

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

**KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE**

Odlukom Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta donetoj na sednici održanoj 20.06.2019. godine, imenovani su članovi Komisije za odbranu završene doktorske disertacije kandidata magistra farmacije Jovane Janković, koja je odobrena pod naslovom:

**„Formulacija i karakterizacija polučvrstih samomikroemulgujućih sistema kao potencijalnih nosača nove generacije za peroralnu primenu aciklovira“**

Komisiju za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije u sastavu:

1. Dr sc. Ljiljana Đekić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor
2. Dr sc. Marija Primorac, redovni profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor
3. Dr sc. Ljiljana Solomun, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, član
4. Dr sc. Aleksandar Rašković, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu – Medicinski fakultet, član

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

## IZVEŠTAJ

### A) PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija kandidata magistra farmacije Jovane Janković pod nazivom „**Formulacija i karakterizacija polučvrstih samomikroemulgujućih sistema kao potencijalnih nosača nove generacije za peroralnu primenu aciklovira**“ napisana je na 154 strane i sadrži šest poglavlja: Uvod (str. 1-42); Cilj istraživanja (str. 43-44); Eksperimentalni deo (str. 45-69); Rezultati i diskusija (str. 70-131); Zaključak (str. 132-137); Literatura (str. 138-154). Na početku disertacije priložen je rezime na srpskom i engleskom jeziku. Sastavni deo disertacije je i biografija kandidata koja je priložena na kraju.

Doktorska disertacija napisana je jasnim i preglednim stilom i sadrži 22 tabele (3 u Uvodu, 4 u Eksperimentalnom delu i 15 u Rezultatima i diskusiji), 35 grafičkih prikaza (2 u Uvodu, 3 u Eksperimentalnom delu i 30 u Rezultatima i diskusiji) i 246 literaturnih navoda koji se tiču razmatrane problematike.

U **Uvodu** je dat pregled dosadašnjih naučnih saznanja u oblasti koja je proučavana u okviru doktorske disertacije, jasno je definisan predmet istraživanja i izložena opravdanost istraživanja. Uvod se sastoji iz tri potpoglavlja: *Aciklovir; Savremeni pristupi u razvoju farmaceutskih formulacija sa aciklovirom; Samomikroemulgujući sistemi kao nosači lekovitih supstanci za peroralnu primenu.*

U *prvom potpoglavlju* prikazani su podaci o mehanizmu delovanja, kliničkom značaju, fizičko-hemijskim i biofarmaceutskim svojstvima aciklovira, koji je korišćen kao model lekovita supstanca u sprovedenom istraživanju. U nastavku su navedene osnovne informacije o komercijalno dostupnim farmaceutskim preparatima aciklovira i ukazano je na činjenicu da se ovaj antivirusni lek uobičajeno primenjuje *per os* u pojedinačnoj dozi od 200 – 800 mg u terapiji infekcija izazvanih virusima *Herpes simplex* tip 1 i tip 2 i *Varicella zoster*. S obzirom da je njegova apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta (GIT) vrlo spora, promenljiva i nepotpuna iz konvencionalnih čvrstih farmaceutskih oblika (tableta, kapsula), a poluvreme eliminacije mu je kratko ( $t_{1/2}$  2,5 h), već dugi niz godina se teži ka poboljšanju fizičko-hemijskih karakteristika i biofarmaceutskog profila aciklovira u cilju povećanja oralne biološke raspoloživosti. U ovom potpoglavlju su navedeni i literaturni podaci koji ukazuju da se niska oralna biološka raspoloživost aciklovira može pripisati njegovom kratkom zadržavanju, niskoj rastvorljivosti i/ili niskoj permeabilnosti na mestu apsorpcije (duodenum i jejunum). Stoga se za aciklovir kao formulacioni izazovi postavljaju kako povećanje njegove rastvorljivosti, tako i pospešivanje intestinalne permeabilnosti. Razvoj formulacionih strategija za poboljšanje apsorpcije peroralno primenjenih lekovitih supstanci je permanentan istraživački interes, sa naročitim značajem kod antiretrovirusne hronične terapije gde su terapijske doze uobičajeno visoke.

*U okviru drugog potpoglavlja* dat je pregled dosadašnjeg istraživačkog rada u oblasti razvoja formulacija sa aciklovirom za različite puteve primene. Fokus je stavljen na studije u kojima su postignuta poboljšanja u pogledu rastvorljivosti i/ili permeabilnosti aciklovira zasnovana na inkapsulaciji aktivne supstance u nosače na mikroskali i nanoskali, kao jednoj od najaktuelnijih i najperspektivnijih oblasti istraživanja sa aspekta potencijalnih poboljšanja terapijske efikasnosti i bezbednosti farmaceutskih proizvoda. Detaljnije su opisani sastav i karakteristike ispitivanih mikročestica, vezikularnih nanonosaa, nanočestica i mikroemulzija sa aciklovirom. Pokazano je da mikroemulzije kao termodinamički stabilne nanodisperzije koje se formiraju spontano u smešama surfaktanat/kosurfaktant/ulje/voda i prednjače među nanonosaaćima u pogledu stabilnosti i kapaciteta za rastvaranje/solubilizaciju lekovite supstance i modifikovanje permeabilnosti bioloških barijera, međutim, ovi sistemi nemaju pogodna fizičko-hemijska svojstva za primenu *per os* u čvrstom farmaceutskom obliku kao najprihvatljivijem za najširu populaciju pacijenata. Dostupna literatura ne daje podatke o nanoinkapsuliranom acikloviru u čvrstom farmaceutskom obliku za peroralnu primenu, što predstavlja problem koji se može dalje istraživati.

*U trećem potpoglavlju* su izloženi osnovni podaci o *lipidnim formulacijama* kao formulacionoj strategiji čiji potencijal za povećanje biološke raspoloživosti, smanjenje terapijske doze i rizika od neželjenih efekata i razvoja rezistencije, je već demonstriran kod teško rastvorljivih antiretrovirotika (ritonavir, sakvinavir, tipranavir) u farmaceutskim preparatima koji su registrovani/licencirani tokom poslednje dve decenije. Ukazano je da poslednjih godina prevladava stav da u ostvarivanju navedenih poboljšanja prednost imaju lipidne formulacije tipa *samomikroemulgujućih sistema* (sin. *mikroemulzioni prekoncentrati*) (engl. Self-microemulsifying drug delivery systems, SMEDDS). SMEDDS sadrže aktivnu supstancu rastvorenu ili suspendovanu u smeši lipida, surfaktanata i hidrofилnih korastvarača i u kontaktu sa vodenim medijumima/GIT tečnostima formiraju ulje-u-vodi mikroemulzije. Sumirani su aktuelni izazovi u formulaciji SMEDDS koji se odnose na: kriterijume za izbor vrste i koncentracije ekscipijenasa, *in vitro* karakterizaciju i diferencijaciju od drugih tipova formulacija sličnog sastava, procenu potencijala za poboljšanje isporuke lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*. Istaknuto je da je u dve novije studije predloženo formulisanje *polučvrstih lipidnih formulacija* kao nove vrste nosača kojima se pripisuju bolja fizička stabilnost (naročito kod formulacija sa visokim sadržajem aktivne supstance) i kontrolisano oslobađanja leka, međutim do sada nisu formulisani i istraživani nosači tipa *polučvrstih SMEDDS*. S obzirom da bi se time otvorila mogućnost i za njihovo punjenje u kapsule, kao čvrsti farmaceutski oblik za primenu *per os*, kandidat prepoznaje formulaciju i karakterizaciju polučvrstih SMEDDS kao izazov za detaljno istraživanje, čemu je posvećena ova doktorska disertacija.

