

**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 13.7.2017. godine, imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata Sanele Savić, magistra farmacije, pod naslovom:

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

Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Snežana Savić, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. Dr sc. Miroslav Savić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Jela Milić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
4. Dr sc. Nebojša Cekić, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu
5. Dr sc. Danijela Randelović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju

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: „**Parenteralne nanoemulzije sa slabo rastvorljivim psihofarmakološkim lekovima: formulacija, optimizacija i *in vivo* procena dispozicije**“, sadrži šest poglavlja: uvod, cilj istraživanja, eksperimentalni deo, rezultati i diskusija, zaključak, i literatura. Na početku disertacije je priložen sažetak/*abstract*, dok se na kraju rada nalazi spisak publikovanih i saopštenih radova koji čine deo doktorske disertacije, kratka biografija kandidata, i potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije i korišćenju doktorske disertacije (obavezni Prilozi 1, 2 i 3).

Disertacija je napisana na 179 strana i sadrži 34 slike (9 u uvodu, 25 u rezultatima i diskusiji) i 18 tabela (6 u uvodu, 5 u eksperimentalnom delu, 7 u rezultatima i diskusiji). Pregled literature sadrži 174 navoda.

Uvod se sastoji iz sedam delova. Svaki deo sadrži informacije koje su od značaja za predmet proučavanja ove doktorske disertacije.

U prvom delu uvoda kandidatkinja je izdvojila najznačajnije informacije o nanoemulzijama kao obećavajućim koloidnim nosačima lekovitih/biološki aktivnih supstanci za različite puteve primene, posebno za parenteralnu primenu. Prikazujući najnovije literaturne podatke, kroz tri generacije parenteralnih nanoemulzija, kandidatkinja jasno obrazlaže prednosti, izazove i potencijalna rešenja u razvoju nanoemulzija kao perspektivnih nosača za poboljšanu, ciljnu isporuku slabo rastvorljivih lekovitih supstanci u određene organe, naročito mozak, nakon parenteralne primene.

Vodeći se činjenicom da je uspeh nanoemulzija kao nosača lekovitih supstanci kritično povezan sa njihovim sastavom, u drugom delu uvoda detaljno je opisan izbor visoko bezbednih i biokompatibilnih komponenata uljane faze, vodene faze i emulgatora/stabilizatora, sa posebnim osvrtom na zahteve (opšte i specifične) koje lipidne nanoemulzije za parenteralnu primenu treba da ispune.

U trećem delu uvoda dat je pregled visokoenergetskih i niskoenergetskih metoda i uređaja za izradu nanoemulzija, sa akcentom na homogenizaciju pod visokim pritiskom

kao metodu izbora za dobijanje parenteralnih nanoemulzija zadovoljavajućih karakteristika, naročito onih zasnovanih na lecitinu.

U četvrtom delu ovog poglavlja kandidatkinja ističe značaj poznavanja i kontrole istovremenog uticaja više formulacionih i/ili procesnih faktora na osobine kritične za kvalitet i stabilnost, te *in vivo* farmakokinetičko ponašanje i efikasnost razvijenih nanoemulzionih sistema. U tom smislu, kao naročito koristan alat u razvoju i optimizaciji nanoemulzija kao obećavajućih nosača slabo rastvorljivih lekovitih supstanci prepoznata je metodologija eksperimentalnog dizajna.

Peti deo uvoda posvećen je fizičko-hemijskoj karakterizaciji (posebno analizi veličine i raspodele veličina kapi, analizi zeta potencijala i morfološkoj analizi) i proceni stabilnosti parenteralnih nanoemulzija kao suštinskom delu razvoja kvalitetnih, bezbednih i efikasnih proizvoda za kliničku upotrebu.

U šestom delu uvoda akcenat je stavljen na značaj i probleme *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja lekovite supstance iz nanoemulzija. Budući da za parenteralne preparate ne postoji standardni farmakopejski ili neki drugi regulatorno propisan metod za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance, u nastavku je dat osvrt na metode koje su u tu svrhu do sada korišćene, uz objektivno navođenje prednosti i nedostataka svake metode. Više podataka dato je za tehniku reverzne dijalize uz primenu vrećica kao metodu izbora, koju je kandidatkinja u eksperimentalnom delu rada i koristila.

