

UNIVERZITET U BEOGRADU

Tehnološko-metalurški fakultet

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

Predmet: Referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata Katarine Bukara.

Odlukom broj 533/1 od 01.06.2017. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije kandidata Katarine Bukara, magistra farmacije, pod naslovom

Sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem lekova zasnovani na mezoporoznoj silici i eritrocitnim membranama

(Controlled drug delivery systems based on mesoporous silica and erythrocyte membranes)

Posle pregleda dostavljene Disertacije i drugih pratećih materijala i razgovora sa Kandidatom, Komisija je sačinila sledeći

REFERAT

1. UVOD

1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

- **Školske 2011/12** godine kandidat Katarina Bukara, magistar farmacije je upisala Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, profil Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija.

- **13. 09. 2016.** Kandidat Katarina Bukara, magistar farmacije, predložila je temu doktorske disertacije pod nazivom: "Sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem lekova zasnovani na mezoporoznoj silici i eritrocitnim membranama" ("Controlled drug delivery systems based on mesoporous silica and erythrocyte membranes").

- **24. 11. 2016.** na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu doneta je odluka (br. 35/502) o imenovanovanju članove Komisije za ocenu podobnosti teme i kandidata Katarine Bukara, magistra farmacije za izradu doktorske disertacije i naučne zasnovanosti teme "Sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem lekova zasnovani na mezoporoznoj silici i eritrocitnim membranama" ("Controlled drug delivery systems based on mesoporous silica and erythrocyte membranes").

- **23. 02. 2017.** na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu doneta je odluka br. 35/28 o prihvatanju Referata Komisije za ocenu podobnosti teme i kandidata i odobravanju izrade doktorske disertacije Katarine Bukara, magistra farmacije, pod nazivom: "Sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem lekova zasnovani na mezoporoznoj silici i eritrocitnim membranama" ("Controlled drug delivery systems based on mesoporous silica and erythrocyte membranes") a za mentore ove doktorske disertacije imenovani su dr Branko Bugarski, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu i dr Filip Kiekens, redovni profesor Fakulteta farmaceutskih, biomedicinskih i veterinarskih nauka Univerziteta u Antverpenu.

- **27. 03. 2017.** na sednici Veća naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu data je saglasnost na predlog teme doktorske disertacije Katarine Bukara, magistra farmacije, pod nazivom "Sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem lekova zasnovani na mezoporoznoj silici i eritrocitnim membranama" ("Controlled drug delivery systems based on mesoporous silica and erythrocyte membranes").

- **01. 06. 2017.** na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu doneta je odluka br. 533/1 o imenovanju članova Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Katarine Bukara, magistra farmacije, pod nazivom "Sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem lekova zasnovani na mezoporoznoj silici i eritrocitnim membranama" ("Controlled drug delivery systems based on mesoporous silica and erythrocyte membranes").

1.2. Naučna oblast disertacije

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pripadaju naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo, uža naučna oblast biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, za koju je matičan Tehnološko-metalurški fakultet, Univerziteta u Beogradu. Za mentore ove doktorske disertacije imenovani su dr Branko Bugarski, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu

i dr Filip Kiekens, redovni profesor Fakulteta farmaceutskih, biomedicinskih i veterinarskih nauka Univerziteta u Antverpenu, koji su na osnovu dosadašnjih objavljenih radova i iskustava kompetentni da rukovode izradom ove doktorske disertacije.

1.2. Biografski podaci o kandidatu

Kandidat **Katarina Bukara**, magistar farmacije, je rođena 23. 02. 1987. godine u Kraljevu, Srbija. Osnovnu školu "Sveti Sava" u Kraljevu završila je 2002. godine kao nosilac Vukove diplome, nakon čega je upisala Medicinsku školu u Kraljevu gde je maturirala 2006. godine, takođe kao nosilac Vukove diplome. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2006/2007, na kom je diplomirala 2011. godine sa prosečnom ocenom 9.34. Školske 2011/2012. godine upisala je doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu na smeru Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija, pod rukovodstvom dr Branka Bugarskog, redovnog profesora. Na doktorskim studijama je uspešno položila sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00; a završni ispit pod naslovom „Mogućnost korišćenja membrana eritrocita iz otpadne klanične krvi kao nosača biološki aktivnih molekula – primer deksametazona“ je odbranila sa ocenom 10.