**Sveukupan Cilj istraživanja** koje je sprovedeno u okviru doktorske disertacije **bio je da se ispita mogućnost za formulaciju nove generacije nosača lekovitih supstanci tipa polučvrstih SMEDDS, kao i sveobuhvatna fizičko-hemijska, farmaceutsko-tehnološka i biofarmaceutska karakterizacija u cilju sagledavanja njihovog potencijala za peroralnu primenu aciklovira kao model aktivne supstance u obliku tvrdih kapsula. Dodatno, kod polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom koji**

**ispunjava postavljene kriterijume u pogledu fizičko-hemijskih i farmaceutsko-tehnoloških karakteristika, kao i biofarmaceutskog profila, bio je cilj da se proceni uticaj nosača na biološku raspoloživost aktivne supstance kao i da se ispita neškodljivost *in vivo* na animalnom modelu.**

U poglavlju **Eksperimentalni deo** navedene su karakteristike korišćenih materijala i dat je detaljan opis eksperimentalnih procedura, opreme i uređaja koji su primenjeni za realizaciju postavljenih ciljeva istraživanja. Eksperimentalni rad odvijao se u tri faze.

U *prvoj fazi eksperimentalnog rada* je izvršena formulacija i *in vitro* karakterizacija tečnih SMEDDS sa aciklovirom. Formulacija je obuhvatila izbor sastojaka sistema tipa ulje/surfaktant/kosurfaktant/korastvarač koji predstavljaju potencijalne SMEDDS i studiju njihove disperzibilnosti u vodenim medijumima različite pH vrednosti (0,1 M HCl i fosfatnom puferu pH 7,2) i kapaciteta za inkapsulaciju aciklovira sa ciljem da se identifikuju oni koji imaju karakteristike SMEDDS. Na osnovu literaturnih podataka razmotren je veći broj ekscipijenasa iz grupe ulja, surfaktanata i korastvarača, a zatim je eksperimentalno određena rastvorljivost aciklovira u odabranim ekscipijensima kako bi se izvršila selekcija onih koji su potencijalno najpogodniji za formulisanje SMEDDS sa visokim kapacitetom za inkapsulaciju ove aktivne supstance. Izabrani ekscipijensi su upotrebljeni za pripremu pseudoternernih sistema ulje/surfaktant/kosurfaktant/korastvarač čiji je sastav definisan korišćenjem metodologije pseudoternernih faznih dijagrama pri čemu je pseudokomponenta bila smeša surfaktanta i kosurfaktanta. Pripremljeno je 60 pseudoternernih sistema koji su imali isti sadržaj ulja (10% *m/m*), a razlikovali su se u pogledu vrste surfaktanta, masenog odnosa surfaktanta i kosurfaktanta (Km), vrste korastvarača i njihovih koncentracija (20% *m/m* ili 30% *m/m*). Kod svih pseudoternernih sistema je takođe određivan kapacitet za inkapsulaciju aciklovira. Karakterizacija njihove disperzibilnosti u kiselom i alkalnom vodenom medijumu obuhvatila je organoleptički pregled, UV-Vis spektrofotometrijsko određivanje transmitance i određivanje veličine kapi fotonskom korelacionom spektroskopijom (PCS). Brzina dispergovanja, transmitanca, prosečna veličina kapi (*Z-ave*) i indeks polidisperziteta (PdI) korišćeni su kao kriterijumi za identifikaciju pseudoternernih sistema koji su imali svojstva SMEDDS. Kod SMEDDS je procenjivan uticaj nosača na brzinu oslobađanja aciklovira (korišćenjem modela difuzione ćelije) i njegovu permeabilnost (test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama, PAMPA).

*Druga faza eksperimentalnog rada* se odnosila na formulaciju, fizičko-hemijsku, farmaceutsko-tehnološku i biofarmaceutsku karakterizaciju polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom u obliku tvrdih kapsula. Formulacija polučvrstih SMEDDS izvršena je pripremom novih uzoraka tako što je u sastav tečnih SMEDDS, koji su optimizovani u prethodnoj fazi istraživanja, uključen sintetski polimer makrogol 8000 (5-10% *m/m*). Kod polučvrstih sistema ispitivano je reološko ponašanje, kako bi se izvršio izbor onih koji imaju najpogodnije karakteristike za punjenje u dvodelne kapsule sa minimalnim rizikom od curenja i drugih vidova fizičke nestabilnosti. SMEDDS sa optimizovanim reološkim ponašanjem upotrebljeni su za izradu uzoraka sa aciklovirom u koncentraciji koja je odgovarala kapacitetu za inkapsulaciju (procenjenom u prethodnoj fazi istraživanja) kao i sa koncentracijom prikladnom za primenu terapijske doze od 200 mg ove aktivne

supstance u jednodoznom čvrstom farmaceutskom obliku (tvrda kapsula veličine 0). Da bi se sagledale karakteristike polučvrstih SMEDDS *per se* kao nosača za *per os* primenu aciklovira, ispitana je njihova disperzibilnost u 0,1 M HCl i fosfatnom puferu pH 7,2 i *in vitro* brzina oslobađanja aktivne supstance (korišćenjem modela difuzione ćelije) u poređenju sa suspenzijom aciklovira. Pored toga, za procenu fizičkog stanja inkorporiranog aciklovira i potencijalnih interakcija aktivne supstance i sastojaka formulacije izvršena je analiza polučvrstih SMEDDS optičkom mikroskopijom i diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC). Preliminarnim razmatranjima utvrđena je zadovoljavajuća kompatibilnost polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom i omotačem tvrdih kapsula od hipromeloze (HPMC), na osnovu razmatranja njihovih organoleptičkih svojstava i integriteta tokom 1 meseca čuvanja pod ambijentalnim uslovima. Dodatno, izvršena je DSC analiza fizičke smeše polučvrstih SMEDDS sa hipromelozom. U završnom delu druge faze eksperimentalnog rada, u cilju procene stabilnosti polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom u obliku tvrdih kapsula, ispitivane su organoleptičke karakteristike (oblik, boja, integritet, mehanička svojstva), određivan je sadržaj aciklovira, ispitivana je disperzibilnost (transmitanca, prosečna veličina kapi i indeks polidisperziteta) i praćeno je *in vitro* oslobađanje lekovite supstance (u standardnoj aparaturi sa rotirajućom lopaticom) kod uzoraka koji su čuvani u klima komori na 25 °C/60% RH, odnosno, 5±3 °C tokom 3 meseca. Kako bi se procenio uticaj omotača kapsule na stabilnost i performanse SMEDDS nosača uporedo su ispitivani i polučvrsti SMEDDS koji nisu punjeni u kapsule (*bulk* formulacije) i čuvani su pod istim uslovima.

