



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ



Петар М. Батинић

**КОНТРОЛИСАНО ОТПУШТАЊЕ ФОЛНЕ
КИСЕЛИНЕ ИЗ СИСТЕМА ЛИПОЗОМ-
БИОПОЛИМЕРНИ ФИЛМ**

Докторска дисертација

Београд, 2023



UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND
METALLURGY




Petar M. Batinić

**THE CONTROLLED RELEASE OF FOLIC ACID
FROM THE SYSTEM OF LIPOSOME-
BIOPOLYMER FILM**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

МЕНТОРИ КАНДИДАТА



Др Бранко Бугарски, редовни професор,

Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет, Београд



Др Душан Миџин, редовни професор,

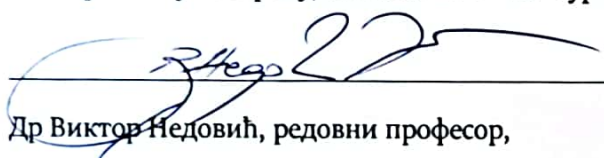
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет, Београд

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ ЗА ПРЕГЛЕД, ОЦЕНУ И ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ



Др Зорица Кнежевић Југовић, редовни професор,

Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет, Београд



Др Виктор Недовић, редовни професор,

Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет, Београд



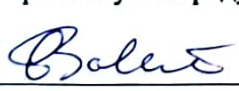
Др Верица Ђорђевић, научни саветник,

Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет, Београд



Др Милан Миливојевић, ванредни професор,

Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет, Београд



Др Бојана Баланч, виши научни сарадник,

Иновациони центар Технолошко-металуршког факултета, Београд

ДАТУМ ОДБРАНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ



28.9.2023.

Ова докторска дисертација изведена је на Катедрама за хемијско инжењерство и органску хемију Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду. Поједини делови експеримената реализовани су у Лабораторији за физичку хемију Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду, Центру за електрохемију Института за хемију, технологију и металургију Универзитета у Београду, Катедри за неорганску хемијску технологију Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, Катедри за општу и неорганску хемију Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду и у Институту техничких наука Српске академије наука и уметности, у оквиру истраживачке групе за корелацију својстава и функционалних особина кондензоване материје.

Финансијска средства неопходна за рад на овој докторској дисертацији обезбедила је Влада Републике Србије, Министарство науке, технолошког развоја и иновација (евиденциони број уговора: 451-03-47/2023-01/200135 и 451-03-47/2023-01/200287).

Изјаве захвалности

Ово научно дело не би било могуће урадити без подршке ментора, редовних професора Технолошко-металуришког факултета Универзитета у Београду, др Бранка Бугарског, дипломираног инжењера технологије и др Душана Мијина, дипломираног инжењера технологије. Са неупитним поштовањем захваљујем им на помоћи, саветима и усмеравању у научно-истраживачком раду.

Драгој колегиници, др Верици Ђорђевић, научном саветнику Технолошко-металуришког факултета Универзитета у Београду, члану Комисије, најлепше хвала на напору који је уложила да се ово дело, као и научни радови који из њега проистичу, реализују и по својој суштини приближе сличном академском штиву. Такође, да теоријско-експерименталном раду треба приступати систематски и добро методолошки организовано, важни су принципи које сам усвојио у току наше вишегодишње сарадње. Са радошћу ишчекујем научни рад у будућности и време кад ћу део задуженог одужити.

Председнику, др Зорици Кнежевић Југовић, редовном професору Технолошко-металуришког факултета Универзитета у Београду, као и члановима, др Милану Миливојевићу, ванредном професору Технолошко-металуришког факултета Универзитета у Београду и др Виктору Недовићу, редовном професору Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, захваљујем се на учешћу у Комисији за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације.

Др Бојани Баланч, вишем научном сараднику Иновационог центра Технолошко-металуришког факултета Универзитета у Београду, члану Комисије и др Ради Пјановић, редовном професору Технолошко-металуришког факултета Универзитета у Београду хвала на стручним примедбама, помоћи у писању научних радова и многобројним саветима у току истраживања.

За велику помоћ у експерименталном раду захваљујем се Александру Крстићу, мастер хемичару, истраживачу сараднику Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду, који ми је своје знање и умеће, потпуно и недвосмислено, ставио на располагање.

Др Сањи Стевановић, вишем научном сараднику Института за хемију, технологију и металургију Универзитета у Београду, др Смиљи Марковић, научном саветнику Института техничких наука Српске академије наука и уметности и др Ђорђу Вељовићу, ванредном професору Технолошко-металуришког факултета Универзитета у Београду хвала на помоћи приликом реализације AFM, DSC и SEM анализа. Др Марији Николић, ванредном професору Технолошко-металуришког факултета Универзитета у Београду хвала на предусретљивости и помоћи око реализације реолошких експерименталних анализа. Др Наташи Обрадовић, научном сараднику Иновационог центра Технолошко-металуришког факултета Универзитета у Београду хвала лепо на помоћи око реализације механичких испитивања биополимерних филмова.

Било је велико задовољство сарађивати са целокупним научно-стручним колективом Катедре за хемијско инжењерство и Катедре за органску хемију, посебно са колегама из истраживачких тимова којима руководе проф. др Бранко Бугарски, проф. др Душан Мијин и проф. др Александар Маринковић. Сходно томе, драгим колегама (из лабораторија 43, 304 и 328)

дугујем благодарност за свестрано залагање да се ово дело нађе у оваквој форми. Хвала свима, без изузетка, на инспиративним разговорима, угодној и лепој радној атмосфери.

Колегиницама Наталији Чутовић, маг. инж. технол., истраживачу сараднику Института за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ у Београду, др Александри Машуловић, научном сараднику Иновационог центра Технолошко-металушког факултета Универзитета у Београду, др Јелени Лађаревић, вишем научном сараднику, асистенту са докторатом Технолошко-металушког факултета Универзитета у Београду, др Милени Милошевић, научном сараднику Института за хемију, технологију и металургију Универзитета у Београду и колегама Младену Бугарчићу, маг. инж. технол., истраживачу сараднику Института за технологију нуклеарних и других минералних сировина у Београду, и др Луки Матовићу, научном сараднику Иновационог центра Технолошко-металушког факултета Универзитета у Београду, хвала на помоћи приликом сређивања овог рукописа.

Исто тако, захваљујем се и другим колегама са факултета и института Универзитета у Београду, и Академије наука који су, у виду подршке и благе речи, учествовали у настанку ове дисертације, а нису именом наведени.

Руководству Института за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ у Београду захваљујем се на обезбеђеним финансијским средствима неопходним за штампу овог рукописа, као и за оцену и одбрану докторске дисертације.

Напоследку, хвала драгим родитељима, Момчилу и Светлани, и сестри Јелени, на подршци и великој вери у мој рад. Породица је била и остала моје највеће исходиште и уточиште.

У Београду, током лета 2023. године

Петар М. Батинић

„Знање, то су златне степенице које нас воде у небеса – знање је светлост која осветљава пут наш кроз овај свет и води нас у живот будућности, пун неуцеле славе“.

Олимпијада Пупин

„Где је воља, ту је и умеће“.

Михајло Пупин

КОНТРОЛИСАНО ОТПУШТАЊЕ ФОЛНЕ КИСЕЛИНЕ ИЗ СИСТЕМА ЛИПОЗОМ-БИОПОЛИМЕРНИ ФИЛМ

РЕЗИМЕ

Предмет ове дисертације је формулација мултикомпонентног система липозом-биополимерни филм који у свом саставу садржи фолну киселину. Један од важних циљева рада је објашњење кинетике контролисаног отпуштања витамина у системима који симулирају људску кожу (*in vitro*). Липозоми, као модел матрице за инкапсулацију активног молекула, припремљени су пролипозомном методом. Биополимерни филм, на бази карбоксиметил-целулозе и солагама, са инкорпорираним липозомима у које је инкапсулирана фолна киселина добијен је методом изливања из раствора. У експериментима је извршена детаљна карактеризација носача која укључује коришћење инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом за испитивање физичко-хемијских интеракција између фолне киселине и компонената носача; употребу микроскопије атомских сила за анализу површинске морфологије липозома инкорпорираних унутар структуре биополимерног матрикса; испитивање термичке стабилности носача при загревању, као и утврђивање потенцијалних интеракција између носача и активних супстанци; одређивање кинетике бубрења биополимерних филмова при рН вредности коже (рН 5,5); анализу кинетике сушења и тестирање механичких својстава биополимерних филмова када су подвргнути напрезању. Проблем смањене растворљивости фолне киселине превазиђен је додатком хистидина. Одређен је степен инкапсулације активне супстанце у носач (ЕЕ > 80%), као и његова стабилност у току времена. Такође, испитана је кинетика контролисаног отпуштања фолне киселине из липозома на основу чега су одређени и ефективни коефицијенти дифузије и отпори дифузији. На основу добијених профила отпуштања, утврђено је да испитивани систем, липозом-биополимерни филм, може постепено ослобађати фолну киселину током 24 сата.

Кључне речи: фолна киселина, липозоми, пролипозомна метода, карбоксиметил-целулоза, солагам, биополимерни филм, кинетика отпуштања.

Научна област: Технолошко инжењерство

Ужа научна област: Хемијско инжењерство

УДК број:

THE CONTROLLED RELEASE OF FOLIC ACID FROM THE SYSTEM OF LIPOSOME-BIOPOLYMER FILM

SUMMARY

The subject of this dissertation is the formulation of a multicomponent liposome-biopolymer film system that contains folic acid. One of the important goals of the work is the explanation of the release kinetics of the active substance in the systems which simulate human skin (*in vitro*). The liposomes, as a model matrix for the encapsulation of the active molecule, were prepared by the proliposome method. The production of a biopolymer film based on carboxymethyl cellulose and solagum, which contains liposomes with encapsulated folic acid, was formed using the film casting method. In the experiments, a detailed characterization of the carrier was carried out, which includes the use of Fourier-transform infrared spectroscopy to examine the physical-chemical interactions between folic acid and the carrier's components; atomic force microscopy to examine the surface morphology of liposomes incorporated into the biopolymer matrix; and testing the carrier's thermal stability during heating as well as potential interaction between film constituents: determining the swelling kinetics of biopolymer films at the pH value of the skin (pH 5.5); analysing the drying kinetics and testing the mechanical properties of biopolymer films under stress. The problem of low solubility of folic acid was overcome by adding histidine. Also, the degree of encapsulation of the active substance in the carrier was determined ($EE > 80\%$), as well as the examination of their stability over time. The release kinetics and determination of the effective diffusion coefficients, and diffusion resistances were realized. Finally, it was found that the tested system of the liposome-biopolymer film, based on experimentally determined release profiles, can gradually release folic acid over a period of 24 hours.

Keywords: folic acid, liposomes, proliposome method, carboxymethyl cellulose, solagum, biopolymer film, release kinetics.

Scientific field: Technological Engineering

Scientific subfield: Chemical Engineering

UDC number:

САДРЖАЈ

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| УВОД..... | 12 |
| 1. ТЕОРИЈСКИ ДЕО..... | 13 |
| 1.1. Фолна киселина | 13 |
| 1.1.1. Примена фолне киселине у третману поремећаја на кожи | 16 |
| 1.1.2. Утицај додатка хистидина на побољшање растворљивости фолне киселине..... | 17 |
| 1.2. Инкапсулација..... | 21 |
| 1.2.1. Липозоми као системи за инкапсулацију активних супстанци..... | 22 |
| 1.2.1.1. Класификација липозома | 24 |
| 1.2.1.2. Методе припреме липозома за инкапсулацију активних супстанци | 25 |
| 1.2.1.3. Модификација фосфолипидне мембране липозома | 26 |
| 1.2.2. Карбоксиметил-целулоза | 28 |
| 1.2.3. Солагам | 29 |
| 1.2.3.1. Ксантан гума..... | 30 |
| 1.2.3.2. Гума арабика (арапска гума)..... | 31 |
| 1.3. Сложени систем липозом-биополимер | 33 |
| 1.4. Контролисано отпуштање | 35 |
| 1.4.1. Пренос масе..... | 36 |
| 1.4.1.1. Молекулска дифузија..... | 36 |
| 1.4.1.2. Општи диференцијални биланс преноса масе | 37 |
| 1.4.1.3. Стационарна дифузија | 39 |
| 1.4.2. Контролисано отпуштање активних супстанци и дифузија лекова кроз кожу | 42 |
| 1.4.3. Биополимерни филмови као системи за контролисано отпуштање активних супстанци | 43 |
| 1.4.3.1. Биополимерни филмови на бази карбоксиметил-целулозе за контролисано отпуштање активних супстанци..... | 45 |
| 1.4.4. Трансдермални системи за контролисано отпуштање активних супстанци..... | 46 |
| 1.4.4.1. Откриће, развој и физиолошки аспекти употребе трансдермалних система | 46 |
| 1.4.4.2. Примери употребе трансдермалних система за контролисано отпуштање витамина | 49 |
| 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО..... | 52 |
| 2.1. Материјали и методе рада..... | 53 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.1. Стандарди и реагенси | 53 |
| 2.2. Добијање и карактеризација липозома | 54 |
| 2.2.1. Припрема липозома пролипозомном методом | 54 |
| 2.2.2. Анализа стабилности и величина честица | 54 |
| 2.2.3. Одређивање степена инкапсулације и капацитета везивања | 55 |
| 2.2.4. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом | 55 |
| 2.2.5. Микроскопија атомских сила | 56 |
| 2.2.6. Диференцијална скенирајућа калориметрија | 56 |
| 2.2.7. Испитивање кинетике контролисаног отпуштања фолне киселине из липозома | 56 |
| 2.3. Добијање и карактеризација система липозом-биополимерни филм | 57 |
| 2.3.1. Припрема система липозом-биополимерни филм | 57 |
| 2.3.2. Физичка својства биополимерних филмова | 58 |
| 2.3.3. Сушење биополимерних филмова и одређивање садржаја активне супстанце | 59 |
| 2.3.4. Бубрење биополимерних филмова..... | 59 |
| 2.3.5. Одређивање механичких својстава биополимерних филмова..... | 59 |
| 2.3.6. Испитивање структурних својстава система липозом-биополимерни филм инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом | 60 |
| 2.3.7. Испитивање термалне стабилности система липозом-биополимерни филм диференцијалном скенирајућом калориметријом..... | 60 |
| 2.3.8. Скенирајућа електронска микроскопија | 60 |
| 2.3.9. Микроскопија атомских сила..... | 61 |
| 2.3.10. Испитивање кинетике контролисаног отпуштања фолне киселине из система липозом-биополимерни филм..... | 61 |
| 2.4. Статистичка анализа | 62 |
| 3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА | 63 |
| 3.1. Карактеризација липозома са инкапсулираном фолном киселином | 63 |
| 3.1.1. Величина честица и стабилност | 63 |
| 3.1.2. Степен инкапсулације..... | 65 |
| 3.1.3. Анализа липозома инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом | 66 |
| 3.1.4. Микроскопија атомских сила | 68 |
| 3.1.5. Диференцијална скенирајућа калориметрија | 70 |
| 3.1.6. Кинетика контролисаног отпуштања фолне киселине из липозома и одређивање коефицијента дифузије | 72 |
| 3.2. Карактеризација система липозом-биополимерни филм..... | 75 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.1. Одређивање физичких и механичких својстава система липозом-биополимерни филм | 75 |
| 3.2.1.1. Густина, површински напон и вискозност раствора односно суспензија коришћених за добијање биополимерних филмова | 75 |
| 3.2.1.2. Дебљина, садржај активне супстанце и одређивање механичких својстава биополимерних филмова | 75 |
| 3.2.1.3. Сушење и бубрење биополимерних филмова | 78 |
| 3.2.2. Анализа инфрацрвеног спектра липозом-биополимерни филм инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом | 79 |
| 3.2.3. Диференцијална скенирајућа калориметрија | 81 |
| 3.2.4. Скенирајућа електронска микроскопија | 83 |
| 3.2.5. Микроскопија атомских сила | 84 |
| 3.2.6. Кинетика контролисаног отпуштања фолне киселине из система липозом-биополимерни филм | 85 |
| 4. ЗАКЉУЧАК | 87 |
| ЛИТЕРАТУРА | 89 |
| СПИСАК СЛИКА | 101 |
| СПИСАК ТАБЕЛА | 103 |
| ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА | 104 |
| ПРИЛОГ 1. | 106 |
| ПРИЛОГ 2. | 107 |
| ПРИЛОГ 3. | 108 |
| ПРИЛОГ 4. | 109 |
| ПРИЛОГ 5. | 110 |
| БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ | 111 |
| ЛИСТА ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА | 112 |
| Изјава о ауторству | 113 |
| Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада | 114 |
| Изјава о коришћењу | 115 |
| Оцена извештаја о провери оригиналности докторске дисертације | 117 |

УВОД

С обзиром на то да се акутна и хронична обољења коже данас често појављују, научници развијају нове системе за трансдермалну испоруку лекова. Изазов је како одређени тип лека на што једноставнији начин испоручити у системску циркулацију и остварити терапеутско дејство.

Модел лека (активне супстанце) који може превенирати процес „старења коже“ је витамин В₉ (фолна киселина). У исто време, инфламаторне реакције на кожи праћене патофизиолошким променама, попут црвенила, перутања и хиперпигментације, могу се ублажити апликацијом фармацеутских и козметичких производа који у свом саставу садрже фолну киселину.

Липозоми као матрице за инкапсулацију лековитих (активних) супстанци имају широку употребу у разним гранама процесне индустрије (фармацеутска технологија, козметологија, прехранбена технологија и друго) сходно својим физичким и хемијским својствима (биокомпатибилност, нетоксичност, биодеградабилност). Међутим, липазе, нагле промене рН вредности и јонске јачине, микроорганизми и зрачење могу нарушити нативну структуру липозома и изазвати „цурење“ активне супстанце. Стога, потребно је липозоме заштити од утицаја спољашњих чиниоца – фактора деградације. Најчешће се у ту сврху користе природни полимери, попут алгината, хитозана, целулозе и њених деривата, природне гуме (ксантан, акација, гуар-гума) и инулин. У исто време, неопходно је водити рачуна да природни производи који се користе за облагање, тј. заштиту липозома буду безопасни за људске органе и да не ремете нормалне метаболичке процесе у организму. Циљ овог рада је развити нове системе за контролисано отпуштање фолне киселине на бази липозома и система липозом-биополимерни филм.

Материја обрађена у овом раду систематизована је у пет целина: увод, теоријски део, експериментални део, резултати и дискусија, и закључак. Експериментални део ове докторске дисертације подељен је на два дела. Први део експерименталног рада односи се на инкапсулацију витамина у липозоме и детаљну физичко-хемијску карактеризацију ових наноносача, и испитивање контролисаног (*in vitro*) отпуштања. Други део експерименталног рада обухвата инкорпорацију липозома са витамином у комплексни матрикс који у основи садржи макромолекулска полимерна једињења (смешу карбоксиметил-целулозе и солагама). Након инкорпорације липозома, извршено је испитивање физичких, реолошких, морфолошких и механичких својстава биополимерног носача, као и тест контролисаног (*in vitro*) отпуштања.

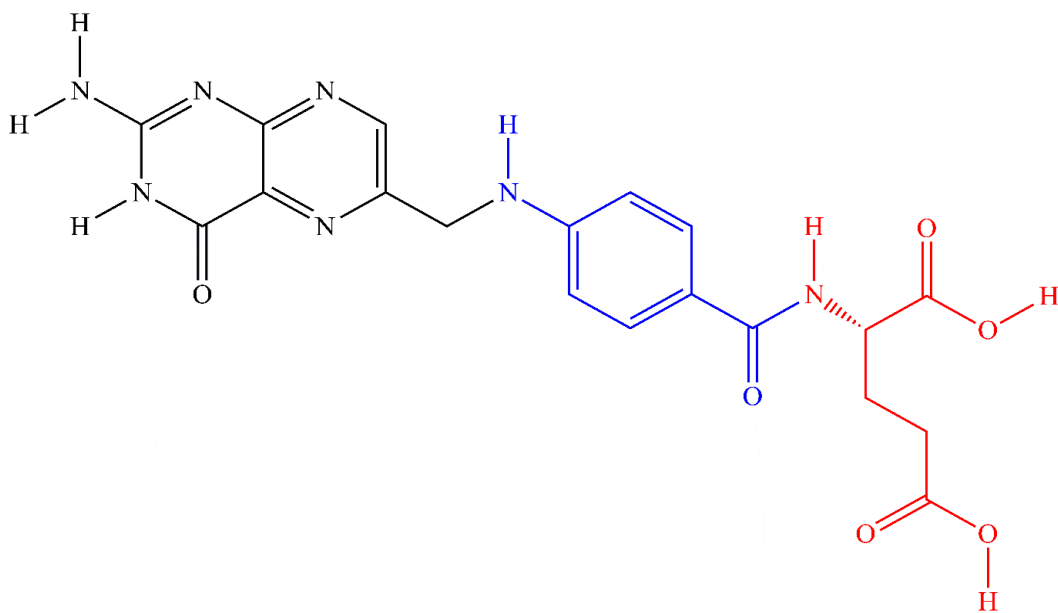
Најважнији резултат истраживања је анализа експериментално добијених профила отпуштања активне супстанце из липозома и из система липозом-биополимерни филм у средину која треба да симулира услове на хуманој кожи. Сва аналитичка испитивања реализована су употребом течне хроматографије високих перформанси.

Коначно, истраживања оваквог типа представљају основу за развој нових модела топикалних/трансдермалних система за контролисано и продужено отпуштање витамина.

1. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

1.1. Фолна киселина

Фолну киселину (слика 1.1) је крајем XIX века синтетисао британски биохемичар Фредерик Г. Хопкинс (*Frederick Gowland Hopkins*, енг.) који је, између осталог, објаснио физиолошко дејство анти-анемичних витамина. Сам витамин је у почетку дефинисан као витамин М, да би данашњи назив био тек касније утврђен, након потпуног утврђивања његове биохемијске улоге. Порекло речи је из латинског језика („*Folin*“, лат.) и значи лист (Šiler Marinković, 2009). Молекул је изграђен од три компоненте: птеридински прстен (2-амино-4-окси-6-метилптерин), пара-аминобензоева киселина и L-глутаминска киселина (Мијин и Petrović, 2022).



Слика 1.1. Фолна киселина (птеридински прстен; *p*-аминобензоева киселина; L-глутаминска киселина)

Фолна киселина има есенцијалну улогу у метаболизму монокарбонских јединица која укључује реакције конверзије серина у глицин, затим катаболизам хистидина, као и синтезу метионина, тимидилата, пурина и пиримидина, а њихово деловање потпомогнуто је учешћем специфичних ензимских система, попут флавинских коензима (Burger и сар., 2007).

Нагло интересовање за физиолошко дејство фолне киселине и њен благотворан утицај на здравље појавио се у последњој декади XX века и то најпре као потреба да се у потпуности расветле, и ублаже поремећаји настали код превремено рођених беба са аномалијама (оштећење на лумбалним пршљеновима кичме („*Spina bifida*“), затим оштећења максиларне структуре и слично (Butterworth, 1993; Mills и сар., 1999). Поред наведеног, развојем клиничке праксе, евидентиране су појаве настанка карцинома бронхија, дојке, грлића утеруса и колоне (дебелог црева) (Kamei и сар., 1993; Slattery и сар., 1999) затим појаве Дауновог синдрома, Алцхајмерове болести (Godfrey и сар., 1990; James и сар., 1999), меланома и хиперпигментације коже (Branda и сар., 1988; Han и сар., 2007), рекурентног губитка трудноће у раној фази и прееклампсије (Dekker и сар., 1995).

Структура фолне киселине и биолошка активност молекула паушално је проучавана четрдесетих година XX века и том приликом је утврђено да је за раст и развој неких пробиотских бактерија - *Lactobacillus casei* потребна супстанца изолована из генеративних органа спанаћа, превасходно из листа биљке.

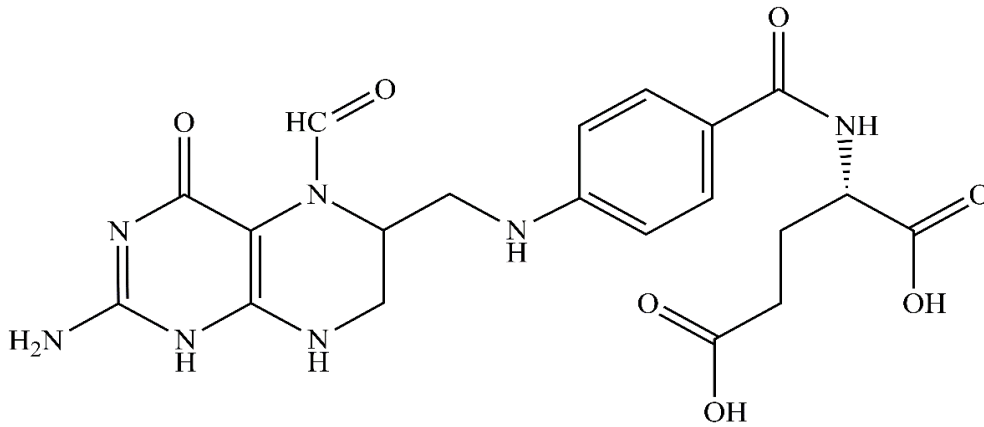
Шездесетих година XX века научници Смитлес и Хибард установили су да су жене које су родиле децу са поремећајем неуралне цеви („*neural tube defects*“, енгл.) имале неповољно високе вредности формиминоглутаминске киселине у тестовима испитивања хемијског састава урина. Стога, спроведено је истраживање у којем је трудним женама даван комплекс витамина, укључујући и фолну киселину, у време зачећа, а које су у претходним порођајима рађале децу са аномалијама. Резултат студије је смањени ризик од рецидива за 1/7 наспрам контролне групе (жене које су одбиле да конзумирају комплекс витамина). Такође, доказано је да је у трудноћи неопходно уносити 4-5 mg фолне киселине, што је десет пута више од дозе која је до тада препоручивана. (Wald, 2011). Поред овога, недостатак фолата се примарно везивао за појаву пернициозне и мегалобластне анемије која се појавила код жена у Индији у истом временском периоду (Brody и сар., 2001; Eitenmiller, 2008; Phillips и сар., 2011).

Такође, недостатак фолне киселине везује се и за појаву аутоимуних болести, поремећај рада срца и јетре, као и дегенеративне промене на плаценти код трудница. Повећан број новорођене деце са расцепом горње усне - „зечије усне“ („*Palatoschisis*“, лат.) директно је последица недовољног уноса фолне киселине у току трудноће, а највише у првом триместру (Nikolić, 1977).

Поред наведених функција, доказано је да фолна киселина може потпомоћи раст и развој костију, ублажити ефекте ултраљубичастог зрачења на кожи и подстаћи обнављање леукопоетичног ткива (Nikolić, 1977; Šiler Marinković, 2009; Ammar и сар., 2016).

Нутритивне препоруке обично су засноване на вредностима која прописује Служба за храну и исхрану Одсека за пољопривреду Сједињених Америчких Држава (*U. S. Department of Agriculture, Food and Nutrition Service*, енгл.), указујући да је потребни дневни унос фолне киселине за мушкарце и жене у адолесцентском периоду око 0,4 g/дневно, затим 0,6 g/дневно за труднице и 0,5 g/дневно за жене у периоду лактације. Суплементација фолном киселином може да се искаже кроз следеће поређење: биоеквивалентност је да 1 mg чисте фолне киселине одговара 0,6 mg фолата добијеног из воћа и поврћа (Wald, 2011).

Степен усвајања фолне киселине из намирница зависи од количине и облика садржаног фолата, као и од активности ензима заслужних за разлагање (поли- γ -глутамил хидролазе). Ресорбована биолошки неактивна фолна киселина у јетри се преводи у своје физиолошки активне облике преко којих учествује у различитим метаболичким процесима. Такође, за потребе развоја бактерије *Leuconostoc citrovorum*, одређена количина фолата, у облику цитроворум-фактора (фолинска киселина, слика 1.2) складишти се у организму. Ово једињење је, уједно, биолошки најактивнији облик фолне киселине који, као прекурсор, учествује у реакцији синтезе витамина (Šiler Marinković, 2009).



Слика 1.2. Фолинска киселина (2-[[4-[(2-амино-5-формил-4-оксо-3,6,7,8-тетрахидроптеридин-6-ил)метиламино]бензоил]амино]пентандеканска киселина)

Најважнија функција која се везује за фолате је конверзија 5-метилтетрахидрофолата у тетрахидрофолат уз помоћ ензима метилтетрахидрофолат редуктазе. Такође, 5-метилтетрахидрофолна киселина је дозор метил-група неопходних за конверзију хомоцистеина у *S*-аденозилметионин (Wald, 2011). Поред овога, фолна киселина је дозор/акцептор монокарбонских јединица, попут метил-, хидрокси-метил-, формил- и карбоксилне групе. Сходно овоме, метил- и хидрокси-метил-групе N^5 -формилтетрахидрофолне киселине подлежу редукцији и користе за синтезу холина и других биолошки активних молекула (Šiler Marinković, 2009).

Фолна киселина и њени конституенти, пиазин и птерин, могу се једноставно трансформисати уз помоћ хидратисаног електрона и ацетон-кетил-радикала. Том приликом добија се одговарајући дериват у прстену пиазина који представља саставни део молекула. Са друге стране, тетрахидрофолна киселина, у функцији одговарајућег коензима, посредује у процесу преношења формил- остатка, у различитим ензимски катализованим реакцијама, при чему се остварује синтеза пептидних ланаца на полирибозомима, тј. синтеза ДНК и поспешују процеси регенерације ткива. Такође, формил-група везана за тетрахидрофолну киселину посредује при настајању активног формијата (Šiler Marinković, 2009; Wald, 2011). Уопштено, фолна киселина, тј. птериоилмоноглутамат, је стабилан, синтетски аналог који представља матичну структуру једног великог броја витамин-изомера, односно витамина-коензима.

Фолна киселина спада у групу високо ефикасних биолошки активних молекула који могу потпомоћи регенерацију оштећеног епитела коже и нарочито онда када је поремећај настао као последица прекомерног излагања ултраљубичастом зрачењу (Debowska и сар., 2005). Наиме, фолна киселина, у зависности од концентрације, побољшава одрживост примарних хуманих фибробласта и стимулише њихову пролиферацију. С тим у вези, фолна киселина модулира исправку ДНК молекула, а остварени ефекат долази као резултат брзог спајања раскинутих ланаца. Такође, утврђено је да фолна киселина поспешује хидратацију коже, смањује трансепидермални губитак воде без значајних промена у лучењу себума (Debowska и сар., 2005).

1.1.1. Примена фолне киселине у третману поремећаја на кожи

Фолна киселина има кратак „полу-живот“ у телу, око $1,5 \pm 0,45$ часова, што је чини погодном за трансдермалну примену (Loew и сар., 1987). Такође, у литератури нису утврђене нежељене појаве при високим уносима фолне киселине, чак ни при оралној конзумацији, те се нежељени ефекти трансдермалне апликације овог витамина могу искључити. Поред споменутог, потребно је нагласити да биорасположивост и биодоступност неког лека зависи од различитих пре-апсорптивних и пост-апсорптивних фактора (Alkrad, 2019).

Неке студије су показале да козметичке формулације са инкорпорираном фолном киселином унапређују еластичност коже (Kim и сар., 1997; Debowska и сар., 2005; Alkrad и сар., 2019). Индекс еластичности коже расте близу 100% након четворонедељног третмана препаратима у виду гела или креме који садрже фолну киселину. Поред овога, утврђено је да фолна киселина интензивно утиче на смањење губитка влаге коже за око 12% у периоду од четири недеље. На овај начин подстиче се боља хидратисаност коже и самим тим смањује се могућност инфекција условљених дејством бактерија. Такође, као што је претходно наговештено, утврђена је успешна пролиферација фибробласта за око 16% у периоду од седам дана, што додатно потврђује позитивну улогу витамина у процесима обнављања ткива (Kim и сар., 1997; Debowska и сар., 2005).

Када разматрамо резултате добијене из студија о топикалној односно трансдермалној примени фолне киселине можемо видети да се једнако успешни резултати добијају када се користе емулзије (микроемулзије), чврсти липидни наноносачи и липозоми (Ammar и сар., 2016). Уопштено је доказано да се пренос активних супстанци врши интрацелуларно кроз канале фоликула длака и знојних жлезда, и да се честице у одређеној мери деформишу приликом проласка кроз *Stratum corneum*, први слој епидермиса (Pjanović, 2010). Такође, утврђено је да је флуks фолне киселине приликом проласка кроз синтетичку мембрану пропорционалан концентрацији витамина у систему. С тим у вези, Alkrad и сар. (2019) утврдили су да се флуks фолне киселине у процесу трансдермалног преноса из микроемулзије кроз синтетичку мембрану кретао у опсегу од $5,15 \cdot 10^{-3}$ до $11,47 \cdot 10^{-3}$ mg/cm²/h у опсегу концентрација од 2,54 до 3,77 mg/ml.

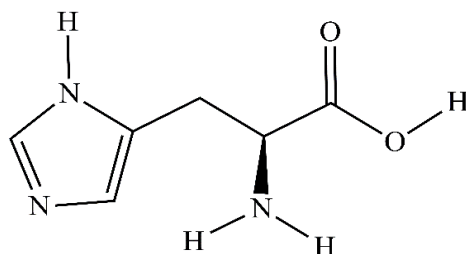
Упркос наведеним предностима чврстих липидних носача, наноемулзија и липозома које се огледају у једноставности примене, неинванзивности приликом апликације, биокомпатабилности и нетоксичности, приликом коришћења споменутих система, превасходно липозома, за инкапсулацију и контролисано отпуштање хидрофилних активних супстанци у биолошком миљеу, појављају се одређене потешкоће. Једна од најчешћих је ниска ефикасност инкапсулације условљена директно физичко-хемијским својствима активне супстанце (мала растворљивост или тенденција да се, због високе осетљивости, разгради/инактивира у току операције припреме липозома). Поред овога, главни недостаци липозома као носача за хидрофилне активне молекуле укључују неконтролисано ослобађање (цурење) у току складиштења, споро отпуштање, слабу апсорпцију која може одложити почетак деловања активне супстанце, мали потенцијал за тачно прилагођавање дозе, немогућност уклањања дозе активне супстанце у случају неисправности формулације и сметње у производњи великих количина, и стерилизацији (ако је неопходна) (Kulkarni и сар., 1995). Такође, стабилност липозома је у већој мери предодређена стабилношћу фосфолипидне мембране, односно осетљивошћу градивних липида, модификатора мембране и других екципијената, на светлост, промене у рН вредности, активност ензима и слично (Kulkarni и сар.,

1995; Bastiat и сар., 2007). Као један од начина да се овакви проблеми превазиђу предлаже се инкопорација липосома унутар структуре комплексних полисахарида, на пример целулозе, хитозана и њихових деривата (Јао и сар., 2018). Предност биополимерних филмова, као један од типова носача, је могућност да се активна супстанца и липозоми, као основне матрице, заштите од спољашњих фактора деградације. Такође, код оваквих модела носача може се повећати биорасположивост активне супстанце, одржати дуже задржавање унутар системске циркулације и смањити „цурење“ инкапсулисаног активног молекула из носача (Garg и сар., 2007; Wang и сар., 2010).

Још један од проблема који се може везати за инкапсулацију фолне киселине је веома мала растворљивост овог витамина у води при неутралној вредности рН средине (1,6 mg/l), за разлику од неполарних средина (липидне емулзије) у којима приметно веће растварање (Ammaг и сар., 2016). Стога, као једно од потенцијалних решења јесте растварање фолне киселине у воденим растворима витамина С (Јао и сар., 2018) или у растворима базних аминокиселина, на пример - лизина (Penalva и сар., 2015). У овој докторској дисертацији користиће се хистидин (2-амино-3-(1*H*-имидазол-4-ил)пропанска киселина), односно водени раствор ове базне аминокиселине у циљу побољшања растворљивости фолне киселине.

1.1.2. Утицај додатка хистидина на побољшање растворљивости фолне киселине

Хистидин (слика 1.3) је есенцијална аминокиселина која је прекурсор различитих хормона (тиротропин) и посредује у многим метаболичким процесима, попут реналне функције, неуротрансмисије, желудачне секреције и управљања имуним системом (Ingle, 2011). Због своје специфичне структуре, хистидин је једна од најважнијих аминокиселина, нарочито због улоге које има у метаболизму протеина, где у улози активног центра учествује у различитим ензимским реакцијама (Voet и сар., 2016). Хистидин је у људском организму присутан у различитим формама, највише у слободној форми (L или D-хистидин), затим као N-(алфа)-ацетилхистидин и хистидин као саставни елемент карнозина и ансерина. Позната је улога хистидина у синтези и метаболизму хистамина, неуротрансмитера који посредује при контроли уноса хране, заједно са катехоламином и 5-хидрокситриптамином. У литератури се може пронаћи податак да хистидин снажно хелира комплексе бакра (II), никла (II), кобалта (II) и кадмијума (II). Ово својство условљено је хемијском структуром молекула будући да је бочни ланац имидазоловог језгра једини координирајући лиганд у комплексима метал-протеин (Harding, 2004; Ingle, 2011).

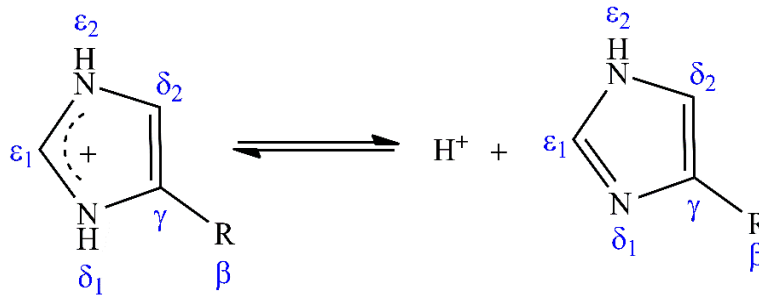


Слика 1.3. Структурна формула хистидина: петочлана прстенаста структура која садржи два атома азота у прстену имидазола и бочни ланац који (R-остатак) представља структуру α-аминопропионске киселине (Holešek, 2020)

Неутрални облик имидазола, који представља основу структуре хистидина, може постојати у две таутомерне форме: са водоником на δ1 атому азота или са водоником на ε2 атому азота (слика 1.4).

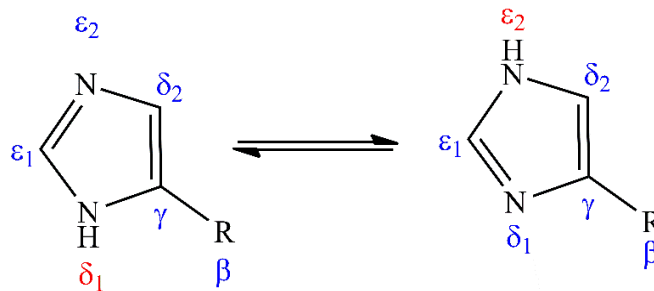
Наиме, рН вредност константе дисоцијације ϵ_2 атома азота је приближно 0,6 јединица виша него δ_1 атома азота, те је у физиолошким условима аминогрупа протонувана, а карбоксилна група депротонувана (слика 1.4). Ово је потврђено и подацима добијеним ^{13}C NMR спектроскопијом (Voet и сар., 2016).

Тако, хистидин поседује одређени пуферски капацитет, могућност да хелира поједине јоне метала, као и да посредује у реакцијама неутрализације слободних радикала (Ingle, 2011; Voet и сар., 2016).



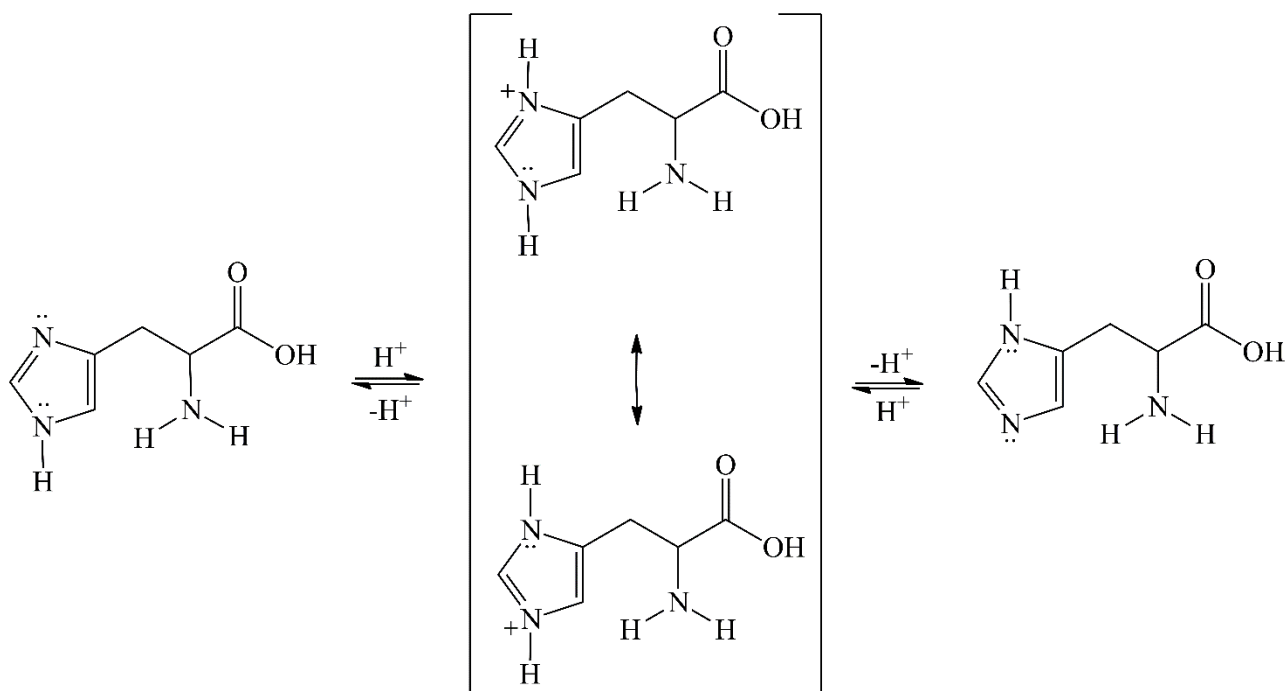
Слика 1.4. Структурна формула хистидина у физиолошким условима, $\text{pK}_a=6.0-7.0$ (Voet и сар., 2016)

Поред овога, хистидин у депротонованом стању може посредовати као нуклеофил у реакцијама фосфорилловања (делимично је протонувана на $\text{pH}=7.0$; $\text{pK}_{a2}=6.0$). То омогућава да у неутралној средини, када је вредност константе дисоцијације близу 7,0, бочни ланац имидазола има веома базан карактер. Сходно томе, хистидин у неутралном облику има тзв. „амбидекстерну природу“, те у реакцијама образовања водоничних веза слободни азот делује као нуклеофил, што га чини акцептором протона (водоничне везе), док се у случају када је везан за атом водоника понаша као електрофил, те може бити донор протона (водоничне везе) (Voet и сар., 2016) (слика 1.5).