Od 2011. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na projektu 'Razvoj novih inkapsulacionih enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti' pod rukovodstvom dr Branka Bugarskog, redovnog profesora. Tokom ovog perioda Katarina Bukara učestvovala je aktivno u saradnji sa Institutom za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu i Institutom za fiziku, Univerziteta u Beogradu. Školsku 2015/2016 godinu provela je na studentskoj razmeni na Fakultetu farmaceutskih, biomedicinskih i veterinarskih nauka Univerziteta u Antverpenu, Belgija, kao stipendista Evropske komisije za oblast farmaceutске tehnologije. Od 2016. godine učestvuje u projektima farmaceutске kompanije Johnson & Johnson u Belgiji, u departmanu za istraživanje i razvoj parenteralnih i tečnih farmaceutskih oblika.

2. OPIS DISERTACIJE

2.1. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija kandidata Katarine Bukara, magistra farmacije, pisana je na engleskom jeziku i sadrži 128 strana A4 formata, 20 slika, 11 tabela i 197 literaturnih navoda. Doktorska disertacija sadrži sledeća poglavlja: Rezime (na engleskom i srpskom jeziku), Uvod, Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultate i diskusiju, Zaključak, Literaturu, Biografiju i Priloge. Prilozi

sadrže izjavu o autorstvu, izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije i izjavu o korišćenju. Po svojoj formi i sadržaju, podneti rad zadovoljava sve standarde Univerziteta u Beogradu za doktorsku disertaciju.

2.2. Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U uvodnom delu prikazan je predmet, sadržaj i cilj doktorske disertacije. Predmet rada ove doktorske disertacije obuhvata razvoj dva sistema sa kontrolisanim otpuštanjem lekova zasnovanih na mezoporoznoj silici i eritrocitnim membranama. U okviru Teorijskog dela disertacije prikazan je literaturni pregled predmetne oblasti. Data je definicija i kratak istorijski razvoj sistema sa kontrolisanim otpuštanjem lekova. U prvom delu poglavlja opisana je problematika formulisanja slabo rastvornih lekova na primeru visokolipofilnog leka fenofibrata koji se koristi da normalizuje nivo lipoproteina niske gustine i holesterola u krvi kod pacijenata sa hiperholesterolemijom i hipertrigliceridemijom. Dalje su predstavljena dostignuća u sintezi i primeni mezoporozne silike kao nosača slabo rastvornih lekova. U drugom delu poglavlja istaknuta su neželjena dejstva lekova kao prepreka u njihovom razvoju i primeni a kao primer uzet je natrijum diklofenak. Detaljno su dalje opisane eritrocitne membrane kao sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem lekova i kao moguće rešenje ovog problema.

U Eksperimentalnom delu disertacije opisani su materijali i metode prema redosledu eksperimentalnog istraživačkog rada. Prvi deo eksperimentalnog dela obuhvata razvoj uređene mezoporozne silike. Punjenje mezoporozne silike fenofibratom izvedeno je u automatskom granulatoru metodom vlažne impregnacije incipijenta dok sadržaj leka ne dostigne 29%. Fenofibrat je finalno formulisan kao kapsula i ispitivan u pretkliničkoj i kliničkoj studiji. Dve vrste kapsula sa različitim sadržajem fenofibrata (33.5 i 16.75 mg) su poređene sa dva referentna sistema Lipanthyl®(fenofibrat mikrokristali) i Tricor®(fenofibrat nanokristali) u smislu *in vitro* oslobađanja i systemske izloženosti fenofibratu i njegovom metabolitu nakon oralne primene kod Bigl pasa. Studije stabilnosti su obuhvatile procenu *in vitro* oslobađanja i odsustva kristalizacije metodom deferencijalne skenirajuće kalorimetrije nakon jednog, dva i šest meseci čuvanja na 25 °C/60% relativne vlažnosti i na 40 °C/75% relativne vlažnosti. Sa ciljem da se ispita potencijal uređene mezoporozne silike da poboljša bioraspoloživost fenofibrata kod ljudi, sprovedena je otvorena, randomizovana, kros-over klinička studija. Dvanaest zdravih volontera je primilo pojedinačnu dozu fenofibrata formulisanog sa mezoporoznom silikom a tretman je poređen sa komercijalnim preparatom Tricor® (fenofibrat nanokristali). Plazma koncentracije fenofibrinske kiseline, farmakološki aktivnog metabolita fenofibrata, praćene su do 96 sati nakon doziranja. Step en i obim apsorpcije fenofibrata procenjen je na osnovu farmakokinetički parametara.

Drugi deo eksperimentalnog dela obuhvata razvoj sistema sa kontrolisanim otpuštanjem natrijum diklofenaka zasnovanog na eritrocitnim membranama. Inkapsulacija amfifilnog jedinjenja natrijum diklofenaka u eritrocitne duhove poreklom iz svinjske otpadne klanične krvi i prestarele humane krvi izvedena je procesom gradualne hipotonične hemolize. Polazni eritrociti, prazni eritrocitni duhovi i duhovi u koje je inkapsuliran natrijum diklofenak su poređeni u smislu

efikasnosti inkapsulacije, profila oslobađanja leka, raspodele veličine, površinskog naelektrisanja, provodljivosti, površinske hrapavosti i morfologije.

