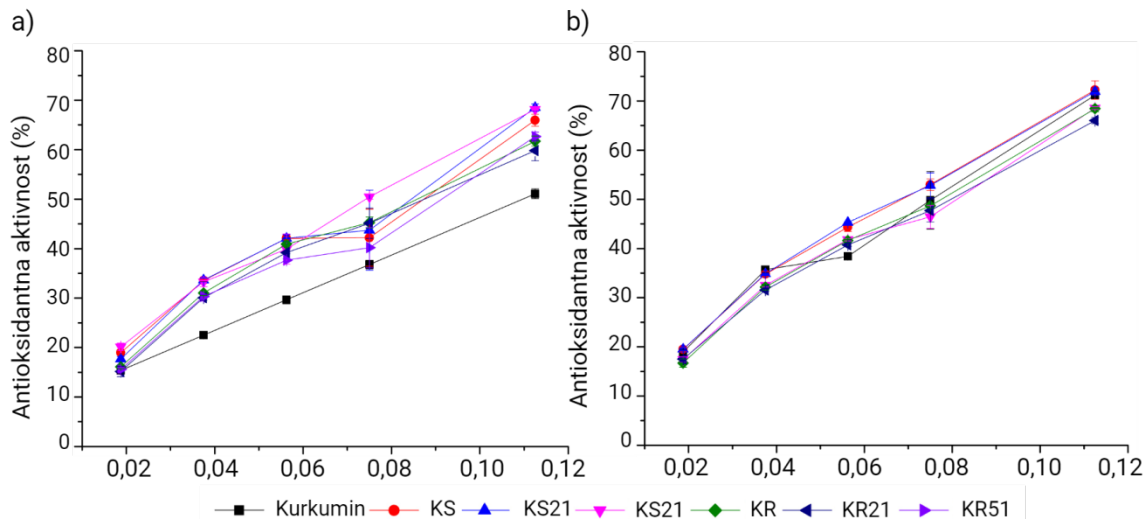
Slika 4.2.6. AFM mikrografije nanoemulzija sa sojinim i ribljim uljem: a) signal greške sa površine uzorka veličine $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$; b) 2D topografija; c) profili visine kapi odabranih nanoemulzija.



Slika 4.2.7. Mikrografije nanoemulzija sa kurkuminom snimljene na polarizacionom mikroskopu nakon dve godine čuvanja NE na sobnoj temperaturi.

4.2.5. Antioksidantni testovi

Upotreba ribljeg ulja nije povećala antioksidativnu aktivnost nanoemulzija u poređenju sa formulacijama sa sojinim uljem, uprkos sastavu masnih kiselina, odnosno prisustvu EPA i DHA (Calder i sar., 2020; Culler i sar., 2021). DPPH test je pokazao da sve analizirane nanoemulzije sa kurkuminom imaju veću antioksidativnu aktivnost od čistog kurkumina u svakoj ispitivanoj koncentraciji (Slika 4.2.8. a), verovatno zbog dodatka BHT. Posle dve godine skladištenja, antioksidativni potencijal nanoemulzija je ostao relativno nepromenjen (Slika 4.2.8. b), o čemu svedoče i izračunate IC50 vrednosti (Tabela 4.2.4.). Dobijene vrednosti su u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima koji govore o očuvanoj stabilnosti kurkumina u formulacijama tokom skladištenja (Slika 4.2.5.).



Slika 4.2.8. Antioksidantna aktivnost nanoemulzija sa kurkuminom određena pomoću DPPH testa: a) inicijalno i b) nakon 2 godine čuvanja na sobnoj temperaturi

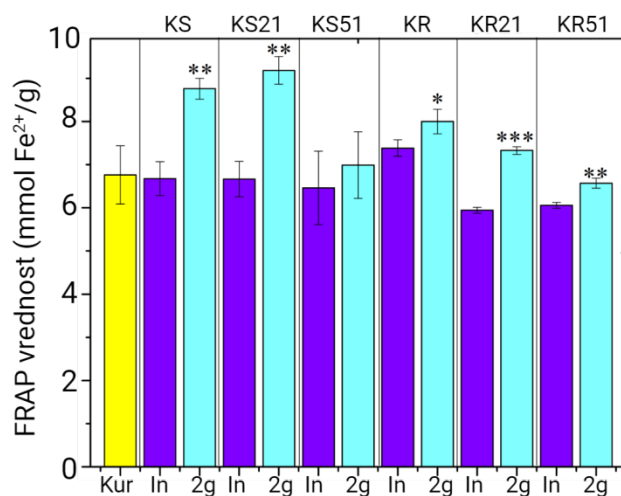
Tabela 4.2.4. IC50 vrednosti analiziranih nanoemulzija određene pomoću DPPH testa sprovedenog odmah nakon izrade nanoemulzija (inicijalno) i nakon 2 godine čuvanja (2 god)

Nanoemulzije	IC50 (mg/ml)	
	Inicijalno	2 god
KS	0,0805 ± 0,0022	0,0737 ± 0,0029 *
KS21	0,0779 ± 0,0051	0,0696 ± 0,0010
KS51	0,0752 ± 0,0009	0,0695 ± 0,0010 **
KR	0,0838 ± 0,0005	0,0767 ± 0,0011 ***
KR21	0,0867 ± 0,0040	0,0760 ± 0,0006 *
KR51	0,0873 ± 0,0026	0,0787 ± 0,0015 **

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± sd (n = 3); *, ** i ***, p < 0,05, p < 0,01 i p < 0,001 u poređenju sa početnim vrednostima.

FRAP test, koji se odvija u vodenom okruženju omogućava očuvanje strukture kapi i pruža uvid u uticaj NE na očuvanje antioksidativne aktivnosti formulacija. Nisu primećene značajne razlike između NE sa sojinim i ribljim uljem, bilo inicijalno ili nakon čuvanja. Dodatno, nije bilo statistički značajnih razlika u FRAP vrednostima između čistog kurkumina i NE. FRAP vrednosti određene nakon dve godine su bile više u odnosu na prvobitne, kod svih formulacija, dok je za neke NE ova razlika bila i statistički značajna (p < 0,05) (Slika 4.2.9.).

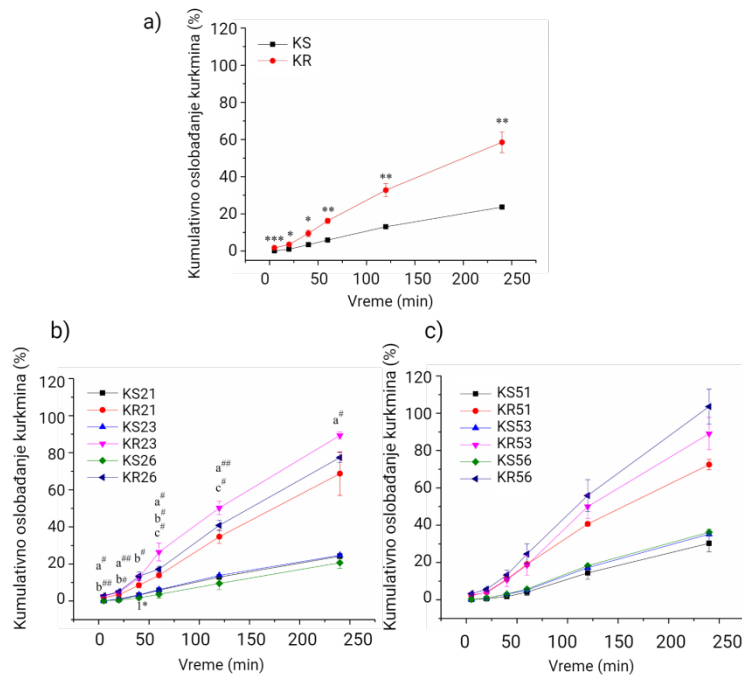
Ovi rezultati su posledica metodologije testa, odnosno procene antioksidativnog efekta u odnosu na korespondentna placebo, koja su korišćena kao slepe probe. Stoga bi se naizgled povećane vrednosti FRAP nakon 2 godine verovatno mogle pripisati smanjenom antioksidativnom potencijalu placebo, koji se javlja kao posledica njihove lošije fizičko-hemijske stabilnosti u odnosu na formulacije sa kurkuminom (**Tabela 4.2.2.**). To znači da slepe probe nakon 2 godine imaju niže vrednosti apsorpcije u odnosu na prvobitne, pa u odnosu na njih formulacije sa kurkuminom karakterisane nakon 2 godine imaju veću apsorpciju i veći antioksidativni potencijal u poređenju sa početnim. Slično rezultatima DPPH testa, čini se da izbor masne faze nije značajnije uticao na antioksidativnu stabilnost formulacija, budući da nije bilo značajnih razlika u FRAP vrednostima između formulacija sa sojinim i ribljim uljem. FRAP test je takođe potvrdio očuvanje antioksidativnog potencijala formulacija tokom skladištenja.



Slika 4.2.9. FRAP vrednosti određene nakon pripreme (In) i posle dve godine čuvanja (2 g). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm sd ($n = 3$); *, ** i ***, $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u odnosu na početne

4.2.6. Oslobođanje kurkumina iz nanoemulzija

U studijama brzine oslobađanja kurkumina iz pripremljenih formulacija (**Slika 4.2.10. a**) pokazano je da se kod ne-PEGilovanih NE kurkumin brže oslobađa iz formulacije sa ribljim uljem (KR) u poređenju sa NE sa sojinim uljem (KS), u svim analiziranim vremenskim tačkama na statistički značajnom nivou ($p < 0,05$). Ovo se može objasniti većim uticajem kurkumina na stabilizaciju NE sa ribljim uljem, što je pokazano EPR studijom. Kada se NE sa ribljim uljem nađe u medijumu za oslobađanje, izlazak kurkumina iz stabilizacionog sloja ima izraženiji efekat na integritet formulacija sa ovom masnom fazom, one se brže raspadaju, što za posledicu ima veću stopu oslobađanja. Oslobođanje kurkumina iz ne-PEGilovanih formulacija je najbolje opisano kinetikom nultog reda i Korsmeyer–Peppas modelom, s obzirom da ovaj model ima najveću vrednost prilagođenog koeficijenta determinacije (R^2_{adjusted}) i najnižu vrednost Akaike informacionog kriterijuma (AIC) (Costa i Sousa Lobo, 2001). Vrednost eksponenta oslobađanja N u Korsmeyer–Peppas modelu za KR (**Tabela 4.2.5.**) ukazuje na anomalan transport, gde je oslobađanje leka regulisano bubrenjem i difuzijom (Costa i Sousa Lobo, 2001). Interesantno je da su vrednosti prilagođenih koeficijenata determinacije R^2_{adj} bile veće od 0,99 kod većeg broja modela, što ukazuje na kompleksne mehanizme oslobađanja kurkumina iz obe formulacije (**Tabela 4.2.5.**).



Slika 4.2.10. Kumulativno oslobađanje kurkumina iz (a) ne-PEGilovanih NE; (b) NE sa PEG2000-DSPE; (c) NE sa PEG5000-DPPE; rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm sd ($n = 3$); *, ** i ***, $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u poređenju sa KS; $a^{\#}$ $p < 0,05$, $a^{\#\#}$ $p < 0,01$, KR21 vs KR23; $b^{\#}$, $b^{\#\#}$, $p < 0,05$ i $p < 0,01$ KR21 vs KR26; $c^{\#}$ $p < 0,05$, KR23 vs KR26; 1^* $p < 0,05$, KS 23 vs KS 26.

Trend većeg oslobađanja kurkumina iz NE sa ribljim uljem je zadržan i kod PEGilovanih formulacija (**Slika 4.2.10. b i c**). Dodavanje različitih koncentracija PEG2000-DSPE nije imalo značajan efekat na oslobađanje formulacija sa sojinim uljem (**Slika 4.2.10. b**). Ovaj rezultat potencijalno znači da je optimalna zaštita površine NE kapi postignuta sa najnižom koncentracijom PEGilovanog fosfolipida, tako da dalje povećanje koncentracije nije imalo uticaj na oslobađanje. Međutim, kod NE sa ribljim uljem se javljaju razlike kod PEGilovanih formulacija, pa je dodatak 0,1% PEG2000-DSPE (KR21) usporio oslobađanje kurkumina više nego dodatak 0,3% ili 0,6% (KR23 i KR26, respektivno). Moguće je da dalji dodatak PEG2000-DSPE povećava oslobađanje kurkumina zato što smanjuje rigidnost stabilizacionog sloja. Oslobađanje kurkumina iz NE sa sojinim uljem je najbolje opisano kinetikom nultog reda za KS23, i Korsmeyer-Peppas za KS21 i KS26, dok je za NE sa ribljim uljem nabolji bio Korsmeyer-Peppas za KR21, a kinetika nultog reda za KR23 i KR26. Slično kao kod ne-PEGilovanih NE, oslobađanje kurkumina se kod nekih formulacija sa PEG2000-DSPE može opisati pomoću nekoliko modela, što ukazuje na kompleksnost procesa (**Tabela 4.2.5.**). U slučaju NE sa PEG5000-DPPE, nije bilo statistički značajnih razlika između NE sa sojinim uljem (KS51, KS53 i KS56) ili između formulacija sa ribljim uljem (KR51, KR53, i KR56) (**Slika 4.2.10. c**), što verovatno ukazuje da je optimalna pokrivenost površine kapi postignuta sa 0,1% PEG-FL, a da je dalje povećanje koncentracije potencijalno samo smanjilo integritet stabilizujućeg sloja. Oslobađanje kurkumina iz NE sa sojinim uljem i PEG5000-DPPE je najbolje opisano Korsmeyer-Peppas modelom, sa eksponentom oslobađanja (N) većim od 1 u svim slučajevima, što ukazuje na *Super Case-II* transport (**Tabela 4.2.5.**). U ovom slučaju, brzina difuzije rastvarača je veća od procesa relaksacije polimera, što dovodi do bržeg prodiranja rastvarača u kap NE. Kinetika nultog reda je bila najbolja za formulacije sa ribljim uljem (**Tabela 4.2.5.**), što se smatra idealnim za postizanje produženog oslobađanja leka (Costa i Sousa Lobo, 2001).

Tabela 4.2.5. Modeli *in vitro* oslobađanja kurkumina iz ispitivanih nanoemulzija

Nanoemulzije	Kinetički modeli					
	Nulti red	Prvi red	Higuchi	Baker-Lonsdale	Korsmeyer-Peppas	Hixson-Crowell
KS	K = 0,100 R² = 0,9918 R²_{adj} = 0,9918 AIC = 8,7911	K = 0,001 R ² = 0,9907 R ² _{adj} = 0,9907 AIC = 10,0073	K = 1,198 R ² = 0,8009 R ² _{adj} = 0,8009 AIC = 28,3909	K = 0,000 R ² = 0,7883 R ² _{adj} = 0,7883 AIC = 28,7596	K = 0,095 N = 1,013 R ² = 0,9925 R ² _{adj} = 0,9906 AIC = 10,2221	K = 0,000 R ² = 0,9916 R ² _{adj} = 0,9916 AIC = 9,2999
KR	K = 0,250 R ² = 0,9930 R ² _{adj} = 0,9930 AIC = 17,8459	K = 0,003 R ² = 0,9581 R ² _{adj} = 0,9851 AIC = 23,3072	K = 3,031 R ² = 0,8278 R ² _{adj} = 0,8278 AIC = 38,0503	K = 0,000 R ² = 0,7914 R ² _{adj} = 0,7914 AIC = 39,2015	K = 0,325 N = 0,952 R² = 0,9945 R²_{adj} = 0,9931 AIC = 18,5235	K = 0,001 R ² = 0,9927 R ² _{adj} = 0,9927 AIC = 19,0848
KS21	K = 0,101 R ² = 0,9894 R ² _{adj} = 0,9894 AIC = 10,4473	K = 0,001 R ² = 0,9860 R ² _{adj} = 0,9860 AIC = 12,7480	K = 1,205 R ² = 0,7860 R ² _{adj} = 0,7860 AIC = 29,1103	K = 0,000 R ² = 0,7732 R ² _{adj} = 0,7732 AIC = 29,4613	K = 0,080 N = 1,050 R² = 0,9913 R²_{adj} = 0,9891 AIC = 9,7759	K = 0,000 R ² = 0,9877 R ² _{adj} = 0,9877 AIC = 11,8910
KS23	K = 0,105 R² = 0,9907 R²_{adj} = 0,9907 AIC = 10,5040	K = 0,001 R ² = 0,9896 R ² _{adj} = 0,9896 AIC = 10,9469	K = 1,254 R ² = 0,7996 R ² _{adj} = 0,7996 AIC = 28,9471	K = 0,000 R ² = 0,7863 R ² _{adj} = 0,7863 AIC = 29,3340	K = 0,100 N = 1,014 R ² = 0,9917 R ² _{adj} = 0,9896 AIC = 11,8500	K = 0,000 R ² = 0,9906 R ² _{adj} = 0,9906 AIC = 10,4372
KS26	K = 0,082 R ² = 0,9640 R ² _{adj} = 0,9640 AIC = 14,5805	K = 0,001 R ² = 0,9546 R ² _{adj} = 0,9546 AIC = 16,4633	K = 0,960 R ² = 0,7129 R ² _{adj} = 0,7129 AIC = 28,8838	K = 0,000 R ² = 0,7023 R ² _{adj} = 0,7023 AIC = 29,1155	K = 0,031 N = 1,300 R² = 0,9924 R²_{adj} = 0,9905 AIC = 7,2300	K = 0,000 R ² = 0,9580 R ² _{adj} = 0,9580 AIC = 15,8103

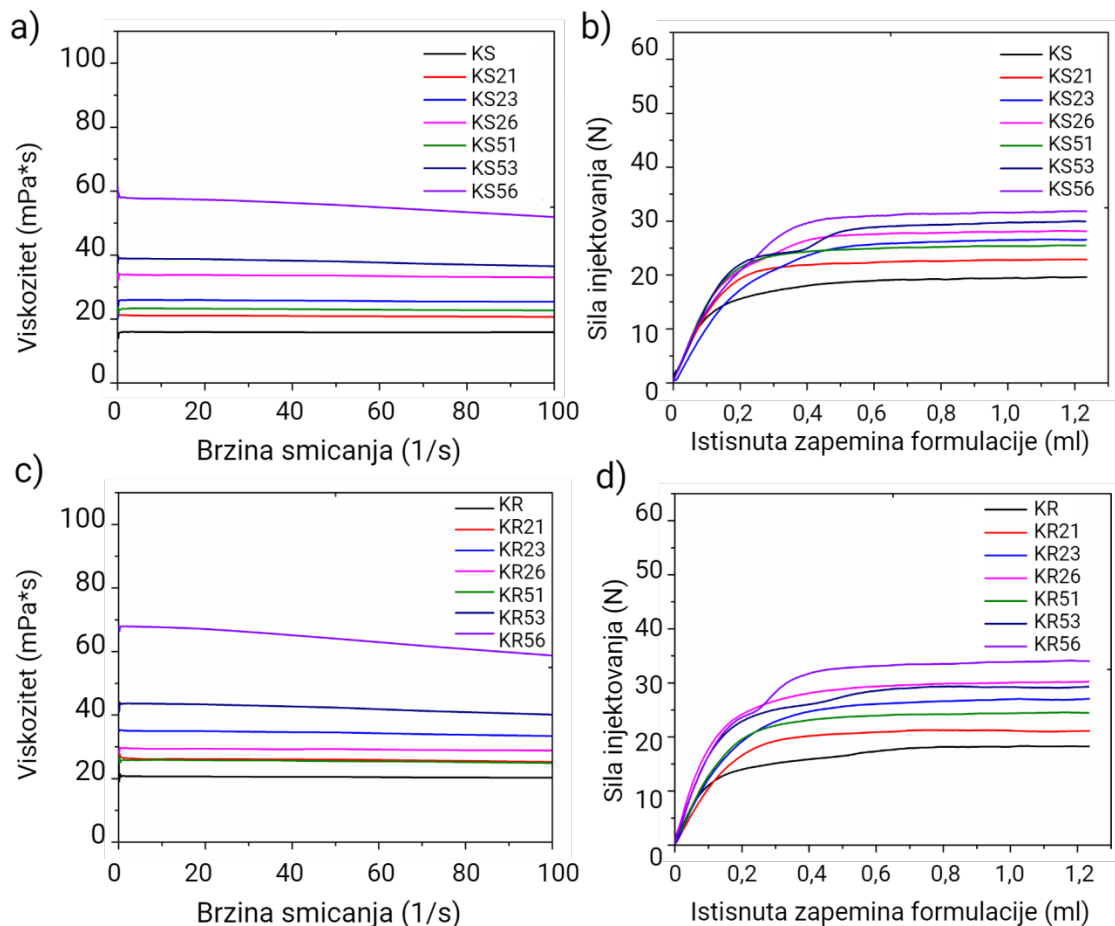
Nanoemulzije	Kinetički modeli					
	Nulti red	Prvi red	Higuchi	Baker-Lonsdale	Korsmeyer-Peppas	Hixson-Crowell
KR21	K = 0,282 $R^2 = 0,9911$ $R^2_{adj} = 0,9911$ AIC = 20,6449	K = 0,004 $R^2 = 0,9471$ $R^2_{adj} = 0,9471$ AIC = 31,9855	K = 3,351 $R^2 = 0,7756$ $R^2_{adj} = 0,7756$ AIC = 41,5504	K = 0,000 $R^2 = 0,7317$ $R^2_{adj} = 0,7317$ AIC = 42,6221	K = 0,178 N = 1,096 $R^2 = 0,9965$ $R^2_{adj} = 0,9956$ AIC = 18,4773	K = 0,001 $R^2 = 0,9660$ $R^2_{adj} = 0,9660$ AIC = 29,0151
KR23	K = 0,382 $R^2 = 0,9876$ $R^2_{adj} = 0,9876$ AIC = 26,3692	K = 0,006 $R^2 = 0,9434$ $R^2_{adj} = 0,9434$ AIC = 36,5120	K = 4,627 $R^2 = 0,8206$ $R^2_{adj} = 0,8206$ AIC = 43,5013	K = 0,000 $R^2 = 0,7565$ $R^2_{adj} = 0,7565$ AIC = 45,3473	K = 0,494 N = 0,959 $R^2 = 0,9901$ $R^2_{adj} = 0,9876$ AIC = 27,5574	K = 0,002 $R^2 = 0,9695$ $R^2_{adj} = 0,9695$ AIC = 32,7449
KR26	K = 0,324 $R^2 = 0,9956$ $R^2_{adj} = 0,9956$ AIC = 18,5561	K = 0,005 $R^2 = 0,9535$ $R^2_{adj} = 0,9535$ AIC = 33,4300	K = 3,904 $R^2 = 0,8086$ $R^2_{adj} = 0,8086$ AIC = 41,9425	K = 0,000 $R^2 = 0,7560$ $R^2_{adj} = 0,7560$ AIC = 43,4036	K = 0,315 N = 1,008 $R^2 = 0,9958$ $R^2_{adj} = 0,9948$ AIC = 20,2089	K = 0,001 $R^2 = 0,9746$ $R^2_{adj} = 0,9746$ AIC = 29,7493
KS51	K = 0,120 $R^2 = 0,9614$ $R^2_{adj} = 0,9614$ AIC = 21,0680	K = 0,001 $R^2 = 0,9435$ $R^2_{adj} = 0,9435$ AIC = 23,5581	K = 1,389 $R^2 = 0,6986$ $R^2_{adj} = 0,6986$ AIC = 34,0295	K = 0,000 $R^2 = 0,6826$ $R^2_{adj} = 0,6826$ AIC = 34,3458	K = 0,031 N = 1,307 $R^2 = 0,9899$ $R^2_{adj} = 0,9874$ AIC = 15,5387	K = 0,000 $R^2 = 0,9501$ $R^2_{adj} = 0,9501$ AIC = 22,7485
KS53	K = 0,414 $R^2 = 0,9752$ $R^2_{adj} = 0,9752$ AIC = 20,6748	K = 0,002 $R^2 = 0,9559$ $R^2_{adj} = 24,2330$ AIC = 24,2330	K = 1,648 $R^2 = 0,7237$ $R^2_{adj} = 0,7237$ AIC = 35,3250	K = 0,000 $R^2 = 0,7045$ $R^2_{adj} = 0,7045$ AIC = 35,7292	K = 0,044 N = 1,227 $R^2 = 0,9920$ $R^2_{adj} = 0,9900$ AIC = 15,8758	K = 0,001 $R^2 = 0,9632$ $R^2_{adj} = 0,9632$ AIC = 23,1150

