

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski fakultet

Jovana V. Janković

**Formulacija i karakterizacija polučvrstih
samo-mikroemulgujućih sistema kao
potencijalnih nosača nove generacije za
peroralnu primenu aciklovira**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

University of Belgrade

Faculty of Pharmacy

Jovana V. Janković

**Formulation and characterization of
semisolid self-microemulsifying drug
delivery systems as potential new
generation carriers for oral delivery of
aciclovir**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019.

Mentori

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

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

Članovi komisije

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

Dr sc. Aleksandar Rašković, redovni profesor,
Medicinski fakultet – Novi Sad

Datum odbrane _____

FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA POLUČVRSTIH SAMO-MIKROEMULGUJUĆIH SISTEMA KAO POTENCIJALNIH NOSAČA NOVE GENERACIJE ZA PERORALNU PRIMENU ACIKLOVIRA

Rezime

U radu je izvršena formulacija nove generacije nosača lekovitih supstanci tipa polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema (SMEDDS), pogodnih za razvoj tvrdih kapsula kao finalnog čvrstog farmaceutskog oblika, kao i sveobuhvatna fizičko-hemijska, farmaceutsko-tehnološka i biofarmaceutska karakterizacija u cilju sagledavanja njihovog potencijala za peroralnu primenu aciklovira kao model aktivne supstance. Dodatno, kod sistema koji ispunjava postavljene kriterijume u pogledu fizičko-hemijskih i farmaceutsko-tehnoloških karakteristika, kao i biofarmaceutskog profila, izvršena je procena uticaja samo-mikroemulgujućeg nosača na biološku raspoloživost aciklovira i neškodljivost razvijenih sistema *in vivo* na animalnom modelu. U prvoj fazi istraživanja ispitan je uticaj različitih formulacionih parametara u tečnim pseudo-ternernim sistemima pripremljenim od ulja (trigliceridi srednje dužine lanaca), surfaktanata (PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi, polisorbat 20, makrogol glicerol hidrosistearat), ko-surfaktanata (poligliceril-3-dioleata) i korastvarača (glicerol, makrogol 400), i procenjen je njihov potencijal kao nosača za peroralnu primenu aciklovira kao model aktivne supstance sa karakteristikama grupe 3, odnosno, 4 prema biofarmaceutskom sistemu klasifikacije (BSK). Kapacitet sistema za inkapsulaciju aciklovira iznosio je 0,18-31,66 mg/ml. Od ukupno 60 ispitanih formulacija, tri su odgovarale kriterijumima postavljenim za SMEDDS u pogledu prosečne veličine kapi (Z-ave) i polidisperziteta (PdI) ($Z\text{-ave} \leq 100 \text{ nm}$, $PdI \leq 0,250$) nakon dispergovanja u 0,1 M HCl i fosfatnom puferu pH 7,2. SMEDDS sa najvećim kapacitetom za inkapsulaciju aciklovira (24,06 mg/ml i 21,12 mg/ml) su pokazali brzinu difuzije aciklovira $0,325 \text{ mgcm}^{-2}\text{min}^{-1}$ i $0,323 \text{ mgcm}^{-2}\text{min}^{-1}$ redom, i značajno su doveli do povećanja permeabilnosti lekovite supstance ispitane testom permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA test), u poređenju sa čistom supstancom. Za formulaciju SMEDDS sa aciklovirom od kritičnog značaja bili su vrsta i koncentracija surfaktanta, maseni odnos surfaktanta i ko-surfaktanta (Km), i vrsta i koncentracija korastvarača. U nastavku istraživanja je razmotrena mogućnost formulacije polučvrstih SMEDDS upotrebom makrogola 8000 kao sredstva za modifikaciju viskoziteta tečnih SMEDDS. Kod sistema ispitan je reološko ponašanje, disperzibilnost u kiselom i alkalnom vodenom medijumu, kapacitet za inkorporiranje aktivne supstance i kinetika njenog oslobađanja difuzijom, u cilju identifikacije polučvrstog SMEDDS sa optimalnim karakteristikama kao nosača za peroralnu primenu aciklovira u obliku tvrdih kapsula. Utvrđeno je da su formulisani SMEDDS bili polučvrsti na temperaturama do 50 °C i fizički stabilni i kompatibilni sa tvrdim kapsulama od hipromeloze (HPMC) tokom tromesečnog čuvanja na temperaturama 25 °C/60% RH, odnosno, na 5 ± 3 °C. Rezultati *in vitro* ispitivanja oslobađanja aktivne supstance su pokazali da se brzina difuzije aciklovira povećava sa

povećanjem sadržaja aciklovira u formulaciji, pri čemu polučvrsti SMEDDS sa terapijskom dozom od 200 mg aciklovira omogućava kontrolisanu raspodelu supstance iz *in situ* formiranog nosača tipa ulje-u-vodi mikroemulzije, što smanjuje rizik od smanjenja rastvorljivosti i potencijalno poboljšava njenu dostupnost za apsorpciju. U završnoj fazi istraživanja izvedeni su *in vivo* biološki testovi na pacovima *Wistar* soja za polučvrsti SMEDDS sa aciklovirom sastava: trigliceridi srednje dužine lanaca (10%), makrogol glicerol hidrosistearat (56,25%), poligliceril-3-dioleat (6,25%), glicerol (20%), makrogol 8000 (7,5%) i aciklovir (2,5 mg/ml). Farmakokinetički profil aciklovira je praćen na tri grupe životinja nakon primene vodenog rastvora aciklovira (intravenski), suspenzije aciklovira (peroralno) i polučvrstog SMEDDS (peroralno), redom. Ispitani su sledeći farmakokinetički parametri: maksimalna koncentracija aciklovira u serumu (C_{max}), vreme potrebno za postizanje C_{max} (T_{max}), površine ispod krive zavisnosti koncentracija/vreme (AUC_{0-t} i $AUC_{0-\infty}$), konstanta brzine eliminacije (k_{el}), poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$), volumen distribucije (Vd), srednje vreme zadržavanja (MRT), klirens (Cl), nulta koncentracija (C_0), volumen raspodele stacionarnog stanja (V_{ss}) i apsolutna biološka raspoloživost (BA). Dodatno, za procenu neškodljivosti, urađena su ispitivanja biohemijskih parametara (aktivnost jetrenih transaminaza, koncentracija mokraćne kiseline, uree i kreatinina) u uzorcima krvi životinja nakon primene oralnog rastvora aciklovira, polučvrstog SMEDDS, sa i bez aciklovira. Primenom polučvrstog SMEDDS sa aciklovirom postignuta je dvostruko veća C_{max} ($0,92 \pm 0,21$ mg/ml) i značajno kraći T_{max} ($14 \pm 10,84$ min) u poređenju sa suspenzijom aciklovira (C_{max} $0,29 \pm 0,09$ mg/ml i T_{max} $26,00 \pm 5,48$ min). BA je značajno povećana primenom polučvrstog SMEDDS, dok je analiza biohemijskih parametara isključila mogućnost oštećenja funkcije jetre i bubrega primenom SMEDDS.