Sedmi, poslednji deo ove celine posvećen je sudbini nanoemulzija u organizmu (engl. *in vivo* fate, biofate) nakon parenteralne primene. U tom smislu, opisani su mogući mehanizmi eliminacije parenteralnih nanoemulzija i uloga sastava (uljana faza, emulgator) i fizičko-hemijskih osobina nanoemulzija (veličina kapi, površinska svojstva) u biodistribuciji i farmakokinetici nakon parenteralne primene. Nakon toga, kandidatkinja obrazlaže koncept diferencijalne adsorpcije proteina, kroz povezivanje fizičko-hemijskih osobina nanoemulzionog nosača lekovite supstance, profila adsorbovanih proteina plazme i posledične distribucije u organe parenteralno primenjenih nanoemulzija.

Cilj rada je jasno definisan tako da se sagleda potencijal razvijenih nanoemulzija kao perspektivnih nosača za poboljšanu isporuku u mozak slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekovitih supstanci nakon parenteralne primene, kroz jedinstven,

sveobuhvatni pristup – od formulacije, izrade i optimizacije primenom koncepta eksperimentalnog dizajna, preko sistematičnog ispitivanja fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih karakteristika i stabilnosti, do *in vivo* procene sistemske dispozicije i efikasnosti isporuke inkorporirane lekovite supstance u mozak pacova. Ciljevi ove doktorske disertacije realizovani su u okviru tri faze istraživanja koje su opisane u eksperimentalnom delu.

U poglavlju **Eksperimentalni deo** prikazani su podaci o ispitivanim formulacijama nanoemulzija i opisane sve fizičko-hemijske, biofarmaceutske i *in vivo* metode i uređaji koji su korišćeni u eksperimentalnom radu. Eksperimentalni rad izveden je u tri faze.

U prvom segmentu eksperimentalnog dela detaljno su opisani sastav i način izrade, homogenizacijom pod visokim pritiskom, parenteralnih nanoemulzija stabilizovanih kombinacijom lecitina i odgovarajućeg sternog stabilizatora, bez i sa inkorporiranom model lekovitom supstancom (diazepam, risperidon), uz variranje različitih formulacionih i procesnih parametara (sadržaj uljane faze, vrsta lecitina, vrsta koemulgatora, vrsta vodene faze, prisustvo lekovite supstance i temperatura homogenizacije), kao i procena uticaja ovih parametara i njihovih interakcija na osobine kritične za kvalitet i stabilnost razvijenih nanoemulzija (veličina kapi, indeks polidisperznosti, zeta potencijal i viskozitet), primenom metodologije punog faktorskog i generalnog faktorskog eksperimentalnog dizajna.

U drugom delu ovog poglavlja opisan je postupak sveobuhvatne fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakterizacije odabranih optimalnih formulacija placebo i nanoemulzija sa lekovitom supstancom u pogledu veličine i raspodele veličina kapi (fotonska korelaciona spektroskopija, laserska difrakcija, svetlosna mikroskopija), površinskog naelektrisanja (merenje elektroforetske pokretljivosti i prevođenje u zeta potencijal), viskoziteta (reološka merenja), pH vrednosti, električne provodljivosti, morfologije (mikroskopija atomskih sila), interakcija lek–nosač (diferencijalna skenirajuća kalorimetrija, FT-IR spektroskopija), dugoročne stabilnosti (godinu dana, $25 \pm 2^\circ\text{C}$), stabilnosti na sterilizaciju parom (121°C , 15 min, u autoklavu), kao i *in vitro* brzine oslobađanja model lekovite supstance iz razvijenih, opimizovanih nanoemulzija (tehnika reverzne dijalize uz primenu vrećica). Detaljno je opisana oprema koja je pritom korišćena, kao i primenjeni uslovi ispitivanja.

Konačno, u trećoj fazi eksperimentalnog dela opisan je protokol sprovođenja *in vivo* farmakokinetičkih i studija biodistribucije na pacovima soja *Wistar* nakon parenteralne primene odabranih nanoemulzija sa diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama, sa ciljem dobijanja uvida u farmakokinetičke performanse i *in vivo* dispoziciju razvijenih formulacija nanoemulzija i procene uticaja samog nanoemulzionog sistema, kao nosača, na farmakokinetiku, te efikasnost isporuke u mozak inkorporirane model lekovite supstance. Dalje su opisani uslovi izvođenja i oprema korišćena za *in vitro* i *ex vivo* određivanje slobodne frakcije lekovite supstance formulisane u vidu nanoemulzija ili rastvora. Na kraju je dat prikaz eksperimentalnog protokola farmakodinamske studije sprovedene na modelu amfetaminom-indukovane hiperlokomocije kod pacova, sa ciljem procene povezanosti bihejvioralnih efekata lekovite supstance primenjene u vidu parenteralnih nanoemulzija i profila koncentracija lekovite supstance u plazmi i moždanom tkivu pacova.