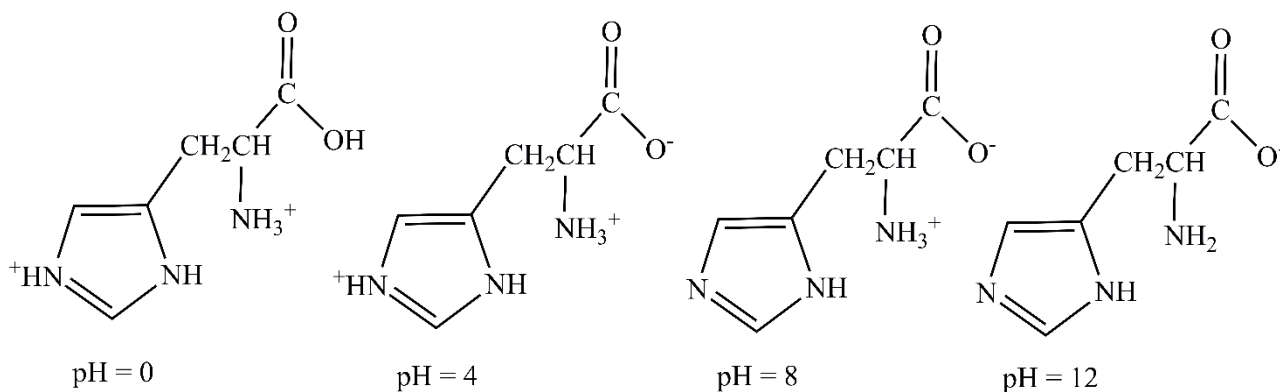
Слика 1.5. Таутомерни облици хистидина (Voet и сар., 2016)

Када се бочни ланац хистидина у потпуности протонује, молекул губи својства нуклеофила. У том случају, протонувани облик молекула имидазола стабилизован је резонанцијом, при чему се позитивно наелектрисање у молекулу подједнако расподељује на оба атома азота у структури прстена (слика 1.6) (Voet и сар., 2016).



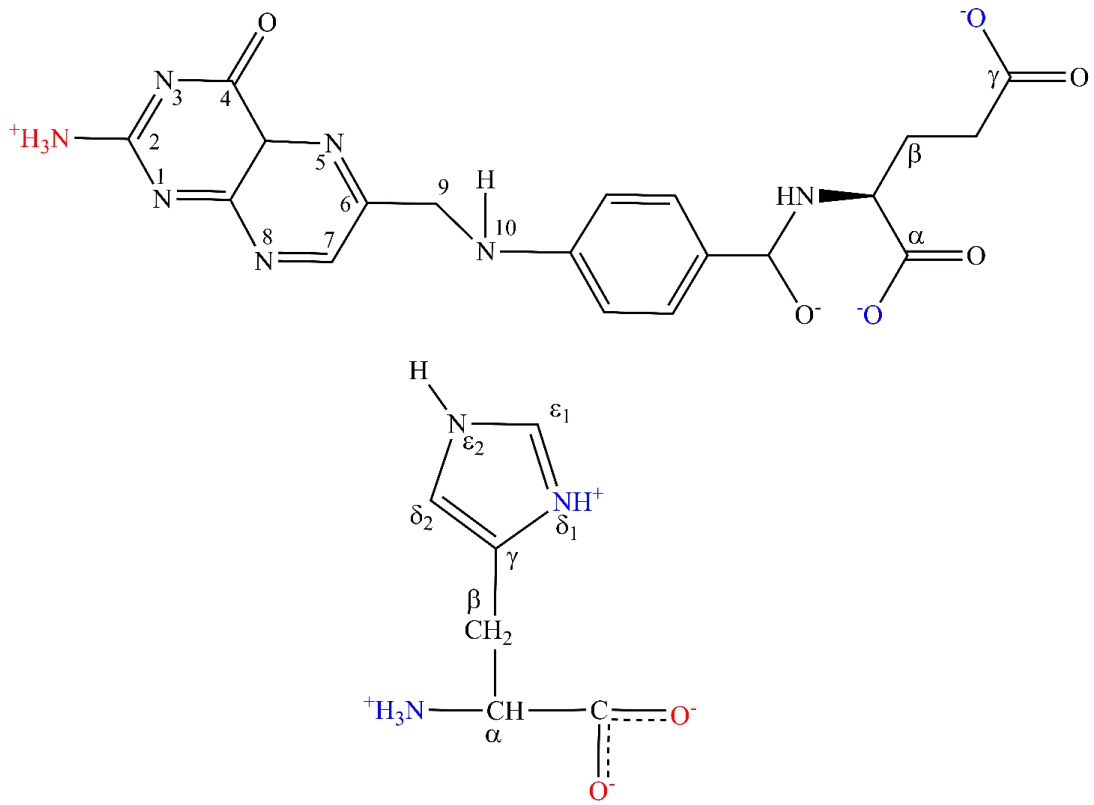
Слика 1.6. Приказ резонантних структура хистидина (Voet и сар., 2016)

Хистидин у условима благо алкалне киселине средине (физиолошки услови), постоји у облику цвитер јона (изоелектрична тачка - $pI = 7,59$, слика 1.7).



Слика 1.7. Наелектрисање хистидина при различитим вредностима рН средине

Када се, на пример, за растварање фолне киселине користи водени раствор хистидина ($pH=7,8$) доћи ће до формирања јонског пара, односно комплекса витамин-аминокиселина, условљеног електростатичким и Ван дер Валсовим интеракцијама између функционалних група различитих наелектрисања (слика 1.8). Наиме, негативно наелектрисане алфа и гама карбоксилне групе фолне киселине, које представљају остатак глутаминске киселине ($pK_{a1}=3,1$ и $pK_{a2}=4,8$), у неутралној средини, ступиће у интеракцију са протонаном алфа-амино групом хистидина ($pK_a=1,82$), која ће у исто време реаговати са електронегативним атомом азота из птеридинског прстена. Настали производ постоји у облику соли и поседује добра солубилизациона својства.



Слика 1.8. Приказ потенцијалних интеракција између фолне киселине и хистидина при благо алкалним условима средине (pH 7,6)

1.2. Инкапсулација

Инкапсулација је техника која представља поступак имобилизације (заробљавања) једне материје унутар друге, при чему величине таквог система могу бити нанометарских, микрометарских и милиметарских димензија. Када је величина тог система испод једног микрометра, систем поприма својства колоидних честица (Čaliја, 2013; Balanč, 2016). Инкапсулирана материја може бити чиста супстанца или смеша више супстанци. У литератури се инкапсулисана материја може пронаћи под називом обложени материјал, интерна (унутрашња) фаза, језгро, пуњење, лек, (био)активна супстанца и слично. Супротно, материјал које се користи за облагање назива се зид, капсула, матрица, екстерна (спољашња) фаза, мембрана, носач, љуска, чаура и слично. У основи структуре матрице, најчешће, налазе се природна органска једињења попут хомо- или хетерополисахарида (скроб, целулоза и деривати целулозе, полиурониди), протеина, липида и синтетских полимерних једињења (Trifković, 2016). Постоје два основна типа инкапсулата: инкапсулат типа матрица и инкапсулат типа резервоар (акумулацијски тип). Код инкапсулата типа матрица, активна супстанца је хомогено или хетерогено распоређена по целокупној запремини (површини). За разлику од инкапсулата типа матрица, код акумулацијског типа, активна супстанца је смештена у средишњем делу носача (језгро) и окружена је, истовремено и заштићена, зидом (мембраном) матрице. Садржај резервоара (пуњење – активна супстанца) задржаваће се у капсули све док се одговарајућим процесом, који за последицу има деформацију (деструкцију) растварањем, топљењем, ерозијом, ломљењем или пуцањем заштитне мембране матрикса, не услови излазак у спољну средину. У системе за инкапсулацију различитих активних супстанци убрајају се једноставни или комплексни системи мицеларне структуре и организације, системи честица код којих је језгро обавијено мембраном (липозоми, наноемулзије), полијезгарни колоидни системи, системи код којих је језгро обложено полимерном матрицом (хидрогелови, коацервати, биополимерни филмови-омотачи и тако даље) (Augustin и сар., 2013; Balanč, 2016).

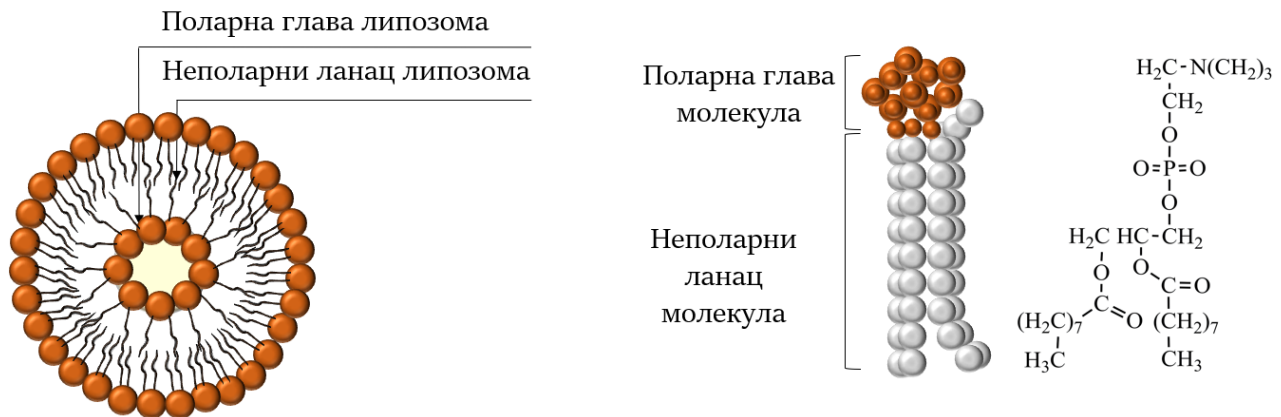
Ако се осврнемо на разлоге због којих инкапсулацију као технику примењујемо, у литератури се наводе следећи (Trifković, 2016):

- заштита инкапсулата од неповољног утицаја спољашњих фактора (светлост, влага, кисеоник и други гасови, промена рН вредности, температуре и слично) на директан начин, односно смањењем њихове реактивности;
- продужење рока трајања крајњег производа;
- корекција сензорних својстава (мирис, укус, текстура);
- заштита организма од неповољног дејства активних супстанци смањењем њихове концентрације у систему (организму);
- модификовано ослобађање активних супстанци (контролисано и продужено отпуштање у одређеном тренутку и/или месту);
- онемогућавање да инкапсулиране активне супстанце, у случају мултикомпонентног система, међусобно реагују.

У наставку, обрадиће се системи за инкапсулацију активних супстанци који у основи своје структуре садрже фосфолипиде и деривате фосфолипида, будући да се експериментални део ове докторске дисертације заснива на липозомима као основним моделима носача за инкапсулацију и контролисано отпуштање фолне киселине.

1.2.1. Липозоми као системи за инкапсулацију активних супстанци

Липозоми (слика 1.9., лево) представљају сферичне структуре састављене од језгра и љуске, пречника од 0,02 до неколико микрометара, компоноване од концентрисаних фосфолипидног двослоја (слика 1.9., десно) спонтано формираног у воденом окружењу, под дејством спољашње силе или притиска (Bangham и Horne, 1964; Vladisavljević и сар., 2014). У свом саставу, липозоми, могу садржати неколико концентричних мембрана. Дебљина мембране је око $4 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}$ (Lasic, 1993).



Слика 1.9. Приказ основне структуре липозома - лево и структура молекула фосфолипида - десно

Поларни делови молекула фосфолипида смештени су на површини и окренути су ка спољашњој средини, док су неполарни делови окренути ка унутрашњој средини. У зависности од броја фосфолипидних двослоја који опкољавају језгро, липозомне честице могу бити структурно организоване као једноламеларне или вишеламеларне (Balanč, 2016). Због природе липозомних честица да у својој структури носе хидрофобне, хидрофилне или обе групе молекула, ове творевине представљају незаменљиву групу носача у фармацеутској и прехранбеној технологији. Такође, липозоми као носачи за отпуштање лекова нашли су примену и у другим научним дисциплинама, попут органске и аналитичке хемије, биологије, фармакологије, токсикологије, ветеринарске медицине и слично. Уљорастворни органски молекули уграђују се у структуру фосфолипидне мембране липозома, због саме хидрофобности (неполарности) мембране, док се водорастворни органски молекули уграђују у језгро липозома, чије је окружење хидрофилног (поларног) карактера (Pjanović, 2010). Као што је познато, липозоми у основи садрже природне органске молекуле, који су биодеградабилни, биокомпатибилни, нетоксични и не изискују имуни одговор организма (Lasic, 1993).

У литератури се могу пронаћи подаци да се липозоми користе за инкапсулацију нестереоидних антиинфламаторних лекова (Torchilin, 2005), ензима (Walde и Ichikawa, 2001), гена (Templeton и Lasic, 1999), хидролизата протеина (Pavlović и сар., 2020), витамина (Suntres и Shek, 1994; Jiao и сар., 2018; Batinić и сар., 2020), пигмената (Moraes и сар., 2013), полифенолних једињења (Balanč, 2016; Pravilović, 2016), етарских уља (Sebaaly и сар., 2015), арома (Singh и сар., 2012), вакцина (Wang и сар., 2017) и друго.

У зависности од избора фосфолипида који се користе за припрему липозома, зависиће и крајња својства носача. Технике карактеризације липозома најчешће укључују одређивање састава фосфолипидне мембране, одређивање стабилности и величине честица, одређивање степена инкапсулације и испитивање кинетике ослобађања активног молекула (Balanč, 2016).

Постоји неколико механизма деловања липозома када се нађу у организму (Dunnick и сар., 1976):

- липозом се везује за ћелијску мембрану и приликом сједињавања са ћелијском мембраном ослобађа инкапсулисани садржај унутар њене структуре;
- липозом преузима ћелија и том приликом долази до интеракције фосфолипида из двослоја носача са липидима који чине структуру ћелијске мембране што за последицу има ослобађање инкапсулисаног садржаја;
- у случају фагоцитозе, долази до везивања липозома за ћелију и тада се инкапсулисани садржај ослобађа деловањем других ћелијских органела, као на пример лизозома, на зидове фосфолипидног двослоја.

Предности коришћења липозома као система за инкапсулацију огледају се кроз читав низ предности од којих се посебно издвајају следеће (Vishvakrama и Sharma, 2014):

- обезбеђују контролисано и продужено отпуштање лекова;
- обезбеђују директну интеракцију лека са ћелијом;
- поседују својства биодеградабилности, биокомпатибилности, нетоксичности, флексибилности;
- погодни су за инкапсулацију и хидрофилних и хидрофобних органских молекула;
- могу испољавати својства стабилизатора и превенирати деградационе процесе изазване оксидацијом липида;
- омогућавају контролисану хидратацију;
- имају утицај на побољшање стабилизације протеина;
- имају утицај на циљано ослобађање лека на специфичном месту;
- имају утицај на стабилизацију инкапсулираног лека који је пореклом из клиничког окружења;
- омогућавају извођење алтернативне фармакокинетики и фармакодинамике;
- дају могућност администрације кроз различите путеве дистрибуције (руте);
- повећавају терапеутски индекс инкапсулираног лека;
- дају могућност модулације недостатка лека у систему.

Још неке од предности коришћења липозома укључују њихову примену у дерматологији. Липозоми су погодни за инкапсулацију и циљано ослобађање лековитих супстанци због специфичне структуре која је, генерално, слична структури коже. Такође, треба нагласити да липозоми не играју само важну улогу као средство за испоруку лековитих супстанци преко коже, на специфичном ткиву, већ имају могућност транспорта лека кроз слојеве коже (трансдермални пренос). Липозоми могу побољшати хидрираност коже, као и превенирати настанак хиперпигментације и орожалости ткива, атопијски дерматитис, псоријазу и друга акутна или хронична обољења коже. Још неке од предности коришћења липозома у дерматологији су да када је кожа захваћена екцемом или оштећена због недостатка влаге, двојслојне нановезикуле ступају у интеракцију са протеинима и липидима коже помажући да се овај орган регенерише и да настави да правилно обавља своју заштитну функцију. Липозоми могу олакшати продор амфифилних и липофилних молекула кроз површинске слојеве коже, онемогућавајући том приликом физичку деградацију и инактивацију активних супстанци. Такође, сходно својој бифазној природи, липозоми могу повећати растворљивост неких органских молекула, као што су, на пример, липосолубилни витамини. Могу повећати стабилност неких антиоксиданаса (витамин Е, витамин С, убихинон), арома (лимонен) и других фотосензитивних молекула. Поред тога, липозоми могу деловати као

сигнални молекули, могу градити комплексе са имуносупресивним лековима и могу смањити интоксикацију, као и нежељена дејства лека због испољавања ефекта продуженог отпуштања.

1.2.1.1. Класификација липозома

Липозоми као носачи за инкапсулацију активних супстанци могу се класификовати према следећим критеријумима (Pravilović, 2016):

- параметри структуре који се односе на величину липозома;
- технике, односно начини припреме липозома;
- састав фосфолипидне мембране липозома и њихова даља апликација.

На основу параметара структуре које се односе на величину липозома разликујемо следеће класе:

- мултиламеларни липозоми (средњи пречник честице је већи од 500 нанометара) који поседују велики број концентричних двослојева;
- олиголамеларни липозоми (средњи пречник честице је у опсегу од 100-1000 нанометара) који поседују од 2 до 10 концентричних двослојева;
- униламеларни липозоми који поседују један липидни двослој који окружује језгро.

Додатно, униламеларни липозоми се даље, према средњем пречнику, могу поделити на:

- мале униламеларне липозоме (средњи пречник од 20 – 100 нанометара);
- средње униламеларне липозоме (средњи пречник је 100 нанометара);
- велике униламеларне (средњи пречник је преко 100 нанометара);
- огромне униламеларне липозоме (средњи пречник је преко 1000 нанометара).

На основу технике припреме, липозоми се могу поделити на:

- мале униламеларне липозоме добијене техником реверзно-фазне евапорације;
- мултиламеларне липозоме добијене техником реверзно-фазне евапорације;
- липозоме настале процесом екструзије;
- липозоме настале процесом соникације;
- липозоми настале техником дехидратације-рехидратације;
- липозоме настале солубилизацијом, тј. методом уклањања површински активних молекула;
- липозоме настале уклањањем хаотропног јона;
- липозоме настале спорим отицањем у раствору неелектролита.
- липозоме настале растварач-инјекционом методом (етанол-инјекциона или етар-инјекциона метода) и друго.

Липозоми се на основу састава фосфолипидне мембране и потенцијалне апликације могу поделити на:

- конвенционални липозоми – у њихов састав улазе фосфолипиди и холестерол;
- „стелт липозоми“ (*stealth liposomes*, енгл.) или тзв. дугоциркулишући липозоми (примењују се за системску циркулацију);
- имунолипозоми - поседују елементе антитета те им то својство омогућава да се везују за циљано место у организму;
- катјонски липозоми (користе се за пренос генетског материјала).

1.2.1.2. Методе припреме липозома за инкапсулацију активних супстанци

У литератури описане су различите методе за припрему липозома, попут методе танког филма, инјекционих метода, деемулзификационих метода и слично (Lasic, 1993). Генерално, методе добијања липозома деле се у две групе (Lasic, 1993):

- методе активне инкапсулације (инкапсулација активне компоненте одвија се истовремено са процесом формирања липозома);
- методе пасивне инкапсулације (инкапсулација активне компоненте одвија се након процеса формирања липозома).

Метода танког филма („*thin-film hydration method*“, енгл.) је најшире усвојена за припрему липозома и припада методама пасивне инкапсулације. Концепт методе заснован је на три основне операције које укључују: (I) растварање молекула липида одговарајућим органским растварачима или смешом органских растварача, (II) уклањање растварача и хидратација пролипозомне смеше, и (III) смањење (редукција) величина честица (Рјановић, 2010; Баланч, 2016). Растварање липида спроводи се у циљу хомогенизације узорка. Одабир растварача зависи од растворљивости липида у конвекционалним растварачима, те се врло често користе смеше органских растварача, које укључују хлороформ, метил-алкохол, етил алкохол, диетил-етар и друге раствараче. Такође, потребно је водити рачуна о односу липида и растварача. Добром лабораторијском праксом утврђено је да је адекватан однос 10-20 mg липида и 1 ml растварача или смеше растварача (Баланч, 2016). Након равномерног растварања липида, потребно је уклонити органски растварач и то се, најчешће, изводи у условима сниженог притиска (200-300 mbar) помоћу различитих типова система за упаравање. Када се растварач уклони долази до формирања танког филма на зидовима суда, те је наредни корак хидратација филма и мешање на температури која је изнад фазне трансформације липида. Ову операцију је нарочито важно правилно применити зато што се липозоми могу припремити само на температурама изнад фазне трансформације липида. Том приликом долази до преласка молекула фосфолипида из кристалне у течну (гел) структуру (Taylor и Morris, 1995; Рјановић, 2010; Баланч, 2016). Након хидратације и мешања, добијају се мултиламеларни липозоми величине неколико микрометара, те је даље неопходно смањити њихову величину. Редукција величине честица може се извести на различите начине: соникацијом, екструзијом, хомогенизацијом под високим притиском, електрохемијски - мењањем рН вредности, јонске јачине, површинског потенцијала или мењањем услова растварања, укључујући растварање/адсорпцију молекула или хидратационих јона на површини ламела честица (Lasic, 1993). На овај начин могу се добити липозоми једноламеларне структуре, величине мање од једног микрометра.

За припрему липозома у лабораторијским условима најзаступљенија је метода танког филма. Такође, у индустријским и полуиндустријским условима користе се и реверзно-фазни поступак припреме липозома, метода инјектовања растварача и слично (Lasic, 1993; Баланч, 2016).

У овој докторској дисертацији липозоми су добијени коришћењем пролипозомне методе који су први пут описали Perrett и сар. (1991). За разлику од методе танког филма која се искључиво користи у лабораторијским условима, пролипозомна метода може се користити и у лабораторијским и у индустријским условима (Moraes и сар., 2013). Moraes и сар. (2013) су ову методу користили за инкапсулацију бета-каротена у липозоме, док је Баланч (2016) користила ову методу за инкапсулацију расвератрола.

У фармацеутској технологији, липозоми, нуде прегршт могућности за инкапсулацију, контролисано ослобађање и циљану доставу активне супстанце. Модификацијом фосфолипидне мембране омогућава се испорука активне супстанце на тачно дефинисаном месту у организму. Због могућности липозома да делују као резервоари за доставу осетљивих активних супстанци, да их постепено ослобађају, елиминише се могућност појаве нежељених појава лека настала услед брзе ресорпције. Такође, употребом липозома као система за доставу лека елиминише се могућност појаве високе концентрације медикамента у крви (Рђановић, 2010).

1.2.1.3. Модификација фосфолипидне мембране липозома

Модификацијом фосфолипидне мембране липозома постиже се могућност за инкапсулацију различитих хидрофобних и хидрофилних супстанци, као и успоравање или убрзавање њихове дифузије из постојеће матрице. Мењање састава мембране директно условљава брзину преноса масе активне супстанце из носача, али и друге феномене попут дужине задржавања активне супстанце у организму, места на којем ће активна супстанца деловати и слично.

Додатно, брзина дифузије активне супстанце из липозома условљена је саставом и уделом фосфолипида у двослоју, присуством полимерних једињења или површински активних супстанци (Fadda и сар., 1998; Pravilović, 2016; Andra и сар., 2022; Liu и сар., 2022). На пример, код система липозом-полимер, хидрофобни ланац полимера уграђен је у структуру фосфолипидног двослоја и тако накалемљени полимер омогућава липозомима интеракције са протеинима и другим ћелијама у таквом типу биолошког система. Такође, настале интеракције између система липозом-полимер и других биолошких молекула резултат су просторне оријентације функционалних група липозома, односно полимера, хидратисаности система, као и електростатичких сила привлачења, односно одбијања између датих молекула (Gao и сар., 2021).

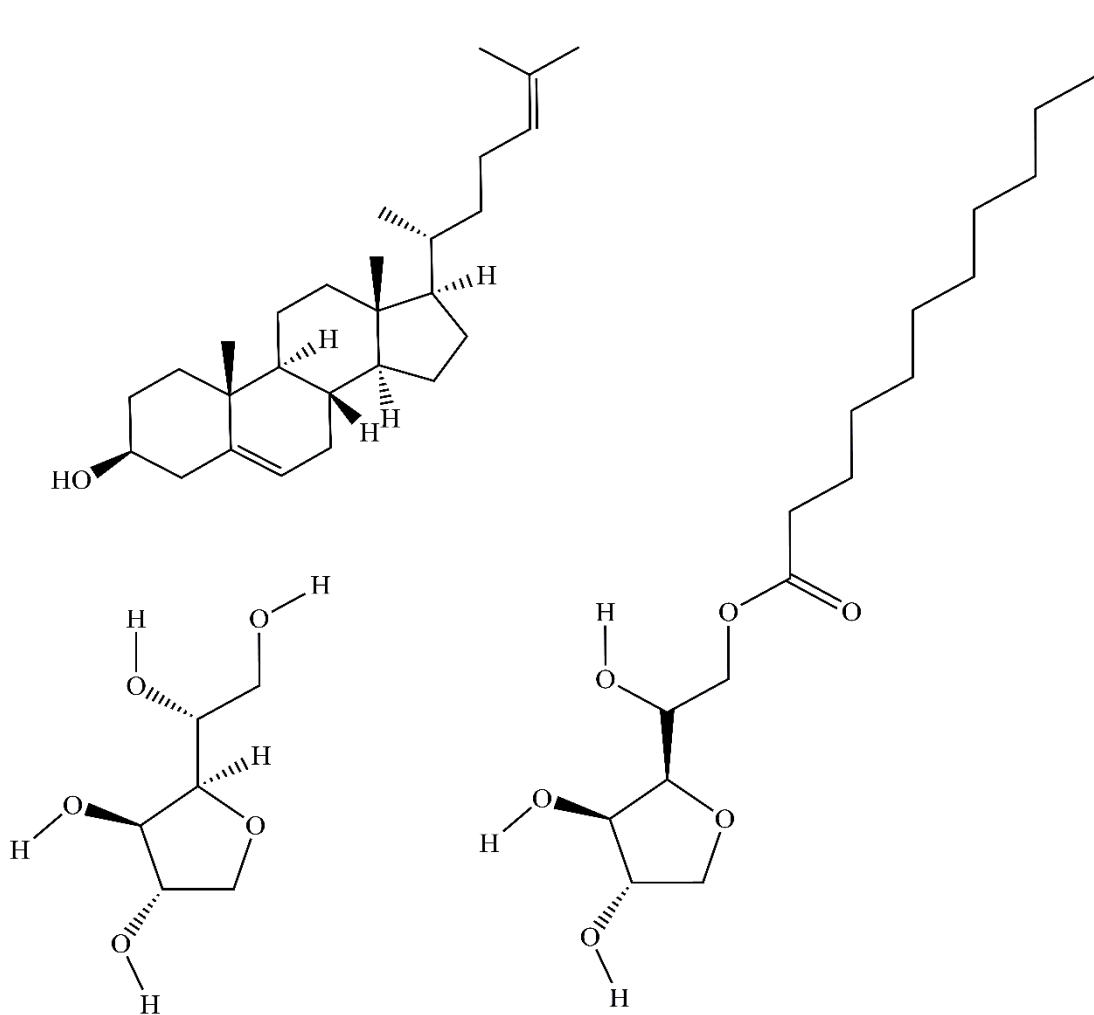
Мембрана липозома може се модификовати уз помоћ различитих органских молекула, при чему су највише коришћени стероли (холестерол, ергостерол, бета-ситостерол), полисорбати и њихови деривати.

Додатак холестерола у одређеним концентрацијама може позитивно утицати на морфолошка (облик, просторна геометрија) својства липозома. Наиме, висока концентрација холестерола у липозомима утиче на повећање величине наночестица и уређење њихове геометријске структуре, односно прелаз из неправилног у правилни, облик сфере (Kaddah и сар., 2018). Додатно, у истраживању спроведеном од стране Јовановић и сар. (2018) доказано је да смањење молског удела холестерола у липозомима смањује флуидност и повећава ригидност фосфолипидне мембране. Том приликом је утврђено да, оптимална концентрација холестерола неопходна за одржавање адекватне флуидности мембране липозома и њихове стабилности, износи 50 mol% (1:1). Сходно томе, изведен је закључак да холестерол игра кључну улогу у међуграничном простору и у ригидности мембране липозома која је условљена молским уделом модификатора, структуром и саставом липида, као и физичко-хемијским својствима инкапсулата. Додатно, нека истраживања указују да присуство холестерола у структури фосфолипидног двослоја, у концентрацији од 25% mol, може изазвати смањење оптичке густине липозомне суспензије за око 90% и дезинтеграцију липозома условљену деловањем површински активних молекула, попут натријум-додецил-сулфата, у времену од 60 минута (Deo и Somasundaran, 2003). То практично потврђује чињеницу да присуство холестерола у

структури фосфолипидног двослоја чини липозоме неактивним према анјонским површински активним материјама.

Полисорбати су емулгатори који се, претежно, користе у прехранбеном и фармацеутском инжењерству. У питању су анјонске површински активне супстанце који имају структуру налик фосфолипидима, односно у својој структури садрже функционалне групе који испољавају хидрофилни и хидрофобни карактер. Ово својство им, као класи органских липофилних супстанци, омогућава да добро стабилизују емулзије типа уље у води, као и обрнуто. На тај начин могу се добити различити прехранбени или фармацеутски производи, компактне конзистенције и задовољавајуће текстуре. Могу се користити самостално или у меши са другим анјонским и катјонским површински активним материјама, као и неким стеролима.

Са друге стране, када говоримо о дериватима полисорбата, значајно је споменути сорбитол естре. Природа ових једињења је готово идентична као и код полисорбата. У својој структури поседују хидрофилну главу и хидрофобни ланац, са 20 оксиетиленских јединица. Настају естерификацијом сорбитана (слика 1.10) масним киселинама дужег ланца, попут олеинске, стеаринске, палмитинске и слично. Назив масне киселине која учествује у процесу естерификације одређује и назив добијеног сорбитол естра. Неки од примера сорбитол естара су: SPAN 20, SPAN 40, SPAN 80 и други (Pravilović, 2016). У наставку, приказане су структуре неких, често коришћених модификатора фосфолипидне мембране, холестерола и SPAN-а 20.



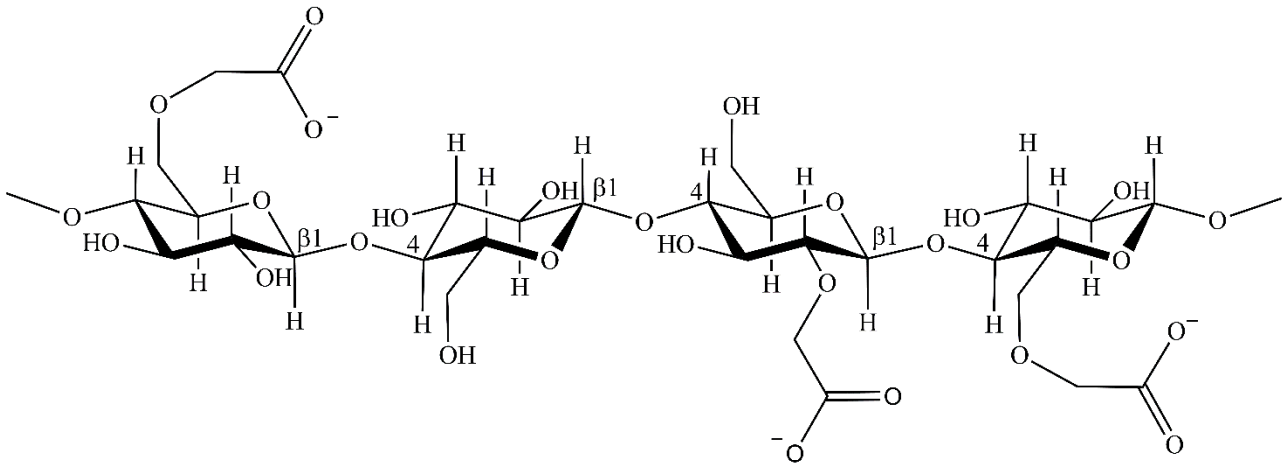
Слика 1.10. Структурне формуле молекула холестерола (горе лево), сорбитана (доле лево) и SPAN-а 20 (десно)

На крају опште дискусије о липозомима, важно је нагласити да су основна својства липозома: састав и концентрација молекула липида који чине мембрану липозома, степен инкапсулације (инкорпорације) активне супстанце у липозоме и концентрација, рН вредност липозомне суспензије, површинско (зета) наелектрисање и расподела величине честица (пречник честице и индекс полидисперзије) (Рјановић, 2010).

Имајући у виду ове чињенице, као и факторе који утичу на стабилност липозома, у пракси су разматране и реализоване различите методе заштите липозома облагањем (*coating*, енгл.) или импрегнацијом у водене и/или уљане системе да би се њихова својства очувала. Најчешћи узроци деградације липозома су липазе, нагле осцилације рН вредности и јонске јачине раствора, ултраљубичаста светлост и други чиниоци који су везани за оксидационе промене фосфолипида, који се налазе у основи ових двослојних везикула.

1.2.2. Карбоксиметил-целулоза

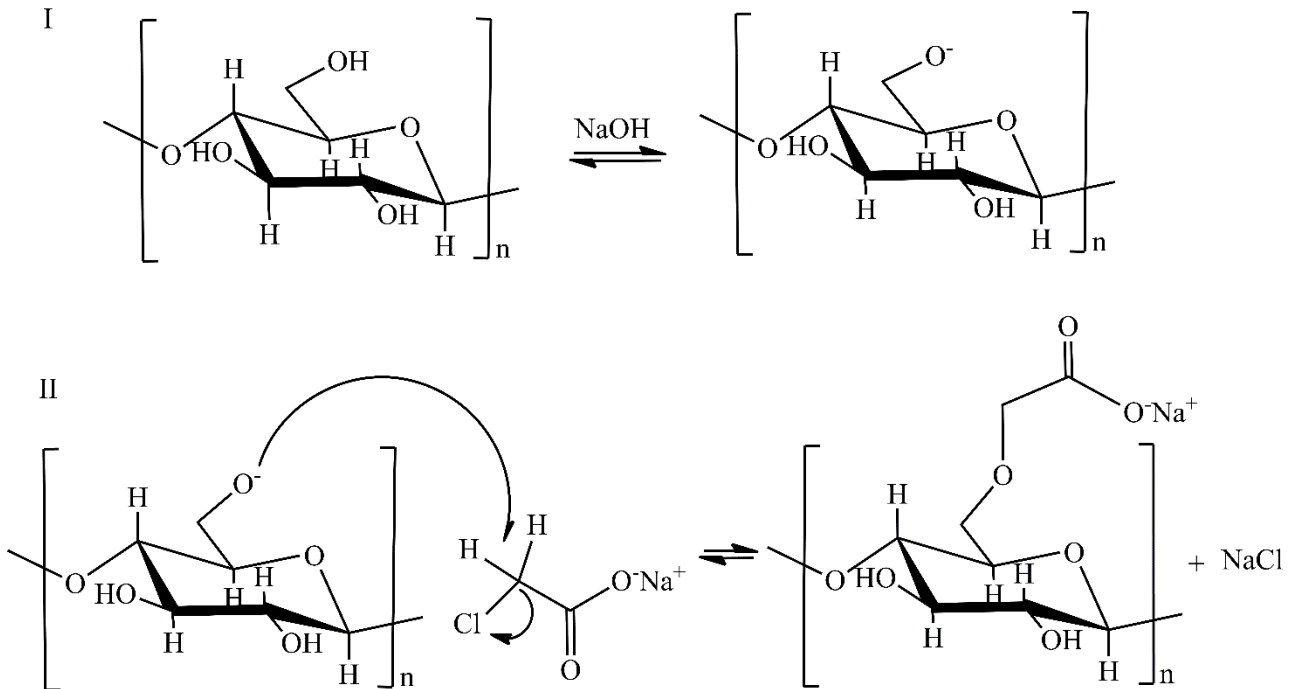
Натријумова со карбоксиметил-етра целулозе (Na-CMC, целулоза $-O-CH_2-COO^-Na^+$) натријум-карбоксиметил-целулоза (слика 1.11) настаје у реакцији између базне целулозе и натријум-хлорацетата.



Слика 1.11. Хемијска структура натријум-карбоксиметил-целулозе

У питању је бели прах, без мириса и укуса, моларне масе између 90000 и 2000000 Da, са степеном супституције у опсегу од 0,4 до 0,9 (Charpentier и сар., 1997); Pettignano и сар., 2019). Натријум-карбоксиметил-целулоза је први пут синтетисана 1918. године од стране научника Јансена (*Jansen*, енгл.). У првом ступњу синтезе, молекул целулозе се третира натријум-хидроксидом, док се у наредном ступњу врши третман са монохлорсирћетном киселином (слика 1.12) (Charpentier и сар., 1997). Степен супституције одређује физичка и хемијска својства молекула, највише растворљивост у води, која у случају натријум-карбоксиметил-целулозе износи 10 mg/ml. Такође, степен супституције варира и креће се у опсегу од 0,4 до 0,9. У структури глукопиранозне јединице, за атоме угљеника на позицијама два, три и шест везани су атоми кисеоника на којима је уведен један супституент. У глукопиранозном ланцу, карбоксиметил-целулоза има уведено карбоксиметил-групу ($-CH_2-COOH$) уместо водоника. Степен супституције за натријум-карбоксиметил-целулозу која се користи у прехранбеној индустрији је између 0,7-0,8. Степен униформности супституције дуж целокупног ланца полимера директно одређује својства и понашање у воденим системима. Својства попут течљивости и деформације које настају када се примени спољашња сила смицања условљени су моларном масом полимера и степеном супституције. У литератури се могу пронаћи подаци да карбоксиметил-целулоза са моларном масом од око 30000 Da и степеном супституције од

0,6-0,9, тзв. „натријум-карбоксиметил-целулоза средње вискозности“ гради униформне и хомогене растворе који испољавају својства тиксотропних флуида (Charpentier и сар., 1997; Pettignano и сар., 2019; Popović Kokar, 2022).

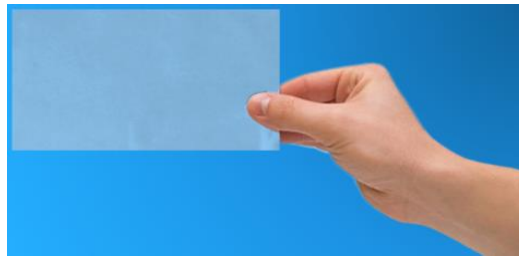


Слика 1.12. Синтеза натријум-карбоксиметил-целулозе: I – алкализација; II – етерификација; (Yáñez и сар., 2018)

Анјонска карбоксиметил-целулоза у поређењу са нејонским дериватима целулозе може снажно приањати на одређене типове биолошких површина и као таква веома је подесна са трансдермалну и трансмукозну примену. У новије време, трансдермални систем базиран на карбоксиметил-целулози умрежен поли[2-(метакрилокси)етил триметиламониум-хлоридом] користи се за отпуштање нарингенина, дилтиазем-хидрохлорида, натријум-диклофенака и куркумина (Mandal и сар., 2017; Park и сар., 2018). Такође, карбоксиметил-целулоза се успешно користи као носач у типу фластера за инкапсулацију гатифлоксацина (8-метоксифлуорокинолон), синтетичког антибактеријског лека широког спектра дејства (Ullah и сар., 2021).

1.2.3. Солагам

Солагам (*Solagum AX^R*, енгл.) је комерцијални полимерни стабилизатор и угушћивач који се интензивно користи за припрему различитих формулација у фармацеутској технологији. Представља смешу два природна полимера, ксантан гуме и гуме арабике, при чему је ксантан гума доминантна компонента у систему, која облаже, условно речено, језгро које чини гума арабика. Однос је 5:1 мас.% у корист ксантан гуме. Овај полимер је добро растворљив у води, густине 0,35-0,45 g/l, стабилан у широком опсегу рН вредности (3-12) и гради вискозне растворе (400-600 mPa·s, при концентрацији од 1% (w/w)). Структура биополимерних филмова на бази солагама (слика 1.13) је умерено конзистентна, филмови су крхки и делимично лепљиви. У комерцијалној употреби финални производ је у прашкастом облику, у виду микрочестица величине ~0,1 mm.



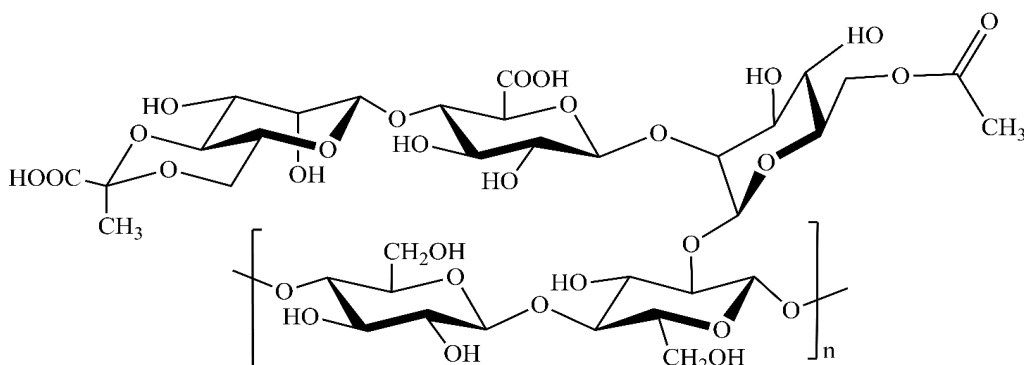
Слика 1.13. Графичка илустрација филма на бази солагама (*Solagum*TM AX, SEPPIC, 2%, (w/w))

У козметичким формулацијама, солагам се налази у концентрацијама не већим од 2,5% (w/w). Уколико се у формулацијама користи у вишим концентрацијама, може доћи до појава накнадног обојења и замућења производа. Када говоримо о стабилности, подаци из литературе указују да је овај полимер стабилан при дејству алкалија (натријум-хидроксид) и јаких оксидационих средстава (водоник-пероксид). Не деградира се под дејством површинске микрофлоре на кожи и ултраљубичастог зрачења. Широко се примењује у средствима за заштиту од сунца, у типу заштитних крема или гелова. Компатибилан је са природним бојама и пигментима, формира чисте гелове и суспензије, са добром унутрашњом расподела честица.

Солагам се користи за облагање чврстих липидних наночестица, базираних на алкилполигликозидима (Schwarz и сар., 2012) и микрочестица базираних на поли(метил) метакрилату која се примењују дермално (Bile и сар., 2016). Shrivastava и сар. (2021) су проучавали антиинфламаторна и антивирусна својства полимерних филмова базираних на смеси хидроксипропил-целулозе и солагама у третману чишћења назалне слузокоже и минимизирању тешких респираторних тегоба изазвани вирусном инфекцијом SARS-CoV-2. Норрел и сар. (2014), користе солагам као емулгатор за припрему вишеккомпонентних емулзија вода/уље/вода за дермалну испоруку ацетил-хексапептида. Солагам може побољшати текстуална својства фармацеутских производа, а пошто задовољава све нормативе Управе за храну и лекове Сједињених Америчких Држава (*Food and Drug administration*, енг.) може се користити у прехранбеним формулацијама. Овај полимерни материјал може у потпуности испољити своју функцију и стабилизovati различите системе у присуству киселина, површински активних материја и соли.

1.2.3.1. Ксантан гума

Ксантан гума (слика 1.14) је органско једињење које, припада класи сложених угљених хидрата, хетерополисахарида, које у примарној структури садржи пентасахаридне јединице формиране од две подјединице глукозе, две подјединице манозе и једне подјединице глукуронске киселине, у моларном односу 2,8:2,0:2,0 (Garcia-Ochoa и сар., 2000).