Ključne reči: samo-mikroemulgujući sistemi (SMEDDS); aciklovir; PAMPA test; polučvrsti SMEDDS; reološko ponašanje; fotonska korelaciona spektroskopija (PCS); diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC); oslobađanje leka *in vitro*; biološka raspoloživost; neškodljivost

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

UDK broj: 615.281.07(043.3)

FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF SEMISOLID SELF-MICROEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEMS AS POTENTIAL NEW GENERATION CARRIERS FOR ORAL DELIVERY OF ACICLOVIR

Abstract

The study aimed to develop the new generation of semisolid self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS), suitable for the development of hard capsules as the final solid pharmaceutical form, as well as a comprehensive physico-chemical, pharmaceutical, technological and biopharmaceutical characterization in order to examine their potential for oral delivery of aciclovir as a model of active substance. Semisolid SMEDDS with optimized pharmaceutical-technological characteristics, as well as the biopharmaceutical profile, was evaluated *in vivo* regarding effects on pharmacokinetics of aciclovir. Additional goal of this study was evaluation of safety of this semisolid SMEDDS. In the first phase of the study it was investigated the influence of formulation parameters for design of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDSs) comprising oil (medium chain triglycerides), surfactant (PEG-8 caprylic/capric glycerides, polysorbate 20, or macrogolglycerol hydroxystearate), cosurfactant (polyglyceryl-3-dioleate), and cosolvent (glycerol or macrogol 400), and evaluate their potential as carriers for oral delivery of aciclovir as a model of the active substance with the characteristics of the group 3, respectively, 4 to Biopharmaceutical Classification System (BCS). The drug loading capacity of the prepared formulations ranged from 0,18–31,66 mg/ml. Among a total of 60 formulations, three formulations meet the limits for average droplet size ($Z\text{-ave}$) and polydispersity index (PdI) that have been set for SMEDDSs ($Z\text{-ave} \leq 100$ nm, $\text{PdI} \leq 0,250$) upon spontaneous dispersion in 0,1 M HCl and phosphate buffer pH 7,2. SMEDDSs with the highest aciclovir loading capacity (24,06 mg/ml and 21,12 mg/ml) provided the *in vitro* drug release rates of $0,325 \text{ mgcm}^{-2}\text{min}^{-1}$ i $0,323 \text{ mgcm}^{-2}\text{min}^{-1}$, respectively, and significantly enhanced drug permeability in the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA), in comparison with the pure drug substance. For the formulation of SMEDDS with aciclovir of critical importance were the type and concentration of surfactants, the mass ratio of surfactant and co-surfactant (Km), and the type and concentration of the cosolvent. Further research has been considered the possibility of formulating semisolid SMEDDS using macrogol 8000 as a viscosity modifier of liquid SMEDDS. The system was tested for rheological behavior, dispersibility in acid and alkaline aqueous medium, capacity for incorporation of the active substance and its release by diffusion, in order to identify semisolid SMEDDS with optimal characteristics as the carrier for the oral delivery of aciclovir in the form of hard capsules. It has been established that the SMEDDSs were semisolids at temperatures up to 50 °C and physically stable and compatible with HPMC capsules for 3 months storage at 25 °C/60% RH and 5 ± 3 °C, respectively. The results of *in vitro* release study revealed that the designed solid dosage form based on the semisolid SMEDDSs loaded with the therapeutic dose of 200 mg, may control partition of the solubilized drug from *in situ* formed oil-in-water microemulsion carrier into the surrounding

aqueous media, and hence decrease the risk for precipitation and potentially enhance availability of the drug for absorption. *In vivo* biological tests were also performed on Wistar rats for semisolid SMEDDS with acyclovir consisted of medium chain length triglycerides (10% w/w), macroglycerol hydroxystearate (56,25% w/w), polyglyceryl-3-dioleate (6,25% w/w), glycerol (20% w/w), macrogol 8000 (7,5% w/w), and acyclovir (2,5 mg/ml). The pharmacokinetics of acyclovir was monitored in three groups of animals after administration of drug solution (intravenously), drug suspension (orally) and semisolid SMEDDS (orally), respectively. The determined pharmacokinetic parameters were: maximum concentration of acyclovir in serum (C_{max}), time taken to reach C_{max} (T_{max}), areas under time-concentration curves (AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$), terminal elimination rate constant (k_{el}), $t_{1/2}$, volume of distribution (V_d), mean residence time (MRT), clearance (Cl), zero concentration (C_0), steady state volume of distribution (V_{ss}), and BA. Additionally, for safety evaluation, animals were treated orally with aqueous solution of acyclovir, drug-free semisolid SMEDDS and acyclovir-loaded semisolid SMEDDS. Serum samples of sacrificed animals were used for biochemical analysis of enzymatic activity of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), urea, creatinine, and uric acid. Acyclovir administered by semisolid SMEDDS reached twice higher C_{max} ($0,92 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$) and has significantly shorter T_{max} ($14 \pm 10,84 \text{ min}$) compared to the suspension of acyclovir ($C_{max} 0,29 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ and $T_{max} 26,00 \pm 5,48 \text{ min}$). BA of the drug was significantly increased by semisolid SMEDDS, while the analysis of biochemical parameters excluded damage on function of liver and kidneys caused by the investigated drug delivery system.

