

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU  
UNIVERZITETA U BEOGRADU – FARMACEUTSKOG FAKULTETA**

**KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 13. maja 2021. godine, imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata Zore Četković, diplomiranog farmaceuta, pod naslovom:

**RAZVOJ I *IN VITRO/IN SILICO* KARAKTERIZACIJA LIPIDNIH FORMULACIJA  
SA SIMVASTATINOM KAO MODEL SUPSTANCOM**

Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Dragana Vasiljević - mentor, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
2. Dr sc. Sandra Cvijić - mentor, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Svetlana Ibrić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
4. Dr sc. Vesna Radojević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Tehnološko-metalurški fakultet

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta sledeći:

**IZVEŠTAJ**

**A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija pod nazivom: „Razvoj i *in vitro/in silico* karakterizacija lipidnih formulacija sa simvastatinom kao model supstancom”, sadrži šest poglavlja: (i) Uvod, (ii) Cilj istraživanja, (iii) Eksperimentalni deo, (iv) Rezultati i diskusija, (v) Zaključak i (vi) Literatura. Na početku disertacije priloženi su sažetak na srpskom i engleskom jeziku, lista skraćenica i sadržaj. Na kraju disertacije, u delu Prilozi, navedeni su spisak radova i saopštenja koji čine deo doktorske disertacije, kao i kratka biografija kandidata. Dodatno,

priložene su potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije i korišćenju doktorske disertacije.

Disertacija je napisana jasnim i preglednim stilom, na 128 strana, i obuhvata 54 grafička prikaza (8 u Uvodu, 2 u Eksperimentalnom delu i 44 u Rezultatima i diskusiji), 30 tabela (3 u Uvodu, 7 u Eksperimentalnom delu i 20 u Rezultatima i diskusiji), kao i 331 literaturni navod.

U okviru **Uvoda** je dat pregled aktuelnih naučnih saznanja u oblasti koja je proučavana u ovoj doktorskoj disertaciji i izložena opravdanost sprovedih istraživanja. Uvod se sastoji iz četiri potpoglavlja: *Lipidne formulacije*; *Čvrste lipidne formulacije*; *In silico modeli za procenu apsorpcije i biološke raspoloživosti lekovite supstance*; *Simvastatin*.

U prvom potpoglavlju je data definicija i klasifikacija lipidnih formulacija, koje predstavljaju jedan od savremenih pristupa za razvoj farmaceutskih oblika lekova sa nisko rastvorljivim lekovitim supstancama, u cilju povećanja njihove rastvorljivosti, brzine rastvaranja i, samim tim, biološke raspoloživosti. Dat je i prikaz lekova sa dozvolom (registrovanih lekova) na svetskom i domaćem tržištu, što ukazuje na aktuelnost lipidnih formulacija u savremenoj farmakoterapiji. Posebna pažnja je posvećena lipidnim formulacijama tipa samomikroemulgujućih sistema (engl. *Self-microemulsifying drug delivery systems*; skr. SMEDDS), koji se poslednjih godina intenzivno proučavaju zbog brojnih prednosti u odnosu na druge lipidne formulacije. SMEDDS predstavljaju najčešće tečne, izotropne smeše ulja, surfaktanta i hidrofилnih korastvarača/kosurfaktanata, a u kontaktu sa vodom/gastrointestinalnim (GI) tečnostima spontano i brzo se formiraju optički izotropne, transparentne, termodinamički stabilne mikroemulzije. S obzirom na malu veličinu kapi, ukupna površina međupovršinskog filma je velika, te je kapacitet za solubilizaciju nisko rastvorljivih lekovitih supstanci visok, a samim tim i potencijal za poboljšanje njene apsorpcije i biološke raspoloživosti. Takođe, apsorpcija lekovite supstance iz SMEDDS ne zavisi od digestije lipida pod uticajem pankreasnih enzima. Aktuelna istraživanja ukazuju na činjenicu da se SMEDDS mogu koristiti za različite puteve primene, ali najviše za peroralnu primenu. U ovom potpoglavlju je ukazano značaj pravilnog izbora pomoćnih supstanci/ekscipijenasa za formulaciju SMEDDS za peroralnu primenu, ne samo iz potrebe da omogućе efikasno samoemulgovanje, već i iz razloga bezbednosti njihove primene. Takođe je dat prikaz savremenih metoda za karakterizaciju SMEDDS, kao i kritički osvrt na njihove prednosti i nedostatke.

U drugom potpoglavlju dat je prikaz rezultata aktuelnih istraživanja u oblasti čvrstih lipidnih formulacija, sa posebnim akcentom na čvrste SMEDDS. Naime, zbog određenih nedostataka tečnih SMEDDS (ograničena stabilnost, mogućnost ireverzibilne precipitacije lekovite supstance, otežan i zahtevan transport i skladištenje) danas se intenzivno radi na iznalaženju mogućnosti za prevođenje tečnih u čvrste SMEDDS. Prikazani su postupci za dobijanje čvrstih SMEDDS (punjenje u kapsule, adsorpcija na čvrste nosače, sušenje raspršivanjem, sušenje smrzanjem, ekstruzija-sferonizacija, granulacija topljenjem), a posebno su razmotrene mogućnosti za dobijanje čvrstih lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance. Modifikacijom oslobađanja se mogu postići manje fluktuacije koncentracije lekovite supstance u plazmi, produžen terapijski efekat i/ili ciljna isporuka lekovite supstance, uz manje neželjenih efekata i bolju komplijansu. Jedan od pristupa za postizanje ciljne isporuke lekovite supstance u određeni deo GI trakta zasniva se na razlikama u pH vrednostima u različitim delovima GI trakta, a najčešće se postiže oblaganje jezgra tableta ili višestaničnih sistema (peleta, granula, mikrokapsula)

gastrorezistentnom oblogom. Gastrorezistentni omotač je najčešće izrađen od polimera, od kojih se najviše koriste kopolimeri metakrilne kiseline i metil metakrilata, u različitim odnosima (Eudragit® polimeri, Evonik, Nemačka).

U trećem potpoglavlju je opisan značaj savremenih trendova u razvoju formulacija farmaceutskih preparata, koji obuhvataju, pored primene *in vitro* i *in vivo* metoda, i primenu *in silico* (računarski podržanog) modelovanja i simulacija, kao korisnog načina za procenu apsorpcije i biološke raspoloživosti lekovite supstance. U ovom delu su opisane osnovne postavke modela za predviđanje apsorpcije i dispozicije peroralno primenjenih lekovitih supstanci, kao i njihovih metabolita. *In silico* metode se danas koriste u različitim fazama razvoja lekova, počevši od predviđanja biofarmaceutskih svojstava i toksičnog potencijala lekovite supstance, preko odabira optimalne formulacije, do predviđanja ishoda studija biološke raspoloživosti i biološke ekvivalentnosti lekova. *In silico* modelovanje omogućava da se u kraćem vremenu, uz manje troškove i bez izvođenja nepotrebnih kliničkih studija dođe do optimalnih rešenja u toku razvoja farmaceutskih preparata. Uprkos sve većoj upotrebi *in silico* modelovanja za predviđanje apsorpcije i raspodele lekovitih supstanci, postoji mnogo izazova koji ograničavaju njihovu primenu, što pruža mogućnost za dalja istraživanja u ovoj oblasti.