Слика 1.14. Хемијска структура ксантан гуме (Mijin i Petrović, 2022)

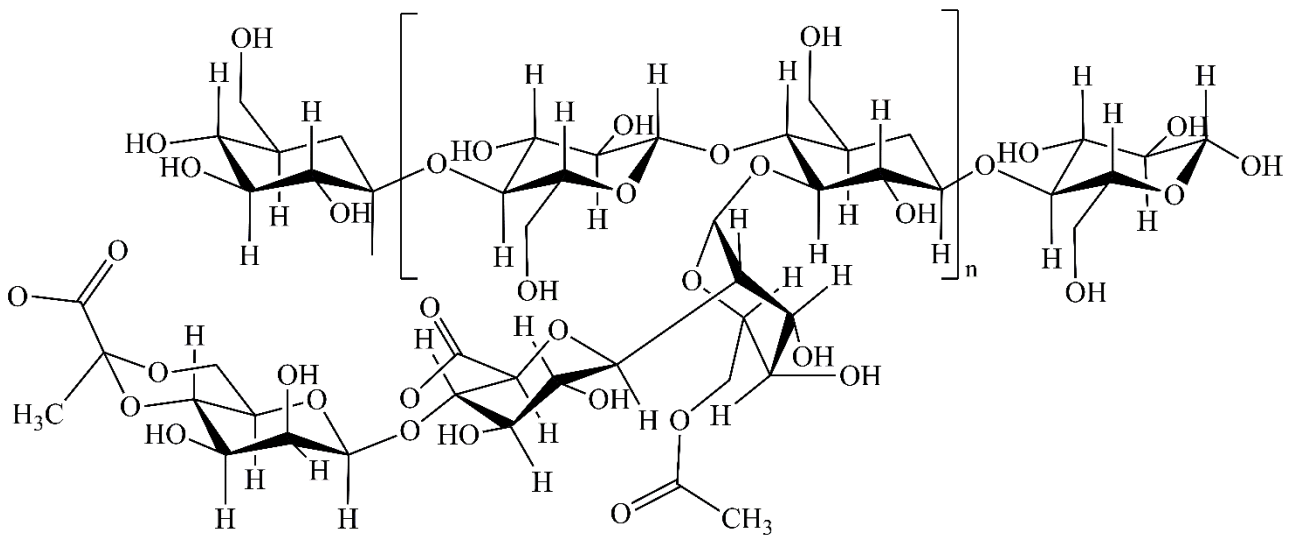
Ксантан гума је откривена почетком друге половине XX века од стране истраживача Управе за храну и пољопривреду Сједињених Америчких Држава (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, енгл.) Kumar и сар., 2018). Прва индустријска производња ксантан гуме почела је шездесетих година XX века, двадесет година касније од почетка комерцијализације декстрана (Margaritis, 1978; Kumar и сар., 2017). Ксантан гума припада класи сложених угљених хидрата, хетерополисахарида, са високим степеном биоразградивости, нетоксична је и биокомпатибилна. Добија се аеробном ферментацијом глукозе уз помоћ микроорганизама *Xanthomonas campestris*. Овај природни полимер не изазива иритацију коже или очију и дозвољен је за употребу у медицини и фармацеутској технологији од 1984. године, од стране Управе за храну и лекове Сједињених Америчких Држава (FDA – *Food and Drug Administration*, енгл.) (Kennedy и сар., 1981).

Главни ланац садржи β -D-глукозне јединице везане у положају 1 и 4. Хемијска структура главног ланца одговара хемијској структури главног ланца целулозе. Трисахаридни ланци садрже једну подјединицу D-глукуронске киселине између две јединице молекула манозе везане на O-3 позицији сваког другог остатка глукозе у главном ланцу (Garcia-Ochoa и сар., 2000). Приближно једна половина терминалне D-манозе садржи остатке пирогрожђане киселине повезане преко кето-групе на позицији 4 и 6. Јединице D-манозе везане за главни ланац садрже ацетил-групу на позицији O-6. Поред овога, присуство сирћетне и пирогрожђане киселине утиче на синтезу, тј. настанак молекула полимера који има својства анјонског полисахаридног типа (Garcia-Ochoa и сар., 2000). Ксантан гума је биополимер добро растворан у води, чија моларна маса достиже вредности и по неколико стотина хиљада. Да због врло великих и разгранатих полимерних ланаца (Le и Turgeon, 2013; Kumar и сар., 2018). Водене растворе ксантан гуме одликује псеудопластично понашање. Приликом растварања ксантан гуме у води потребно је интензивно мешање како би се спречило стварање малих грудви. Одговарајућим методама карактеризације површине молекула утврђено је да ксантан гума има хеликоидну структуру, са висином од 4,7 nm и пречником од 1,9 nm (Moorhouse и сар., 1977; Kumar и сар., 2018). Изменом услова средине (температура, pH вредност, јонска јачина) могу настати одређене конформационе промене и преласка молекула из уређене у неуређену структуру (Milas и Rinaudo, 1986). Ксантан гума је стабилна на деловање високих температура (до 90 °C) и високе концентрације натријум-хлорида (до 150 g/l) и као таква се може користити као стабилизациони агенс у виду емулгатора, згушњивача или лубриканта (Rosalam и England, 2006; Milanović, 2016). Генерално, термичка стабилност ксантан гуме након хидролизе далеко је боља него код многих других полисахарида и полимера добро растворних у води. Разлог овоме је веома уређена спирална структура која представља заштиту од деполимеризације. Такође, на вискозност раствора ксантан гуме утичу само веома високе температуре термичког третмана (стерилизација). Овај природни полимер стабилан је и у великом опсегу pH вредности. У новије време, испитиване су различите могућности примене ксантан гуме у медицини и у инжењерству ткива (Kumar и сар., 2018). Ксантан гума има ознаку E 415 и дозвољена је за употребу у индустрији хране од стране Управе за храну и лекове Сједињених Америчких Држава.

1.2.3.2. Гума арабика (арапска гума)

Прве студије молекулске структуре гуме арабике (слика 1.15) спроведене у току последње две деценије XX столећа указују да ова врста природног производа представља смешу макромолекулских угљених хидрата и биљних протеина, при чему су протеини заступљени до највише 2 мас%. Шест једињења која улазе у састав гуме арабике су: L-арабинофураноза, L-

рамноза, L-арабинопираноза, D-галактоза, D-глукуронска и 4-O-метилглукуронска киселина. Главна структурна компонента овог полимера је бочни ланац β -галактопиранозе везан 1,3-гликозидним везама на бочни ланац 1,6-галактопиранозе чији остатак чине јединице D-глукуронске или 4-O-метилглукуронске киселине (Street и Anderson, 1983; Dickinson и сар., 1991; Dauqan и Abdullah, 2013). Са становишта структуре протеинских, у мањој мери заступљених фракција у структури гуме Арабике, утврђено је присуство одређених аминокиселина, попут серина и хидроксипролина у значајном уделу (Street и Anderson, 1983). Стога, омогућено је формирање комплекса арабиногалактан-протеин, при чему је садржај азотних једињења у опсегу од 10 до 30% (Spasojević, 2021). У литератури се овај феномен дефинише под називом „плетени цвет“ (Dickinson и сар., 1991). Структура арабиногалактана има облик диска. Угљенохидратни блокови арабиногалактана су преко серина и хидроксипролина везани за полипептидни ланац протеина. Овако формиран комплекс не разлаже се под дејством протеолитичких ензима и стабилан је ширем опсегу вредности рН.



Слика 1.15. Хемијска структура арапске гуме

Раствори гуме арабике у води слабо се опиру течењу, тј. слабо су вискозни, док је њихова рН вредност око 4,5. Са друге стране, разграната структура гуме арабике омогућава стерну стабилизацију молекула приликом процеса адсорпције на граници фаза, на пример у систему уље-вода и на тај начин даје полимеру добра емулгујућа својства (Dickinson и сар., 1991). Гума арабика се користи као згушњивач или везивно средство у прехранбеној индустрији (адитив ознаке Е 414), најчешће у индустрији безалкохолних пића (Spasojević, 2021). Поред овога, овај полимер улази у састав појединих фармацеутских формулација чија је намена ублажавање инфламаторних реакција на кожи, као и поспешивање регенерације ткива у току процеса зарастања рана (Kouyada и Orsu, 2021; Spasojević, 2021). У литератури се могу пронаћи и подаци који се односе на реолошка својства гуме арабике. Наиме, раствори гуме арабике у води показују својства Њутновских флуида до концентрације од 30% (w/w). Разлог оваквом понашању је просторни распоред конституената унутар структуре молекула полимера што ће, последично, утицати на хидродинамички пречник макромолекула. Гума арабика, самостално или у комбинацији за биљним и анималним протеинима (зеин; β -лактоглобулин), се може користити као матрица за инкапсулацију различитих природних антиоксиданаса и биљних пигмената, попут епигалокатехин-галата, рутина, куркумина и карвакрола (Ribeiro и Veloso, 2021; Gao и сар., 2021; Galí и сар., 2022; Hudiyanti и сар., 2022; Sun и сар., 2022).

1.3. Сложени систем липозом-биополимер

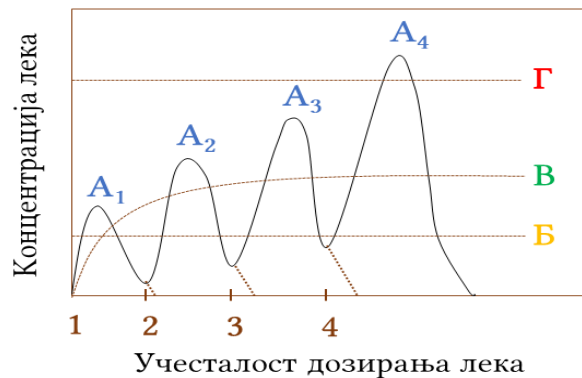
Липозоми као носачи имају неке недостатаке што ограничава њихову примену. Основни недостак је деградација под дејством ензима, ултраљубичастог зрачења и ниске рН вредности (Budai и Szogyi, 2001; Sułkowski и сар., 2005). Због тога се развијају системи у којима су липозоми дисперговани у различите форме полимерних носача. У ту сврху се као полимери најчешће користе алгинат, хитозан, пектин, карбоксиметил-целулоза и други представници хомо- или хетерополисахарида (Pjanović, 2010; Smistad и сар., 2012; Balanč, 2016; Wang и сар., 2017; Ding и сар., 2020). Потребно је развити систем који ће бити компатибилан са активном супстанцом коју треба инкапсулисати. Могуће је предвидети и оптимизовати профил отпуштања активне супстанце. У обзир треба узети растворљивост и положај инкапсулиране супстанце унутар структуре носача (у оквиру хидрофилног језгра, фосфолипидног двослоја или на граници ових двеју фаза). Пожељно је применити биодеградабилне, биокомпатибилне и нетоксичне носаче који не изискују високе финансијске издатке. Такође, важне су могућности једноставне припреме система липозом-полимер. Потребно је водити рачуна и о могућностима полимера да добро реагује са водом, да гради стабилне гелове при нижим концентрацијама и да буде инертан у срединама где преовладавају ниске вредности рН средине и присуство ензима који деградирају липозоме. Највећи број истраживања на ову тему има за крајњи циљ добијање различитих облика носача и формулација које се могу применити за оралну и трансдермалну администрацију активних супстанци. Сходно томе, систем липозом-карбоксиметил-целулоза у потпуности задовољава одређене норме и стандарде за примену у фармацеутској технологији. Понашање филмова условљено тзв. „филмогеним“ својствима (адхезивна својства, отпорност на влагу и гасове и друго). Позитивни ефекти инкорпорирања активне супстанце у филмове се најчешће огледају у порасту неке од биолошких активности (антиоксидативни потенцијал, антимикробна активност, мукоадхезивна својства и слично). Прегледом доступне литературе може се закључити да су се до данас биополимерни филмови који у основи садрже карбоксиметил-целулозу са диспергованим липозомима, претежно, користили за облагање различитих производа прехранбеног порекла, а све у циљу побољшања квалитета и безбедности (трајности) производа. Новија истраживања имају фокус на примени карбоксиметил-целулозе у трансдермалној медицини. С тим у вези, испитују се различите формулације које садрже липозоме и деривате целулозе, на пример хидроксипропилметил-целулоза. Сврха ових испитивања је постићи модификацију површинског слоја епидермиса, *Stratum corneum*-а, побољшањем одређених баријерних својстава (Takmaz и Yener, 2021; Ullah и сар., 2021) како би се омогућила што ефикаснија дифузија лека кроз кожу, имајући у виду чињеницу да је кожа слабо пропусна за велики број хидрофилних и хидрофобних супстанци.

Када говоримо о својствима биополимерних материјала за трансдермалну примену, важно је нагласити да такав материјал треба да добро приања на кожу, да буде издржљив на савијање, да онемогући накупљање гасова и воде на контактної фази (филм-кожа), да омогући постепено ослобађање активне супстанце током времена и да буде стабилан под дејством фактора из спољашње средине (светлост, ензими, патогени микроорганизми и слично). Дифузиони процеси на кожи зависе, првенствено, од механичких и реолошких својстава биополимерног филма, те је потребно оптимизовати однос растварача и полимера приликом припреме. Такође, у козметичким формулацијама често се додају различити пластификатори и модификатори површине, попут глицерола, полиетилен-гликола, пропилен-гликола, холестерола и површински активних материја („твин“, „спан“, „бриџ“). Напоследку, у *in vitro* дифузионим испитивањима, потребно је водити рачуна и о својствима синтетичке или природне мембране преко које се врши пренос масе активне супстанце (постојаност на

температури, у присуству ензима), као и о саставу медијума у којем се медикамент отпушта (рН вредност, разлика јонских потенцијала и друго).

1.4. Контролисано отпуштање

Током протеклих неколико деценија лечење разних болести код људи омогућено је употребом различитих форми фармацеутских препарата, попут инјекција, таблета, капсула, гелова, масти, раствора, вагиналних и ректалних супозиторија и друго. Ови, конвенционални фармацеутски производи се и данас могу наћи на тржишту лекова, у апотекама и њихово коришћење је омогућено са или без лекарског рецепта. Да би се постигла и одржала концентрација лека у системској циркулацији, унутар адекватног терапеутског опсега, често је потребно користити овакву форму за ослобађање лека неколико пута у току дана. То је непожељно поготово када су у питању хронична обољења, јер се остварује ефекат тзв. „клацкалице“ (слика 1.16) у телу човека (Swarbrick, 2007).



Слика 1.16. Поређење профила концентрације лека у системској циркулацији остварених употребом традиционалних облика лекова (А) и система са контролисаним отпуштањем, Б – минимална ефективна концентрација (<Б – без терапеутског ефекта), (В – контролисано отпуштање); Г – граница токсичности (>Г – нежељени ефекти лека) (Swarbrick, 2007)

Да би се ова, непожељна појава превазишла, развијене су нове технике за испоруку лекова које могу одржати терапеутску концентрацију у организму и/или циљану испоруку лека до одређеног ткива. Помаци који су начињени у развоју оваквих система допринели су настанку неколико нових облика за испоруку лекова, који пружају низ предности (Swarbrick, 2007; Рјановић, 2010):

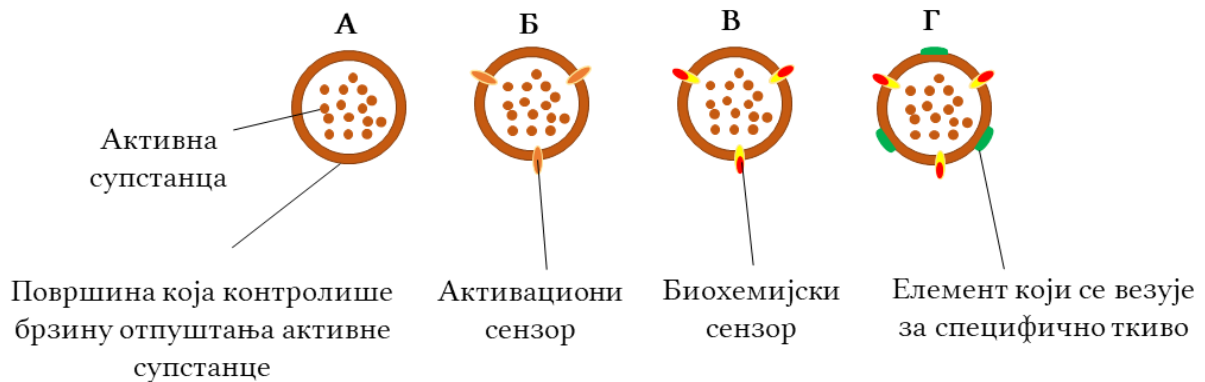
- одржавање концентрације лека унутар оптималног терапеутског опсега што је погодно у случајевима тежих болести и дугог лечења;
- побољшање односа између дозе лека и ефикасности лечења;
- смањење нежељених ефеката;
- изостанак потребе за честим дозирањем лека;
- смањење оптерећења пацијента због једноставније и комфорније примене.

Идеална форма лека, односно терапеутског средства за контролисано отпуштање треба да задовољи два услова (Рјановић, 2010):

- количина активне супстанце у току примене која се унесе у организам треба да буде довољна за цео третман, одстранивши време као фактор (погодно код болести које се дуго лече, попут дијабетеса, хипертензије, хепатитиса, панкреатитиса, нервних обољења и друго).
- други услов је да се омогући дејство лека на жељеном месту у организму.

На основу техничке усавршености системи за контролисано отпуштање могу се поделити на (Swarbrick, 2007; Pjanović, 2010):

- системи са унапред програмираном брзином ослобађања активне супстанце (слика 1.17А) – активна супстанца се отпушта програмирано са унапред дефинисаном брзином; пренос масе је једини параметар који одређује брзину отпуштања;
- активационо-модулисани системи (слика 1.17Б) – отпуштање активне супстанце условљено је неким физичким (осмотски притисак, механичка сила), хемијским (рН вредност, јонска активација) или биохемијским (активација услед деловања ензима) процесом;
- системи за контролисано отпуштање који могу обезбедити повратну информацију (слика 1.17В) – отпуштање активне супстанце унапред се иницира специфичним молекулима, тзв. „оксидачима“, при чему је брзина отпуштања, што је и у називу система дефинисано, контролисана механизмом повратне информације;
- системи за контролисано отпуштање који се могу активирати у унапред одређеном органу или ткиву (слика 1.17Г) – још увек су недовољно развијени (контрола преноса масе активне супстанце је омогућена, док је путања активне супстанце од места за дозирање до жељеног ткива непозната) (Pjanović, 2010; Balanč, 2016).



Слика 1.17. Различити системи за контролисано отпуштање активних супстанци (Pjanović, 2010; Balanč, 2016)

1.4.1. Пренос масе

1.4.1.1. Молекулска дифузија

Под појмом дифузија подразумева се пренос масе активне супстанце на молекулском нивоу у непокретним системима или у системима у којима је успостављено струјање флуида. Генерално гледано, у смеси флуида различитих концентрација, постоји природна тенденција да се разлике концентрација смање. Градијент концентрације је погонска сила која условљава кретање молекула из области веће концентрације у област мање концентрације. Математичке основе овог феномена постављали су разни научници, а најшире је прихваћена Фикова теорија преноса масе, познатија под називом први Фиков закон (1855). У условима стационарног (сталног, постојаног) преноса, флуks супстанце A једнак је односу концентрације супстанце која дифундује и растојања у којем се пренос супстанце одвија (Duduković, 2008):

$$J_{Ax} = -D_{AB} \frac{\partial C_A}{\partial x} = -C D_{AB} \frac{\partial y_A}{\partial x} \quad (J - 1. 1)$$

у којем је J_{Ax} моларни флуks $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^2\text{s}}\right]$ супстанце А у x-смеру, D_{AB} – молекулски коефицијент дифузије, а $\frac{\partial C_A}{\partial x}$ – је градијент концентрације у x-смеру, при чему је $C_A \left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$ моларна концентрација. Флуks и концентрација се могу изражавати и у масеним јединицама ($J_A \left[\frac{\text{kg}}{\text{m}^2\text{s}}\right]$; $C_A \left[\frac{\text{kg}}{\text{m}^3}\right]$). Знак минус указује да се пренос масе супстанце одвија у смеру опадања концентрације, док је правац флуksа нормалан на површину кроз коју се пренос одвија. Моларни флуks (J_{Ax}) везан је за координатни систем који се креће средњом моларном, односно средњом масеном брзином, без обзира да ли је реч о непокретном или покретном координатном систему.

Уопштено, знајући да је флуks компоненте која се креће средњом моларном (масеном) брзином флуида везан за координатни систем, можемо са сигурношћу тврдити да та вредност неће бити идентична кроз раван у непокретном координатном систему или кроз раван која се креће.

Код бинарних система, на пример, под претпоставком да нису у равнотежи концентрација, компоненте у систему крећу се одређеном брзином u_i , те се средња моларна (масена) брзина U може приказати као (Duduković, 2008):

$$U = \frac{\sum_{i=1}^n C_i U_i}{\sum_{i=1}^n C_i} = \frac{\sum_{i=1}^n C_i U_i}{C} = \sum_{i=1}^n y_i u_i, \quad i \neq 0 \quad (\text{J - 1.2})$$

при чему компонента i има брзину u_i у непокретном координатном систему i ($u_i - U$) у односу на средњу моларну (масену) брзину U .

За двокомпонентне системе моларни (масени) флуksеви у смеру x, у непокретним координатама, могу се изразити на следећи начин:

$$N_{Ax} = C_A u_{Ax} \text{ односно } N_{Bx} = C_{Bx} u_{Bx} \quad (\text{J - 1.3})$$

одакле следи да је:

$$U_x = \frac{C_A u_{Ax} + C_{Bx} u_{Bx}}{C} = \frac{N_{Ax} + N_{Bx}}{C} \quad (\text{J - 1.4})$$

те је, за смер x, флуks у координатама које се крећу средњом моларном брзином:

$$J_{Ax} = C_A (u_{Ax} - U_x) = -C D_{AB} \frac{\partial y_A}{\partial x} \quad (\text{J - 1.5a})$$

Одавде, заменом у J - 1. 3 добија се једначина за флуks у непокретним координатама:

$$N_{Ax} = -C D_{AB} \frac{\partial y_A}{\partial x} + y_A (N_A + N_B), \quad (\text{J - 1.5b})$$

док је векторски приказ:

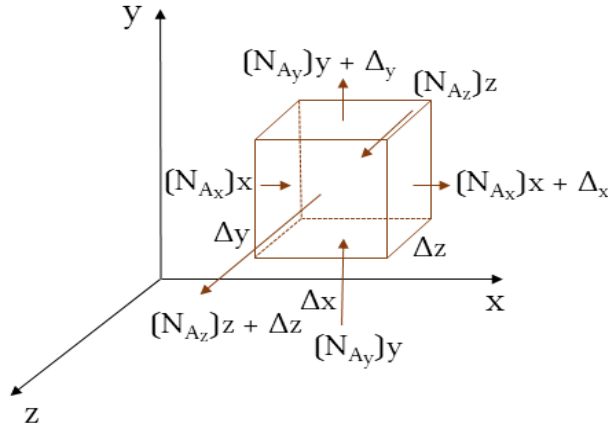
$$N_A = -C D_{AB} \nabla y_B + y_A (N_A + N_B) \quad (\text{J - 1.6})$$

1.4.1.2. Општи диференцијални биланс преноса масе

При тумачењу резултата добијених из експеримената дифузије, истраживачи наилазе на разне тешкоће. Један од проблема јесте и објашњење распореда концентрација у неком систему, за одређено време. Стога, неопходно је развити једначину поља концентрације која ближе описује споменути распоред концентрација различитих супстанци у одређеним системима. Duduković (2008) биланс масе за диференцијални елемент запремине са

димензијама Δx , Δy , Δz , у систему где имамо хомоген и изотропан флуид, дефинише као (слика 1.18):

$$\left[\begin{array}{c} \text{Нето брзина излаза-улаза} \\ \text{супстанце А из елемента} \\ \text{запремине} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{Брзина} \\ \text{акумулације А} \\ \text{у елементу} \\ \text{запремине} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Брзина настајања} \\ \text{А у хемијској реакцији} \\ \text{у елементу запремине} \end{array} \right] = 0 \quad (J - 1.7)$$



Слика 1.18. Елемент контролисане запремине (Duduković, 2008)

Према томе, биланс нето брзина излаз-улаз супстанце А и елемента контролисане запремине (за x, y и z-правац) изгледаће (Duduković, 2008):

$$(J - 1.8)$$

$$\begin{aligned} N_{Ax} \Big|_{x+\Delta x} \Delta y \Delta z - N_{Ax} \Big|_x \Delta y \Delta z & \quad (\text{x-правац}) \\ N_{Ay} \Big|_{y+\Delta y} \Delta x \Delta z - N_{Ay} \Big|_y \Delta x \Delta z & \quad (\text{y-правац}) \\ N_{Az} \Big|_{z+\Delta z} \Delta x \Delta z - N_{Az} \Big|_z \Delta x \Delta y & \quad (\text{z-правац}) \end{aligned}$$

Одавде следи:

$\frac{\partial C_A}{\partial t} \Delta x \Delta y \Delta z$ је брзина акумулације А у елементу запремине, док се брзина настајања А у елементу запремине дефинише као $r_A \Delta x \Delta y \Delta z$, при чему је r_A брзина настајања А по јединици запремине. У случајевима када је $\Delta x \rightarrow 0$, $\Delta y \rightarrow 0$, $\Delta z \rightarrow 0$, онда је (Duduković, 2008):

$$\frac{\partial N_{Ax}}{\partial x} + \frac{\partial N_{Ay}}{\partial y} + \frac{\partial N_{Az}}{\partial z} + \frac{\partial C_A}{\partial t} - r_A = 0 \quad \text{или} \quad \nabla N_A + \frac{\partial C_A}{\partial t} = 0 \quad (J - 1.9)$$

Једначина 1.9 (J - 1.9) представља генералну диференцијалну једначину за пренос масе. Пошто је $N_A + N_B = CU$, флукс је:

$$N_A = -CD_{AB}\nabla y_A + y_A CU = -C D_{AB}\nabla y_A + C_A U \quad (J - 1.10)$$

Стога је:

$$N_A = -D_{AB}\nabla^2 C_A + C_A \nabla U + U \nabla C_A + \frac{\partial C_A}{\partial t} - r_A = 0, \quad (J - 1.11)$$

при чему је $D_{AB} = const.$, $\nabla U = 0$

Одатле имамо:

$$U \nabla C_A + \frac{\partial C_A}{\partial t} = D_{AB} \nabla^2 C_A + r_A \quad (J - 1.12)$$

Упрошћавањем приказаног израза, у случајевима када нема хемијске реакције, па је члан акумулације једнак нули, добија се израз за једначину која представља други Фиков закон (Duduković, 2008):

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D_{AB} \nabla^2 C_A \quad (J - 1.13)$$

1.4.1.3. Стационарна дифузија

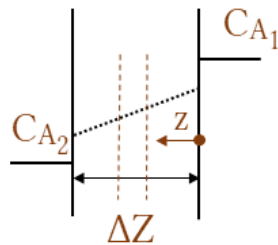
Стационарна дифузија се, по правилу, одвија у условима при којима је брзина константна вредност. То значи да је у току процеса дифузије број молекула који прелази преко неке површине (флукс) константан са временом. Погонска сила (градијент концентрације) је непромењена вредност. За стационарну дифузију важи следећа законитост (Crank, 1979):

$$J_{улаз} = J_{излаз} \quad (J - 1.14)$$

▪ Једнодимензионална дифузија кроз филм

У случајевима једнодимензионалне дифузије кроз филм, одређене дебљине – δ , пренос масе одређене компоненте А одвија се из области више концентрације у област ниже концентрације, при чему се претпоставља да је концентрација компоненте А константна са обе стране филма (Рјановић, 2010). На слици 1.19 приказана је једнодимензионална дифузија кроз филм. Концентрације компонента А са обе стране као и унутар филма су константне, те се други Фиков закон своди на:

$$\frac{\partial^2 C_A}{\partial z^2} = 0 \quad (J - 1.15)$$



Слика 1.19. Једнодимензионална дифузија кроз филм (Рјановић, 2010)

Увођењем следећих граничних услова:

$$z = 0 \quad C_A = C_{A1} \quad (J - 1.16)$$

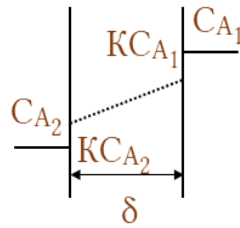
$$z = \delta \quad C_A = C_{A2}$$

Решавањем једначине J – 1.15 добија се израз за профил концентрација унутар филма:

$$C_A = C_{A1} + (C_{A2} - C_{A1}) \cdot z/\delta \quad (J - 1.17)$$

▪ Једнодимензионална дифузија кроз мембрану

Због специфичних физичко-хемијских својстава мембране, гранични услови код једнодимензионалне дифузије кроз мембрану у односу на једнодимензионалну дифузију кроз филм, су другачији. На слици 1.20 приказана је једнодимензионална дифузија кроз мембрану.



Слика 1.20. Једнодимензионална дифузија кроз мембрану (Рјановић, 2010)

У случају једнодимензионалне дифузије кроз мембрану, гранични услови су следећи:

$$z = 0 \quad C_{Am1} = K C_{A1} \quad (J - 1.18)$$

$$z = \delta \quad C_{Am2} = K C_{A2}$$

При чему су C_{Am1} и C_{Am2} су концентрације у мембрани, док је K коефицијент расподеле који представља равнотежни однос концентрације компоненте А у мембрани и концентрације компоненте А у раствору, који је у контакту са мембраном. Из овога следи да је профил концентрације једнак (Рјановић, 2010):

$$C_A = K C_{A1} + K(C_{A2} - C_{A1}) \cdot z/\delta \quad (J - 1.17)$$

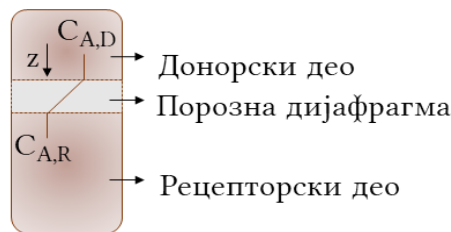
Са друге стране, флуks компоненте А кроз мембрану може се изразити на следећи начин:

$$J_A = DK/\delta \cdot (C_{A1} - C_{A2}) \quad (J - 1.18)$$

Члан DK се назива – пропустљивост мемbrane, док је величина $= DK/\delta$ у стручној литератури дефинисана под називом коефицијент пермеабилности (Рјановић, 2010).

- Једнодимензионална дифузија кроз ћелију са дијафрагмом

Ћелије са дијафрагмом (препреком – слика 1.21) имају употребу у истраживањима у фармацеутској технологији, за одређивање профила отпуштања активне супстанце (лека) у системима који симулирају услове на кожи.



Слика 1.21. Приказ једнодимензионалне дифузије кроз ћелију са дијафрагмом - препреком (Balanč, 2016)

Францова дифузиона ћелија представља модел ћелије са препреком (слика 1.22). Израђена је од стакла и састоји се из два дела, доноског и рецепторског, у којима се налазе раствори различитих концентрација. Францова дифузиона ћелија најчешће се користи за одређивање коефицијената дифузије из чврстих и получврстих материјала или суспензија. Доноски и рецепторски део ове апаратуре раздвојени су мембраном, која у зависности од типа експеримента може бити израђена од различитих материјала. Мембрана је порозна по целој својој површини. Ћелија поседује и бочну стаклену цев која извире из рецепторског дела помоћу које се, у одређеним интервалима током трајања експеримента, узоркује аликвот који представља раствор непознате концентрације активне супстанце коју је потребно анализирати

(квантификовати). На овај начин омогућено је ефикасно одређивање промене концентрације активне супстанце са временом у рецепторском делу ћелије (Рјановић, 2010; Баланч, 2016).

Ако претпоставимо да је дифузија кроз ћелију са препреком стационарног типа, одатле произилази следеће установљење. Број одређених молекула које прелазе преко неке површине - препреке (флукс), има исту математичку изведбу као и у случају стационарне дифузије кроз филм и мембрану (Рјановић, 2010):

$$J_A = DK/\delta (C_{A,D} - C_{A,R}) \quad (J - 1.19)$$

Биланс масе:

$$V_D \frac{\partial C_{A,D}}{\partial t} = - A \cdot J_A \quad (J - 1.20)$$

$$V_D \frac{\partial C_{A,R}}{\partial t} = A \cdot J_A \quad (J - 1.21)$$

$$\frac{\partial C_{A,R}}{\partial t} = - A \cdot J_A / V_D \quad (J - 1.22)$$

$$\frac{\partial C_{A,R}}{\partial t} = A \cdot J_A / V_R \quad (J - 1.23)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} (C_{A,D} - C_{A,R}) = - A J_A \cdot (1/V_D + 1/V_R) \quad (J - 1.24)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} (C_{A,D} - C_{A,R}) = - A \cdot DK/\delta \cdot (C_{A,D} - C_{A,R}) \cdot (1/V_D + 1/V_R) \quad (J - 1.25)$$

$$\partial(C_{A,D} - C_{A,R})/(C_{A,D} - C_{A,R}) = - D \cdot \beta \cdot \partial t \quad (J - 1.26)$$

A - површина препреке (дијафрагме)

$$\frac{\partial}{\partial t} (C_{A,D} - C_{A,R}) = D \cdot \beta \cdot (C_{A,D} - C_{A,R}) \quad (J - 1.27)$$

Одакле следи:

$$\beta = \frac{AK}{\delta} \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_R} \right), \quad t = 0, \quad C_{A,D} - C_{A,R} = C_{A,D}^0 - C_{A,R}^0 \quad (J - 1.28)$$

β - геометријска константа (променљива величина - услови система диктирају њену промену)

$$\int \partial(C_{A,D} - C_{A,R})/(C_{A,D} - C_{A,R}) = - D \cdot \beta \int_0^t dt \quad (J - 1.29)$$

$$\log (C_{A,D} - C_{A,R})/(C_{A,D} - C_{A,R}) = - D \cdot \beta \cdot t \quad (J - 1.30)$$

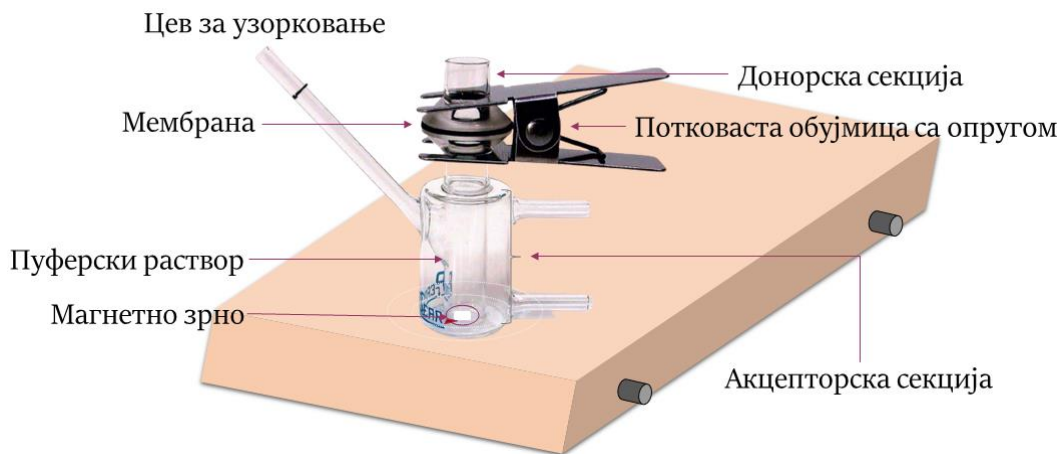
Интеграцијом израза написаном у једначинама 1.28-1.30, за наведене услове, добија се израз за израчунавање ефективног коефицијента дифузије (Mills и сар., 1968; Рјановић, 2010):

$$(C_{A,D} - C_{A,R} / C_{A,D}^0 - C_{A,R}^0) = e^{-\beta D t}, \quad (J - 1.31)$$

односно:

$$D_{eff} = \frac{1}{\beta t} \log (C_{A,D} - C_{A,R} / C_{A,D}^0 - C_{A,R}^0) \quad (J - 1.32)$$

D_{eff} - ефективни коефицијент дифузије



Слика 1.22. Францова статичка дифузиона ћелија

1.4.2. Контролисано отпуштање активних супстанци и дифузија лекова кроз кожу

Контролисано ослобађање активне супстанце у времену (иницијално до $2/3$ ослобођене активне супстанце) пропорционално је квадратном корену времена, при чему ова тврдња важи, искључиво, када је овај процес контролисан молекулском дифузијом (Higuchi и Higuchi, 1960a, 1960b; Рјановић, 2010). Ова тврдња не важи у хидрофилним полимерним системима, јер том приликом долази до промене волумена полимера, што мења његова општа физичко-хемијска својства и директно утиче на процес ослобађања активне супстанце (Рјановић, 2010). Овакве појаве предмет су многобројних истраживања и у литератури се везују за појам аномалне, „не-Фикове дифузије“ (non-Fick diffusion, енгл.)

Новија испитивања контролисаног отпуштања активних супстанци кроз кожу свде се на симулацију трансдермалног процеса преноса тако што се у експериментима користе мембране налик хуманој кожи, одговарајуће структуре и порозности. С тим у вези, креирају се и истовремено примењују различити модели описивања кинетике дифузије, при чему су најшире прихваћени „Хигучијев“ (Higuchi, 1961) и „Пепасов“ (Peppas, 1985) модел.

У испитивањима оваквог типа посебно се у обзир мора узети чињеница да је кожа, као један вишеслојан систем, непропусна за липофилне и за неке хидрофилне супстанце. Ово својство условљено је хисто-физиолошким својствима коже, превасходно, због заштитне улоге коју овај орган поседује.

Апликација лека, односно терапеутског средства преко коже назива се топикалном, а пренос масе активне супстанце кроз анатомске слојеве коже назива се трансдермални пренос (Рјановић, 2010).

Дифузија активних супстанци кроз кожу може се описати првим Фиковим законом дифузије, а заснована је на тврђењу да се удео активне супстанце на површини коже не мења значајно са временом. Када се испитивања, у реалним условима, изводе уз помоћ Францове дифузионе апаратуре, веома важан фактор је коефицијент дифузије активне супстанце.

Због самих баријерних својстава коже, веома је тешко оптимизовати процес дифузије активне супстанце. *Stratum corneum*, први површински слој коже, представља највећи отпор дифузији активне супстанце. Овај слој је липофилног карактера, изграђен од липида изнад којег се налази слој корнеоцита у чијој основи су протеини. Оваква структура, повећава

„вијугавост“ мембране која је праћена истовременим смањењем пермеабилности (Walicka и Iwanowska-Chomiak, 2018).

У савременој медицини, лекови се могу на различите начине администрирати у системску циркулацију, али је најједноставнији и најнеинвазивнији трансдермални поступак апликације. Сходно овоме, израђују се различити системи за контролисану испоруку активних супстанци кроз кожу који морају задовољити услов биокомпатибилности са органом. Нарочито су за овакву примену погодне фосфолипидне честице – липозоми и нанолипозоми, узимајући у обзир њихову структуру и липофилну природу. Kirjavainen и сар. (1999) проучавали су интеракције између липозома изграђених од фосфолипида и липида коже из рожнатог слоја. Такође, испитиван је утицај липозома на пермеабилна својства коже. Том приликом утврђено је да када су липозоми дисперговани у воденим системима не долази до значајних промена пермеабилних својстава коже. Супротно овоме, када су липозоми дисперговани у системима разблаженог раствора етил-алкохола (32%, v/v) уочавају се промене пермеабилних својстава коже и, самим тим, пропустљивост појединих активних супстанци значајно је повећана. Пропустљивост се, исто тако, повећавала са повећањем концентрације етил-алкохола у систему. Ово су, такође, потврдиле и студије конфокалне микроскопије Kirjavainen и сар. (1999). Још једна од претпоставки која је предмет научних дискусија јесте деформација честице кроз кожу приликом проласка кроз *Stratum corneum*. Наиме, из појединих истраживања произилазе тврдње да приликом таквог процеса дифузије активне супстанце кроз кожу долази до реверзибилне деформације носача (Sevc & Blume, 2004; Рјановић, 2010). Додатно, неке студије анализирају употребу и ефикасност деформабилних липозома и липозома са етил-алкохом (етозома) за инкапсулацију и контролисано отпуштање кетотифена и кофеина (Elsayed и сар., 2006; Pilch и Musiał, 2018; Abd и сар., 2021). Испитан је ефекат пенетрације лекова кроз модел животињске коже у току времена, као и утицај додатка појачивача пенетрације, и „активатора ивица“ (*edge activators*, енгл.) на флексибилности и пермеабилност фосфолипидног двослоја деформабилних липозома. Предности додатка етил-алкохола у липозоме огледају се у повећању биодоступности компонента које су слабо растворљиве или потпуно нерастворљиве у води. Потенцијално, овакви липозоми повећавају адсорпцију лека, смањују нежељене ефекте на кожи и хидратацију рожнатог слоја коже. Супротно, недостаци примене липозома са етил алкохом огледају се у денатурацији протеинских фракција у оним случајевима када су ове компоненте инкапсулиране у споменуте наночестице.

1.4.3. Биополимерни филмови као системи за контролисано отпуштање активних супстанци

У козметологији, један од ограничавајућих фактора примене течних и получврстих формулација за дермално и трансдермално ослобађање фармацеутски и биолошки активних састојака је њихово лако спирање са коже при одржавању хигијене тела. Због тога, врло мало фармацеутских формулација доспе и одржи се на тржишту. Стога, као једно од потенцијалних решења јесу формулације које приликом контакта са кожом очвршћавају и у ту групу се, у најширем смислу, сврставају и биополимерни филмови.

У последње време, веома су атрактивни биополимерни филмови намењени за негу рана на кожи. Уз помоћ филма, ране се могу затворити и заштити од потенцијалних инфекција. У продаји се биополимерни филмови могу наћи под различитим комерцијалним називима, попут „Liqui-Patch“ и „Durapeel“, за контролисано ослобађање ривастигмина, тестостерона, тербинафина, холекалциферола и слично.

У свету, у протеклом периоду, различите истраживачке групе радиле су на развоју формулација у виду биополимерног филма за инкорпорацију различитих типова нестероидних антиинфламаторних лекова и њихову различиту примену (трансдермална, назална, окуларна и слично) (Patel и сар., 2009; Samad и сар., 2009; Sharma и сар., 2016; Torres-Martínez и сар., 2018; Da Silva и сар., 2020). Тема је нарочито интересантна када је акценат формулације на остваривању продуженог отпуштања медикамента. Наиме, својства филма у погледу времена сушења, дебљине и масе, реолошких перформанси, приањања и ширења, адхезивности, пропустљивости за гасове и водену пару, хомогености и отпорности на деформацију су од суштинског значаја. Такође, развијене формулације не би требало да садрже токсичне или алергене састојке. У савременој клиничкој пракси чешће се прибегава дизајну формулација за контролисано ослобађање липофилних супстанци у односу на хидрофилне. Потенцијално објашњење ове појаве налази се у чињеници да ослобађање хидрофилних активних супстанци, неретко, није потребно додатно успоравати будући да оне и саме слабо продиру кроз *Stratum corneum*. Поред овога, формулације које садрже високо осетљиве органске молекуле, због свог незавидног „пенентрационог капацитета“ не могу дуго остати на кожи, што доводи до тежег продирања кроз слојеве органа и самим тим онемогућава постизање терапеутског ефекта. Са друге стране, пенентрација у *Stratum corneum* има ограничења у погледу количине лека која се може апсорбовати. Наиме, транспорт лекова кроз *Stratum corneum* одвија се трансепидермално, трансфоликуларно и трансгладуларно, те ће се дизајн носача у виду филма бирати на основу пенентрационог механизма успостављеног приликом продирања лека (Dellali и сар., 2021).