Keywords: self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDSs); aciclovir; PAMPA test; semisolid SMEDDS; rheological behaviour; photon correlation spectroscopy (PCS); differential scanning calorimetry (DSC); *in vitro* drug release; oral bioavailability; safety

Field of research: Pharmacy

Specific field of research: Pharmaceutical technology

UDK number: 615.281.07(043.3)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Aciklovir	2
1.1.1. Mehanizam delovanja i klinički značaj aciklovira	2
1.1.2. Fizičko-hemijska i biofarmaceutska svojstva aciklovira	5
1.2. Savremeni pristupi u razvoju farmaceutskih formulacija sa aciklovirom	10
1.2.1. Mikroinkapsulacija aciklovira	10
1.2.2. Inkapsulacija aciklovira u vezikularne nosače	11
1.2.3. Inkapsulacija aciklovira u nanočestice.....	16
1.2.4. Inkapsulacija aciklovira u nosače tipa mikroemulzija	19
1.3. Samo-mikroemulgujući sistemi kao nosači lekovitih supstanci za peroralnu primenu	21
1.3.1. Kategorizacija samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci prema kriterijumima <i>Sistema klasifikacije lipidnih formulacija</i>	21
1.3.2. Izazovi u formulaciji samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci	26
1.3.2.1. Kriterijumi za izbor ekscipijenasa u samo-mikroemulgujućim nosačima lekovitih supstanci	27
1.3.2.2. Karakterizacija <i>in vitro</i> performansi samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci	32
1.3.2.3. Formulacija polučvrstih samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci	34
1.3.2.4. Formulacija tvrdih kapsula kao čvrstog farmaceutskog oblika samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci	35
1.3.3. Karakteristike i značaj samo-mikroemulgujućih nosača za poboljšanje apsorpcije slabo rastvorljivih i/ili permeabilnih aktivnih supstanci.....	39
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	43
3. EKSPERIMENTALNI DEO	45
3.1. Prva faza istraživanja.....	45
3.1.1. Materijali koji su korišćeni u prvoj fazi eksperimentalog rada.....	46
3.1.2. Izbor sastojaka pseudoternernih sistema tipa ulje / surfaktant / kosurfaktant / korastvarač	47

3.1.2.1. Određivanje rastvorljivosti aciklovira u individualnim ekscipijensima	47
3.1.2.2. Ispitivanje faznog ponašanja pseudoternernih sistema tipa ulje / surfaktant / kosurfaktant / korastvarač.....	48
3.1.2.3. Određivanje kapaciteta za inkapsulaciju aciklovira u ispitivanim pseudoternernim sistemima ulje / surfaktant / kosurfaktant / korastvarač	50
3.1.2.4. Ispitivanje disperzibilnosti pseudoternarnih sistema sa aciklovirom u vodenim medijumima	51
3.1.3. Biofarmaceutska karakterizacija samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom....	51
3.1.3.1. <i>In vitro</i> ispitivanje difuzije aciklovira iz samo-mikroemulgujućih sistema	52
3.1.3.2. Test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA test)	53
3.2. Druga faza istraživanja	56
3.2.1. Materijali koji su korišćeni u drugoj fazi eksperimentalnog rada	56
3.2.2. Formulacija polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom	57
3.2.3. Fizičko-hemijska karakterizacija polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom	58
3.2.3.1. Karakterizacija reološkog ponašanja polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom	59
3.2.3.2. Ispitivanje disperzibilnosti polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom	59
3.2.3.3. Optička mikroskopija.....	60
3.2.3.4. DSC analiza	60
3.2.4. Biofarmaceutska karakterizacija polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom	60
3.2.5. Procena kompatibilnosti polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom i omotačem tvrdih kapsula	61
3.2.6. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja aciklovira iz polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema u obliku tvrdih kapsula.....	61
3.2.7. Procena stabilnosti polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom u obliku tvrdih kapsula	62
3.2.7.1. Određivanje sadržaja aciklovira u polučvrstim samo-mikroemulgujućim sistemima u obliku tvrdih kapsula	62

3.2.7.2. Ispitivanje disperzibilnosti polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom u obliku tvrdih kapsula.....	62
3.2.7.3. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja aciklovira iz polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema u obliku tvrdih kapsula.....	63
3.3. Treća faza istraživanja	63
3.3.1. Materijali koji su korišćeni u trećoj fazi eksperimentalnog rada	63
3.3.2. Eksperimentalne životinje	64
3.3.3. Priprema uzoraka za <i>in vivo</i> ispitivanja	64
3.3.3.1. Priprema polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema bez lekovite supstance	64
3.3.3.2. Priprema polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom	65
3.3.3.3. Priprema vodenog rastvora i suspenzije aciklovira	65
3.3.4. <i>In vivo</i> ispitivanje biološke raspoloživosti aciklovira iz polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema	65
3.3.5. Procena neškodljivosti polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom	67
3.3.5.1. Procena parametara jetrene funkcije	68
3.3.5.2. Procena parametara bubrežne funkcije	69
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	70
4.1. Rezultati i diskusija I faze istraživanja	71
4.1.1. Izbor sastojaka pseudoternernih sistema tipa ulje/surfaktant/kosurfaktant/korastvarač	71
4.1.2. Fazno ponašanje pseudoternernih sistema tipa ulje/surfaktant/kosurfaktant/korastvarač	74
4.1.3. Uticaj surfaktanata, kosurfaktanta i korastvarača na disperzibilnost ispitivanih pseudoternernih sistema sa aciklovirom.....	79
4.1.4. <i>In vitro</i> kinetika difuzije aciklovira iz tečnih samo-mikroemulgujućih sistema	97
4.1.5. <i>In vitro</i> permeabilnost aciklovira iz tečnih samo-mikroemulgujućih sistema	100
4.2. Rezultati i diskusija II faze istraživanja.....	101
4.2.1. Fizičko-hemijske karakteristike polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom	102