U trećoj fazi eksperimentalnog rada izvedeni su *in vivo* testovi za procenu farmakokinetičkog profila aciklovira iz *per os* primenjenih SMEDDS i njihove neškodljivosti. U biološkim testovima je upotrebljen polučvrsti SMEDDS koji je u okviru prethodne faze ispitivanja pokazao najpovoljniji *in vitro* biofarmaceutski profil i zadovoljavajuću stabilnost u obliku tvrdih kapsula. *In vivo* eksperimenti su sprovedeni na laboratorijskim pacovima soja *Wistar*, uz odobrenje Etičke komisije Univerziteta u Novom Sadu (br. 01-78/16-3). Za potrebe ispitivanja uticaja SMEDDS nosača na farmakokinetički profil aciklovira u poređenju sa čistom supstancom, pripremljeni su uzorci polučvrstog SMEDDS bez lekovite supstance i sa aciklovirom, kao i vodeni rastvor i suspenzija aciklovira, koji su primenjeni kod životinja prema definisanom i odobrenom protokolu. Da bi se izračunali farmakokinetički parametri za aciklovir (maksimalna koncentracija u serumu ( $C_{max}$ ), koncentracija u nultoj tački ( $C_0$ ), prosečno vreme potrebno za dostizanje  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ), površine ispod krive zavisnosti koncentracije od vremena ( $AUC_{0-t}$  i  $AUC_{0-\infty}$ ), konstanta eliminacije ( $k_{el}$ ), poluvreme eliminacije ( $t_{1/2}$ ), volumen raspodele stacionarnog stanja ( $V_{ss}$ ), klirens (Cl), srednje vreme zadržavanja (MRT) i apsolutna biološka raspoloživost (BA)), korišćeni su podaci o sadržaju aktivne supstance u serumu pacova koji je određivan hromatografskom analizom. Kako bi se procenila neškodljivost oralno primenjenih polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom, u serumu eksperimentalnih životinja odgovarajućim analitičkim postupcima su određivani: aktivnost jetrenih aminotransferaza (alanin transaminaze (ALT) i aspartat transaminaze (AST)), koncentracija mokraćne kiseline, uree i kreatinina. Za statističku analizu dobijenih podataka je korišćen ANOVA test.

Poglavlje **Rezultati i diskusija** sadrži 62 stranice teksta, uključujući 30 grafičkih prikaza i 15 tabela. Rezultati istraživanja i njihova analiza izloženi su kroz tri potpoglavlja: *Rezultati i diskusija I faze istraživanja*; *Rezultati i diskusija II faze istraživanja*; *Rezultati i diskusija III faze istraživanja*.

U poglavlju **Zaključak** kroz 14 tačaka detaljno i jasno su prikazana razmatranja i izvedeni zaključci koji su proistekli iz dobijenih rezultata istraživanja i njihove analize.

U poglavlju **Literatura** dat je spisak 246 referenci koje su citirane u okviru doktorske disertacije.

## **B) OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA**

Rezultati doktorske disertacije podeljeni su u tri celine, shodno postavljenim ciljevima i konceptu sprovođenja eksperimenatalnog dela istraživanja.

U prvom delu prikazani su i analizirani rezultati određivanja rastvorljivosti aciklovira u individualnim ekscipijensima iz grupe ulja, surfaktanata i hidrofilnih korastvarača na osnovu čega je izvršen izbor ekscipijenasa koji su u nastavku korišćeni kao sastojci potencijalnih SMEDDS. U nastavku je ispitan uticaj različitih formulacionih parametara (vrste i koncentracije surfaktanta i korastvarača i masenog odnosa surfaktanta i kosurfaktanta (Km)) na kapacitet za inkapsulaciju aciklovira u tečnim pseudoternernim sistemima pripremljenim od ulja (trigliceridi srednje dužine lanaca) (10%), surfaktanta (PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi, polisorbit 20 ili makrogol glicerol hidroksistearat), kosurfaktanta (poligliceril-3-dioleata) i korastvarača (glicerol, makrogol 400) (20% ili 30%), pri Km koji je variran u rasponu od 0,11 do 9. Utvrđeno je da je kapacitet formulisanih pseudoternernih sistema za inkapsulaciju aciklovira iznosio 0,18-31,66 mg/ml. Razmatranje dobijenih rezultata je pokazalo da su vrsta i sadržaj surfaktanta i korastvarača imali značajan uticaj na kapacitet ispitivanih pseudoternernih sistema za inkorporiranje aciklovira. Maksimalan kapacitet za inkapsulaciju aciklovira je postignut korišćenjem makrogol glicerol hidroksistearata pri najvišem ispitivanom Km (9). Povećanje koncentracije hidrofilnog korastvarača, glicerola ili makrogola 400, uprkos smanjenju ukupnog sadržaja nejonskih surfaktanata i ulja, može dovesti do povećanja rastvorljivosti aciklovira u pseudoternernim sistemima kada se kao surfaktant upotrebi makrogol glicerol hidroksistearat. U nastavku je razmotren uticaj ispitivanih formulacionih parametara na disperzibilnost pseudoternernih sistema sa aciklovirom u vodenim medijumima različitih pH, uzimajući u obzir činjenicu da je kod *per os* primene fomulacija izložena različitim vrednostima ovog parametra u različitim segmentima GIT-a. Od ukupno 60 ispitanih tečnih pseudoternernih sistema utvrđeno je da su tri ispunili kriterijume postavljene za SMEDDS u pogledu optičkih karakteristika (transmiranca > 50%) i prosečne veličine kapi ( $Z\text{-ave} \leq 100$  nm) i indeksa polidisperziteta ( $PdI \leq 0,250$ ) nakon dispergovanja u oba medijuma (0,1 M HCl i fosfatni pufer pH 7,2), a za dalja ispitavanja su odabrana dva sistema koji su imali maksimalni kapacitet za inkapsulaciju aciklovira koji je iznosio 24,06 mg/ml (SMEDDS1), odnosno, 21,12 mg/ml (SMEDDS3).

PAMPA testom kod SMEDDS1 i SMEDDS3 je utvrđeno značajno povećanje permeabilnosti aciklovira u poređenju sa čistom supstancom u baznom medijumu. Ukupna količina oslobođene lekovite supstance iz SMEDDS1 bila je značajno veća od SMEDDS3, iako je njen sadržaj u ova dva sistema bio veoma sličan, što je dovedeno u vezu sa razlikama u njihovom sastavu i hidrofobnim interakcijama između aktivne supstance i nosača.