U četvrtom potpoglavlju je dat prikaz mehanizma delovanja, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih osobina simvastatina, lekovite supstance iz grupe statina, koja se koristi za snižavanje koncentracije holesterola u krvi, poseduje i vaskuloprotektivna svojstva, a najnovija istraživanja pokazuju da ispoljava određenu efikasnost i u lečenju tumora dojke, kolona i prostate. Takođe je dat i prikaz aktuelnih istraživanja vezanih za razvoj savremenih farmaceutskih oblika lekova sa ovom lekovitom supstancom. Simvastatin karakteriše niska rastvorljivost i visoka permeabilnost (BSK klasa II). Zbog niske biološke raspoloživosti simvastatina nakon peroralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem, jedinog farmaceutskog oblika sa simvastatinom na tržištu, postoji sve veća potreba za razvojem savremenih nosača koji bi obezbedili veću biološku raspoloživost ove lekovite supstance.

U okviru **Cilja istraživanja** konkretno i jasno su definisani ciljevi rada. Sveobuhvatni cilj ove doktorske disertacije je bio razvoj novih lipidnih formulacija sa aspekta potencijalne primene kao nosača nove generacije za peroralnu primenu simvastatina i njihova fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija. Pojedinačni ciljevi istraživanja su obuhvatili: (A) Formulaciju i karakterizaciju tečnih SMEDDS sa simvastatinom, u cilju poboljšanja njegove rastvorljivosti, odnosno izbor ekscipijenasa (ulja, surfaktanata i kosurfaktanta) i određivanje njihovih optimalnih udela u formulaciji SMEDDS; (B) Razvoj i primenu *in silico* modela za procenu apsorpcije i biološke raspoloživosti simvastatina nakon peroralne primene različitih preparata, na osnovu biofarmaceutskih osobina navedene lekovite supstance, da bi se na osnovu mehanističke analize rezultata simulacija identifikovalo optimalno mesto za apsorpciju simvastatina, kako bi se dizajnirale odgovarajuće formulacije sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance i, posledično, poboljšanom biološkom raspoloživošću; (C) Formulaciju i karakterizaciju lipidnih sistema sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina, koji su definisani na osnovu rezultata *in silico* predviđanja. U skladu sa navedenim, u prvom delu ovih istraživanja tečni SMEDDS su punjeni u acidorezistentne kapsule. U drugom delu istraživanja formulisani su sistemi sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina, dobijeni od odabranih tečnih SMEDDS i odgovarajućih čvrstih polimernih nosača, koji mogu da omoguće modifikovano oslobađanje lekovite supstance u GI traktu. Na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja simvastatina iz navedenih formulacija, primenom simvastatin-specifičnog *in silico* modela razvijenog u drugoj fazi eksperimentalnog rada, izvršeno je predviđanje očekivanog stepena i brzine apsorpcije simvastatina nakon

peroralne primene dobijenih formulacija i razmatranje eventualnog povećanja biološke raspoloživosti.

U poglavlju **Eksperimentalni deo** navedene su karakteristike korišćenih materijala i dat je detaljan opis eksperimentalnih postupaka, opreme i uređaja koji su korišćeni za realizaciju postavljenih ciljeva istraživanja. Eksperimentalni rad je sproveden kroz tri faze, u skladu sa pojedinačnim ciljevima istraživanja.

U prvoj fazi eksperimentalnog rada izvršena je formulacija i karakterizacija tečnih SMEDDS, kao potencijalnih nosača za peroralnu primenu simvastatina, koji treba da omoguće povećanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja ove lekovite supstance. Na osnovu literaturnih podataka razmotren je veći broj ulja, surfaktanata i kosurfaktanata, a zatim je sprovedeno eksperimentalno određivanje rastvorljivosti simvastatina u odabranim ekscipijensima, kako bi se izvršio izbor potencijalno najpogodnijih za formulaciju SMEDDS, sa visokim kapacitetom za solubilizaciju lekovite supstance. Konstrukcija pseudoternarnih faznih dijagrama i određivanje mikroemulziona oblasti izvršeno je primenom metode titracije vodom. Na ovaj način je određeno koja, od ukupno 54 različite kombinacije ulja (oleoil makrogol 6 gliceridi, propilenglikol monokaprilat, propilenglikol monolaurat), surfaktanta (kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi) i kosurfaktanta (polisorbat 80 ili makrogol 15 hidroksistearat), omogućava izradu tečnih SMEDDS. U cilju fizičko-hemijske karakterizacije tečnih SMEDDS sprovedene su sledeće analize: procena samoemulgovanja (korišćenjem standardne aparature za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance sa rotirajućom lopaticom), određivanje robustnosti prema razblaživanju (vizuelno i UV spektrofotometrijski), određivanje veličine i raspodele veličine kapi (indeks polidisperziteta, skr. PDI) fotonskom korelacionom spektroskopijom. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS, punjenih u tvrde želatinske kapsule, izvedeno je u aparaturi sa rotirajućom korpicom. Procena stabilnosti tečnih SMEDDS sprovedena je vizuelnim posmatranjem, određivanjem prosečne veličine kapi i PDI, kao i UV spektrofotometrijskim određivanjem sadržaja lekovite supstance, tokom šestomesečnog skladištenja uzoraka na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 2$  °C).

U drugoj fazi eksperimentalnog rada, primenom kompjuterskog programa GastroPlus™, razvijen je simvastatin-specifičan fiziološki zasnovan farmakokinetički (PBPK) model, koji opisuje apsorpciju, konverziju u simvastatin-kiselinu, raspodelu i eliminaciju simvastatina. Set ulaznih parametara za *in silico* modelovanje izabran je na osnovu analize literaturnih podataka, eksperimentalnih podataka i *in silico* predviđenih vrednosti parametara koji opisuju biofarmaceutska svojstva simvastatina i fiziološke karakteristike organizma. Izgrađeni PBPK model je validiran poređenjem predviđenih sa *in vivo* vrednostima farmakokinetičkih parametara za simvastatin i simvastatin-kiselinu nakon peroralne primene 20 mg simvastatina u obliku tableta sa trenutnim oslobađanjem. Analizom rezultata simulacija utvrđeno je koji su delovi GI trakta optimalno mesto za apsorpciju simvastatina, da bi se u narednoj fazi eksperimentalnog rada pristupilo formulaciji farmaceutskih preparata za predviđenu (ciljnu) isporuku lekovite supstance, radi povećanja njene biološke raspoloživosti.