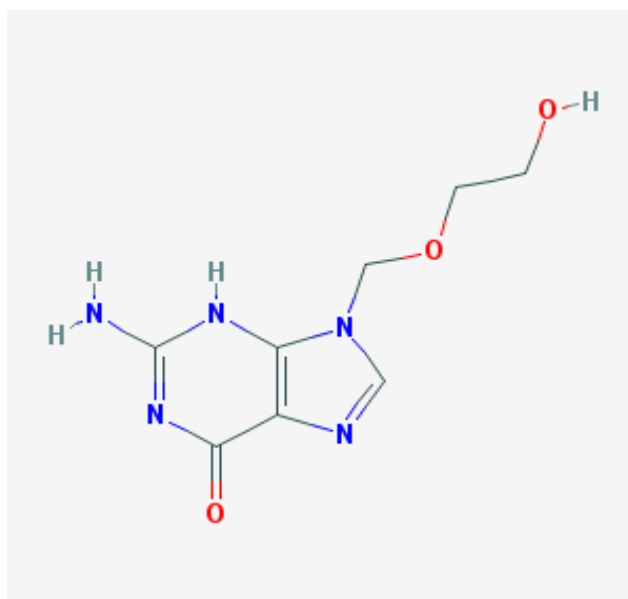
4.2.1.1. Reološko ponašanje polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom	102
4.2.1.2. Disperzibilnost polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom u vodenim medijumima	104
4.2.1.3. Uticaj sadržaja aciklovira na optičke i termalne karakteristike polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema	106
4.2.1.4. <i>In vitro</i> kinetika difuzije aciklovira iz polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema	109
4.2.2. Kompatibilnost polučvrstih polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom sa omotačem tvrdih kapsula	111
4.2.3. <i>In vitro</i> oslobađanje aciklovira iz polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema u obliku tvrdih kapsula	114
4.2.4. Stabilnost polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom u obliku tvrdih kapsula	116
4.3. Rezultati i diskusija III faze istraživanja	123
4.3.1. Uticaj polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema na biološku raspoloživost aciklovira	123
4.3.2. Neškodljivost polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom.....	129
5. ZAKLJUČAK	132
6. LITERATURA	138

1. UVOD

1.1. Aciklovir

1.1.1. Mehanizam delovanja i klinički značaj aciklovira

Aciklovir (*lat.* aciclovirum; *engl.* acyclovir (International Nonproprietary Name (INN), British Approved Name (BAN) i United States Adopted Names (USAN)) je jedan od najstarijih antivirusnih lekova i u upotrebi je već tri decenije (Mehta, 2013; Mondal, 2016). Prvi put je sintetisan u *Wellcome Research Laboratories* (danas *GlaxoSmithKline*, GSK). Aciklovir je sintetski purinski nukleozidni analog i prema nomenklaturi *Međunarodne unije za čistu i primenjenu hemiju* (The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)) predstavlja 2-amino-9-(2-hidroksietoksimetil)-3-purin-6-on (Slika 1) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acyclovir#section=Top>).

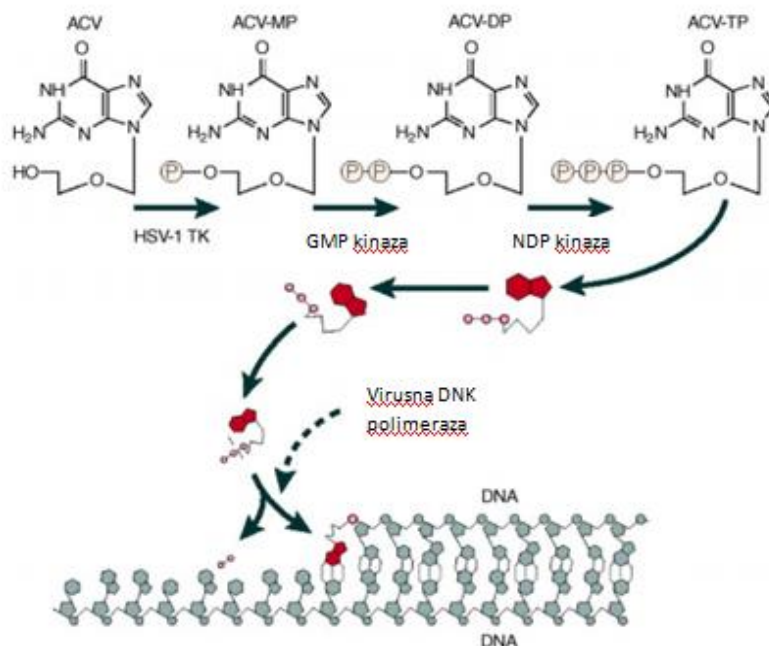


Slika 1. Hemijska struktura aciklovira

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acyclovir#section=Top>)