Nanoemulzije	Kinetički modeli					
	Nulti red	Prvi red	Higuchi	Baker-Lonsdale	Korsmeyer-Peppas	Hixson-Crowell
KS56	K = 0,147 $R^2 = 0,9767$ $R^2_{adj} = 0,9767$ AIC = 20,7972	K = 0,002 $R^2 = 0,9581$ $R^2_{adj} = 0,9581$ AIC = 24,3848	K = 1,713 $R^2 = 0,7298$ $R^2_{adj} = 0,7298$ AIC = 35,5760	K = 0,000 $R^2 = 0,7099$ $R^2_{adj} = 0,7099$ AIC = 36,0033	K = 0,051 N = 1,201 $R^2 = 0,9903$ $R^2_{adj} = 0,9879$ AIC = 17,2340	K = 0,001 $R^2 = 0,9653$ $R^2_{adj} = 0,9653$ AIC = 23,2384
KR51	K = 0,308 $R^2 = 0,9929$ $R^2_{adj} = 0,9929$ AIC = 21,5793	K = 0,004 $R^2 = 0,9686$ $R^2_{adj} = 0,9686$ AIC = 30,1040	K = 3,728 $R^2 = 0,8196$ $R^2_{adj} = 0,8196$ AIC = 40,9533	K = 0,000 $R^2 = 0,7716$ $R^2_{adj} = 0,7716$ AIC = 42,3767	K = 0,366 N = 0,971 $R^2 = 0,9942$ $R^2_{adj} = 0,9927$ AIC = 22,1855	K = 0,001 $R^2 = 0,9842$ $R^2_{adj} = 0,9842$ AIC = 25,5464
KR53	K = 0,374 $R^2 = 0,9848$ $R^2_{adj} = 0,9848$ AIC = 28,5973	K = 0,006 $R^2 = 0,9176$ $R^2_{adj} = 0,9176$ AIC = 38,9857	K = 4,457 $R^2 = 0,7780$ $R^2_{adj} = 0,7780$ AIC = 44,9222	K = 0,000 $R^2 = 0,7147$ $R^2_{adj} = 0,7147$ AIC = 46,4540	K = 0,294 N = 1,061 $R^2 = 0,9877$ $R^2_{adj} = 0,9846$ AIC = 29,4679	K = 0,002 $R^2 = 0,9483$ $R^2_{adj} = 0,9483$ AIC = 36,1667
KR56	K = 0,434 $R^2 = 0,9931$ $R^2_{adj} = 0,9931$ AIC = 25,2423	K = 0,007 $R^2 = 0,8965$ $R^2_{adj} = 0,8965$ AIC = 41,9234	K = 5,202 $R^2 = 0,7951$ $R^2_{adj} = 0,7951$ AIC = 46,0397	K = 0,001 $R^2 = 0,7151$ $R^2_{adj} = 0,7151$ AIC = 48,0304	K = 0,377 N = 1,034 $R^2 = 0,9941$ $R^2_{adj} = 0,9927$ AIC = 25,9541	K = 0,002 $R^2 = 0,9359$ $R^2_{adj} = 0,9359$ AIC = 39,0479

R^2 – koeficijent determinacije; $R^2_{adjusted}$ – prilagođeni koeficijent determinacije; AIC – Akaike informacijski kriterijum; N – eksponent oslobađanja

4.2.7. Viskozitet i injektabilnost

Reološke karakteristike formulacija značajno utiču na ponašanje tokom administracije i bezbednosti primene, pa mogu i da ograniče njihovu upotrebu kao sistema za isporuku aktivnih supstanci (Levy i Benita, 1990). U važećim Farmakopejama ne postoje specifični zahtevi za viskozitet parenteralnih formulacija, samo se navodi da ona mora biti takva da omogući adekvatnu primenu preparata. Budući da je parenteralni put primene lekova jedan od najčešće korišćenih (Watt i sar., 2019; Zhang i sar., 2018), a da se različiti polietilenglikoli (PEG) koriste kao reološki modifikatori u parenteralnim suspenzijama, bilo je važno utvrditi kako dodatak PEGilovanih fosfolipida utiče na viskozitet pripremljenih nanoemulzija i njihove fizičke performanse. Lakoća preuzimanja formulacije iz bočice u sistem šprica i igle (engl. *syringeability*) i sila potrebna da se formulacije injektuju u ciljno tkivo (engl. *injectability*, injektabilnost) su ključne za adekvatne performanse parenteralnih preparata (Cilurzo i sar., 2011). Sa **Slike 4.2.11.** se može videti da se viskoznost nanoemulzija povećava sa dodatkom PEGilovanih fosfolipida, i da je za ne-PEGilovane formulacije ona bila oko 20 mPa*s, dok je sa 0,6% PEG-5000-DPPE iznosila oko 60 mPa*s kod obe masne faze (**Slike 4.2.11. a i c**).



Slika 4.2.11. a) viskozitet i b) injektabilnost nanoemulzija sa sojinim uljem; c) viskozitet i d) injektabilnost nanoemulzija sa ribljim uljem

Kako bismo procenili injektabilnost razvijenih formulacija prilikom intravenske primene razvili smo poseban test. U našoj ekperimentalnoj postavci se za ovaj put primene koristi infuziona pumpa (Stoelting Co., Vood Dale, IL, SAD), baždarena za špric od 10 ml i

infuzioni set sa veličinom igle od 25 G (Romed, Vilnis, Holandija). U testu je merna ćelija analizatora teksture podešena da se spušta brzinom od 1 mm/s istiskujući tako formulacije kroz sistem šprica i infuzionog seta u 36,6 %, v/v, rastvor glicerola u vodi, čiji je viskozitet bio oko 4726 mPa*s, a koji je cirkulisao brzinom od oko 4 ml/min kroz silikonsku cev unutrašnjeg prečnika od 2 mm, kako bi imitirao proticanje krvi kroz krvne sudove (Yousif i sar., 2009). Ovakva postavka je omogućila, ne samo određivanje sile potrebne da se formulacija injektuje u krv, već i otkrivanje mogućih opstrukcija kao posledice povećanog viskoziteta formulacija. Merenjima injektabilnosti pokazano je da se maksimalna sila potrebna za istiskivanje formulacija kroz špric menja sa oko 20 N za ne-PEGilovane NE, do oko 40 N za formulacije sa 0,6 % PEG5000-DPPE (**Slika 4.2.11. b, d**). Odnosno, veća sila injektovanja je bila potrebna za viskoznije preparate. Iako u literaturi ne postoje podaci o injektabilnosti intravenskih formulacija, nakon ispitivanja subkutane primene zaključeno je da bi za optimalnu primenu bila poželjna sila manja od 20 N, a maksimalna koja omogućava laganu primenu do 40 N (Watt i sar., 2019). U **Tabeli 4.2.5.** se može videti da je najveća sila postignuta pri injektovanju formulacija (F_{max}) bila manja od 40 N za sve formulacije, dok je za ne-PEGilovane NE i formulacije sa 0,1% PEG2000-DSPE bila oko 20 N. Pored toga, nijedna od analiziranih NE nije pokazala da dolazi do opstrukcije modela krvnog suda (silikonske cevi), što ukazuje na njihovu pogodnost za intravensku primenu. Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da se i formulacije viskoziteta od oko 60 mPa*s mogu primenjivati intravenski kod eksperimentalnih životinja u datoj eksperimentalnoj postavci (veličini šprica i igle infuzionog sistema) ali da su optimalne vrednosti viskoziteta manje od 20 mPa*s.

Tabela 4.2.5. Maksimalne sile injektovanja nanoemulzija

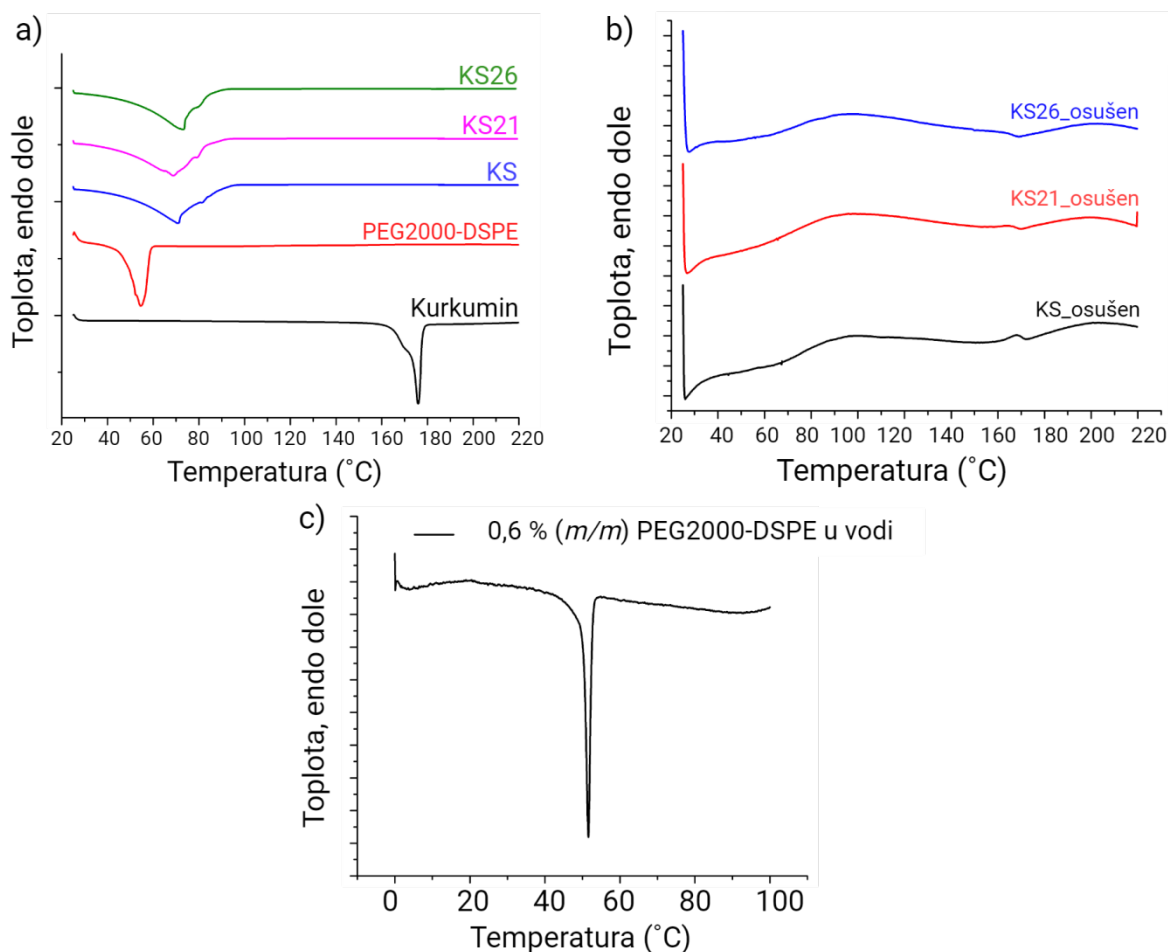
Formulacija	Maksimalna sila injektovanja (F_{max}) (N)
KS	19,65 ± 1,54
KS21	22,94 ± 0,26
KS23	27,66 ± 1,00
KS26	29,34 ± 1,20
KS51	25,21 ± 0,33
KS53	28,58 ± 2,34
KS56	34,60 ± 2,58
KR	19,58 ± 1,55
KR21	23,39 ± 2,45
KR23	26,53 ± 2,51
KR26	30,57 ± 0,45
KR51	24,35 ± 0,46
KR53	29,06 ± 2,37
KR56	35,81 ± 3,27

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± sd (n = 3)

4.3. Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada

4.3.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) je korišćena za ispitivanje termalnog ponašanja NE i radi inicijalne procene efikasnosti PEGilovanja. Na termogramima odabranih NE se nisu javili pikovi koji odgovaraju topljenju PEG2000-DSPE, na temperaturi od 53,90 °C, već širok endotermni pik na oko 70 °C (Slika 4.3.1. a). Ovi rezultati verovatno ukazuju da je PEGilovani fosfolipid bio inkorporiran u formulacije, budući da su micelle PEG2000-DSPE imale istu temperaturu topljenja kao čist PEG-FL (Slika 4.3.1. c), dok je pik PEGilovanih NE bio različit (Paolino i sar., 2017). Dodatno, na DSC termogramima formulacija nisu uočene promene na 175,44 °C koje bi odgovarale topljenju kurkumina, što ukazuje da je on u formulacijama molekularno dispergovan (Slika 4.3.1. a). Ovo je potvrđeno analizom uzoraka osušenih na vazduhu (Slika 4.3.1. b), sa izuzetkom KS26, gde je primećen mali pik na 173 °C, što ukazuje na drugačiji način solubilizacije kurkumina.

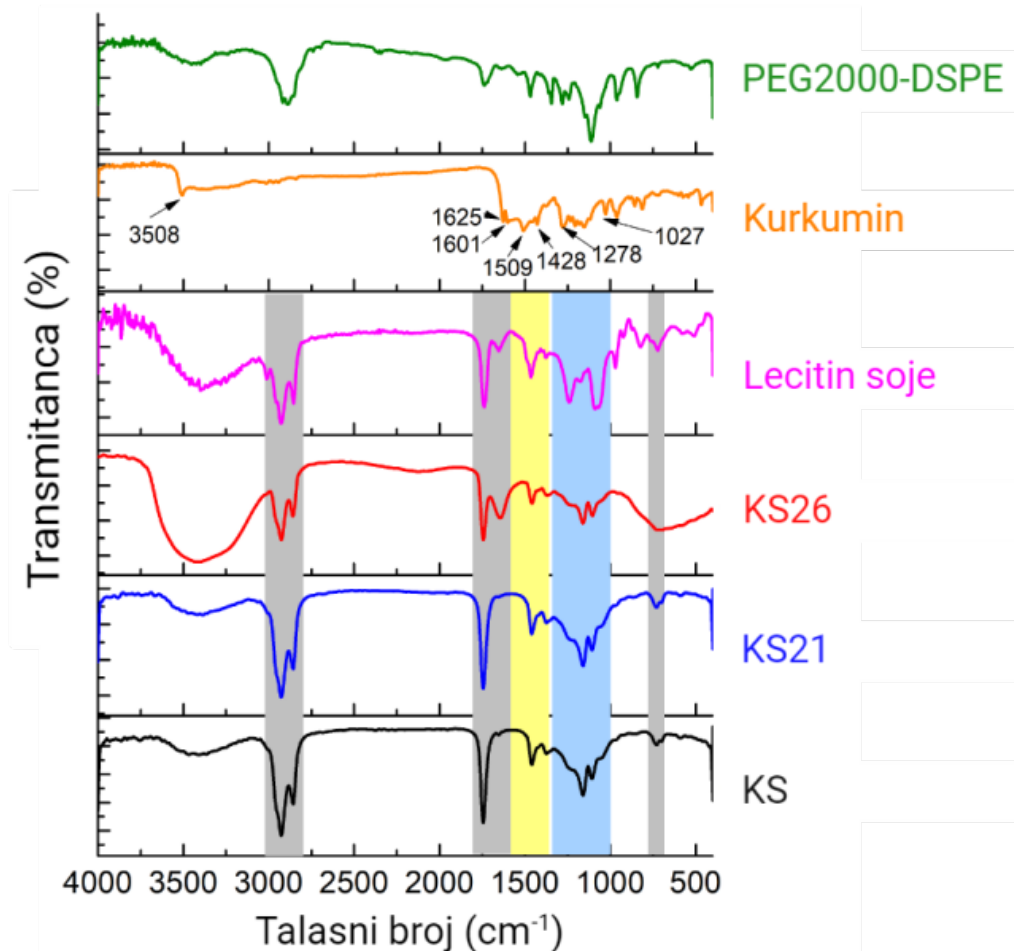


Slika 4.3.1. DSC termogrami a) nanoemulzija u tečnom obliku, čistog kurkumina i PEG2000-DSPE; b) nanoemulzija osušenih na vazduhu; c) 0,6 % (m/m) disperzija PEG2000-DSPE u vodi

4.3.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektri NE su bili veoma slični, samo se kod uzorka KS26 javio dodatni pik na oko 1642 cm^{-1} koji može da ukaže na formiranje nove veze (Slika 4.3.2.). Spektri formulacija su bili slični lecitinu, sa pikovima karakterističnim za vibraciju O-H grupe (3400 cm^{-1}),

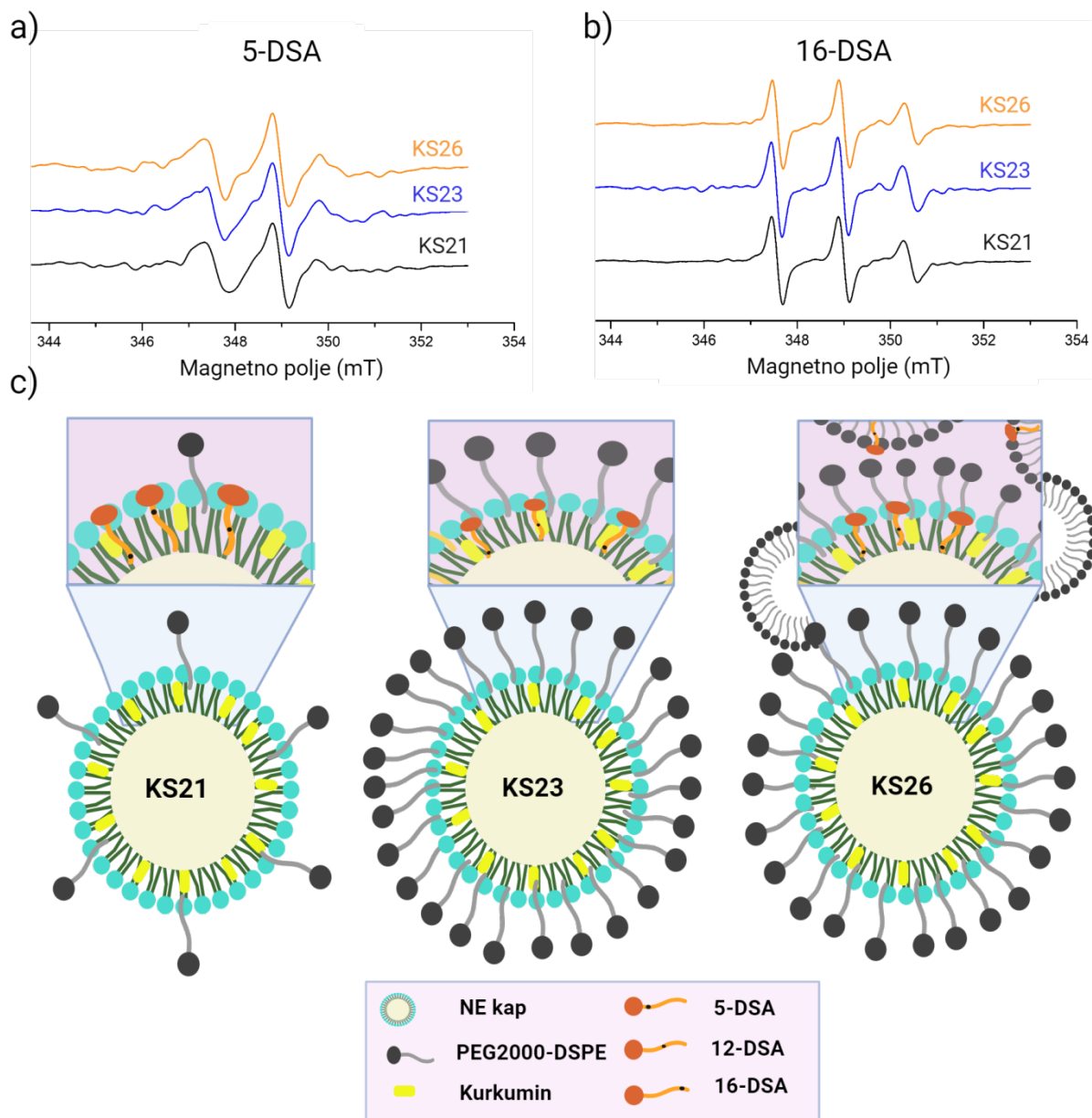
antisimetrične i simetrične vibracije CH_2 (2928 cm^{-1} i 2854 cm^{-1}), $\text{C}=\text{O}$ (1738 cm^{-1}), vibracije seckanja (engl. *scissoring*) CH_2 (1466 cm^{-1}), deformacije CH_3 (1377 cm^{-1}), PO_2 (1242 cm^{-1}), $\text{C}-\text{C}$ (1070 cm^{-1}) i $\text{N}-(\text{CH}_3)_3$ (969 cm^{-1}) grupa (Łach i sar., 2023; L. Li i sar., 2018; Li i Jiang, 2009; Setiadi i Hidayah, 2018; Zhang i sar, 2017). Dodatno, na spektrima formulacija nema pikova karakterističnih za kurkumin, kao što su vibracije istežanja fenolne $\text{O}-\text{H}$ grupe (3508 cm^{-1}), aromatičnih $\text{C}=\text{C}$ veza (1625 cm^{-1}), benzenovog prstena (1601 cm^{-1}), $\text{C}=\text{O}$ i $\text{C}=\text{C}$ grupa (1509 cm^{-1}), olefinskih $\text{C}-\text{H}$ veza (1428 cm^{-1}), aromatične $\text{C}-\text{O}$ (1278 cm^{-1}) i $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ grupe (1027 cm^{-1}) (Slika 4.3.2.) (Chen i sar., 2015). Ovi rezultati ukazuju na inkorporiranje kurkumina u NE, ili potencijalno pokrivanje ovih pikova pikovima drugih komponenti.