Sve metode koje su korišćene u eksperimentalnom radu ove doktorske disertacije su odgovarajuće i u skladu sa savremenim zahtevima naučnoistraživačkog rada u relevantnoj oblasti. Takođe, primenjene metode su omogućile dobijanje objektivnih i pouzdanih rezultata na osnovu kojih je bilo moguće doneti adekvatne naučne zaključke.

Svi eksperimenti na životinjama sprovedeni su u skladu sa EU Direktivom 2010/63/EU, uz pridržavanje protokola odobrenog od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama, Univerziteta u Beogradu–Farmaceutskog fakulteta.

Rezultati i diskusija su prikazani na 75 stranica teksta, kroz 25 slika i 7 tabela, i prate prethodno opisane tri faze eksperimentalnog rada. Kroz diskusiju dobijenih rezultata, kandidatkinja je na sveobuhvatan i razumljiv način iznela svoja tumačenja hipoteza navedenih u ciljevima rada, koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije, a uz osvrt na relevantne nalaze drugih autora koji imaju isti naučni interes.

U poglavlju **Zaključak** navedeni su najznačajniji zaključci svake od tri faze eksperimentalnog rada, koji su u skladu sa dobijenim rezultatima i navedenim ciljevima istraživanja, kao i opšti zaključak doktorske disertacije.

U poglavlju **Literatura** navedeno je 174 referenci citiranih harvardskim stilom.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati ove doktorske disertacije podeljeni su u tri celine, u skladu sa postavljenim ciljevima, iznošenjem i tumačenjem rezultata svake od izvedenih faza eksperimentalnog rada.

U okviru prvog dela, nakon odabira odgovarajućih bezbednih, biokompatibilnih, biodegradabilnih i funkcionalnih ekscipijenasa (uljana faza – na osnovu studija rastvorljivosti; emulgatori/koemulgatori; vodena faza), primenom metodologije eksperimentalnog dizajna formulisane su i metodom homogenizacije pod visokim pritiskom (topli/hladni postupak) uspešno izrađene parenteralne nanoemulzije bez i sa inkorporiranom model lekovitom supstancom, stabilizovane kombinacijom lecitina i odgovarajućeg sternog stabilizatora (polisorbat 80, poloksamer 188, Solutol HS 15). Rezultati fizičko-hemijske karakterizacije i preliminarne procene stabilnosti su potvrdili da su razvijene nanoemulzije pogodne za parenteralnu primenu, pri čemu je dobijeno da su nanoemulzije izrađene sa sojinim lecitinom robusnije i stabilnije od nanoemulzija sa lecitinom iz jajeta, dok su nanoemulzije izrađene sa natrijum-oleatom u vodenoj fazi, kao dodatnim stabilizatorom i puferskim agensom, robusnije i stabilnije od onih sa fosfatnim puferom. Pored toga, rezultati ovog dela doktorske disertacije potvrdili su opravdanost primene punog faktorskog i generalnog faktorskog dizajna u cilju procene istovremenog uticaja različitih formulacionih i procesnih faktora, i njihovih interakcija, na fizičko-hemijska svojstva i stabilnost izrađenih nanoemulzija, a sa krajnjim ciljem dobijanja nanoemulzija optimalnih karakteristika za parenteralnu primenu i isporuku lekovite supstance u mozak. Rezultati su pokazali da ne samo ispitivani pojedinačni faktori (sadržaj uljane faze, vrsta lecitina, vrsta koemulgatora, vrste vodene faze, prisustvo lekovite supstance, i temperatura homogenizacije), već interakcije između ovih faktora, značajno utiču na veličinu kapi, indeks polidisperznosti, zeta potencijal i viskozitet, kao kritične attribute kvaliteta razvijenih nanoemulzija.

U drugom delu ovog poglavlja opisani su rezultati sistematične fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakterizacije i ispitivanja stabilnosti odabranih optimalnih formulacija nanoemulzija bez i sa diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama, a u cilju procene pogodnosti formulisanih nanoemulzionih sistema za parenteralnu primenu i isporuku slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekova. Fizičko-