U trećoj fazi eksperimentalnog rada formulisane su lipidne formulacije od kojih se očekuje modifikovano (ciljno) oslobađanje simvastatina, u određeni deo GI trakta, koji predstavlja optimalno mesto za apsorpciju lekovite supstance. U cilju realizacije ove faze eksperimentalnog rada izabrana su dva prisupa: punjenje odabranih tečnih SMEDDS u acidorezistentne kapsule, kao i mešanje odabranih tečnih SMEDDS sa kopolimerima metakrilne kiseline, koji pokazuju pH zavisnu rastvorljivost. Korišćeni su polimeri Eudragit® L100, Eudragit® S100, kao i njihova kombinacija, u odnosu 1:1, a odnos SMEDDS:polimer je

bio 2:1. Biofarmaceutska karakterizacija lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina obuhvatila je *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem, pod uslovima izmene medijuma. Analiza *in vitro* profila brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem sprovedena je za uzorke dobijene mešanjem tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera, primenom različitih matematičkih modela (kinetika nultog reda, kinetika prvog reda, *Higuchi*, *Korsmeyer-Peppas* i *Hixon-Crowell* model). Simvastatin-specifičan GastroPlus™ model, razvijen u drugoj fazi eksperimentalnog rada, korišćen je za predviđanje očekivanog stepena i brzine apsorpcije simvastatina nakon peroralne primene lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem. Karakterizacija lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina, dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera obuhvatila je i reološku karakterizaciju, odnosno određivanje elastičnog ( $G'$ ) i viskozno modula ( $G''$ ), kao i tangens faznog ugla ( $\tan \delta$ ) korišćenjem reometra Rheolab MC 120 (Paar Physica, Nemačka), ispitivanje tvrdoće uređajem Texture Analyzer EZ-LX (Shimadzu Corporation, Japan), kao i ispitivanje stabilnosti nakon šest meseci čuvanja uzoraka na sobnoj ( $22 \pm 2$  °C) i povišenoj ( $45 \pm 2$  °C) temperaturi, vizuelnim posmatranjem kapsula u koje su punjeni uzorci (izgled, boja, tekstura) i UV spektrofotometrijskim određivanjem sadržaja simvastatina.

Poglavlje **Rezultati i diskusija** sadrži 49 stranice teksta, uključujući 44 grafička prikaza i 20 tabela. Rezultati istraživanja i njihova analiza izloženi su kroz tri potpoglavlja: *Prva faza eksperimentalnog rada*; *Druga faza eksperimentalnog rada*; *Treća faza eksperimentalnog rada*.

U poglavlju **Zaključak** su detaljno i jasno prikazana razmatranja i izvedeni zaključci koji su proistekli iz dobijenih rezultata istraživanja i njihove analize.

U poglavlju **Literatura** dat je spisak 331 reference, koje su citirane harvardskim stilom.

## B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati istraživanja su pokazali da je za formulaciju SMEDDS neophodno izabrati optimalnu vrstu ekscipijenasa, kao i njihov udeo, što se postiže analizom mikroemulzione oblasti na pseudoternarnim faznim dijagramima. Dobijeni podaci za rastvorljivost simvastatina u izabranim ekscipijensima (ulja: oleoil makrogol-6 gliceridi, propilenglikol monokaprilat, propilenglikol monolaurat; surfaktant: kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi; kosurfaktanti: polisorbat 80 ili makrogol 15 hidrosistearat), u opsegu 43,14 mg/ml do 115,18 mg/ml, pokazali su da oni imaju visok kapacitet za rastvaranje lekovite supstance. Na veličinu mikroemulzione oblasti su uticali vrsta ulja i kosurfaktanta (Cs), udeo surfaktanta (S) u S/Cs smeši, kao i prisustvo simvastatina, čije inkorporiranje u sisteme generalno dovodi do smanjenja mikroemulzione oblasti.

Dobijeni rezultati za vreme samoemulgovanja ( $< 60$  s) i robustnost prema razblaživanju (transparencija  $> 98\%$ , bez obzira na stepen razblaženja) su potvrdili da su ispitivani odabrani uzorci mikroemulzije. Rezultati ftonske korelacione spektroskopije su pokazali da svi uzorci bez simvastatina imaju veličinu kapi u opsegu koji odgovara mikroemulzijama (između 10,25 i 18,58 nm za uzorke sa polisorbatom 80 i između 10,54 i 12,12 nm za uzorke sa makrogol 15 hidrosistearatom) i vrlo homogenu raspodelu veličine kapi ( $PDI \leq 0,20$ ), bez obzira na vrstu upotrebljene uljane faze. Inkorporiranje simvastatina u SMEDDS sa propilenglikol

monokaprilatom je dovelo do primetnog povećanje veličine kapi i PDI, dok je uticaj dodatka simvastatina na sisteme sa oleoil makrogol-6 gliceridima bio neznan.

Šestomesečno skladištenje tečnih SMEDDS na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 2$  °C) dovelo je do neznatnih promena veličine kapi i PDI uzoraka sa oleoil makrogol-6 gliceridima, dok su promene navedenih parametara u SMEDDS sa propilenglikol monokaprilatom bile znatno veće. Dodatno, rezultati određivanja sadržaja simvastatina u SMEDDS sa oleoil makrogol-6 gliceridima (97,25-99,70% inicijalno; 94,95-97,25%, nakon šest meseci) su ukazali na prihvatljivu stabilnost ovih uzoraka.

Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja su pokazali da se simvastatin veoma brzo oslobađa iz svih formuliranih SMEDDS ( $\geq 80\%$  nakon 5 minuta, iz uzoraka sa polisorbitom 80 i  $> 90\%$  nakon 5 min, iz uzoraka sa makrogol 15 hidrosistearatom).

Poređenjem predviđenih i *in vivo* određenih vrednosti farmakokinetičkih parametara za simvastatin i simvastatin-kiselinu nakon peroralne primene 20 mg simvastatina u obliku tableta sa trenutnim oslobađanjem je procenjeno da se predviđena biološka raspoloživost simvastatina, kao i maksimalna koncentracija u plazmi ( $C_{max}$ ) i površina ispod krive koncentracije leka u plazmi ( $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ ) za simvastatin i simvastatin-kiselinu uklapaju u opseg vrednosti iz referentne *in vivo* studije, što ukazuje da je simvastatin-specifični PBPK model uspešno razvijen i validiran.

Na osnovu rezultata simulacija generisanih pomoću *in vitro* profila brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS punjenih u tvrde kapsule, kao ulaznih vrednosti, može se konstatovati da ove formulacije omogućavaju povećanje brzine rastvaranja, ali ne i biološke raspoloživosti simvastatina, u poređenju sa tabletama simvastatina sa trenutnim oslobađanjem. Ovaj zaključak je u skladu sa zapažanjem da veliki deo simvastatina, nakon apsorpcije iz proksimalnih delova GI trakta, podleže presistemskom metabolizmu u crevima i jetri.

Analizom rezultata simulacija je identifikovano da su distalni delovi GI trakta optimalno mesto za apsorpciju simvastatina, te da se razvojem odgovarajućih formulacija sa modifikovanim (ciljnim) oslobađanjem može postići smanjenje uticaja presistemskog metabolizma, a samim tim i poboljšanje biološke raspoloživosti simvastatina, što je iskorišćeno za sledeću fazu eksperimentalnog rada – formulaciju lipidnih sistema sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina, punjenjem tečnih SMEDDS u acidorezistentne kapsule, odnosno mešanjem tečnih SMEDDS sa Eudragit® polimerima, koji pokazuju pH zavisnu rastvorljivost.

Rezultati *in vitro/in silico* ispitivanja tečnih SMEDDS punjenih u acidorezistentne kapsule su pokazali da se odloženim oslobađanjem simvastatina (potpuno oslobađanje lekovite supstance nakon 90 min, u medijumu pH 6,4) može očekivati povećanje biološke raspoloživosti simvastatina za oko 22%, u odnosu na tablete sa trenutnim oslobađanjem.

Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja simvastatina iz uzoraka dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS sa polimerima Eudragit® L100, Eudragit® S100 ili njihovom kombinacijom (u odnosu SMEDDS:polimer 2:1), punjenih u tvrde kapsule su pokazali da dužina odlaganja oslobađanja simvastatina zavisi od vrste polimera, bez obzira na vrstu kosurfaktanta koji je korišćen u izradi SMEDDS. Simvastatin se potpuno oslobodio iz formulacija sa Eudragit® L100 nakon 180 min, u medijumu pH 6,9, koji odgovara distalnom jejunumu, dok se korišćenjem Eudragit® S100, kao pojedinačnog ekscipijensa ili u kombinaciji sa Eudragit®

L100 omogućilo dodatno odlaganje oslobađanja simvastatina (nakon 240, odnosno 300 min, u medijumu pH 7,4, što odgovara distalnom ileumu i kolonu).

Rezultati *in silico* modelovanja su pokazali da se primenom formulacija na bazi Eudragit® S100 polimera može očekivati povećanje biološke raspoloživosti simvastatina za više od 100%, a primenom formulacija sa kombinacijom polimera Eudragit® S100/Eudragit® L100 (u odnosu 1:1) za više od 80%, u odnosu na biološku raspoloživost simvastatina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. Dobijeni rezultati su ukazali da odloženo/usporeno oslobađanje simvastatina iz navedenih formulacija dovodi do povećanja apsorpcije simvastatina iz distalnih delova GI trakta, što rezultuje povećanom ukupnom biološkom raspoloživošću.

Matematičko modelovanje kinetike oslobađanja simvastatina iz lipidnih formulacija sa polimerima je ukazalo na različite mehanizme oslobađanja, u zavisnosti od upotrebljenog kosurfaktanta u SMEDDS, kao i od korišćenih Eudragit® polimera.

Rezultati istraživanja su pokazali da mešanjem tečnih SMEDDS sa Eudragit® polimerima, nakon 1 h dolazi do nastanka čvrstih, rastegljivih, transparentnih sistema, verovatno kao posledica građenja intermolekulskih veza između polimera i surfaktanta i obrazovanja gelske mreže. Oscilatorna reološka merenja ovih čvrstih lipidnih formulacija su pokazala da svi uzorci ispoljavaju viskoelastična svojstva ( $G' > G''$  i  $\tan \delta < 1$ ). Sa povećanjem udela surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida elastičnost sistema se povećavala, verovatno kao posledica formiranja rigidnije gelske mreže. Dodatak simvastatina (3,33%) je dovodio do izvesnog smanjenja elastičnih svojstava sistema, a smanjenje elastičnosti je bilo više izraženo u uzorcima sa kombinacijom polimera Eudragit® L100/Eudragit® S100.

Ispitivanjem tvrdoće čvrstih lipidnih formulacija je zaključeno da je udeo kaprilokaproil makrogol-8 glicerida imao različit uticaj na tvrdoću uzoraka, u zavisnosti od vrste kosurfaktanta. Kod formulacija sa polisorbitom 80, povećanjem udela kaprilokaproil makrogol-8 glicerida uzorci su bili mekši. U slučaju formulacija sa makrogol 15 hidroksistearatom, povećanje udela surfaktanta je dovodilo do povećanja tvrdoće. Uočene razlike u elastičnosti i tvrdoći uzoraka nisu uticale na modifikovano oslobađanje simvastatina.

Rezultati ispitivanja stabilnosti čvrstih lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina su pokazali da su formulacije stabilne tokom šest meseci na sobnoj i povišenoj ( $45 \pm 2$  °C) temperaturi, s obzirom da nisu primećene promene u izgledu, boji i teksturi kapsula, kao i da je smanjenje sadržaja simvastatina nakon šest meseci bilo u granicama od 5%.

## **C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE**

Peroralni put primene je najjednostavniji i najpoželjniji način primene lekova za većinu pacijenata. Međutim, niska rastvorljivost lekovitih supstanci predstavlja ograničavajući faktor za njihovu apsorpciju i samim tim, biološku raspoloživost nakon peroralne primene. Podatak da više od 50% lekovitih supstanci koje su već na tržištu i oko 90% novosintetisanih lekovitih supstanci imaju nisku rastvorljivost u vodi/GI tečnostima samo ističe problem sa kojim se susreću istraživači i farmaceutska industrija u razvoju farmaceutskih preparata za peroralnu primenu (Huang i sar., 2021). Simvastatin je lekovita supstanca niske rastvorljivosti i visoke permeabilnosti (BSK klasa II), čija je apsorpcija

ograničena njegovom rastvorljivošću i brzinom rastvaranja (Kuentz, 2012). Niska rastvorljivost simvastatina u vodi je potvrđena eksperimentalno ( $0,026 \pm 0,0009$  mg/ml) i slaže se sa već objavljenim rezultatima (Chen i sar., 2002; O'Neil, 2006). Dodatno, simvastatin podleže intenzivnom presistemskom metabolizmu u crevima i jetri, što zajedno sa niskom rastvorljivošću utiče da biološka raspoloživost ove supstance nakon peroralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem, jedinog farmaceutskog oblika sa simvastatinom na tržištu, bude ispod 5% (Tubić-Grozdanis i sar., 2008).

Jedan od pristupa koji se primenjuje u cilju povećanja rastvorljivosti nisko rastvorljivih lekovitih supstanci, a posledično i apsorpcije iz GI trakta je izrada lipidnih formulacija (Plaza-Oliver, 2021). Do sada je objavljeno više naučnih studija u kojima je primenjena strategija formulisanja različitih samoemulgujućih, samomikroemulgujućih ili samonanoemulgujućih sistema sa simvastatinom, kako bi se prevazišao problem niske rastvorljivosti simvastatina u vodi i omogućilo poboljšanje brzine rastvaranja ove lekovite supstance (Kang i sar., 2004; Karim i sar., 2015; Mahmoud i sar., 2013; Thomas i sar., 2012). Međutim, ni jedna od navedenih studija nije uzela u obzir presistemski metabolizam simvastatina, koji može značajno smanjiti njegovu sistemsku i hepatičku raspoloživost, naročito u slučajevima kada su rastvorljivost i/ili brzina rastvaranja simvastatina povećani (Tiwari i Pathak, 2011).