Slika 4.3.2. FTIR spektri nanoemulzija i odabranih komponenti: lecitina soje, kurkumina i PEG2000-DSPE

4.3.3. Elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija

EPR spektroskopija sa tri različite spin probe (5-DSA, 12-DSA i 16-DSA) pruža dodatne informacije o uticaju PEG-FL na karakteristike stabilizacionog sloja NE i može da ukaže na koncentraciju koja pruža optimalnu zaštitu površine kapi, odnosno na ostvarenu efikasnost PEGilovanja. Karakteristični EPR spektri za spinske probe 5- i 16-DSA PEGilovanih NE prikazani su na Slici 4.3.3. a i b, respektivno.



Slika 4.3.3. EPR spektri PEGilovanih NE sa: a) 5-DSA i b) 16-DSA spinskim probama; c) Konceptualni opis pozicioniranja spinskih proba u PEGilovanim NE sa 0,1 %, 0,3 %, ili 0,6 % PEG2000-DSPE.

Rotaciono korelaciono vreme (τ_R), parametar reda (S) i konstanta izotropno hiperfinog spreznja (α_N) su izračunati iz dobijenih spektara na osnovu **jednačina 8, 9 i 10**, i predstavljeni su u **Tabeli 4.3.1.** Rotaciono korelaciono vreme raste sa smanjenjem pokretljivosti spinske probe i povezano je sa povećanjem viskoziteta u njenom mikrookruženju. Parametar reda oslikava fleksibilnost stabilizacionog sloja i može imati vrednosti od $S = 0$, za potpuno neuređen, do $S = 1$, za potpuno uređen sloj. Konstanta izotropno hiperfinog spreznja je povezana sa lokalnom polarnošću, a smanjenje dobijenih vrednosti ukazuje na povećanu hidrofobnost u datom regionu. Može se primetiti da su rotacije 5-DSA spinske probe bile u suštini anizotropne za sve tri PEGilovane nanoemulzije. Na osnovu EPR spektara prikazanih na **Slici 4.3.3. a i b** i vrednosti predstavljenih u **Tabeli 4.3.1**, anizotropija 5-DSA spektra se povećava u prisustvu PEG2000-DSPE, odnosno, dodavanje 0,1 %, 0,3 % ili 0,6 % PEG2000-DSPE dovodi do povećanja rotacionog vremena u poređenju sa ne-PEGilovanom nanoemulzijom. Ovi rezultati

upućuju da spinska proba ima veće smetnje pri rotaciji u PEGilovanim NE, odnosno da PEG-FL povećavaju rigidnost stabilizacionog sloja. Primetno je da daljim povećanjem koncentracije PEG2000-DSPE, τ_R vrednosti opadaju, a zanimljivo je da su za 5-DSA one bile najniže kod formulacije sa najvećom korišćenom koncentracijom PEG-FL (0,6 %) u odnosu na druge dve PEGilovane NE. Ovi rezultati upućuju da je pri nižoj koncentraciji (sa 0,3 % PEG2000-DSPE) postignuta potpuna pokrivenost površine kapi PEG-FL. Stoga, informacije koje pruža EPR spektar 5-DSA probe kod uzorka KS26 mogu da potiču ne samo od sloja PEGilovanih fosfolipida koji okružuju kap, već i od dodatnih struktura koje mogu da nastanu u višku stabilizatora, kao što su micle (Slika 4.3.3. c). Ovi rezultati upućuju da lanci PEG na površini uzorka KS23 i KS26 imaju konfiguraciju četke, što znači da su čvrsto vezani za kap i da joj pružaju potpunu sternu zaštitu (Labouta i sar., 2018). Kod ove probe, PEGilovanje nije uticalo na stepen uređenosti membrane (S), dok je lokalna polarnost izražena preko parametra α_N smanjena. Ove vrednosti ukazuju da lipofilni deo PEG2000-DSPE, DSPE, prodire samo u delove stabilizacionog sloja koje karakteriše 5-DSA sonda, smanjujući polarnost, odnosno povećavajući lipofilnost. Dodatno, zbog hidrofilne prirode lanaca PEG, omotač koji oni grade oko kapi može da adsorbuje deo vode iz vodene faze i smanji njen prodor do stabilizacionog sloja, što takođe rezultuje smanjenjem polarnosti u poređenju sa ne-PEGilovanom formulacijom. S druge strane, veća izotropija spektra proba 12- i 16-DSA (Slika 4.3.3. b), odnosno niže vrednosti parametra S (Tabela 4.3.1.) ukazuju na povećanje fleksibilnosti pokretanja lipidnih lanaca u delovima stabilizacionog sloja koji su bliži unutrašnjem, uljanom jezgru kapi NE. Dodavanje PEG2000-DSPE nije imalo uticaja na rotaciono korelaciono vreme (τ_R), parametar reda (S) i konstantu izotropno hiperfinog sprežanja (α_N) proba 12-DSA i 16-DSA na dubinama stabilizacionog sloja koje ove probe karakterišu, što znači da PEG2000-DSPE ne prodire dublje u stabilizacioni sloj, već se zadržava u regionima bližim površini kapi. Dakle, na dinamiku stabilizacionog sloja nanoemulzija, opisanu parametrima τ_R , S i α_N , prisustvo PEGilovanog fosfolipida utiče u delu kapi koji je blizu vodenog interfejsa, dok unutrašnji deo kapi ostaje nepromenjen.

Tabela 4.3.1. Parametri EPR spektara analiziranih nanoemulzija

NEs	5-DSA			12-DSA			16-DSA		
	τ_R (ns)	S	α_N ($\times 10^{-4}$ T)	τ_R (ns)	S	α_N ($\times 10^{-4}$ T)	τ_R (ns)	S	α_N ($\times 10^{-4}$ T)
KS	2,20 ± 0,30	0,23 ± 0,01	14,9 ± 0,2	1,81 ± 0,06	0,11 ± 0,01	14,1 ± 0,0	0,61 ± 0,03	0,05 ± 0,00	14,6 ± 0,0
KS21	3,75 ± 0,05	0,21 ± 0,04	13,1 ± 0,2	1,79 ± 0,04	0,10 ± 0,01	14,2 ± 0,0	0,63 ± 0,02	0,05 ± 0,00	14,7 ± 0,0
KS23	2,96 ± 0,03	0,23 ± 0,02	12,9 ± 0,4	1,77 ± 0,04	0,10 ± 0,00	14,2 ± 0,2	0,78 ± 0,15	0,05 ± 0,01	14,7 ± 0,0
KS26	2,69 ± 0,04	0,21 ± 0,03	12,9 ± 0,3	1,75 ± 0,01	0,11 ± 0,00	14,1 ± 0,1	0,59 ± 0,04	0,05 ± 0,00	14,7 ± 0,0

τ_R – rotaciono korelaciono vreme; S – parametar reda; α_N – konstanta izotropno hiperfinog sprežanja.

4.3.4. Uticaj PEGilovanja na interakcije sa proteinima

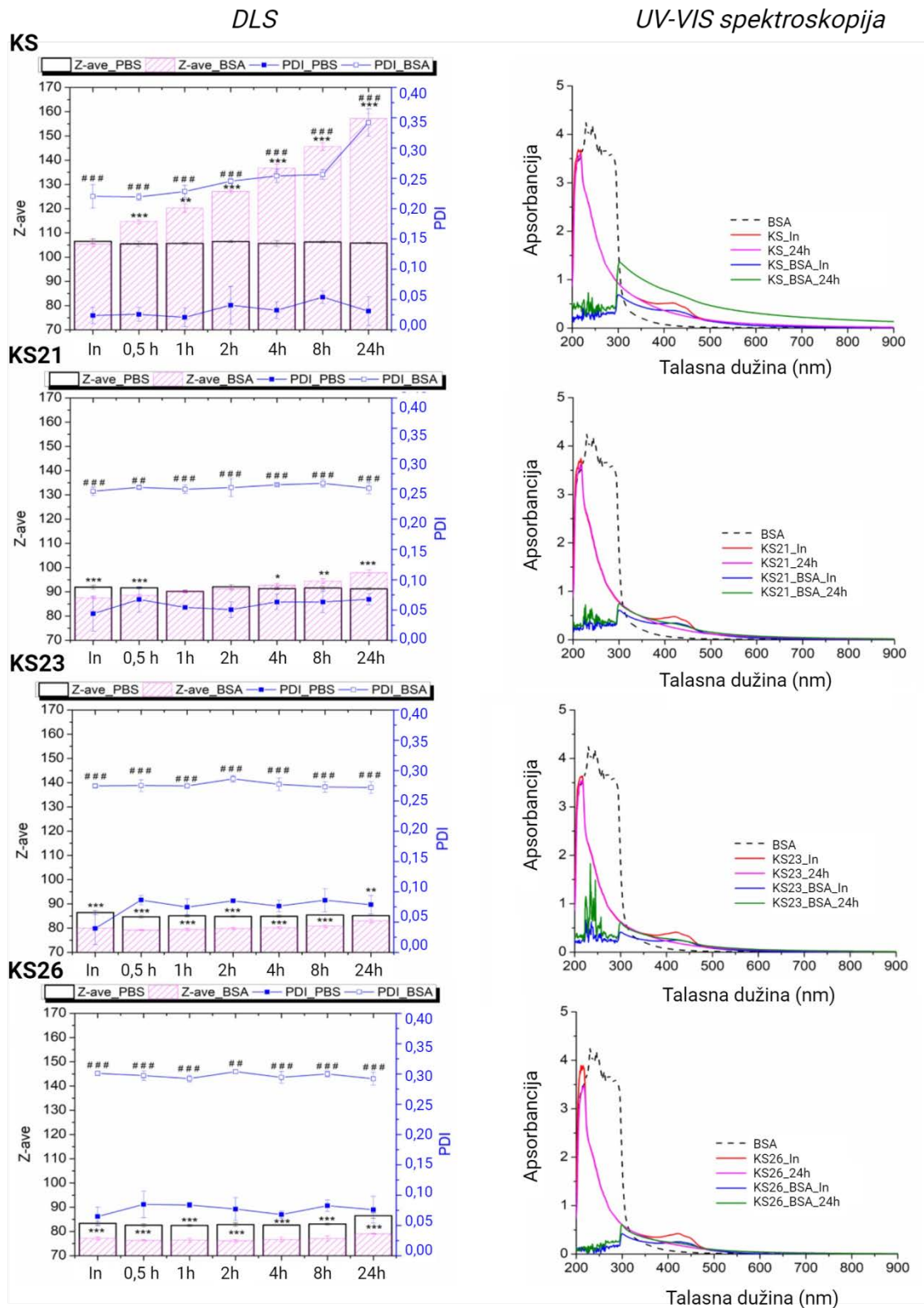
Stepen vezivanja proteina za površinu NE je karakteristika koja može da pomogne kod određivanja efikasnosti PEGilovanja. Pretpostavlja se da je vezivanje proteina za površinu nanonosaa minimizirano pri optimalnoj koncentraciji PEGilovanih fosfolipida. Nakon intravenske primene proteini formiraju koronu na površini kapi, koja kapima NE daje novi biološki identitet i tako određuje njihovu dalju biološku sudbinu (Ezzat i sar., 2022; Keck i sar., 2012b; Phan i sar., 2015; Saptarshi i sar., 2013; Vitali i sar., 2020). U proceni stepena vezivanja različitih proteina za površinu nanoemulzija (PEGilovanih i poredbene ne-PEGilovane) mogu se koristiti različite metode. One mogu biti direktne, zasnovane na dobijanju strukturnih informacija, kvantifikaciji ili identifikaciji proteina vezanih za površinu nanonosaa, ili indirektno, zasnovane na merenju promena veličine čestica, apsorpcije,

naelektrisanja, temperature, fluorescencije ili mase (Zarei i Aalaie, 2019). U ovoj studiji je analizirana interakcija kapi sa albuminom, najzastupljenijim proteinom plazme koji se ponaša kao disopsonin (Karimi i sar., 2016; Spada i sar., 2021). To znači da vezivanje albumina za površinu kapi smanjuje prepoznavanje od strane komponenata mononuklearnog fagocitnog sistema, što rezultuje produženim vremenom cirkulacije (Hörmann i Zimmer, 2016; Spada i sar., 2021). Korišćena koncentracija albumina (30 mg/ml) odgovara sadržaju u plazmi (Moman i sar., 2023). Vezivanje proteina je dodatno ispitano u složenijem medijumu, fetalnom goveđem serumu (FBS), u razblaženju koje se obično koristi za medijume ćelijskih kultura. FBS se sastoji iz mešavine proteina, različitih hormona, masnih kiselina i drugih komponenata (Lee i sar., 2022; Liu i sar., 2023).

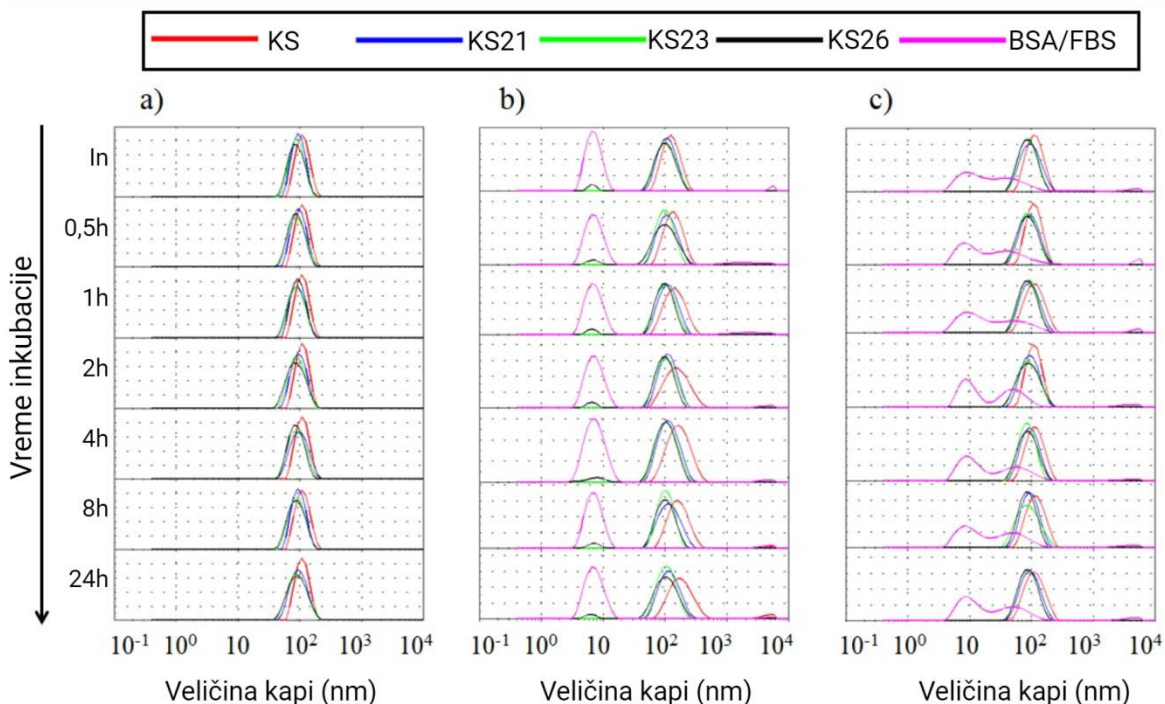
4.3.4.1. Interakcije sa BSA

Tokom analize formulacija tehnikom dinamičkog rasipanja svetlosti, utvrđeno je da se veličina kapi (Z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI) NE nisu značajno promenili tokom 24 časa inkubacije u čistom PBS (**Slika 4.3.4.**), što sugerise da su promene ovih parametara nakon inkubacije u medijumu sa BSA posledica interakcije kapi sa albuminom. Statistički značajne promene u Z-ave i PDI su bile najznačajnije kod ne-PEGilovane nanoemulzije KS (**Slika 4.3.4.**), gde se veličina kapi povećala već nakon 0,5 h inkubacije ($p < 0,001$), što ukazuje na visok afinitet nedekorirane površine kapi za vezivanje albumina. Ovaj trend se održao u svim vremenskim tačkama ($p < 0,001$), što ukazuje na stabilno vezivanje BSA i ostvarivanje jakih interakcija sa površinom kapi. Ovi rezultati su u skladu sa težnjom BSA ka vezivanju za negativno naelektrisane površine, na pH vrednostima iznad izoelektrične tačke (IEP) usled elektrostatičkih interakcija sa pozitivno naelektrisanim aminokiselinama proteina (Phan i sar., 2015). PEGilovanje je uticalo na vezivanje albumina na koncentraciono zavisni način (**Slika 4.3.4.**). Nakon dodatka 0,1 % PEG2000-DSPE može se primetiti da je kod formulacije KS21 inicijalno izmerena Z-ave nakon inkubacije u medijumu sa BSA statistički značajno niža ($p < 0,001$) u poređenju sa vrednostima izmerenim nakon inkubacije u čistom PBS u istoj vremenskoj tački (**Slika 4.3.4.**). Ovakav rezultat je posledica male veličine čestica albumina (oko 10 nm) (**Slika 4.3.5.**), što uzrokuje pomeranje Z-ave ka nižim vrednostima u medijumu sa BSA. Sličan trend je nastavljen i nakon 0,5 h inkubacije. Vezivanje albumina je počelo 1 h nakon inkubacije, što se vidi na osnovu povećanja Z-ave vrednosti, a nakon 4 h ova razlika je postala i statistički značajna. U NE sa 0,3% i 0,6% PEGilovanog fosfolipida, Z-ave je ostala niža u medijumu sa BSA nego u čistom PBS ($p < 0,05$) u svim analiziranim vremenskim tačkama, što ukazuje na nedostatak vezivanja albumina za površinu kapi (**Slika 4.3.4.**). PDI vrednosti su bile značajno veće u medijumu sa BSA u poređenju sa čistim PBS ($p < 0,001$) u svim vremenskim tačkama, što je posledica prisustva dodatne populacije veličine čestica u vidu albumina.

Snimljeni apsorpcioni spektri formulacija nakon inkubacije u medijumu sa proteinom su takođe potvrdili vezivanje albumina za površinu kapi (**Slika 4.3.4.**). Kod formulacije KS je primećena hiperhromna promena nakon 24 h inkubacije, koja ukazuje na izlaganje aminokiselinskih ostataka koji adsorbuju fotone i pojavu konformacione promene albumina zbog interakcija sa NE (W. Wang i sar., 2021). Ove promene su bile manje izražene u PEGilovanim formulacijama (**Slika 4.3.4.**), što ukazuje na niži stepen vezivanja BSA. Niža apsorpcija u delu spektra od 200 do 300 nm ukazuje na niže vezivanje proteina za formulaciju KS26.

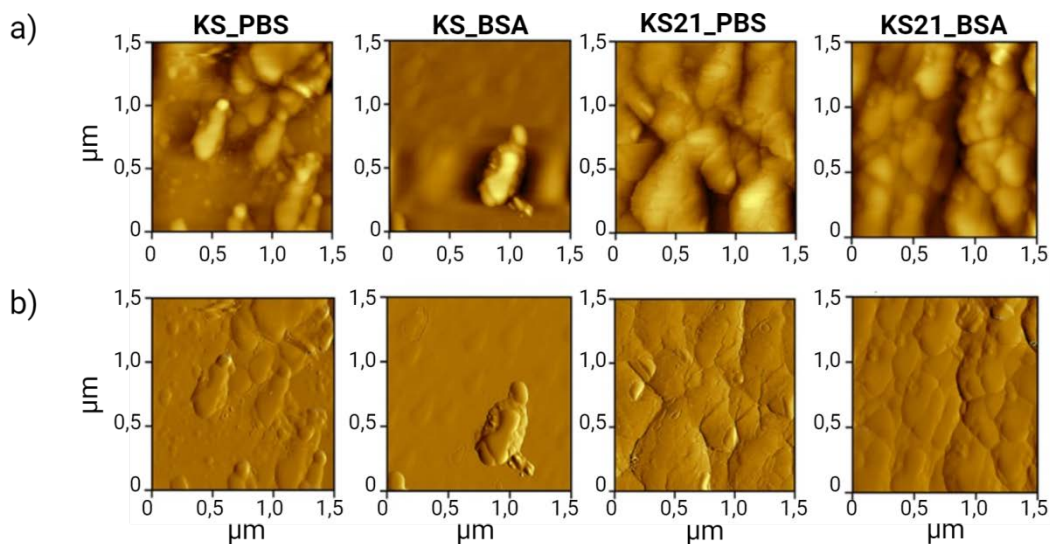


Slika 4.3.4. DLS i UV-VIS spektroskopija u proceni interakcija formulacija sa BSA tokom 24-časovne inkubacije u čistom PBS (PBS) ili PBS obogaćenom BSA (BSA). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm sd; *, ** i ***, $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u poređenju sa Z-ave vrednostima u PBS-u istoj vremenskoj tački; #, ## i ###, $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u poređenju sa PDI vrednostima u PBS-u istoj vremenskoj tački; na desnoj strani su predstavljeni UV-VIS apsorpcioni spektri istih NE snimljeni inicijalno (In) i nakon 24 sata, u PBS i medijumu obogaćenom proteinom



Slika 4.3.5. Veličine kapi nanoemulzija izmerene tehnikom dinamičkog rasipanja svetlosti, nakon inkubacije u: a) fosfatnom puferu (PBS); b) 30 mg/ml BSA (goveđeg serumskog albumina) u PBS; c) 10 % (v/v) FBS (fetalnog goveđeg seruma) u PBS

AFM mikrofografije NE inkubiranih u BSA su takođe pokazale vezivanje albumina za površinu kapi. Nakon inkubacije ne-PEGilovane formulacije (KS) u PBS, na mikrofografijama se mogu videti manje kapi, prečnika oko 100 nm, koje odgovaraju kapima NE, kao i neki agregati verovatno nastali tokom pripreme uzorka. Nakon inkubacije istog uzorka u BSA (**Slika 4.3.6.**), uočeni su veći aglomerati, kao i elipsoidne kapi koje se mogu pripisati topografiji BSA pri pH vrednosti sredine od oko 7 (Hao i sar., 2019). Na mikrofografijama uzorka KS21 inkubiranog u PBS, mogu se uočiti i pojedinačne kapi koje su bolje definisane u poređenju sa ne-PEGilovanom formulacijom, verovatno zbog prisustva PEG2000-DSPE (**Slika 4.3.6.**). Nakon inkubacije ovog uzorka u BSA, mogle su se uočiti različite strukture (**Slika 4.3.6.**), pri čemu su one izdužene verovatno potekle od BSA (Hao i sar., 2019). Sličan izgled topografija nakon inkubacije u čistom PBS i PBS obogaćenom BSA mogu ukazati na niži stepen interakcija između kapi i proteina u poređenju sa uzorkom KS.