Избор полимера неопходног за израду биополимерног филма од великог је значаја. С тим у вези, полимери који се користе у за израду филма могу се користи индивидуално или у виду бленда, односно смеше (Batinić и сар., 2023). Такође, важно је нагласити да ће избор полимера који се налази у основи структуре филма, касније имати утицаја на флексибилност, дебљину, транспарентност и резистентност добијеног производа. Полимери растворљиви у води имају изражена хидрофилна својства и многи од њих нису погодни у погледу биокомпатибилности са кожом у конвенционалним формулацијама за топикалну примену, али су са друге стране идеални за формулације у којима лек пенентрира брзо кроз *Stratum corneum*. Поред тога, биополимерни филмови на бази хидроксиметилцелулозе подесни су за повећање одрживости термоемулзија добијених термогелирањем. Сходно томе, код оваквих система циљ је да се у самој формулацији створи резервоар лека, за који хидрофилни филмови сами по себи нису погодни. Са друге стране, полимери слабо растворљиви у води формирају водоотпорне филмове високе одрживости, али су често крхи и нефлексибилни, што отежава приањање на кожу и узрокује урушавање формулација. Да би се повећала уједначеност филма и његова флексибилност, додају се пластификатори или се полимер комбинује са полимером растворљивим у води (Dellali и сар., 2021).

У будућности ће на избор полимера неопходног за израду биополимерних филмова у великој мери утицати и фактори везани за очување животне средине, како би се генерисање микрополимера и, генерално, накупљење синтетичких производа у хидро- и биоекосистемима, кроз процесе прања, абразије и падавина, свело на најмању могућу меру. У том смислу, филмови који у основи садрже биодеградабилне полимерне материјале, попут скроба, алгината и целулозе биће у фокусу развојних програма у будућности.

Биополимерни филмови који у основи своје структуре садрже хетерогене полисахариде представљају једну од највише експлоатисаних група фармацеутских препарата у биомедицини, понајвише због њихове нетоксичности, биоразградивости, сличности у погледу структуре са природним ткивима, ниске имуногености и могућности да се њихове функционалне

групе модификују како би се добили системи за контролисано отпуштање са побољшаним физичко-хемијским својствима (Pünnel и Lunter, 2021). Полисахариди нуде широк спектар различитих функционалности и разноликости у структури због променљиве моларне масе и бројних функционалних група са високим степеном реактивности (амино, карбоксилне, хидроксилне, карбонилне и друго).

1.4.3.1. Биополимерни филмови на бази карбоксиметил-целулозе за контролисано отпуштање активних супстанци

Примери савремених трансдермалних система су биополимерни филмови изграђени од етил- и хидроксипропилметил целулозе за инкапсулацију фуросемида (Patel и сар., 2009), затим филмови на бази карбоксиметил-целулозе и натријум-алгината са инкапсулацију дилтиазема (Anirudhan и сар., 2018), као и филмови на бази карбоксиметил целулозе који садрже мултиламеларне липозоме са инкапсулираним хидролизатом колегена (Marín-Peñalver и сар., 2019).

Међу различитим биоразградивим филмовима, биополимерни филмови засновани на карбоксиметил-целулози једни су од најперспективнијих, поготово када се користе за израду антимикуробних препарата, затим препарата за негу оштећеног епитела коже, као и за израду амбалажних материјала за потребе паковање хране (Kanikireddy и сар., 2020). Нарочито су апликативни због добре растворљивости у води, затим могућности да образују компактан филм – омотач, као због и способности да граде стабилне колоидне растворе. Врло често се за израду биополимерних филмова који у основи садрже карбоксиметил-целулозу користи метода заснована на изливању раствора полимера у калуп. Принципијелно, неопходно је подесити адекватан однос између полимера и растварача, и услове растварања (брзина мешања и температура). Након добијања хомогеног раствора, у зависности од захтева експеримента, полимерни раствор се може модификовати додатком другог полимера, умрежавајућег агенса или пластификатора. Тако добијени полимерни раствор излива се у калупе или геометријски адекватне посуде и суши у условима контролисане температуре и релативне влажности ваздуха. Такође, након сушења, биополимерни филмови се морају адекватно чувати (на тамном месту, без влаге и реактивних хемијских агенаса). У литератури, се превасходно, у зависности од намене крајњег производа, могу се пронаћи описи различитих типова биополимерних филмова који су израђени од карбоксиметил-целулозе. Тако, Tufan и сар. (2017) синтетисали су биополимерни филм на бази карбоксиметил-целулозе добијене из стабилке сунцокрета. Поред овога, ранија истраживања на тему својстава биополимерних филмова на бази карбоксиметил-целулозе указују да овакве материјале одликује изузетно повољна реологија, механичка отпорност и снажне баријерне перформансе (Kanikireddy и сар., 2020). Додатно, научно је установљено да целулоза и њени деривати могу испољити својства везивних агенаса када улазе у састав композитних полимерних система (Khalil и сар, 2017). Такође, утичу на побољшање термичких својстава. Vasu и сар. (2018) израдили су биополимерне филмове на бази карбоксиметил-целулозе и полиетилен-гликола у виду завојних материјала који се користе за третман рана на кожи код људи оболелих од дијабетеса. Даље, Azarifar и сар. (2019) оптимизовали су производњу нанокомпозитних филмова који у основи садрже бленд карбоксиметил-целулозе и желатина, модификованог влакнима хитина, за инкапсулацију етарског уља семена ајована (*Trachyspermum Ammi*, лат.). Lan и сар. (2018) израдили су материјал за паковање хране базиран на смеси карбоксиметил-целулозе, алгината и хитозана који показује изразита механичка својства и антимикуробни потенцијал према бактеријским сојевима *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Слично овоме, Abdollahi и сар. (2019) развили су биокомпозитни филм базиран на карбоксиметил-целулози и агар-агару са инкапсулираним

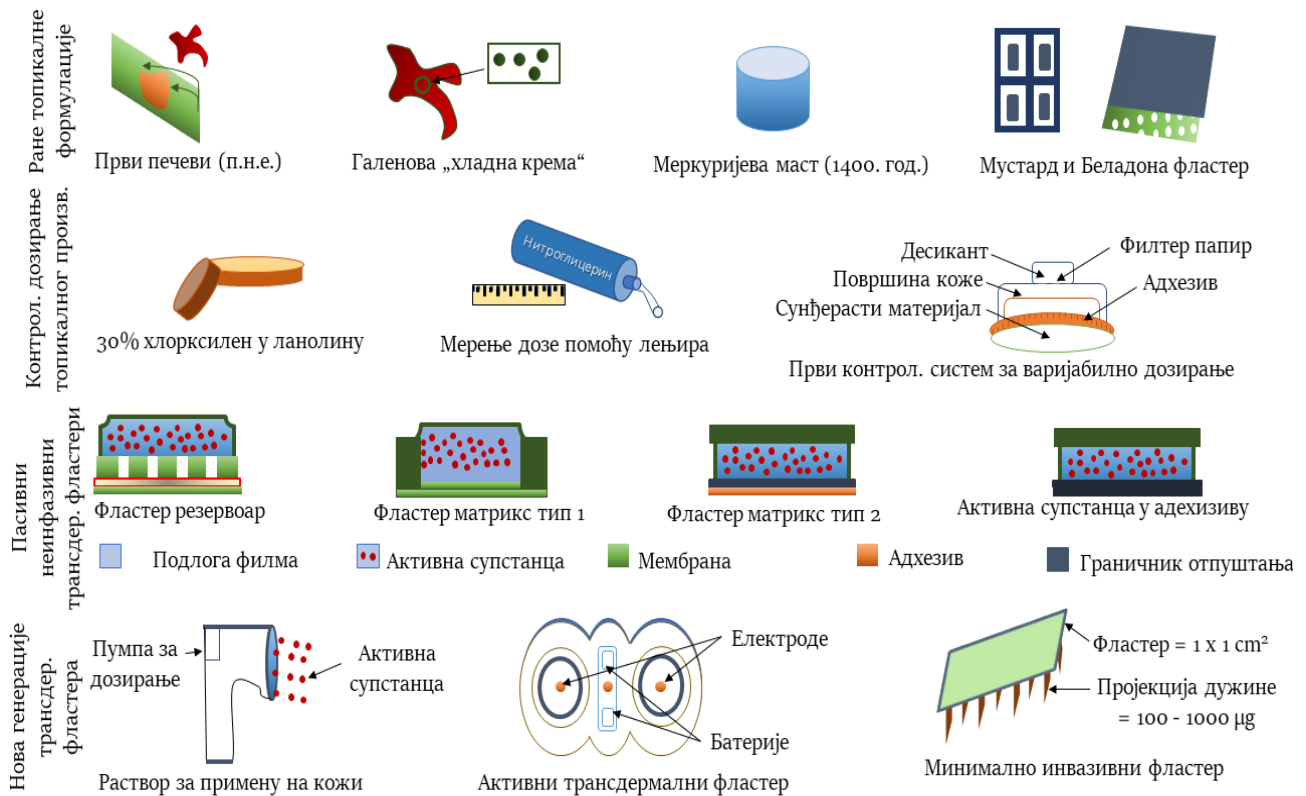
етарским уљем планинског чубра (*Satureja hortensis*) који је испољавао антимикробна својства на грам позитивне сојеве бактерија. Тада је, као закључак истраживања, утврђено да додаток споменутог етарског уља повећава пропустљивост за водену пару у материјалу, и антимикробни потенцијал, уз истовремени пад баријерних својстава и затезне чврстоће биополимерног филма.

1.4.4. Трансдермални системи за контролисано отпуштање активних супстанци

1.4.4.1. Откриће, развој и физиолошки аспекти употребе трансдермалних система

Прве трансдермалне формулације (*Emplastra*, лат.) израђиване су грубо и представљале су смешу различитих састојака добијених из природних производа и њихова географска постојбина везује се за древну Кину и Египат. Тако су, најранији представници препаративних и декоративних козметичких производа, попут крема, масти, помада, руменила, пудера, боја за нокте и очи, као и облога и завоја, садржали у основи природне производе и смеше природних производа, попут девичанских уља руже, горког бадема, нане, маслине, рицинуса и сусама, као и чврсте масти, и лој од животиња. Надасве, добро познати „Елбес Папирус“ (*Elbes Papyrus*, лат., око 1500. п. н. е.) који представља компилацију медицинских текстова, садржи приближно седам стотина рецепата за справљање разних лекова које су народи античког Египта у току живота користили за лечење коже. Те смеше су, у изворном облику, дисперговане унутар структуре лепљивих, биљних (гумених) подлога и као такве наносене на комад тканине или хартије (Chien, 1987). Овако справљене формулације представљају претечу данашњих медицинских трансдермалних фластера (*Emplastra transcutanea*). Нешто касније, у средњем веку, у време Парацелзуса (*Paracelsus*, енгл.) своју намену нашли су и медицински гипсеви (*Emplastrum opodeldoch*, лат.) који су садржали никотин изолован из биљака. Медицински гипсеви са никотином користили су се у циљу испољавања локалног анестетичког дејства (Aiache, 1984). У новије доба, тежило се развијању једноставнијих форми медицинских трансдермалних фластера који у основи садрже једну активну супстанцу. У вези с тим, Фармакопеја Уједињених Нација (*United States Pharmacopoeia – USP*, енгл.) укључује употребу беладоне, хомеопатског лека који се прави од велебиља (*Atropa belladonna*) и који испољава локално аналгетичко дејство. Такође, наведена фармакопеја препоручује употребу слачице (*Sinapis alba* L.) као локалног иританса и салицилне киселине која делује као кератолитички агенс (Pfister, 1997).

Основни концепти савремене трансдермалне медицине темеље се на поставкама из Медицинског канона (*Canon of Medicine*, енгл.). Наиме, споменуто дело садржи постулате које је поставио познати персијског лекар Авицене (980-1037). Главне поставке заснивају се на начелу да се трансдермална примена лека потенцира у ситуацијама када је потребно испољити системско дејство оних типова лекова који се не смеју конзумирати орално. Својевремено, одређене формулације трансдермалних фластера и омотача у својој структури садржале су смеше сумпора и катрана који су се користили за лечење ишијаса, болести зглобова и слично (Moghimi и сар., 2011). Међутим, рутинска употреба трансдермалних система за испоруку лекова постала је уобичајена пракса тек у другој половини двадесетог века и то тек када су се створили услови за прецизну и поновљиву администрацију активне супстанце кроз кожу и постизање системског ефекта деловања (Pastore и сар., 2015). Као један од првих модела активних супстанци коришћен је рутин, полифенолно једињење из групе природних антиоксиданаса, флавоноида (Pastore и сар., 2015). На слици 1.23 приказана је еволуција трансдермалних фластера у временском раздобљу од праисторије до савременог доба.



Слика 1.23. Еволутивни развој трансдермалних фластера (Pastore и сар., 2015)

Научници Вурстер (*Wurster*, енгл.) и Крамер (*Kramer*, енгл.), почетком шездесетих година XX века спровели су експерименталну студију која објашњава дифузију естара салицилне киселине кроз кожу и њихову апсорпцију у системској циркулацији. Студија је имала задатак да дефинише носач и дозу активне супстанце која се отпушта, као и да расветли фармакокинетiku отпуштене супстанце, односно време њеног задржавања у организму (што се може утврдити на основу концентрација екскретираних салицилата у урину). Истраживање је спроведено на групи добровољаца којима је у пределу воларне подлактице постављена дифузиона ћелија се естрима салицилне киселине. Тада је утврђено да је степен апсорпције лековите супстанце, свакако, условљен површином ћелије у којој се одвија дифузија и степеном хидратације коже (*Wurster* и *Kramer*, 1961).

У савременој клиничкој пракси добро је познато да флуks пенетрације активне супстанце кроз кожу умногоме зависи од места примене (*Roberts*, 2007). Међутим, анатомско-физиолошка својства коже неких регија тела, попут рамена, надлактице или груди, не разликују се значајно, те нема ни значајних промена у вредностима флуksа пенетрације активне супстанце (*Roberts*, 2007). У прилог овој чињеници, *MacGregor* и сар. (1985) утврдили су да се концентрација клонидина у крвној плазми, примењеног у облику трансдермалног фластера са клонидином (*Catapres®*, *Alza Corporation, USA*) не разликује битно када се измени место примене трансдермалног препарата. Када говоримо о безбедности примене трансдермалних фластера веома је важно нагласити да је удео безбедности за системску перкутану апсорпцију активне супстанце присутне у фластерима најмање десет пута већи, у односу на максималну дозу активне супстанце, апликамента, која се сме наћи у системској циркулацији. Међутим, овај безбедносни оквир се у највећој мери односи на апликацију препарата на кожи одраслих људи. У прилог овој тврдњи, *Liebelt* и *Shannon* (1993) утврдили су да многе активне супстанце које улазе у састав топикалних препарата, попут метил салицилата, камфора, имидазолена или бензокаина могу изазвати тровање код деце при неконтролисаној

конзумацији (случајно гутање). У литератури се могу пронаћи подаци везани за трансдермалну апликацију кофеина и теофилена код прерано рођене деце, због немогућности да се ове активне супстанце администрирају орално (Barrett и Rutter, 1994). Ово, свакако, представља безбедносни ризик у техници апликације лека, будући да је кожа новорођенчади недовољно развијена по рођењу.

У медицинским испитивањима која за сврху имају испитивање фармакокинетичких својстава лекова (максималне концентрације активне супстанце, проценат трансдермалне површине фластера који приања на орган, као и оквирни период употребе) предуслов је испуњавање одређених регулативних услова, како би се лек или медицинско средство нашло у широкој употреби. Тако, за евалуацију ефикасности финалног трансдермалног фластера користи се неколико стандардних тестова (Minghetti и сар., 2004).

- примарни тест квалитета производа (опис и визуелни преглед, концентрација лека, присутност нечистоћа, униформност у начину дозирања, садржај резидуалног растварача, својства хладног течења, микробиолошка ограничења и друго);
- секундарни тест квалитета производа укључују садржај заостале воде у систему (за трансдермалне фластере чији резервоари садрже разблажене растворе алкохола), податке везане за величину честица (у случајевима када је активна супстанца суспендована у структури трансдермалног фластера), тест формирања кристала (када трансдермални фластер у својој структури садржи растворљиву активну супстанцу) и тест цурења активне супстанце (за трансдермалне фластере у чијим резервоарима је активна супстанца у течном облику) (Van Buskirk и сар., 2012).
- *In vitro* тест дејства активне супстанце најчешће укључује три теста: *in vitro* отпуштање активне супстанце, *in vitro* тест пермеације активне супстанце и *in vitro* тест адхезије. Тестови *in vivo* дејства активне супстанце најчешће се преклапају са *in vitro* тестовима адхезије, који укључују могућност једноставног уклањања трансдермалног фластера након употребе, процену афинитета препарата према хуманој кожи, односно правилно приањање на орган, као и стабилност система у виду могућности да се одржи на месту на којем би иницијално био постављен током читавог терапијског процеса.

У данашње време развој трансдермалне медицине изискује употребу неинвазивних техника испоруке лекова, које истовремено треба да омогуће ефикасну администрацију активних супстанци са ниским флуksom пенетрације и слабом потентношћу. Нека научна истраживања из протекле деценије предвиђају масовнију употребу система са микроиглицама (*microneedles*, енгл.) за испоруку вакцина, опоидних антагониста и синтетских паротироидних хормона за употребу у превенцији вирусних обољења, болести алкохолизма, остеоопорозе и друго (Wermeling и сар., 2008; Daddona и сар., 2011; Quinn и сар., 2014). Исто тако, трансдермални системи са микроиглицама могу се користити и у медицинској педијатрији за превенцију поремећаја пажње код пубесцената и адолесцената изазваном високом хиперактивношћу (Luan и сар., 2017).

1.4.4.2. Примери употребе трансдермалних система за контролисано отпуштање витамина

У хуманој медицини, потреба за трансдермалном испоруком витамина постала је нарочито важна када је утврђено да је при оралној апликацији њихова биорасположивост веома ниска и варијабилна, док је парентерална апликација, када се примењује у виду инфузија или инјекција, болна и инвазивна. Додатно, апликација лека путем инјекција или инфузија изазива повреде мишићне мускулатуре и нерава, хематоме и хеморагију. Стога, истраживачи су имали задатак да дизајнирају и развију трансдермални систем који ће у краћем временском периоду бити у могућности да отпусти ону количину витамина неопходну за остваривање терапеутског ефекта.

Ramöller и сар. (2019) дизајнирали су трансдермални систем са микроиглицама, базиран на поливинилпиролидону, који је у себи садржао молекул цијанокобаламина. Резултат експерименталне анализе је да споменути систем поседује могућност да у времену од 5 часова отпусти приближно 73% витамина цијанокобаламина. Површина трансдермалног система је $1,44 \text{ cm}^2$ и у трајању од 5 часова отпустио је $0,054 \text{ mg}$ цијанокобаламина на кожи младунчади свиња. Концентрација цијанокобаламина у крвном серуму, након тридесетоминутне апликације, износила је $6,4 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$.

Истраживање Papin и Yıldırım (2021) изнедрило је трансдермални систем у виду нановлакна базираних на желатину, поливинил-алкохолу и поливинил пиролидону, који је у себи садржао молекул фолне киселине. Нановлакна су израђена електроспининг методом. Контролисано отпуштање праћено је у раствору који треба да симулира услове на кожи лица и зној. Систем је, иницијално, у трајању од осам часова, омогућио ослобађање птероилмоноглутаминске киселине у уделу од 88%. На почетку експеримента, брзина ослобађања активног молекула била је неравномерна, понајвише због хетерогене дистрибуције витамина унутар сложене структуре нановлакна. Утврђено је да нановлакна могу контролисаним механизмом ослобађати фолну киселину у унапред дефинисаном временском интервалу, и као таква служити као модел за израду савременог терапијског система за ослобађање фолне киселине из брзо растворљивог полимерног носача.

За потребе лечења отворених рана, насталих као последица хроничног дијабетес мелитуса тип I и II, развијен је трансдермални систем у виду целулозног филма пореклом из отпадне комине пиринча, са инкапсулираном L-аскорбинском киселином и прополисом (Voss и сар., 2018). Трансдермални систем је апликован на кожи експерименталних мишева, на ексцизију ране у пределу леђа, чија је површина 9 mm^2 . Експериментални подаци указују да је ослобађање L-аскорбинске киселине контролисано процесом молекулске дифузије и да се витамин брже ослобађа у присуству раствора прополиса. Такође, резултати сугеришу да на брзину контролисаног отпуштања активне супстанце утиче и релаксација самог полимерног матрикса. Хистолошка анализа дала је позитиван цицатрицијални одговор на зарастање рана код мишева чија је оболела кожа третирана целулозним филмовима са витамином C у односу на контролну групу животиња које нису подвргнути тестирањима. *In vitro* студије антимикробне активности потврдиле су позитивно деловање на патогене бактеријске сојеве *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Код рана изазваних опекотинама, од значаја је трансдермални систем са α -токоферолом, преваходно због снажног антиоксидативног деловања према реактивним молекулама кисеоника у току реперфузије ткива. Реактивни молекули кисеоника и други слободни радикали доприносе погоршњу повреде органа настале као последица исхемије. Улога трансдермалног система са α -токоферолом је испуњавање повређене регије, топлотна изолација и обезбеђивање баријере за патогене микроорганизме (Pereira и сар., 2016).

Експериментално испитивање Pereira и сар. (2016) допринело је развоју полимерног филма базираног на натријум-алгинату и поливинил-алкохолу који у свом саставу садржи инкорпориран екстракт алоје вере и раствор витамина Е. Такав трансдермални систем омогућио је ослобађање витамина Е од око 30% у трајању од 24 часа омогућивши на тај начин продор и акумулацију витамина за око 2 до 4 пута више у поређењу на конвенционално доступну крему. Комбинација поливинил-алкохола са натријум-алгинатом обезбедила је филмовима већи капацитет за везивање воде, израженију транспарентност и могућност да се формира влакнасти гел када дођу у непосредни контакт са крвљу или ексудатом из ране. Други део истраживања односио се на инкапсулацију витамина Е у хијалуронске наночестице обложене полимерним филмом базираним на натријум-алгинату. Тако формулисани трансдермални систем омогућио је продужено и континуирано ослобађање витамина Е, и као такав је оцењен као веома ефикасан у погледу оклузионих својстава у односу на филм који није садржао наночестице (контролни узорак). Поред тога, наночестице уграђене у споменути формулацију могу додатно заштити витамин од деградације проузроковане светлошћу или кисеоником.

Трансдермална испорука холекалциферола, као алтернатива оралној и парентералној испоруци, добила је на значају у постоперативном процесу лечења слееве гастректомије код прекомерно гојазних људи, нарочито због ниске инвазивности и готово безболне апликације (Glowka и сар., 2019). Такође, у ветеринарској медицини, трансдермална испорука холекалциферола погодна је профилакси гравидне хипокалцемије код млечних говеда (Yamagishi и сар., 2009). Даље, студија Kittaneh и сар. (2023) имала је за циљ утврђивање ефикасности трансдермалне испоруке холекалциферола из полимерног раствора Eudragit[®] L100-55 и из полимерног филма Eudragit[®] L100-55 обогатеног пластификаторима и појачивачима пенетрације, попут поливинилпирилоидона, полиетилен-гликола, пропилен-гликола и натријум-лаурит-сулфата. Eudragit[®] L100-55 представља кополимерни систем метакрилне киселине и етил-акрилата. Добијени резултати показују да филмове одликују изузетна адхезивна својства и конзистентност, односно могућност снажног приањања и уклањања без напора, као и то да се лако могу савијати, котрљати и увијати, одстранивши бојазан да се њихова нативна структура може нарушити. Тест пермеације (*in vitro*) изведен је уз употребу Strat-M[®] вишеслојне полимерне мембране (неанимални модел). Биополимерни филм обезбеђује задовољавајући удео ослобађања/продирања холекалциферола кроз модел вештачке коже - Strat-M[®] мембрану и то у концентрацији од око 800 интернационалних јединица током 24 часа.

У табели 1.1, на основу прегледа литературе, наведени су примери неких најчешће коришћених трансдермалних система са витаминима.

Табела 1.1. Примери савремених трансдермалних система са витаминима

| Назив формулације | Облик | Носач | Референца |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Трансдермални систем са рибофлавином | Трасдермални фластер | Полиамидоамин | (Filipowicz и Wołowicz, 2011) |
| Трансдермални систем са никотин амидом | Трасдермални фластер | Полиакрилат | (Fan и cap., 2013) |
| Трансдермални систем са пантотенском киселином | Трасдермални фластер | Полиакрилат | (Taghizadeh и Joorabloo, 2015) |
| Трансдермални систем са биотином | Трансдермални систем са микроиглицама | Малтоза | (Ordiz, 2016) |
| Трансдермални систем са фолном киселином | Трансдермални систем са нановлакнима | Желатин, поливинил-алкохол и поливинил-пиролидон | Parin и Yıldırım (2021) |
| Трансдермални систем са цијанокобаламином | Трансдермални систем са микроиглицама | Поливинил-пиролидон | (Ramöller и cap., 2019) |
| Трансдермални систем са L-аскорбинском киселином | Полимерни филм | Целулоза | (Voss и cap., 2018) |
| Трансдермални систем са ретинолом | Трансдермални систем са микроиглицама | Хијалуронска киселина, натријум карбоксиметил-целулоза и трехалоза | (Hiraishi и cap., 2013) |
| Трансдермални систем са холекалциферолом | Полимерни филм | Метакрилна киселина и етил-акрилат | Kittaneh и cap. (2023) |
| Трансдермални систем са α -токоферолом | Полимерни филм | Натријум-алгинат и поливинил-алкохол | Pereira и cap. (2016) |

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

Циљ експерименталних испитивања било је праћење кинетике контролисаног отпуштања фолне киселине из матричног система липозом-биополимерни филм. Споменути систем изграђен је од карбоксиметил-целулозе и солагама у чијој структури су дисперговани липозоми са инкапсулираном фолном киселином. Експериментално истраживање укључује информације везане за технике припреме липозома и система липозом-биополимерни филм, методе карактеризације и тестове контролисаног отпуштања (*in vitro*).

2.1. Материјали и методе рада

2.1.1. Стандарди и реагенси

Сирћетна киселина (Acetic acid – glacial, purity $\geq 99\%$, Sigma Aldrich, United States of America)

Ацетонитрил (Acetonitrile, HPLC grade, Chem-Lab NV, Zedelgem, Belgium)

Етил-алкохол (Ethyl alcohol, 96%, v/v, Zorka Pharma, Republic of Serbia)

Холестерол (Cholesterol, $\geq 99\%$, Sigma Aldrich, Germany)

Хистидин (L-histidine, analytical standard, Sigma Aldrich, United States of America)

Метил-алкохол (Methyl alcohol, p. a., Betahem, Republic of Serbia)

Натријумдихидроген-фосфат (Sodium-phosphate monobasic, purity $\geq 99\%$, Sigma Aldrich, Germany)

Натријумхидроген-фосфат (Sodium-phosphate dibasic, purity $\geq 99\%$, Sigma Aldrich, Germany)

Натријум-хидроксид (Sodium-hydroxide, purity $\geq 98\%$, reagent grade, Sigma Aldrich, United States of America)

Пропилен-гликол (Propylene glycole, purity (FC) $\geq 99,5\%$, Sigma Aldrich, United States of America)

Натријум-карбоксиметил-целулоза (вискозност: средња, 400-800 cP; моларна маса: 250 kDa; степен субституције: 0,65-0,9)

Солагам АХ (SolagumTM AX, Seppic, Germany)

Сорбитан-монолаурат (Sorbitan monolaurate – SPANTM 20, purity (GC) $\geq 44,0\%$, Sigma Aldrich, United States of America)

Фолна киселина (Folic acid, analytical standard, Sigma Aldrich, Germany)

Фосфолипон 90G [Phospholipon 90G (Phosphatidylcholine 94.0% - 102.0%, - Lysophosphatidylcholine max. 4.0%, Tocopherol max. 0.3 %) Phospholipid GmbH, Germany]

Фосфорна киселина (Phosphoric acid, purity $\geq 85\%$, wt, Sigma Aldrich, United States of America)

2.2. Добијање и карактеризација липозома

2.2.1. Припрема липозома пролипозомном методом

Припрема липозома у овој експерименталној студији изведена је према методи који су развили Perrett и сар. (1991), уз неколико модификација. Смеша која садржи 0,4 g фосфолипона 90 G, 0,4 g етил-алкохола и 0,8 g дејонизоване воде мешана је употребом магнетне мешалице (600 o/min) на 60 °C у трајању од 5 минута. Након тога, пролипозомна смеша је охлађена на температуру од 20 °C. Након хлађења смеша је, у малим порцијама, хидрирана воденим раствором хистидина (8 mg/ml) који садржи фолну киселину у концентрацијама од 0,16, односно 1, 3 и 5 mg/ml и мешана на магнетној мешалици (600 o/min, 20 °C) у трајању од 60 минута. Запремина медијума коришћеног за хидрирање износи 18,8 ml. На овај начин добијени су мултиламеларни липозоми. Паралелно са поступком припреме липозома са инкапсулираном фолном киселином, припремљени су и липозоми без активне супстанце (контролни узорак). Експериментални поступак припреме липозома са инкапсулираном фолном киселином је шематски приказана на слици 2.1.



Слика 2.1. Шематски приказ пролипозомне методе за припрему мултиламеларних липозома

2.2.2. Анализа стабилности и величина честица

Величина липозома (*size of liposomes*, енгл.), индекс полидисперзије (*polydispersity index*, енгл.) и површинско (зета) наелектрисање (*zeta potential*, енгл.) испитани су техником ласерске дифракције светлости помоћу апарата чији се рад заснива на динамичком расејавању светлосних зрака (фотон корелациона спектроскопија) („Zetasizer Nano, Malvern Instruments“, Уједињено Краљевство). Узорак липозомне суспензије (0,1 ml) је разблажен 50 пута дејонизованом водом. Мерења су изведена у три независна понављања, на 20 °C и поновљена 7, 20 и 30-ог дана од тренутка припреме не би ли се установила стабилност липозома. Између експерименталних мерења, узорци су чувани на тамном месту при температури од 4 °C.

2.2.3. Одређивање степена инкапсулације и капацитета везивања

Степен инкапсулације (*encapsulation efficiency*, EE, енгл.) представља проценутални однос количине фолне киселине инкапсулиране у липозоме и укупне количине фолне киселине која је унета у систем приликом припреме наночестица (једначина 2.1).

$$EE (\%) = \frac{m_{FA(LIP)} - m_{FA(SN)}}{m_{FA(LIP)}} \cdot 100 \quad (J - 2.1)$$

где је $m_{FA(LIP)}$ иницијална маса фолне киселине коришћена за припрему узорка липозома, а $m_{FA(SN)}$ маса фолне киселине одређена у супернатанту.

Са друге стране, капацитет везивања (*drug loading*, DL, енгл.) представља проценутални однос количине фолне киселине инкапсулиране у липозоме и укупне количине липозома (једначина 2.2).

$$DL (\%) = \frac{m_{FA(LIP)} - m_{FA(SN)}}{m_{LIP}} \cdot 100 \quad (J - 2.2)$$

где је $m_{FA(LIP)}$ иницијална маса фолне киселине коришћена за припрему узорка липозома, $m_{FA(SN)}$ маса фолне киселине одређена у супернатанту, док је m_{LIP} укупна маса липозома.

Неинкапсулирана фолна киселина одвојена је од липозомне суспензије коришћењем центрифуга (Eppendorf 5430 R, Hamburg, Germany – за узорак липозома који садржи фолну киселину у концентрацији од 0,16 mg/ml и Optima XPM-100 ultracentrifuge (Beckman Coulter, USA – за узорак липозома који садржи фолну киселину у концентрацијама од 1,3 и 5 mg/ml)). Липозомна суспензија у запремини од 1 ml пренешена је у епендорф тест тубе за центрифугу и центрифугирана је у три циклуса од по 15 минута на 4 °C, при броју обртаја центрифуге од 17000, у минути, односно у у три циклуса од по 10 минута на 20 °C и броју обртаја од 40 000 у минути. Након центрифугирања, одвојен је супернатант из којег је спектофотометријским путем одређена концентрација фолне киселине на таласној дужини од 280 nm. Резултати су потврђени употребом технике течне хроматографије високих перформанси на уређајима („Nexera X2, LC 30 series, with RID 20A detector, Shimadzu“, Јапан и „ACQUITY UPLC BEH C18, with UV detector, Waters“, Сједињене Америчке Државе).

2.2.4. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом

Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (*Fourier-transform infrared spectroscopy*, енгл.) ради се у циљу идентификације функционалних група молекула који су инкапсулирани у одређену матрицу, затим у циљу испитивања природе веза (интеракција) које су настале у матрици, као и за испитивање природе настанка потенцијалних веза на релацији полимер-полимер и полимер-пластификатор. С тим у вези, инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом коришћена је за структурну хемијску анализу узорака липозома и хемијских једињења од којих су липозоми изграђени. Инфрацрвени спектри анализираних узорака снимљени су техником атенуиране укупне рефлексије (*Attenuated total reflectance*, енгл.) на инфрацрвеном спектрофотометру Nicolet™ iS™-10 FTIR Spectrometer (Thermo Fischer Scientific, САД), у опсегу таласних бројева од 4000 до 400 cm⁻¹ при резолуцији од 4 cm⁻¹ и температури од 25±5 °C. Узорак липозомне суспензије у запремини од 1 ml нанешен је на стаклену плочу, димензија 76 x 26 x 1 mm, и сушен у атмосфери азота у трајању

од 62,5 часова. Након сушења, мала количина узорка (0,1 mg) нанешена је на дијамантско постоље инфрацрвеног спектрофотометра и подвргнута даљој анализи у циљу добијања идентификационих спектра.

2.2.5. Микроскопија атомских сила

Микроскопија атомских сила (*Atomic force microscopy*, енгл.) коришћена је за анализу површинске морфологије липозомних честица. Експериментална анализа реализована је употребом електронског микроскопа „Nano Scope 3D Veeco“, Сједињене Америчке Државе у контактном моду, при амбијенталним условима. За скенирање површине липозома коришћена је силиконска сонда са опругом чија константа се налази у опсегу од 20 до 80 N/m. Узорак липозомне суспензије (0,01 ml) депонован је на атомски равну површину супстрата лискуна (*mica substrate*, енгл.) која је, претходно, полирана адхезивном траком. Узорак липозомне суспензије сушен је на ваздуху у трајању од тридесет минута и након тога подвргнут анализи. Добијени подаци обрађени су помоћу софтверског пакета под називом „Nanoscope image processing software, Bruker“, Сједињене Америчке Државе.

2.2.6. Диференцијална скенирајућа калориметрија

Диференцијална скенирајућа калориметрија (*Differential scanning calorimetry*, енгл.) употребљена је у циљу утврђивања могућих интеракција између самих конституената липозома, као и због утврђивања потенцијалних промена у физичко-хемијским својствима анализираних узорака које настају при загревању на повишеним температурама. Наиме, одређена количина (2-6 mg) одговарајућих лиофилизованих узорака (липозоми, липозоми богати хистидином и липозоми са инкапсулираном фолном киселином) и аналитичких стандарда фолне киселине, и хистидина, положена је у алуминијумску посуду и херметички затворена. Узорци су пре лиофилизације замрзнути (-20 °C) и лиофилизовани током 36 сати, при притиску 0,02 bar уз помоћ уређаја за лиофилизацију под називом Christ Beta 1-8 K (Martin Christ, GmbH, Немачка). Даље, експериментална анализа реализована је помоћу диференцијалног скенирајућег калориметра „DSC 131 EVO SETARAM, Instrumentation, Caluire“, Француска. Као узорак референтне контроле коришћена је празна алуминијумска посуда. Узорци липозома, фолне киселине и хистидина постављени су у комору апарата и загревани у опсегу температура од 20 до 350 °C. Стопа загревања је константна и износи 10 °C у минути, док је проток гаса (N₂) износио 0,02 l/min. Такође, базна линија у анализи подешена је коришћењем две празне алуминијумске посуде без измена параметара процеса.

2.2.7. Испитивање кинетике контролисаног отпуштања фолне киселине из липозома

Испитивање кинетике отпуштања фолне киселине из липозома реализовано је употребом Францове дифузионе ћелије. Сама апаратура је статичног типа и састоји из два одељка, донорског и рецепторског. Одељци су раздвојени полусинтетском мембраном израђеном од ацетил-целулозе (величина пора: $2 \cdot 10^{-4}$ mm; површина: 4,91 cm²). Рецепторски одељак има фиксну запремину од 20 ml и опремљен је малим магнетним зрном чији је задатак одржавање константног мешања флуида и на тај начин успостављање адекватне хомогености у систему (Klimundova и сар., 2006). Непосредно пред почетак сваког експеримента, Францова дифузиона ћелија је термостатирана на 25 ± 5 °C уз употребу флуида у којем се отпуштање прати

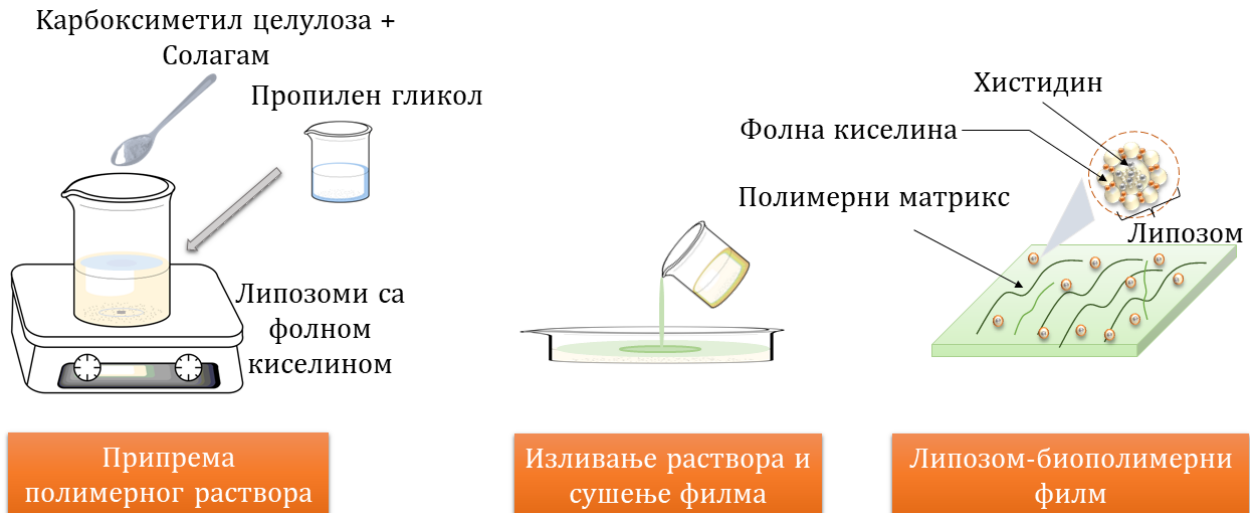
(фосфатни пуфер чија је рН вредност 5,5 или 7) у трајању од најмање тридесет минута. Процес термостатирања ћелије изведен је у циљу избегавања *lag* фазе (фазе адаптације) мембране и боље контроле времена трајања експеримента. Са друге стране, у донорски одељак ћелије унешено је 2 ml липозомне суспензије која садржи фолну киселину. Током трајања експеримента из рецепторског одељка ћелије, у различитим временским интервалима (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 и 1440 минута) узорковано је по 0,5 ml аликвота, преко бочне стаклене цеви, који је до даљих хроматографских анализа чуван на тамном месту и на температури од -18 °C. Исто тако, 0,5 ml свеже припремљеног фосфатног пуфера (рН 5,5 или 7) враћано је перманентно, након узорковања, у рецепторски одељак како би се одржавала стална запремина флуида у ћелији. Концентрација отпуштене фолне киселине одређена је употребом течне хроматографије високих перформанси са детектором индекса рефракције на таласној дужини од 280 nm (Nexera X2, LC 30 series, with RID 20A detector, Shimadzu, Јапан). Апарат је опремљен C₁₈ колоном (4,6 x 250 mm, 5·10⁻³ mm) кондиционираној на 25 °C. Мобилна фаза садржи смешу ацетонитрила и воде (50:50, v/v) са додатком 0,1% (w/v) метанске киселине. Проток мобилне фазе је подешен на вредност од 1 ml/min док је инјекциона запремина износила 0,02 ml. Калибрациона крива је конструисана растварањем фолне киселине у воденом раствору хистидина и фосфатног пуфера (рН 5,5 и 7) у опсегу концентрација од 0,001 до 0,02 mg/ml. Дифузија фолне киселине из липозомних честица у рецепторски медијум кроз целулозно-ацетатну мембрану може се апроксимирати другим Фиковим законом дифузије (Рјановић, 2010).

2.3. Добијање и карактеризација система липозом-биополимерни филм

2.3.1. Припрема система липозом-биополимерни филм

Припрема липозома и овога пута реализована је методом коју су први израдили Perrett и сар. (1991). Пролипозомна смеша која садржи 0,4 g фосфолипона 90 G, 0,4 g етил алкохола и 0,8 g воде мешана је на магнетној мешалици, на 60 °C и 600 o/min, у току пет минута. Смеша је охлађена на собну температуру (25±5 °C) и хидрирана је у малим дозама воденим раствором хистидина (8 mg/ml) који садржи фолну киселину у концентрацијама од 1, 3 и 5 mg/ml. Брзина обртаја магнетне мешалице у току трајања хидратационог процеса подешена је на вредност од 800 o/min, док је запремина хидратационог медијума износила 18,8 ml. Процес хидратације трајао је 60 минута након чега су добијени мултиламеларни липозоми са инкапсулираном фолном киселином. Даље, за припрему система липозом-биополимерни филм коришћена је метода изливања из раствора (*film casting method*, енгл.) (Marín-Peñalver и сар., 2019). Експеримент је започет одмеравањем 0,4 g прашкасте смеше која садржи натријум-карбоксиметил-целулозу и солагам, у односу 9:1, мас.%. Ова смеша је постепено додавана липозомној суспензији у циљу уједначеног растварања полимерних супстанци. Таквом полимерном раствору додат је пластификатор, пропилен-гликол, у концентрацији од 2,6% (w/v), након чега је раствор остављен да се меша на магнетној мешалици у трајању од 24 часа при брзини магнетне мешалице од 500 обртаја у минути. Након 24 часа, добијени полимерни раствор изливен је у стаклене Петри посуде и остављен на сушење у лабораторијској сушници, при контролисаним условима (50 °C, 50% рел. влаж.), у трајању од 24 часа. Након сушења у сушници, биополимерни филмови пажљиво су одвојени од стаклене подлоге и пренешени у ексикатор у коме се налази средство за сушење (магнезијум-сулфат анхидровани, 50% рел. влаж.) у којем су кондиционирани у трајању од 72 часа, при температури од 25±5 °C. Коначно, филмови су упаковани у полипропиленске кесе и чувани до даљих анализа на сувом и тамном месту. Контролни узорци биополимерних филмова који не садрже липозоме припремљени су

растварањем карбоксиметил-целулозе или смеше карбоксиметил-целулозе и солагама у воденом раствору хистидина (8 mg/ml) који садржи фолну киселину у концентрацијама од 1, 3 и 5 mg/ml. Такође, биополимерни филм сачињен од карбоксиметил-целулозе припремљен је растварањем 0,4 g натријум-карбоксиметил целулозе у 20 ml дејонизоване воде и даљим изливањем, и сушењем под идентичним условима. Шематски приказ експерименталне процедуре припреме система липозом-биополимерни филм приказан је на слици 2.2 док је у табели 2.1. дат опис неких од формулацијама добијеним у експерименту са ознакама. Слика С1 (прилог) представља поједностављени графички приказ експеримента.