hemijska karakterizacija i studije stabilnosti pokazale su zadovoljavajuć nanometarski opseg veličina kapi, relativno usku raspodelu veličina, visoko negativno površinsko naelektrisanje, nizak viskozitet, kao i odličnu dugoročnu stabilnost (najmanje godinu dana na $25 \pm 2^\circ\text{C}$) i stabilnost nakon sterilizacije parom (121°C , 15 min) ispitivanih uzoraka nanoemulzija, potvrđujući time osnovnu hipotezu da razvijene nanoemulzije mogu biti obećavajući nosači za parenteralnu primenu i isporuku slabo rastvorljivih lekovitih supstanci, uključujući diazepam i risperidon. Ispitivanje uzoraka primenom mikroskopije atomskih sila je potvrdilo rezultate određivanja veličine kapi, pokazujući ujednačenu distribuciju malih, sferičnih kapi nanovelicina, dok su rezultati dobijeni primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i FT-IR spektroskopije upućivali da su diazepam i risperidon verovatno molekularno dispergovani, odnosno rastvoreni u uljanoj fazi nanoemulzija, bez bilo kakvih naznaka intermolekulske lek–nosač interakcije. Biofarmaceutska karakterizacija sprovedena primenom tehnike reverzne dijalize sa vrećicama omogućila je uvid u bifazne profile i brzinu oslobađanja model lekovitih supstanci, diazepama i risperidona, iz razvijenih optimizovanih uzoraka parenteralnih nanoemulzija, koje prati Korsmeyer–Peppas kinetiku.

Treći deo rezultata daje detaljan prikaz farmakokinetičkih i studija biodistribucije na pacovima nakon parenteralne primene odabranih nanoemulzija sa diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama, na osnovu čega je omogućena *in vivo* procena dispozicije razvijenih nanoemulzija i procena uticaja samog nanoemulzionog sistema kao nosača na farmakokinetiku, te efikasnost isporuke u mozak, inkorporirane model lekovite supstance. Presentovani *in vivo* farmakokinetički profili odabranih nanoemulzija diazepama sa rastućom koncentracijom uljane faze (20, 30 i 40%) pokazali su diskretne razlike u farmakokinetici diazepama, koje su se ogledale u brzjoj i intenzivnoj inicijalnoj distribuciji lekovite supstance u mozak pacova nakon intraperitonealne primene nanoemulzija sa 20% i 30% uljane faze. Takođe, eksperimentalni rezultati su pokazali različite i donekle nepredvidive farmakokinetičke profile risperidona u moždanom tkivu pacova nakon intraperitonealne primene odabranih nanoemulzija kostabilizovanih različitim koemulgatorima (polisorbat 80, poloksamer 188, Solutol HS 15), što je potvrdilo hipotezu da je površina kapi nanoemulzija, odnosno sastav međupovršinskog filma, najverovatnije ključni faktor od koga zavisi prolazak inkorporirane lekovite supstance kroz krvno-moždanu barijeru.

Dobijene vrednosti farmakokinetičkih parametara u plazmi, mozgu i jetri su kandidatkinju dovele do zaključka da bi nanoemulzija kostabilizovana polisorbitom 80 i nanoemulzija stabilizovana samo lecitinom, bez dodatog koemulgatora, mogle biti najperspektivnije u isporuci risperidona u mozak. Ovi navodi potvrđeni su rezultatima bihevioralne analize koja je pokazala da su dve ispitivane nanoemulzije risperidona suprimirale bazalnu aktivnost i ostvarile značajan, brz i stabilan antagonizam amfetaminom-indukovane hiperlokomocije kod pacova, sa tendencijom manje izražene sedacije i, u slučaju nanoemulzije stabilizovane samo lecitinom, produženog antipsihotičnog dejstva, u poređenju sa rastvorom risperidona, što dalje ukazuje na njihovu obećavajuću primenu u akutnim psihotičnim stanjima.

Konačno, prikazani rezultati *in vivo* ispitivanja potvrdili su hipotezu o značajnom potencijalu razvijenih, *tailor-made*, parenteralnih nanoemulzija kao nosača slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekovitih supstanci, čija bi primena bila posebno poželjna u hitnim stanjima, kada je potrebna brza isporuka leka u mozak.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Da bi se obezbedila brza/kontrolisana isporuka lekovite supstance u mozak i poboljšala njena biološka raspoloživost, te terapijski efekat, neophodno je savladati brojne ključne izazove, počev od kritičnih karakteristika same lekovite supstance (slaba rastvorljivost, značajan metabolizam prvog prolaza, nespecifična biodistribucija, efluks od strane *P*-glikoproteina), preko restriktivnih svojstava krvno-moždane barijere, do dizajna i implementacije adekvatne formulacione strategije i proizvodne tehnologije za poboljšanje ciljne isporuke lekovite supstance u mozak. Među nanotehnološkim strategijama koje se koriste u ove svrhe, poslednjih godina značajna pažnja istraživača fokusirana je na nanoemulzije, zahvaljujući njihovim brojnim povoljnim/privlačnim svojstvima uključujući biokompatibilnost, biodegradabilnost, fizičku stabilnost, jednostavan *scale up*, i, naročito, visok solubilizacioni kapacitet za lipofilne lekovite supstance, moguće povećanje biološke raspoloživosti, kontrolisano oslobađanje i ciljnu isporuku u različite organe (Benita i Levy, 1993; Hörmann i Zimmer, 2016; Shinde i sar., 2011; Tamilvanan, 2009). Mada se „lipidne“ nanoemulzije više od pola veka primenjuju u parenteralnoj ishrani, a neke su klinički odobrene za intravensku isporuku