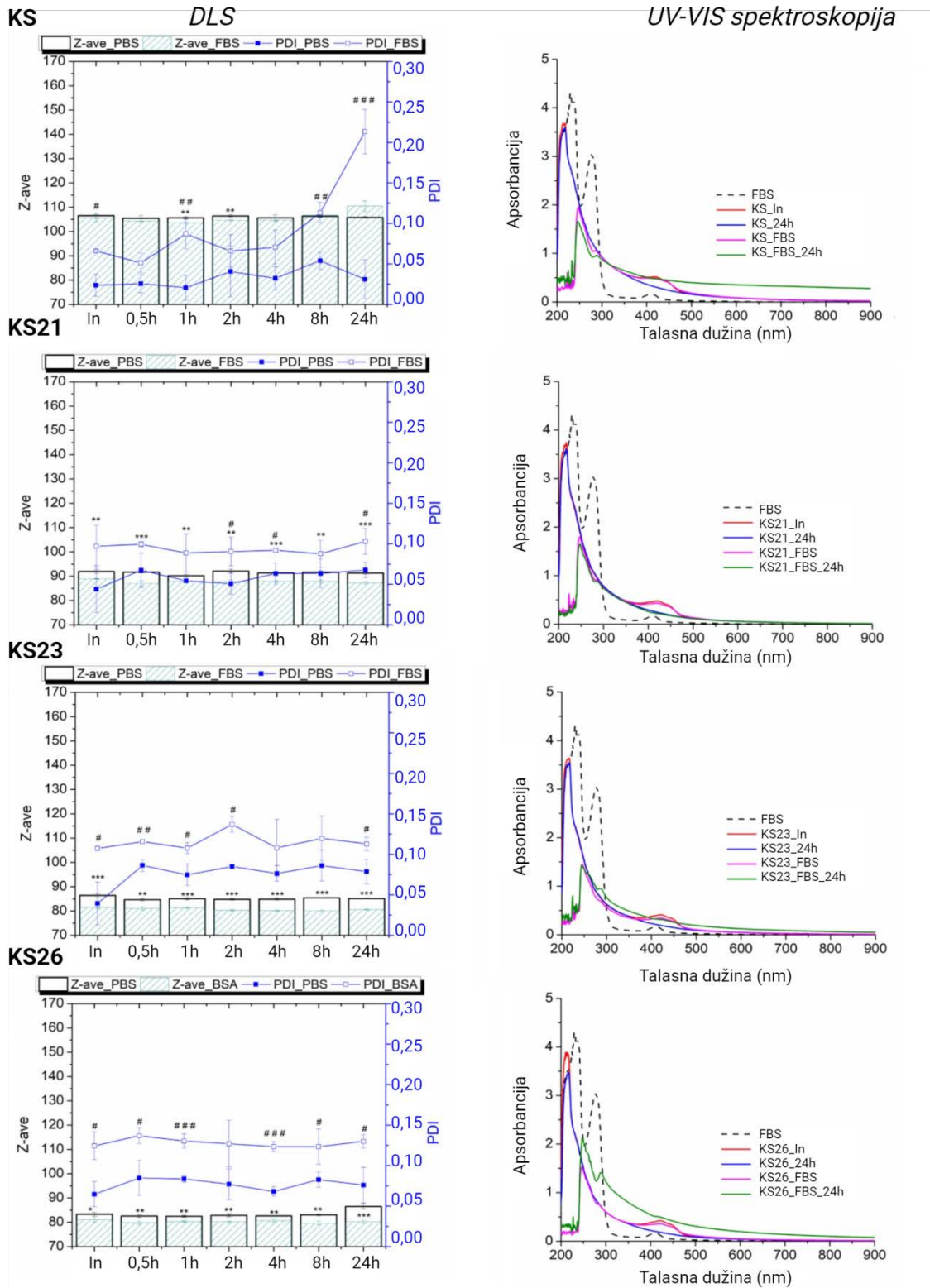


Slika 4.3.6. AFM mikrografije NE inkubiranih u fosfatnom puferu (KS_PBS i KS21_PBS) ili u fosfatnom puferu obogaćenom BSA (KS_BSA i KS21_BSA); a) 2D topografija površine uzorka veličine $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$; i b) odgovarajući signal greške.

4.3.4.2. Interakcije sa FBS

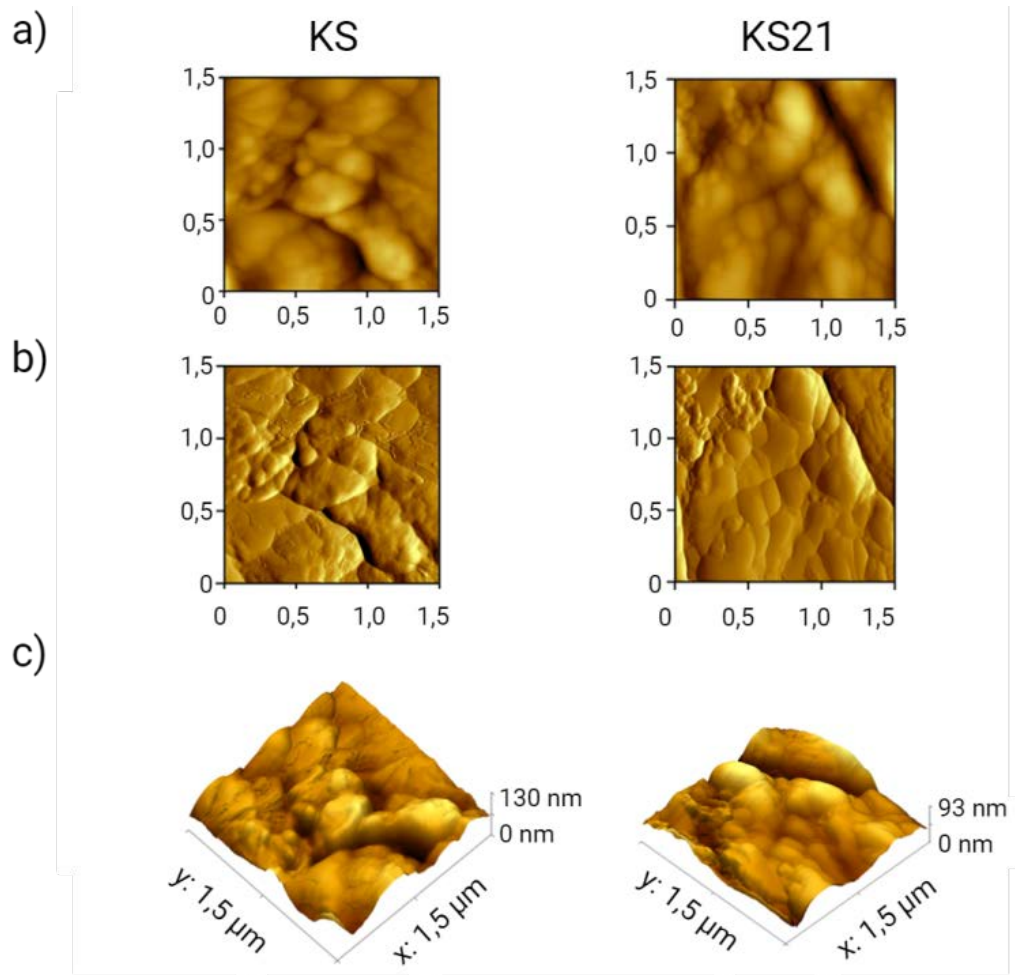
Inicijalna merenja nakon inkubacije formulacija u 10%, v/v, FBS su pokazala veće razlike u veličini i raspodeli veličine kapi kod PEGilovanih, u odnosu na ne-PEGilovanu formulaciju, premda ove promene nisu bile toliko izražene kao kod medijuma sa BSA, verovatno zbog niže koncentracije proteina. Nakon razblaživanja FBS u PBS se može uočiti nekoliko različitih populacija čestica koje su predstavljene na dijagramu raspodele veličine (**Slika 4.3.5. c**). Jedan deo čestica, verovatno albumin, je imao veličinu od oko 10 nm, dok je druga populacija imala veličinu oko 80 nm (**Slika 4.3.5. c**). Nakon inicijalne inkubacije KS u medijumu sa FBS postoje male razlike u Z-ave vrednostima u poređenju sa veličinom kapi u čistom PBS (**Slika 4.3.7.**). Posle jednog sata inkubacije veličina kapi se postepeno povećava, pri čemu je to povećanje najizraženije nakon 24 sata (**Slika 4.3.7.**). Kod svih PEGilovanih NE veličina kapi je bila manja u medijumu sa FBS u odnosu na PBS, u svim vremenskim tačkama (**Slika 4.3.7.**). Ovaj rezultat bi se verovatno mogao objasniti izostankom vezivanja kapi NE za proteine i ostale komponente FBS, bilo da je u pitanju albumin ili čestice veličine oko 80 nm, što znači da postojanje dodatnih populacija smanjuje Z-ave vrednosti. PDI je bio veći nakon inkubacije u FBS za sve formulacije (**Slika 4.3.7.**), što se može objasniti prisustvom čestica različitih veličina.

Apsorpcioni spektri NE nakon inkubacije u proteinskom medijumu ukazuju na interakcije sa komponentama FBS. Uočeni apsorpcioni maksimumi u spektru FBS, na talasnim dužinama od 229 nm i 277 nm (**Slika 4.3.7.**) verovatno potiču od albumina (W. Wang i sar., 2021). Spektar formulacije KS pokazuje hipsohromno pomeranje nakon 24 h inkubacije (**Slika 4.3.7.**). Ovi rezultati ukazuju da su ostaci aminokiselina u albuminu sterno zaklonjeni, verovatno nekom drugom komponentom FBS (Lee i sar., 2022). Apsorpcioni spektar KS21 se nije značajno promenio nakon 24 h inkubacije sa FBS, što ukazuje na najmanju interakciju sa proteinskim medijumom (**Slika 4.3.7.**). Kod formulacije KS23, apsorpcioni maksimum na 244 nm je ostao nepromenjen posle 24 h, ali se javio dodatni pik na 286 nm, koji ukazuje na konformacione promene koje su dovele do otkrivanja aromatičnih aminokiselina, verovatno poreklom iz albumina, koje apsorbuju fotone (W. Wang i sar., 2021). S druge strane, hiperhromna promena u spektru KS26 ukazuje na drugačiji vid proteinskih interakcija (**Slika 4.3.7.**), verovatno usled uticaja različitih komponenta FBS.



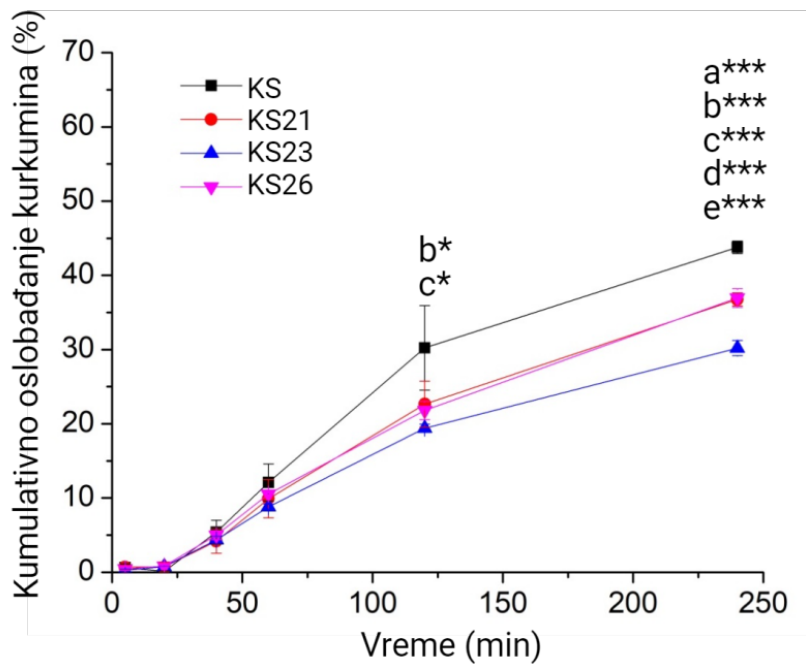
Slika 4.3.7. DLS i UV-VIS spektroskopija u proceni interakcija formulacija sa FBS tokom 24-časovne inkubacije u čistom PBS (PBS) ili PBS obogaćenom FBS. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm sd; *, ** i ***, $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u poređenju sa Z-ave vrednostima u PBS-u za svaku vremensku tačku; #, ## i ###, $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u poređenju sa PDI vrednostima u PBS-u za svaku vremensku tačku. Na desnoj strani, UV-VIS spektri apsorbancije istih NE snimljeni inicijalno (In) i nakon 24 sata, u PBS i medijumu obogaćenom proteinima.

AFM mikrografije formulacija nakon inkubacije u medijumu sa FBS (**Slika 4.3.8**) su pokazale neke veće strukture u odnosu na one snimljene nakon inkubacije sa BSA (**Slika 4.3.6.**), što je u skladu sa kompleksnim sadržajem seruma (Lee i sar., 2022; Liu i sar., 2023). U analiziranim 2D topografijama nisu uočene razlike između ne-PEGilovane i PEGilovane formulacije, dok je kod 3D topografije, glavna razlika bila veća visina uzorka KS u poređenju sa KS21, što potencijalno ukazuje na viši stepen vezivanja za proteine. Ipak, ova metoda nije bila od velikog značaja u otkrivanju ostvarene efikasnosti PEGilovanja, verovatno zbog kompleksnosti medijuma.



Slika 4.3.8. AFM mikrografije snimljene nakon inkubacije NE u PBS obogaćenom FBS; a) 2D topografija površine uzorka od $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$; b) odgovarajući signal greške; c) 3D topografija.

Prilikom analize oslobađanja kurkumina iz NE inkubiranih u medijumu sa FBS, najveći stepen oslobađanja kurkumina je uočen kod ne-PEGilovane formulacije, što ukazuje da komponente FBS narušavaju sposobnost neobloženog stabilizacionog sloja u zadržavanju supstance (**Slika 4.3.9.**). S druge strane, nisu primećene značajne razlike u količini kurkumina oslobođenog iz formulacija KS21 i KS26. Ovo potencijalno znači da je u slučaju KS21 ostvarena određena površinska zaštita kapi pomoću PEG2000-DSPE, što je bilo naročito evidentno nakon 4 h (**Slika 4.3.9.**). U slučaju nanoemulzije KS26, dobijeni rezultati bi se verovatno mogli objasniti delimičnom ugradnjom kurkumina u micelle formirane u višku agensa za PEGilovanje. Najsporije oslobađanje kurkumina je uočeno kod formulacije KS23 (**Slika 4.3.9.**), što ukazuje da je optimalna efikasnost PEGilovanja i adekvatna zaštita površine kapi postignuta sa 0,3 % PEG2000-DSPE.



Slika 4.3.9. Kumulativno oslobađanje kurkumina iz NE inkubiranih sa medijumom obogaćenim FBS; rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm sd ($n = 3$); *, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$; a – KS vs KS21; b – KS vs KS23; c – KS vs KS26; d – KS21 vs KS23, e – KS23 vs KS26.

Modelovanje podataka oslobađanja je ukazalo da je oslobađanje kurkumina iz ne-PEGilovane formulacije (KS) najbolje opisano Korsmejer-Peppas modelom (**Tabela 4.3.2.**), što sugeriše da je u oslobađanje uključeno više fenomena (Costa and Sousa Lobo, 2001). Izračunate vrednosti eksponenta oslobađanja n ukazuju na *super case II* transport, koji se povezuje sa hidratacijom i bubrenjem polimera, a u ovom slučaju je verovatno posledica vezanih proteina (Sevinç-Özakar i sar., 2022). U slučaju formulacije KS21 za opisivanje oslobađanja kurkumina se mogu koristiti i Korsmejer-Peppas i Hixson-Crowell modeli, što ukazuje na složene procese uključene u oslobađanje. Kod nanoemulzija KS23 i KS26, oslobađanje kurkumina je najbolje opisano Hixson-Crowell modelom (**Tabela 4.3.2.**), koji podrazumeva da je za brzinu oslobađanja supstance iz formulacije ograničavajući faktor brzina rastvaranja, a ne difuzija supstance kroz polimerni sloj. Ovaj model najbolje odgovara sistemima za isporuku lekovitih supstanci čiji oblik ostaje konstantan tokom testiranja, što u ovom slučaju može ukazivati na nedostatak vezivanja proteina na površini kapi (Costa and Sousa Lobo, 2001).

Tabela 4.3.2. Modeli *in vitro* oslobađanja kurkumina iz NE nakon inkubacije sa FBS

	Formulacije			
	KS	KS21	KS23	KS26
Nulti red	k = 0,183 R ² = 0,9670 R ² _{adj} = 0,9670 AIC = 25,0861	k = 0,159 R ² = 0,9685 R ² _{adj} = 0,9685 AIC = 22,6126	k = 0,133 R ² = 0,9669 R ² _{adj} = 0,9669 AIC = 20,7277	k = 0,159 R ² = 0,9810 R ² _{adj} = 0,9810 AIC = 19,7908
Prvi red	k = 0,002 R ² = 0,9580 R ² _{adj} = 0,9580 AIC = 25,9696	k = 0,002 R ² = 0,9701 R ² _{adj} = 0,9701 AIC = 22,6487	k = 0,002 R ² = 0,9741 R ² _{adj} = 0,9741 AIC = 19,3765	k = 0,002 R ² = 0,9820 R ² _{adj} = 0,9820 AIC = 19,4812
Higuchi	k = 2,184 R ² = 0,7698 R ² _{adj} = 0,7698 AIC = 36,6900	k = 1,908 R ² = 0,7892 R ² _{adj} = 0,7892 AIC = 34,3436	k = 1,607 R ² = 0,8097 R ² _{adj} = 0,8097 AIC = 31,4055	k = 1,915 R ² = 0,8045 R ² _{adj} = 0,8045 AIC = 33,7973
Baker-Lonsdale	k = 0,000 R ² = 0,7454 R ² _{adj} = 0,7454 AIC = 37,3179	k = 0,000 R ² = 0,7690 R ² _{adj} = 0,7690 AIC = 34,9042	k = 0,000 R ² = 0,7935 R ² _{adj} = 0,7935 AIC = 31,8956	k = 0,000 R ² = 0,7839 R ² _{adj} = 0,7839 AIC = 34,3998
Korsmeyer-Peppas	k = 0,170 n = 1,072 R² = 0,9757 R²_{adj} = 0,9697 AIC = 25,2463	k = 0,188 n = 0,995 R² = 0,9731 R²_{adj} = 0,9664 AIC = 23,6090	k = 0,190 n = 0,935 R ² = 0,9702 R ² _{adj} = 0,9627 AIC = 22,1677	k = 0,183 n = 0,974 R ² = 0,9814 R ² _{adj} = 0,9768 AIC = 21,6577
Hixson-Crowell	k = 0,001 R ² = 0,9630 R ² _{adj} = 0,9630 AIC = 25,3928	k = 0,001 R² = 0,9713 R²_{adj} = 0,9713 AIC = 22,3777	k = 0,000 R² = 0,9729 R²_{adj} = 0,9729 AIC = 19,6085	k = 0,001 R² = 0,9833 R²_{adj} = 0,9833 AIC = 19,0018

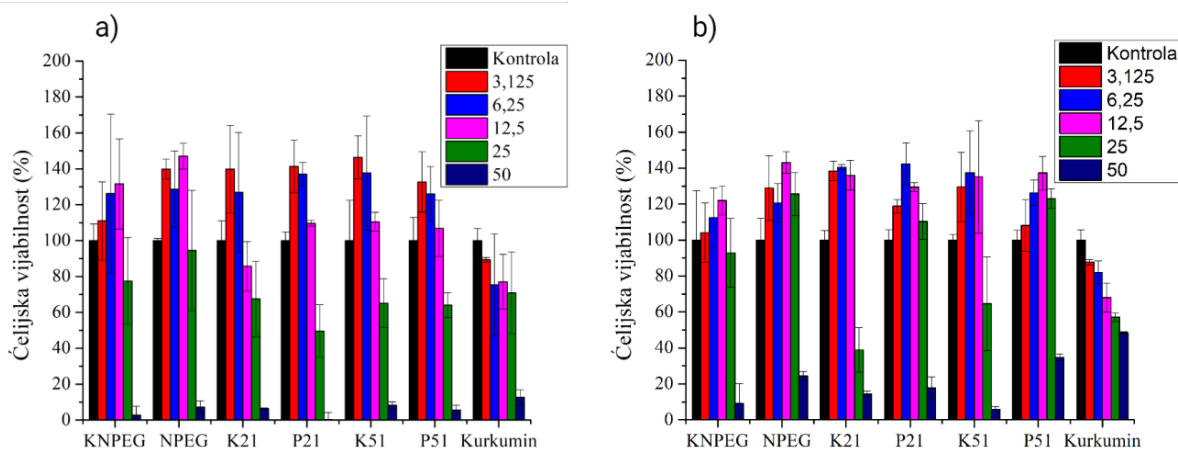
R² – koeficijent determinacije; R²_{adjusted} – prilagođeni koeficijent determinacije; AIC – Akaike informacijski kriterijum; n – eksponent oslobađanja

4.4. Rezultati i diskusija četvrte faze eksperimentalnog rada

4.4.1. Citotoksični i hemolitički potencijal nanoemulzija

In vitro test procene ćelijske vijabilnosti je sproveden u cilju procene biološkog uticaja odabranih nanoemulzija. Kako bi se potvrdila neškodljivost formulacija, prvo je procenjen njihov efekat na ćelijskoj liniji MRC5, odnosno na ćelijama normalnih humanih fibroblasta pluća. Na **Slici 4.4.1. a** se može videti da nijedna od testiranih formulacija sa kurkuminom (KNPEG, K21, K51), kao ni respektivne placebo formulacije (NPEG, P21, P51) nisu imale efekat na normalne ćelije, u ispitivanom opsegu koncentracija, što ukazuje na dobar bezbednosni profil. Povećanje koncentracije formulacija u ćelijskom medijumu je dovelo do smanjenja ćelijske vijabilnosti, što bi se verovatno moglo objasniti prisustvom benzil alkohola, koji ima ulogu korastvarača u formulacijama, a za kojeg je pokazano da ima koncentraciono zavistan citotoksični efekat (Chang i sar., 2008).