Dva tečna SMEDDS koji su proistekli iz prve faze istraživanja, u drugom delu su korišćeni za formulaciju polučvrstih sistema upotrebom makrogola 8000 (5-10% *m/m*) kao sredstva za modifikaciju viskoziteta. Rezultati reološke karakterizacije pokazali su da je polučvrsta konzistencija i odgovarajuća tiksotropija postignuta u uzorku koji je pripremljen kombinovanjem SMEDDS1 i makrogola 8000 u koncentraciji od 7,5% *m/m*. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja disperzibilnost, kapaciteta za inkorporiranje i kinetike oslobađanja aciklovira, dokazano je da je ispitivani polučvrsti SMEDDS imao svojstva sistema koji formira ulje-u-vodi mikroemulziju dispergovanjem u kiselom (0,1 M HCl) i alkalnom (fosfatni pufer pH 7,2) vodenom medijumu, sa zadovoljavajućim kapacitetom za solubilizaciju aktivne supstance. Rezultati karakterizacije dobijenih disperzija spektroskopskim tehnikama dokazali su da su bile transparentni, termodinamički stabilni sistemi organizovani na nanoskali što su ključna svojstva sistema tipa mikroemulzija. Uticaj sadržaja aciklovira na optičke i termalne karakteristike polučvrstog SMEDDS je ispitan primenom optičke mikroskopije i DSC analizom. Mikrografije su pokazale prisustvo kristala aciklovira koji je bio suspendovan u homogenom polučvrstom vehukulumu. Analiza dobijenih DSC termograma ukazala je na formiranje svojevrsnog polimernog matriksa kombinovanjem makrogola 8000 i tečnih SMEDDS. Dobijeni rezultati *in vitro* ispitivanja kinetike difuzije aciklovira pokazali su da je mobilnost molekula lekovite supstance u polučvrstim SMEDDS bila relativno visoka i da je *in situ* formiran nosač tipa mikroemulzije omogućio kompletno rastvaranje/solubilizaciju aciklovira u medijumu (fosfatni pufer pH 7,2). Razmatranjem DSC termograma je utvrđen nizak rizik od interakcija omotača HPMC kapsula sa ispitanim polučvrstim SMEDDS i curenja sadržaja koji zadržava polučvrstu konzistenciju na temperaturama do 50 °C. Analiza profila dobijenih *in vitro* ispitivanjem kinetike oslobađanja aciklovira iz polučvrstih SMEDDS u obliku tvrdih kapsula je pokazala da su ovi sistemi, odnosno, *in situ* formirana ulje-u-vodi mikroemulzija u slabo alkalnom medijumu, značajno uticali na brzinu rastvaranja inkorporiranog aciklovira i mehanizam ovog procesa, u poređenju sa kapsulama sa čistom lekovitom supstancom koje su ispitivane na isti način. Polučvrsti SMEDDS je obezbedio održavanje aktivne supstance u rastvorenom/solubilizovanom stanju i kontrolisanu raspodelu aciklovira iz formirane mikroemulzije u medijum i pri koncentraciji aktivne supstance koja odgovara terapijskoj dozi od 200 mg. Brzina difuzije aciklovira se povećavala sa povećanjem njegovog sadržaja u polučvrstom SMEDDS. Razmotrena je stabilnost polučvrstih SMEDDS u obliku tvrdih kapsula tokom 3 meseca na 25 °C/60% RH, odnosno, 5±3 °C i dobijeni rezultati su pokazali da nije bilo značajnih promena u sadržaju lekovite supstance, prosečnoj veličini kapi i indeksu polidisperziteta nakon dispergovanja u vodenim medijumima, kao ni u profilima oslobađanja lekovite supstance, čime je potvrđeno da je ispitivani sistem u čvrstom farmaceutskom obliku imao očuvana svojstva SMEDDS.

U završnom delu prikazani su rezultati proučavanja farmakokinetičkog profila aciklovira kod *Wistar* pacova nakon oralne primene polučvrstog SMEDDS koji je formulisan i detaljno okarakterisan u prethodnoj fazi istraživanja. Rezultati su ukazali na značajan uticaj polučvrstih SMEDDS na biološku raspoloživost aciklovira, koja je bila 1,6 puta veća u poređenju sa čistom supstancom (primenjenom oralno u obliku suspenzije), što je povezano sa očekivanim relativno brzim procesom samo-mikroemulgovanja i oslobađanja lekovite supstance iz *in situ* formirane ulje-u-vodi mikroemulzije u intestinalnom lumenu pacova, kao i povećanjem permeabilnosti lekovite supstance kroz intestinalnu membranu posredovano nosačem tipa mikroemulzije i njegovim sastavnim komponentama. Takođe, upotreba polučvrstog SMEDDS dovela je do statistički značajnog smanjenja  $T_{max}$  u poređenju sa čistom supstancom. Dobijene vrednosti za Vd i Cl nisu bile statistički značajno različite od onih nakon *i.v.* primene aciklovira (u obliku rastvora), što je ukazalo na to da ispitivani polučvrsti SMEDDS nije bitno uticao na distribuciju aciklovira. Dodatno, prikazani su rezultati određivanja biohemijskih parametara (aktivnost jetrenih transaminaza, koncentracija mokraćne kiseline, uree i kreatinina) u uzorcima krvi životinja nakon oralne primene rastvora aciklovira, odnosno, polučvrstog SMEDDS, sa i bez aciklovira, na osnovu kojih je procenjena njihova neškodljivost. Pokazano je da ponovljena (21 dan) i kratkoročna (7 dana) primena polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom nije značajno uticala na bubrežnu funkciju izlučivanja i nije zabeležena hepatotoksičnost, čime je demonstrirana njihova neškodljivost na korišćenom animalnom modelu.

### **C) UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA PODACIMA IZ LITERATURE**

Do sada nije ustanovljen jedinstven pristup za brz skrining lipidnih formulacija u sistemima sastavljenim od ulja, surfaktanta i hidrofilnih korastvarača, te je u prvoj fazi istraživanja osmišljen i po prvi put primenjen eksperimentalni koncept za formulaciju i preciznu diferencijaciju SMEDDS od drugih tipova nosača sličnog sastava. Rezultati eksperimentalno određene rastvorljivosti aciklovira u većem broju ulja, surfaktanata i korastvarača korišćeni su pri izboru ekscipijenasa iz navedenih grupa, s obzirom da su dostupni literaturni podaci vrlo oskudni i nekonzistentni [1-3]. Maksimalna rastvorljivost aciklovira među ispitivanim uljima utvrđena je za trigliceride srednje dužine lanaca, što je bilo u saglasnosti sa rezultatom koji su objavili Ramadan i sar. [4]. Prema kriterijumima *sistema klasifikacije lipidnih formulacija* (engl. Lipid formulation classification system, LFCS) koji je ustanovljen 2006. godine, SMEDDS sadrže isključivo surfaktante čija je HLB > 12 [6], a potencijalni značaj kombinovanja surfaktanata značajno različitih HLB vrednosti u ovim sistemima do sada nije proučavan. S obzirom da je utvrđeno da je rastvorljivost aciklovira u ispitivanim surfaktantima različitih HLB vrednosti bila slična sa izabranim surfaktantima čija je HLB > 12 (PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi, polisorbit 20 ili makrogol glicerol hidroksistearat), kao kosurfaktant je odabran poligliceril-3-dioleat (HLB 3) kao nejonski tenzid niske HLB vrednosti, kojima se uobičajeno daje prednost u pogledu biokompatibilnosti u odnosu na tenzide visokih HLB vrednosti [5]. Kao sastojci iz grupe hidrofilnih korastvarača razmatrani su makrogol 400 i glicerol, a interesantno je da je za ove ekscipijense utvrđena slična rastvorljivost