Слика 2.2. Шематски приказ процедуре припреме система липозом-биополимерни филм

Табела 2.1. Формулације система липозом-биополимерни филм и објашњење ознака узорака

| Ознака формулације | Опис |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| СМС | Филм карбоксиметил-целулозе |
| СМС-LIP | Филм карбоксиметил-целулозе са инкорпорираним липозомима |
| СМС-SG | Филм карбоксиметил-целулозе и солагама |
| СМС-FA _x | Филм карбоксиметил-целулозе са инкорпорираним фолном киселином |
| СМС-LIP-FA _x | Филм карбоксиметил-целулозе са инкорпорираним липозомима који садрже фолну киселину |

x - представља број који означава почетну концентрацију фолне киселине у систему и може бити 1, 3 или 5 mg/ml

2.3.2. Физичка својства биополимерних филмова

Густина и површински напон раствора полимерних дисперзија коришћених за припрему филмова, одређени су помоћу тензиометра (Force Tensiometer K20, Kruss, Немачка), док је вискозност одређена помоћу реометра („Discovery Hybrid Rheometer HR2, TA Instruments, New Castle, DE“, Сједињене Америчке Државе). Маса и дебљина филмова анализирани су употребом аналитичке ваге Mettler Toledo® Solutions, type AE 200, $\pm 1 \cdot 10^{-5}$ g, Columbus, Ohio, Сједињене Америчке Државе, и дигиталног помичног кљунастог мерила Industrial&Scientific, 0-150 mm, Pittsburgh, Сједињене Америчке Државе.

2.3.3. Сушење биополимерних филмова и одређивање садржаја активне супстанце

Узорци липозом-биополимерних филмова припремљени су према поступку објашњеном у потпоглављу 2.3.1. Мерење масе филмова, у различитим временским интервалима, реализовано помоћу аналитичке ваге „Mettler Toledo® Solutions, type AE 200, $\pm 1 \cdot 10^{-5}$ g, Columbus, Ohio“, Сједињене Америчке Државе. Почетна мерења масе изведена су у краћим интервалима јер је тада губитак влаге интензивнији. Садржај активне супстанце заснован је на постулатима из гравиметрије, при чему у прорачуну фигуришу маса филма пре и после сушења. Садржај суве материје (dry matter, DM, енгл.) израчунат је коришћењем формуле приказане једначином 2.3:

$$DM(\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad (J - 2.3)$$

при чему је m_0 – маса празне Петри посуде у којој се узорак биополимерног филма суши; m_1 – маса Петри посуде са узорком биополимерног филма у посуду пре сушења; m_2 – маса Петри посуде са узорком биополимерног филма после сушења.

Садржај фолне киселине у крајњој формулацији одређен је из односа масе витамина која је унета у систем приликом његове припреме и укупне масе биополимерног филма измерене након сушења.

Сходно томе, садржај активне супстанце (*drug loading*, енгл.) изражен је као маса фолне киселине изражене у милиграмима по јединици масе биополимерног филма изражене у грамама (mg фолне киселине/g филма).

2.3.4. Бубрење биополимерних филмова

Бубрење биополимерних филмова изведено је класичним лабораторијским поступком, у условима који симулирају људску кожу (фосфатни пуфер, pH 5,5, $c=0,1$ mol/dm³). Најпре су узорци биополимерних филмова потопљени у раствор фосфатног пуфера а затим, у унапред дефинисаним временским интервалима, вађени, благо од течности оцеђени, након чега је измерена њихова маса на аналитичкој ваги. Удео бубрења (swelling ratio, SR, енгл.) израчунат је према формули приказаној у једначини 2.4.

$$SR(\%) = \frac{m_t - m_0}{m_0} \cdot 100 \quad (J - 2.4)$$

при чему је m_0 – маса сувог узорка биополимерног филма; m_t – маса узорка биополимерног филма у дефинисаном времену t .

2.3.5. Одређивање механичких својстава биополимерних филмова

Мерење механичких својстава биополимерних филмова изведено је помоћу уређаја за тестирање механичких својстава материјала под називом „AG-X plus Universal Testing Machine, Shimadzu“, Јапан. За овакав вид испитивања коришћена је мерна хелија од 100 N. Експериментално тестирање биополимерних филмова спроведено је на следећи начин: најпре су биополимерни филмови исечени на правоугаоне траке димензија 25 x 80 mm и учвршћени између два метална стезника (грипа) израђена од нерђајућег челика. Након тога је софтверским

путем подешена брзина истезања на 10 mm/min. Сва мерења спроведена су у трипликату. Механичка својства биополимерних филмова одређена су из инжењерских криви које приказују зависност напона и деформације, и силе истезања у тренутку лома. Експериментални подаци обрађени су помоћу софтверског пакета „Trapezium X 1.13, Shimadzu“, Јапан.

2.3.6. Испитивање структурних својстава система липозом-биополимерни филм инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом

За испитивање структурних хемијских својстава система липозом-биополимерни филм коришћена је ФТИР анализа. И овога пута, како што је то претходно објашњено у одељку 2.2.4. инфрацрвени спектри анализираних узорака снимљени су техником атенуиране укупне рефлексije на инфрацрвеном спектрофотометру „Nicolet™ iS™ 10 FTIR Spectrometer, Thermo Fischer Scientific“, Сједињене Америчке Државе, у опсегу таласних бројева од 4000 до 400 cm⁻¹ при резолуцији од 4 cm⁻¹ и температури од 25±5 °C. Узорак биополимерног филма, димензија 10 x 10 mm нанесен је на постоље инфрацрвеног спектрофотометра, опремљено сондом од кристала дијаманта и сниман у оперативном моду (моду мерења). Инфрацрвени спектри добијени су уз помоћ софтверског пакета „OMNIC™ spectroscopic software, Thermo Fischer Scientific“, Сједињене Америчке Државе.

2.3.7. Испитивање термалне стабилности система липозом-биополимерни филм диференцијалном скенирајућом калориметријом

Анализа термалне стабилности система липозом-биополимерни филм и појединачних, чистих компонената извршена је коришћењем диференцијалне скенирајуће калориметрије (ДСЦ). Такође, ова метода коришћена је за објашњење одређених интеракција које се појављују између конституената филмова при загревању. Апарат помоћу којег је реализована анализа је диференцијални скенирајући калориметар “DSC 131 EVO SETARAM™, Instrumentation, Caluire“, Француска. Као контролни узорак коришћена је празна алуминијумска посуда која је загревана паралелно са посудом у којој се налази узорак, у температурном опсегу од -50 до 350 °C. Стопа загревања износи 10 °C/min, док је струја азота имала вредност протока од 0,02 l/min. Основна (базна) линија подешена је у тренутку када су обе алуминијумске посуде биле без узорака, под идентичним вредностима параметара процеса. Вредности енталпија (J/g) добијене експерименталним путем обрађене су коришћењем софтверског пакета „Calisto™ Processing, thermal analysis software, SETARAM™ Instrumentation, Caluire“, Француска.

2.3.8. Скенирајућа електронска микроскопија

У циљу добијања информација везаних за структуру унутрашњости система липозом-биополимерни филм, техника скенирајућа електронске микроскопије са емисијом електрона у пољу (*Field Emission Scanning Electron Microscopy, ФЕЕМ*, енгл.) показала се погодном. С тим у вези, припремљени су узорци биополимерних филмова и анализирани на апарату под називом „Tescan Mira 3 XMU, Cranberry Township“, Сједињене Америчке Државе. Узорци биополимерних филмова исечени су на мале плоче облика квадрата чије су димензије 10 x 10 mm. Непосредно пре анализе, узорци биополимерних филмова напарени су легуром злата и платине у условима сниженог притиска, помоћу уређаја „Polaron Sputter Coater 502“, Сједињене Америчке Државе. Анализа узорка спроведена је при напону од 20 kV. Приликом анализе структуре унутрашњости биополимерног филма коришћена су различита увеличања.

2.3.9. Микроскопија атомских сила

За анализу топологије липозома инкорпорираних у структуру биополимерног матрикса коришћена је техника - микроскопија атомских сила (АФМ) реализована помоћу електронског микроскопа „Nano Scope 3D, Veeco“, Сједињене Америчке Државе. Микрографије липозома добијене су у контактном моду при амбијенталним условима. За скенирање површине система липозом-биополимерни филм коришћена је силиконска сонда са опругом чија се константна налази у опсегу од 20 до 80 N/m. Узорак биополимерног филма, 10 x 10 mm депонован је на површину супстрата лискуна, која је, претходно, полирана адхезивном траком. За обраду слика коришћен је софтверски пакет под називом „Nanoscope image processing software, Bruker“, Сједињене Америчке Државе.

2.3.10. Испитивање кинетике контролисаног отпуштања фолне киселине из система липозом-биополимерни филм

Испитивање кинетике контролисаног отпуштања фолне киселине из система липозом-биополимерни филм реализовано је употребом Францове дифузионе ћелије. Техничке карактеристике саме апаратуре дате су у поглављу 1.4.1.3. Укратко, узорак биополимерног филма масе око 0,1 g и пречника 25 mm постављен је у донорски одељак Францове дифузионе апаратуре и то тако да целом својом површином налаже преко површине целулозно-ацетатне мембране. Са друге стране, рецепторски одељак испуњен је фосфатним пуфером (pH 5,5; 0,1 mol/dm³) у запремини од 20 ml. Процес контролисаног отпуштања трајао је 24 часа, док су узорци узимани у различитим временским интервалима (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 и 1440 минут). Аликвот узорка из рецепторског одељка запремине 0,5 ml пренешен је у тамну стаклену виалу са завртњем и чуван на -18 °C до даљих анализа. Додатно, 0,5 ml свеже припремљеног фосфатног пуфера враћано је у рецепторски одељак Францове ћелије како би се обезбедила стална запремина рецепторског флуида и одржавала засићеност система (енг. *sink conditions*). Број обртаја магнетне мешалице, на коју је постављена Францова ћелија, износио је 280 у минути. Концентрација отпуштене фолне киселине у рецепторском медијуму одређена је употребом течне хроматографије високих перформанси са детектором која генерише запис у ултраљубичастој области („Waters ACQUITY ultra-performance liquid chromatography“ (UPLC) system coupled with a UV detector), „Waters™ - Corporation, Milford, Massachusetts“, Сједињене Америчке Државе, на таласној дужини од 285 nm. Апарат је опремљен са C₁₈ колоном „ACQUITY UPLC BEH C₁₈, Waters™ Corporation, Milford, Massachusetts“, Сједињене Америчке Државе, димензија 1,7·10⁻³ mm, 100 mm x 2,1 mm. Анализа је спроведена у изократским условима са мобилном фазом која садржи смешу метилалкохола и дејонизоване воде (95:5, v/v) са додатком 5% (w/v) сирћетне киселине. Проток мобилне фазе подешен је на вредност од 0,2 ml/min док инјекциона запремина износила 6·10⁻³ ml. Калибрациона крива је конструисана растварањем фолне киселине у воденом раствору хистидина и фосфатног пуфера (pH 5,5) у опсегу концентрација од 1·10⁻⁴ до 5·10⁻³ mg/ml. Дифузија фолне киселине из система липозом-биополимерни филм у рецепторски медијум кроз целулозно-ацетатну мембрану апроксимирана је другим Фиковим законом дифузије. Ефективни коефицијент дифузије прерачун је на начин како је то разјашњено у поглављу 1.4.1.3 (Pjanović, 2010).

2.4. Статистичка анализа

Статистичка обрада података извршена је уз помоћ софтверског пакета Microsoft Excel 2016 – „Microsoft Corporation, Redmond, Washington“, Сједињене Америчке Државе. Добијени резултати приказани су као средња вредност три мерења са стандардом девијацијом (статистички значајна разлика постоји када је $p < 0,05$).

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

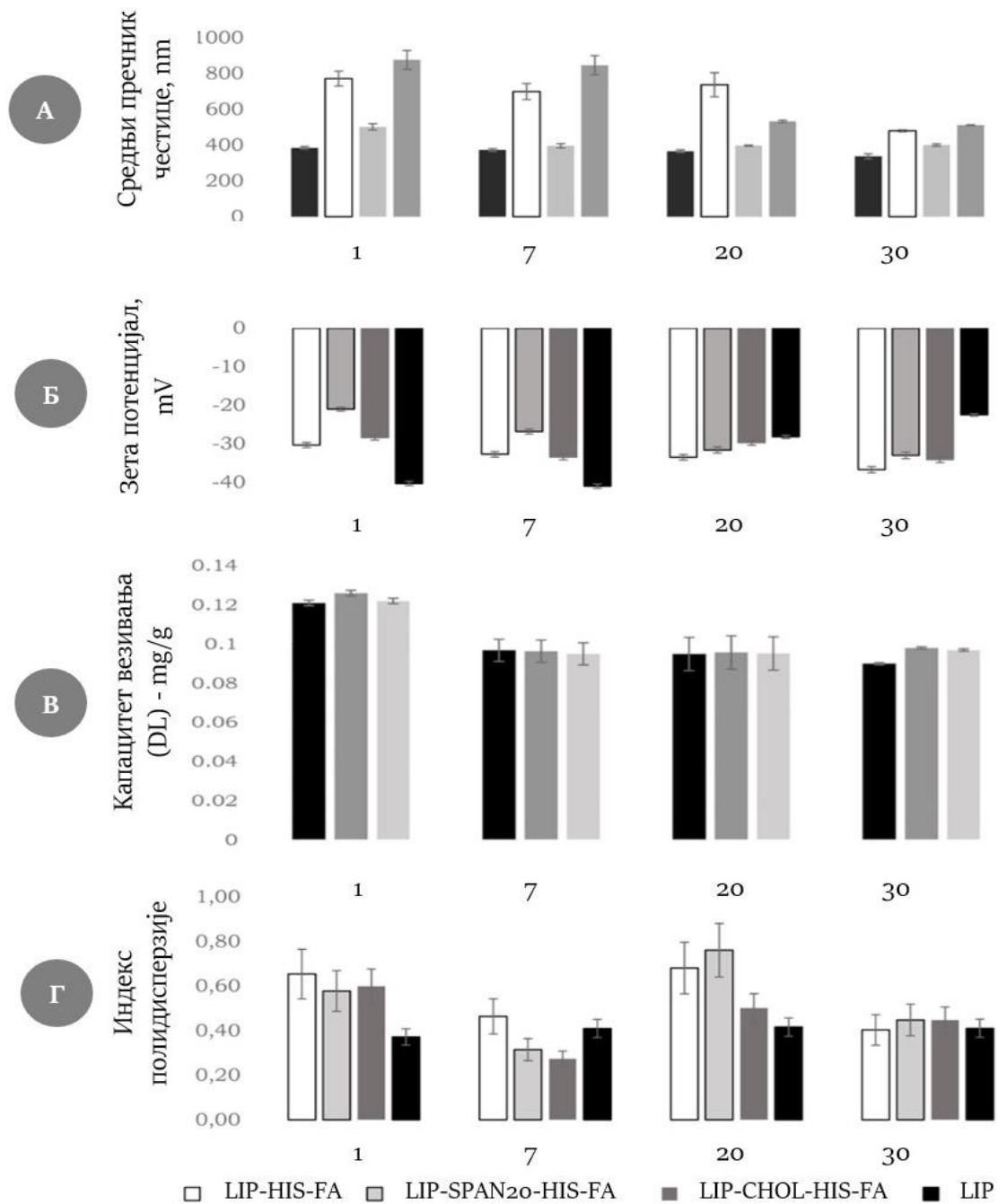
3.1. Карактеризација липозома са инкапсулираном фолном киселином

3.1.1. Величина честица и стабилност

Стабилност липозома са инкапсулираном фолном киселином праћена је у периоду од тридесет дана (слика 3.1). Величина липозома, површинско наелектрисање, односно зета потенцијал и индекс полидисперзије мерени су првог, седмог, двадесетог и тридесетог дана након припреме узорка. Резултати приказани на слици 3.1. показују да се липозоми без инкапсулиране фолне киселине, припремљени пролипозомном методом, не разликују много у вредностима величине честица у односу на липозоме који садрже активну супстанцу. Ово је, донекле, потврда да хистидин који улази у састав медијума за хидратацију није у потпуности инкорпориран унутар структуре фосфолипидног двослоја и као такав незнатно утиче на величину липозома. Ова појава је предодређена физичко-хемијским својствима самог молекула, те ће се хистидин, као хидрофилна аминокиселина, пре позиционирати у унутрашњости структуре липозомне честице (поларно језгро) него у супротној, неполарној средини коју чине хидрофобни ланци молекула фосфолипида. Величина липозома без активне супстанце износи 385 nm. Са друге стране, првог дана припреме узорка, липозоми са инкапсулираном фолном киселином, зависно од формулације, имају вредност величине честица између 503 и 877 nm (слика 3.1-А). Потенцијално објашњење за ову различитост у вредностима величине честица је да фолна киселина продирући у фосфолипидни двослој изазива делимично нарушавање структуре, што је последица структурних својстава и поларности молекула. Наиме, ароматична компонента молекула витамина, тј. језгро птеридина, оријентише се ка неполарној (хидрофобној) средини, док амино и карбоксилне групе молекула имају афинитет ка поларној (хидрофилној) средини. Стога, врло је вероватно да је молекул фолне киселине пре позициониран на граници фаза липид-вода него у унутрашњости фосфолипидног двослоја.

Ако се осврнемо на резултате везане за површинско наелектрисање честица можемо уочити да све формулације липозома имају негативну вредност зета потенцијала и то у опсегу од -37 до -20 mV, што је условљено самом природом фосфолипида (слика 3.1-Б). Наиме, липозоми израђени од фосфатидилхолина и деривата фосфатидилхолина генеришу високе апсолутне вредности зета потенцијала. Такви системи могу се сматрати стабилним и одликује их правилно дисперговање честица које је настало као последица високих вредности електричног набоја. У литератури могу се пронаћи подаци који указују да холестерол повећава апсолутну вредност зета потенцијала и електростатичка одбијања између липозомних честица и то онда када је концентрација површински активних материја испод 30%, mol (Јовановић и сар., 2018). Узорци липозома који су садржали SPAN 20 дали су нешто ниже вредности зета потенцијала (~-20 mV) у односу на немодификоване липозоме (~-30 mV) и липозоме са холестеролом (~-30 mV), што је у сагласности са истраживањем спроведеним од кинеских стране (Liu и сар., 2013) који су утврдили да нејонске површински активне материје генеришу више вредности зета потенцијала у односу јонске (анјонске).

Разматрајући стабилност липозомних честица може се уочити евидентан пад у вредностима средње величине честица у периоду чувања од 30 дана на 4 °C (слика 3.1-В) Потенцијално објашњење за овакав резултат је појава накнадног ослобађања фолне киселине



Слика 3.1. Стабилност липозома при складиштењу у времену од 30. дана (А - средњи пречник честица; Б – зета потенцијал; В – капацитет везивања (DL); Г – индекс полидисперзије (барови представљају стандарде девијације при мерењу три узорка)

из носача у току времена чувања/складиштења позната под називом „цурење активне супстанце“ (*leakage of active substance*, енгл.). Наиме, утврђен је „губитак“ фолне киселине од око 22-24% већ у првих седам дана складиштења на 4 °C. Ово је уобичајен и нежељен феномен који се најчешће појављује при дужем складиштењу мултиламеларних липозома. Други разлог за смањење средње величине честица током времена може бити присуство етил-алкохола, у резидуама, који може заостати у траговима након примене пролипозомне методе за припрему липозома. Наиме, сматра се да резидуе етил алкохола у систему доводе до стерне стабилизације што за последицу има пад вредности средње величине честица (Lopez-Pinto и сар., 2005).

Додатно, анализирајући вредности величине липозома са SPAN-ом 20, може се уочити да су такве честице имале најмању средњу величину честица у поређењу са липозомима који

садрже холестерол и липозомима без површински активних материја. Објашњење за овакав резултат је да SPAN 20 у значајној мери смањује међуповршински напон у мембрани стварајући на тај начин услове да молекул фосфолипида образује кондензоване липидне слојеве. Истовремено, у узорцима са SPAN 20 утврђен је пад вредности индекса полидисперзије испод 0,5 што указује на монодисперзност и хомогеност узорака (слика 3.1-Г). До сличних резултата дошли су Liu и сар. (2013) који су утврдили да инкапсулација флавонола у липозоме етанол-инјекционом методом доводи до повећања величине честице за око 2,5 пута, у присуству SPAN 20 као модификатора фосфолипидне мембране.

Са друге стране, липозоми са инкапсулираном фолном киселином који су садржали холестерол, као модификатор мембране, имали су много веће вредности величина честица. Присуство холестерола и физичке интеракције између липидних ланаца доводи до повећања међулипидног простора и ширења мембране. Ово ширење мембране директно се одражава на пораст повећања средњег дијаметра липозома. Додатно, на примеру липозома са холестеролом могу се увидети две појаве које се једна другој, међусобно, супростављају. Наиме, присуство холестерола у мембрани липозома изазива повећану хидрофобност, повећану стабилност и смањење пермеабилности двослоја што резултира ефикаснијом инкапсулацијом активне супстанце. Насупрот томе, молекул холестерола може се, хипотетички, надметати са молекулом фолне киселине за „освајање простора“ током процеса инкорпорације унутар структуре фосфолипидног двослоја и последично томе онемогућити, инкапсулацију активне супстанце све до тренутка док амфифилни молекули не образују липозоме. Овај феномен ће се касније одразити и на резултат ефикасности инкапсулације фолне киселине у липозоме.

3.1.2. Степен инкапсулације

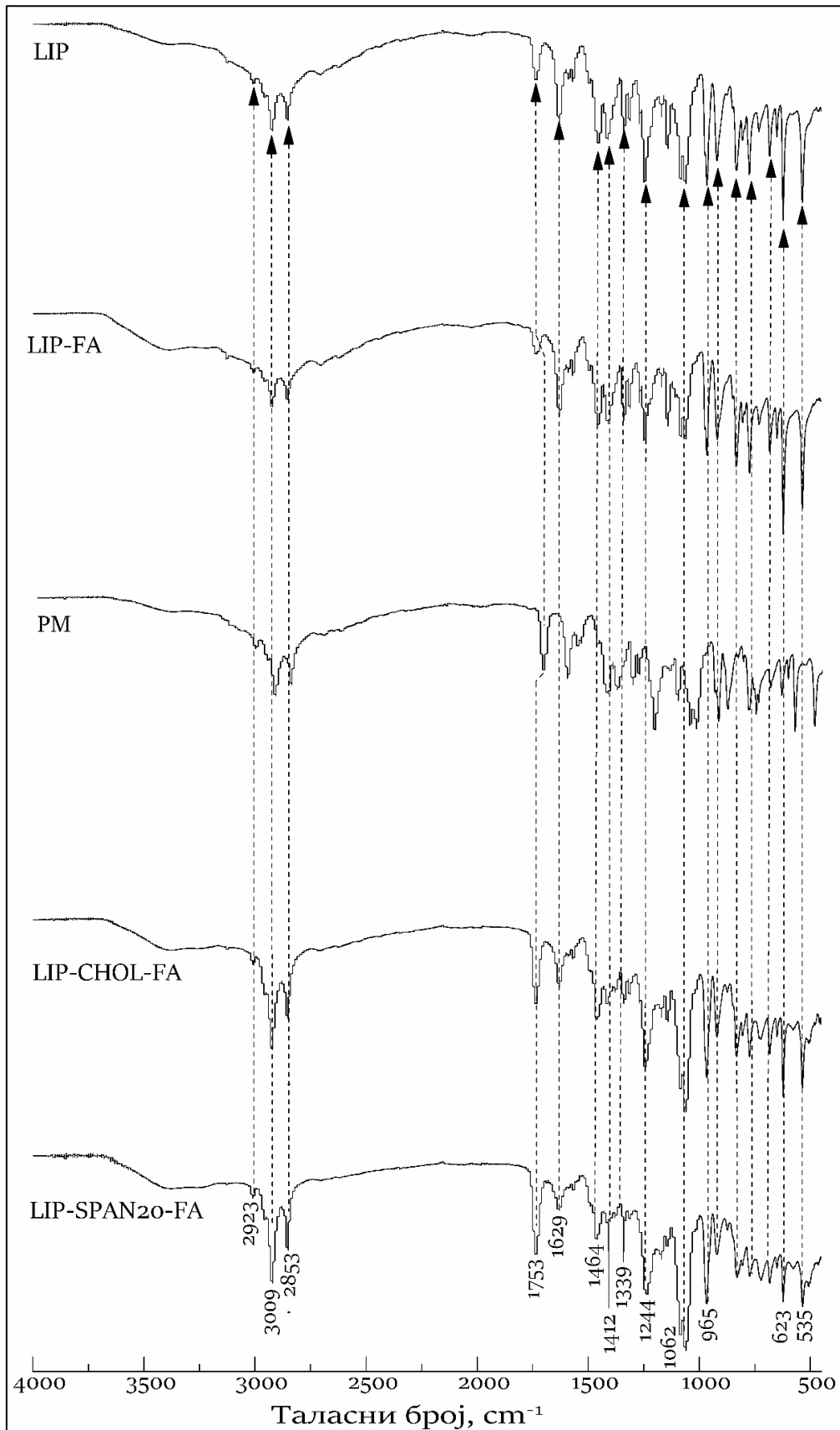
Степен инкапсулације фолне киселине у липозоме приказан је у табели 3.1. Добијени резултати указују на чињеницу да су сви добијени липозоми имали релативно висок степен инкапсулације (>80%). Такође, резултати су показали да холестерол и SPAN 20 не утичу на степен инкапсулације фолне киселине у липозоме. Лимитирајући фактор у експериментима је ниска растворљивост фолне киселине у води, при неутралном рН (1,3 mg/l). Стога, у циљу превазилажења овог ограничења, у систем је додата базна аминокиселина, L-хистидин. Претпоставка је да се молекули фолне киселине у алкалној средини понашају као слабе киселине и да као такви интензивирају настанак негативног набоја и развој електростатичких интеракција на релацији витамин-аминокиселина. Наиме, α -амино група хистидина ($-\text{NH}_3^+$; $\text{pK}_a=9,17$) у протонованом облику заједно са делимично протонованим бочним ланцем имидазола реагује са карбоксилном групом L-глутаминске киселине која улази у састав фолне киселине. Новоформирани комплекс има већу растворљивост при неутралној вредности рН средине.

Табела 3.1. Степен инкапсулације фолне киселине у липозоме

| Назив узорка | Степен инкапсулације, % |
|-------------------|-------------------------|
| LIP-HIS-FA | 83,36±0,91 |
| LIP-SPAN20-HIS-FA | 85,25±0,91 |
| LIP-CHOL-HIS-FA | 85,15±0,88 |

3.1.3. Анализа липозома инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом

На слици 3.2. су приказани инфрацрвени спектри липозомних формулација са инкапсулираном фолном киселином, хистидином као солубилизационим агенсом и модификаторима мембране (SPAN 20 и холестерол). Такође, приказан је спектар липозома без инкапсуланата и модификатора који је коришћен као контролни узорак.



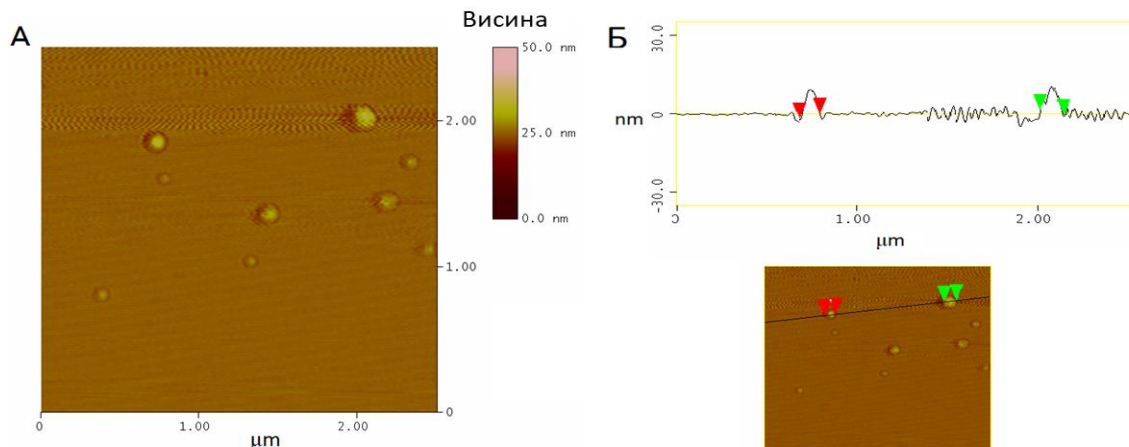
Слика 3.2. Инфрацрвени спектар физичке смеше компоната липозомног система (LIP - липозоми) и формулација липозома са инкапсулираном фолном киселином (LIP-FA) уз додатак модификатора фосфолипидне мембране, холестерола (LIP-CHOL-HIS-FA) и SPAN 20 (LIP-SPAN20-HIS-FA); PM – физичка смеша компоната које улазе у састав анализираниог система

У циљу утврђивања потенцијалних интеракција између самих компонената, након процеса инкапсулације, поређени су спектри липозома са инкапсулираном фолном киселином и спектар који садржи физичку смешу компонената које улазе у састав комплексног липозомног система. Сви приказани спектри садрже пикове на таласним дужинама између $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ који представљају симетричне и асиметричне C-H вибрације истезања у CH_2 и CH_3 групама алкил-ланаца. Апсорпциони вибрациони пик на 1734 cm^{-1} у свим спектрима формулација липозома указује на присуство естарске C=O везе, која представља траку вибрације истезања и потиче од фосфолипона 90 G. Интензитет пика на 1734 cm^{-1} је променљивог карактера и мења се од спектра до спектра, а појављује се као резултат настанка водоничних веза између хидроксилних (-OH) група присутних у свим једињењима и карбонилне (C=O) групе фосфолипида. У складу са литературним подацима, вибрационе траке истезања C=O групе кључни су параметри за праћење промена у структури насталих као последица формирања водоничних веза између самих конституената система (Arsov и Quaroni, 2007; Chen и Tripp, 2012). Са друге стране, холестерол је инкорпориран у структуру фосфолипидног двослоја тако да је хидрофилна компонента, 3β -хидроксилна група, позиционирана у непосредној близини карбонилних група естара фосфолипида, док се хидрофобни, стероидни прстен оријентише паралелно са ацил-ланцима молекула фосфолипона 90 G. Апсорпциони пик на 1630 cm^{-1} може се приписати C=C вибрацијама истезања и потиче од молекула фосфолипона 90 G и хистидина, док је C=N вибрација истезања од молекула фолне киселине. Деформација метилинске (δCH_2) апсорпционе траке евидентна је на 1464 cm^{-1} и условљена је инкорпорирањем/позиционирањем молекула површински активне материје (SPAN 20) унутар фосфолипидног двослоја. NH_2 деформације савијања присутне у свим формулацијама потичу од фолне киселине и хистидина. У региону између $1250-1140\text{ cm}^{-1}$ јављају се вибрације истезања пореклом од PO_2^- уз нагласак да се повећање интензитета може уочити у формулацијама обогаћеним молекулима површински активних материја. Истовремено, ово је доказ присуства молекула површински активних материја у густо пакованом фосфолипидном двослоју. Када се пореде спектри липозома и физичке смеше, могу се уочити одређене промене у интензитетима апсорпционих трака и деформације, и то у региону $965-919\text{ cm}^{-1}$, које се могу приписати вибрацијама истезања C-C=O од молекула фосфолипида и $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ од молекула хистидина. Ове промене указују на могуће интеракције између главних функционалних група фосфолипида и хистидина (имидазол или α -амино-група).

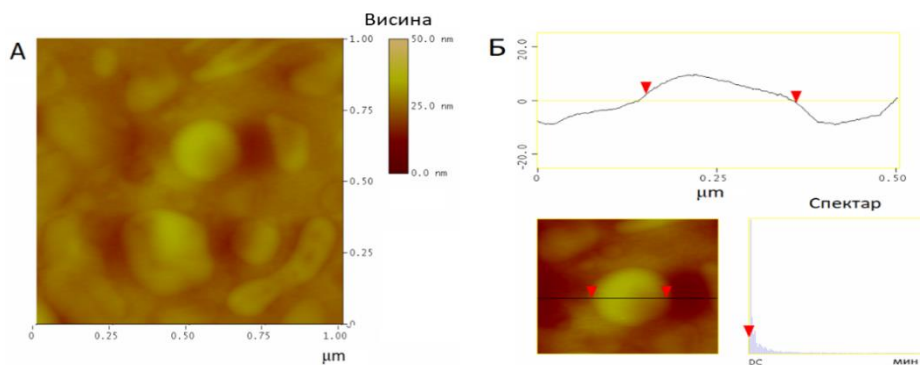
3.1.4. Микроскопија атомских сила

Микроскопија атомских сила поседује многе предности у поређењу са конвенционалним оптичком микроскопијом и електронском микроскопијом, нарочито у студијама у којима су заступљени биолошки узорци. Најпре, припремање узорка за ову технику не изискује примену високог вакуума, металног облагања или смрзавања те се елиминише могућност нарушавања структуре узорка током припреме, пре почетка процеса снимања. Такође, микроскопија атомских сила је погодна техника због тога што се узорци могу снимати на ваздуху, у воденим системима или у срединама у којима владају услови који одговарају условима из њиховог биолошког, односно физиолошког окружења. Мерења микроскопијом атомских сила јасно разграничавају разлике између липозома са инкапсулираном фолном киселином и липозома који су модификовани површински активним супстанцама у односу на липозоме који не садрже активну супстанцу и модификаторе површине (контролни узорци). Геометријски пречник честица добијен у мерењима спроведеним у контактном режиму варира од формулације до формулације. Пречник чистих (контролних) липозома (LIP) износи 120 nm , 209 nm за липозоме

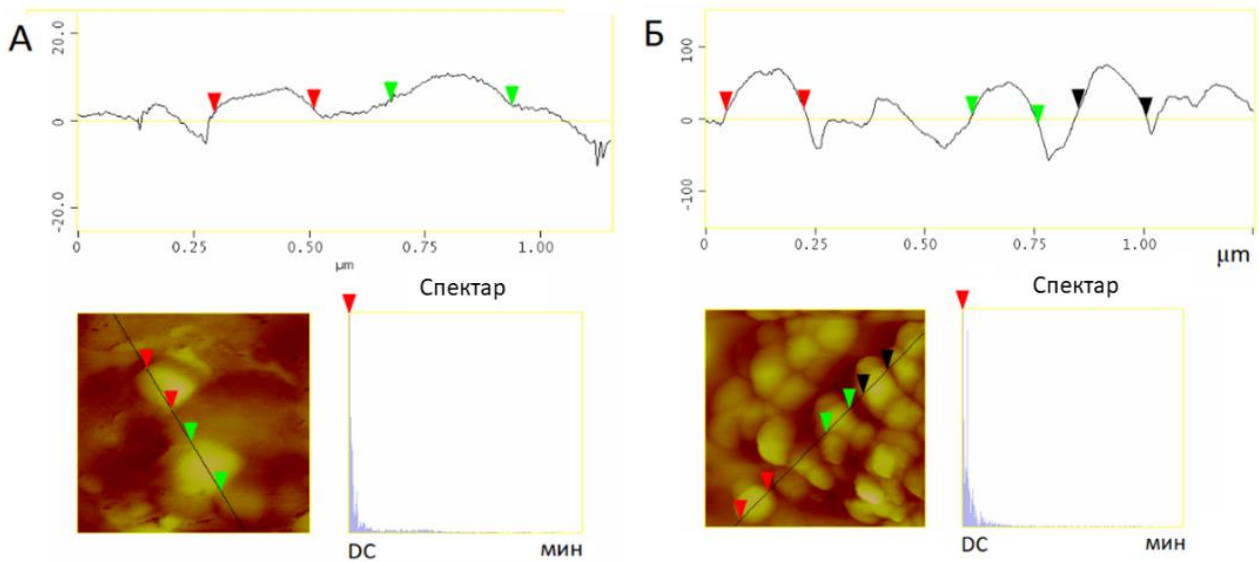
са инкапсулираном фолном киселином (LIP-HIS-FA), 216 nm за липозоме који садрже холестерол (LIP-CHOL-HIS-FA) и 130 nm за липозоме који садрже SPAN 20 (LIP-SPAN20-HIS-FA). Утицај молекула фолне киселине, холестерола и SPAN 20 на величину липозома добијен микроскопијом атомских сила у складу је са закључцима о величини честица добијеним фотон корелационом спектроскопијом, али су реалне вредности величине честица далеко мање. Објашњење за ове разлике у резултатима добијеним различитим методама може се описати чињеницом да техника динамичког расејавања светлости даје просечне вредности расподеле честица у целокупној запремини раствора, што даље имплицира да ће веома велике честице у систему у значајној мери утицати на расподелу величине. Са друге стране, микроскопија атомских сила анализира само везикуле које су адсорбоване на површини лискуна, све док се интеракција између везикуле и површине не заврши адхезијом након процеса адсорпције. Додатно, структура великих липозомних честица може бити нарушена у току самог процеса снимања (Liang и сар., 2004). Стога, закључци из мерења техником микроскопије атомских сила морају се разматрати са одређеном задршком, јер су мерења заснована на запремински ограниченом узорку липозома. Просечна висина је 7-12 nm за липозоме са инкапсулираном фолном киселином, 4-8 nm за липозоме чија је мембрана модификована холестеролом (LIP-CHOL-HIS-FA), односно 9-11 nm за липозоме чија је мембрана модификована SPAN-ом 20 (LIP-SPAN20-HIS-FA). Узорак контролних липозома (LIP) показује регуларну структуру глобуле (слике 3.3. и 3.4) док су липозоми са инкапсулираном фолном киселином у одређеној мери попримили спљоштен и/или заобљен облик (слика 3.5).



Слика 3.3. AFM - микрографије узорка контролних липозома: А) поглед одозго надоле; Б) попречни пресек



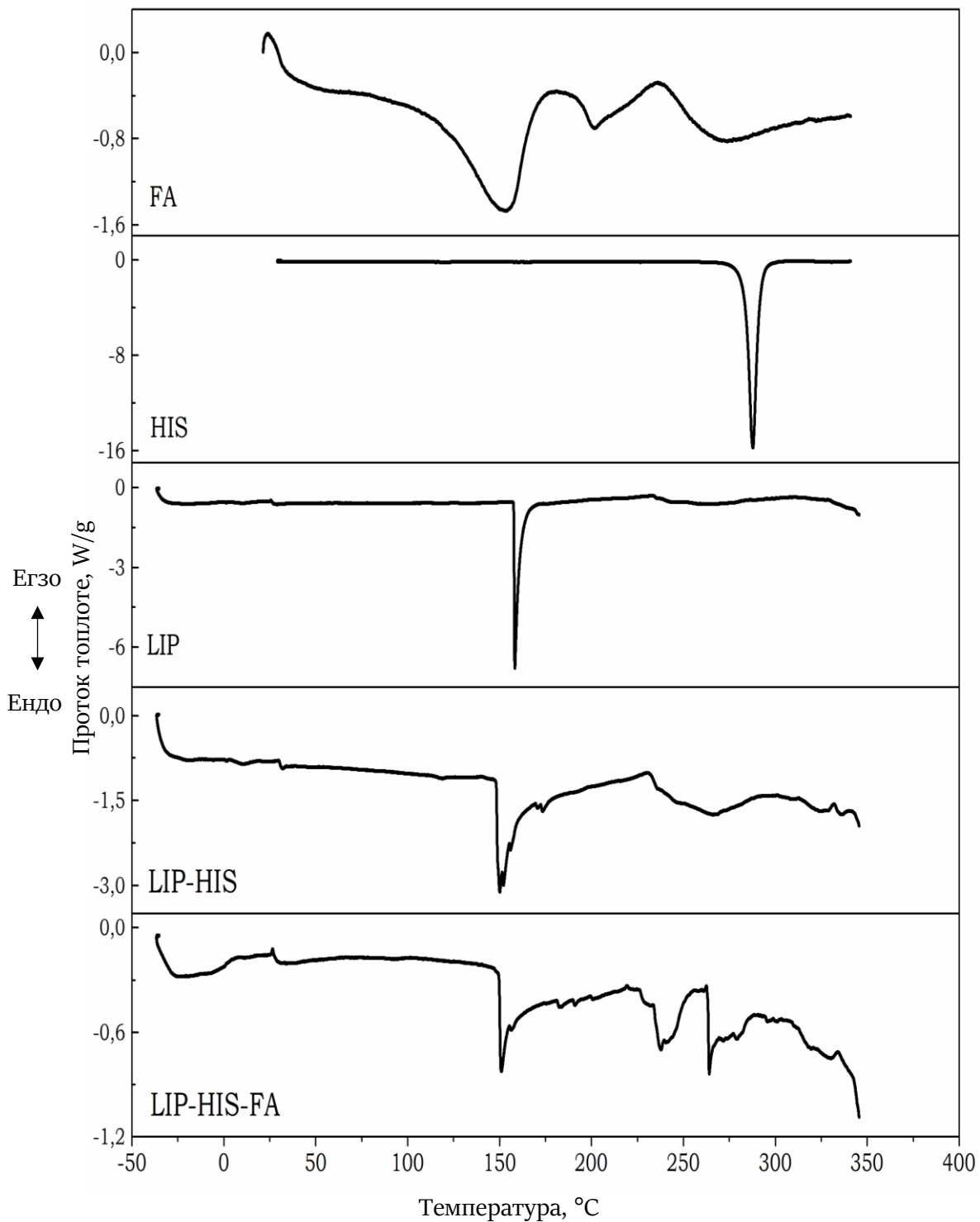
Слика 3.4. AFM - микрографије липозома са инкапсулираном фолном киселином (LIP-HIS-FA): (А) поглед одозго надоле; Б) попречни пресек липозома



Слика 3.5. AFM - микрографије липозома са инкапсулираном фолном киселином и модификаторима фосфолипидне мембране (A) са холестеролом (LIP-CHOL-HIS-FA); Б) са SPAN-ом 20 (LIP-SPAN20-HIS-FA)

3.1.5. Диференцијална скенирајућа калориметрија

Анализа термичких својстава липозома испитана је методом диференцијалне скенирајуће калориметрије. Термограми узорака липозома (контролни липозоми; липозоми са хистидином и липозоми са фолном киселином) као и термограми чистих супстанци (аналитички стандарди фолне киселине и хистидина) приказани су на слици 3.6. Као што се са термограма може уочити, деградација фолне киселине појављује се у три корака, односно у три термалне епизоде и то на 154, 200 и 260 °C. У складу са подацима из литературе, први термални корак приписује се разградњи дела L-глутаминске киселине, праћен деградацијом птерина и *p*-аминобензојеве киселине (Gazzali и сар., 2016).