Pored procene bezbednosti na MRC5 ćelijskoj liniji, dodatno je procenjena efikasnost formulacija na ćelijskoj liniji karcinoma debelog creva (LS-174). Može se uočiti da su formulacije sa kurkuminom imale veći uticaj na vijabilnost ćelija u odnosu na odgovarajuće placebo formulacije pripremljene u istom razblaženju (**Slika 4.4.1. b**). Dodatno, pokazano je da čist kurkumin ima veći uticaj na vijabilnost ćelija u odnosu na formulacije NE sa kurkuminom. Ovi rezultati mogu se objasniti inkapsulacijom kurkumina u stabilizacioni sloj kapi, što usporava oslobađanje kapi i daje privid niže aktivnosti (Nikolic i sar., 2020). Takav zaključak je takođe u skladu sa rezultatima dobijenim u analizi *in vitro* studija oslobađanja (**Slika 4.1.11.**), gde se vidi da je oslobađanje kurkumina iz formulacija NE odloženo u odnosu na rastvor.

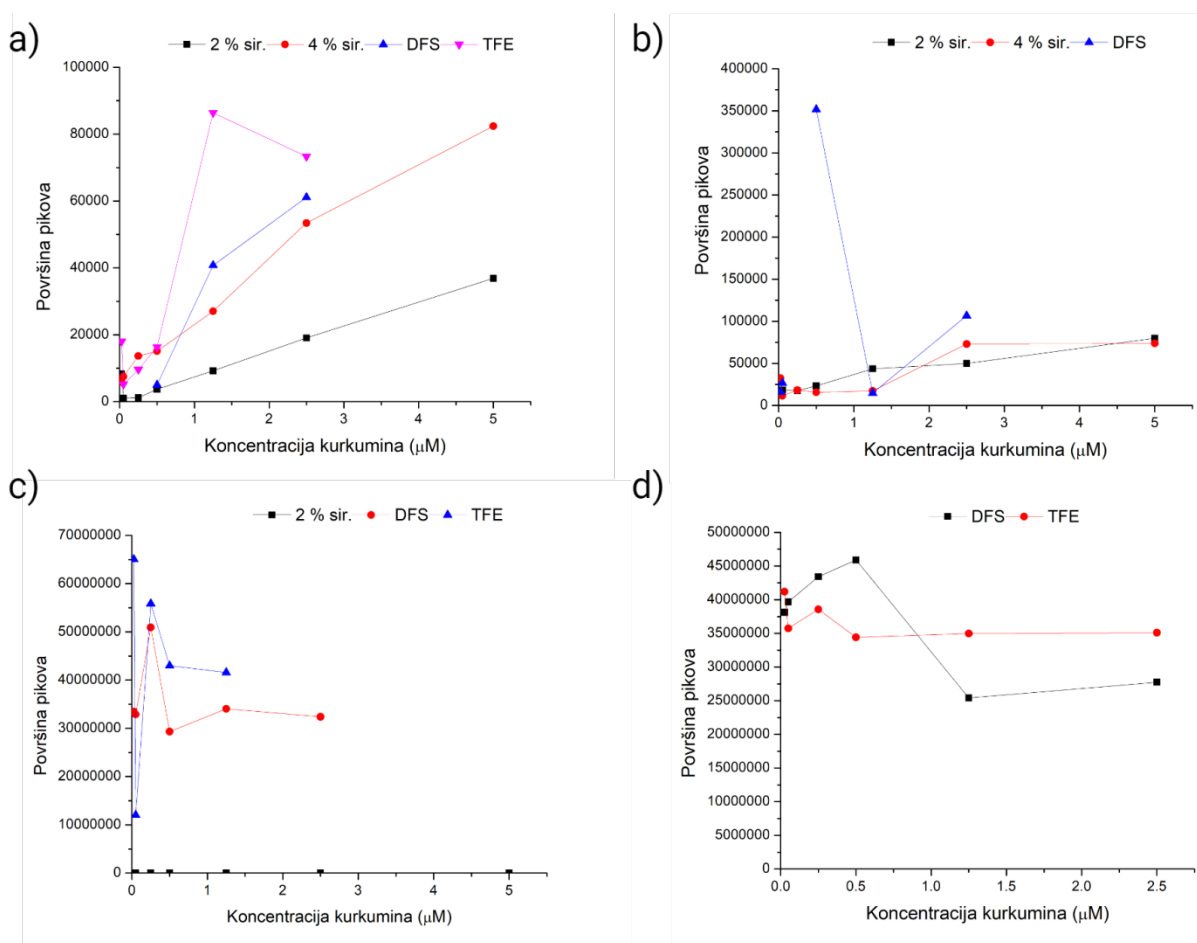


Slika 4.4.1. Uticaj odabranih formulacija na ćelijsku vijabilnost a) MRC-5 i b) LS-174 ćelijskih linija. Svi rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm sd ($n = 3$)

Neškodljivost formulacija je dodatno potvrđena testom hemolize, čiji su rezultati pokazali da pripremljene NE ne pokazuju značajnu hemolitičku aktivnost. Dobijeni procenti hemolize $7,17 \pm 0,73\%$, $2,65 \pm 0,39\%$ i $2,96 \pm 3,44\%$ za KNPEG, K21 i K51, respektivno, smatraju se prihvatljivim, odnosno nehemolitičkim (Amin i Dannenfesler, 2006). Interesantno je da je ne-PEGilovana formulacija (KNPEG) imala više nego dvostruko veću hemolitičku aktivnost u poređenju sa PEGilovanim nanoemulzijama (K21 i K51). Ovo se verovatno može pripisati činjenici da lanci PEG sterno ometaju interakciju sa eritrocitima. Ovaj test je bio posebno značajan u potvrđivanju bezbednosti formulacija izabranih za *in vivo* analizu farmakokinetike, budući da su korišćeni puna krv pacova i nerazblažene formulacije, čime su simulirani uslovi nakon intravenske primene nanoemulzija.

4.4.2. Metoda za obradu biološkog materijala sa kurkuminom

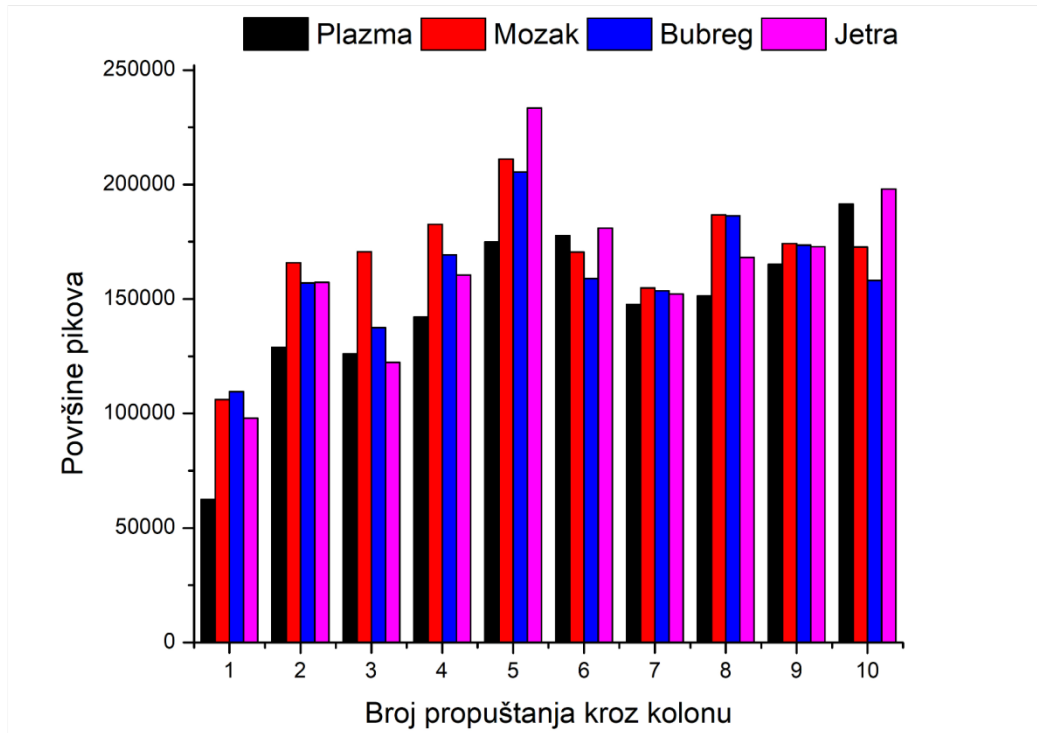
Kako bi se adekvatno procenila raspodela kurkumina u različitim tkivima i organima najvažniji korak je odabir adekvatne metode za obradu biološkog materijala. Kritičan deo ovog procesa je prečišćavanje supernatanata homogenizata tkiva i organa kako bi se dobili uzorci adekvatnog kvaliteta za dalju LC-MS/MS analizu. U tu svrhu su ispitana dva najčešće korišćena postupka, čvrsto-tečna hromatografija i taloženje proteina acetonitrilom, koji su literaturno preporučeni za prečišćavanje biološkog materijala sa kurkuminom (Chirio i sar., 2019; Dibaei i sar., 2019; Marczylo i sar., 2007). U protokolu čvrsto-tečne ekstrakcije su korišćeni različiti rastvarači za eluciju bazirani na zakišeljavanju metanola različitim kiselinama, budući da je stabilnost kurkumina veća u kiseljoj sredini (Subramani i sar., 2017). Na osnovu dobijenih rezultata predstavljenih na **Slici 4.4.2.** može se videti da ni jedan od korišćenih eluata nije dao zadovoljavajuće rezultate linearnosti koncentracije kurkumina, stoga je ova metoda smatrana neodgovarajućom.



Slika 4.4.2. Uticaj različitih sredstava za eluciju u protokolu čvrsto-tečne ekstrakcije na koncentraciju kurkumina nakon prečišćavanja supernatanata/homogenizata: a) plazme; b) mozga; c) jetre i d) bubrega; 2% sir. – 2%, v/v, rastvor sirćetne kiseline u metanolu; 4% sir. – 4%, v/v, rastvor sirćetne kiseline u metanolu; DFS – 0,5%, m/m, rastvor difluorosirćetne kiseline u metanolu; TFE – 0,5%, m/m, rastvor trifluoroetanolu u metanolu.

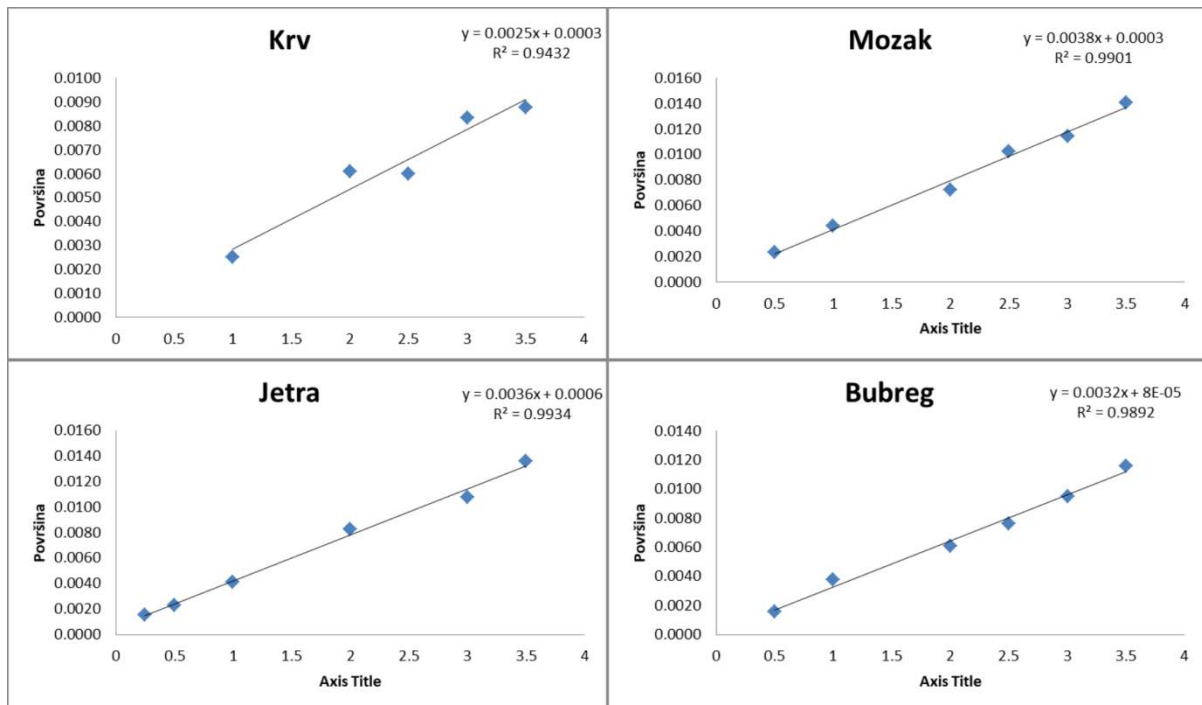
Radi dodatne potvrde, protokol za eluciju je ponovljen više puta sa istom koncentracijom kurkumina (0,5 μM) kako bi se videlo da li dolazi do zadržavanja kurkumina na kolonama. U rezultatima predstavljenim na **Slici 4.4.3.** se može videti da, bez obzira na tkivni materijal, dalja propuštanja rastvora daju veći odgovor u odnosu na inicijalni, što znači da se kurkumin

zadržava na koloni, što je definitivno potvrdilo neadekvatnost metode čvrsto-tečne ekstrakcije u finalnom prečišćavanju biološkog materijala opterećenog kurkuminom.



Slika 4.4.3. Rezultati višestrukog propuštanja rastvora kurkumina (0,5 μM) kroz kolonu u čvrsto-tečnoj ekstrakciji

Što se tiče metode taloženja proteina acetonitrilom, može se videti da je linearnost pripremljenih kalibracionih rastvora značajno bolja, sa vrednostima koeficijenta korelacije iznad 0,94, što se smatralo prihvatljivim, pogotovu imajući u vidu složenost matriksa.



Slika 4.4.4. Kalibracione krive kurkumina dobijene nakon obrade biološkog materijala metodom taloženja proteina

Dodatno su analizirani tačnost i preciznost između *run*-ova, a dobijeni rezultati su dati u **Tabeli 4.4.1.** Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da su vrednosti tačnosti i preciznosti blago odstupale od zahtevanih ($> \pm 15\%$) i to pre svega kod krvi. Međutim, uzimajući u obzir nedostatak linearnosti kod metode čvrsto-tečne ekstrakcije, metoda taloženja proteina acetonitrilom je odabrana za dalju analizu i korišćena za finalno prečišćavanje biološkog materijala sa kurkuminom u pilot studiji farmakokinetike.

Tabela 4.4.1. Tačnost i preciznost metode taloženja proteina acetonitrilom

Koncentracija (μM)	Biološki materijal	Tačnost (%)	Preciznost (%)
0,75	Krv	+22,66	+15,20
	Mozak	-5,88	+12,56
	Jetra	-4,81	+11,85
	Bubreg	+2,59	+4,98
1,5	Krv	-0,12	+4,57
	Mozak	-15,45	+10,96
	Jetra	-1,29	+4,66
	Bubreg	-8,27	+5,30
2,75	Krv	+6,01	+8,69
	Mozak	-10,97	+2,53
	Jetra	+4,90	+18,47
	Bubreg	-9,91	+7,12
3,25	Krv	-0,52	+17,07
	Mozak	+5,88	+3,39
	Jetra	+15,07	+7,35
	Bubreg	-3,71	+5,16

4.4.3. Farmakokinetička analiza

Inherentna fizičko-hemijska nestabilnost kurkumina čini čisto računski predviđanja njegove bioraspodivnosti veoma nepouzdanim (Nelson i sar., 2017). Situacija se dodatno komplikuje ako se ispituje raspoloživost kurkumina inkorporiranog u napredne sisteme za isporuku, kao što su PEGilovane nanoemulzije. U literaturi se mogu pronaći različiti podaci o vremenu praćenja *in vivo* sudbine kurkumina, tako da je u slučaju nanosuspenzija ona praćena samo 60 min (Bi i sar., 2017), ili maksimalno 24 h, kada je bio inkorporiran u nanonosače na bazi konjugata zein-polisulfobetaina (Chen i sar., 2020). Zato je bilo neophodno sprovesti pilot studiju farmakokinetike, pre svega kako bi se razjasnilo da li postoji razlika u koncentraciji kurkumina u različitim tkivima i organima 20 min ili 24 h nakon primene tretmana, ali i radi uspostavljanja vremenskog intervala tokom kojeg bi se kurkumin primenjen u formi odabranih formulacija mogao detektovati u biološkom materijalu. Može se videti da je koncentracija kurkumina u plazmi nakon 20 min bila trostruko veća kod PEGilovanih formulacija K21 i K51, u poređenju sa rastvorom kurkumina, i gotovo dva puta veća u odnosu na ne-PEGilovanu nanoemulziju KNPEG (**Tabela 4.4.2.**).

Tabela 4.4.2. Koncentracije kurkumina u plazmi, mozgu, jetri i bubrezima nakon intravenske primene 5mg/kg rastvora, ili odabranih nanoemulzija KNPEG, CP21 i CP51.

Formulacije	Vreme	Plazma	Mozak	Jetra	Bubrezi
		Koncentracija (ng/ml)	Koncentracija (ng/g)		
Rastvor	20 min	129,70 ± 20,91	108,07 ± 0,25	76,44 ± 5,05	145,67 ± 18,82
	24 h	32,92 ± 2,40	109,33 ± 3,36	74,64 ± 5,22	43,50 ± 2,68
KNPEG	20 min	255,39 ± 54,43	112,26 ± 0,02	68,01 ± 2,29	118,11 ± 60,63
	24 h	30,58 ± 6,10	109,46 ± 2,96	66,23 ± 3,25	45,62 ± 8,74
K21	20 min	398,33 ± 12,90	109,58 ± 1,31	84,48 ± 14,89	200,98 ± 93,20
	24 h	26,88 ± 4,04	107,57 ± 0,17	69,16 ± 2,37	44,01 ± 6,35
K51	20 min	339,69 ± 17,83	107,10 ± 0,67	68,79 ± 3,70	116,59 ± 30,12
	24 h	24,27 ± 0,45	107,90 ± 1,80	70,68 ± 2,05	44,71 ± 0,25

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± sd (n = 2)

Ovakav rezultat se može pripisati prisustvu PEGilovanih fosfolipida u formulacijama K21 i K51 koji pružaju sternu zaštitu od komponenata mononuklearnog fagocitnog sistema i omogućavaju produženu cirkulaciju nanoemulzionih kapi (Alayoubi i sar., 2013; Kandadi i sar., 2011). Sa druge strane, nakon 24 h nije bilo značajnih razlika između formulacija u izmerenoj koncentraciji kurkumina u plazmi, što je verovatna posledica njegove distribucije u ekstravaskularna tkiva i organe (**Tabela 4.4.2.**). Od posebnog interesa je bilo proučavanje distribucije kurkumina u mozak, budući da je on ciljno mesto delovanja u ovom istraživanju (Bhat i sar., 2019). Može se primetiti da se koncentracija kurkumina u mozgu postignuta nakon primene analiziranih formulacija nije značajno razlikovala posle 20 min ili 24 h (**Tabela 4.4.2.**). Potencijalno objašnjenje možda leži u činjenici da je maksimalna koncentracija dostignuta negde između ove dve vremenske tačke, tako da se ne može detektovati razlika u izabranim vremenskim tačkama. Slični rezultati su dobijeni i kod jetre. Ipak, treba uočiti da prividna ujednačenost merenih koncentracija kurkumina u mozgu, odnosno u jetri, može ukazati i na nedovoljnu robusnost na nivou tehnika pripreme uzoraka koji potiču iz ovih bioloških matriksa.

Kada je reč o bubrezima, može se primetiti da je izmerena koncentracija nakon 24 h najmanje dva puta niža u odnosu na vrednosti dobijene posle 20 min (**Tabela 4.4.2.**), za sve formulacije, što ukazuje da se maksimalna eliminacija polaznog jedinjenja desila u periodu koji predhodi tački od 24 h, što verovatno obuhvata procese redukcione metaboličke transformacije i konjugacije (Kotha i Luthria, 2019; Sharma i sar., 2005). Ova studija pokazuje da nanoemulzije, bilo PEGilovane ili ne, imaju potencijal da povećaju maksimalne koncentracije koje se mogu postići u cirkulaciji, što se verovatno ne odražava na brzinu eliminacije.

U zaključku, iako je studija potvrdila da su PEGilovane NE obećavajući nosači za isporuku kurkumina, treba sprovesti punu farmakokinetičku studiju, sa krajnjom vremenskom tačkom nešto kraćom od 24 h, kako bi se na osnovu izračunatih farmakokinetičkih parametara stekao detaljniji uvid u uticaj formulacija na *in vivo* sudbinu kurkumina nakon intravenske primene. Ipak, treba uočiti da je naša pilot studija i sa svoje strane ukazala na izazove u bioanalitici kurkumina, koji se sagledavaju u nekonzistentnosti rezultata koje su publikovale različite istraživačke grupe (Anand i sar., 2007; Nelson i sar., 2017).

5. ZAKLJUČAK

5.1. Zaključak prve faze eksperimentalnog rada

Prva faza istraživanja je bila posvećena razvoju parenteralnih nanoemulzija sa kurkuminom i proceni uticaja PEGilovanih fosfolipida na njihove karakteristike i dugoročnu stabilnost. Rastvorljivost kurkumina bila je najbolja u kombinaciji sojinog ulja i triglicerida srednje dužine lanca (1:4, *m/m*) tako da je ova kombinacija izabrana za masnu fazu formulacija. U formulacije je dodat i benzilalkohol, kao korastvarač, kako bi se postigao što veći sadržaj kurkumina. Lecitin soje je korišćen kao glavni stabilizator, dok su polisorbit 80 i natrijum oleat dodati kao kostabilizatori. Imajući u vidu put primene, u formulacije je dodat i glicerol kao sredstvo za podešavanje toničnosti, dok je zbog održavanja bolje dugotrajne stabilnosti kurkumina, pH podešen na oko 7 pomoću razblaženog rastvora hlorovodonične kiseline.