Priroda hemijske interakcije između leka i membrane ispitana je primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom. Efikasnost inkapsulacije i profil oslobađanja natrijum diklofenaka će su utvrđeni metodom tečne hromatografije ultravisokih performansi kuplovane sa masenim spektrometrom. Efekat natrijum diklofenaka na hemolizu i efluks kalijuma utvrđen je cijanomethemoglobinskom metodom i jon selektivnom elektrodom, respektivno. Površinsko naelektrisanje i provodljivost eritrocita, praznih duhova i inkapsuliranih duhova su utvrđeni primenom zetasajzera. Raspodela veličine eritrocita, praznih duhova i inkapsuliranih duhova ispitana je primenom metode zasnovane na dinamičnom rasipanju svetlosti. Hrapavost površine praznih duhova i duhova sa lekom je određena primenom mikroskopije atomskih sila. Ova tehnika će otkriti i morfološke promene eritrocita prouzrokovane gradualnom hipotoničnom hemolizom i procesom inkapsulacije. Stepenn prečišćenosti praznih duhova koji se postiže primenjenim procesom proizvodnje je procenjen dvofotonskom mikroskopijom zasnovanom na autofluorescenciji hemoglobina.

U okviru poglavlja Rezultati i diskusija izdvojene su dve celine: 1) Sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem zasnovani na mezoporoznoj silici i 2) Sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem zasnovani na eritrocitnim membranama. U prvom delu ispitivane su *in vitro* i *in vivo* performanse uređene mezoporozne silike kao nosača za slabo rastvorni lek fenofibrat. Mezoporozna silika je punjena fenofibratom metodom vlažne impregnacije incipijenta dok sadržaj leka ne dostigne 29%, a potom finalno formulisana kao kapsula. Dve vrste kapsula (koje sadrže 33.5 mg i 16.75 mg fenofibrata) poređene su sa komercijalno dostupnim oblicima - Lipantil® (fenofibrat mikrokristali) i Trikor® (fenofibrat nanokristali). *In vitro* testovi rastvorljivosti pokazali su da je količina fenofibrata oslobođenog iz Lipantila® i Trikora® aproksimativno iznosila 30% dok je oko 66 i 60% leka oslobođeno iz kapsula sa mezoporoznom silikom koje su sadržale 33.5 i 16.75 mg fenofibrata, respektivno. *In vivo* studija na psima potvrdila je zadovoljavajući nivo bezbednosti i tolerantnosti formulacija sa mezoporoznom silikom i fenofibratom (33.5 mg) kao i potencijal za poboljšanje apsorpcije fenofibrata. Uprkos varijabilnosti dobijenih podataka, ova formulacija je bila obećavajuća za buduća klinička ispitivanja. Sledstvena klinička studija izvedena je sa ciljem da se proceni potencijal uređene mezoporozne silike da poboljša bioraspoloživost fenofibrata kod čoveka. U ovoj otvorenoj, randomizovanoj, dvostruko ukrštenoj studiji, 12 zdravih volontera je primilo pojedinačnu dozu fenofibrata formulisanog sa uređenom mezoporoznom silikom kao i komercijalni proizvod baziran na mikroniziranom fenofibratu. Plazma koncentracije fenofibrinske kiseline, farmakološki aktivnog metabolita fenofibrata bile su praćene 96 sati nakon uzete doze. Stepenn (odnos $C_{max}/doza$ bio je povećan 77%, a t_{max} redukovano za 0,75 h) i obim apsorpcije (PIK_{0-24h} je bila uvećana za 54%) fenofibrata su bili značajno povećani nakon administracije formulacije zasnovane na uređenoj mezoporoznoj silici.

U drugom delu studije razvijen je sistem sa kontrolisanim otpuštanjem za amfilni lek natrijum diklofenak uz razmatranje razlika između eritrocita izolovanih iz dva lako dostupna materijala – svinjske otpadne klanične i prestarele humane krvi. Polazni eritrociti, prazni eritrocitni duhovi kao