U prvoj fazi istraživanja formulisani su tečni SMEDDS, kao potencijalni nosači za peroralnu primenu simvastatina. Ovaj pristup formulisanja SMEDDS je primenjen i u određenom broju registrovanih lekova na tržištu, izrađenih sa nisko rastvorljivim lekovitim supstancama BSK klase II (Huang i sar., 2021; Savla i sar., 2017). Izbor odgovarajućih ekscipijenasa koji ulaze u sastav SMEDDS je složen zadatak i zahteva da se najpre odredi rastvorljivost lekovite supstance u različitim uljima, surfaktantima, kosurfaktantima ili korastvaračima, a zatim i fazno ponašanje sistema u kojima su ekscipijensi u različitim odnosima (Sharma i sar., 2016). U odnosu na nisku rastvorljivost u vodi, rastvorljivost simvastatina u ispitivanim ekscipijensima je veća i ukazuje da je simvastatin lipofilna supstanca, što je u skladu sa visokom vrednošću particionog koeficijenta (logP) koji je potvrđen u literaturi (Ishigami i sar., 2001; Serajuddin i sar., 1991). Najveća rastvorljivost simvastatina u ispitivanim uljima utvrđena je za propilenglikol monokaprilat, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Karim i sar., 2015; Mahmoud i sar., 2013). Takođe, kada se uporedi sposobnost solubilizacije ispitivanog surfaktanta i kosurfaktanata, uočava se da je rastvorljivost simvastatina veća u kaprilokaproil makrogol-8 gliceridima (90,64 mg/ml), koji sadrže 80% kaprilne kiseline u odnosu na polisorbata 80 (73,49 mg/ml) i makrogol 15 hidrosistearat (43,14 mg/ml). I ove eksperimentalno određene vrednosti rastvorljivosti simvastatina su u saglasnosti sa rezultatima sličnih studija (Kang i sar., 2004; Karim i sar., 2015; Mahmoud i sar., 2013). Kako bi se odredio optimalni udeo sastojaka u formulaciji, izvršena je formulacija i karakterizacija ukupno 54 različite kombinacije ulja (oleoil makrogol-6 gliceridi, propilenglikol monokaprilat, propilenglikol monolaurat), surfaktanta (kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi) i kosurfaktanata (polisorbata 80 ili makrogol 15 hidrosistearat). Ispitivane kombinacije vrste i udela ekscipijenasa nisu prethodno opisane u literaturi. Rezultati su pokazali da veličina mikroemulziona oblasti zavisi od fizičko-hemijskih osobina uljane i surfaktantne (S/Cs) faze, kao i od odnosa ekscipijenasa u formulaciji, kao što je istaknuto u ranijoj studiji (El Maghraby, 2008). Takođe, pokazano je da kosurfaktant polisorbata 80 ima veću moć solubilizacije i daje veću mikroemulzionu oblast u poređenju sa makrogol 15 hidrosistearatom. Ovi rezultati potvrđuju da površinski aktivne materije sa većom hidrofilnom glavom i dužim ugljovodoničnim lancem imaju veću moć solubilizacije (Kahlweit, 1999; Sjöblom i sar., 1996), kao i da prisustvo dvostruke veze u hidrofobnom ugljovodoničnom lancu omogućava nastajanje mikroemulzija i pri većem razblaživanju



vodom (Shah i sar., 2018). Dodatak lekovite supstance može uticati na smanjenje mikroemulzione oblasti SMEDDS (Balakrishnan i sar., 2010; Qureshi i sar., 2015), što je potvrđeno i u ovim istraživanjima. Simvastatin se iz odabranih tečnih SMEDDS oslobađao vrlo brzo, čime je potvrđeno da se formulisanjem SMEDDS značajno može povećati brzina rastvaranja lekovite supstance, pre svega zahvaljujući formiranju sitnih kapi koje omogućavaju njeno brže oslobađanje (Liu i sar., 2009).

U drugoj fazi istraživanja, primenom kompjuterskog programa GastroPlus™, uspešno je razvijen i validiran simvastatin-specifični fiziološki zasnovan farmakokinetički (PBPK) model. Poređenjem predviđenih i *in vivo* određenih vrednosti farmakokinetičkih parametara za simvastatin i simvastatin-kiselinu nakon peroralne primene 20 mg simvastatina u obliku tableta sa trenutnim oslobađanjem, procenjeno je da se predviđena biološka raspoloživost simvastatina, kao i vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  za simvastatin i simvastatin-kiselinu uklapaju u opseg vrednosti iz referentne *in vivo* studije (Tubić-Grozdaniš i sar., 2008). Do sada je publikovano samo nekoliko radova koji se bave modelovanjem apsorpcije lekovite supstance iz SMEDDS (Abraham-Vieira i sar., 2020; Fei i sar., 2013). Ovo je prva studija koja se bavi PBPK modelovanjem SMEDDS sa simvastatinom. Rezultati *in silico* modelovanja su pokazali da se formulisanjem tečnih SMEDDS ne povećava biološka raspoloživost simvastatina, u poređenju sa tabletama simvastatina sa trenutnim oslobađanjem. To ukazuje da samo poboljšanje rastvorljivosti simvastatina, postignuto formulisanjem tečnih SMEDDS, ne predstavlja najbolju strategiju u formulisanju farmaceutskih preparata sa ciljem poboljšanja biološke raspoloživosti simvastatina. Analizom rezultata simulacija je utvrđeno da su distalni delovi GI trakta optimalno mesto za apsorpciju simvastatina, te se razvojem formulacija sa modifikovanim (ciljnim) oslobađanjem simvastatina može postići smanjenje uticaja presistemskog metabolizma i povećanje biološke raspoloživosti ove lekovite supstance, što je u saglasnosti sa rezultatima Tubić-Grozdaniš i saradnika (2008). Istovremeno, ovi rezultati predstavljaju uvod u treću fazu doktorske disertacije.

U trećoj fazi istraživanja su po prvi put formulisane i okarakterisane lipidne formulacije sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina. U prvom delu istraživanja, tečni SMEDDS su punjeni u acidorezistentne kapsule, koje obezbeđuju zaštitu sadržaja kapsule u kiseloj sredini želuca i odloženo oslobađanje lekovite supstance. Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja simvastatina su pokazali da se na ovaj način donekle odlaže oslobađanje simvastatina. U drugom delu istraživanja, formulisani su i izrađeni sistemi mešanjem tečnih SMEDDS i odgovarajućih čvrstih polimernih nosača, kopolimera metakrilne kiseline Eudragit® L100 i Eudragit® S100. U dosadašnjim istraživanjima je opisano više primera konvencionalne upotrebe navedenih Eudragit® polimera, za oblaganje jezgra tableta ili različitih mikročestica. Primena navedenih polimera, koji imaju pH zavisnu rastvorljivost omogućava modifikovano oslobađanje lekovite supstance iz ovakvih farmaceutskih preparata (Agrawal i sar., 2017; Desai i Momin, 2020; Hîrjău i sar., 2020; Kumar i sar., 2018; Subudhi i sar., 2015; Thakral i sar., 2010; Thakral i sar., 2012; Vilas i sar., 2021; Zhang i sar., 2011). I na tržištu postoje farmaceutski preparati sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance, koje je postignuto oblaganjem Eudragit® L100 i Eudragit® S100 polimerima, kao što su gastrozistentne tablete mesalazina i gastrozistentne kapsule budesonida (Sandborn i Hanauer, 2003; Thakral i sar., 2013). Međutim, nema podataka da se navedeni Eudragit® polimeri mogu koristiti kao nosači SMEDDS za peroralnu primenu lekovitih supstanci. Sa aspekta formulacije, izrađene lipidne formulacije sa Eudragit® polimerima su najslabije organogelovima za rektalnu primenu, koje su formulisali Goto i saradnici (1991) mešanjem Eudragit® S100/L100 polimera u visokoj koncentraciji (30-40%) i propilenglikola, koji omogućavaju odloženo oslobađanje lekovitih supstanci. U istraživanjima sprovedenim u okviru ove disertacije je potvrđeno da uzorci nastali mešanjem 33,3% Eudragit® polimera i