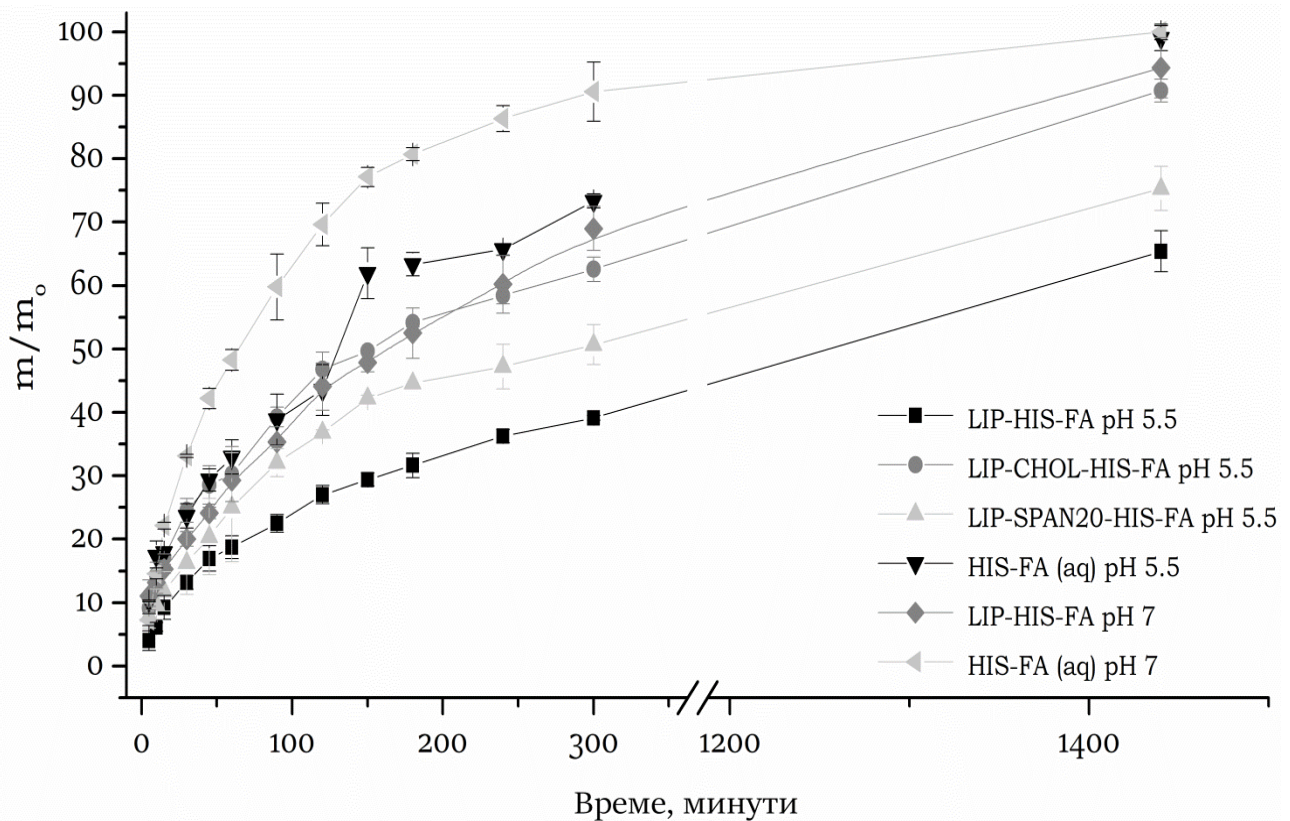
Слика 3.6. Термограм добијен анализом диференцијалне скенирајуће калориметрије за узорке чистих супстанци (FA – фолна киселина; HIS – хистидин) и липозома (LIP - контролни узорак липозома; LIP-HIS – липозоми са хистидином; LIP-HIS-FA – липозоми са инакпулисаном фолном киселином).

Из термограма се може закључити да се на 200 °C у потпуности губе функционалности амида и киселине при чему фолна киселина мења своју структуру, и из кристалне прелази у аморфну. Трећи ендотермни пик на 260 °C доводи се у везу са губитком масе, док се прве две ендотермне реакције појављују независно од губитка масе (Vora и сар., 2002). Оштри пик на 288 °C на термограму хистидина потиче од реакције топљења кристала и декомпозиције аминокиселине (Neacsu и сар., 2018). Термограми липозома (LIP) и липозома са хистидином

(LIP-HIS) показују два ендотермна догађаја, један на приближно 160 °C и други чија се деградација одиграва изнад 230 °C (оба се могу приписати молекулу фосфолипона 90 G) (Khurana и сар., 2017). Са друге стране, липозоми са инкапсулираном фолном киселином (LIP-HIS-FA) показују три ендотермна догађаја, који се могу приписати деградацији фолне киселине и фосфолипида. Други термални догађај мења своју позицију и измешта се ка вишим температурама у поређењу са ендотермним догађајем који потиче од фолне киселине, што је показатељ интеракција између фолне киселине и фосфатидилхолина, уз истовремено указивање на високу термалну стабилност компоненте *p*-аминобензојеве киселине у молекулу витамина. Потпуни изостанак тачке топљења хистидина додатна је потврда да се аминокиселина у структури липозома налази у аморфном стању.

3.1.6. Кинетика контролисаног отпуштања фолне киселине из липозома и одређивање коефицијента дифузије

Испитивање контролисаног отпуштања фолне киселине из липозома изведено је употребом Францове статичке дифузионе ћелије. Отпуштање је праћено у средини коју чини фосфатни пуфер (pH 5,5 и 7), док је концентрација отпуштене фолне киселине одређена уз помоћ течне хроматографије високих перформанси. Криве отпуштања фолне киселине из липозома (LIP-HIS-FA, LIP-CHOL-HIS-FA и LIP-SPAN20-HIS-FA) поређене су са кривама отпуштања фолне киселине из воденог раствора хистидина (HIS-FA_(aq)). Профили отпуштања приказани су на слици 3.7. Брзина дифузије фолне киселине и степен отпуштања предодређен је pH вредношћу средине у којој се отпуштање врши, што је и очекивано, јер растворљивост витамина расте са порашћу pH вредности. Профили отпуштања указују да се активна супстанца из носача ослобађа на уобичајен начин. Након 300 минута инкубације на pH 7, концентрација фолне киселине у акцепторском одељку је смањена за око 30%, због утицаја баријерних својстава липозомне мембране. Разматрајући утицај холестерола и SPAN 20, може се уочити да оба површински активна молекула у мањој мери доприносе повећању брзине отпуштања у односу на узорке липозома који не садрже модификаторе мембране. Генерално, познато је да површински модификовани липозоми који садрже сорбитан-монолаурат, пружају већи отпор дифузији активне супстанце у односу на немодификоване, због кратког, засићеног, хидрофобног ланца. Величина молекула површински активне материје и висока хидрофобност средине додатно омогућавају постизање већег отпора дифузији активне супстанце (HLB број је 8,6). Међутим, оваква појава није уочена у експерименту ове докторске дисертације. Наиме, у резултатима ове докторске дисертације, стопа отпуштања фолне киселине нешто је већа у формулацији која садржи SPAN 20. Ово је резултат слободног расипања молекула површински активне материје у поларној средини - раствору, што може довести до повећања пермеабилности активне супстанце кроз целулозно-ацетатну мембрану Францове дифузионе ћелије. Са друге стране, научно је утврђено да холестерол смањује пермеабилност фосфолипидног двослоја изнад температуре фазне трансформације (Nakhaei и сар., 2021), али исто тако постоје и неки литературни подаци који су у супротности са наведеном тврдњом (да холестерол не утиче на дифузију активне супстанце из носача) (Briuglia и сар., 2015). Претпоставка која произилази из ове докторске дисертације је да при смањењу pH вредности на 5,5 долази до промене наелектрисања језгра имидазола који у структури поседује два реактивна места (NH-група), што даље узрокује интеракције између молекула аминокиселине и витамина. Као последица тог феномена долази до ослобађања веће количине фолне киселине из носача које је подстакнуто истовременим ослобађањем хистидина. На слици 3.7. приказани су профили отпуштања фолне киселине из липозома при различитим вредностима pH средине.



Слика 3.7. Кинетика контролисаног отпуштања фолне киселине из суспензија липозома

Као што је већ објашњено у поглављу 1.4.1.3. ефективни коефицијенти дифузије одређени су из нагиба линеарног дела кривих формираних из зависности $\ln(C_D^0 - C_R^0/C_D - C_R)$ од времена t (слика 3.8) и приказани су у табели 3.2. Најпре је потребно одредити коефицијент правца ($D \cdot \beta$), а из њега коефицијент дифузије D . Геометријска константа (β) за стандардну Францову дифузиону ћелију са мембраном од ацетат-целулозе, запремине 20 ml, износи $2,49 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$. Такође, отпор преносу масе кроз ацетат-целулозну мембрану може се одредити када је позната дебелина слоја кроз који се одвија пренос масе активне супстанце (једначина 3.1).

$$R = \delta/D \tag{J - 3.1}$$

При чему је δ дебелина слоја у коме се одвија пренос масе активне супстанце, а D је коефицијент дифузије. У случају дифузије из липозома, укупни отпор представља збир појединачних дифузионих отпора мембране R_{CAM} и липозома R_{LIP} што се може представити следећом једначином:

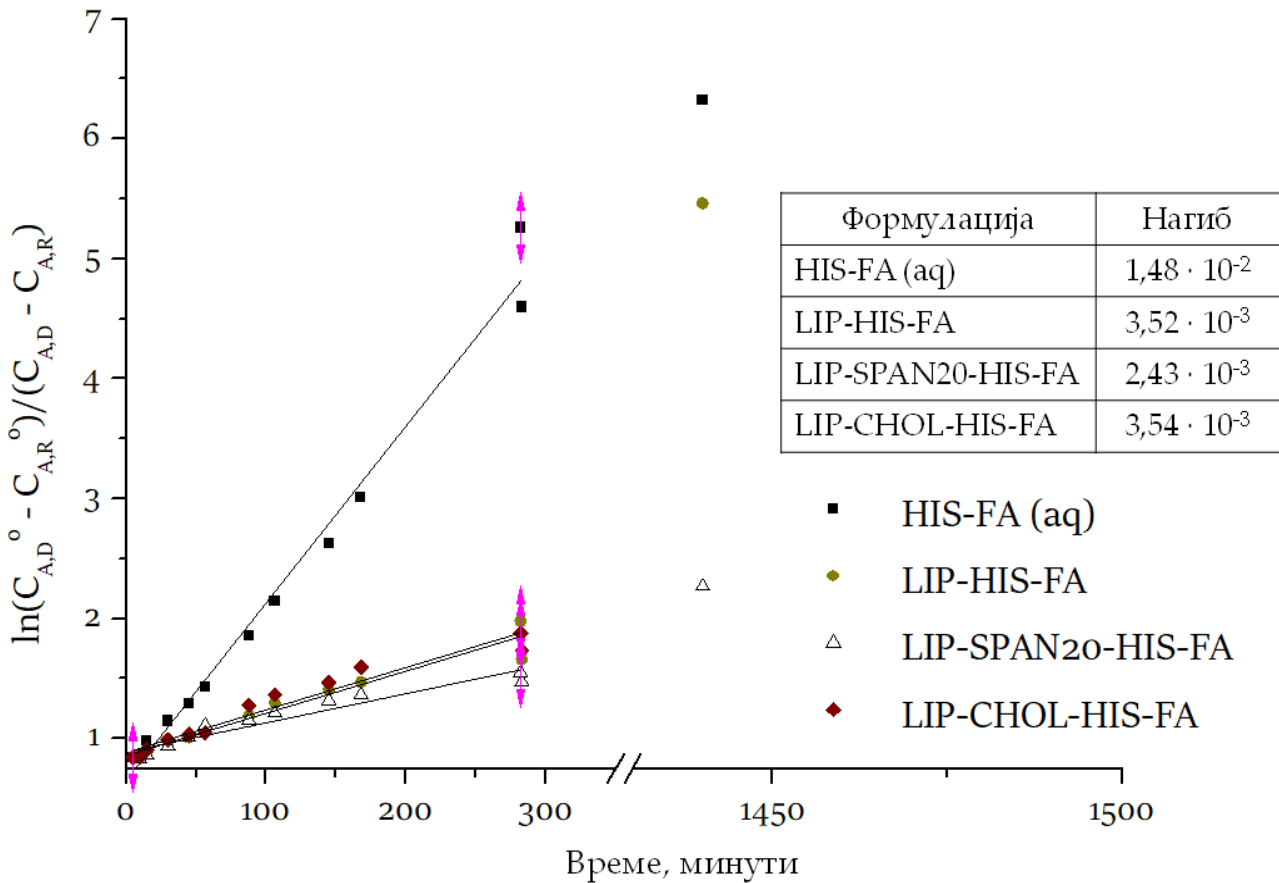
$$R = \delta_0/D_{eff} = R_{CAM} + R_{LIP} \tag{J - 3.2}$$

У овом случају, δ_0 представља укупну вредност дебелине слоја (збир вредности дебелине мембране и липозома), D_{eff} је ефективни коефицијент дифузије добијен из једначине 1.32. Такође, могуће је дефинисати и једначине за одређивање вредности отпора који генерише ацетатат-целулозна мембрана, као и вредност отпора који генеришу липозоми, односно мембрана липозома (једначина 3.3 и једначина 3.4).

$$R_{CAM} = \delta_{CAM}/D \tag{J - 3.3}$$

$$R_{CAM} = (\delta_0/D_{eff}) - \delta_{CAM}/D \tag{J - 3.4}$$

Вредности отпора који потичу од ацетатат-целулозне мембране и од фосфолипидне мембране липозома приказани су у табели 3.2.



Слика 3.8. Дифузија фолне киселине из липозома апроксимирана другим Фиковим законом

Резултати добијени у овим експериментима указују да липозоми са инкапсулираном фолном киселином, који у својој структури садрже молекуле SPAN-а 20 и холестерола не обезбеђују додатни отпор дифузији молекула витамина у односу на липозоми који не садрже молекуле сурфактанта (табела 3.2). Овај резултат је у складу са експериментално одређеним профилима отпуштања, али није у потпуности поуздан због тога што су за одређивање коефицијента дифузије коришћени само резултати добијени у току првих 300 минута.

Табела 3.2. Ефективни коефицијенти дифузије фолне киселине и отпори дифузији липозома са инкапсулираном фолном киселином

| Назив узорка | δ_0 , mm | D_{eff} , m ² /s | R, s/m | R_{LIP} , s/m |
|------------------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| HIS-FA _(aq) | 4,02 | $6,51 \cdot 10^{-9} \diamond$ | $6,17 \cdot 10^5 \blacklozenge$ | н. п. ° |
| LIP-HIS-FA | 4,07 | $2,62 \cdot 10^{-9}$ | $1,55 \cdot 10^6$ | $9,36 \cdot 10^5$ |
| LIP-SPAN20-HIS-FA | | $2,80 \cdot 10^{-9}$ | $1,45 \cdot 10^6$ | $8,33 \cdot 10^5$ |
| LIP-CHOL-HIS-FA | | $2,97 \cdot 10^{-9}$ | $1,37 \cdot 10^6$ | $7,53 \cdot 10^5$ |

\diamond Коефицијент дифузије кроз ацетатат-целулозну мембрану; \blacklozenge Отпор дифузији који генерише ацетатат-целулозна мембрана (R_{CAM}); ° није примењиво.

3.2. Карактеризација система липозом-биополимерни филм

Узорци биополимерних филмова су најпре анализирани са становишта физичких карактеристика (густине, површинског напона и вискозности) раствора одн. суспензија од којих су добијени изливањем, а након тога следила су испитивања механичких и структурних својстава, као и анализа површинске морфологије. На крају, узорци су били подвргнути тестовима контролисаног отпуштања (*in vitro*).

3.2.1. Одређивање физичких и механичких својстава система липозом-биополимерни филм

3.2.1.1. Густина, површински напон и вискозност раствора односно суспензија коришћених за добијање биополимерних филмова

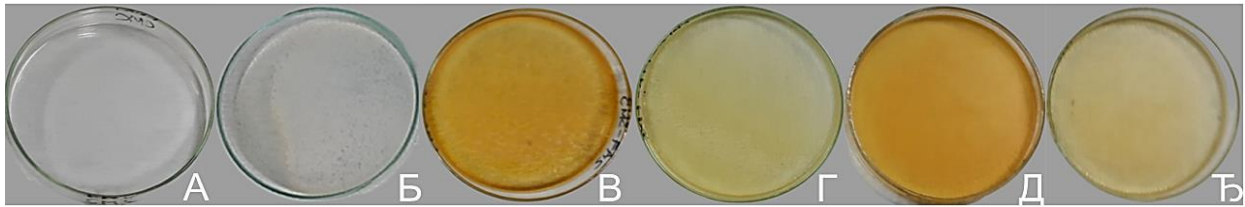
Резултати густине и површинског напона приказани су у табели 3.3, док је вискозност полимерних раствора приказана на графику П1 (прилог). Из приложених резултата може се закључити да додаток липозома у значајној мери утиче на повећање вредности површинског напона и густине, док се у случају додатка фолне киселине не уочавају промене. Са друге стране, разматрајући резултате реолошких мерења, може се извести закључак да вискозност полимерних раствора опада са повећањем брзине смицања до одређеног тренутка, након чега долази до успостављања равнотеже. Феноменолошки посматрано, добијени резултат је очекиван, јер се приликом повећање брзине смицања истовремено одиграва и „разгранаване“ полимерних ланаца унутар структуре полимера чиме се омогућава правилније груписање, тј. паковање молекула. Додатно, поређењем вредности вискозности различитих узорка добијених на истој фреквенцији, може се уочити да једино полимерни раствор карбоксиметил целулозе пружа нешто мањи отпор при течењу у односу на остале узорке. Такође, на вискозност полимерних раствора, поред интрамолекулских реакција, утиче састав и концентрација полимера, моларна маса и степен супституције.

Табела 3.3. Површински напон и густина различитих узорка полимерних раствора

| Узорак | Површински напон, mN/m | Густина, g/ml |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| СМС | 30,40±0,13 | 1,010±1·10 ⁻⁴ |
| СМС-FA ₅ | 27,50±0,10 | 1,013±1·10 ⁻⁴ |
| СМС-LIP-FA ₁ | 167,0±1·10 ⁻² | 1,010±1·10 ⁻⁴ |
| СМС-SG-LIP-FA ₁ | 182,9±9·10 ⁻³ | 1,011±2·10 ⁻⁴ |
| СМС-LIP-FA ₅ | 175,4±9·10 ⁻³ | 1,019±2·10 ⁻⁴ |

3.2.1.2. Дебљина, садржај активне супстанце и одређивање механичких својстава биополимерних филмова

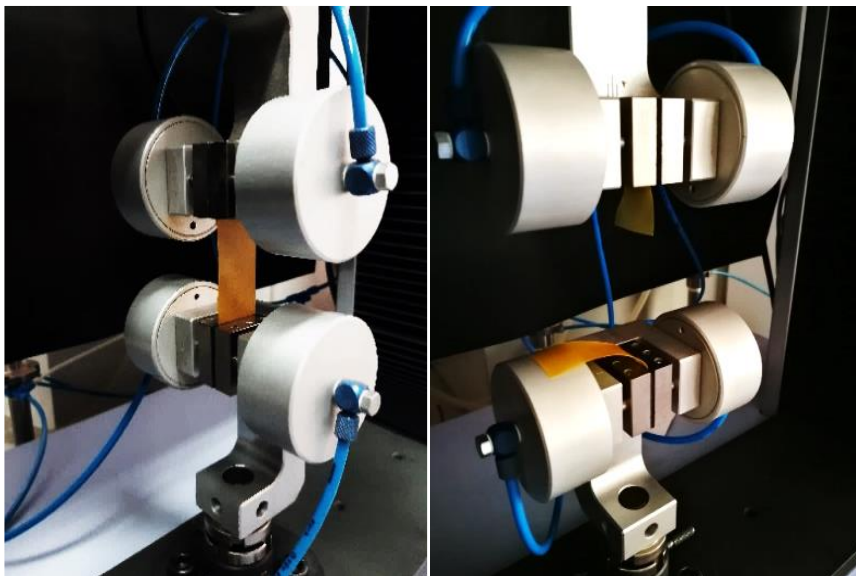
Сви испитивани узорци биополимерних филмова су глатки и флексибилни, док се транспарентност мења од узорка до узорка, зависно од формулације. Наиме, фолна киселина је носилац обојености, те са порастом или падом концентрације витамина, долази до повећања или пада интензитета обојености узорка (слика 3.9). У одсуству витамина су филмови у потпуности транспарентни (слика 3.9А, Б). Поред овога, фотографије добијених филмова указују на неуниформну расподелу липозомних честица унутар структуре полимерног матрикса, што у одређеној мери доприноси паду хомогености система.



Слика 3.9. Фотографије различитих узорка биополимерних филмова (А – филм карбоксиметил-целулозе; Б – филм карбоксиметил-целулозе са инкорпорираним липозомима; В – филм карбоксиметил-целулозе са инкорпорираним фолном киселином у концентрацији од 5 mg/ml; Г – филм карбоксиметил-целулозе са инкорпорираним липозомима који садрже фолну киселину у концентрацији од 1 mg/ml, Д – филм карбоксиметил-целулозе са инкорпорираним липозомима који садрже фолну киселину у концентрацији од 5 mg/ml, Е – филм карбоксиметил-целулозе и солагама са инкорпорираним липозомима који садрже фолну киселину у концентрацији од 5 mg/ml).

Дебљина узорака биополимерних филмова варира и налази се у опсегу од 50 до 80 μ (табела 3.3). Исто тако, процес сушења биополимерних филмова, односно губитак воде, директно се одражава на дебљину узорака и друга физичка својства, попут масе, конзистенције и слично. Додатно, постоји претпоставка да неравномерна дистрибуција липозома унутар структуре биополимерних филмова производи прекиде у полимерном матриксу што интензивира елиминацију воде у току процеса сушења (Montero García и сар., 2019).

Параметри који описују механичка својства система липозом-биополимерни филм (затезна чврстоћа, сила лома и елонгација) приказани су у табели 3.4. Такође, механичка својства система липозом-биополимерни филм одређена су техником напрезања, тј. истезања помоћу металних грипова на уређају за одређивање механичких својстава „AG(X) plus, Shimadzu“, Јапан, опремљен дигиталним уређајем контроле (слика 3.10).



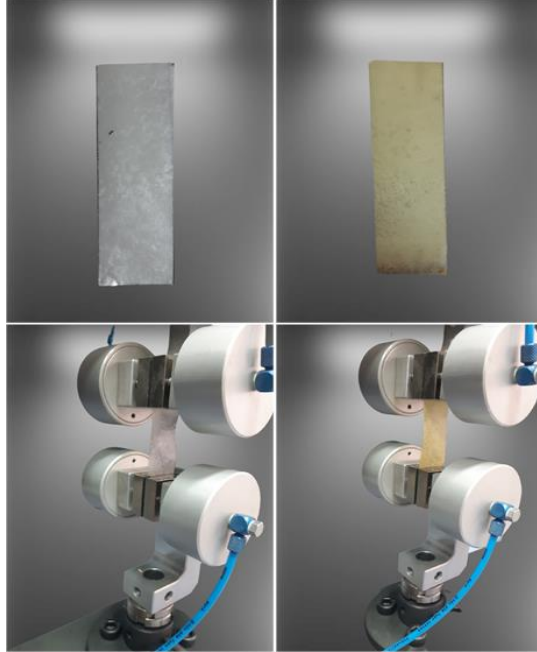
Слика 3.10. Тестирање биополимерних филмова коришћењем универзалне тест машине за испитивање механичких својстава: узорак филма карбоксиметил-целулозе са инкорпорираним липозомима и у њима фолном киселином у концентрацији од 5 mg/ml пре теста истезања под напоном (лево) и након фрактуре (десно)

Табела 3.4. Дебљина, садржај активне супстанце и механичка својства различитих типова биополимерних филмова

| Тип узорка | Дебљина филма, mm | Садржај фолне киселине (mg/g филма) | Затезна чврстоћа, МПа | Сила лома, N | Елонгација, % |
|----------------------------|-------------------|-------------------------------------|-----------------------|--------------|---------------|
| СМС | 0,06 | / | 4,79±0,36 | 9,58±0,72 | 3,31±0,66 |
| СМС-FA ₅ | 0,05 | 20,19 | 7,19±0,43 | 8,99±0,53 | 5,07±0,98 |
| СМС-LIP-FA ₁ | 0,08 | 3,12 | 5,40±2,61 | 10,81±3,52 | 1,37±0,92 |
| СМС-LIP-FA ₅ | 0,05 | 19,54 | 6,98±1,34 | 13,97±2,68 | 0,97±0,30 |
| СМС-SG-LIP-FA ₁ | 0,06 | 6,37 | 5,41±1,43 | 10,82±3,36 | 0,94±0,22 |

Генерално, додатак фолне киселине у филм карбоксиметил-целулозе доприноси укупној затезној чврстоћи и крутости система (СМС наспрот СМС-FA₅ и СМС-LIP-FA наспрот СМС-LIP-FA₅), највише због интеракција молекула фолне киселине и хистидина, са једне стране, односно функционалних група унутар полимерних конституената са друге. Такође, веома је важно нагласити да додатак липозома није изазвао значајне промене у механичком понашању филма карбоксиметил-целулозе, што се најбоље може сагледати из нумеричких вредности који ближе описују затезну чврстоћу, силу лома и елонгацију (издужење) испитиваних материјала. С тим у вези, ова појава може бити резултат неких ефеката који се међусобно опонирају. Наиме, постоји претпоставка да инкорпорација липозома унутар биополимерног матрикса изазива нарушавање уређене структуре полимера, и самим тим, изазива слабљење филма. Са друге стране, неки литературни подаци указују да затезна чврстоћа филма израђеног од карбоксиметил-целулозе расте са додатком комерцијалних фосфолипида, било самостално, било у комбинацији са површински активним материјама (Martelli и сар., 2017; Neacsu и сар., 2018). Као потенцијално објашњење наводи се податак да позитивно наелектрисане групе холина у структури фосфолипида могу ступити у интеракцију са анјонским функционалним групама карбоксиметил-целулозе што доводи до формирања хемијских веза и резултира повећањем чврстоће биополимерног филма. Rodríguez и сар., (2006) тврде да постоји синергистички ефекат између молекула пластификатора и молекула површински активне материје. Треба нагласити да су биополимерни филмови са инкорпорираним липозомима испољили веома велику варијабилност у вредностима механичких параметара (вредности стандардних девијација налазе се у опсегу између 19 и 48%) што је, свакако, један од показатеља смањене хомогености анализираних система. Највеће вредности елонгације при деформацији истезањем од 5,07% добијене су за систем карбоксиметил-целулозе са инкорпорираним фолном киселином у концентрацији од 5 mg/ml и то, највероватније, због интеракција између фолне киселине и функционалних група молекула који чине ланце полимера. Такође, додатак фолне киселине пропагира повећање хомогености система што је важно за механичка својства биополимерних филмова и њихову, потенцијалну, трансдермалну апликацију. Насупрот овоме, додатак липозома у филм карбоксиметил-целулозе смањује флексибилност узорака, вероватно због интеракција између холина и анјонских група полимера. Интересантно је да разлика у вредностима елонгације не постоји, нарочито у узорцима филмова који у основи садрже карбоксиметил целулозу, са једне стране и филма који садржи бленд карбоксиметилцелулозе и солагама, са друге. Наиме, понашање полимера у тренутку деформације условљено је сложеним структурним својствима молекула полиуронида (ксантан гума, акација), те се очекивао пад у вредностима затезне чврстоће (Nazirah и сар.,

2016; Rezaie и сар., 2021). Овај ефекат доводи се у везу са слабљењем међумолекулских сила узрокованих повећањем ОН-функционалности у структури полимера. Коначно, понашање биополимерних филмова у тренутку излагања „стресу“ (деловању силе) условљено је, највише, међусобним интеракцијама молекула ингредијената. На слици 3.11. приказани су филмови изграђени од карбоксиметил-целулозе, као и филмови карбоксиметил-целулозе који у структури садрже дисперговане липозоме.



Слика 3.11. Испитивања механичких својстава филма карбоксиметил-целулозе (горе и доле лево) и филма карбоксиметил-целулозе са липозомима (горе и доле десно)

3.2.1.3. Сушење и бубрење биополимерних филмова

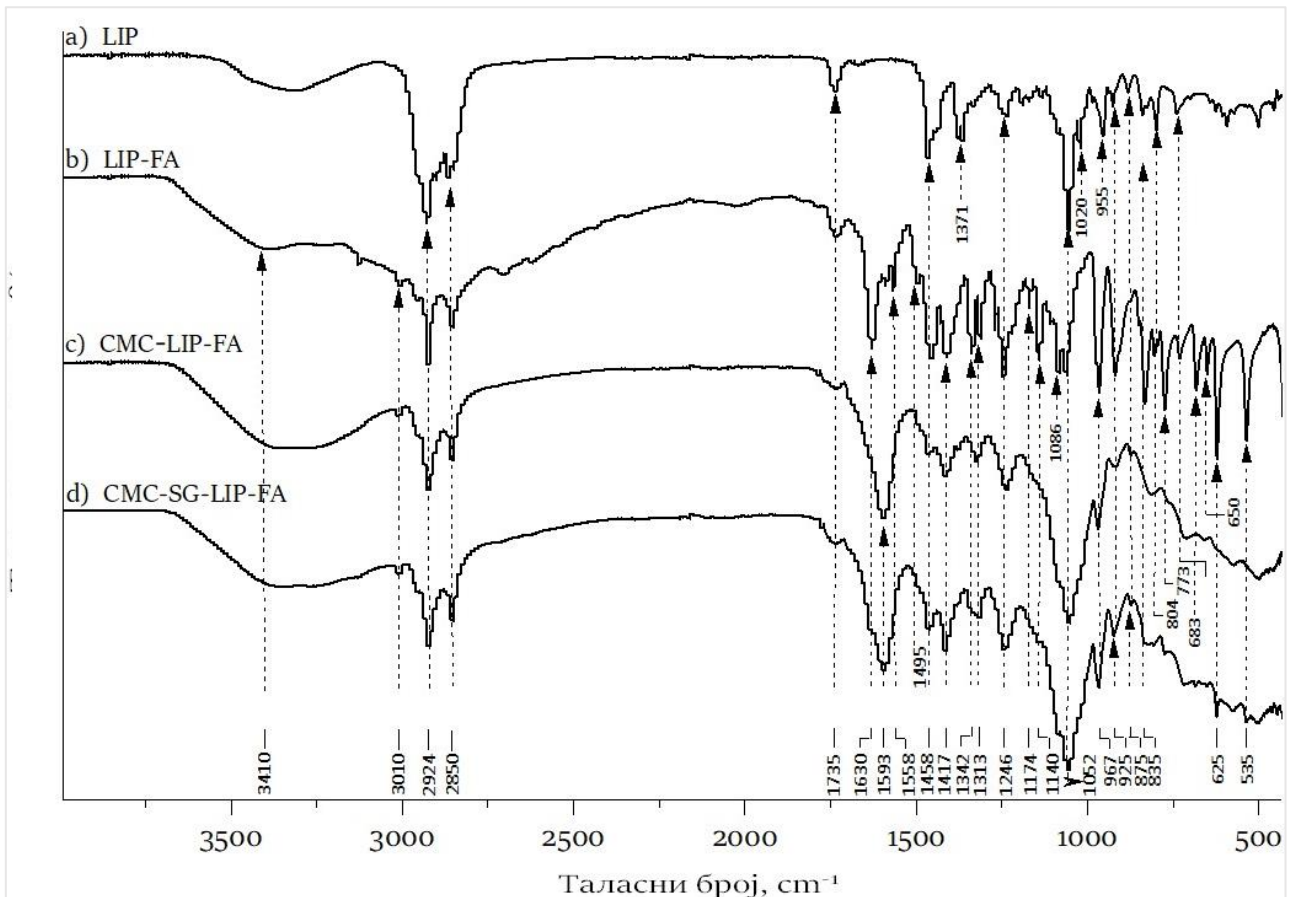
Резултати кинетике сушења приказане су на графику П2 (прилог). Криве сушења сугеришу да је губитак масе узорка биополимерних филмова одвија постепено. Наиме, воду најлакше губи узорак биополимерног филма израђен од чисте карбоксиметил-целулозе, јер релативно лако долази до раскидања водоничних веза између ланаца полимера. Што се тиче узорка биополимерних филмова који садрже фолну киселину у већој концентрацији (СМС-LIP-FA₃), губитак влаге одвија се спором динамиком јер сам молекул витамина може да за себе веже одређену количину воде, да кристалише и смањи дифузију молекула воде из полимерног матрикса. Такође, код узорка биополимерног филма који садржи липозоме (СМС-LIP-FA₁) примећено је спорије одавање влаге. С тим у вези, претпоставка је да липидна компонента унутар узорка биополимерног филма додатно поспешује интермолекулске хидрофобне реакције и пружа отпор преносу влаге из материјала у околни систем.

Резултати кинетике бубрења приказани су на графику П3 (прилог). Наиме, познато је да у киселој средини (рН 5,5) долази до интензивнијег бубрења биополимерних филмова, услед ширења ланаца полимера насталих као резултат депротоновања карбоксилних и хидроксилних група карбоксиметил-целулозе. У току првих 60 минута бубрење узорка биополимерних филмова је нагло, нарочито код узорка СМС-SG-FA₃. Након 60 минута настаје успоравање процеса бубрења свих испитиваних узорка. Разлог због којег се брзина бубрења смањује током времена јесте последица губитка међу-молекулских интеракција између функционалних група два полимера, праћено ерозијом биополимерних филмова. Такође,

временом порозна мрежа полимера постаје засићенија молекулима воде, те биополимерни филм постаје гушћи и транспарентнији.

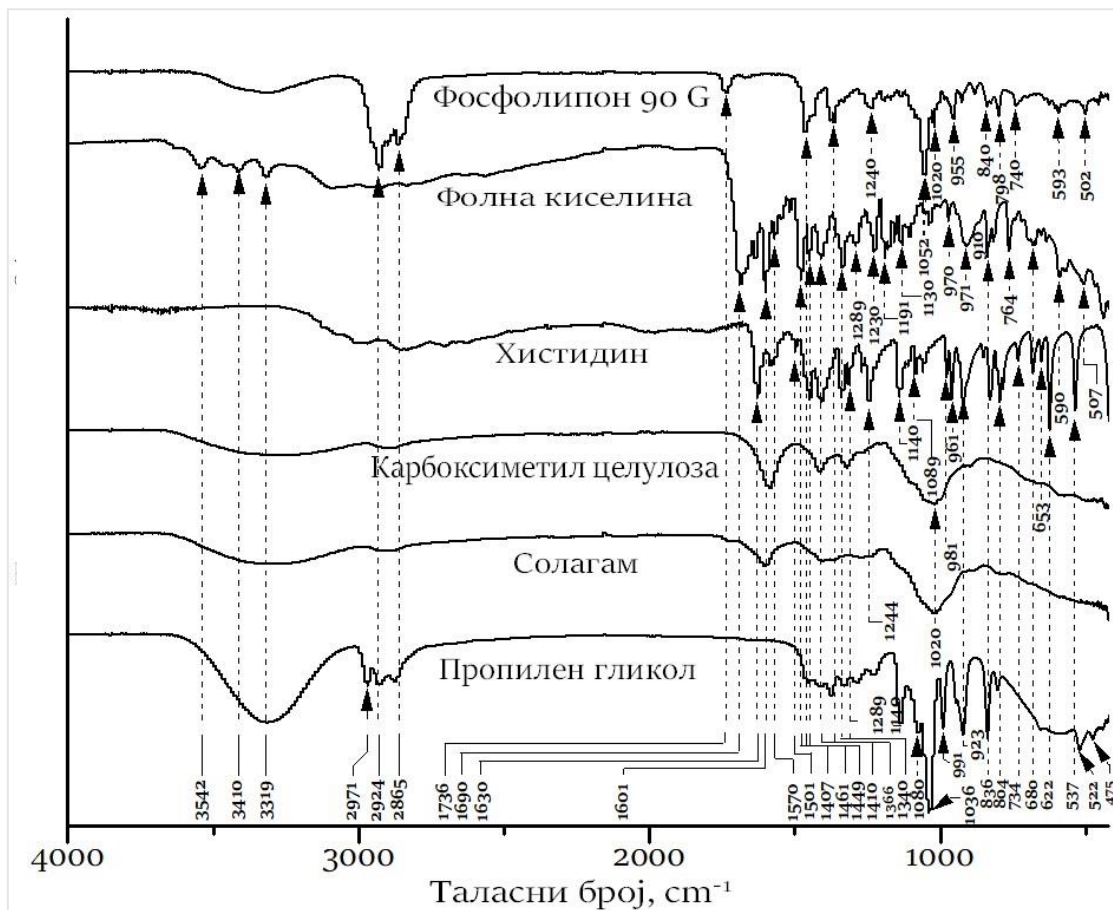
3.2.2. Анализа инфрацрвеног спектра липозом-биополимерни филм инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом

Инфрацрвени спектар система липозом-биополимерни филм приказан је на слици 3.12, док је на слици 3.13 приказан спектар чистих компонената које улазе у састав испитиваног система. Такође, на слици 3.12 је приказано поређење чистих липозома, липозома са инкапсулираном фолном киселином и липозома са инкапсулираном фолном киселином који су инкорпорирани у структуру биополимерног матрикса који у основи садржи натријум-карбоксиметил-целулозу и солагам. Процес облагања липозома карбоксиметил-целулозом или блендом карбоксиметил целулозе и солагама указује на промене у интензитетима или нестајање одређених пикова у неколико различитих региона апсорпционог спектра. Широке и дугачке траке на 3542 , 3410 и 3319 cm^{-1} могу се приписати ОН и $=\text{C}-\text{H}$ вибрацијама истезања које потичу од фосфолипона 90 G и полимерних молекула (карбоксиметил-целулозе и солагама). Када се пореде спектри липозома, липозома са фолном киселином и спектри липозома обложених полимерним материјалом, могу се уочити промене у интензитетима апсорпционих трака на 3010 , 2924 и 2850 cm^{-1} који представљају $=\text{C}-\text{H}$ и $\text{C}-\text{H}$ вибрације истезања у винил-, метил-/метиленским групама (поребло је од молекула фосфолипона 90 G и молекула фолне киселине). Такође, спектри чистих липозома показују највеће интензитете пикова у региону $3010\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ у односу на остале три формулације. Ове промене у интензитетима долазе као последица промене преноса наелектрисања са атома донора на атом акцептора и настанка нових водоничних веза између места која донирају/прихватају протоне из ингредијената система. Исто тако, ове промене се рефлектују као избочине у апсорпционом спектру. У складу са подацима из литературе, пик на 1736 cm^{-1} који потиче од $\text{C}=\text{O}$ везе и уочљив је у формулацијама чистих липозома и липозома са инкапсулираном фолном киселином, док је у формулацијама у којима су липозоми обложеним полимером евидентан изостанак пика (Chen и Tripp, 2012). Ова појава имплицира на потенцијалне физичко-хемијске интеракције између липозома и полимера. Апсорпционе траке на 1630 и 1558 cm^{-1} у спектру липозома са инкапсулираном фолном киселином могу се приписати NH вибрацијама савијања и $\text{C}-\text{N}$ вибрацијама истезања амид I и амид II траке, као и реакцијама између фолне киселине и полимерних конституената. Међутим, са спектра се може уочити да су пикови на 1630 и 1158 cm^{-1} , у формулацијама биополимерних филмова, уједињени у један и то са максимумом апсорпције на 1593 cm^{-1} . Тај сигнал представља присуство $\text{O}-\text{H}$ угаоних деформационих вибрација које се преклапају са асиметричним вибрацијама истезања које потичу од карбоксилних група пирувата и глукуронске киселине, који су у основи солагама (Osiro и сар., 2011). Iбекве и сар. (2017) указују да регион око 1458 cm^{-1} може представљати неке асиметричне вибрације истезања карбоксилне групе резидуа уронских киселина и њихових деривата, које потичу од комплексних полисахарида (ксантан гума и Арапска гума). Даље, порекло пика на 1417 cm^{-1} може бити из два извора: први, од $\text{C}-\text{C}$ веза фолне киселине и хистидина, и други од карбоксилних група молекула полимера. Такође, у литератури постоје индикације да се вибрације које се јављају на 1417 cm^{-1} могу приписати $\text{O}-\text{H}$ вибрацијама дисторзија фенолног скелета.



Слика 3.12. Инфрацрвени спектар чистих липозома (LIP), липозома са инкапсулираном фолном киселином (LIP-FA), липозома са фолном киселином инкорпорираних у карбоксиметил-целулозни матрикс (CMC-LIP-FA) и липозома са фолном киселином инкорпорираних у матрикс који садржи смешу карбоксиметил-целулозе и солагама (CMC-SG-LIP-FA)

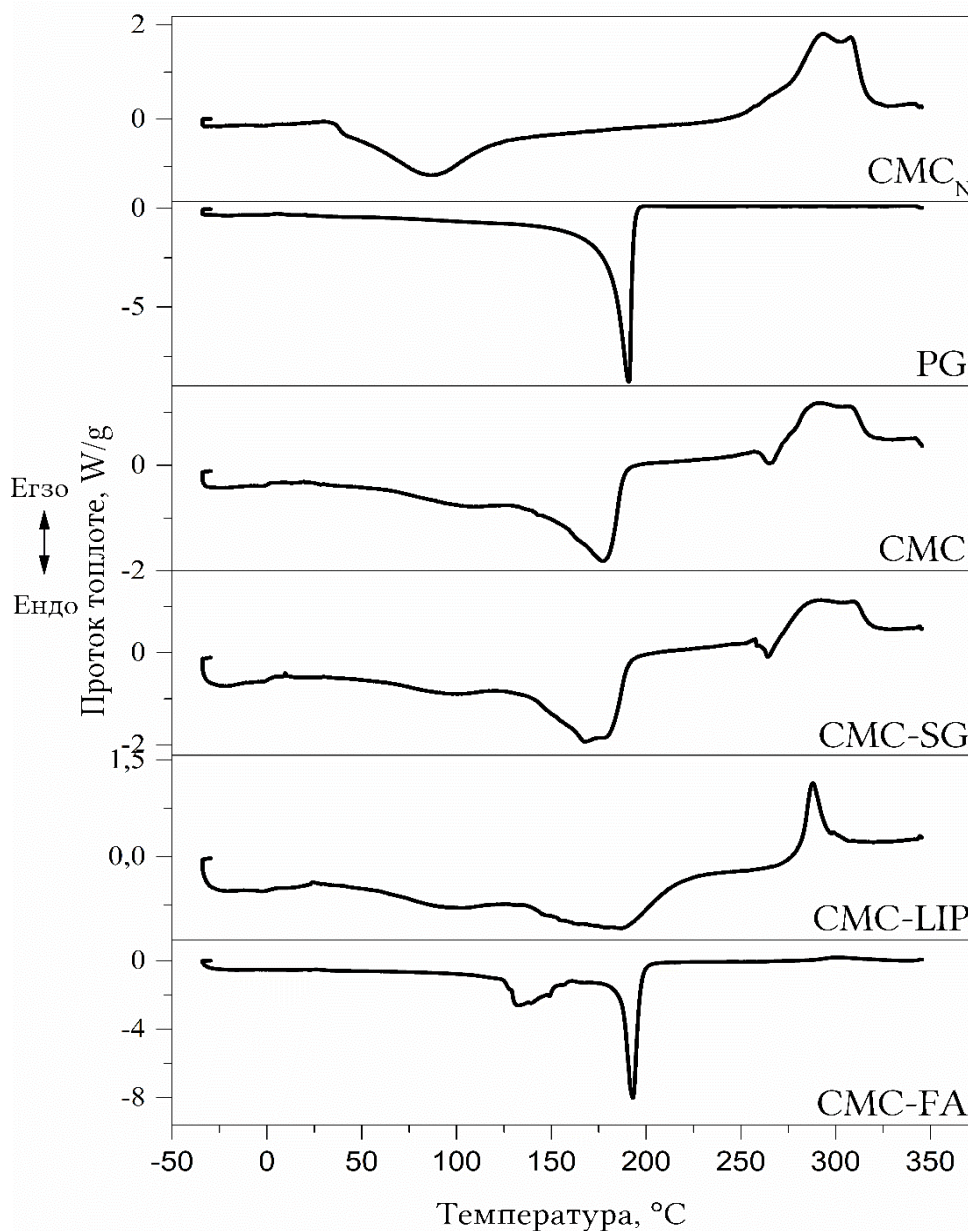
Пик на 1313 cm^{-1} представља C-C вибрације истезања бочног ланца хистидина и потврђује присуство аминокиселине у свим формулацијама. На 1246 cm^{-1} идентификоване су C-O, C-O-C и C-N вибрације истезања ароматичне компоненте у структури хистидина и P=O вибрације истезања које потичу од фосфатне групе фосфолипона 90 G. Изражена трака на 1086 cm^{-1} у формулацији чистих липозома и липозома са фолном киселином представља C-O вибрације истезања карбоксилне групе, док се на 1052 cm^{-1} појављује вибрација истезања P-O-C групе која потиче од молекула фосфолипида и хистидина. У исто време, сигнал на 1052 cm^{-1} може бити преклопљен C-O-C вибрацијама од пиранозног прстена карбоксиметил-целулозе. Даље, мали пик на 967 cm^{-1} може се приписати $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ вибрацијама истезања које су пореклом од молекула фолне киселине, док је на 925 cm^{-1} уочљив пик од C-N вибрације истезања које се појављују као последица деформације ароматичне компоненте молекула хистидина. На крају, присуство малих пикова на 625 (деформације истезања) и 535 cm^{-1} (торзиона осцилација NH_3^+) доказују присуство молекула витамина и аминокиселине у комплексној структури биополимерног филма.