i inkapsulirani duhovi bili su poređeni u smislu efikasnosti inkapsulacije, profila oslobađanja leka, raspodele veličine, površinskog naelektrisanja, provodljivosti, hrapavosti površine i morfologije. Inkapsulacija natrijum diklofena izvedena je procesom zasnovanim na osmozi – gradualnom hemolizom. Tokom ovog procesa natrijum diklofenak ispoljio je blag i odložen antihemolitički efekat kao i povećan efluks kalijuma kod svinjskih ali ne i kod prestarelih humanih eritrocita. FTIR spektri su otkrili odsustvo narušavanja strukture membranskih lipida kao i hemijske reakcije između natrijum diklofena i inkapsuliranih duhova. Lokalizacija rezidualnog hemoglobina u suspenziji eritrocitinih duhova i njegova prostorna distribucija određeni su primenom dvofotonske fluorescentne mikroskopije. Prestareli humani eritrocitni duhovi sa detektovanim oštećenjima na površini i smanjenom sposobnošću da se skupljaju imali su efikasnost inkapsulacije od samo 8%. Sa druge strane, svinjski eritrocitni duhovi su imali efikasnost inkapsulacije od 37% i relativno nisku brzinu oslobađanja leka. Viši stepen očuvanosti strukture i funkcije svinjskih eritrocita posmatran kroz superiornije performanse inkapsulacije i oslobađanja leka, definiše ih kao pogodniji materijal za inkapsulaciju natrijum diklofena.

U Zaključku su taksativno prikazani najvažniji zaključci izvedeni na osnovu ispitivanja izloženih u prethodnim poglavljima. Nakon zaključka navedene su reference korišćene tokom izrade doktorske disertacije.

3. OCENA DISERTACIJE

3.1. Savremenost i originalnost

Obzirom da slaba rastvorljivost lekova kao i učestala neželjena dejstva predstavljaju glavne probleme u njihovom razvoju, pojavljuje se potreba za sistemima sa kontrolisanim otpuštanjem koji omogućavaju bolju kontrolu nivoa leka u plazmi, manju frekvencu doziranja, manje neželjenih efekata, povećanu efikasnost i konstantno oslobađanje. Kao model supstance odabrana su dva leka (diklofen i fenofibrat) koji su zbog svoje efikasnosti lekovi prvog izbora u patološkim stanjima za koja su indikovani, pa su stoga u širokoj upotrebi.

Fenofibrat je visokolipofilni lek koji se koristi da normalizuje nivo lipoproteina niske gustine i holesterola u krvi kod pacijenata sa hiperholesterolemijom i hipertrigliceridemijom. Kao tipičan predstavnik jedinjenja klase 2 Biofarmaceutskog klasifikacionog sistema ($\log p = 5.24$), praktično je nerastvoran u vodi i fiziološkim tečnostima. Njegova nedovoljna apsorcija iz vodene sredine gastrointestinalnog trakta ima za posledicu veoma niske koncentracije leka u sistemskoj cirkulaciji nakon oralne primene. Stoga, biološka raspoloživost fenofibrata može biti povećana povećanjem rastvorljivosti. Iako je poslednjih godina upotrebljeno nekoliko konvencionalnih tehnika kao što su mikro- i nanonizacija, lipozomi, razni polimerni nanočestični sistemi i formulacije zasnovane na lipidima da se poveća biološka raspoloživost fenofibrata, broj ovih proizvoda na tržištu je ostao veoma ograničen.

Uređena mezoporozna silika sa porama veličine 4 do 10 nm, velikim specifičnim volumenom pora (oko $1 \text{ cm}^3/\text{g}$) i velikom površinom (oko $1000 \text{ m}^2/\text{g}$) omogućava dobro punjenje lekom i povećanje njegove rastvorljivosti. Princip povećanja rastvorljivosti zasnovan je na adsorpciji leka za površinu nosača do molekuskog nivoa. Obzirom da je preraspodela leka po površini mezoporozne silike povezana sa supresijom kristalizacije adsorbovanih molekula, ovaj nosač je odličan stabilizator za amorfne aktivne supstance. Kada se izlože vodi, adsorbovani molekuli leka su u kompeticiji za hidrofilnu površinu silike i bivaju oslobođeni iz pora. Posledično, u ovom rastvorenom stanju oni postaju dostupni za apsorpciju u gastrointestinalnom traktu.

Natrijum diklofenak je moćan nesteroidni antiinflamatorni lek sa analgetskim i antipiretskim efektima. Međutim, zbog njegove fizičko-hemijske aktivnosti na želudačnoj sluzokoži i inflamatornog efekta na tankom i debelom crevu, smatra se faktorom rizika za relativno visoku incidencu gastrointestinalnih neželjenih efekata. Zbog pomenutih neželjenih efekata i kratkog poluvremena eliminacije, natrijum diklofenak je idealan kandidat za sisteme sa kontrolisanim otpuštanjem sa ciljem da se održi terapijska aktivnost, redukuju toksični efekti i poboljša komplijansa pacijenata.