lipofilnih lekova (pr. diazepam, propofol, etomidat) (Constantinides i sar., 2008; Li i sar., 2011), do sada je publikovano samo nekoliko radova na temu nanoemulzija kao perspektivnih nosača za poboljšanu isporuku slabo rastvorljivih lekovitih supstanci u mozak nakon parenteralne primene (Kandadi i sar., 2011; Madhusudhan i sar., 2007; Prabhakar i sar., 2013; Shah i sar., 2014), što svedoči o potrebi za ulaganjem dodatnih napora u cilju optimizacije formulacije, stabilnosti, isporuke lekova, i uopšte *in vivo* ponašanja ovih sistema, dajući ovoj temi obnovljen i sve veći značaj (Klang i Valenta, 2011).

U svetlu prethodnih navoda i nalaza, može se sagledeti poseban značaj rezultata ove doktorske disertacije koji počivaju na detaljnom pregledu literature i primeni adekvatnih fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i *in vivo* eksperimentalnih metoda, koji predstavljaju jasan doprinos u oblasti: (i) razvoja parenteralnih nanoemulzija kao obećavajućih nosača za poboljšanu isporuku u mozak slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekovitih supstanci; (ii) primene metodologije eksperimentalnog dizajna u cilju procene istovremenog uticaja različitih formulacionih i procesnih faktora na osobine kritične za kvalitet i stabilnost nanoemulzija; (iii) uspostavljanja potencijalnih veza između fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance inkorporirane u nanoemulzioni nosač i njene farmakokinetike, biodistribucije i farmakodinamike.

Dobro je poznato da parametri formulacije, parametri procesa izrade, kao i inkorporiranje lekovite supstance u unutrašnju, uljanu fazu nanoemulzije, mogu značajno da utiču na fizičko-hemijska svojstva i stabilnost, i posledično, na *in vivo* farmakokinetičko ponašanje, te efikasnost razvijenih nanoemulzionih sistema (Benita i Levy, 1993; Hippalgaonkar i sar., 2010; Jumaa i Müller, 2002; Nordén i sar., 2001). Mada je uticaj navedenih faktora na osobine kritične za kvalitet i stabilnost nanoemulzija dokumentovan, malo je podataka u literaturi koji govore o njihovom zajedničkom efektu, a za čije je sagledavanje i kontrolu eksperimentalni dizajn prepoznat kao dobar alat (Klang i Valenta, 2011; Li i sar., 2017). Ipak, sistematično ispitivanje istovremenog uticaja više formulacionih i/ili procesnih parametara na fizičko-hemijske osobine i stabilnost nanoemulzija, primenom koncepta eksperimentalnog dizajna, do sada je sprovedeno u svega nekoliko studija (Jumaa i sar., 1998; Kelmann i sar., 2007; Marín-Quintero i sar., 2013; Musa i sar., 2013; Samiun i sar., 2016; Zainol i sar., 2012). U tom smislu, veliki doprinos ove doktorske disertacije

predstavljaju rezultati dobijeni primenom punog faktorskog i generalnog faktorskog dizajna u cilju dobijanja dubljeg uvida u to kako na kritična svojstva nanoemulzija (veličinu kapi, indeks polidisperznosti, zeta potencijal i viskozitet) utiču varijacije u sastavu formulacije i uslovima izrade, čime je omogućena ne samo identifikacija faktora koji imaju značajan uticaj na vrednost ispitivanog odgovora, nego i kvantifikacija kako direktnog efekta svake pojedinačne promenljive, tako i efekata njihovih interakcija, a sa krajnjim ciljem dobijanja nanoemulzija optimalnih fizičko-hemijskih svojstava za parenteralnu primenu i isporuku lekovite supstance u mozak.