66,6% odgovarajućeg SMEDDS omogućavaju modifikovano oslobađanje simvastatina. Dodatno, profili *in vitro* brzine oslobađanja simvastatina iz formulacija dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS sa Eudragit<sup>®</sup> polimerima, punjenih u tvrde kapsule, pokazali su da postoji jasna zavisnost između brzine rastvaranja/oslobađanja simvastatina i vrste Eudragit<sup>®</sup> polimera. Rezultati matematičkog modelovanja profila brzine rastvaranja simvastatina iz ovih lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem su pokazali da se simvastatin iz ispitivanih formulacija oslobađa različitom kinetikom, odnosno različitim mehanizmima, u zavisnosti od vrste upotrebljenog kosurfaktanta u SMEDDS i od vrste polimera. Rezultati simulacija su ukazali da očekivana brzina i obim apsorpcije simvastatina iz ispitivanih uzoraka značajno zavise od profila oslobađanja/brzine rastvaranja ove supstance. Odloženo/usporeno oslobađanje simvastatina iz navedenih formulacija dovodi do povećanja apsorpcije simvastatina iz distalnih delova GI trakta i, samim tim do povećanja biološke raspoloživosti, što opravdava postavku treće faze ove disertacije. Navedeni rezultati, koji se odnose na formulacije sa tečnim SMEDDS i Eudragit<sup>®</sup> polimerima, su inovativnog karaktera i u literaturi nema sličnih primera za poređenje. Mešanjem tečnih SMEDDS sa Eudragit<sup>®</sup> polimerima je došlo do očvršćavanja uzoraka 1 h nakon izrade, pri čemu su nastali čvrsti, rastegljivi, transparentni sistemi, koji se dalje mogu okarakterisati ispitivanjima reoloških svojstava i tvrdoće. Oscilatorna reološka merenja su pokazala da ovi čvrsti uzorci pokazuju viskoelastična svojstva ( $G' > G''$  i  $\tan \delta < 1$ ), kao i da sa povećanjem udela surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida raste elastičnost sistema. Dodatak simvastatina (3,33%) je doveo do određenog smanjenja elastičnih svojstava sistema. Goto i saradnici (1991) su pokazali da dodatak lekovite supstance baznih osobina izrađenim organogelovima više utiče na intermolekulske vodonične veze između Eudragit<sup>®</sup> polimera i komponenata tečne faze u poređenju sa lekovitim supstancama kiselih osobina, kao i da sadržaj lekovite supstance u organogelu treba da bude mali, do 1,23%, da bi njen uticaj bio zanemarljiv. Uzorci ispitani u okviru ove disertacije sadrže 3,33% simvastatina (pKa vrednost 13,49), što potvrđuje da se uticaj ove lekovite supstance na reološke osobine uzorka ne može zanemariti. Razlike u formulacijama čvrstih sistema sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina su uticale i na tvrdoću ovih uzoraka. Međutim, zbog inovativne prirode ovih formulacije nije moguće porediti dobijene rezultate sa podacima iz literature. Može se pretpostaviti da formiranje gelske mreže uzoraka zavisi do molekulske strukture i polarnosti kosurfaktanta, jer su uzorci sa polisorbitom 80 mekši, u poređenju sa odgovarajućim uzorcima sa makrogol 15 hidroksistearatom, koji su tvrdi. Ovi podaci ukazuju na različite interakcije komponenata u uzorcima, usled razlika u molekulskoj strukturi i polarnosti korišćenih kosurfaktanata. Verovatno makrogol 15 hidroksistearat, koji ima više hidroksilnih grupa i veću mogućnost formiranja vodoničnih veza, omogućava nastanak rigidnije strukture i dobijanje sistema veće tvrdoće. Slično su pokazali Gravelle i saradnici (2013) u istraživanjima oleogelova sa etilcelulozom, gde su uzorci sa ricinusovim uljem (sadrži hidroksilne grupe) imali veću tvrdoću u odnosu na uzorke sa mineralnim uljem. Važno je napomenuti da uočene razlike u elastičnosti i tvrdoći uzoraka nisu uticale na modifikovano oslobađanje simvastatina. Rezultati ispitivanja stabilnosti čvrstih lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem su pokazali da su formulacije stabilne tokom šest meseci na sobnoj ( $22 \pm 2$  °C) i povišenoj ( $45 \pm 2$  °C) temperaturi, s obzirom da nisu primećene promene u izgledu, boji i teksturi kapsula, kao i da je smanjenje sadržaja simvastatina nakon šest meseci bilo u granicama od 5%. Dobijeni rezultati se mogu objasniti potvrđenom stabilnošću simvastatina i Eudragit<sup>®</sup> S100 i Eudragit<sup>®</sup> L100 polimera, na temperaturama do 170 °C (Parikh i sar., 2014; Souza i sar., 2007).

Na osnovu sprovedenih istraživanja može se istaći da lipidne formulacije, dobijene mešanjem tečnih SMEDDS sa simvastatinom i kopolimera metakrilne kiseline, punjene u tvrde kapsule kao finalni farmaceutski oblik, predstavljaju inovativni pristup u primeni

Eudragit<sup>®</sup> polimera kao čvrstih nosača za SMEDDS, koji obezbeđuju željeno modifikovano oslobađanje nisko rastvorljive lekovite supstance i, posledično, povećanje njene biološke raspoloživosti. Ostali rezultati su uglavnom u saglasnosti ili se mogu objasniti odgovarajućim podacima iz literature.

## Literatura

Abraham-Vieira, B.A., Souza, A.M.T., Barros, R.C., do Carmo, F., Abreu, L., Moreira, R., Honório, T., Rodrigues, C., Sousa, V., Cabral, L., 2020. *In Silico* studies of novel sildenafil self-emulsifying drug delivery system absorption improvement for pulmonary arterial hypertension. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 92(2), e20191445.

Agrawall, G.R., Wakte, P., Shelke, S., 2017. Formulation, physicochemical characterization and *in vitro* evaluation of human insulin-loaded microspheres as potential oral carrier. *Prog. Biomater.* 6, 125-136.

Balakrishnan, P., Lee, B.J., Oh, D.H., Kim, J.O., Lee, Y.I., Kim, D.D., Jee, J.P., Lee, Y.B., Woo, J.S., Yong, C.S., Choi, H.G., 2009. Enhanced oral bioavailability of coenzyme Q10 by self-emulsifying drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 374, 66-72.

Chen, X.Q., Cho, S.J., Li, Y., Venkatesh, S., 2002. Prediction of aqueous solubility of organic compounds using a quantitative structure-property relationship. *J. Pharm. Sci.* 91, 1838-1852.

Desai, N., Momin, M., 2020. Colon targeted bioadhesive pellets of curcumin and cyclosporine for improved management of inflammatory bowel disease. *Drug Deliv. Transl. Res.* 1, 1288-1301.

El Maghraby, G.M., 2008. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants. *Int. J. Pharm.* 355, 285-292.

Fei, Y., Kostewicz, E.S., Sheu, M.T., Dressman, J.B., 2013. Analysis of the enhanced oral bioavailability of fenofibrate lipid formulations in fasted humans using an *in vitro-in silico-in vivo* approach. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 1274-1284.

Goto, S., Kawata, M., Suzuki, T., Kim, N.S., Ito, C., 1991. Preparation and evaluation of eudragit gels. I: Eudragit organogels containing drugs as rectal sustained-release preparations. *J. Pharm. Sci.* 20, 555-566.

Gravelle, A.J., Barbut, S., Marangoni, A.G., 2013. Fractionation of ethylcellulose oleogels during setting. *Food Funct.* 4, 153-161.