Inkapsulacija lekova u eritrocite i eritrocitne membrane je jedan od najobećavajućih terapijskih alternativnih pristupa u administraciji toksičnih i lekova sa kratkim poluvremenom eliminacije. Tokom procesa postepenog smanjenja jonske jačine rastvora koji okružuje eritrocite, eritrociti bubre i hemoglobin izlazi u spoljašnju sredinu ostavljajući intaktne eritrocitne membrane. Za vreme hipotonične hemolize na eritrocitnim membranama se pojavljuju otvori veličine 20-50 nm koji omogućavaju da se lek iz ekstracelularne sredine inkapsulira kroz ove pore.

Mnogi hemijski sintetisani i prirodni nosači kao što su fosfolipidni lipozomi, natrijum alginatne čestice, PLGA nanočestice, silika-hitozan kompoziti, čvrste lipidne nanočestice itd. su korišćeni za dizajniranje sistema sa kontrolisanim otpuštanjem za natrijum diklofenak. Međutim, hemija površine pomenutih nosača suštinski se razlikuje od hemije ćelijske membrane. Studije sprovedene na lipozomima su pokazale da se natrijum diklofenak zbog svoje površinske aktivnosti može inkorporirati u membrane narušavajući lipidni sastav što za posledicu ima solubilizaciju strukture. S druge strane, eritrocitna membrana koja je mnogo složenija nego lipozomalna i takođe interaguje sa natrijum diklofenakom ali bez disrupcije, mogla bi biti prirodna alternativa pružajući potencijalne prednosti u odnosu na lipozome.

3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U doktorskoj disertaciji je citirano 197 literaturnih navoda koja se odnose na istraživanja vezana za sisteme sa kontrolisanim otpuštanjem lekova zasnovanim na mezoporoznoj silici i eritrocitnim membranama. Literaturni pregled je obuhvatio veliki broj publikovanih naučnih radova iz oblasti: sinteze mezoporozne silike, njenih fizičko-hemijskih svojstava, tehnika punjenja mezoporozne silike slabim rastvornim lekovima, tehnika za dobijanje eritrocitnih duhova, metoda karakterizacije

i inkapsulacije lekova u njih. U okviru disertacije dat je potpun kritički literaturni pregled po pojedinim poglavljima fenomena koji su istraživani kao i poređenja dobijenih rezultata sa slično publikovanim rezultatima.

3.3. Opis i adekvatnost primenjenih naučnih metoda

U istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije korišćene su savremene tehnike karakterizacije materijala u svim fazama eksperimentalnih istraživanja.

Punjenje mezoporozne silike fenofibratom izvedeno je u automatskom granulatoru metodom vlažne impregnacije incipijenta dok sadržaj leka ne dostigne 29%. Fenofibrat je finalno formulisan kao kapsula i ispitivan u pretkliničkoj i kliničkoj studiji.

Korak 1: Dve vrste kapsula sa različitim sadržajem fenofibrata (33.5 i 16.75 mg) su poređene sa dva referentna sistema Lipanthyl®(fenofibrat mikrokristali) i Tricor®(fenofibrat nanokristali) u smislu *in vitro* oslobađanja i sistemske izloženosti fenofibratu i njegovom metabolitu nakon oralne primene kod Bigl pasa. Farmakokinetički parametri koji su bili procenjivani nakon pojedinačne doze kod četiri životinje su:

- C_{max} -maksimalna koncentracija detektovana u plazmi
- C_{last} -poslednja merljiva koncentracija u plazmi
- t_{max} -vremenska tačka u kojoj je dostignut maksimum koncentracije
- t_{last} -vremenska tačka poslednje merljive koncentracije
- AUC_{last} -površina ispod krive plazma koncentracija-vreme od momenta uzimanja leka pa do poslednje merljive koncentracije, računata metodom trapezoida (za lek i njegov metabolit)
- AUC_{∞} - površina ispod krive plazma koncentracija-vreme od momenta uzimanja leka pa do beskonačnosti, računata kao $AUC_{last} + C_{last}/\lambda_z$, gde je C_{last} poslednja merljiva koncentracija
- λ_z -konstanta eliminacije, određena linearnom regresijom terminalnih tačaka na lineranoj koncentracija-vreme krivoj
- $t_{1/2}$ -poluvreme eliminacije, računato kao $\ln(2)/\lambda_z$.

Studije stabilnosti su obuhvatile procenu *in vitro* oslobađanja i odsustva kristalizacije metodom deferencijalne skenirajuće kalorimetrije nakon jednog, dva i šest meseci čuvanja na 25 °C/60% relativne vlažnosti i na 40 °C/75% relativne vlažnosti.