Pored uticaja formulacionih i procesnih parametara na osobine kritične za kvalitet i stabilnost nanoemulzija, od velikog značaja je i razumevanje uticaja same formulacije na ponašanje inkorporiranog leka. Poznato je da nanoemulzioni sistem sam po sebi može da utiče na farmakokinetičke performanse inkorporirane lekovite supstance i, posledično, na njen terapijski efekat (Hörmann i Zimmer, 2016; Keck i sar., 2013). Međutim, iako je, na primer, diazepam već formulisan u vidu komercijalno dostupnih injekcija tipa emulzije (pod zaštićenim nazivom Diazemuls), generalno nema podataka o njegovom farmakokinetičkom profilu. Osim za diazepam, pretpostavlja se da bi parenteralne nanoemulzije bile pogodan nosač i za risperidon, atipični antipsihotik za koji na tržištu nema farmaceutskog oblika pogodnog za tretman akutnih psihotičnih epizoda ili akutne agitacije, a koji bi bio posebno poželjan u urgentnim stanjima, kada je potrebna brza isporuka leka u mozak, i kada pacijenti ne mogu ili odbijaju da uzmu oralne oblike (D'Souza i sar., 2013; Kumar i sar., 2008; Rund i sar., 2006). Stoga je u ovoj disertaciji opravdano sprovedeno ispitivanje farmakokinetike i *in vivo* profila dispozicije formulisanih nanoemulzija sa diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama, koje je potvrdilo uticaj same formulacije nanoemulzija, u smislu rastuće koncentracije uljane faze i sastava ulje–voda međupovršinskog filma, pre svega vrste kostabilizatora/koemulgatora, na farmakokinetiku inkorporirane model lekovite supstance, uključujući odnose ekspozicije u plazmi i moždanom tkivu te efikasnost isporuke u mozak, nakon intraperitonealne primene serije nanoemulzija kod pacova. Pored farmakokinetičkih nalaza, dodatna vrednost disertacije leži u rezultatima bihevioralne studije sprovedene na modelu amfetaminom indukovane hiperlokomocije kod pacova, koji su zajedno sa povoljnim fizičko-hemijskim i farmakokinetičkim svojstvima, mogli da ukažu na potencijalnu prednost razvijenih *tailor-made*

nanoemulzija risperidona nad trenutno dostupnim formulacijama na tržištu, u lečenju agitiranih i nekooperativnih akutnih psihotičnih pacijenata.

Sveukupno gledano, rezultati dobijeni i predstavljeni u okviru ove doktorske disertacije delom su saglasni sa podacima iz literature, a rezultati određenih ispitivanja izvedenih u okviru disertacije nisu mogli biti provereni u publikovanim izvorima, te se smatraju doprinosom istraživačkog rada kandidata.

Literatura

- Benita, S., Levy MY. 1993. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J. Pharm. Sci.* 82, 1069–1079.
- Constantinides, P.P., Chaubal, M.V., Shorr, R., 2008. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 17, 757–767.
- D'Souza, S., Faraj, J., Deluca, P., 2013. Microsphere delivery of Risperidone as an alternative to combination therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 613–619.
- Hippalgaonkar, K., Majumdar, S., Kansara, V., 2010. Injectable lipid emulsions—advancements, opportunities and challenges. *AAPS PharmSciTech.* 11, 1526–1540.
- Hörmann, K., Zimmer, A., 2016. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions — A review. *J. Control. Release* 223, 85–98.
- Jumaa, M., Kleinebudde, P., Müller, B.W., 1998. Mixture experiments with the oil phase of parenteral emulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46, 161–167.
- Jumaa, M., Müller, B.W., 2002. Parenteral emulsions stabilized with a mixture of phospholipids and PEG-660–12-hydroxy-stearate: evaluation of accelerated and long-term stability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54, 207–212.
- Kandadi, P., Syed, M.A., Goparaboina, S., Veerabrahma, K., 2011. Brain specific delivery of pegylated indinavir submicron lipid emulsions. *Eur. J. Pharm.* 42, 423–432.
- Keck, C.M., Jansch, M., Müller, R.H., 2013. Protein adsorption patterns and analysis on iv nanoemulsions—the key factor determining the organ distribution. *Pharmaceutics* 5, 36–68.
- Kelmann, R.G., Kuminek, G., Teixeira, H.F., Koester, L.S., 2007. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. *Int. J. Pharm.* 342, 231–239.
- Klang, V., Valenta, C., 2011. Lecithin-based nanoemulsions. *J. Drug Del. Sci. Tech.* 21, 55–76.