Aciklovir je lekovita supstanca iz grupe antivirusika koji *in vitro* i *in vivo* inhibira aktivnost humanih *Herpes* virusa, uključujući *Herpes simplex* virus (HSV) tip 1 (HSV-1) i tip 2 (HSV-2) (koji uzrokuju herpesni keratitis, herpesni encefalitis, genitalni herpes, neonatalni herpes i labijalni herpes) i *Varicella zoster* virus (VZV). Slabo je aktivan protiv *Epstein-Barr* virusa (EBV), *Cytomegalovirusa* (CMV) i humanog *Herpes* virusa-6 (HHV-6), pa se ne koristi u terapiji infekcija izazvanih ovim virusima (Mehta, 2013). *Herpes simplex* virus je veoma zarazan i širi se direktnim kontaktom sa zaraženom osobom. Virus penetrira kroz epidermis ili mukozne membrane i replikuje se unutar epitelnih ćelija. Posle primarne infekcije, latentni virus koji se ne replikuje ostaje uglavnom unutar gornjih dorzalnih ganglija, odakle se može reaktivirati i u području kože uzrokovati rekrudescentne lezije. HSV-1 je obično facijalan ili negenitalni, dok HSV-2 obično izaziva genitalne lezije. HSV-1 i -2 su osetljivi na inhibitorne efekte aciklovira. Inhibitorni efekat aciklovira ostvaruje se dozama kojima se postiže nivo ovog leka u plazmi u rasponu od 0,1 µM do 0,6 µM (Blum i sar., 1982; Douglas i sar., 1988; Stahlmann i sar., 1987).

Mehanizam delovanja aciklovira zasniva se na inhibiciji sinteze virusne DNK (Slika 2). Inhibitorna aktivnost aciklovira prema HSV-1, HSV-2 i VZV je visoko selektivna, pa efikasno blokira virusnu DNK polimerazu i replikaciju virusa, dok mu je toksičnost za ćelije sisara izuzetno niska (De Clercq, 2004). Aciklovir se dejstvom virus-specifične timidin kinaze konvertuje u monofosfatni oblik, zatim kinazama ćelija domaćina u trifosfatni koji kompetitivno inhibira virusnu DNK-polimerazu, što za posledicu ima zaustavljanje rasta virusnog DNK lanca. Aciklovir se mnogo efikasnije fosforiliše pod dejstvom virusne timidin kinaze u odnosu na humanu i 30 puta jače inhibira DNK-polimerazu virusa u poređenju sa humanom formom enzima. Stoga aciklovir nema jako izražena neželjena dejstva i uglavnom se dobro podnosi. Virus može da razvije rezistenciju na lek modifikacijama DNK-polimeraze ili timidin kinaze, što se najčešće dešava kod imunokompromitovanih pacijenata usled dugotrajnog izlaganja leku. Rezistentne infekcije tretiraju se primenom foskarneta, trifluridina ili cidofovira (De Clercq, 2004; Mehta, 2013; Mondal, 2016; Rang i sar., 2003).



Slika 2. Mehanizam dejstva aciklovira inhibicijom sinteze virusne DNK (De Clercq, 2004)

Aciklovir se može primeniti peroralno, intravenski (*i.v.*) ili na koži, u zavisnosti od kliničke slike, kod imunokompetentnih i imunokompromitovanih pacijenata (Rang i sar., 2003; Susantakumar i sar., 2011). Dermatološka primena aciklovira karakteristična je za blage orolabijalne i infekcije oka prouzrokovane *Herpes simplex* virusom kod imunokompetentnih pacijenata. Ozbiljne infekcije novorođenčadi i imunokompromitovanih osoba zahtevaju sistemsko lečenje. Peroralna primena indikovana je kod prve epizode genitalnog herpesa, rekurentnog labijalnog herpesa, primarnog gingivostomatitisa kod dece, profilaktički tokom dužeg perioda kod imunokompromitovane dece sa težim oblicima infekcija, kod komplikovanih infekcija izazvanih *Varicella zoster* virusom kod adolescenata i odraslih, kao i kod herpes zostera (Pott Junior i sar., 2018). Intravenska primena aciklovira je terapija izbora kod ozbiljnih infekcija kao što su herpesni encefalitis, herpesni keratokonjuktivitis kod novorođenčadi, neonatalna varicela, i varicela kod imunokompromitovane dece (Mehta, 2013; Mondal, 2016; Nacionalni registar lekova, 2018).

Većina pacijenata dobro podnosi aciklovir. Najčešći neželjeni efekti nakon njegove sistemske primene su mučnina, dijareja, osip i glavobolja. Može doći do ispoljavanja neurološke

toksičnosti, uključujući tremor, delirijum, konvulzije, promene svesti, letargiju, konfuziju, halucinacije, mioklonus i ekstrapiramidalne znakove koji se povlače nakon obustave terapije (Patel i sar., 2019). Renalni neželjeni efekti poput kristalne i intersticijalne nefropatije uglavnom su posledica visokih serumskih koncentracija aciklovira nakon brze intravenske primene i mogu se izbeći primenom odgovarajućih doza leka za svakog pojedinačnog pacijenta, adekvatnom hidratacijom i sporom intravenskom primenom leka. U *in vivo* studijama na životinjama primena visokih doza leka nije pokazala teratogeni, mutageni ili karcinogeni efekat. Međutim, bezbednost primene aciklovira tokom trudnoće nije potvrđena, te se njegova primena ne preporučuje, osim ukoliko se proceni da terapijska korist za majku prevazilazi rizik po fetus (Mehta, 2013; Nacionalni registar lekova, 2018).

Klinički značajne interakcije aciklovira sa drugim lekovima nisu utvrđene. Međutim, treba uzeti u obzir da istovremena primena zidovudina može dovesti do somnolence, a istovremena primena cimetidina ili probenecida može redukovati renalni klirens aciklovira. Istovremena primena amfotericina B, ciklosporina i drugih nefrotoksičnih lekova sa aciklovirom, može povećati rizik od pojave nefrotoksičnosti (Mehta, 2013).

1.1.2. Fizičko-hemijska i biofarmaceutska svojstva aciklovira

Aciklovir je beo ili skoro beo kristalni prašak molekulske formule $C_8H_{11}N_5O_3$ i relativne molekulske mase 225,2 g/mol, slabo rastvorljiv u vodi, dobro rastvorljiv u dimetil sulfoksidu, veoma slabo rastvorljiv u etanolu (96%). Rastvara se u razblaženim rastvorima mineralnih kiselina i alkalnih hidroksida (Ph. Eur. 9.0).