Kako bi se odabrali adekvatni uslovi za izradu PEGilovanih nanoemulzija analiziran je uticaj procesnih parametara homogenizacije pod visokim pritiskom (pritisak i broj ciklusa), kao i vrste i koncentracije PEGilovanih fosfolipida metodom eksperimentalnog dizajna. Pomoću ove metode je procenjen uticaj, ne samo individualnih faktora, već i njihovih interakcija na kritične attribute kvaliteta nanoemulzija – veličinu i raspodelu veličine kapi. Utvrđeno je da su na veličinu kapi (*Z-ave*) uticali svi analizirani faktori, ali da je uticaj procesnih parametara bio značajniji od faktora formulacije, dok su na raspodelu veličine (PDI) uticali pre svega pritisak homogenizacije i koncentracija PEGilovanih fosfolipida. Dodatno je pokazano da na analizirane parametre utiču i interakcije između faktora. Primenjena numerička optimizacija je pokazala da oba analizirana PEGilovana fosfolipida (PEG2000-DSPE i PEG5000-DPPE) u obe koncentracije (0,1 %/0,3 %) daju formulacije adekvatnog kvaliteta, dok je za najmanju veličinu i raspodelu veličina kapi preporučeno da se koristi pritisak od 800 bar i 10 ciklusa homogenizacije.

Na osnovu rezultata eksperimentalnog dizajna pripremljene su PEGilovane nanoemulzije sa kurkuminom. Prosečna veličina kapi svih nanoemulzija je bila između 101 i 108 nm, sa uskom raspodelom veličina (PDI < 0,15), apsolutnim vrednostima ZP većim od 30 mV, pH između 6,76 i 6,89, i viskozitetom između 23 i 46 mPa*s, što zajedno sa blagom hipertoničnošću ukazuje na pogodnost za parenteralnu primenu. Ove vrednosti uglavnom se nisu značajno promenile tokom dve godine čuvanja formulacija na sobnoj temperaturi, ali su promene bile izraženije kod ne-PEGilovane u odnosu na PEGilovanu formulaciju. Dobijeni rezultati su ukazali na adekvatnost razvijenih nanoemulzija kao sistema za očuvanje stabilnosti kurkumina, što je potvrđeno i merenjem sadržaja kurkumina i veličine kapi tehnikom laserske difrakcije.

Mikroskopske tehnike karakterizacije su omogućile direktnu vizuelizaciju kapi. Kod analize formulacija optičkom mikroskopijom nisu uočeni kristali kurkumina nakon dve godine čuvanja, dok je skenirajućom elektronskom mikroskopijom vizuelizovan omotač polietilenglikola oko kapi placebo nanoemulzija. Mikroskopija atomskih sila je pružila dodatni uvid u raspodelu veličine i morfologiju kapi nanoemulzija sa kurkuminom, gde su formulacije sa PEG2000-DSPE bile bolje definisane u odnosu na nanoemulzije pripremljene sa PEG5000-DPPE, što potencijalno ukazuje na formiranje jačeg stabilizacionog sloja sa ovom vrstom PEG-ilovanog fosfolipida. Kristali kurkumina nisu detektovani ni ovom metodom, što dodatno potvrđuje uticaj formulacija na njegovu stabilizaciju.

Sprovedeni antioksidativni testovi su pokazali očuvanje antioksidativne aktivnosti kurkumina tokom čuvanja. DPPH test je pokazao da formulacije imaju veću antioksidativnu aktivnost, odnosno niže IC50 vrednosti, u poređenju sa čistim kurkuminom, što je verovatno posledica dodatka butilhidroksitoluena koji je dodat radi obezbeđivanja oksidativne stabilnosti lecitina

tokom čuvanja. FRAP test, u kome je struktura kapi očuvana, takođe je pokazao dobru antioksidativnu aktivnost formulacija.

Analizom oslobađanja je pokazano da nanoemulzije usporavaju oslobađanje kurkumina u odnosu na rastvor, što je predstavljalo potvrdu njegove inkorporacije u kapi. Tokom prvih 60 min testa PEGilovanje je dodatno usporilo oslobađanje, zbog zaštitnog sloja formiranog od lanaca PEG. Povećanje koncentracije PEGilovanih fosfolipida nije značajno uticalo na oslobađanje kurkumina iz formulacija. Oslobađanje kurkumina iz PEGilovanih nanoemulzija se najbolje opisuje kinetikom nultog reda, što ukazuje na zadržavanje strukture kapi tokom analize, dok konstante brzine oslobađanja potvrđuju sporije oslobađanje kurkumina iz formulacija sa PEG2000-DSPE u poređenju sa PEG5000-DPPE, što potencijalno ukazuje na građenje čvršćeg stabilizacionog sloja sa PEG2000-DSPE. Analize sprovedene u ovoj fazi istraživanja pokazuju da su razvijene PEGilovane nanoemulzije adekvatni sistemi za parenteralnu isporuku i dugotrajno očuvanje stabilnosti kurkumina.

5.2. Zaključak druge faze eksperimentalnog rada

U drugoj fazi eksperimentalnog rada je pokazano da riblje ulje može zameniti sojino u masnoj fazi formulacija, bez uticaja na sadržaj kurkumina, zbog slične rastvorljivosti kurkumina u obe masne faze. Karakterizacija stabilizacionog sloja metodom elektron paramagnetne rezonantne spektroskopije, pomoću tri različite spinske probe, je pokazala da izbor masne faze značajno utiče na karakteristike nanoemulzija. Dodatno, ova ispitivanja su pokazala da dodatak kurkumina ima različit efekat u zavisnosti od sastava masne faze. U slučaju nanoemulzija sa sojinim uljem dolazi do smanjenja rotaciono korelacionog vremena τ_R , što znači da dodatak kurkumina dovodi do formiranja manje rigidnog stabilizacionog sloja, dok u slučaju formulacija sa ribljim uljem dodatak kurkumina dovodi do porasta τ_R vrednosti, odnosno nastanka čvršćeg stabilizacionog sloja. Takođe, kurkumin je u formulacijama sa ribljim uljem distribuiran po celom stabilizacionom sloju, dok je kod formulacija sa sojinim uljem smešten u delu bližem vodenoj fazi. Kod nanoemulzija sa ribljim uljem dolazi do povećanja vrednosti parametra reda S , što se može objasniti smanjenjem veličine kapi nakon dodavanja kurkumina i posledično veće zakrivljenosti stabilizacionog sloja, a smanjenje konstante izotropnog hiperfinog sprezanja, α_N je u skladu sa inkorporiranjem hidrofobnog molekula kao što je kurkumin. Analiza efikasnosti inkapsulacije je pokazala da je više od 99 % kurkumina vezano za masnu fazu formulacija.

Eksperimentalni dizajn je pokazao da su na veličinu kapi, po opadajućem redosledu uticali: prisustvo kurkumina, vrsta masne faze, vrsta PEGilovanog fosfolipida i njihova koncentracija. Izbor masne faze je imao antagonistički efekat na Z -ave, što znači da su nanoemulzije sa ribljim uljem imale manju veličinu kapi u poređenju sa formulacijama sa sojinim uljem. Vrsta i koncentracija PEGilovanih fosfolipida su imali sinergistički uticaj na Z -ave, što znači da su manje kapi dobijene sa PEG2000-DSPE, dok je povećanje njihove koncentracije dovelo do stvaranja većih kapi. Sa druge strane, na PDI su od individualnih faktora značajno uticali samo vrsta i koncentracija PEGilovanih fosfolipida, s tim što je vrsta imala izraženiji, i to antagonistički efekat, što znači da se manje PDI vrednosti mogu postići sa PEG5000-DPPE umesto PEG2000-DSPE. Na veličinu kapi značajno utiču i interakcije između vrste i koncentracije PEG-ilovanih fosfolipida, kao i između koncentracije PEG-FL i prisustva kurkumina. Za razliku od veličine, na distribuciju kapi prevashodno utiču različite interakcije između faktora: vrste PEG-FL i prisustva kurkumina, vrste i koncentracije PEG-FL, koncentracije PEG-FL i vrste masne faze i između koncentracije PEG-FL i prisustva kurkumina, što znači da se za dobijanje uske raspodele veličine kapi formulacioni faktori moraju posebno razmotriti u zavisnosti od odabira masne faze. Dizajn eksperimenata je pokazao da prisustvo kurkumina dovodi do smanjenja veličine kapi, a zajedno sa nalazima

EPR strukturne analize ukazuje da njegovo prisustvo u stabilizacionom sloju povećava stabilnost nanoemulzija. Dodatno je potvrđen i uticaj odabira masne faze na Z-ave, što se može pripisati sastavu masnih kiselina, a posebno oleinskoj kiselini, koja je prisutna u višoj koncentraciji u sojinom ulju, a koja služi kao dodatni stabilizator nanoemulzija.

Izmerene vrednosti fizičko-hemijskih parametara: veličine kapi (< 200 nm), indeksa polidisperznosti ($< 0,2$), zeta potencijala (oko -30 mV do -40 mV), pH (oko 7,4) i provodljivosti (oko $180 \mu\text{S}/\text{cm}$), ukazuju na pogodnost ovih nanoemulzija za parenteralnu primenu. Prisustvo PEGilovanih fosfolipida i kurkumina je doprinelo boljoj stabilnosti formulacija nakon 2 godine čuvanja na sobnoj temperaturi. Budući da je kod formulacija sa ribljim uljem došlo do većeg pada pH vrednosti u poređenju sa formulacijama sa sojinim uljem, ali i da je metodom laserske difrakcije pokazano da su se kod nekih formulacija sa ribljim uljem tokom čuvanja javile veće kapi, zaključeno je da je stabilnost formulacija sa sojinim uljem bila bolja. Sadržaj kurkumina nije se značajno promenio tokom čuvanja, kao ni efikasnost PEGilovanja, koja je bila veća od 99 % kod svih nanoemulzija.

Mikroskopija atomskih sila je u uzorku ne-PEGilovane nanoemulzije kurkumina sa ribljim uljem pokazala prisustvo kapi veličine oko 100 nm, dok su se nakon dodatka 0,1 % PEG2000-DSPE mogle videti samo kapi veličine oko 300 nm, verovatno zbog uticaja postupka sušenja, dok su analizirane formulacije sa sojinim uljem imale sličan, izdužen oblik i veličinu oko 100 nm. Mikrografije snimljene na polarizacionom mikroskopu nisu pokazale prisustvo kurkumina ni nakon 2 godine čuvanja na sobnoj temperaturi, što je dodatno potvrdilo stabilnost razvijenih formulacija.

DPPH i FRAP testovi su pokazali da je antioksidativna aktivnost formulacija sa kurkuminom očuvana tokom dve godine skladištenja, pri čemu je FRAP analiza pokazala da je ova aktivnost porasla tokom čuvanja, što je verovatno posledica metodologije testa, odnosno određivanja antioksidativne aktivnosti u odnosu na respektivna placebo kao slepe probe. Studije *in vitro* oslobađanja su pokazale da se kurkumin brže oslobađa iz formulacija sa ribljim uljem, bilo da se radi o PEGilovanim ili ne-PEGilovanim nanoemulzijama, verovatno zbog većeg uticaja kurkumina u stabilizaciji formulacija sa ribljim uljem, kako je i pokazano prethodnim analizama. Povećanje koncentracije PEGilovanih fosfolipida je imalo efekat na oslobađanje kurkumina iz formulacija sa ribljim uljem, ali ne i na nanoemulzije sa sojinim uljem, što možda ukazuje da je za adekvatnu zaštitu površine kapi formulacija dovoljna najniža koncentracija PEGilovanih fosfolipida od 0,1 %. U oslobađanje kurkumina iz formulacija sa ribljim uljem je verovatno uključeno više različitih mehanizama, budući da je vrednost koeficijenta determinacije bila veća od 0,99 za veći broj analiziranih modela.

Dodatkom PEGilovanih fosfolipida raste i viskozitet formulacija, što znači da je za njihovo injektovanje bila potrebna veća sila u poređenju sa ne-PEGilovanim formulacijama, u razvijenom testu simulacije injektabilnosti kod intravenske primene. Dobijeni rezultati pokazuju da sve razvijene formulacije imaju adekvatan viskozitet i injektabilnost za intravensku primenu, ali i da je za optimalnu podnošljivost preporučljivo da viskozitet formulacija bude manji od $20 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. Iako je pokazano da dodatak kurkumina i PEGilovanje deluju kao značajni stabilizatori formulacija sa ribljim uljem, njegov dodatak ne povećava antioksidativnu aktivnost formulacija, pa je zbog veće stabilnosti u daljim istraživanjima prednost data formulacijama sa sojinim uljem.

5.3. Zaključak treće faze eksperimentalnog rada

U trećoj fazi istraživanja su primenjene različite metode u cilju procene vezivanja PEG2000-DSPE za nanoemulzije kapi i određivanje efikasnosti PEGilovanja, odnosno koncentracije kojom se postiže optimalna zaštita površine kapi. Metoda diferencijalne skenirajuće

kalorimetrije je pokazala da je i najveća analizirana koncentracija PEGilovanog fosfolipida od 0,6 % inkorporirana u nanoemulzione kapi, ali pojava dodatnog pika kod osušenog uzorka ove formulacije ukazuje na drugačiji način solubilizacije. FTIR analiza je kod istog uzorka detektovala pojavu novog pika, što ukazuje na formiranje nove veze.

EPR analiza je pokazala da dodavanje 0,1 %, 0,3 % ili 0,6 % PEG2000-DSPE dovodi do povećanja rotaciono korelacionog vremena u poređenju sa ne-PEGilovanom nanoemulzijom, što znači da PEGilovanje povećava rigidnost stabilizacionog sloja. Međutim, povećanjem koncentracije PEG2000-DSPE, τ_R vrednosti opadaju, a posebno je zanimljivo da su za 5-DSA probu one bile najniže kod formulacije sa 0,6 % PEG-FL, što verovatno znači da je sa 0,3 % PEG2000-DSPE postignuta potpuna pokrivenost površine kapi. Dodavanje PEG2000-DSPE nije imalo uticaja na rotaciono korelaciono vreme (τ_R), parametar reda (S) i konstantu izotropno hiperfinog sprezanja (α_N) proba 12-DSA i 16-DSA na dubinama stabilizacionog sloja koje ove probe karakterišu, što znači da PEG2000-DSPE ne prodire dublje, već se zadržava u regionima bližim površini kapi. Dakle, na dinamiku stabilizacionog sloja nanoemulzija, opisanu parametrima τ_R , S i α_N , prisustvo PEGilovanog fosfolipida utiče u delu kapi koji je blizu vodenog interfejsa, dok je unutrašnji deo kapi ostao nepromenjen.

Analizom vezivanja BSA tehnikom dinamičkog rasipanja svetlosti, utvrđeno je da se veličina kapi (Z -ave) i indeks polidisperznosti (PDI) NE nisu značajno promenili tokom 24 časa inkubacije u čistom PBS, ali je kod ne-PEGilovane nanoemulzije došlo do povećanja veličine kapi već nakon 0,5 h inkubacije, što ukazuje na visok afinitet nedekorirane površine kapi ka vezivanju albumina. PEGilovanje je uticalo na vezivanje albumina na koncentraciono zavisni način, tako da je najmanje vezivanje uočeno kod formulacije sa najnižom koncentracijom PEG2000-DSPE, dok kod većih koncentracija, u praćenom vremenskom periodu, nije došlo do vezivanja. PDI vrednosti su bile značajno veće u medijumu sa BSA u poređenju sa čistim PBS u svim vremenskim tačkama, što je posledica prisustva dodatne populacije veličine čestica u vidu albumina. Snimljeni apsorpcioni spektri formulacija nakon inkubacije u medijumu sa proteinom su takođe potvrdili vezivanje albumina za površinu kapi, naročito kod ne-PEGilovane nanoemulzije, dok su kod PEGilovanih formulacija ove promene bile znatno manje izražene, što ukazuje na niži stepen vezivanja proteina. Mikroskopija atomskim silama je dodatno potvrdila prethodne nalaze.

Inicijalna merenja nakon inkubacije formulacija u 10% (v/v) FBS su pokazala veće razlike u veličini i raspodeli veličine kapi kod PEGilovanih, u odnosu na ne-PEGilovanu formulaciju, premda ove promene nisu bile toliko izražene kao kod medijuma sa BSA, verovatno zbog niže koncentracije proteina. Kod ne-PEGilovane formulacije veličina kapi postepeno se povećava tokom prvog sata, pri čemu je to povećanje najizraženije nakon 24 časa. Kod PEGilovanih NE je izostalo vezivanje proteina, što se manifestovalo nedostatkom rasta veličine kapi. Zbog prisustva kapi različite veličine, PDI je nakon inkubacije u medijumu sa FBS bila veća za sve formulacije u poređenju sa vrednostima dobijenim nakon inkubacije u čistom PBS. Apsorpcioni spektri NE nakon inkubacije u proteinskom medijumu ukazuju na interakcije sa komponentama FBS, mada pojava različitih pikova ukazuje da proteini zauzimaju drugačije konformacije nakon inkubacije sa različitim formulacijama. AFM mikrofografije formulacija nakon inkubacije u medijumu sa FBS su pokazale neke veće strukture u odnosu na one snimljene nakon inkubacije sa BSA, što je u skladu sa kompleksnim sadržajem seruma. Ipak, ova metoda nije bila od velikog značaja u otkrivanju ostvarene efikasnosti PEGilovanja, verovatno zbog kompleksnosti samog medijuma.

Prilikom analize oslobađanja kurkumina iz NE inkubiranih u medijumu sa FBS, najveći stepen oslobađanja kurkumina je uočen kod ne-PEGilovane formulacije, što ukazuje da komponente FBS narušavaju sposobnost neobloženog stabilizacionog sloja u zadržavanju

supstance. S druge strane, nedostatak značajnih razlika u količini kurkumina oslobođenog iz formulacija sa 0,1 % i 0,6 % PEG2000-DSPE ukazuje da je sa najnižom koncentracijom PEG-FL ostvarena određena zaštita površine kapi. U slučaju nanoemulzije sa 0,6 % PEG2000-DSPE dobijeni rezultati bi se verovatno mogli objasniti delimičnom ugradnjom kurkumina u micelle formirane u višku agensa za PEGilovanje, dok najsporije oslobađanje kurkumina iz formulacija sa 0,3 % PEG-FL ukazuje na dostizanje optimalne efikasnosti PEGilovanja. Modelovanje dobijenih podataka oslobađanja ukazuje da je oslobađanje kurkumina iz ne-PEGilovane formulacije uslovljeno sa više različitih fenomena, što je važno i za PEGilovane nanoemulzije.

5.4. Zaključak četvrte faze eksperimentalnog rada

Ispitivanja na MRC-5 ćelijskoj liniji su pokazala da su analizirane formulacije, bilo placebo ili sa kurkuminom imale zadovoljavajuću neškodljivost, dok se citotoksični efekat dobijen pri korišćenju većih koncentracija nanoemulzija mogao objasniti dodatkom benzilalkohola. Efikasnost formulacija je potvrđena na ćelijskoj liniji LS-174, a njihov slabiji uticaj u odnosu na čist kurkumin je verovatno posledica njegovog inkorporiranja u kapi, čime se oslobađanje odlaže. Neškodljivost formulacija je potvrđena i u testu hemotoksičnosti gde su zadovoljavajući rezultati dobijeni za sve formulacije. Interesantno je da je procenat hemolize bio veći kod ne-PEGilovane formulacije, verovatno zato što lanci PEG izoluju površinu kapi. Ovaj test je bio posebno značajan zato što se u njemu simuliraju uslovi pri *in vivo* primeni formulacija.

Od analiziranih metoda za finalnu obradu biološkog materijala sa kurkuminom, odnosno, supernatanata homogenizata tkiva metoda čvrsto-tečne ekstrakcije se nije pokazala adekvatnom, bez obzira na korišćeni agens za zakišeljavanje. Sa druge strane, metoda taloženja proteina acetonitrilom je imala zadovoljavajuće vrednosti linearnosti, tačnosti i preciznosti. Pilot studija farmakokinetike je pokazala da se nakon 20 min postiže veća koncentracija kurkumina u plazmi primenom PEGilovanih formulacija u poređenju sa ne-PEGilovanom formulacijom i rastvorom. Kod mozga i jetre nisu uočene razlike, verovatno zato što u analiziranim vremenskim tačkama nije došlo do distribucije kurkumina u date organe, ili je on već eliminisan. Ujednačenost merenih koncentracija u ovim matriksima može ukazati i na nedovoljnu robusnost na nivou tehnika pripreme uzoraka. Kod bubrega su takođe uočene razlike u koncentraciji kurkumina nakon 24 h, verovatno zato što metabolizam i ekskrecija kreću ubrzo nakon primene formulacija. Sprovedena pilot studija je dodatno ukazala na izazove u bioanalitici kurkumina. Za detaljnu procenu efekta PEGilovanja na biološku sudbinu kurkumina potrebno je sprovesti punu studiju farmakokinetike.

5.5. Opšti zaključak

Predstavljeni rezultati ove disertacije ukazuju da parenteralne nanoemulzije mogu da budu adekvatan sistem za isporuku i održavanje dugoročne stabilnosti kurkumina. Dodatak PEGilovanih fosfolipida je povećao stabilnost formulacija, bez ugrožavanja fizičko-hemijskih karakteristika nanoemulzija, a njihov dodatak je bio posebno značajan kod formulacija sa ribljim uljem. Posebna pažnja je posvećena odabiru koncentracije PEGilovanih fosfolipida sa kojima se postiže adekvatna zaštita površine kapi, što je značajno sa aspekta njihove efikasnosti i bezbednosti. U tu svrhu je korišćena strukturna analiza i različite metode procene interakcija sa proteinima. Na kraju je neškodljivost i efikasnost formulacija potvrđena eksperimentima na odabranim ćelijskim linijama, dok je pilot studija farmakokinetike uputila na efikasnost PEGilovanja u postizanju povećane koncentracije kurkumina nakon primene u animalnim modelima. Za punu procenu doprinosa PEGilovanja u unapređenju bioraspodivnosti kurkumina potrebno je sprovesti punu studiju farmakokinetike, što i predstavlja sledeći korak u istraživanju.