Korak 2: Sa ciljem da se ispita potencijal uređene mezoporozne silike da poboljša bioraspodivnost fenofibrata kod ljudi, sprovedena je otvorena, randomizovana, kros-over klinička studija. Dvanaest zdravih volontera je primilo pojedinačnu dozu fenofibrata formulisanog sa mezoporoznom silikom a tretman je poređen sa komercijalnim preparatom

Tricor® (fenofibrat nanokristali). Plazma koncentracije fenofibrinske kiseline, farmakološki aktivnog metabolita fenofibrata, praćene su do 96 sati nakon doziranja. Da bi se utvrdio stepen i obim apsorpcije fenofibrata procenjivani su isti farmakokinetički parametri kao u gore nevedenoj prekliničkoj studiji.

Inkapsulacija amfifilnog jedinjenja natrijum diklofenaka u eritrocitne duhove poreklom iz svinjske otpadne klanične krvi i prestarele humane izvedena je procesom gradualne hipotonične hemolize. Polazni eritrociti, prazni eritrocitni duhovi i duhovi u koje je inkapsuliran natrijum diklofenak su poređeni u smislu efikasnosti inkapsulacije, profila oslobađanja leka, raspodele veličine, površinskog naelektrisanja, provodljivosti, površinske hrapavosti i morfologije.

- Priroda hemijske interakcije između leka i membrane ispitana je primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom.
- Efikasnost inkapsulacije i profil oslobađanja natrijum diklofenaka su utvrđeni metodom tečne hromatografije ultravisokih performansi kuplovane sa masenim spektrometrom.
- Efekat natrijum diklofenaka na hemolizu i efluks kalijuma utvrđen je cijanomethemoglobinskom metodom i jon selektivnom elektrodom, respektivno.
- Površinsko naelektrisanje i provodljivost eritrocita, praznih duhova i inkapsuliranih duhova utvrđena je primenom zetasajzera.
- Raspodela veličine eritrocita, praznih duhova i inkapsuliranih duhova ispitana je primenom metode zasnovane na dinamičnom rasipanju svetlosti.
- Hrapavost površine praznih duhova i duhova sa lekom određena je primenom mikroskopije atomskih sila. Ova tehnika je otkrila i morfološke promene eritrocita prouzrokovane gradualnom hipotoničnom hemolizom i procesom inkapsulacije.
- Stepem prečišćenosti praznih duhova koji se postiže primenjenim procesom proizvodnje je procenjen dvofotonskom mikroskopijom zasnovanom na autofluorescenciji hemoglobina.

3.4. Primenljivost ostvarenih rezultata

Rezultati ove disertacije predstavljaju značajan doprinos u oblasti sistema sa kontrolisanim otpuštanjem lekova. Razvijen je proces punjenja mezoporozne silike slabo rastvornim lekom – fenofibratom. Detaljno je opisana farmakokinetika kroz relevantne farmakokinetičke parametere. Efikasnost i bezbednost ovog sistema potvrđeni su u prekliničkoj i kliničkoj studiji.

U drugom delu ove disertacije razvijen je postupak inkapsulacije natrijum diklofenaka u eritrocitne membrane. Dat je detaljan uvid u fizičko-hemijska svojstva ovog sistema sa kontrolisanim otpuštanjem. Njegova efikasnost utvrđena in vitro otvara put za dalja in vivo istraživanja.

3.5. Ocena dostignutih sposobnosti kandidata za samostalni naučni rad

U toku izrade doktorske disertacije, kandidat je potpuno osposobljen da samostalno i kritički napravi literaturni pregled, pripremi i realizuje eksperimente, kao i da analizira dobijene rezultate. Tokom izrade doktorske disertacije ovladao je brojnim tehnikama koje se koriste u razvoju i karakterizaciji sistema sa kontrolisanim otpuštanjem lekova. Kandidat poseduje sve kvalitete neophodne za naučno-istraživački rad i samostalnu prezentaciju dobijenih rezultata.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

Naučni doprinos rezultata istraživanja ostvarenih u okviru ove doktorske disertacije je sledeći:

- Povećana je rastvorljivosti fenofibrata u vodi i posledično poboljšana biološka raspoloživost kod životinja i ljudi korišćenjem mezoporozne silike kao nosača.
- Ostvaren je uvid u farmakokinetički profil fenofibrata i njegovog farmakološki aktivnog metabolita fenofibrinske kiseline nakon oralne administracije formulacije sa mezoporoznom silikom.
- Razvijena formulacija bi mogla naći primenu u terapiji hiperholesterolemije i hipetrigliceridemije.
- Razvijen je proces inkapsulacije natrijum diklofenaka u eritrocitne membrane zasnovan na gradualnoj hipotoničnoj hemolizi.
- Ostvaren je uvid u fizičko-hemijske karakteristike inkapsuliranih membrana.
- Razvijen sistem sa kontrolisanim otpuštanjem bi uz dalja usavšavanja mogao da doprinese smanjenju neželjenih efekata natrijum diklofena s jedne strane, a s druge strane bi se rešio problem skladištenja otpadne klanične i prestarele humane krvi koje se generano smatraju otpadom.