- Kumar, M., Misra, A., Babbar, A.K., Mishra, A.K., Mishra, P., Pathak, K., 2008. Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. *Int. J. Pharm.* 358, 285–291.
- Li, J., Qiao, Y., Wu, Z., 2017. Nanosystem trends in drug delivery using quality-by-design concept. *J. Control. Release* 256, 9–18.
- Li, X., Du, L., Wang, C., Liu, Y., Mei, X., Jin, Y., 2011. Highly efficient and lowly toxic docetaxel nanoemulsions for intravenous injection to animals. *Pharmazie* 66, 479–483.
- Madhusudhan, B., Rambhau, D., Apte, S.S., Gopinath, D., 2007. 1-O-alkylglycerol stabilized carbamazepine intravenous o/w nanoemulsions for drug targeting in mice. *J. Drug Target.* 15, 154–161.
- Marín-Quintero, D., Fernández-Campos, F., Calpena-Campmany, A.C., Montes-López, M.J., Clares-Naveros, B., Del Pozo-Carrascosa, A., 2013. Formulation design and optimization for the improvement of nystatin-loaded lipid intravenous emulsion. *J. Pharm. Sci.* 102, 4015–4023.
- Musa, S.H., Basri, M., Masoumi, H.R., Karjiban, R.A., Malek, E.A., Basri, H., Shamsuddin, A.F., 2013. Formulation optimization of palm kernel oil esters nanoemulsion-loaded with chloramphenicol suitable for meningitis treatment. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 112, 113–119.
- Nordén, T.P., Siekmann, B., Lundquist, S., Malmsten, M., 2001. Physicochemical characterisation of a drug-containing phospholipid-stabilised o/w emulsion for intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 393–401.
- Prabhakar, K., Afzal, S.M., Surender, G., Kishan, V., 2013. Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain. *Acta Pharm. Sin. B* 3, 345–353.
- Rund, D.A., Ewing, J.D., Mitzel, K., Votolato, N., 2006. The use of intramuscular benzodiazepines and antipsychotic agents in the treatment of acute agitation or violence in the emergency department. *J. Emerg. Med.* 31, 317–24.
- Samiun, W.S., Basri, M., Masoumi, H.R.F., Khairudin, N., 2016. The prediction of the optimum compositions of a parenteral nanoemulsion system loaded with a low water solubility drug for the treatment of schizophrenia by artificial neural networks. *RSC Adv.* 6, 14068–14076.
- Shah, L., Gattacceca, F., Amiji, M.M., 2014. CNS delivery and pharmacokinetic evaluations of DALDA analgesic peptide analog administered in Nano-sized oil-in-water emulsion formulation. *Pharm. Res.* 31, 1315–1324.
- Shinde, R.L., Jindal, A.B., Devarajan, P.V., 2011. Microemulsions and nanoemulsions for targeted drug delivery to the brain. *Curr. Nanosci.* 7, 119–133.

Tamilvanan, S., 2009. Formulation of multifunctional oil-in-water nanosized emulsions for active and passive targeting of drugs to otherwise inaccessible internal organs of the human body. *Int. J. Pharm.* 381, 62–76.

Zainol, S., Basri, M., Basri, H.B., Shamsuddin, A.F., Abdul-Gani, S.S., Karjiban, R.A., Abdul-Malek, E., 2012. Formulation optimization of a palm-based nanoemulsion system containing levodopa. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 13049–13064.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DISERTACIJE

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u vidu četiri rada u časopisima koji su na SCI listi (tri rada kategorije M21 i jedan rad kategorije M23), dva rada u časopisima nacionalnog značaja (jedan rad kategorije M52 i jedan rad kategorije M53), kao i u formi većeg broja saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima štampanih u celini ili u izvodu. Podaci o publikovanim radovima dati su u nastavku.

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

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

Rad u međunarodnom časopisu (M23)

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

Rad u časopisu nacionalnog značaja (M52)

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

Rad u naučnom časopisu (M53)

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

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

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

pharmacokinetic study. 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisbon/Portugal, March 31–April 3, 2014.

Saopštenja sa medunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. Dorđević S, Cekić N, Stamenković V, Mitrović J, Milićević I, Isailović T, Savić S. Parenteral diazepam-loaded nanoemulsions with 20, 30 and 40% of oil phase: Physicochemical and biopharmaceutical characterization. II Congress of Pharmacists of Montenegro with the International Participation, Budva/Montenegro, May 28–31, 2015; P216–217.
2. Djordjevic S, Cekic N, Pantelic I, Vuleta G, Milic J, Savic S. Alkyl polyglucoside vs. lecithin-based nanoemulsions: Preparation, characterization and stability evaluation. 9th World Surfactant Congress and Business Convention (CESIO), Barcelona/Spain, June 10–12, 2013; P35.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