Слика 3.13. Инфрацрвени спектар чистих компонената које улазе у састав комплексног система липозом-биополимерни филм

3.2.3. Диференцијална скенирајућа калориметрија

Диференцијална скенирајућа калориметрија коришћена је за идентификацију термалних догађаја и добијања додатних информација везаних за интеракције између компонената биополимерног филма. Филмови карбоксиметил-целулозе генеришу неколико термалних догађаја (слика 3.14). Широки транзициони пик који се појављује на око 90 °C значајно је смањен у формулацији карбоксиметил-целулозе и карбоксиметил-целулозе-солагам у односу на транзиционе пикове нативне натријум-карбоксиметил целулозе. Редуковане вредности енталпија топљења филмова карбоксиметил-целулозе указују на мање сакупљање ланаца полимера и последично томе мању кристалиничност у коначној структури. Изражени ендотермни пик филмова карбоксиметил-целулозе који се приписује кључању пропилен-гликола измештен је наниже у поређењу са пиком чистог пропилен-гликола (оштри ендотермни пик на 190 °C), нарочито у случају формулације карбоксиметил целулоза-солагам, упућујући тиме на интеракције између самих компонената биополимерног филма. Такође, DSC криве биополимерних филмова и нативне карбоксиметил-целулозе показују изразити термални догађај који се појављује као доминантни егзотермни пик, на око 284 °C, који се може приписати термалној деградацији карбоксилног јона и C-O-C естра који улази у састав комплексне структуре карбоксиметил-целулозе (Kim и сар., 1997).



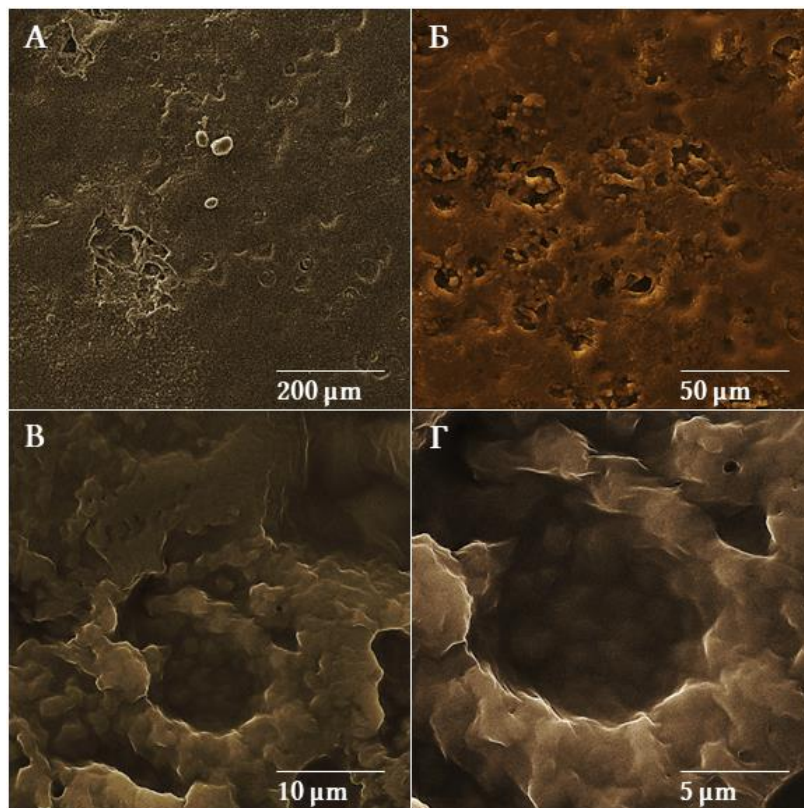
Слика 3.14. Термограм добијен техником диференцијалне скенирајуће калориметрије за узорке система липозом-биополимерни филм (CMC_N – карбоксиметил-целулоза (нативна), PG – пропилен-гликол, CMC – биополимерни филм карбоксиметил-целулозе, CMC-SG – биополимерни филм карбоксиметил-целулозе и солагама, CMC-LIP – биополимерни филм карбоксиметил-целулозе и липозома, CMC-FA – биополимерни филм карбоксиметил-целулозе и фолне киселине)

Са друге стране, након инкорпорације липозома унутар структуре биополимерних филмова долази до измештања ендотермних догађаја унутар опсега температура од 140-200 °C због преклапања два пика (од фосфолипона 90 G и од липозома). С тим у вези, у експерименталним испитивањима потврђено је присуство споменутих пикова, док деградација фосфолипида на 230 °C није уочена, јер су промене вредности енталпије овог термалног догађаја биле изузетно ниске. Сходно томе, да би се установиле могуће интеракције између система фолна киселина-хистидин и система фолна киселина-хистидин-карбоксиметил-целулоза, припремљен је контролни узорак који не садржи липозоме. Анализом термограма система фолна киселина-хистидин утврђено је присуство карактеристичног ендотермног догађаја са јасно израженим пиком, на 154 °C, што се може приписати разградњи L-

глутаминске киселине, која се налази у основи структуре молекула витамина. Појава померања ендотермних догађаја ка нижим вредностима температура индикација је могућих интеракција између молекула витамина и полимера, што додатно имплицира на смањену термичку стабилност L-глутаминске киселине. Штавише, може се приметити потпуно одсуство тачке топљења хистидина (288 °C), што је показатељ да аминокиселина егзистира у аморфном стању. Коначно, интеракције између фосфатидилхолина и фолне киселине при загревању могу се евидентирати у опсегу температура карактеристичних за разградњу *p*-аминобензојеве киселине.

3.2.4. Скенирајућа електронска микроскопија

На слици 3.15. приказане су микрографије попречних пресека честица липозома инкорпорираних у структуру биополимерног филма (CMC-SG-LIP-FA).

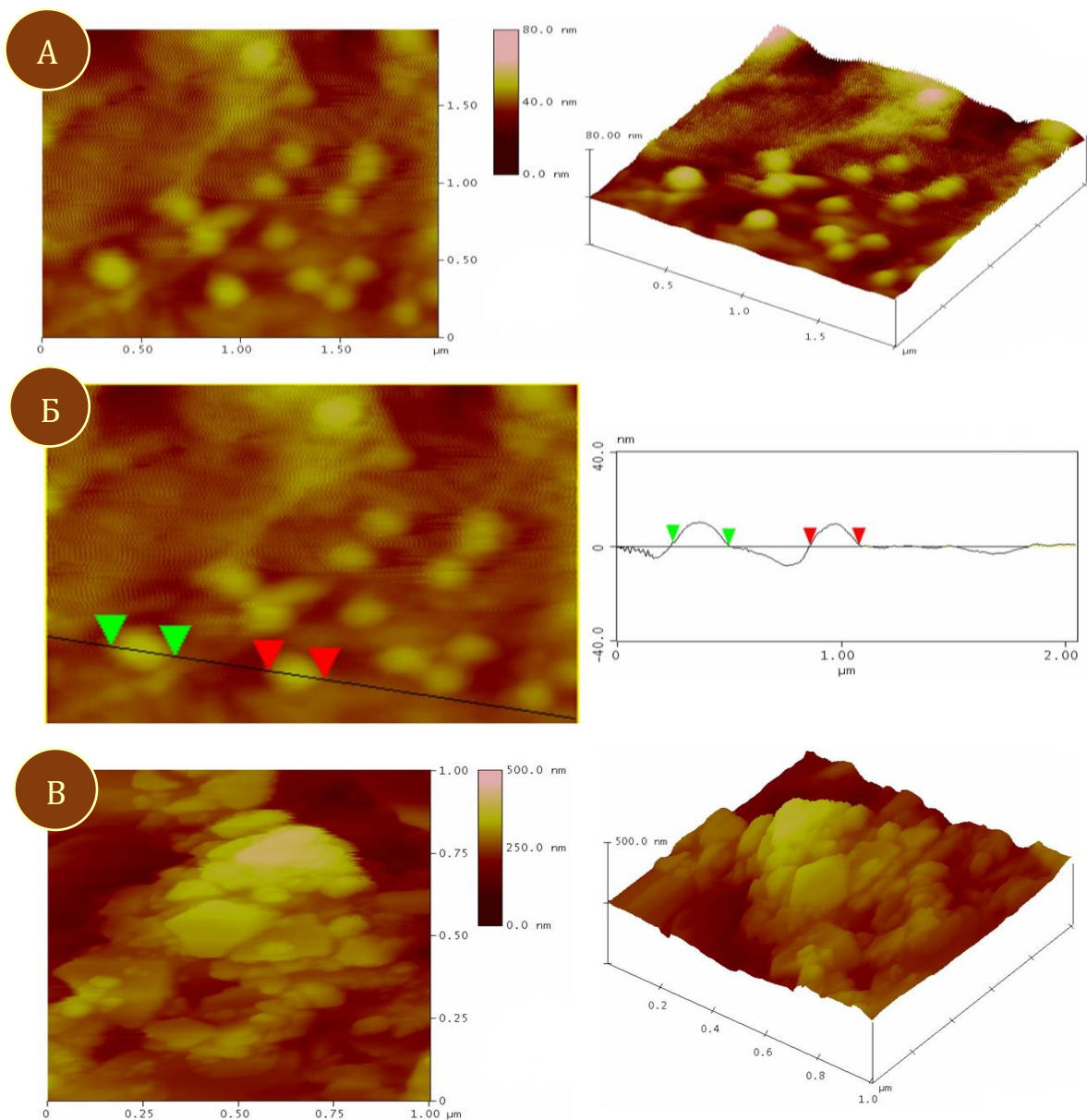


Слика 3.15. Електронске микрографије попречних пресека липозома инкорпорираних у структуру биополимерног филма - CMC-SG-LIP-FA: А) увеличање 200 x; Б) увеличање 1000 x; В) увеличање 5000 x; Г) увеличање 10000 x

Са приказане слике може се уочити да су липозоми, у одређеној мери задржали своју нативну (глобуларну) форму и након инкорпорације у полимерни матрикс. Такође, опажа се да су липозоми, у мањој мери, агломерирали у току самог процеса припреме биополимерног филма. При већим увећањима (5000 и 10000 x) у унутрашњости система виде се мањи липозоми инкорпорирани у поре матрикса карбоксиметилцелулозе и солагама. Уочљиво је да предложени систем карактерише одређена порозност и као такав, у извесној мери, поприма структуру пчелињег саћа.

3.2.5. Микроскопија атомских сила

Експерименталним тестовима утврђено је да липозоми израђени од фосфолипона 90 G, пролипозомном методом, имају правилан, глобуларни облик, док је додаток фолне киселине утицао на промену облика у мањој мери. Споменута промена структуре, из глобуларне у сферну, настала је као последица процеса деформације наночестица. Такође, из резултата добијених микроскопијом атомских сила може се уочити да липозоми, генерално, уграђени у структуру биополимерног филма карбоксиметил-целулозе задржавају свој геометријски интегритет и изгледају као одвојене честице са средњим пречником од 249,3 nm. Насупрот томе, липозоми интегрисани у структуру биополимерног филма који у основи садржи бленд карбоксиметил-целулозе и солагама показују тенденцију ка процесу фузије и формирању агломерата. На слици 3.16. приказана је морфологија биополимерних филмова са интегрисаним липозомима који садрже фолну киселину.



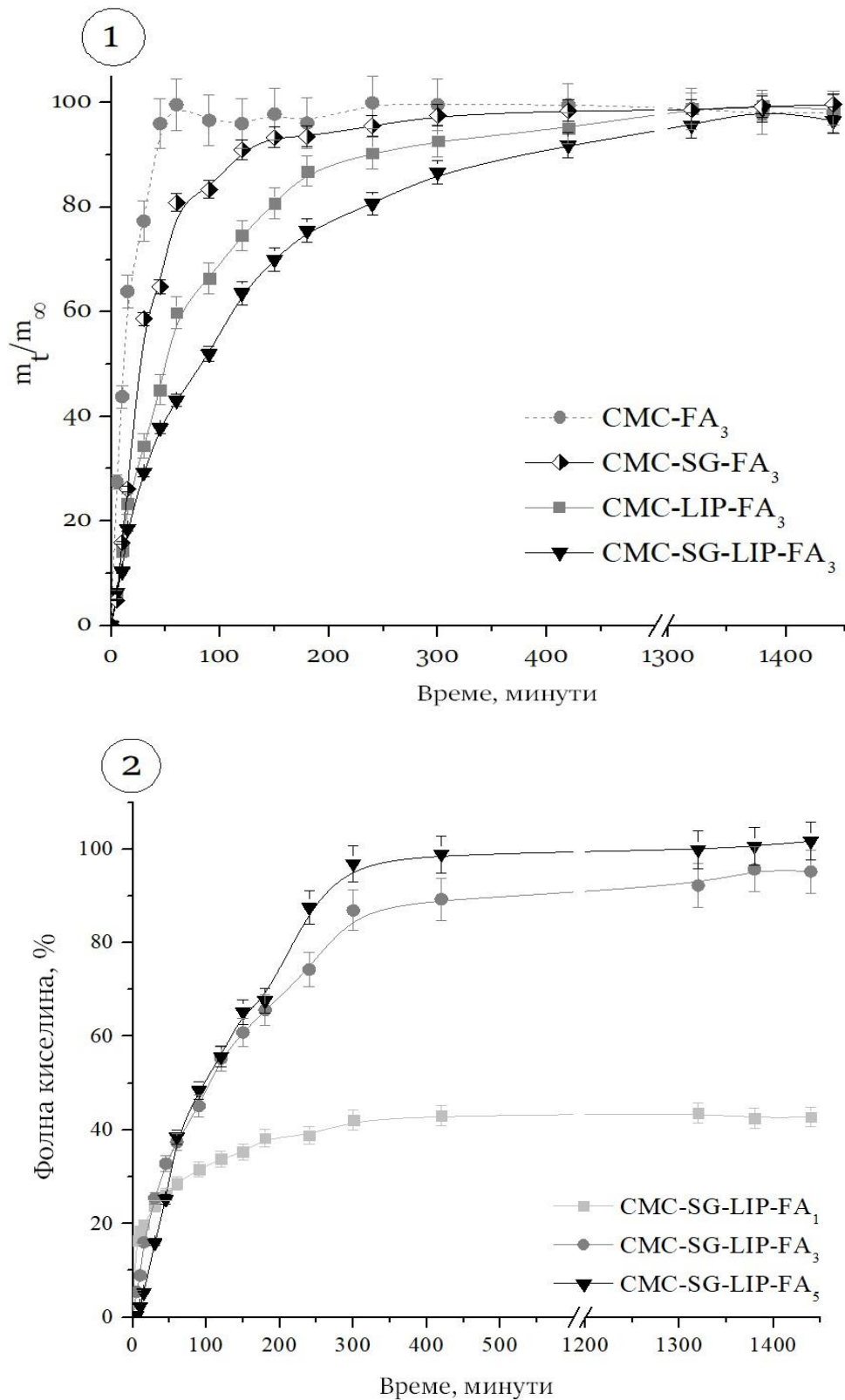
Слика 3.16. Микрографије система липозом-биополимерни филм добијеног техником микроскопије атомских сила- СМС-LIP-FA: А) поглед одозго и анализа површине; В) секциона анализа и спектар; СМС-SG-LIP-FA: В) поглед одозго и анализа површине

3.2.6. Кинетика контролисаног отпуштања фолне киселине из система липозом-биополимерни филм

Испитивање контролисаног отпуштања фолне киселине, при концентрацији од 3 mg/ml, из система липозом-биополимерни филм изведена је коришћењем Францове дифузионе ћелије. На слици 3.17. приказани су профили отпуштања фолне киселине из четири различите формулације у средину која симулира услове на кожи (фосфатни пуфер, pH 5,5) у току 24 часа. На слици 3.17/1, приказан је однос удела отпуштеног лека у времену t (m_t) и удела отпуштеног лека у моменту постизања равнотежне концентрације (m_e), током времена, изражен у процентима. Генерално, на вишим вредностима pH средине од константе дисоцијације карбоксилних група (pK_a 4-5), долази до депротоновања карбоксилних група (COO^-), док електростатичке силе одбијања између негативно наелектрисаних места (COO^-) интензивирају бубрење полимера, што поспешује процес ослобађање фолне киселине из матрице. Такође, може се приметити да удео ослобођене фолне киселине расте у току времена, знатно више, када се молекул витамина унесе у раствор полимера у облику суспензије (СМС-FA и СМС-SG-FA). Са друге стране, када се фолна киселина најпре инкапсулише у липозоме, а затим диспергује у раствор полимера, удео ослобођене фолне киселине у току времена биће мањи у односу на случај када липозоми нису део предложеног система (СМС-LIP-FA и СМС-SG-LIP-FA). Систем липозом-биополимерни филм омогућио је продужено ослобађање фолне киселине у временском трајању од 24 часа, за разлику од самог полимера који је обезбедио задржавање активне супстанце од око 6,5 часова. Сходно томе, резултати добијени у овој тези подударују се са резултатима добијеним у ранијим истраживањима о овој теми (Silva-Weiss и сар., 2018). Наиме, постоји претпоставка да солагам, као једињење са великом моларном масом (од један до неколико милиона Da), доприноси великом капацитету згушњавања и на тај начин успорава дифузионе процесе.

Утицај иницијалне концентрације активне супстанце (1, 3 и 5 mg/ml) на проценат отпуштања фолне киселине из формулације СМС-SG-LIP-FA графички је илустрован на слици 3.17/2. Као што се може уочити, апсолутна брзина ослобађања знатно се повећава са повећањем иницијалне концентрације витамина, са 1 на 3 mg/ml, док даље повећање, закључно са 5 mg/ml, не омогућава такав ефекат. Такође, полимерни матрикс утиче на смањење апсолутне концентрације ослобођеног активног молекула, те је у случају формулација у којима концентрација фолне киселине износи 1 mg/ml разлика у вредностима ослобођеног активног молекула статистички значајна тек након 300 минута ($p \leq 0,05$), док је у случају формулација биополимерних филмова код који је концентрација фолне киселине 3 и 5 mg/ml, разлика уочљива од самог почетка. Као што је и очекивано, липозоми који садрже веће концентрације фолне киселине више ће је и ослободити у току времена. Стога, растворљивост фолне киселине и овога пута један је од фактора ограничења у испитиваном систему. Уопштено посматрано, молекул фолне киселине мање ће бити јонизован при нижим вредностима pH средине (кисела средина) у односу на више (алкална средина) и последично томе бити мање растворљив. У складу са резултатима студије Wu и сар. (2010), растворљивост фолне киселине на 25 °C, при pH 5,59, износи $216 \cdot 10^{-6}$ mol/l (0,094 mg/ml), што је вредност приближна тачки сатурације уочљивој на слици 3.18Б, иако поједини литературни подаци индукују далеку нижу растворљивост молекула витамина ($\sim 3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml) на pH 5,5 (Younis, 2003). Међутим, потребно је нагласити да је присуство хистидина, највероватније, допринело повећању растворљивости фолне киселине услед електростатичких интеракција које су настале између два молекула (фолне киселине као пример молекула слабе киселине и хистидина као пример молекула слабе базе). Додатно, у прилогу (график П4) резултати отпуштања фолне киселине само из липозома,

као контролног узорка (LIP-FA₁, LIP-FA₃ и LIP-FA₅) и резултати отпуштања фолне киселине из формулација липозом-биополимерни филм (CMC-SG-LIP-FA₁, CMC-SG-LIP-FA₃, CMC-SG-LIP-FA₅) обједињени су како би се једноставније могли поредити, односно анализирати.



Слика 3.17. Кинетика отпуштања фолне киселине из различитих формулација система липозом-биополимерни филм: 1. Формулације које садрже фолну киселину у концентрације од 3 mg/ml; 2. Формулације које садрже фолну киселину у концентрацијама од 1, 3 и 5 mg/ml.

4. ЗАКЉУЧАК

Из резултата ове докторске дисертације може се закључити да липозоми и систем липозом-биополимерни филм може адекватно служити за инкапсулацију и контролисано/продужено отпуштање фолне киселине. Детаљно су описани поступци добијања мултиламеларних липозома и методе њихове карактеризације које укључују фотон корелациону спектроскопију за одређивање стабилности и величине честица, затим спектрофотометрију у ултраљубичастој области и течну хроматографију високих перформанси за одређивање степена инкапсулације активне супстанце у носач и израду профила отпуштања, као и утврђивање потенцијалних интеракција између активне супстанце и носача, односно других компоненти у систему, употребом инфрацрвене спектрофотомерије са Фуријеовом трансформацијом. Испитивање морфологије система изведено је коришћењем микроскопије атомских сила. Систем липозом-биополимерни филм, најпре је укључивао методе физичке карактеризације (маса, дебљина, обојеност, вискозност, густина, површински напон, кинетика сушења и бубрења), након чега је тежиште рада пребачено за одређивање механичких, термичких, структурних и морфолошких својстава. На крају истраживања анализирана је кинетика контролисаног отпуштања фолне киселине из система липозом-биополимерни филм. У наставку, у кратким ставкама, образложени су најважнији резултати истраживања.

- Основни недостатак фолне киселине је ниска растворљивост у биолошким медијумима, при неутралним вредностима рН средине. Стога, један од резултата добијен у овој студији указује да додаток L-хистидина, као агенса солубилизације, у концентрацији од 8 mg/ml, позитивно утиче на повећање растворљивости витамина. С тим у вези, релативно висока средња вредност степена инкапсулације у липозома, која износи приближно 84%, додатно потврђује претходно наведену тврдњу.
- Липозоми са инкапсулираном фолном киселином показали су високу стабилност у току чувања/складиштења на 4 °С, у трајању од 30 дана, што су потврдили параметри везани за расподелу величине честице, површинског наелектрисања (зета потенцијал) и индекса полидисперзије.
- Додатак холестерола (20%, mol) у одређеној мери утиче на повећање средњег пречника честица, док додаток SPAN-а 20 (20%, mol) утиче на смањење величине липозома. Вредности средње величине честица налазе се у опсегу од 503-877 нанометара, док су се вредности зета потенцијала кретале од -20 до -40 mV. Након седам дана складиштења на 4 °С, дошло је смањење величине честица за око 22-24%, зависно од испитиване формулације.
- Резултати добијени структурном хемијском анализом, реализовани употребом инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом, у опсегу таласних бројева од 1630-1464 cm⁻¹ и 965-919 cm⁻¹, указују на интеракције између молекула фосфолипида, са једне стране и молекула фолне киселине, и L-хистидина, са друге. Такође, резултати добијени овом методом инструменталне анализе указују да присуство молекула површински активне материје у структури фосфолипидног двослоја ближе одређује просторну геометрију молекула витамина и молекула аминокиселине унутар носача.
- Резултати добијени анализом термичких својстава носача и инкапсуланата, добијени уз помоћ диференцијалне скенирајуће калориметрије, указују на то да на вишим температурама термичког третмана (>160 °С) долази до деградације молекула витамина, у три ступња, као и до промене агрегатне структуре, из кристалне у аморфну. Такође, резултати добијени диференцијалном скенирајућом калориметријом указују на потенцијалне интеракције између молекула витамина и молекула фосфолипида.

- Анализа морфолошких својстава микроскопијом атомских сила показује да липозоми, у нативном стању, поседују структуру глобуле, док код липозома са инкапсулираном фолном киселином долази до процеса издуживања (као последице деформације), те такве честице попримају облик неправилне сфере и/или ваљка.
- Профили отпуштања добијени у овим испитивањима указују да се отпуштање молекула активне супстанце из липозома одвија на уобичајан начин, при чему је механизам преноса масе условљен процесом молекулске дифузије. Такође, криве отпуштања указују да је стопа отпуштања предодређена растворљивошћу активне супстанце у медијуму у којем се отпуштање прати.
- Добијени резултати указују да молекули SPAN-а 20 не обезбеђују додатни отпор дифузији молекула фолне киселине из липозома.
- Резултати произашли из испитивања механичких својстава система липозом-биополимерни филм указују да додатак фолне киселине доприноси укупној чврстини система, док додатак липозома у мањој мери утиче на споменуто својство.
- Анализом структуре система липозом-биополимерни филм инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом утврђено је да су вибрације истезања амид I и амид II траке у опсегу таласних бројева од 1593 до 1630 cm^{-1} резултат интеракција између полимера и липозома.
- Анализом термичких својстава система липозом-биополимерни филм помоћу диференцијалне скенирајуће калориметрије утврђено је да на нижим температурама загревања (90 °C) долази до сакупљања ланаца молекула полимера и до промене кристалинжности финалне структуре. Такође, резултати показују да до деградације фолне киселине долази на температурама вишим од 150 °C, док је хистидин на вишим температурама у аморфном стању.
- Скенирајућом електронском микроскопијом утврђено је да липозоми у мањој мери након инкорпорације у биополимерни филм теже формирању агломерата, при чему је њихова нативна структура делимично нарушена.
- Микроскопија атомских сила показала је да липозоми инкорпорирани у структури биополимерног филма задржавају нативни облик (облик глобуле). Са друге стране, инкорпорацијом липозома у биополимерни филм који, поред карбоксиметил-целулозе, садржи и солагам, долази до процеса фузије честица и формирања агломерата.
- Резултати испитивања кинетике отпуштања указују да на вишим вредностима рН средине од константе дисоцијације карбоксилних група полимера, долази до интензивног бубрења, што је у исто време праћено интензивним ослобађањем фолне киселине из биополимерног филма.
- Систем липозом-биополимерни филм омогућава продужено отпуштање фолне киселине у временском трајању од 24 часа, за разлику од самог биополимерног филма који обезбеђује задржавање молекула витамина у трајању од око 6,5 часова.

На основу добијених резултата, детаљног и свеобухватног прегледа литературе, научни допринос ове докторске дисертације огледа се у дефинисању поступка израде модела трансдермалног система који фолну киселину може ослобађати контролисаним механизмом, а поред тога имати могућност за ширу примену. Стога, резултати произашли из ове докторске дисертације имају, пре свега, феноменолошки значај за описивање једног савременог и еколошки прихватљивог биополимерног носача.

ЛИТЕРАТУРА

- Abd, E., Gomes, J., Sales, C. C., Yousef, S., Forouz, F., Telaprolu, K. C., Roberts, M. S., Grice, J. E., Lopes, P. S., & Leite-Silva, V. R. (2021). Deformable liposomes as enhancer of caffeine penetration through human skin in a Franz diffusion cell test. *International Journal of Cosmetic Science*, 43(1), 1–10.
- Abdollahi, M., Damirchi, S., Shafafi, M., Rezaei, M., & Ariaai, P. (2019). Carboxymethyl cellulose-agar biocomposite film activated with summer savory essential oil as an antimicrobial agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 561–568.
- Aiache, J. M. (1984). Historique des emplâtres. *Bull Tech Gattefossé*, 77, 9–17.
- Alkrad, J. A. (2019). Using inverted microemulsions for transdermal application of folic acid. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*, 13(02).
- Ammar, H. O., Ghorab, M. M., Mostafa, D. M., & Ibrahim, E. S. (2016a). Folic acid loaded lipid nanocarriers with promoted skin antiaging and antioxidant efficacy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 31, 72–82.
- Andra, V. V. S. N. L., Pammi, S. V. N., Bhatraju, L. V. K. P., & Ruddaraju, L. K. (2022). A comprehensive review on novel liposomal methodologies, commercial formulations, clinical trials and patents. *Bionanoscience*, 12(1), 274–291.
- Anirudhan, T. S., Nair, A. S., & Gopika, S. S. (2018). The role of biopolymer matrix films derived from carboxymethyl cellulose, sodium alginate and polyvinyl alcohol on the sustained transdermal release of diltiazem. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 779–789.
- Arsov, Z., & Quaroni, L. (2007). Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 150(1), 35–48.
- Augustin, M. A., Sanguansri, L., & Lockett, T. (2013). Nano-and micro-encapsulated systems for enhancing the delivery of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1290(1), 107–112.
- Azarifar, M., Ghanbarzadeh, B., Khiabani, M. S., Basti, A. A., Abdulkhani, A., Noshirvani, N., & Hosseini, M. (2019). The optimization of gelatin-CMC based active films containing chitin nanofiber and *Trachyspermum ammi* essential oil by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 208, 457–468.
- Balanč, B. (2016). *Lipozomi i sistemi lipozomi-alginat za kontrolisano otpuštanje rasveratrola* [Doktorska disertacija]. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
- Bangham, A. D., & Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, 8(5), 660–IN10.

- Barrett, D. A., & Rutter, N. (1994). Transdermal delivery and the premature neonate. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 11(1), 1–30.
- Bastiat, G., Oliger, P., Karlsson, G., Edwards, K., & Lafleur, M. (2007). Development of non-phospholipid liposomes containing a high cholesterol concentration. *Langmuir*, 23(14), 7695–7699.
- Basu, P., Narendrakumar, U., Arunachalam, R., Devi, S., & Manjubala, I. (2018). Characterization and evaluation of carboxymethyl cellulose-based films for healing of full-thickness wounds in normal and diabetic rats. *ACS Omega*, 3(10), 12622–12632.
- Batinić, P. M., Đorđević, V. B., Obradović, N. S., Krstić, A. D., Stevanović, S. I., Balanč, B. D., Marković, S. B., Pjanović, R. V., Mijin, D. Ž., & Bugarski, B. M. (2023). Polymer-lipid matrices based on carboxymethyl cellulose/solagum and liposomes for controlled release of folic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 125, 2200169.
- Batinić, P. M., Đorđević, V. B., Stevanović, S. I., Balanč, B. D., Marković, S. B., Luković, N. D., Mijin, D. Ž., & Bugarski, B. M. (2020). Formulation and characterization of novel liposomes containing histidine for encapsulation of a poorly soluble vitamin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 59, 101920.
- Bile, J., Bolzinger, M.-A., Valour, J.-P., Fessi, H., & Chevalier, Y. (2016). Antimicrobial films containing microparticles for the enhancement of long-term sustained release. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(5), 818–824.
- Branda, R. F., McCormack, J. J., Perlmutter, C. A., Mathews, L. A., & Robison, S. H. (1988). Effects of folate deficiency on the metastatic potential of murine melanoma cells. *Cancer Research*, 48(16), 4529–4534.
- Briuglia, M.-L., Rotella, C., McFarlane, A., & Lamprou, D. A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, 5(3), 231–242.
- Brody, T., Shane, B., & Stokstad, E. L. R. (2001). Folic acid. *Handbook of Vitamins*, 427–462.
- Budai, M., & Szogyi, M. (2001). Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 71(1), 114–118.
- Butterworth Jr, C. E. (1993). Folate status, women's health, pregnancy outcome, and cancer. *Journal of the American College of Nutrition*, 12(4), 438–441.
- Čalija, B. (2013). *Funkcionalnost hitozana u formulaciji alginat-hitozan mikročestica kao nosača za nesteroidne antiinflamatorne lekove* [Doktorska disertacija]. Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Cevc, G., & Blume, G. (2004). Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1663(1–2), 61–73.
- Charpentier, D., Mocanu, G., Carpov, A., Chapelle, S., Merle, L., & Müller, G. (1997). New hydrophobically modified carboxymethylcellulose derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 33(2–3), 177–186.

- Chen, C., & Tripp, C. P. (2012). A comparison of the behavior of cholesterol, 7-dehydrocholesterol and ergosterol in phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(7), 1673–1681.
- Chien, Y. W. (1987). Development of transdermal drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 13(4–5), 589–651.
- Crank, J. (1979). *The mathematics of diffusion*. Oxford university press.
- Da Silva, T. N., Reynaud, F., de Souza Picciani, P. H., e Silva, K. G. de H., & Barradas, T. N. (2020). Chitosan-based films containing nanoemulsions of methyl salicylate: Formulation development, physical-chemical and in vitro drug release characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2558–2568.
- Daddona, P. E., Matriano, J., Mandema, J., & Maa, Y.-F. (2011). Parathyroid hormone (1-34)-coated microneedle patch system: clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics for treatment of osteoporosis. *Pharmaceutical Research*, 28(1), 159–165.
- Dauqan, E., & Abdullah, A. (2013). Utilization of gum arabic for industries and human health. *American Journal of Applied Sciences*, 10(10), 1270.
- Debowska, R., Rogiewicz, K., Iwanenko, T., Kruszewski, M., & Eris, I. (2005). Folic acid (folacin)-New application of a cosmetic ingredient. *Kosmetische Medizin*, 26(3), 123.
- Dekker, G. A., De Vries, J. I. P., Doelitzsch, P. M., Huijgens, P. C., Von Blomberg, B. M. E., Jakobs, C., & Van Geijn, H. P. (1995). Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 173(4), 1042–1048.
- Dellali, M., Iurciuc, C. E., Savin, C. L., Spahis, N., Djennad, M., & Popa, M. (2021). Hydrogel films based on chitosan and oxidized carboxymethylcellulose optimized for the controlled release of curcumin with applications in treating dermatological conditions. *Molecules*, 26(8), 2185.
- Deo, N., & Somasundaran, P. (2003). Disintegration of liposomes by surfactants: mechanism of protein and cholesterol effects. *Langmuir*, 19(6), 2007–2012.
- Dickinson, E., Galazka, V. B., & Anderson, D. M. W. (1991). Emulsifying behaviour of gum arabic. Part 2: Effect of the gum molecular weight on the emulsion droplet-size distribution. *Carbohydrate Polymers*, 14(4), 385–392.
- Ding, X., Yin, C., Zhang, W., Sun, Y., Zhang, Z., Yang, E., Sun, D., & Wang, W. (2020). Designing aptamer-gold nanoparticle-loaded pH-sensitive liposomes encapsulate morin for treating cancer. *Nanoscale Research Letters*, 15(1), 1–17.
- Duduković, A. (2008). *Osnovi i operacije prenosa mase*. Akademska misao, Beograd.
- Dunnick, J. K., Rooke, J. D., Aragon, S., & Kriss, J. P. (1976). Alteration of mammalian cells by interaction with artificial lipid vesicles. *Cancer Research*, 36(7_Part_1), 2385–2389.
- Eitenmiller, R. R. (2008). Vitamin B₆. *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*.

- Elsayed, M. M. A., Abdallah, O. Y., Naggar, V. F., & Khalafallah, N. M. (2006). Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 322(1-2), 60-66.
- Fadda, A. M., Baroli, B. M., Maccioni, A. M., Sinico, C., Valenti, D., & Alhaique, F. (1998). Phospholipid-detergent systems: effects of polysorbates on the release of liposomal caffeine. *Il Farmaco*, 53(10-11), 650-654.
- Fan, X., Chen, J., & Shen, Q. (2013). Docetaxel-nicotinamide complex-loaded nanostructured lipid carriers for transdermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 458(2), 296-304.
- Filipowicz, A., & Wołowiec, S. (2011). Solubility and in vitro transdermal diffusion of riboflavin assisted by PAMAM dendrimers. *International Journal of Pharmaceutics*, 408(1-2), 152-156.
- Gali, L., Bedjou, F., Ferrari, G., & Donsì, F. (2022). Formulation and characterization of zein/gum Arabic nanoparticles for the encapsulation of a rutin-rich extract from *Ruta chalepensis* L. *Food Chemistry*, 367, 129982.
- Gao, J., Mao, Y., Xiang, C., Cao, M., Ren, G., Wang, K., Ma, X., Wu, D., & Xie, H. (2021). Preparation of β -lactoglobulin/gum arabic complex nanoparticles for encapsulation and controlled release of EGCG in simulated gastrointestinal digestion model. *Food Chemistry*, 354, 129516.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., & Gómez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18(7), 549-579.
- Garg, M., Dutta, T., & Jain, N. K. (2007). Stability study of stavudine-loaded O-palmitoyl-anchored carbohydrate-coated liposomes. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 8, E86-E93.
- Gazzali, A. M., Lobry, M., Colombeau, L., Acherar, S., Azaïs, H., Mordon, S., Arnoux, P., Baros, F., Vanderesse, R., & Frochot, C. (2016). Stability of folic acid under several parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 419-430.
- Glowka, E., Stasiak, J., & Lulek, J. (2019). Drug delivery systems for vitamin D supplementation and therapy. *Pharmaceutics*, 11(7), 347.
- Godfrey, P. S. A., Toone, B. K., Bottiglien, T., Laundry, M., Reynolds, E. H., Carney, M. W. P., Flynn, T. G., & Chanarin, I. (1990). Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate. *The Lancet*, 336(8712), 392-395.
- Han, J., Colditz, G. A., & Hunter, D. J. (2007). Polymorphisms in the MTHFR and VDR genes and skin cancer risk. *Carcinogenesis*, 28(2), 390-397.
- Hazirah, M. N., Isa, M. I. N., & Sarbon, N. M. (2016). Effect of xanthan gum on the physical and mechanical properties of gelatin-carboxymethyl cellulose film blends. *Food Packaging and Shelf Life*, 9, 55-63.
- Higuchi, W. I., & Higuchi, T. (1960). Theoretical analysis of diffusional movement through heterogeneous barriers. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 49(9), 598-606.
- Hiraishi, Y., Hirobe, S., Iioka, H., Quan, Y.-S., Kamiyama, F., Asada, H., Okada, N., & Nakagawa, S. (2013). Development of a novel therapeutic approach using a retinoic acid-loaded microneedle

- patch for seborrheic keratosis treatment and safety study in humans. *Journal of Controlled Release*, 171(2), 93–103.
- Holeček, M. (2020). Histidine in health and disease: metabolism, physiological importance, and use as a supplement. *Nutrients*, 12(3), 848.
- Hoppel, M., Mahrhauser, D., Stallinger, C., Wagner, F., Wirth, M., & Valenta, C. (2014). Natural polymer-stabilized multiple water-in-oil-in-water emulsions: a novel dermal drug delivery system for 5-fluorouracil. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(5), 658–667.
- Hudiyanti, D., Al Khafiz, M. F., Anam, K., Siahaan, P., & Christa, S. M. (2022). In vitro evaluation of curcumin encapsulation in gum arabic dispersions under different environments. *Molecules*, 27(12), 3855.
- Ibekwe, C. A., Oyatogun, G. M., Esan, T. A., & Oluwasegun, K. M. (2017). Synthesis and characterization of chitosan/gum arabic nanoparticles for bone regeneration. *Am. J. Mater. Sci. Eng*, 5(1).
- Ingle, R. A. (2011). Histidine biosynthesis. *Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9.
- Isailović, B. D., Kostić, I. T., Zvonar, A., Đorđević, V. B., Gašperlin, M., Nedović, V. A., & Bugarski, B. M. (2013). Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 181–189.
- James, S. J., Pogribna, M., Pogribny, I. P., Melnyk, S., Hine, R. J., Gibson, J. B., Yi, P., Tafoya, D. L., Swenson, D. H., & Wilson, V. L. (1999). Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(4), 495–501.
- Jiao, Z., Wang, X., Yin, Y., Xia, J., & Mei, Y. (2018). Preparation and evaluation of a chitosan-coated antioxidant liposome containing vitamin C and folic acid. *Journal of Microencapsulation*, 35(3), 272–280.
- Jovanović, A. A., Balanč, B. D., Ota, A., Ahlin Grabnar, P., Djordjević, V. B., Šavikin, K. P., Bugarski, B. M., Nedović, V. A., & Poklar Ulrih, N. (2018). Comparative effects of cholesterol and β -sitosterol on the liposome membrane characteristics. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(9), 1800039.
- Kaddah, S., Khreich, N., Kaddah, F., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2018). Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. *Food and Chemical Toxicology*, 113, 40–48.
- Kamei, T., Kohno, T., Ohwada, H., Takeuchi, Y., Hayashi, Y., & Fukuma, S. (1993). Experimental study of the therapeutic effects of folate, vitamin A, and vitamin B12 on squamous metaplasia of the bronchial epithelium. *Cancer*, 71(8), 2477–2483.
- Kanikireddy, V., Varaprasad, K., Jayaramudu, T., Karthikeyan, C., & Sadiku, R. (2020). Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 963–975.

- Kennedy, J. F., Barker, S. A., Bradshaw, I. J., & Jones, P. (1981). The isolation of xanthan gum from fermentations of *Xanthomonas campestris* by complexation with quaternary ammonium salts. *Carbohydrate Polymers*, 1(1), 55–66.
- Khalil, H. P. S., Tye, Y. Y., Saurabh, C. K., Leh, C. P., Lai, T. K., Chong, E. W. N., Fazita, M. R., Hafiidz, J. M., Banerjee, A., & Syakir, M. I. (2017). Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material. *Express Polymer Letters*, 11(4).
- Khurana, R. K., Bansal, A. K., Beg, S., Burrow, A. J., Katare, O. P., Singh, K. K., & Singh, B. (2017). Enhancing biopharmaceutical attributes of phospholipid complex-loaded nanostructured lipidic carriers of mangiferin: systematic development, characterization and evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 518(1–2), 289–306.
- Kim, Y. I., Pogribny, I. P., Basnakian, A. G., Miller, J. W., Selhub, J., James, S. J., & Mason, J. B. (1997). Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65(1), 46–52.
- Kirjavainen, M., Urtti, A., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J., & Mönkkönen, J. (1999). Liposome–skin interactions and their effects on the skin permeation of drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(4), 279–286.
- Kittaneh, M., Qurt, M., Malkieh, N., Naseef, H., & Muqedi, R. (2023). Preparation and Evaluation of Vitamin D₃ Supplementation as Transdermal Film-Forming Solution. *Pharmaceutics*, 15(1), 39.
- Koyyada, A., & Orsu, P. (2021). Natural gum polysaccharides as efficient tissue engineering and drug delivery biopolymers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102431.
- Kulkarni, S. B., Betageri, G. V, & Singh, M. (1995). Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *Journal of Microencapsulation*, 12(3), 229–246.
- Kumar, A., Rao, K. M., & Han, S. S. (2018). Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydrate Polymers*, 180, 128–144.
- Kumar, A., Sharma, S., Srivastava, A., & Kumar, R. (2017). Synthesis of xanthan gum graft copolymer and its application for controlled release of highly water soluble Levofloxacin drug in aqueous medium. *Carbohydrate Polymers*, 171, 211–219.
- Lan, W., He, L., & Liu, Y. (2018). Preparation and properties of sodium carboxymethyl cellulose/sodium alginate/chitosan composite film. *Coatings*, 8(8), 291.
- Lasic, D. D. (1993). *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier Science Limited.
- Le, X. T., & Turgeon, S. L. (2013). Rheological and structural study of electrostatic cross-linked xanthan gum hydrogels induced by β -lactoglobulin. *Soft Matter*, 9(11), 3063–3073.
- Liang, X., Mao, G., & Ng, K. Y. S. (2004). Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 278(1), 53–62.
- Liebelt, E. L., & Shanon, M. W. (1993). Small doses, big problems: a selected review of highly toxic common medications. *Pediatric Emergency Care*, 9(5), 292–297.