4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Glavni cilj ovog rada je razvoj dva sistema sa kontrolisanim otpuštanjem lekova zasnovanih na uređenoj mezoporoznoj silici i eritrocitnim membranama (u daljem tekstu duhovima) za dva leka u širokoj upotrebi: fenofibrat i natrijum diklofenak.

U prvom delu ove studije ispitivane su *in vitro* i *in vivo* performase uređene mezoporozne silike kao nosača za slabo rastvorni lek fenofibrat. Mezoporozna silika je punjena fenofibratom metodom vlažne impregnacije incipijenta dok sadržaj leka ne dostigne 29%, a potom finalno formulisana kao kapsula. Dve vrste kapsula (koje sadrže 33.5 mg i 16.75 mg fenofibrata) poređene su sa komercijalno dostupnim oblicima - Lipantil® (fenofibrat mikrokristali) i Trikor® (fenofibrat

nanokristali). *In vitro* testovi rastvorljivosti pokazali su da je količina fenofibrata oslobođenog iz Lipantila® i Trikora® aproksimativno iznosila 30% dok je oko 66 i 60% leka oslobođeno iz kapsula sa mezoporoznom silikom koje su sadržale 33.5 i 16.75 mg fenofibrata, respektivno. *In vivo* studija na psima potvrdila je zadovoljavajući nivo bezbednosti i tolerantnosti formulacija sa mezoporoznom silikom i fenofibratom (33.5 mg) kao i potencijal za poboljšanje apsorpcije fenofibrata. Uprkos variabilnosti dobijenih podataka, ova formulacija je bila obećavajuća za buduća klinička ispitivanja. Sledstvena klinička studija izvedena je sa ciljem da se proceni potencijal uređene mezoporozne silike da poboljša bioraspoloživost fenofibrata kod čoveka. U ovoj otvorenoj, randomizovanoj, dvostruko ukrštenoj studiji, 12 zdravih volontera je primilo pojedinačnu dozu fenofibrata formulisanog sa uređenom mezoporoznom silikom kao i komercijalni proizvod baziran na mikroniziranom fenofibratu. Plazma koncentracije fenofibrinske kiseline, farmakološki aktivnog metabolita fenofibrata bile su praćene 96 sati nakon uzete doze. Step (odnos C_{max} /doza bio je povećan 77%, a t_{max} redukovano za 0,75 h) i obim apsorpcije (PIK_{0-24h}) je bila uvećana za 54%) fenofibrata su bili značajno povećani nakon administracije formulacije zasnovane na uređenoj mezoporoznoj silici.

U drugom delu studije razvijen je sistem sa kontrolisanim otpuštanjem za amfilni lek natrijum diklofenak uz razmatranje razlika između eritrocita izolovanih iz dva lako dostupna materijala – svinjske otpadne klanične i prestarele humane krvi. Polazni eritrociti, prazni eritrocitni duhovi kao i inkapsulirani duhovi bili su poređeni u smislu efikasnosti inkapsulacije, profila oslobađanja leka, raspodele veličine, površinskog naelektrisanja, provodljivosti, hrapavosti površine i morfologije. Inkapsulacija natrijum diklofena izvedena je procesom zasnovanim na osmozi – gradualnom hemolizom. Tokom ovog procesa natrijum diklofenak ispoljio je blag i odložen antihemolitički efekat kao i povećan efluks kalijuma kod svinjskih ali ne i kod prestarelih humanih eritrocita. FTIR spektri su otkrili odsustvo narušavanja strukture membranskih lipida kao i hemijske reakcije između natrijum diklofena i inkapsuliranih duhova. Lokalizacija rezidualnog hemoglobina u suspenziji eritrocitnih duhova i njegova prostorna distribucija određeni su primenom dvofotonske fluorescentne mikroskopije. Prestareli humani eritrocitni duhovi sa detektovanim oštećenjima na površini i smanjenom sposobnošću da se skupljaju imali su efikasnost inkapsulacije od samo 8%. Sa druge strane, svinjski eritrocitni duhovi su imali efikasnost inkapsulacije od 37% i relativno nisku brzinu oslobađanja leka. Viši stepen očuvanosti strukture i funkcije svinjskih eritrocita posmatran kroz superiornije performanse inkapsulacije i oslobađanja leka, definiše ih kao pogodniji materijal za inkapsulaciju natrijum diklofena.