6. LITERATURA

- Ahmad, G., Gattacecca, F., El Satta, R., Botchkina, G., Ojima, I., Egan, J., Amiji, M., 2018. Biodistribution and Pharmacokinetic Evaluations of a Novel Taxoid DHA-SBT-1214 in an Oil-in-Water Nanoemulsion Formulation in Naïve and Tumor-Bearing Mice. *Pharm. Res.* 35, 91. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2349-x>
- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem. Biol. Interact.* 174, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.003>
- Alayoubi, A., Alqahtani, S., Kaddoumi, A., Nazzal, S., 2013. Effect of PEG Surface Conformation on Anticancer Activity and Blood Circulation of Nanoemulsions Loaded with Tocotrienol-Rich Fraction of Palm Oil. *AAPS J.* 15, 1168–1179. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9525-z>
- Amin, K., Dannenfelser, R.-M., 2006. In vitro hemolysis: Guidance for the pharmaceutical scientist. *J. Pharm. Sci.* 95, 1173–1176. <https://doi.org/10.1002/jps.20627>
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A., Aggarwal, B.B., 2007. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Mol. Pharm.* 4, 807–818. <https://doi.org/10.1021/mp700113r>
- Aswathanarayan, J.B., Vittal, R.R., 2019. Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. *Front. Sustain. Food Syst.* 3, 95. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00095>
- Avramiotis, S., Papadimitriou, V., Hatzara, E., Bekiari, V., Lianos, P., Xenakis, A., 2007. Lecithin Organogels Used as Bioactive Compounds Carriers. A Microdomain Properties Investigation. *Langmuir* 23, 4438–4447. <https://doi.org/10.1021/la0634995>
- Babaei, F., Nassiri-Asl, M., Hosseinzadeh, H., 2020. Curcumin (a constituent of turmeric): New treatment option against COVID-19. *Food Sci. Nutr.* 8, 5215–5227. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1858>
- Bhat, A., Mahalakshmi, A.M., Ray, B., Tuladhar, S., Hediya, T.A., Manthiannem, E., Padamati, J., Chandra, R., Chidambaram, S.B., Sakharkar, M.K., 2019. Benefits of curcumin in brain disorders. *BioFactors* 45, 666–689. <https://doi.org/10.1002/biof.1533>
- Bhattacharjee, S., 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Controlled Release* 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bi, C., Miao, X.Q., Chow, S.F., Wu, W.J., Yan, R., Liao, Y.H., Chow, A.H.-L., Zheng, Y., 2017. Particle size effect of curcumin nanosuspensions on cytotoxicity, cellular internalization, in vivo pharmacokinetics and biodistribution. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 13, 943–953. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.11.004>
- Calder, P.C., Waitzberg, D.L., Klek, S., Martindale, R.G., 2020. Lipids in Parenteral Nutrition: Biological Aspects. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 44. <https://doi.org/10.1002/jpen.1756>
- Cascone, S., 2017. Modeling and comparison of release profiles: Effect of the dissolution method. *Eur. J. Pharm. Sci.* 106, 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.021>
- Chang, Y.-S., Wu, C.-L., Tseng, S.-H., Kuo, P.-Y., Tseng, S.-Y., 2008. In vitro benzyl alcohol cytotoxicity: Implications for intravitreal use of triamcinolone acetonide. *Exp. Eye Res.* 86, 942–950. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.03.011>
- Chen, S., Li, Q., Li, H., Yang, L., Yi, J.-Z., Xie, M., Zhang, L.-M., 2020. Long-circulating zein-polysulfobetaine conjugate-based nanocarriers for enhancing the stability and pharmacokinetics of curcumin. *Mater. Sci. Eng. C* 109, 110636. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110636>
- Chen, X., Zou, L.-Q., Niu, J., Liu, W., Peng, S.-F., Liu, C.-M., 2015. The Stability, Sustained Release and Cellular Antioxidant Activity of Curcumin Nanoliposomes. *Molecules* 20, 14293–14311. <https://doi.org/10.3390/molecules200814293>

- Cheng, Y., Liu, M., Hu, H., Liu, D., Zhou, S., 2016. Development, Optimization, and Characterization of PEGylated Nanoemulsion of Prostaglandin E1 for Long Circulation. *AAPS PharmSciTech* 17, 409–417. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0366-1>
- Chirio, D., Peira, E., Dianzani, C., Muntoni, E., Gigliotti, C., Ferrara, B., Sapino, S., Chindamo, G., Gallarate, M., 2019. Development of Solid Lipid Nanoparticles by Cold Dilution of Microemulsions: Curcumin Loading, Preliminary In Vitro Studies, and Biodistribution. *Nanomaterials* 9, 230. <https://doi.org/10.3390/nano9020230>
- Chong, W.-T., Tan, C.-P., Cheah, Y.-K., B. Lajis, A.F., Habi Mat Dian, N.L., Kanagaratnam, S., Lai, O.-M., 2018. Optimization of process parameters in preparation of tocotrienol-rich red palm oil-based nanoemulsion stabilized by Tween80-Span 80 using response surface methodology. *PLOS ONE* 13, e0202771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202771>
- Chuacharoen, T., Prasongsuk, S., Sabliov, C.M., 2019. Effect of Surfactant Concentrations on Physicochemical Properties and Functionality of Curcumin Nanoemulsions Under Conditions Relevant to Commercial Utilization. *Molecules* 24, 2744. <https://doi.org/10.3390/molecules24152744>
- Cilurzo, F., Selmin, F., Minghetti, P., Adami, M., Bertoni, E., Lauria, S., Montanari, L., 2011. Injectability Evaluation: An Open Issue. *AAPS PharmSciTech* 12, 604–609. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9625-y>
- Clogston, J.D., Patri, A.K., 2011. Zeta Potential Measurement, in: McNeil, S.E. (Ed.), *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 63–70. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6
- Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), 2020. Guideline on the quality of water for pharmaceutical use.
- Community herbal monograph on *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. (*C. xanthorrhiza* D. Dietrich), rhizoma, n.d.
- Costa, P., Sousa Lobo, J.M., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 123–133. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- Culler, M.D., Inchingolo, R., McClements, D.J., Decker, E.A., 2021. Impact of Polyunsaturated Fatty Acid Dilution and Antioxidant Addition on Lipid Oxidation Kinetics in Oil/Water Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 69, 750–755. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06209>
- Czerniel, J., Gostyńska, A., Jańczak, J., Stawny, M., 2023. A critical review of the novelties in the development of intravenous nanoemulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 191, 36–56. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.08.009>
- De Andrade, D.F., Zuglianello, C., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Beck, R.C.R., 2015. Assessing the In Vitro Drug Release from Lipid-Core Nanocapsules: a New Strategy Combining Dialysis Sac and a Continuous-Flow System. *AAPS PharmSciTech* 16, 1409–1417. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0330-0>
- Demisli, S., Mitsou, E., Pletsa, V., Xenakis, A., Papadimitriou, V., 2020. Development and Study of Nanoemulsions and Nanoemulsion-Based Hydrogels for the Encapsulation of Lipophilic Compounds. *Nanomaterials* 10, 2464. <https://doi.org/10.3390/nano10122464>
- Deshpande, D., Janero, D.R., Amiji, M., 2013. Engineering of an ω -3 polyunsaturated fatty acid-containing nanoemulsion system for combination C6-ceramide and 17 β -estradiol delivery and bioactivity in human vascular endothelial and smooth muscle cells.

- Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med. 9, 885–894.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.02.007>
- Devalapally, H., Zhou, F., McDade, J., Goloverda, G., Owen, A., Hidalgo, I.J., Silchenko, S., 2015. Optimization of PEGylated nanoemulsions for improved pharmacokinetics of BCS class II compounds. *Drug Deliv.* 22, 467–474.
<https://doi.org/10.3109/10717544.2013.869275>
- Dibaei, M., Rouini, M.-R., Sheikholeslami, B., Gholami, M., Dinarvand, R., 2019. The effect of surface treatment on the brain delivery of curcumin nanosuspension: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Nanomedicine Volume 14*, 5477–5490.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S199624>
- Đorđević, S.M., Cekić, N.D., Savić, M.M., Isailović, T.M., Randelović, D.V., Marković, B.D., Savić, S.R., Stamenić, T.T., Daniels, R., Savić, S.D., 2015. Parenteral nanoemulsions as promising carriers for brain delivery of risperidone: Design, characterization and in vivo pharmacokinetic evaluation. *Int. J. Pharm.* 493, 40–54.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.007>
- Drescher, S., Van Hoogevest, P., 2020. The Phospholipid Research Center: Current Research in Phospholipids and Their Use in Drug Delivery. *Pharmaceutics* 12, 1235.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121235>
- D'souza, A.A., Shegokar, R., 2016. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* 13, 1257–1275.
<https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>
- Đorđević, S.M., Radulović, T.S., Cekić, N.D., Randelović, D.V., Savić, M.M., Krajišnik, D.R., Milić, J.R., Savić, S.D., 2013. Experimental Design in Formulation of Diazepam Nanoemulsions: Physicochemical and Pharmacokinetic Performances. *J. Pharm. Sci.* 102, 4159–4172. <https://doi.org/10.1002/jps.23734>
- Elsewedy, H.S., Aldhubiab, B.E., Mahdy, M.A., Elnahas, H.M., 2021. Brucine PEGylated nanoemulsion: In vitro and in vivo evaluation. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 608, 125618. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125618>
- Eric, Drexler K., 1986. *Engines of Creation. The Coming Era of Nanotechnology.* Anchor book.
- Esson, M.M., Mecozzi, S., 2020. Preparation, Characterization, and Formulation Optimization of Ionic-Liquid-in-Water Nanoemulsions toward Systemic Delivery of Amphotericin B. *Mol. Pharm.* 17, 2221–2226.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00809>
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2023. . EDQM, S.I.
- Ezzat, A.A., Tammam, S.N., Hanafi, R.S., Rashad, O., Osama, A., Abdelnaby, E., Magdeldin, S., Mansour, S., 2022. Different Serum, Different Protein Corona! The Impact of the Serum Source on Cellular Targeting of Folic Acid-Modified Chitosan-Based Nanoparticles. *Mol. Pharm.* 19, 1635–1646.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00108>
- Farjadian, F., Ghasemi, A., Gohari, O., Roointan, A., Karimi, M., Hamblin, M.R., 2019. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. *Nanomed.* 14, 93–126. <https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0120>
- Feng, T., Wei, Y., Lee, R., Zhao, L., 2017. Liposomal curcumin and its application in cancer. *Int. J. Nanomedicine Volume 12*, 6027–6044. <https://doi.org/10.2147/IJN.S132434>
- Floury, J., Desrumaux, A., Lardières, J., 2000. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1, 127–134. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00012-6)

- Floyd, A.G., 1999. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2, 134–143. [https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(99\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(99)00141-8)
- Ganta, S., Amiji, M., 2009. Coadministration of Paclitaxel and Curcumin in Nanoemulsion Formulations To Overcome Multidrug Resistance in Tumor Cells. *Mol. Pharm.* 6, 928–939. <https://doi.org/10.1021/mp800240j>
- Ganta, S., Sharma, P., Paxton, J.W., Baguley, B.C., Garg, S., 2010. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorambucil delivered in long-circulating nanoemulsion. *J. Drug Target.* 18, 125–133. <https://doi.org/10.3109/10611860903244199>
- Ganta, S., Talekar, M., Singh, A., Coleman, T.P., Amiji, M.M., 2014. Nanoemulsions in Translational Research—Opportunities and Challenges in Targeted Cancer Therapy. *AAPS PharmSciTech* 15, 694–708. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0088-9>
- Germain, M., Caputo, F., Metcalfe, S., Tosi, G., Spring, K., Åslund, A.K.O., Pottier, A., Schiffelers, R., Ceccaldi, A., Schmid, R., 2020. Delivering the power of nanomedicine to patients today. *J. Controlled Release* 326, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.007>
- Gulati, N., Gupta, H., 2011. Parenteral Drug Delivery: A Review. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 5, 133–145. <https://doi.org/10.2174/187221111795471391>
- Han, Y., Chu, X., Cui, L., Fu, S., Gao, C., Li, Y., Sun, B., 2020. Neuronal mitochondria-targeted therapy for Alzheimer's disease by systemic delivery of resveratrol using dual-modified novel biomimetic nanosystems. *Drug Deliv.* 27, 502–518. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1745328>
- Hao, M., Ji, Y., Wang, Y., Chen, Y., 2019. AFM Study of Temperature and pH Effects on BSA Structure and Adhesion, in: 2019 IEEE International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale (3M-NANO). Presented at the 2019 IEEE International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale (3M-NANO), IEEE, Zhenjiang, China, pp. 333–336. <https://doi.org/10.1109/3M-NANO46308.2019.8947371>
- Harris, J.M., Chess, R.B., 2003. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 214–221. <https://doi.org/10.1038/nrd1033>
- Harun, S., Amin Nordin, S., Abd Gani, S.S., Shamsuddin, A.F., Basri, M., Bin Basri, H., 2018. Development of nanoemulsion for efficient brain parenteral delivery of cefuroxime: designs, characterizations, and pharmacokinetics. *Int. J. Nanomedicine* Volume 13, 2571–2584. <https://doi.org/10.2147/IJN.S151788>
- Hatzara, E., Karatza, E., Avramiotis, S., Xenakis, A., 2004. Spectroscopic mobility probing studies of lecithin organogels, in: Miguel, M., Burrows, H.D. (Eds.), *Trends in Colloid and Interface Science XVI*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 94–97. https://doi.org/10.1007/978-3-540-36462-7_22
- Hidajat, M.J., Jo, W., Kim, H., Noh, J., 2020. Effective Droplet Size Reduction and Excellent Stability of Limonene Nanoemulsion Formed by High-Pressure Homogenizer. *Colloids Interfaces* 4, 5. <https://doi.org/10.3390/colloids4010005>
- Hörmann, K., Zimmer, A., 2016. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions — A review. *J. Controlled Release* 223, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.016>
- Hu, Y., Gaillard, P.J., de Lange, E.C.M., Hammarlund-Udenaes, M., 2019. Targeted brain delivery of methotrexate by glutathione PEGylated liposomes: How can the formulation make a difference? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 139, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.04.004>
- Hubrecht, Carter, 2019. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals* 9, 754. <https://doi.org/10.3390/ani9100754>

- Ilić, T., Đoković, J.B., Nikolić, I., Mitrović, J.R., Pantelić, I., Savić, S.D., Savić, M.M., 2023. Parenteral Lipid-Based Nanoparticles for CNS Disorders: Integrating Various Facets of Preclinical Evaluation towards More Effective Clinical Translation. *Pharmaceutics* 15, 443. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020443>
- Kakkar, V., Singh, S., Singla, D., Kaur, I.P., 2011. Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 495–503. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000310>
- Kalaitzaki, A., Emo, M., Stébé, M.J., Xenakis, A., Papadimitriou, V., 2013. Biocompatible nanodispersions as delivery systems of food additives: A structural study. *Food Res. Int.* 54, 1448–1454. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.010>
- Kalogianni, E.P., Sklaviadis, L., Nika, S., Theochari, I., Dimitreli, G., Georgiou, D., Papadimitriou, V., 2017. Effect of oleic acid on the properties of protein adsorbed layers at water/oil interfaces: An EPR study combined with dynamic interfacial tension measurements. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 158, 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.022>
- Kandadi, P., Syed, M.A., Goparaboina, S., Veerabrahma, K., 2011. Brain specific delivery of pegylated indinavir submicron lipid emulsions. *Eur. J. Pharm. Sci.* 42, 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.01.008>
- Karami, Z., Saghatchi Zanjani, M.R., Rezaee, S., Rostamizadeh, K., Hamidi, M., 2019. Neuropharmacokinetic evaluation of lactoferrin-treated indinavir-loaded nanoemulsions: remarkable brain delivery enhancement. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 45, 736–744. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1569039>
- Karimi, M., Bahrami, S., Ravari, S.B., Zangabad, P.S., Mirshekari, H., Bozorgomid, M., Shahreza, S., Sori, M., Hamblin, M.R., 2016. Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 13, 1609–1623. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1193149>
- Keck, C., Jansch, M., Müller, R., 2012a. Protein Adsorption Patterns and Analysis on IV Nanoemulsions—The Key Factor Determining the Organ Distribution. *Pharmaceutics* 5, 36–68. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5010036>
- Keck, C., Jansch, M., Müller, R., 2012b. Protein Adsorption Patterns and Analysis on IV Nanoemulsions—The Key Factor Determining the Organ Distribution. *Pharmaceutics* 5, 36–68. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5010036>
- Kharat, M., Du, Z., Zhang, G., McClements, D.J., 2017a. Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular Environment. *J. Agric. Food Chem.* 65, 1525–1532. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04815>
- Kharat, M., Du, Z., Zhang, G., McClements, D.J., 2017b. Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular Environment. *J. Agric. Food Chem.* 65, 1525–1532. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04815>
- Khonsari, F., Heydari, M., Dinarvand, R., Sharifzadeh, M., Atyabi, F., 2021. Brain targeted delivery of rapamycin using transferrin decorated nanostructured lipid carriers. *BioImpacts* 1. <https://doi.org/10.34172/bi.2021.23389>
- Klang, V., Valenta, C., 2011. Lecithin-based nanoemulsions. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 21, 55–76. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(11\)50006-1](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50006-1)
- Kotha, R.R., Luthria, D.L., 2019. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules* 24, 2930. <https://doi.org/10.3390/molecules24162930>
- Kozma, G.T., Shimizu, T., Ishida, T., Szebeni, J., 2020. Anti-PEG antibodies: Properties, formation, testing and role in adverse immune reactions to PEGylated nano-

- biopharmaceuticals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 154–155, 163–175.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.024>
- Kumar, M., Bishnoi, R.S., Shukla, A.K., Jain, C.P., 2019. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Prev. Nutr. Food Sci.* 24, 225–234.
<https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.225>
- Kurechi, T., Kikugawa, K., Kato, T., 1980. Studies on the antioxidants. XIII. Hydrogen donating capability of antioxidants to 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 28, 2089–2093. <https://doi.org/10.1248/cpb.28.2089>
- Labouta, H.I., Gomez-Garcia, M.J., Sarsons, C.D., Nguyen, T., Kennard, J., Ngo, W., Terefe, K., Iragorri, N., Lai, P., Rinker, K.D., Cramb, D.T., 2018. Surface-grafted polyethylene glycol conformation impacts the transport of PEG-functionalized liposomes through a tumour extracellular matrix model. *RSC Adv.* 8, 7697–7708.
<https://doi.org/10.1039/C7RA13438J>
- Łach, K., Kowal, A., Perek-Polnik, M., Jakubczyk, P., Arthur, C.J., Bal, W., Drogosiewicz, M., Dembowska-Bagińska, B., Grajkowska, W., Cebulski, J., Chaber, R., 2023. Infrared Spectroscopy as a Potential Diagnostic Tool for Medulloblastoma. *Molecules* 28, 2390. <https://doi.org/10.3390/molecules28052390>
- Lee, D.Y., Lee, S.Y., Yun, S.H., Jeong, J.W., Kim, J.H., Kim, H.W., Choi, J.S., Kim, G.-D., Joo, S.T., Choi, I., Hur, S.J., 2022. Review of the Current Research on Fetal Bovine Serum and the Development of Cultured Meat. *Food Sci. Anim. Resour.* 42, 775–799.
<https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e46>
- Lelli, D., Sahebkar, A., Johnston, T.P., Pedone, C., 2017. Curcumin use in pulmonary diseases: State of the art and future perspectives. *Pharmacol. Res.* 115, 133–148.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.017>
- 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, C., Chen, X., Luo, X., Wang, H., Zhu, Y., Du, G., Chen, W., Chen, Z., Hao, X., Zhang, Z., Sun, X., 2021. Nanoemulsions Target to Ectopic Lymphoids in Inflamed Joints to Restore Immune Tolerance in Rheumatoid Arthritis. *Nano Lett.* 21, 2551–2561.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c05110>
- Li, L., Bi, X., Sun, H., Liu, S., Yu, M., Zhang, Y., Weng, S., Yang, L., Bao, Y., Wu, J., Xu, Y., Shen, K., 2018. Characterization of ovarian cancer cells and tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Ovarian Res.* 11, 64.
<https://doi.org/10.1186/s13048-018-0434-8>
- Li, L., Mu, Q., Zhang, B., Yan, B., 2010. Analytical strategies for detecting nanoparticle–protein interactions. *The Analyst* 135, 1519. <https://doi.org/10.1039/c0an00075b>
- Li, M., Pare, P.W., Zhang, J., Kang, T., Zhang, Z., Yang, D., Wang, K., Xing, H., 2018. Antioxidant Capacity Connection with Phenolic and Flavonoid Content in Chinese Medicinal Herbs. *Rec. Nat. Prod.* 12, 239–250.
<https://doi.org/10.25135/rnp.24.17.08.138>
- Li, Z., Jiang, W.-T., 2009. Interlayer Conformations of Intercalated Dodecyltrimethylammonium in Hectorite as Determined by FTIR, XRD, and TG Analyses. *Clays Clay Miner.* 57, 194–204.
<https://doi.org/10.1346/CCMN.2009.0570206>
- Liu, F., Liu, D., 1995. Long-circulating emulsions (oil-in-water) as carriers for lipophilic drugs. *Pharm. Res.* 12, 1060–1064. <https://doi.org/10.1023/A:1016274801930>
- Liu, S., Yang, W., Li, Y., Sun, C., 2023. Fetal bovine serum, an important factor affecting the reproducibility of cell experiments. *Sci. Rep.* 13, 1942.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-29060-7>