Hîrjău, M., Miron, D.S., Anuta, V., Lupuliasa, D., Ghica, M.V., Jînga, V., Dinu-Pîrveu, C.E., 2020. Evaluation of experimental multi-particulate polymer-coated drug delivery systems with meloxicam. *Coatings.* 10, 490.

Huang, Y., Yu, Q., Chen, Z., Wu, W., Zhu, Q., Lu, Y., 2021. *In vitro* and *in vivo* correlation for lipid-based formulations: Current status and future perspectives. *Acta Pharm. Sin. B.* [In press]. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.025>.

Ishigami, M., Honda, T., Takasaki, W., Ikeda, T., Komai, T., Ito, K., Sugiyama, Y., 2001. A comparison of the effect of 3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors on the CYP3A4-dependent oxidation of mexazolam *in vitro*. *Drug Metab. Dispos.* 29, 282-288.

Kahlweit, M., 1999. Microemulsions. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect C:Phys Chem.* 95, 89-115.

- Kang, B.K., Lee, J.S., Chon, S.K., Jeong, S.Y., Yuk, S.H., Khang, G., Lee, H.B., Cho, S.H., 2004. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *Int. J. Pharm.* 274, 65-73.
- Karim, F.T., Kalam, A., Anwar, R., Miah, M.M., Rahman, M.S., Islam, S.M., 2015. Preparation and evaluation of SEDDS of simvastatin by *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo* technique. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41, 1338-1342.
- Kuentz, M., 2012. Lipid-based formulations for oral delivery of lipophilic drugs. *Drug Discov. Today Technol.* 9, e97-e104.
- Kumar, V.S., Rijo, J., Sabitha, M., 2018. Guar gum and Eudragit® coated curcumin liquid solid tablets for colon specific drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 110, 318-327.
- Liu, Y., Zhang, P., Feng, N., Zhang, X., Wu, S., Zhao, J., 2009. Optimization and *in situ* intestinal absorption of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. *Int. J. Pharm.* 365, 136-142.
- Mahmoud, H., Al-Suwayeh, S., Elkadi, S., 2013. Design and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery systems of simvastatin aiming dissolution enhancement. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 7, 1482-1500.
- O'Neil, M.J., 2006. The Merck index - An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14th ed. Merck & Co. Inc, Whitehouse Station, New Jersey, pp. 1471-1472.
- Parikh, T., Gupta, S.S., Meena, A., Serajuddin, A.T.M., 2014. Investigation of thermal and viscoelastic properties of polymers relevant to hot melt extrusion - III: Polymethacrylates and polymethacrylic acid based polymers. *J. Excip. Food Chem.* 5, 56-64.
- Plaza-Oliver, M., Santander-Ortega, M.J., Lozano, M.V., 2021. Current approaches in lipid-based nanocarriers for oral drug delivery. *Drug Deliv. Transl. Res.* 11, 471-497.
- Qureshi, M.J., Mallikarjuna, C., Kian, W.G., 2015. Enhancement of solubility and therapeutic potential of poorly soluble lovastatin by SMEDDS formulation adsorbed on directly compressed spray dried magnesium aluminometasilicate liquid loadable tablets: a study in diet induced hyperlipidemic rabbits. *Asian J. Pharm. Sci.* 10, 40-56.
- Sandborn, W.J., Hanauer, S.B., 2003. Systematic review: the pharmacokinetic profiles of oral mesalazine formulations and mesalazine pro-drugs used in the management of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 17, 29-42.
- Savla, R., Browne, J., Plassat, V., Wasan, K.M., Wasan, E.K., 2017. Review and analysis of FDA approved drugs using lipid-based formulations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43, 1743-1758.
- Serajuddin, A.T.M., Ranadive, S.A., Mahoney, E.M., 1991. Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-COA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. *J. Pharm. Sci.* 80, 830-834.
- Shah, A., Thool, P., Sorathiya, K., Prajapat, H., Dalrymple, D., Serajuddin, A.T.M., 2018. Effect of different polysorbates on development of self-microemulsifying drug delivery systems using medium chain lipids. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44, 215-223.
- Sharma, V.K., Koka, A., Yadav, J., Sharma, A.K., Keservani R.K., 2016. Self-micro emulsifying drug delivery systems: A strategy to improve oral bioavailability. *Ars. Pharm.* 57, 97-109.
- Sjöblom, J., Lindbergh, R., Friberg, S.E., 1996. Microemulsions – phase equilibria characterization, structures, application and chemical reactions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 65, 125-287.
- Souza, M.A.F., Conceição, M.M., Silva, M.C.D., Soledade, L.E.B., Souza, A.G., 2007. Thermal and kinetic study of statins. *J. Therm. Anal. Calorim.* 87, 859-863.

- Subudhi, M.B., Jain, A., Jain, A., Hurkat, P., Shilpi, S., Gulbake, A., Jain, S.K., 2015. Eudragit<sup>®</sup> S100 coated citrus pectin nanoparticles for colon targeting of 5-fluorouracil, *Materials*. 8, 832-849.
- Thakral, N.K., Ray, A.R., Bar-Shalom, D., Eriksson, A.H., Majumdar, D.K., 2012. Soluplus-solubilized citrated camptothecin-a potential drug delivery strategy in colon cancer. *AAPS PharmSciTech*. 13, 59-66.
- Thakral, N.K., Ray, A.R., Majumdar, D.K., 2010. Eudragit S-100 Entrapped chitosan microspheres of valdecoxib for colon cancer. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21, 2691-2699.
- Thakral, S., Thakral, N.K., Majumdar, D.K., 2013. Eudragit: A technology evaluation. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10:131-149.
- Thomas, N., Mullertz, A., Graf, A., Rades, T., 2012. Influence of lipid composition and drug load on the *in vitro* performance of selfnanoemulsifying drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.* 101, 1721-1731.
- Tiwari, R., Pathak, K., 2011. Statins therapy: a review on conventional and novel formulation approaches. *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 983-998.
- Tubić-Grozdanis, M., Hilfinger, J.M., Amidon, G.L., Kim, J.S., Kijek, P., Staubach, P., Langguth, P., 2008. Pharmacokinetics of the CYP3A substrate simvastatin following administration of delayed versus immediate release oral dosage forms. *Pharm. Res.* 25, 1591-1600.
- Vilas, S., Thilagar, S., 2021. Formulation and optimisation of lamivudine-loaded Eudragit<sup>®</sup> S 100 polymer-coated pectin microspheres for colon-specific delivery. *IET Nanobiotechnol.* 15, 90-99.
- Zhang, L., Cao, F., Ding, B., Li, Q., Xi, Y., Zhai, G., 2011. Eudragit<sup>®</sup> S100 coated calcium pectinate microspheres of curcumin for colon targeting. *J. Microencapsul.* 28, 659-667.

#### 4. OBJAVLJANI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DISERTACIJE

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije objavljeni su u dva rada u međunarodnim naučnim časopisima sa SCI liste (kategorije M22) i nekoliko saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima štampanih u izvodu. Publikovani radovi i prezentovana saopštenja, koja su u direktnoj vezi sa temom doktorske disertacije, navedeni su u nastavku.