Ovo kvalitetno i detaljno izvedeno istraživanje otvorilo je nove pravce za dalja istraživanja u smislu dizajniranja novih sistema sa kontrolisanim otpuštanjem slabo rastvornih lekova kao i lekova sa ozbiljnim neželjenim dejstvima.

4.3. Verifikacija naučnih doprinosa

Spisak radova koji su rezultat istraživanja u okviru doktorske disertacije:

Kategorija M21:

1. **Bukara K.**, Jovanić S., Drvenica I., Stančić A., Ilić V., Rabasović M., Pantelić D., Jelenković B., Bugarski B., Krmpot A. (2017) Mapping of hemoglobin in erythrocytes and erythrocyte ghosts using two photon excitation fluorescence microscopy. *J Bioemd Opt*, IF=2.556, ISSN 1083-3668.
2. **Bukara K.**, Schueller L., Rosier J., Martens M. A., Daems T., Verheyden L., Eelen S., Van Speybroeck M., Libanati C., Martens J. A., Van Den Mooter G., Frérart F., Jolling K., De Gieter M., Bugarski B., Kiekens F. (2016) Ordered mesoporous silica to enhance the bioavailability of poorly water-soluble drugs: Proof of concept in man. *Eur J Pharm Biopharm*, IF=3.975, ISSN 0939-6411.
3. **Bukara K.**, Schueller L., Rosier J., Daems T., Verheyden L., Eelen S., Martens J. A., Van den Mooter G., Bugarski B., Kiekens F. (2016) In Vivo performance of fenofibrate formulated with ordered mesoporous silica versus two marketed formulations: A comparative bioavailability study in beagle dogs. *J Pharm Sci*, IF=2.59, ISSN 1520-6017.

Kategorija M22:

1. **Bukara K.**, Drvenica I., Ilić V., Stančić A., Mišić D., Vasić B., Gajić R., Vučetić D., Kiekens F., Bugarski B. (2016) *J Biotechnol*, Comparative studies on osmosis based encapsulation of sodium diclofenac in porcine and outdated human erythrocyte ghosts. IF=2.667, ISSN 0168-1656.

Kategorija M34:

1. **Bukara K.**, Vladkovic A., Kostic I., Stancic A., Ilic V., Rabasovic M., Pantelic D., Jelenkovic B., Krmpot A., Bugarski B., Two photon excitation fluorescence microscopy analysis of porcine erythrocytes and erythrocyte ghosts, The fifth International School and Conference on Photonics-PHOTONICA 2015. 24-28. August 2015 Belgrade, Serbia. ISBN: 978-86-7306-131

5. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Na osnovu svega navedenog, Komisija smatra da doktorska disertacija kandidata Katarine Bukara, magistra farmacije, pod naslovom "Sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem lekova zasnovani na mezoporoznoj silici i eritrocitnim membranama" ("Controlled drug delivery systems based on mesoporous silica and erythrocyte membranes") predstavlja značajan i originalan naučni doprinos u datoj oblasti, što je i potvrđeno kroz objavljivanje radova u časopisima međunarodnog značaja. Predmet i ciljevi koji su postavljeni su jasno navedeni i u potpunosti ostvareni. Komisija je mišljenja da doktorska disertacija pod naslovom "Sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem lekova zasnovani na mezoporoznoj silici i eritrocitnim membranama" ("Controlled drug delivery systems based on mesoporous silica and erythrocyte membranes") u potpunosti ispunjava sve zahtevane kriterijume kao i da je kandidat tokom izrade disertacije pokazao izuzetnu naučno-istraživačku sposobnost u svim fazama izrade ove disertacije.

Imajući u vidu kvalitet, obim i naučni doprinos postignutih i prikazanih rezultata, Komisija predlaže Naučno-nastavnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, da prihvati ovaj Referat, pruži na uvid javnosti doktorsku disertaciju kandidata Katarine Bukara, magistra farmacije, u zakonom predviđenom roku, kao i da referat uputi Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu i da nakon završetka procedure pozove kandidata na usmenu odbranu disertacije pred komisijom u istom sastavu.

U Beogradu, 14. 06. 2017.

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Branko Bugarski, red. prof. Univerziteta u Beogradu,
Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Filip Kiekens, red. Prof. Univerziteta u Antverpenu,
Fakultet farmaceutskih, biomedicinskih i veterinarskih
nauka

Dr Vesna Ilić, naučni savetnik Univerziteta u Beogradu,
Institut za medicinska istraživanja

Dr Verica Đorđević, viši naučni saradnik Univerziteta u
Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Nenad Lazarević, naučni saradnik Univerziteta u
Beogradu, Institut za fiziku

Dr Zorica Knežević-Jugović, red. prof. Univerziteta u
Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