aciklovira sa podacima dobijenim za rastvorljivost u surfaktantima. Karakterizacija pripremljenih 60 tečnih pseudoternernih sistema omogućila je detaljno i sistematično proučavanje uticaja formulacionih parametara na mehanizme procesa dispergovanja i kapacitet za inkapsulaciju aciklovira. Povećanje Km i sadržaja hidrofilnog korastvarača u pseudoternernim sistemima povećava rastvorljivost aciklovira, a vrednosti su bile najviše u sistemima sa makrogol glicerol hidroksistearatom i glicerolom. Dobijeni rezultati idu u prilog stavu određenog broja istraživača da rastvorljivost lekovite supstance u pojedinačnim ekscipijensima ne podrazumeva ekvivalentan kapacitet za njenu inkapsulaciju u samo-mikroemulgujućoj formulaciji i da je neophodna eksperimentalna procena rastvorljivosti u smešama ekscipijenasa [7]. Rezultati ispitivanja disperzibilnosti ukazali su na značajan uticaj vrste surfaktanta, Km i vrste i koncentracije korastvarača na termodinamičku stabilnost, veličinu kapi i polidisperzitet disperzija pripremljenih od pseudoternernih smeša. Karakteristike SMEDDS prema postavljenim kriterijumima utvrđene su kod 3 sistema sa makrogol glicerol hidroksistearatom i 20% glicerola pri Km 9 (SMEDDS1), 20% makrogola 400 pri Km 9 (SMEDDS2) i 30% glicerola pri Km 2,33 (SMEDDS3). Dobijeni rezultati pokazali su da se SMEDDS mogu formulirati kombinovanjem surfaktanata visokih i niskih HLB vrednosti u odgovarajućem masenom odnosu uz optimalnu koncentraciju odgovarajućeg hidrofilnog korastvarača. Ovaj rezultat predstavlja doprinos novom pristupu klasifikaciji SMEDDS i ostalih lipidnih formulacija, koji se primarno bazira na fizičko-hemijskim karakteristikama *in situ* formiranog disperznog sistema, a predložili su ga Williams i sar. [8]. Od skoro se ističe potreba za razvojem i primenom *in vitro* testova za procenu biofarmaceutskog profila još u početnoj fazi formulacije lipidnih formulacija [9], pa je u ovom radu kod SMEDDS sa maksimalnim kapacitetom za inkapsulaciju aciklovira (SMEDDS1 i SMEDDS3) razmotrena mogućnost primene modela difuzione ćelije za procenu brzine oslobađanja aktivne supstance iz nosača (što gotovo da nije primenjivano u ove svrhe) i PAMPA testa za ispitivanje permeabilnosti, koji je predložen za lekovite supstance koje permeiraju kroz biološke membrane pasivnom difuzijom [10]. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđene su značajne razlike u količini oslobođenog aciklovira iz ispitivanih SMEDDS. Permeabilnost čistog aciklovira je bila slična već objavljenim rezultatima Zhu i sar. [10], a dva ispitivana SMEDDS su pokazala međusobno sličnu, ali značajno veću permeabilnost u poređenju sa čistim aciklovirom.

Rezultati ispitivanja koja su sprovedena u drugom delu istraživanja ukazali su na mogućnost razvoja polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom, iz prethodno optimizovanog tečnog SMEDDS, i njihove primene kao čvrstog farmaceutskog oblika (tvrda kapsula) sa terapijskom dozom aktivne supstance. Za formulaciju polučvrstih SMEDDS je upotrebljen makrogol 8000, jer je već demonstrirano da povećava viskozitet tečnih lipofilnih podloga [11] i poboljšava rastvorljivosti lekovitih supstanci u čvrstim disperzijama [12, 13], ali ovaj farmaceutski ekscipijens, kao ni drugi čvrsti makrogoli ( $M_r > 1000$  g/mol), nisu do sada korišćeni kao sastojci SMEDDS. Reološka analiza je pokazala da je inkorporiranje makrogola 8000 u tečne SMEDDS dovelo do promene tipa proticanja iz Njutnovskog u pseudoplastično. DSC analizom je utvrđeno da formiranje polučvrstog sistema može biti povezano sa formiranjem matriksa od makrogola 8000 u tečnom SMEDDS, što je zapaženo i kod makrogola 4000 u ulje-u-vodi emulziji [14]. Na prividni viskozitet i tiksotropiju polučvrstog SMEDDS značajan uticaj imali su

koncentracija polimera i sadržaj glicerola, a odgovarajuće vrednosti ovih parametara za punjenje u kapsule bile su 7,5% makrogola 8000 i 20% glicerola. Poznato je da aciklovir ima nekoliko vrsta polimorfnih oblika i hidrata [15-17], a opisana je i njegova amorfizacija u polimernom matriksu nanočestica [18, 19]. Sa mikrografija i DSC termograma je zapaženo prisustvo kristala aciklovira suspendovanog u homogenom polučvrstom SMEDDS nosaču, pri čemu nosač snižava tačku topljenja aktivne supstance. Efekat snižavanja tačke topljenja je opisan i kod progesterona u polučvrstom samonanoemulgujućem nosaču [20]. Ispitivani polučvrsti SMEDDS je brzo formirao je ulje-u-vodi mikroemulziju u 0,1 M HCl i fosfatnom puferu pH 7,2 što je dokazano vrednostima transmitance većim od 98%, termodinamičkom stabilnošću pri izvođenju testa centrifugiranja, unimodalnom raspodelom veličine kapi u uskom rasponu veličina i prosečnom veličinom kapi (Z-ave) od  $26,04 \pm 1,73$  nm i  $25,10 \pm 0,99$  nm. Dobijeni rezultati povezani su sa progresivnom difuzijom vode u polučvrsti matriks i inhibicijom precipitacije čestica lekovite supstance zbog hidrofobnih interakcija ili vodoničnih veza između leka i hidrofilnog polimera, što je ranije opisano kod sistema na bazi hidrofilnih polimernih matriksa [21, 22]. Brzina difuzije aciklovira iz polučvrstog SMEDDS bila je značajno veća u poređenju sa čistom supstancom, i povećavala se povećanjem sadržaja aktivne supstance i njene mobilnosti, što je takođe uočeno i za vankomicin-hidrohlorid u matriksu na bazi makrogola [22]. Rezultati DSC analize ukazali su na zadovoljavajuću kompatibilnost ispitivanih polučvrstih SMEDDS sa omotačem HPMC kapsula, bez rizika od curenja sadržaja iz tvrdih kapsula na temperaturama koje su uobičajene za skladištenje i upotrebu farmaceutskih preparata. Polučvrsti SMEDDS bili su pogodni za inkorporiranje aciklovira u koncentraciji koja odgovara terapijskoj dozi aciklovira od 200 mg u obliku kapsula veličine 0, a koja je bila višestruko veća u odnosu na one koje su prethodno postigli drugi istraživači u tečnom SMEDDS [23] i mikroemulziji [24]. Profili *in vitro* oslobađanja aciklovira iz tvrdih kapsula sa polučvrstim SMEDDS značajno su se razlikovali u poređenju sa čistom supstancom u istom obliku, za koju je uočeno nepotpuno rastvaranje usled fizičkih interakcija sa omotačem kapsula, na koje su ukazali rezultati DSC analize. Suprotno tome profili oslobađanja iz polučvrstih SMEDDS povezani su sa prethodno dokazanom solubilizacijom lekovite supstance u koloidnom nosaču formiranom u vodenom medijumu, što je u literaturi jasno prepoznato kao preduslov za apsorpciju i smanjenje rizika od precipitacije ili interakcija lekovite u GIT-u [6, 9, 25, 26]. Masa, boja, fizički integritet kapsula sa polučvrstim SMEDDS, sadržaj i *in vitro* profili oslobađanja lekovite supstance, *in vitro* disperzibilnost u vodenim medijumima i prosečna veličina kapi ostali su nepromenjeni tokom celokupnog perioda ispitivanja (3 meseca) na  $25\text{ }^{\circ}\text{C}/60\%\text{RH}$ , odnosno, na  $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Time je dokazano da se formulacijom polučvrstih SMEDDS mogu prevazići problemi koji su opisani u literaturi u pogledu kompatibilnosti tečnih SMEDDS i omotača kapsula, ujednačenosti sadržaja lekovite supstance i curenja sadržaja iz kapsule [20, 27-29].