- Liu, Z., Zhang, L., He, Q., Liu, X., Chukwunweike Ikechukwu, O., Tong, L., Guo, L., Yang, H., Zhang, Q., Zhao, H., Gu, X., 2015a. Effect of Baicalin-loaded PEGylated cationic solid lipid nanoparticles modified by OX26 antibody on regulating the levels of baicalin and amino acids during cerebral ischemia–reperfusion in rats. *Int. J. Pharm.* 489, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.04.049>
- Liu, Z., Zhao, H., Shu, L., Zhang, Y., Okeke, C., Zhang, L., Li, J., Li, N., 2015b. Preparation and evaluation of Baicalin-loaded cationic solid lipid nanoparticles conjugated with OX26 for improved delivery across the BBB. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41, 353–361. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.861478>
- Mandal, M., Jaiswal, P., Mishra, A., 2020. Role of curcumin and its nanoformulations in neurotherapeutics: A comprehensive review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 34, e22478. <https://doi.org/10.1002/jbt.22478>
- Marczylo, T.H., Verschoyle, R.D., Cooke, D.N., Morazzoni, P., Steward, W.P., Gescher, A.J., 2007. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60, 171–177. <https://doi.org/10.1007/s00280-006-0355-x>
- Marques, C., Maurizi, L., Borchard, G., Jordan, O., 2022. Characterization Challenges of Self-Assembled Polymer-SPIONs Nanoparticles: Benefits of Orthogonal Methods. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 16124. <https://doi.org/10.3390/ijms232416124>
- Martins, J.P., Das Neves, J., De La Fuente, M., Celia, C., Florindo, H., Günday-Türeli, N., Popat, A., Santos, J.L., Sousa, F., Schmid, R., Wolfram, J., Sarmento, B., Santos, H.A., 2020. The solid progress of nanomedicine. *Drug Deliv. Transl. Res.* 10, 726–729. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00743-2>
- Molska, A., Nyman, A.K.G., Sofias, A.M., Kristiansen, K.A., Hak, S., Widerøe, M., 2020. In vitro and in vivo evaluation of organic solvent-free injectable melatonin nanoformulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 152, 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.05.003>
- Moman, R.N., Gupta, N., Varacallo, M., 2023. Physiology, Albumin, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Müller, R.H., Schmidt, S., Buttle, I., Akkar, A., Schmitt, J., Brömer, S., 2004. SolEmuls®—novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 269, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.09.019>
- Musa, S.H., Basri, M., Masoumi, H.R.F., Karjiban, R.A., Malek, E.A., Basri, H., Shamsuddin, A.F., 2013. Formulation optimization of palm kernel oil esters nanoemulsion-loaded with chloramphenicol suitable for meningitis treatment. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 112, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.043>
- Nelson, K.M., Dahlin, J.L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G.F., Walters, M.A., 2017. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin: Miniperspective. *J. Med. Chem.* 60, 1620–1637. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00975>
- Neves, A.R., van der Putten, L., Queiroz, J.F., Pinheiro, M., Reis, S., 2021. Transferrin-Functionalized Lipid Nanoparticles for Curcumin Brain Delivery. *J. Biotechnol.* 331, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.03.010>
- Nicholas, A.R., Scott, M.J., Kennedy, N.I., Jones, M.N., 2000. Effect of grafted polyethylene glycol (PEG) on the size, encapsulation efficiency and permeability of vesicles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1463, 167–178. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00192-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00192-3)
- Nikolić, I., Gledović, A., Tamburić, S., Major, T., Savić, S., 2020. Nanoemulsions as Carriers for Natural Antioxidants: Formulation Development and Optimisation, in: Aboudzadeh, M.A. (Ed.), *Emulsion-based Encapsulation of Antioxidants, Food*

- Bioactive Ingredients. Springer International Publishing, Cham, pp. 149–195.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-62052-3_4
- Nikolic, I., Jasmin Lunter, D., Randjelovic, D., Zugic, A., Tadic, V., Markovic, B., Cekic, N., Zivkovic, L., Topalovic, D., Spremo-Potparevic, B., Daniels, R., Savic, S., 2018. Curcumin-loaded low-energy nanoemulsions as a prototype of multifunctional vehicles for different administration routes: Physicochemical and in vitro peculiarities important for dermal application. *Int. J. Pharm.* 550, 333–346.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.060>
- Nikolic, I., Mitsou, E., Damjanovic, A., Papadimitriou, V., Antic-Stankovic, J., Stanojevic, B., Xenakis, A., Savic, S., 2020. Curcumin-loaded low-energy nanoemulsions: Linking EPR spectroscopy-analysed microstructure and antioxidant potential with in vitro evaluated biological activity. *J. Mol. Liq.* 301, 112479.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112479>
- Onodera, T., Kuriyama, I., Andoh, T., Ichikawa, H., Sakamoto, Y., Lee-Hiraiwa, E., Mizushina, Y., 2015. Influence of particle size on the in vitro and in vivo anti-inflammatory and anti-allergic activities of a curcumin lipid nanoemulsion. *Int. J. Mol. Med.* 35, 1720–1728. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2186>
- Panchal, K., Katke, S., Dash, S.K., Gaur, A., Shinde, A., Saha, N., Mehra, N.K., Chaurasiya, A., 2023. An expanding horizon of complex injectable products: development and regulatory considerations. *Drug Deliv. Transl. Res.* 13, 433–472.
<https://doi.org/10.1007/s13346-022-01223-5>
- Paolino, D., Accolla, M.L., Cilurzo, F., Cristiano, M.C., Cosco, D., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Fresta, M., Celia, C., 2017. Interaction between PEG lipid and DSPE/DSPC phospholipids: An insight of PEGylation degree and kinetics of de-PEGylation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 155, 266–275.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.018>
- Park, K., 2019. The beginning of the end of the nanomedicine hype. *J. Controlled Release* 305, 221–222. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.05.044>
- Partridge, B., Eardley, A., Morales, B.E., Campelo, S.N., Lorenzo, M.F., Mehta, J.N., Kani, Y., Mora, J.K.G., Campbell, E.-O.Y., Arena, C.B., Platt, S., Mintz, A., Shinn, R.L., Rylander, C.G., Debinski, W., Davalos, R.V., Rossmesl, J.H., 2022. Advancements in drug delivery methods for the treatment of brain disease. *Front. Vet. Sci.* 9, 1039745. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1039745>
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., Sirichakwal, P.P., 2008. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *J. Food Compos. Anal.* 21, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.10.002>
- Phan, H.T.M., Bartelt-Hunt, S., Rodenhausen, K.B., Schubert, M., Bartz, J.C., 2015. Investigation of Bovine Serum Albumin (BSA) Attachment onto Self-Assembled Monolayers (SAMs) Using Combinatorial Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (QCM-D) and Spectroscopic Ellipsometry (SE). *PLOS ONE* 10, e0141282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141282>
- Piazzini, V., Landucci, E., Graverini, G., Pellegrini-Giampietro, D., Bilia, A., Bergonzi, M., 2018. Stealth and Cationic Nanoliposomes as Drug Delivery Systems to Increase Andrographolide BBB Permeability. *Pharmaceutics* 10, 128.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030128>
- Pinheiro, R.G.R., Granja, A., Loureiro, J.A., Pereira, M.C., Pinheiro, M., Neves, A.R., Reis, S., 2020. Quercetin lipid nanoparticles functionalized with transferrin for Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharm. Sci.* 148, 105314. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105314>
- Pinheiro, R.G.R., Granja, A., Loureiro, J.A., Pereira, M.C., Pinheiro, M., Neves, A.R., Reis, S., 2020. RVG29-Functionalized Lipid Nanoparticles for Quercetin Brain Delivery

- and Alzheimer's Disease. *Pharm. Res.* 37, 139. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02865-1>
- Qu, M., Lin, Q., He, S., Wang, L., Fu, Y., Zhang, Z., Zhang, L., 2018. A brain targeting functionalized liposomes of the dopamine derivative N -3,4-bis(pivaloyloxy)-dopamine for treatment of Parkinson's disease. *J. Controlled Release* 277, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.019>
- Raman, M., Almutairdi, A., Mulesa, L., Alberda, C., Beattie, C., Gramlich, L., 2017. Parenteral Nutrition and Lipids. *Nutrients* 9, 388. <https://doi.org/10.3390/nu9040388>
- Roethlisberger, D., Mahler, H.-C., Altenburger, U., Pappenberger, A., 2017. If Euhydric and Isotonic Do Not Work, What Are Acceptable pH and Osmolality for Parenteral Drug Dosage Forms? *J. Pharm. Sci.* 106, 446–456. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.09.034>
- Ruiz-Montañez, G., Ragazzo-Sanchez, J.A., Picart-Palmade, L., Calderón-Santoyo, M., Chevalier-Lucia, D., 2017. Optimization of nanoemulsions processed by high-pressure homogenization to protect a bioactive extract of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 40, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.10.020>
- Saptarshi, S.R., Duschl, A., Lopata, A.L., 2013. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J. Nanobiotechnology* 11, 26. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-26>
- Sarah Samiun, W., Basri, M., Fard Masoumi, H.R., Khairudin, N., 2016. The prediction of the optimum compositions of a parenteral nanoemulsion system loaded with a low water solubility drug for the treatment of schizophrenia by artificial neural networks. *RSC Adv.* 6, 14068–14076. <https://doi.org/10.1039/C5RA26243G>
- Schmidt, S., 2003. Plasma protein adsorption patterns on surfaces of Amphotericin B-containing fat emulsions. *Int. J. Pharm.* 254, 3–5. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00667-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00667-1)
- Schuh, R.S., Bruxel, F., Teixeira, H.F., 2014. Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. *Quím. Nova.* <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140186>
- Search for: Curcumin, Study start on or after 01/01/2018 | List Results | ClinicalTrials.gov [WWW Document], n.d. URL https://clinicaltrials.gov/search?intr=Curcumin&start=2018-01-01_&viewType=Table&page=1 (accessed 3.4.24).
- Setiadi, S., Hidayah, N., 2018. The Effect of Papain Enzyme Dosage on the Modification of Egg-yolk Lecithin Emulsifier Product through Enzymatic Hydrolysis Reaction. *Int. J. Technol.* 9, 380. <https://doi.org/10.14716/ijtech.v9i2.1073>
- Sevinç-Özakar, R., Seyret, E., Özakar, E., Adıgüzel, M.C., 2022. Nanoemulsion-Based Hydrogels and Organogels Containing Propolis and Dexpanthenol: Preparation, Characterization, and Comparative Evaluation of Stability, Antimicrobial, and Cytotoxic Properties. *Gels* 8, 578. <https://doi.org/10.3390/gels8090578>
- Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P., 2005. Curcumin: The story so far. *Eur. J. Cancer* 41, 1955–1968. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>
- Sheng, L., Wei, Yumeng, Pi, C., Cheng, J., Su, Z., Wang, Y., Chen, T., Wen, J., Wei, Yuxun, Ma, J., Tang, J., Liu, H., Liu, Z., Shen, H., Zuo, Y., Zheng, W., Zhao, L., 2023. Preparation and Evaluation of Curcumin Derivatives Nanoemulsion Based on Turmeric Extract and Its Antidepressant Effect. *Int. J. Nanomedicine Volume* 18, 7965–7983. <https://doi.org/10.2147/IJN.S430769>
- Shi, Y., Li, Huili, Li, J., Zhi, D., Zhang, X., Liu, H., Wang, H., Li, Hongyu, 2015. Development, optimization and evaluation of emodin loaded nanoemulsion prepared

- by ultrasonic emulsification. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 27, 46–55.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.04.003>
- Shukla, P., Dwivedi, P., Gupta, P.K., Mishra, P.R., 2014. Optimization of novel tocopheryl acetate nanoemulsions for parenteral delivery of curcumin for therapeutic intervention of sepsis. *Expert Opin. Drug Deliv.* 11, 1697–1712.
<https://doi.org/10.1517/17425247.2014.932769>
- Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., Khan, F.A., Chaurasia, M., Jain, N.K., Chourasia, M.K., 2017. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J. Controlled Release* 252, 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>
- Spada, A., Emami, J., Tuszynski, J.A., Lavasanifar, A., 2021. The Uniqueness of Albumin as a Carrier in Nanodrug Delivery. *Mol. Pharm.* 18, 1862–1894.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00046>
- Strickley, R.G., 2004. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. *Pharm. Res.* 21, 201–230. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016235.32639.23>
- Su, Y., Liu, M., Liang, K., Liu, X., Song, Y., Deng, Y., 2018. Evaluating the Accelerated Blood Clearance Phenomenon of PEGylated Nanoemulsions in Rats by Intraperitoneal Administration. *AAPS PharmSciTech* 19, 3210–3218.
<https://doi.org/10.1208/s12249-018-1120-2>
- Subramani, P.A., Panati, K., Lebaka, V.R., Reddy, D.D., Narala, V.R., 2017. Nanostructures for Curcumin Delivery: Possibilities and Challenges, in: *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems*. Elsevier, pp. 393–418. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52727-9.00021-2>
- Sun, M., Su, X., Ding, B., He, X., Liu, X., Yu, A., Lou, H., Zhai, G., 2012. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. *Nanomed.* 7, 1085–1100.
<https://doi.org/10.2217/nnm.12.80>
- Swanson, D., Block, R., Mousa, S.A., 2012. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Adv. Nutr.* 3, 1–7. <https://doi.org/10.3945/an.111.000893>
- Swierczewska, M., Lee, K.C., Lee, S., 2015. What is the future of PEGylated therapies? *Expert Opin. Emerg. Drugs* 20, 531–536.
<https://doi.org/10.1517/14728214.2015.1113254>
- Syed, Veerabrahma, 2013. Biodegradable preparation, characterization and In vitro evaluation of stealth docetaxel lipid nanoemulsions for efficient cytotoxicity. *Int. J. Drug Deliv.* 188–195.
- Tabanelli, R., Brogi, S., Calderone, V., 2021. Improving Curcumin Bioavailability: Current Strategies and Future Perspectives. *Pharmaceutics* 13, 1715.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101715>
- Tamilvanan, S., 2004. Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems. *Prog. Lipid Res.* 43, 489–533.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.09.001>
- Tan, S.F., Kirby, B.P., Stanslas, J., Basri, H.B., 2017. Characterisation, in-vitro and in-vivo evaluation of valproic acid-loaded nanoemulsion for improved brain bioavailability. *J. Pharm. Pharmacol.* 69, 1447–1457. <https://doi.org/10.1111/jphp.12800>
- Tan, S.F., Masoumi, H.R.F., Karjiban, R.A., Stanslas, J., Kirby, B.P., Basri, M., Basri, H.B., 2016. Ultrasonic emulsification of parenteral valproic acid-loaded nanoemulsion with response surface methodology and evaluation of its stability. *Ultrason. Sonochem.* 29, 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.09.015>
- Tang, M., Taghibiglou, C., 2017. The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 58, 1003–1016. <https://doi.org/10.3233/JAD-170188>
- Teixeira, M.I., Lopes, C.M., Gonçalves, H., Catita, J., Silva, A.M., Rodrigues, F., Amaral, M.H., Costa, P.C., 2022. Formulation, Characterization, and Cytotoxicity Evaluation

- of Lactoferrin Functionalized Lipid Nanoparticles for Riluzole Delivery to the Brain. *Pharmaceutics* 14, 185. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010185>
- Tenchov, R., Sasso, J.M., Zhou, Q.A., 2023. PEGylated Lipid Nanoparticle Formulations: Immunological Safety and Efficiency Perspective. *Bioconjug. Chem.* 34, 941–960. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.3c00174>
- Ton, M.N., Chang, C., Carpentier, Y.A., Deckelbaum, R.J., 2005. In vivo and in vitro properties of an intravenous lipid emulsion containing only medium chain and fish oil triglycerides. *Clin. Nutr.* 24, 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2005.03.001>
- Vitali, M., Casals, E., Canals, F., Colomé, N., Puntès, V., 2020. Simple spectroscopic determination of the hard protein corona composition in AuNPs: albumin at 75%. *Nanoscale* 12, 15832–15844. <https://doi.org/10.1039/D0NR02379E>
- Wang, W., Hassan, Md.M., Mao, G., 2023. Colloidal Perspective on Targeted Drug Delivery to the Central Nervous System. *Langmuir* 39, 3235–3245. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02949>
- Wang, W., Huang, Z., Li, Y., Wang, Wenhua, Shi, J., Fu, F., Huang, Y., Pan, X., Wu, C., 2021. Impact of particle size and pH on protein corona formation of solid lipid nanoparticles: A proof-of-concept study. *Acta Pharm. Sin. B* 11, 1030–1046. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.10.023>
- Wang, Y.-L., Chen, L.-J., Tsao, L.-Y., Chen, H.-N., Lee, C.-H., Hsiao, C.-C., 2021. Parenteral nutrition with fish oil-based lipid emulsion reduces the risk of cholestasis in preterm infants. *J. Int. Med. Res.* 49, 030006052110118. <https://doi.org/10.1177/03000605211011805>
- Washington, C., 1989. Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition. *Int. J. Pharm.* 56, 71–74. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90062-8](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90062-8)
- Watt, R.P., Khatri, H., Dibble, A.R.G., 2019. Injectability as a function of viscosity and dosing materials for subcutaneous administration. *Int. J. Pharm.* 554, 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.012>
- Wilson, R.J., Li, Y., Yang, G., Zhao, C.-X., 2022. Nanoemulsions for drug delivery. *Particuology* 64, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2021.05.009>
- Wu, Y., Zhang, B., Kebebe, D., Guo, L., Guo, H., Li, N., Pi, J., Qi, D., Guo, P., Liu, Z., 2019. Preparation, optimization and cellular uptake study of tanshinone I nanoemulsion modified with lactoferrin for brain drug delivery. *Pharm. Dev. Technol.* 24, 982–991. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1621897>
- Yallapu, M.M., Nagesh, P.K.B., Jaggi, M., Chauhan, S.C., 2015. Therapeutic Applications of Curcumin Nanoformulations. *AAPS J.* 17, 1341–1356. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9811-z>
- Yang, Q., Jacobs, T.M., McCallen, J.D., Moore, D.T., Huckaby, J.T., Edelstein, J.N., Lai, S.K., 2016. Analysis of Pre-existing IgG and IgM Antibodies against Polyethylene Glycol (PEG) in the General Population. *Anal. Chem.* 88, 11804–11812. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03437>
- Yao, K., McClements, D.J., Xiang, J., Zhang, Z., Cao, Y., Xiao, H., Liu, X., 2019. Improvement of carotenoid bioaccessibility from spinach by co-ingesting with excipient nanoemulsions: impact of the oil phase composition. *Food Funct.* 10, 5302–5311. <https://doi.org/10.1039/C9FO01328H>
- Yousif, M.Y., Holdsworth, D.W., Poepping, T.L., 2009. Deriving a Blood-Mimicking Fluid for Particle Image Velocimetry in Sylgard- 184 Vascular Models. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Minneapolis, MN, USA.

- Zarei, M., Aalaie, J., 2019. Profiling of nanoparticle–protein interactions by electrophoresis techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 79–96. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1401-3>
- Zhang, C., Yan, L., Wang, X., Zhu, S., Chen, C., Gu, Z., Zhao, Y., 2020. Progress, challenges, and future of nanomedicine. *Nano Today* 35, 101008. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.101008>
- Zhang, Q., Fassihi, M.A., Fassihi, R., 2018. Delivery Considerations of Highly Viscous Polymeric Fluids Mimicking Concentrated Biopharmaceuticals: Assessment of Injectability via Measurement of Total Work Done “WT.” *AAPS PharmSciTech* 19, 1520–1528. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0963-x>
- Zhang, X., Wang, X., Chen, Z., 2017. A Novel Nanocomposite as an Efficient Adsorbent for the Rapid Adsorption of Ni(II) from Aqueous Solution. *Materials* 10, 1124. <https://doi.org/10.3390/ma10101124>
- Zhang, Y., He, J., Shen, L., Wang, T., Yang, J., Li, Y., Wang, Y., Quan, D., 2021. Brain-targeted delivery of obidoxime, using aptamer-modified liposomes, for detoxification of organophosphorus compounds. *J. Controlled Release* 329, 1117–1128. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.039>
- Zhao, C., Zhang, J., Hu, H., Qiao, M., Chen, D., Zhao, X., Yang, C., 2018. Design of lactoferrin modified lipid nano-carriers for efficient brain-targeted delivery of nimodipine. *Mater. Sci. Eng. C* 92, 1031–1040. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.02.004>
- Zou, T.-T., Li, J.-R., Zhu, Y., Wan, C.-M., Liao, Q., 2022. Fish oil-containing lipid emulsions prevention on parenteral nutrition-associated cholestasis in very low birth weight infants: a meta-analysis. *World J. Pediatr.* 18, 463–471. <https://doi.org/10.1007/s12519-022-00536-2>

BIOGRAFIJA

Jelena Đoković je rođena 7. marta 1991. godine u Ivanjici, gde je završila osnovnu školu *Milinko Kušić* i *Gimnaziju* kao nosilac diploma *Vuk Karadžić*. Školske 2010/2011 godine je upisala integrisane akademske studije (program Farmacija) na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a diplomirala u oktobru 2015. godine sa prosečnom ocenom 9,57 i time stekla zvanje magistar farmacije. Nakon obavljenog pripravničkog staža položila je stručni ispit za farmaceute 2016. godine. Tokom školovanja bila je stipendista Opštine Ivanjica, Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka kao i nosilac stipendije *Dositeja* Fonda za mlade talente Republike Srbije. Doktorske akademske studije (modul Farmaceutska tehnologija) upisala je školske 2016/2017. godine. Iste godine se zaposlila na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, gde je od tada zaposlena, prvo kao saradnik u nastavi, zatim kao istraživač-pripravnik, istraživač-saradnik i asistent. Učestvuje u izvođenju praktične nastave iz predmeta farmaceutska tehnologija 1, farmaceutska tehnologija 2 i kozmetologija.

Do sada je učestvovala u realizaciji nekoliko projekata: *Razvoj mikro- i nanosistema kao nosača za lekove sa antiinflamatornim delovanjem i metoda za njihovu karakterizaciju* (TR34031) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, *Improving the preclinical prediction of adverse effects of pharmaceuticals on the nervous system* (NeuroDeRisk) H2020 IMI2-2017-13-10, *Inovativne nanoformulacije za isporuku lekova u mozak/kožu* projekat bilateralne saradnje sa Univerzitetom u Tibingenu (Nemačka). Trenutno učestvuje na projektu 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 je dva puta boravila na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutskog fakulteta Medicinskog univerziteta u Gdanjsku (Poljska) u okviru CEEPUS programa mobilnosti. Provela je mesec dana na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Univerziteta u Tibingenu, kao i dve nedelje na Institutu za hemijsku biologiju Nacionalne helenske istraživačke fondacije u Atini. Tokom novembra 2019. godine u okviru projekta *Boosting Capacities for Advanced Characterization of Nano-Dispersed Drug-Delivery Systems* (NanoDiction) je provela nedelju dana u *JRC Nanobiotechnology Laboratory, Joint Research Centre* u Ispri (Italija). Završila je obuku i položila ispit iz predmeta Principi rada sa eksperimentalnim životinjama 2017. godine.

Autor je tri rada objavljena u međunarodnim časopisima, kao i većeg broja saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima. Na dodeli Godišnjih nagrada za naučnoistraživačke radove studenata posle diplomskih studija osvojila je drugu nagradu 2019. godine, i prvu nagradu 2023. godine.