Tri molekula aciklovira i dva molekula vode čine hidratizani oblik (Kristl i sar., 1996), što odgovara teorijskom sadržaju vode od 5%. Međutim, doza i rastvorljivost izražavaju se najčešće preko anhidrovanog oblika aciklovira. Anhidrovani oblik se dobija sušenjem hidratisanog na temperaturama iznad 150 °C (USP 40 - NF 35, 2017). Dokazano je da postoji još jedan anhidrovani oblik aciklovira koji nastaje njegovim rastvaranjem u metanolu na 60 °C, a zatim kristalizacijom usled hlađenja do sobne temperature (Rohani i Sarkar, 2015). Iako ne postoje

značajne razlike u rastvorljivosti, utvrđeno je da se anhidrovani oblik rastvara brže od hidratisanog (Kristl i sar., 1996).

Prema podacima iz literature, na sobnoj temperaturi (22-25 °C) rastvorljivost aciklovira je od 1,2 do 1,6 mg/ml (Satish i sar., 2014), a rastvorljivost u vodi na 37 °C iznosi 2,5 mg/ml. Rastvorljivost aciklovira na 37 °C blago varira u zavisnosti od pH vrednosti rastvora. Najniža rastvorljivost od 2,3 mg/ml izmerena je pri pH 5,8, dok je najviša vrednost (>3,5 mg/ml) izmerena pri pH vrednosti 1,2 (Arnal i sar., 2008). Veoma je slabo rastvorljiv u etanolu (0,2 mg/ml), a rastvorljiv je u mineralnim kiselinama i dimetilsulfoksidu (Hosny i Alahdal, 2013).

Vrednost koeficijenta lipidno-vodene raspodele (logP) aciklovira u sistemu n-oktanol/voda na 22 °C iznosi -1,57 (Bergstrom i sar., 2003). Laktam aciklovira ima slabo kisele, a imin slabo bazne osobine, te je ceo molekul amfoteran. Prema različitim izvorima pKa vrednosti aciklovira iznose 2,27 i 9,25 (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00787>), ali ni u jednom nije naglašeno na kojoj temperaturi su merenja izvršena. Na 37 °C prijavljene su pKa vrednosti 2,16 i 9,04 (British Pharmacopoeia, 2015).

Aciklovir se u čvrstim farmaceutskim oblicima za peroralnu primenu najčešće upotrebljava u obliku slobodne kiseline, a za parenteralnu primenu koristi se natrijumova so. Lista osnovnih lekova *Svetske zdravstvene organizacije* (SZO) propisuje aciklovir u obliku masti za oči (3% m/m), oralnog rastvora (250 mg/5 ml), praška za injekcije (250 mg aciklovira u obliku natrijumove soli) i tableta (200 mg) (http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015_8-May-15.pdf). Na nacionalnim listama osnovnih lekova nekih zemalja Evropske unije (Hrvatska, Slovenija) uvršten je aciklovir u obliku praška za infuziju (250 mg), film tableta (jačine 200 mg i 400 mg), masti za oči (30 mg/g masti) (http://www.who.int/selection_medicines/country_lists/en/). U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) u prometu su dostupni farmaceutski preparati aciklovira u obliku krema (5% m/m), masti za oči (3% m/m), kapsula i tableta (jačine 200 mg, 400 mg i 800 mg), oralne suspenzije (200 mg/5 ml) i injekcije (250 mg/5 ml) (<http://www.fda.gov/Drugs/default.htm>). U Republici Srbiji aciklovir je registrovan kao krem (5%), mast (5%), tablete (200 mg), prašak za rastvor za infuziju (250 mg) i mast za oči (30 mg/g)

(Nacionalni registar lekova, 2018). Najčešći farmaceutski oblici za peroralnu primenu aciklovira su neobložene i film tablete u jačini od 200 mg, 400 mg i 800 mg (Elshafeeya i sar., 2010). U tabelama 1 i 2 prikazane su pomoćne supstance koje ulaze u sastav odabranih farmaceutskih preparata aciklovira sa tržišta, u obliku film tableta.

Tabela 1. Lista ekscipijenasa u Zovirax® tabletama (aciklovir 200 mg i 800 mg) (GlaxoSmithKline, Velika Britanija) (<http://www.medicines.org.uk/EMC/medicine/9273/SPC/Zovirax+200mg+Tablets/>, <http://www.medicines.org.uk/EMC/medicine/9275/SPC/Zovirax+800mg+Tablets/>)

Zovirax® tableta, aciklovir	200 mg	800 mg
Jezgro	Celuloza, mikrokristalna	Celuloza, mikrokristalna
	Aluminijum-magnezijum-silikat	Aluminijum-magnezijum-silikat
	Natrijum-skrobglikolat	Natrijum-skrobglikolat
	Povidon K-30	Povidon K-30
	Magnezijum-stearat	Magnezijum-stearat
Film	Koncentrat boje Y-1-7000, bela (Hipromeloza; Makrogol 400; Titan-dioksid)	Hipromeloza Titan-dioksid Makrogol 400
Politura	Makrogol 8000	Makrogol 8000

Tabela 2. Lista ekscipijenasa i njihova uloga u Aciklovir tabletama (aciklovir 200 mg) (Zdravlje AD, Srbija) (<http://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/smpc/515-01-3122-12-001.pdf>)

Pomoćna supstanca	Uloga u formulaciji
Kukuruzni skrob	Sredstvo za dopunjavanje, sredstvo za raspadanje
Laktoza, monohidrat	Sredstvo za dopunjavanje
Celuloza, mikrokristalna	Sredstvo za dopunjavanje, sredstvo za raspadanje
Povidon K-30	Vezivno sredstvo
Magnezijum-stearat	Sredstvo za klizanje, lubrikans, antiadheziv