Rezultati koji su dobijeni i predstavljeni u okviru treće faze istraživanja ukazali su da aciklovir koji je primenjen kod pacova oralno u sastavu ispitivanog polučvrstog SMEDDS, ima 1,6 puta veću biološku raspoloživost u poređenju sa *per os* primenjenom suspenzijom lekovite supstance, odnosno na značajno povećanje obima i brzine apsorpcije aciklovira iz polučvrstog SMEDDS u poređenju sa čistom supstancom. U sličnoj studiji [23] postignuta je oko 3,5 puta veća biološka raspoloživost aciklovira iz

SMEDDS, kod pacova, međutim, za poređenje je korišćen rastvor lekovite supstance, pa slaba rastvorljivost i proces rastvaranja nisu bili kritični parametri za procenu apsorpcije. Ghosh i sar. [24] su utvrdili 12,78 puta veću biološku raspoloživost aciklovira iz mikroemulzije u poređenju sa tabletama, ali je  $T_{max}$  u ovoj studiji bilo oko 12 puta duže u poređenju sa polučvrstim SMEDDS sa aciklovirom razmatranim u ovoj disertaciji. Povećanje apsorpcije lekovite supstance upotrebom ispitivanog polučvrstog SMEDDS je povezano sa brзом solubilizacijom aciklovira u vodenoj sredini GIT-a i povećanjem permeabilnosti na mestu apsorpcije posredovano nosačem, odnosno ekscipijenasima (ulje i surfaktanati) za koje je dobro opisana uloga u inhibiciji efluksa aktivnih supstanci kroz intestinalnu membranu [30]. Intersantno je da su distribucija i eliminacija aciklovira iz polučvrstog SMEDDS bile slične kao nakon *i.v.* primene rastvora, a ovaj aspekt do sada nije razmatran. Aciklovir ispoljava svoju antivirusnu aktivnost kompetitivnom inhibicijom virusne DNK selektivnim vezivanjem za HSV-timidin kinazu sa 200 puta većim afinitetom nego za isti enzim kod sisara [31], čime se argumentuje njegova bezbedna primena kod čoveka. Rezultati kvantifikacije biohemijskih parametara u serumu pacova koji su povezani sa funkcijom jetre [32-34] i bubrega [35] ukazali su na neškodljivost SMEDDS nosača nakon ponovljene primene.

#### Literatura:

- [1] Dedakia J, Majumdar SH. Formulation and evaluation of microemulsion based tablets of acyclovir for better patient compliance. *Int J Pharm Technol Res* 2012;4:1730-1734.
- [2] Kumar B, Jain SK, Prajapati SK. Effect of penetration enhancer DMSO on in-vitro skin permeation of acyclovir transdermal microemulsion formulation. *Int J Drug Deliv* 2011;3:83-94.
- [3] Shishu, Rajan S, Kamalpreet. Development of novel microemulsion-based topical formulations of acyclovir for the treatment of cutaneous herpetic infections. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2009;10:559-565.
- [4] Ramadan E, Borg Th Abdelghani GM, Saleh NM. Formulation and evaluation of acyclovir microemulsions. *Bull Pharm Sci Assiut University* 2013;36:31-47.
- [5] Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Del Rev* 2000;45:89-121.
- [6] Pouton CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration-physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification systems. *Eur J Pharm Sci*. 2006;29:278-287.
- [7] Patel SV, Patel S. Prediction of the solubility in lipidic solvent mixture: Investigation of the modeling approach and thermodynamic analysis of solubility. *Eur J Pharm Sci* 2015;77:161-169.
- [8] Williams HD, Sassene P, Kleberg K, Calderone M, Igonin A, Jule E, Vertommen J, Blundell R, Benameur H, Müllertz A, Porter CJH, Pouton CW. Communicated on behalf of the, toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, Part 4: proposing a new lipid formulation performance classification system. *J Pharm Sci* 2014;103:2441-2455.
- [9] Feeney OM, Crum MF, McEvoy CL, Trevaskis NL, Williams HD, Pouton CW, Charman WN, Bergström CA, Porter CJH. 50 years of oral lipid-based formulations: Provenance, progress and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;101:167-194.