##### Radovi u međunarodnim časopisima:

1. Četković, Z., Cvijić, S., Vasiljević, D., 2018. *In vitro/in silico* approach in the development of simvastatin-loaded self-microemulsifying drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44, 849-860. (IF<sub>2018</sub> 2,367; 152/267) (M22)
2. Četković, Z., Cvijić, S., Vasiljević, D., 2019. Formulation and characterization of novel lipid-based drug delivery systems containing polymethacrylate polymers as solid carriers for sustained release of simvastatin. *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 53, 1-9. (IF<sub>2019</sub> 2,734; 135/271) (M22)

#### **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34):**

1. Četković, Z., Krstić, M., Cvijić, S., Vasiljević, D., 2016. Self-microemulsifying drug delivery systems containing simvastatin: formulation and characterization. 6th Congress of Pharmacy of Macedonia. 1-5. jun 2016, Ohrid, Makedonija. Macedon. Pharm. Bull. 62 (Suppl S3), 365-366.
2. Četković, Z., Cvijić, S., Vasiljević, D. *In vitro/in silico* approach in the characterization of novel lipid-based drug delivery systems for sustained release of simvastatin. 3. Kongres Farmaceuta Crne Gore sa međunarodnim učešćem. 9-12. maj 2019, Bečići, Crna Gora.
3. Četković, Z., Cvijić, S., Vasiljević, D. The effects of polymethacrylate polymers as carriers on the release of simvastatin from SMEDDS-based drug delivery systems. 12<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. 11-14. maj 2021. Online Conference.

#### **Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64):**

1. Četković, Z., Cvijić, S., Vasiljević, D., 2018. Samoemulgujući terapijski sistemi sa simvastatinom: uticaj vrste kosurfaktanta na veličinu kapi i isporuku leka. VII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem. 10-14. oktobar 2018, Beograd, Srbija. Arh. farm. 68, 611-612.

### **D. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE**

Rezultati sprovedenih istraživanja ukazuju da je formulacija SMEDDS za peroralnu primenu simvastatina, nisko rastvorljive lekovite supstance, veoma zahtevna i složena. Neophodno je izabrati odgovarajuće ekscipijense (ulja, surfaktant, kosurfaktant), u optimalnim udelima, koji će omogućiti izradu sistema sa svojstvima dobrog samoemulgovanja, imati visok kapacitet za solubilizaciju lekovite supstance i biti bezbedni sa aspekta primene.

U okviru razvoja farmaceutskih preparata u savremenom okruženju, osim *in vitro* i *in vivo* istraživanja, poželjno je uključiti i *in silico* modelovanje, korišćenjem odgovarajućih kompjuterskih programa, kojim se omogućava da se u kraćem vremenu, uz manje troškove i bez izvođenja nepotrebnih kliničkih studija dođe do optimalnih rešenja. Ovo je naročito značajno za razvoj inovativnih formulacija, odnosno, farmaceutskih oblika lekova. U sprovedenim istraživanjima je uspešno razvijen i validiran simvastatin-specifični PBPK model, koji opisuje ključne farmakokinetičke procese kojima u organizmu podleže simvastatin i njegov aktivni metabolit, simvastatin-kiselina. Pored primene u okviru ove disertacije, navedeni model se može koristiti u budućem razvoju farmaceutskih preparata za oralnu upotrebu sa simvastatinom.

Na osnovu rezultata simulacija generisanih pomoću *in vitro* profila brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS, punjenih u tvrde kapsule, kao ulaznih vrednosti, zaključeno je da ove formulacije omogućavaju povećanje brzine rastvaranja, ali ne i biološke raspoloživosti simvastatina u poređenju sa tabletama simvastatina sa trenutnim oslobađanjem, jer veliki deo simvastatina, nakon apsorpcije iz proksimalnih delova GI trakta, podleže presistemskom metabolizmu u crevima i jetri. Analizom rezultata simulacija je identifikovano da su distalni delovi GI trakta optimalno mesto za apsorpciju simvastatina, te da se razvojem

odgovarajućih formulacija sa modifikovanim (ciljnim) oslobađanjem može postići smanjenje uticaja presistenskog metabolizma, a samim tim i poboljšanje biološke raspoloživosti simvastatina.

Rezultati *in vitro/in silico* ispitivanja tečnih SMEDDS punjenih u acidorezistentne kapsule su pokazali da se odloženim oslobađanjem simvastatina može očekivati povećanje biološke raspoloživosti simvastatina za oko 22% u odnosu na tablete sa trenutnim oslobađanjem.

Dalja istraživanja u okviru ove disertacije su pokazala da je moguće izraditi lipidne formulacije sa ciljnim oslobađanjem simvastatina, mešanjem tečnih SMEDDS, koje sadrže lekovitu supstancu, sa kopolimerima metakrilne kiseline (Eudragit® S100 ili kombinacija Eudragit® S100/L100). Dobijene tečne smeše se vrlo lako pune u tvrde kapsule, kao finalni farmaceutski oblik i vrlo brzo očvršćavaju. Nastali čvrsti, elastični, transparentni sistemi imaju odgovarajuće reološke karakteristike i tvrdoću, kao i prihvatljivu stabilnost tokom šestomesečnog čuvanja na sobnoj i povišenoj temperaturi. Rezultati *in silico* modelovanja su pokazali da se primenom eksperimentalnih lipidnih formulacija koje sadrže Eudragit® S100 polimer očekuje povećanje biološke raspoloživosti simvastatina za više od 100%, u odnosu na biološku raspoloživost iz tableta sa trenutnim oslobađanjem.

Prikazani rezultati predstavljaju značajan doprinos u razvoju lipidnih formulacija za peroralnu primenu, sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina, u cilju povećanja biološke raspoloživosti ove nisko rastvorljive lekovite supstance.

## **F. PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE**

Korišćenjem programa iThenticate u Univerzitetnoj biblioteci Svetozar Marković, Beograd završena je provera originalnosti doktorske disertacije. Dobijena vrednost za *Similarity index* iznosi 9% i posledica je podudarnosti ličnih imena, citata, uobičajenih fraza, naziva supstanci, naziva skraćenica, kao i publikovanih rezultata istraživanja kandidata koji su proistekli iz ove doktorske disertacije. Na osnovu navedenog, može se zaključiti da je priložena doktorska disertacija kandidata diplomiranog farmaceuta Zore Četković originalno naučno delo.

## G. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija kandidata diplomiranog farmaceuta Zore Četković, pod nazivom „**Razvoj i *in vitro/in silico* karakterizacija lipidnih formulacija sa simvastatinom kao model supstancom**”, čija je izrada odobrena na sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka na Univerzitetu u Beogradu održanoj 2. jula 2019. godine (Odluka br. 61206-2752/2-19), po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, dobro osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaključcima, ispunjava sve kriterijume adekvatno napisanog naučnog dela. Navedeno je potkrepljeno objavljivanjem rezultata doktorske disertacije u dva rada u međunarodnim časopisima sa SCI liste (kategorije M22). Iz navedenih razloga Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan izveštaj o izrađenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom „Razvoj i *in vitro/in silico* karakterizacija lipidnih formulacija sa simvastatinom kao model supstancom” i kandidatu, diplomiranom farmaceutu Zori Četković, odobri javnu odbranu doktorske disertacije, po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Beograd, 9.6.2021. godine

### Članovi Komisije

---

Dr sc. Dragana Vasiljević, vanredni profesor, mentor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Sandra Cvijić, vanredni profesor, mentor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Svetlana Ibrić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Vesna Radojević, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Tehnološko-metalurški fakultet