Apsorpcija aciklovira iz gastrointestinalnog trakta (GIT-a) je vrlo spora, promenljiva i nepotpuna, kada se primenjuju konvencionalni farmaceutski preparati u obliku tableta. Apsolutna biološka raspoloživost je niska (~ 15–30%), a poluvreme eliminacije kratko ($t_{1/2}$ 2,5 h), a veće vrednosti $t_{1/2}$ uočene su kod pacijenata sa oštećenjem bubrega (Arnal i sar., 2008; Kristl i sar., 1996). Prisustvo hrane ne utiče na apsorpciju aciklovira. Oko 80% peroralno primenjene doze aciklovira ne apsorbuje se u tankom crevu i eliminiše se putem fecesa (Satish i sar., 2014). Aciklovir se u niskom stepenu vezuje za proteine plazme (9-33%) i distribuira se do većine tkiva i telesnih tečnosti (Vergin i sar., 1995). Apsorbovana frakcija leka se u najvećem procentu nepromenjena eliminiše iz organizma putem bubrega, glomerularnom filtracijom i tubularnom sekrecijom. Uobičajeno se za supresiju i profilaksu HSV infekcija kod imunokompetentnih pacijenata i VZV infekcije primenjuje u dozi od 1000 mg dnevno (5 puta po 1 tableta jačine 200 mg (genitalni herpes)) ili 4000 mg dnevno (4 puta po 5 tableta jačine 200 mg (herpes zoster)) (Nacionalni registar lekova, 2018), što umanjuje komplikaciju pacijenata. *In vivo* studije na životinjama pokazale su da je niska oralna raspoloživost aciklovira povezana sa njegovim kratkim zadržavanjem na mestu apsorpcije u gornjim delovima GIT-a (duodenum i jejunum) (Arnal i sar., 2008; Dhaliwal i sar., 2008; Tao i sar., 2009; Vergin i sar., 1995).

Biofarmaceutski sistem klasifikacije (BSK), u kome su sve lekovite supstance klasifikovane u četiri grupe prema njihovoj rastvorljivosti u vodi i permeabilnosti kroz intestinalnu membranu (Amidon i sar., 1995; Ritschel, 1992), prema smernicama SAD administracije za hranu i lekove (*engl.* Food and drug administration (FDA)), predstavlja validan vodič za predviđanje intestinalne resorpcije lekovite supstance. BSK se široko koristi prilikom razvoja različitih farmaceutskih preparata u farmaceutskoj industriji kao i razvoja brojnih zahteva regulativnih tela (*CDER/FDA, U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research: Guidance for industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, 2000; EMEA, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP): Guideline on the investigation of bioequivalence, 2010*). Osnove ovog sistema klasifikacije je postavio Gordon Amidon za šta je u avgustu 2006. godine na kongresu *Medjunarodne farmaceutske federacije* (*engl.* International Pharmaceutical Federation (FIP)) održanom u Salvadoru (Brazil), dobio nagradu za istaknuti naučni rad. Prema kriterijumu BSK,

nisko rastvorljivim lekovitim supstancama se smatraju supstance koje će se u količini jednako maksimalnoj terapijskoj dozi rastvoriti u 250 ml, ili manje vodenog medijuma, čija je pH vrednost od 1,0 do 7,5, na temperaturi od $37 \pm 0,5$ °C. U suprotnom, supstanca se smatra slabo rastvorljivom. Pod permeabilnošću se, u smislu BSK, podrazumeva efektivna permeabilnost kroz membranu humanog jejunuma. Supstanca se smatra visoko permeabilnom ukoliko se apsorbuje više od 90% primenjene količine lekovite supstance i ukoliko nema dokumentovanih podataka o nestabilnosti supstance u GIT-u. Ako se apsorbuje u manjem procentu, smatra se da je nisko permeabilna (Amidon i sar., 1995).

Studija permeabilnosti sa 3H-aciklovirom ukazala je na visok koeficijent permeabilnosti aciklovira od oko $1,19 \cdot 10^{-5}$ cm/s (Salama i sar., 2004). Međutim, druge studije ukazale su na znatno niže vrednosti koeficijenta permeabilnosti koje se kreću u opsegu od $0,12 \cdot 10^{-6}$ (Bergstrom i sar., 2003) do $2,0 \cdot 10^{-6}$ cm/s (Yee, 1997).

Aciklovir je svrstan u grupu 3 prema kriterijumima BSK, kao lekovita supstanca koja ima nisku permeabilnost i visoku rastvorljivost u kiseloj sredini (pKa 2,27), mada mu je rastvorljivost u vodi (~ 0,2%, 25 °C) i većini nepolarnih rastvarača niska. Međutim, neki autori smatraju da se aciklovir u dozi od 200 mg i 400 mg svrstava u BSK grupu 3, dok se u dozi od 800 mg može svrstati u grupu 4 prema BSK. U četvrtu BSK grupu svrstavaju se lekovi sa niskom rastvorljivošću i niskom permeabilnošću (Arnal i sar., 2008).

S obzirom da su rastvaranje u gastrointestinalnim tečnostima i zadovoljavajuća permeabilnost preduslov za apsorpciju, aktivne supstance iz grupe 2, 3 i 4, koje pokazuju ograničenu rastvorljivost i/ili ograničenu intestinalnu apsorpciju, predstavljaju veliki izazov za ovaj put primene (Gunawardana i sar., 2015) naročito u slučaju antiretrovirusne hronične terapije, kod koje se kombinuje nekoliko aktivnih supstanci u visokim dozama i koje se primenjuju svakodnevno. Problem nepredvidive, neregularne i nepotpune apsorpcije aktivne supstance iz GIT-a, pre svega iz čvrstih farmaceutskih oblika, potencijalno bi se mogla prevazići poboljšanjem njene rastvorljivosti i intestinalne permeabilnosti na mestu apsorpcije. Najveći deo farmaceutskih istraživanja, u cilju poboljšanja biološke raspoloživosti, se fokusira na postizanje bolje rastvorljivosti lekovite supstance i iz tog razloga prve kandidate prilikom odabira lekovite