- [10] Zhu C, Jiang L, Chen TM, Hwang KK. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur J Med Chem* 2002;37:399-407.
- [11] Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th edition. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2009. pp. 517-522.
- [12] Kalepu S, Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B* 2015;5:442-453.
- [13] Law D, Schmitt EA, Marsh KC, Everitt EA, Wang W, Fort JJ, Krill SL, Qiu Y. Ritonavir-PEG 8000 amorphous solid dispersions: *In vitro* and *in vivo* evaluations. *J Pharm Sci* 2004;93:563-570.
- [14] Noda Y, Watanabe K, Sanagawa A, Sobajima Y, Fujii S. Physicochemical properties of macrogol ointment and emulsion ointment blend developed for regulation of water absorption. *Int J Pharm* 2011;419:131-136.
- [15] Birnbaum GI, Cygler M, Shugar D. Conformational features of acyclonucleosides: structure of acyclovir, an antiherpes agent. *Can J Chem* 1984;62:2646-2652.
- [16] Lutker KM, Quinones R, Xu J, Ramamoorthy A, Matzder AJ. Polymorphs and hydrates of acyclovir. *J Pharm Sci* 2011;100:949-963.
- [17] Yonemochi E, Terada K, Fujii K, Uekusa H. Polymorphic transformation behavior of acyclovir evaluated by crystal structure analysis. *Photon Factory Activity Report* 2013;31:253-259.
- [18] Gandhi S, Jana K, Sen K. In-vitro release of acyclovir loaded Eudragit RLPO<sup>®</sup> nanoparticles for sustained drug delivery. *Int J Biol Macromolec* 2014;67:478-482.
- [19] Madgulkar A, Bhalekar MR, Dikpati AA. Improving oral bioavailability of acyclovir using nanoparticulates of thiolated xyloglucan. *Int J Biol Macromol* 2016;89:689-699.
- [20] Hassan TH, Mäder K. Novel semisolid SNEDDS based on PEG-30-di-(polyhydroxystearate): Progesterone incorporation and in vitro digestion. *Int J Pharm* 2015;486:77-87.
- [21] Overhoff KA, McConville JT, Yang W, Johnston KP, Peters JJ, Williams RO 3rd. Effect of stabilizer on the maximum degree and extent of supersaturation and oral absorption of tacrolimus made by ultra-rapid freezing. *Pharm Res* 2008;25:167-175.
- [22] Baykara T, Yuksel N. The preparation of prolonged action formulations in the form of semi-solid matrix into hard gelatin capsules of oxyprenolol. Thermocapmethod. *Drug Dev Ind Pharm* 1991;17:1215-1227.
- [22] Lucas RA, Bowtle WJ, Ryden R. Disposition of vancomycin in healthy volunteers from oral solution and semi-solid matrix capsules. *J Clin Pharm Ther* 1987;12:27-31.
- [23] Patel D, Sawant KK. Oral bioavailability enhancement of acyclovir by self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS). *Drug Dev Ind Pharm* 2007;33:1318-1326.
- [24] Ghosh PK, Majithiya RJ, Umrethia ML, Murthy RSR. Design and development of microemulsion drug delivery system of acyclovir for improvement of oral bioavailability. *AAPS Pharm Sci Technol* 2006;7:172-177.
- [25] Đekić Lj, Primorac M. Formulation and Characterisation of self-microemulsifying drug delivery systems based on biocompatible nonionic surfactants. *Chemical Industry* 2014;68:565-573.
- [26] Porter CJH, Pouton CW, Cuine JF, Charman WN. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Adv Drug Del Rev* 2008;60:673-691.

- [27] Cole ET, Cadé D, Benameur H. Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:747-756.
- [28] Dokania S, Joshi AK. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) – challenges and road ahead. *Drug Deliv* 2015;22:675-690.
- [29] Hassan TH, Metz H, Mäder K. Novel semisolid SNEDDS based on PEG-30-dipolyhydroxystearate: Development and characterization. *Int J Pharm* 2014;477:506-518.
- [30] Shah I. Development and characterization of oil-in-water nanoemulsions from self-microemulsifying mixtures. Dissertation. The University of Toledo Digital Repository, 2011.
- [31] De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol* 2004;30:115-133.
- [32] Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 2005;172:367-379.
- [33] Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 2008;245:194-205.
- [34] Soares AA, De Sá-Nakanishi AB, Bracht A, Da Costa SMG, Koehnlein EA, De Souza CGM, Peralta RM. Hepatoprotective effects of mushrooms. *Molecules* 2013;18:7609-7630.
- [35] Eraslan F, Inal A, Savasturk O, Gunes A. Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Sci Hortic* 2007;114(1):5-10.

#### **D) OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

##### **Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja:**

- 1) **Janković Jovana**, Djekic Ljiljana, Dobričić Vladimir, Primorac Marija. Evaluation of critical formulation parameters in design and differentiation of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDSs) for oral delivery of aciclovir. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016;497(1-2):301-311. (IF 4,224) **(M21)**
- 2) Djekic Ljiljana, **Janković Jovana**, Čalija Bojan, Primorac Marija. Development of semisolid self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDSs) filled in hard capsules for oral delivery of aciclovir. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017;528:372-380. (IF 4,229) **(M21)**
- 3) Djekic Ljiljana, **Janković Jovana**, Rašković Aleksandar, Primorac Marija. Semisolid self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDSs): Effects on pharmacokinetics of acyclovir in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018;121:287-292. (IF 3,786) **(M21)**

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

1) Djekic L, **Jankovic J**, Primorac M. Type III lipid-based formulations for oral delivery of high-dosage drugs: design and in vitro evaluation. 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery; 2015 Apr 13-14; Reims, France (Abstract book)

2) **Jankovic J**, Djekic L, Primorac M. Type III lipid-based formulations design for oral delivery of acyclovir. 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery; 2015 Apr 13-14; Reims, France (Abstract book)

3) **Janković J**, Đekić Lj, Primorac M. Selfdispersing systems for oral administration of acyclovir: in vitro differentiation of a nanocarrier type. II Congress of pharmacists of Montenegro with the international participation, Pharmacy – science and practice guided by humanity. 2015 Maj 28-31; Bečići, Crna gora. (poster prezentacija na skupu)

4) **Jankovic J**, Djekic L, Primorac M. Selfmicroemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) with acyclovir: in vitro release profile. 4th Congress on Innovation in Drug Delivery. Site-Specific Drug Delivery. 2016 Sept 25-28; Antibes-Juan-les-Pins, France (P3)

5) **Jankovic J**, Djekic L, Primorac M. In vitro release profile of acyclovir from different formulations for oral administration. Proceedings of the 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology; 2016 April 4-7; Glasgow, United Kingdom (P102)

6) **Janković J**, Đekić Lj, Primorac M. Formulation and in vitro assessment of supersaturated self-microemulsifying drug delivery systems (S-SMEDDS) for oral delivery of acyclovir. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 2016 Sept 22-24; Belgrade, Serbia. Arhiv za farmaciju, 2016;66/Special Issue (PP29)

7) **Jankovic J**, Djekic L, Solomun L, Primorac M. Stability evaluation of HPMC capsules with aciclovir loaded semisolid selfmicroemulsifying drug delivery systems. 21st International Symposium on Microencapsulation, Faro, Portugal, September 27-29, 2017. pp. 52 (P16)

8) **Jankovic J**, Djekic L, Rašković A, Primorac M. Semisolid self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS): effects on pharmacokinetics of acyclovir in rats. 7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Balatonfured, Hungary, 5-7 October, 2017 (P1E-6)

9) Djekic L, **Jankovic J**, Solomun L, Stanić D, Primorac M. HPMC capsules as emerging solidification approach for self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS). 7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Balatonfured, Hungary, 5-7 October, 2017 (P1D-7)

## E) ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Predmet naučnog istraživanja doktorske disertacije bio je formulacija biokompatibilnih polučvrstih samomikroemulgujućih sistema (SMEDDS) i njihova fizičko-hemijska, farmaceutsko-tehnološka i biofarmaceutska karakterizacija kao potencijalnih nosača nove generacije za oralnu primenu antivirusika aciklovira u obliku tvrdih kapsula kao finalnog farmaceutskog oblika. Takođe je ispitivana neškodljivosti i uticaj polučvrstog SMEDDS na biološku raspoloživost aciklovira na modelu pacova.