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

E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE

Uzimajući u obzir brojna preformulaciona, formulaciona, fiziološka i farmakološka pitanja povezana sa razvojem parenteralnih farmaceutskih oblika lekova slabo rastvorljivih u vodi, u ovoj disertaciji predložen je noviji pristup zasnovan na biokompatibilnim nanoemulzijama kao alternativnim, perspektivnim nosačima za parenteralnu primenu slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekovitih supstanci (uključujući diazepam i risperidon), a čija bi primena bila posebno poželjna u hitnim stanjima, kada je potrebna brza isporuka leka u mozak. Visoki zahtevi koje u pogledu kvaliteta i bezbednosti nameće parenteralni put primene, specifične karakteristike psihofarmakoloških lekovitih supstanci, uticaj različitih faktora (formulacionih, procesnih i prisustva lekovite supstance) na fizičko-hemijska svojstva i stabilnost nanoemulzija, kao i uticaj samog nanoemulzionog sistema kao nosača na biološke

performanse inkorporirane lekovite supstance (oslobađanje iz nanoemulzije, farmakokinetičko ponašanje i, posledično, terapijski efekat), čine razvoj parenteralnih nanoemulzija sa slabo rastvorljivim psihofarmakološkim lekovima naročito izazovnim.

U tom smislu, prikazana doktorska disertacija predstavlja svojevrsan naučni doprinos na ovom polju, koji se upravo ogleda u multidisciplinarnom, sveobuhvatnom pristupu – od formulacije, izrade i optimizacije primenom koncepta eksperimentalnog dizajna, preko fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakterizacije i ispitivanja stabilnosti razvijenih nanoemulzija, do *in vivo* procene sistemske dispozicije i efikasnosti isporuke inkorporirane lekovite supstance u mozak pacova.

U okviru doktorske disertacije pokazana je zadovoljavajuća primena eksperimentalnog dizajna, kao posebno korisne strategije za identifikaciju i procenu efekata i interakcija različitih formulacionih i procesnih parametara i utvrđivanje njihove povezanosti sa kritičnim atributima kvaliteta razvijenih nanoemulzija, a u cilju definisanja optimalnog sastava formulacije i uslova izrade nanoemulzija koje u pogledu fizičko-hemijskih svojstava zadovoljavaju kriterijume parenteralnog puta primene. Dodatna vrednost disertacije leži u objedinjavanju rezultata sveobuhvatne karakterizacije odabranih optimalnih formulacija nanoemulzija bez i sa inkorporiranom model lekovitom supstancom – njihovih fizičko-hemijskih karakteristika, stabilnosti, lek–nosač interakcija, i osnovnih biofarmaceutskih karakteristika, čije poznavanje i kontrola predstavljaju jedan od suštinskih aspekata u razvoju kvalitetnih, bezbednih i efikasnih proizvoda za kliničku upotrebu.

Konačno, veliki doprinos ove doktorske disertacije predstavljaju i rezultati dobijeni sprovođenjem *in vivo* farmakokinetičkih i farmakodinamskih ispitivanja formulisanih nanoemulzija u cilju predviđanja uticaja samog nanoemulzionog sistema kao nosača na farmakokinetiku, te efikasnost isporuke u mozak inkorporirane model lekovite supstance i, posledično, bihejvioralne efekte. Na primeru diazepama i risperidona kao model lekovitih supstanci, potvrđena je sposobnost parenteralnih nanoemulzija da uspešno isporuče slabo rastvorljive lekovite supstance kroz krvno-moždanu barijeru, čime je dobijen uvid u značajan potencijal razvijenih formulacija nanoemulzija kao nosača za parenteralnu primenu i poboljšanu isporuku u mozak slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekova, čija bi primena bila posebno poželjna u hitnim stanjima, kada je potrebna brza isporuka leka u mozak.

F. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom „**Parenteralne nanoemulzije sa slabo rastvorljivim psihofarmakološkim lekovima: formulacija, optimizacija i *in vivo* procena dispozicije**“, čija je izrada odobrena na sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka na Univerzitetu u Beogradu održanoj 8.7.2014. godine, kandidata mag. farm. Sanele M. Savić, po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, zadovoljavajuće osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji, i dobro formulisanim zaključcima, ispunjava sve kriterijume adekvatno napisanog naučnog dela.

Komisija, stoga, sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan izveštaj o izrađenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom „**Parenteralne nanoemulzije sa slabo rastvorljivim psihofarmakološkim lekovima: formulacija, optimizacija i *in vivo* procena dispozicije**“, i kandidatu mag. farm. Saneli Savić odobri javnu odbranu doktorske disertacije po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Beograd, 7.9.2017. godine

Članovi Komisije

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

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

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



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

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