- Liu, D., Hu, H., Lin, Z., Chen, D., Zhu, Y., Hou, S., & Shi, X. (2013). Quercetin deformable liposome: preparation and efficacy against ultraviolet B induced skin damages in vitro and in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 127, 8–17.
- Liu, P., Chen, G., & Zhang, J. (2022). A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules*, 27(4), 1372.
- Loew, D., Eberhardt, A., Heseke, H., & Kübler, W. (1987). Zur plasmakinetik und elimination von folsäure. *Klinische Wochenschrift*, 65(11), 520–524.
- Lopez-Pinto, J. M., Gonzalez-Rodriguez, M. L., & Rabasco, A. M. (2005). Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 298(1), 1–12.
- Luan, R., Mu, Z., Yue, F., & He, S. (2017). Efficacy and tolerability of different interventions in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. *Frontiers in Psychiatry*, 8, 229.
- MacGregor, T. R., Matzek, K. M., Keirns, J. J., van Wayjen, R. G. A., van den Ende, A., & van Tol, R. G. L. (1985). Pharmacokinetics of transdermally delivered clonidine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 38(3), 278–284.
- Mandal, B., Rameshbabu, A. P., Dhara, S., & Pal, S. (2017). Nanocomposite hydrogel derived from poly (methacrylic acid)/carboxymethyl cellulose/AuNPs: A potential transdermal drugs carrier. *Polymer*, 120, 9–19.
- Margaritis, A. (1978). Biotechnology review: mixing, mass transfer, and scale-up of polysaccharide fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 977–993.
- Marín-Peñalver, D., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2019). Carboxymethyl cellulose films containing nanoliposomes loaded with an angiotensin-converting enzyme inhibitory collagen hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 94, 553–560.
- Martelli, S. M., Motta, C., Caon, T., Alberton, J., Bellettini, I. C., do Prado, A. C. P., Barreto, P. L. M., & Soldi, V. (2017). Edible carboxymethyl cellulose films containing natural antioxidant and surfactants: α -tocopherol stability, in vitro release and film properties. *LWT*, 77, 21–29.
- Mijin, D., & Petrović, S. (2022). *Osnove hemije prirodnih organskih jedinjenja* (Prvo izdanje). Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
- Milanović Maja. (2016). *Uticao anjonskog i nejonskog tenzida na fizičko-hemijske osobine vodenih rastvora makromolekula* [Doktorska disertacija]. Medicinski fakultet, Novi Sad.
- Milas, M., & Rinaudo, M. (1986). Properties of xanthan gum in aqueous solutions: role of the conformational transition. *Carbohydrate Research*, 158, 191–204.
- Mills, J. L., Kirke, P. N., Molloy, A. M., Burke, H., Conley, M. R., Lee, Y. J., Mayne, P. D., Weir, D. G., & Scott, J. M. (1999). Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *American Journal of Medical Genetics*, 86(1), 71–74.
- Mills, R., Woolf, L. A., & Watts, R. O. (1968). Simplified procedures for diaphragm—cell diffusion studies. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 14(4), 671–673.

- Minghetti, P., Cilurzo, F., & Casiraghi, A. (2004). Measuring adhesive performance in transdermal delivery systems. *American Journal of Drug Delivery*, 2(3), 193–206.
- Moghimi, H. R., Shafizade, A., & Kamlinejad, M. (2011). Drug delivery systems in Iranian traditional pharmacy. *Traditional Medicine and Materia Medica Research Center, SBMU, Tehran, Iran*.
- Montero García, P., Mosquera, M., Marín, D., Alemán, A., Martínez Álvarez, Ó., & Guillén, G. (2019). Changes in structural integrity of sodium caseinate films by the addition of nanoliposomes encapsulating an active shrimp peptide fraction. *Journal of Food Engineering* 244(1–2), 47–54.
- Moorhouse, R., Walkinshaw, M. D., & Arnott, S. (1977). *Xanthan Gum” Molecular Conformation and Interactions*. ACS Publications.
- Moraes, M., Carvalho, J. M. P., Silva, C. R., Cho, S., Sola, M. R., & Pinho, S. C. (2013). Liposomes encapsulating beta-carotene produced by the proliposomes method: characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(2), 274–282.
- Nakhaei, P., Margiana, R., Bokov, D. O., Abdelbasset, W. K., Jadidi Kouhbanani, M. A., Varma, R. S., Marofi, F., Jarahian, M., & Beheshtkhoo, N. (2021). Liposomes: structure, biomedical applications, and stability parameters with emphasis on cholesterol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 748.
- Neacsu, A., Gheorghe, D., Contineanu, I., Sofronia, A. M., Teodorescu, F., & Perişanu, S. (2018). Enthalpies of combustion and formation of histidine stereoisomers. *Journal of Chemistry*, 2018.
- Nikolić B. (1977). *Osnovi fiziologije čoveka* (Treće izdanje). Medicinska knjiga, Beograd - Zagreb.
- Ordiz, I. (2016). In vivo HPLC tissue concentration study of three drugs (caffeine, biotin and procaine) administered by microneedling, electroporation and both techniques combined. *Union of Aesthetic Medicine–UIME*, 105.
- Osiro, D., Franco, R. W. A., & Colnago, L. A. (2011). Spectroscopic characterization of the exopolysaccharide of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Cu²⁺ resistance mechanism. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, 1339–1345.
- Parın, F. N., & Yıldırım, K. (2021). Preparation and characterisation of vitamin-loaded electrospun nanofibres as promising transdermal patches. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*.
- Park, S. H., Shin, H. S., & Park, S. N. (2018). A novel pH-responsive hydrogel based on carboxymethyl cellulose/2-hydroxyethyl acrylate for transdermal delivery of naringenin. *Carbohydrate Polymers*, 200, 341–352.
- Pastore, M. N., Kalia, Y. N., Horstmann, M., & Roberts, M. S. (2015). Transdermal patches: history, development and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 172(9), 2179–2209.
- Patel, D. P., Setty, C. M., Mistry, G. N., Patel, S. L., Patel, T. J., Mistry, P. C., Rana, A. K., Patel, P. K., & Mishra, R. S. (2009). Development and evaluation of ethyl cellulose-based transdermal films of furosemide for improved in vitro skin permeation. *Aaps Pharmscitech*, 10(2), 437–442.

- Pavlović, N. V., Jovanović, J. R., Đorđević, V. B., Balanč, B. D., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. (2020). Priprema i karakterizacija lipozoma sa inkapsuliranim bioaktivnim hidrolizatom proteina soje. *Hemijska Industrija*, 74(5), 327–339.
- Penalva, R., Esparza, I., Agüeros, M., Gonzalez-Navarro, C. J., Gonzalez-Ferrero, C., & Irache, J. M. (2015). Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. *Food Hydrocolloids*, 44, 399–406.
- Pereira, G. G., Detoni, C. B., Balducci, A. G., Rondelli, V., Colombo, P., Guterres, S. S., & Sonvico, F. (2016). Hyaluronate nanoparticles included in polymer films for the prolonged release of vitamin E for the management of skin wounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 203–211.
- Perrett, S., Golding, M., & Williams, W. P. (1991). A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: characterization of the liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43(3), 154–161.
- Pettignano, A., Charlot, A., & Fleury, E. (2019). Carboxyl-functionalized derivatives of carboxymethyl cellulose: Towards advanced biomedical applications. *Polymer Reviews*, 59(3), 510–560.
- Pfister, W. R. (1997). Transdermal and dermal therapeutic systems: current status. *Transdermal and Topical Drug Delivery Systems*, 33–112.
- Phillips, K. M., Ruggio, D. M., & Haytowitz, D. B. (2011). Folate composition of 10 types of mushrooms determined by liquid chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 129(2), 630–636.
- Pilch, E., & Musiał, W. (2018). Liposomes with an ethanol fraction as an application for drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3806.
- Pjanović, R. (2010). *Prenos mase aktivne komponente u heterogenim sistemima sa mikročesticama* [Doktorska disertacija]. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
- Popović Kokar Nikolina. (2022). *Upotreba hidrogelova dobijenih modifikacijom polisaharida fenolnim jedinjenjima za imobilizaciju ćelija i biokatalizatora* [Doktorska disertacija]. Hemijski fakultet, Beograd.
- Pravilović, R. (2016). *Difuzija polifenolnih jedinjenja iz mikročestica dobijenih različitim tehnikama inkapsulacije* [Doktorska disertacija]. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
- Pünnel, L. C., & Lunter, D. J. (2021). Film-forming systems for dermal drug delivery. *Pharmaceutics*, 13(7), 932.
- Quinn, H. L., Kearney, M.-C., Courtenay, A. J., McCrudden, M. T. C., & Donnelly, R. F. (2014). The role of microneedles for drug and vaccine delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(11), 1769–1780.
- Ramöller, I. K., Tekko, I. A., McCarthy, H. O., & Donnelly, R. F. (2019). Rapidly dissolving bilayer microneedle arrays–A minimally invasive transdermal drug delivery system for vitamin B12. *International Journal of Pharmaceutics*, 566, 299–306.
- Rezaie, A., Rezaei, M., & Alboofetileh, M. (2021). *Preparation of biodegradable carboxymethyl cellulose-Arabic gum composite film and evaluation of its physical, mechanical and thermal properties*.

- Ribeiro, J. S., & Veloso, C. M. (2021). Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. *Food Hydrocolloids*, 112, 106374.
- Roberts, M. S. (2007). *Dermal absorption and toxicity assessment*. CRC Press.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., & Maté, J. I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39(8), 840–846.
- Samad, A., Ullah, Z., Alam, M. I., Wais, M., & Shams, M. S. (2009). Transdermal drug delivery system: patent reviews. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 3(2), 143–152.
- Schwarz, J. C., Weixelbaum, A., Pagitsch, E., Löw, M., Resch, G. P., & Valenta, C. (2012). Nanocarriers for dermal drug delivery: influence of preparation method, carrier type and rheological properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 437(1–2), 83–88.
- Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2015). Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chemistry*, 178, 52–62.
- Sharma, A. K., Arya, A., Sahoo, P. K., & Majumdar, D. K. (2016). Overview of biopolymers as carriers of anti-inflammatory agents for treatment of diverse ocular inflammations. *Materials Science and Engineering: C*, 67, 779–791.
- Shrivastava, R., Shrivastava, R., Johansen, B., & Allain, T. (2021). Anti-inflammatory and antiviral osmotic polymeric film to treat Covid-19 early-stage infection. *Journal of Inflammation Research*, 14, 1195.
- Šiler Marinković S. (2009). *Vitamini* (Prvo izdanje). Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
- Silva-Weiss, A., Quilaqueo, M., Venegas, O., Ahumada, M., Silva, W., Osorio, F., & Giménez, B. (2018). Design of dipalmitoyl lecithin liposomes loaded with quercetin and rutin and their release kinetics from carboxymethyl cellulose edible films. *Journal of Food Engineering*, 224, 165–173.
- Singh, H., Thompson, A., Liu, W., & Corredig, M. (2012). Liposomes as food ingredients and nutraceutical delivery systems. *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals*, 287–318.
- Slattery, M. L., Potter, J. D., Samowitz, W., Schaffer, D., & Leppert, M. (1999). Methylene tetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 8(6), 513–518.
- Smistad, G., Bøyum, S., Alund, S. J., Samuelsen, A. B. C., & Hiorth, M. (2012). The potential of pectin as a stabilizer for liposomal drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, 90(3), 1337–1344.
- Spasojević Liljana. (2021). *Priprema nanočestica zeina i njihova primena kao funkcionalnih koloida* [Doktorska disertacija]. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Street, C. A., & Anderson, D. M. W. (1983). Refinement of structures previously proposed for gum arabic and other acacia gum exudates. *Talanta*, 30(11), 887–893.
- Sułkowski, W. W., Pentak, D., Nowak, K., & Sułkowska, A. (2005). The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure*, 744, 737–747.

- Sun, J., Cheng, Y., Zhang, T., & Zang, J. (2022). Microencapsulation of Carvacrol by Complex Coacervation of Walnut Meal Protein Isolate and Gum Arabic: Preparation, Characterization and Bio-Functional Activity. *Foods*, 11(21), 3382.
- Suntres, Z. E., & Shek, P. N. (1994). Incorporation of α -tocopherol in liposomes promotes the retention of liposome-encapsulated glutathione in the rat lung. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(1), 23–28.
- Swarbrick, J. (2007). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (3rd ed.). Taylor & Francis.
- Taghizadeh, S. M., & Joorabloo, A. (2015). Influence of chemical enhancer and loading dose on caffeine and Vitamin B5 skin permeation and adhesion properties of transdermal patches. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1507–1515.
- Takmaz, E. A., & Yener, G. (2021). Effective factors on iontophoretic transdermal delivery of memantine and donepezil as model drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102438.
- Taylor, K. M. G., & Morris, R. M. (1995). Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. *Thermochimica Acta*, 248, 289–301.
- Templeton, N. S., & Lasic, D. D. (1999). New directions in liposome gene delivery. *Molecular Biotechnology*, 11(2), 175–180.
- Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(2), 145–160.
- Torres-Martínez, E. J., Cornejo Bravo, J. M., Serrano Medina, A., Pérez González, G. L., & Villarreal Gómez, L. J. (2018). A summary of electrospun nanofibers as drug delivery system: Drugs loaded and biopolymers used as matrices. *Current Drug Delivery*, 15(10), 1360–1374.
- Trifković, K. (2016). *Hidrogelovi na bazi hitozana za kontrolisano otpuštanje polifenola* [Doktorska disertacija]. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
- Tufan, M., Tosun, C., & Ferdi Gercel, H. (2017). Preparation and characterization of carboxymethyl cellulose film from sunflower stalk. In *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology* (Vol. 5, Issue 2). <http://iraj.in>
- Ullah, W., Nawaz, A., Akhlaq, M., Shah, K. U., Latif, M. S., & Alfatama, M. (2021). Transdermal delivery of gatifloxacin carboxymethyl cellulose-based patches: Preparation and characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66, 102783.
- Van Buskirk, G. A., Arsulowicz, D., Basu, P., Block, L., Cai, B., Cleary, G. W., Ghosh, T., González, M. A., Kanios, D., & Marques, M. (2012). Passive transdermal systems whitepaper incorporating current chemistry, manufacturing and controls (CMC) development principles. *AAPS PharmSciTech*, 13(1), 218–230.
- Vishvakrama, P., & Sharma, S. (2014). Liposomes: an overview. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 47–55.

- Vladisavljević, G. T., Laouini, A., Charcosset, C., Fessi, H., Bandulasena, H. C. H., & Holdich, R. G. (2014). Production of liposomes using microengineered membrane and co-flow microfluidic device. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 458, 168–177.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. John Wiley & Sons.
- Vora, A., Riga, A., Dollimore, D., & Alexander, K. S. (2002). Thermal stability of folic acid. *Thermochimica Acta*, 392, 209–220.
- Voss, G. T., Gularte, M. S., Vogt, A. G., Giongo, J. L., Vaucher, R. A., Echenique, J. V. Z., Soares, M. P., Luchese, C., Wilhelm, E. A., & Fajardo, A. R. (2018). Polysaccharide-based film loaded with vitamin C and propolis: A promising device to accelerate diabetic wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*, 552(1–2), 340–351.
- Wald, N. J. (2011). Commentary: a brief history of folic acid in the prevention of neural tube defects. *International Journal of Epidemiology*, 40(5), 1154–1156.
- Walde, P., & Ichikawa, S. (2001). Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomolecular Engineering*, 18(4), 143–177.
- Walicka, A., & Iwanowska-Chomiak, B. (2018). Drug diffusion transport through human skin. *International Journal of Applied Mechanics and Engineering*, 23(4).
- Wang, N., Zhen, Y., Jin, Y., Wang, X., Li, N., Jiang, S., & Wang, T. (2017). Combining different types of liposomes loaded with ammonium bicarbonate to fabricate microneedle arrays as a vaginal mucosal vaccine adjuvant-dual delivery system. *Journal of Controlled Release*, 246, 12–29.
- Wang, Y., Tu, S., Li, R., Yang, X., Liu, L., & Zhang, Q. (2010). Cholesterol succinyl chitosan anchored liposomes: preparation, characterization, physical stability, and drug release behavior. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(3), 471–477.
- Wermeling, D. P., Banks, S. L., Hudson, D. A., Gill, H. S., Gupta, J., Prausnitz, M. R., & Stinchcomb, A. L. (2008). Microneedles permit transdermal delivery of a skin-impermeant medication to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), 2058–2063.
- Wu, Z., Li, X., Hou, C., & Qian, Y. (2010). Solubility of Folic Acid in Water at pH Values between 0 and 7 at different temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55(9), 3958–3961.
- Wurster, D. E., & Kramer, S. F. (1961). Investigation of some factors influencing percutaneous absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(4), 288–293.
- Yamagishi, N., Namioka, T., Okura, N., Sato, S., Kim, D., Furuhashi, K., & Naito, Y. (2009). Application of a reservoir-type calcitriol transdermal patch in dairy cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(6), 845–848.
- Yáñez-S, M., Matsuhira, B., Maldonado, S., González, R., Luengo, J., Uyarte, O., Serafine, D., Moya, S., Romero, J., & Torres, R. (2018). Carboxymethylcellulose from bleached organosolv fibers of *Eucalyptus nitens*: synthesis and physicochemical characterization. *Cellulose*, 25, 2901–2914.
- Younis, I. R. (2003). *Pharmaceutical quality performance of folic acid supplements*. West Virginia University.

СПИСАК СЛИКА

Слика 1.1. Структурна формула фолне киселине

Слика 1.2. Структурна формула фолинске киселине

Слика 1.3. Структурна формула хистидина

Слика 1.4. Структурна формула хистидина у физиолошким условима

Слика 1.5. Таутомерни облици хистидина

Слика 1.6. Приказ резонантних структура хистидина

Слика 1.7. Наелектрисање хистидина при различитим вредностима рН средине

Слика 1.8. Приказ потенцијалних интеракција између фолне киселине и хистидина при благо алкалним условима средине

Слика 1.9. Прикази основне структуре липозома и структуре молекула фосфолипида

Слика 1.10. Структурне формуле молекула холестерола, сорбитана и SPAN-а 20

Слика 1.11. Хемијска структура натријум-карбоксиметил-целулозе

Слика 1.12. Приказ хемијске реакције синтезе натријум-карбоксиметил целулозе

Слика 1.13. Графичка илустрација филма на бази солагама

Слика 1.14. Хемијска структура ксантан гуме

Слика 1.15. Хемијска структура арапске гуме (гуме арабике)

Слика 1.16. Поређење профила концентрације лека у системској циркулацији остварених употребом традиционалних форми лекова

Слика 1.17. Различити системи за контролисано отпуштање активних супстанци

Слика 1.18. Елемент контролисане запремине

Слика 1.19. Графички приказ једнодимензионалне дифузије кроз филм

Слика 1.20. Графички приказ једнодимензионалне дифузије кроз мембрану

Слика 1.21. Графички приказ једнодимензионалне дифузије кроз ћелију са дијафрагмом - препреком

Слика 1.22. Францова статичка дифузиона ћелија

Слика 1.23. Еволутивни развој трансдермалних фластера

Слика 2.1. Шематски приказ пролипозомне методе за припрему мултиламеларних липозома

Слика 2.2. Шематски приказ процедуре припреме система липозом-биополимерни филм

Слика 3.1. Графички приказ резултата стабилности липозома при складиштењу у времену од 30. дана

Слика 3.2. Инфрацрвени спектар физичке смеше компонената липозомног система и формулација липозома са инкапсулираном фолном киселином

Слика 3.3. AFM-микрографије узорка контролних липозома добијене микроскопијом атомских сила

Слика 3.4. AFM-микрографије липозома са инкапсулираном фолном киселином

Слика 3.5. AFM-микрографије липозома са инкапсулираном фолном киселином и модификаторима фосфолипидне мембране добијене микроскопијом атомских сила

Слика 3.6. Термограм добијен техником диференцијалне скенирајуће калориметрије за узорке липозома

Слика 3.7. Кинетика контролисаног отпуштања фолне киселине из суспензија липозома

Слика 3.8. Дифузија фолне киселине из липозома апроксимирана другим Фиковим законом

Слика 3.9. Фотографије различитих узорка биополимерних филмова

Слика 3.10. Тестирање биополимерних филмова коришћењем универзалне тест машине за испитивање механичких својстава

Слика 3.11. Испитивања механичких својстава филма карбоксиметил целулозе и филма карбоксиметил целулозе са липозомима

Слика 3.12. Инфрацрвени спектри различитих формулација липозома

Слика 3.13. Инфрацрвени спектар чистих компонената које улазе у састав комплексног система липозом-биополимерни филм

Слика 3.14. Термограм добије техником диференцијалне скенирајуће калориметрије за узорке система липозом-биополимерни филм

Слика 3.15. Електронске микрографије попречних пресека липозома инкорпорираних у структуру биополимерног филма

Слика 3.16. Микрографије система липозом-биополимерни филм добијеним техником микроскопије атомских сила

Слика 3.17. Кинетика контролисаног отпуштања фолне киселине из различитих формулација система липозом-биополимерног филма

СПИСАК ТАБЕЛА

Табела 1.1. Приказ савремених трансдермалних система са витаминима

Табела 3.1. Степен инкапсулације фолне киселине у липозоме

Табела 3.2. Ефективни коефицијенти дифузије фолне киселине и отпори дифузији липозома са инкапсулираном фолном киселином

Табела 3.3. Површински напон и густина различитих типова биополимерних филмова

Табела 3.4. Дебљина, садржај активне супстанце и механичка својства различитих типова биополимерних филмова

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

- СМС – карбоксиметил целулоза
- СМС-LIP – филм карбоксиметил целулозе са инкорпорираним липозомима
- СМС-LIP-FA_x – филм карбоксиметил целулозе са инкорпорираним липозомима који садрже фолну киселину (x – концентрације фолне киселине)
- D* – молекулски коефицијент дифузије
- Da – далтон
- D*_{eff} – ефективни коефицијент дифузије
- DK* – пропустљивост мембране
- DK/δ* – коефицијент пермеабилности
- DL – капацитет пуњења
- DSC – диференцијална скенирајућа калориметрија
- EE* – степен инкапсулације
- ∂C* – градијент концентрације
- FDA – Америчка асоцијација за храну и лекове
- HIS – хистидин
- HIS-FA_(aq) – водени раствор хистидина са фолном киселином
- HPLC – течна хроматографија високих перформанси
- LD₅₀ – летална доза (mg/kg) за 50% испитаника (огледних животиња)
- LIP – липозом
- LIP-CHOL-HIS-FA – формулација липозом-хистидин-фолна киселина која садржи холестерол
- LIP-HIS-FA – формулација липозом-хистидин-фолна киселина
- LIP-SPAN20-HIS-FA – формулација липозом-хистидин-фолна киселина која садржи SPAN20
- m*_∞ – удео отпуштеног лека у тренутку постизања равнотежне концентрације
- m*_t – удео отпуштеног лека у времену '*t*'
- N* – сила лома
- N*_A – флуks у непокретним координатама
- Na-СМС – натријум-карбоксиметил целулоза
- pH – вредност-показатељ водоникових (H₃O⁺) јона

- pK_a – логаритам константе дисоцијације киселине
- pI – изоелектрична тачка
- r – брзина настајања елемента у јединици запремине
- R_{CAM} – дифузиони отпор целулозно-ацетатне мембране
- R_{LIP} – дифузиони отпор липозома
- SEM – скенирајућа електронска микроскопија
- SG – солагам (смеша ксантан гуме и Арапске гуме)
- SPAN – ознака за деривате сорбитана
- U – средња моларна брзина
- UPLC – течна хроматографија (ултра)високих перформанси
- UV – ултраљубичасто зрачење
- V_D – запремина дозорског одељка Францове дифузионе ћелије
- V_R – запремина рецепторског одељка Францове дифузионе ћелије
- x – елемент контролисане запремине у правцу x
- y – елемент контролисане запремине у правцу y
- z – елемент контролисане запремине у правцу z
- β – геометријска константа
- Δ – брзине акумулације
- δ – дебљина слоја у коме се одвија пренос масе активне супстанце
- δ_0 – укупна вредност дебљине слоја
- AFM – микроскопија атомских сила
- J_A – моларни флуks
- CH_2COOH – карбоксиметил група
- C_A – моларна концентрација
- $C_{A,D}$ – концентрација компоненте А у дозорском одељку Францове дифузионе ћелије
- $C_{A,R}$ – концентрација компоненте А у рецепторском одељку Францове дифузионе ћелије
- C_{Ami} – концентрације компонената у мембрани
- СБ – степен бубрења
- СМ – садржај суве материје
- СМС-FA $_x$ – филм карбоксиметил целулозе са инкорпорираном фолном киселином
- СМС-SG – филм карбоксиметил целулозе и солагама

ПРИЛОГ 1.

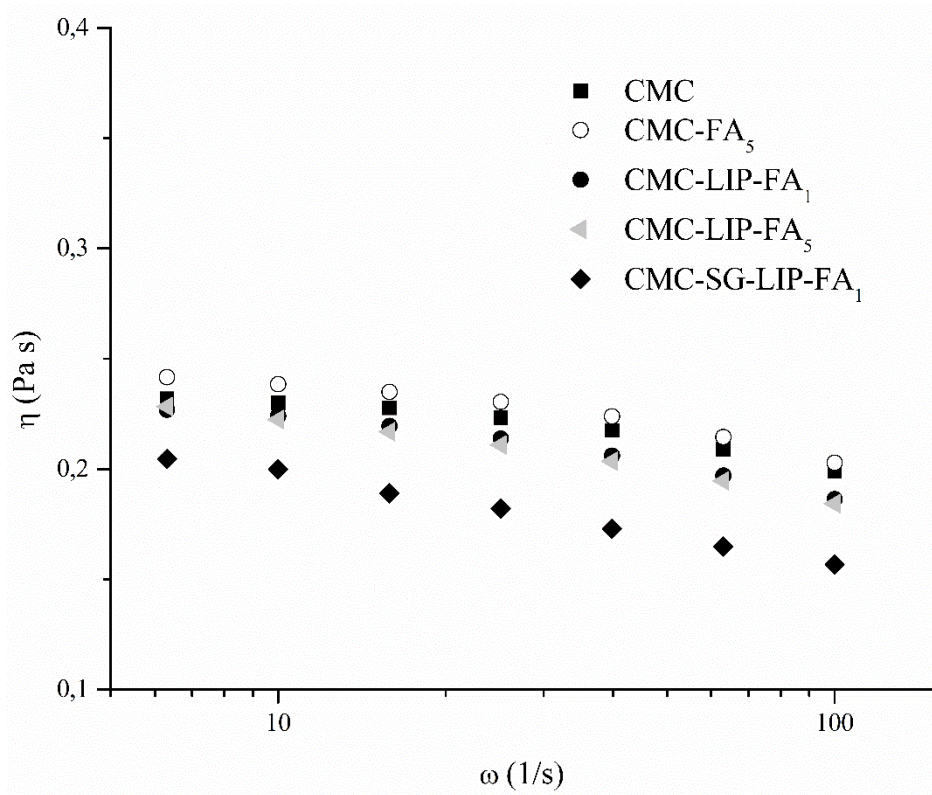


График П1. Вискозност система липозом-биополимерног раствора коришћених за припрему биополимерних филмова

ПРИЛОГ 2.

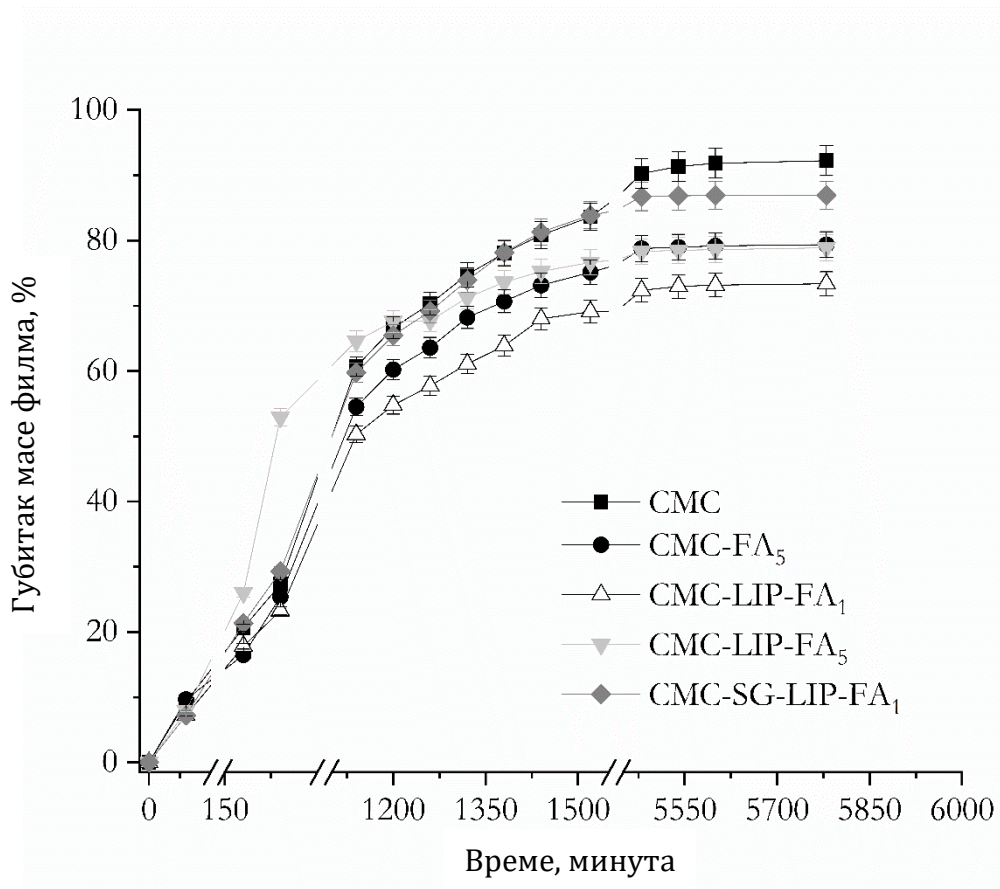


График П2. Профили сушења биополимерних филмова зависно од формулације

ПРИЛОГ 3.

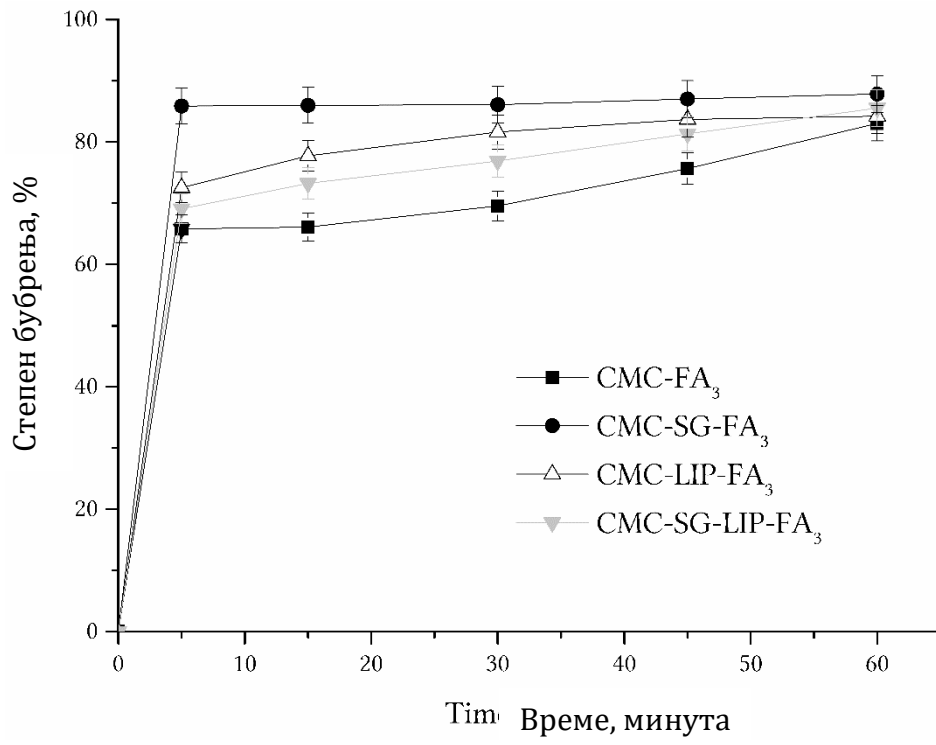


График П3. Профили бубрења биополимерних филмова зависно од формулације

ПРИЛОГ 4.

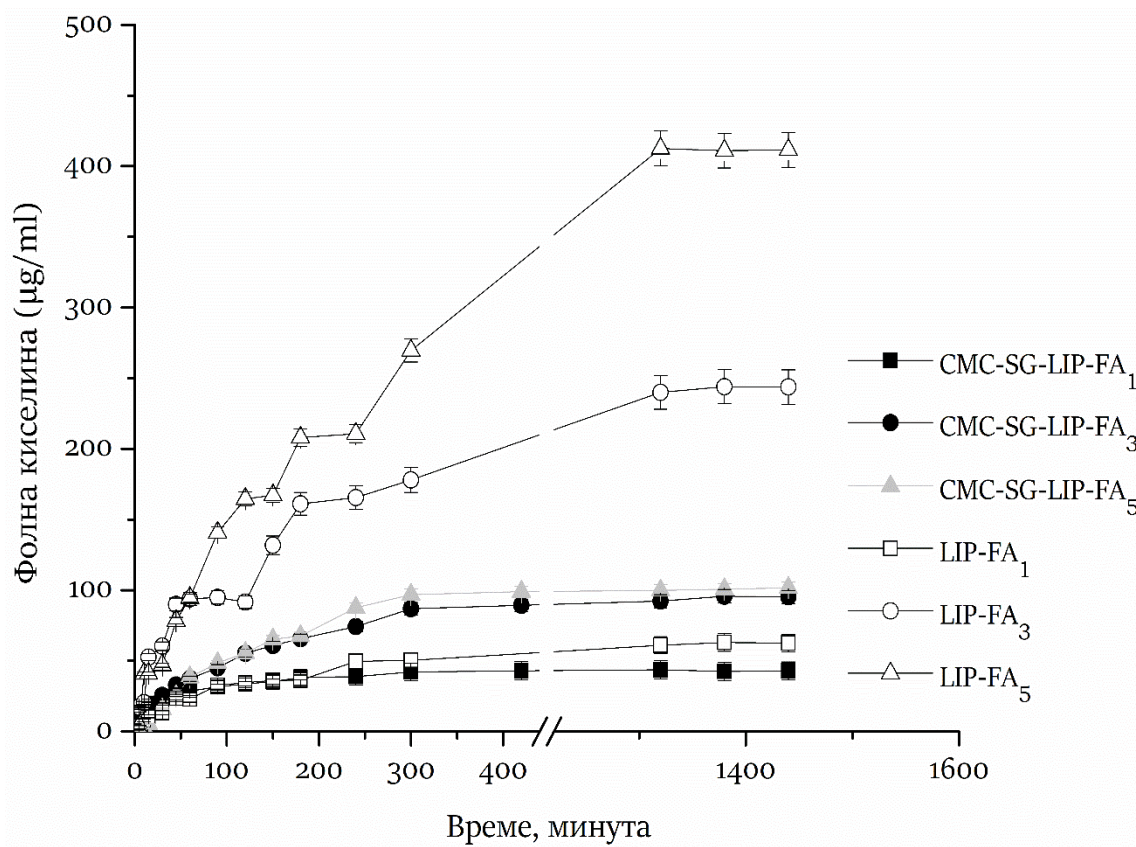
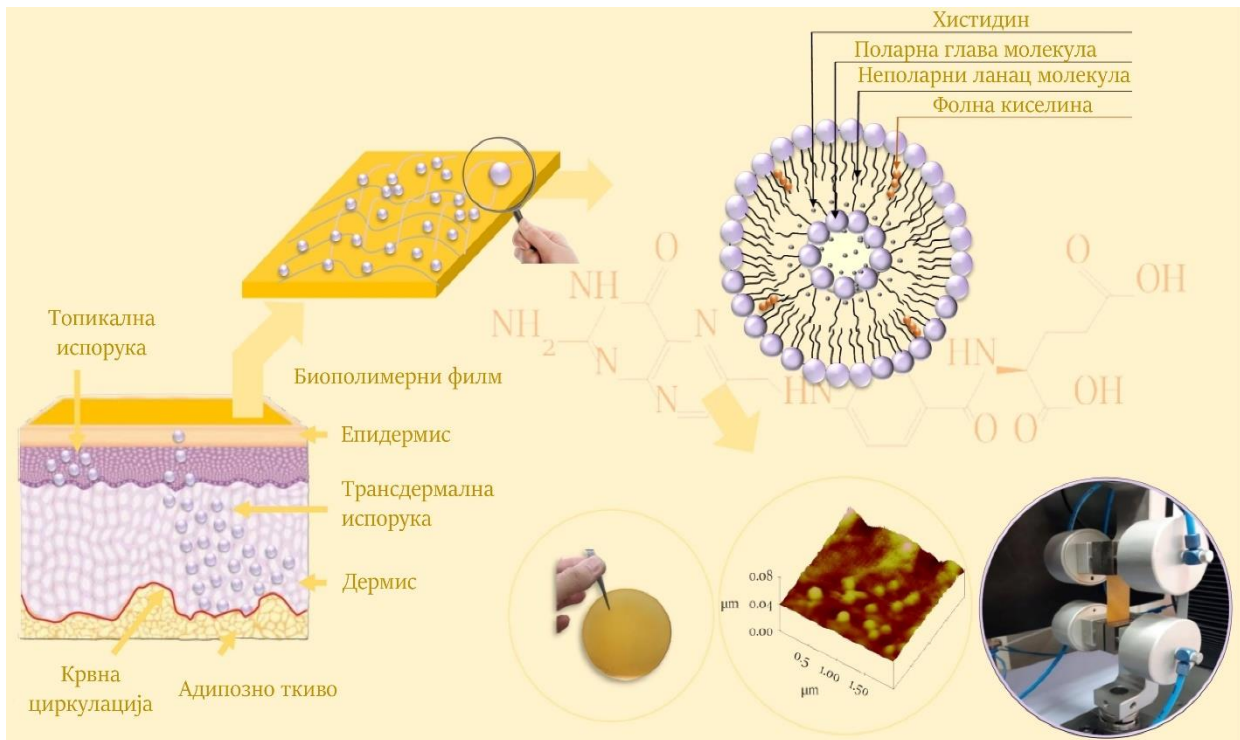


График П4. Кинетика отпуштања фолне киселине из различитих формулација липозома (контролни узорак) и из система липозом-биополимерн филм (поређења криви отпуштања)

ПРИЛОГ 5.



Слика С1. Поједностављени графички приказ дела експерименталног истраживања докторске дисертације

БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ

Петар М. Батинић, мастер инжењер технологије, рођен је 8. новембра 1992. године у Смедеревској Паланци. Основну школу „Радомир Лазић“ завршио је у Азањи, док је средње образовање стекао у Смедеревској Паланци, матуриравши у „Паланачкој гимназији“, у јуну 2011. године.

Високо образовање (основне академске студије) стекао је на Универзитету у Београду, на Одсеку за прехранбену технологију Пољопривредног факултета у Београду, у септембру 2015. године, одбранивши завршни рад под руководством проф. др Предрага Пуђе. Дипломске академске (мастер) студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду успешно је окончао у септембру 2016. године, на Одсеку за биохемијско инжењерство и биотехнологију, одбранивши завршни мастер рад под руководством проф. др Славице Шилер Маринковић.

Докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијско изборно подручје - хемијско инжењерство уписао је у октобру 2016. године под руководством проф. др Бранка Бугарског и проф. др Душана Мијина. Положио је све испите предвиђене планом и програмом студија.

У периоду од јула 2018. до марта 2021. године запосленик је Иновационог центра Технолошко-металуршког факултета у Београду, а од априла 2021. године радни однос заснива у Институту за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ у Београду.

У току академске 2020/21 и 2021/22. године, у својству хонорарног сарадника учествовао је у реализацији експерименталне наставе из предмета Биохемија и Биохемија хране, при Катедри за хемију и биохемију Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

Као резултат рада на докторској дисертацији, кандидат је објавио два научна рада у истакнутим међународним часописима (М22) и једно саопштење са међународног скупа штампано у целини (М33).

ЛИСТА ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

Научни радови произашли као резултат истраживања кандидата у вези са докторском дисертацијом:

- М 22 (Истакнути међународни часопис – часопис који је према IF2 рангиран у JCR у својој области наука између 30% и 60% часописа)

1. **Petar M. Batinić**, Verica B. Đorđević, Sanja I. Stevanović, Bojana D. Balanč, Smilja B. Marković, Nevena D. Luković, Dušan Ž. Mijin, Branko M. Bugarski (2020). Formulation and characterization of novel liposomes containing histidine for encapsulation of poorly soluble vitamin, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, volume 59, 101920.

2. **Petar M. Batinić**, Verica B. Đorđević, Nataša S. Obradović, Aleksandar D. Krstić, Sanja I. Stevanović, Bojana D. Balanč, Smilja B. Marković, Rada V. Pjanović, Dušan Ž. Mijin, Branko M. Bugarski (2023). Polymer-lipid matrice based on carboxymethyl cellulose/solagum and liposomes for controlled release of folic acid, *European Journal of Lipid Science and Technology*, volume 125, 2200169.

- М 33 (Саопштење са међународног скупа штампано у целини)

3. **Petar Batinić**, Verica Đorđević, Bojana Balanč, Stefan Bošković, Branko Bugarski. Encapsulation of vitamin E and folic acid into liposomes – carrier stability and controlled release. Proceedings, VII International Congress of Engineering, Environment and Materials in Process Industry, EEM 2021, Poljice - Jahorina, March 17th-19th, 2021, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina.

Изјава о ауторству

Потписани **Петар Батинић**
Број индекса **4004/2016**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Контролисано отпуштање фолне киселине из система липозом-биополимерни филм“

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

Потпис докторанда

у Београду, 12.7.2023



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Петар Батинић

Број индекса: 4004/2016

Студијски програм: хемијско инжењерство

Наслов рада: „Контролисано отпуштање фолне киселине из система липозом-биополимерни филм“

Ментор: др Бранко Бугарски, редовни професор

Ментор: др Душан Мијин, редовни професор

Потписани/а: Петар Батинић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

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

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

у Београду, 12. 7. 2023

Потпис докторанда



Изјава о коришћењу

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

Контролисано отпуштање фолне киселине из система липозом-биополимерни филм“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 12. 7. 2023

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

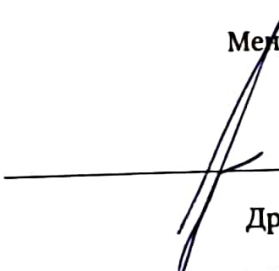
Оцена извештаја о провери оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Контролисано отпуштање фолне киселине из система липозом-биополимерни филм“ аутора Петра М. Батинића, мастер инжењера технологије, констатујемо да утврђено подударарење текста износи 5%. Овај степен подударности претежно је последица употребљених личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, назива коришћених аналитичких метода и реагенаса, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 30.06.2023. године

Ментори


Др Бранко Бугарски,
редовни професор Технолошко-металуршког факултета
Универзитета у Београду


Др Душан Мијин,
редовни професор Технолошко-металуршког факултета
Универзитета у Београду