Na osnovu rezultata ispitivanja rastvorljivosti aciklovira u individualnim ekscipijensima i pseudoternernim sistemima tipa ulje/sufaktant/kosurfaktant/korastvarač, kao i rezultata proučavanja disperzibilnosti pseudoternernih sistema u vodenim medijumima (0,1 M HCl i fosfatni pufer pH 7,2), formulisana su dva tečna SMEDDS sastava trigliceridi srednje dužine lanaca (10% *m/m*)/makrogolglicerol hidroksistearat/poligliceril-3-dioleat/glicerol sa maksimalnim kapacitetom za inkapsulaciju aciklovira od 24,06 mg/ml (sa 20% glicerola pri Km 9) (SMEDDS1) i 21,12 mg/ml (sa 30% glicerola pri Km 2,33) (SMEDDS3), koji u oba medijuma formiraju ulje-u-vodi mikroemulzije sa prosečnom veličinom kapi manjom od 100 nm i uskom raspodelom veličina ( $PdI \leq 0,250$ ).

Utvrđeno je da su dva ispitivana tečna SMEDDS omogućila značajno veću permeabilnost aciklovira u poređenju sa čistom supstancom u baznom medijumu *in vitro*. Pored toga, količina oslobođenog aciklovira iz SMEDDS1 bila je značajno veća u poređenju sa SMEDDS3, što je direktno povezano sa razlikama u sadržaju korastvarača i hidrofilnog surfaktanta.

Dokazano je da se iz tečnog SMEDDS, koji je prethodno optimiziran u pogledu permeabilnosti i kinetike oslobađanja aciklovira, može formulisati polučvrsti SMEDDS korišćenjem hidrofilnog polimera makrogola 8000. Na osnovu rezultata reološke analize utvrđeno je da je koncentracija polimera značajno uticala na prividni viskozitet i tiksotropiju polučvrstih SMEDDS, a vrednosti navedenih reoloških parametara koje su bile najprikladnije za punjenje u tvrde kapsule postignute su pri koncentraciji polimera od 7,5%. Rezultati DSC analize su dokazali da je formiranje polučvrstog sistema bilo zasnovano na stvaranju polimernog matriksa u tečnom SMEDDS. Dokazano je da je polučvrsti SMEDDS bio pogodan za stabilno inkorporiranje aciklovira u koncentraciji koja u količini formulacije koja se može puniti u tvrdu kapsulu veličine 0 odgovara terapijskoj dozi od 200 mg. Mikrografije polučvrstih SMEDDS sa različitim sadržajem aktivne supstance pokazale su prisustvo kristala aciklovira koji je bio suspendovan u homogenom polučvrstom nosaču.

Karakterizacija spektroskopskim tehnikama (UV-Vis, PCS) potvrdila je da su formulisani polučvrsti SMEDDS i pri niskim (2%) i pri visokim (33,33%) koncentracijama aciklovira omogućili brzo spontano dispergovanje i formiranje ulje-u-vodi mikroemulzije u kiselom i alkalnom medijumu (0,1 M HCl i fosfatni pufer pH 7,2) sa zadovoljavajućim kapacitetom za kompletnu solubilizaciju lekovite supstance.

Rezultati ispitivanja *in vitro* kinetike difuzije aciklovira iz polučvrstih SMEDDS ukazali su da je mobilnost molekula lekovite supstance u polučvrstom matriksu bila relativno visoka, a da je *in situ* formiran nosač tipa mikroemulzije omogućio izbegavanje rizika od njene precipitacije u akceptorskom medijumu.

Rezultati ispitivanja koja su sprovedena nakon 1, 2 i 3 meseca u cilju procene stabilnosti polučvrstih SMEDDS u obliku tvrdih kapsula koji su čuvani tokom 3 meseca na 25 °C/60%RH, odnosno, na  $5 \pm 3$  °C, dokazali su da nije bilo značajnih promena u sadržaju lekovite supstance, prosečnoj veličini kapi i njihovoj raspodeli nakon dispergovanja u vodenim medijumima u opsegu fizioloških pH, kao i profilu *in vitro* oslobađanja lekovite supstance. Takođe, rezultati DSC analize dokazali su da ne postoji rizik od curenja polučvrstih SMEDDS iz tvrdih kapsula na temperaturama koje su uobičajene za skladištenje i upotrebu farmaceutskih preparata.

Analizom profila *in vitro* ispitivanja kinetike oslobađanja aciklovira iz polučvrstih SMEDDS u obliku tvrdih kapsula utvrđen je značajan uticaj nosača na brzinu rastvaranja inkorporiranog aciklovira i mehanizam ovog procesa u poređenju sa čistom lekovitom supstancom koja je ispitivana u istom farmaceutskom obliku. Potvrđeno je da, nasuprot nepotpunom rastvaranju čvrste supstance oslobođene iz kapsule u medijum (fosfatni pufer pH 7,2), ispitivani polučvrsti SMEDDS po oslobađanju iz kapsule, podleže brzom dispergovanju u alkalnom medijumu i obezbeđuje efikasnu solubilizaciju aciklovira, kao i njegovo oslobađanje, pri čemu su ovi procesi preduslov za apsorpciju.

Na osnovu rezultata studije farmakokinetičkog profila aciklovira na modelu *Wistar* pacova utvrđeno je da je polučvrsti SMEDDS omogućio 1,6 puta veću oralnu biološku raspoloživost u poređenju sa čistom supstancom (primenjenom oralno kao suspenzija). Utvrđeno je povećanje obima i brzine apsorpcije aciklovira iz ispitivanog polučvrstog SMEDDS, dok mu se distribucija nije statistički značajno razlikovala u odnosu na *i.v.* primenjen rastvor. Time je dokazano da formulisani polučvrsti SMEDDS sa aciklovirom ima svojstva nove generacije SMEDDS nosača sa demonstriranim potencijalom za poboljšanje oralne biološke raspoloživosti aciklovira.

Na osnovu rezultata praćenja osnovnih biohemijskih parametara koji su povezani sa funkcijom jetre i bubrega u serumu životinja koje su tretirane polučvrstim SMEDDS sa aciklovirom tokom 7 dana i 21 dan, nije bilo promena koje bi ukazivale na oštećenje jetre i bubrega, čime je dokazana neškodljivost ovog nosača za peroralni put primene.

## **F) PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE**

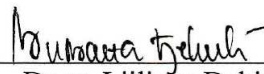
Uvidom u rezultate završene doktorske disertacije, može se konstatovati da je kandidat magistar farmacije Jovana Janković uspešno ostvarila postavljene ciljeve istraživanja, što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u tri rada u vrhunskim međunarodnim časopisima sa SCI liste (dva rada u časopisu *International Journal of Pharmaceutics* i jedan rad u časopisu *European Journal of Pharmaceutical Sciences*).



Članovi Komisije predlažu Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivnu ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Formulacija i karakterizacija polučvrstih samomikroemulgujućih sistema kao potencijalnih nosača nove generacije za peroralnu primenu aciklovira**” kandidata magistra farmacije Jovane Janković.

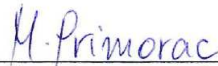
Beograd, 16.08.2019. godine

Članovi Komisije



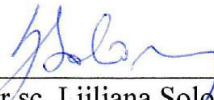
---

Dr sc. Ljiljana Đekić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor



---

Dr sc. Marija Primorac, redovni profesor u penziji  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor



---

Dr sc. Ljiljana Solomun, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, član



---

Dr sc. Aleksandar Rašković, redovni profesor  
Univerzitet u Novom Sadu – Medicinski fakultet, član