model supstance predstavljaju jedinjenja iz BSK grupe 2 (niska rastvorljivost i visoka permeabilnost) (Fahr i Liu, 2007). Međutim, upotreba različitih formulacija koje povećavaju rastvorljivost slabo rastvorljivih supstanci u vodi često ne dovodi do povećanja apsorpcije, jer apsorpcioni profil supstance značajno zavisi od povezanosti rastvorljivosti i permeabilnosti (Dahan i Miller, 2012). Zbog slabe permeabilnosti supstanci iz BSK grupe 3 i 4, kao i zbog njihovih fizičko-hemijskih i hemijskih karakteristika koje se teško menjaju, predlaže se upotreba ekspijenasa koji povećavaju njihovu permeabilnost (Pradeep i sar., 2005).

1.2. Savremeni pristupi u razvoju farmaceutskih formulacija sa aciklovirom

Obiman istraživački rad koji je fokusiran na razmatranje primene novih strategija u razvoju formulacija sa aciklovirom, za različite puteve primene, ukazuje da postoji velika zainteresovanost za unapređenje isporuke ovog antivirusnog i povećanje efikasnosti terapije HSV infekcija. S obzirom da je aciklovir lek izbora kod brojnih indikacija, već dugi niz godina se teži ka poboljšanju njegovih fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih karakteristika u cilju povećanja biološke raspoloživosti kod peroralne, perkutane, okularne, vaginalne i parenteralne primene. Sinteza valaciklovira, L-valil estra aciklovira koji se dobro apsorbuje iz GIT-a nakon peroralne primene i brzo konvertuje u aciklovir hidrolizom estera mehanizmom prvog prolaska kroz jetru, omogućila je 3-5 puta veću biološku raspoloživost aciklovira nakon peroralne primene (Tao i sar., 2009). Utvrđeno je da primena valaciklovira 1-2 puta dnevno može povoljno uticati na komplijansu. Pored sinteze valaciklovira, u više naučnih studija dokumentovan je interes za razvoj novih formulacija i nosača sa aciklovirom, baziranih na strategijama mikroinkapsulacije i nanoinkapsulacije.

1.2.1. Mikroinkapsulacija aciklovira

Mikroinkapsulacija lekovitih supstanci najčešće podrazumeva inkapsulaciju u mikrosfere, mikrokapsule, kao i formiranje ko-kristalnih čestica, čime se mogu postići specifični mehanizmi isporuke aktivne supstance i mogu se razlikovati u pogledu biorazgradivosti, u zavisnosti od

polimera koji ulaze u njihov sastav (prirodni ili sintetski), mehanizma i mesta oslobađanja lekovite supstance (Durai, 2015).

Rokhade i saradnici (2007) su formulisali mikrosfere tipa semipermeabilnih polimernih mreža (*engl.* Interpenetrating polymer network (IPN)) od akrilamida sa vezanim dekstranom i hitozanom, metodom unakrsnog emulgovanja, koristeći glutaraldehid kao vezivno sredstvo. IPN je kombinacija dva ili više umrežena polimera koji se drže zajedno pomoću topoloških veza bez stvaranja kovalentnih veza. Aciklovir je inkapsuliran u IPN mikrosfere i produženo mu je oslobađanje do 12 h, čime je pokazan zadovoljavajući potencijal ovog sistema za kontrolisano oslobađanje ove aktivne supstance.

Za oftalmološku primenu aciklovira, Cortesi i saradnici (2007) su formulisali i izvršili karakterizaciju poliakrilnih (Eudragit[®] RL, RS i NE) mikročestica dobijenih metodom sušenja raspršivanjem. Metoda dobijanja mikročestica sušenjem raspršivanjem je omogućila prihvatljivu efikasnost inkapsuliranja i odgovarajuće fizičke karakteristike potrebne za oftalmološku primenu. Podaci o profilu oslobađanja ukazuju da se aciklovir oslobađa iz mikročestica na kontrolisan način. Profil oslobađanja leka je zavisio od tipa upotrebljenog polimera. Genta i saradnici (1997) su proučavali aciklovir inkapsuliran u mikrosfere od hitozana sa ciljem postizanja produženog oslobađanja leka i povećanja njegove biološke raspoloživosti nakon okularne primene. Rezultati karakterizacije su pokazali da su mikrosfere bile izuzetno malih dimenzija, i da je lekovita supstanca homogeno dispergovana u amorfnom stanju unutar mikrosfere. *In vitro* oslobađanje aciklovira iz mikrosfera je bilo sporije nego upotrebom čiste supstance. *In vivo* okularna primena kod zeca je pokazala visoke koncentracije aciklovira u plazmi tokom dužeg perioda i povećane vrednosti površine ispod krive (*engl.* area under the curve (AUC)).

1.2.2. Inkapsulacija aciklovira u vezikularne nosače

Vezikularni sistemi su pogodni za inkapsulaciju hidrofilnih i hidrofobnih lekovitih supstanci, i omogućavaju njihovo kontrolisano oslobađanje uz povećanje biološke raspoloživosti i terapijske

efikasnosti. Do sada su najviše proučavani nosači tipa liposoma, niosoma, i etosoma za inkapsulaciju aciklovira.

Liposomi su pokazali veliki potencijal kao nosači različitih supstanci, uključujući proteine, peptide, antineoplastične agense, antibiotike i antivirusne lekove. Ispitivani su za različite puteve primene, uključujući parenteralni, peroralni, nazalni, pulmonalni, okularni, transdermalni (Gregoriadis, 2007; Đekić, 2017; Torchilin, 2005). Poslednjih godina se polje istraživanja značajno proširilo na peroralni put primene liposoma (Jensen i sar., 2015; Liu i sar., 2017; Tang i sar., 2017), zahvaljujući novim metodama za povećanje njihove stabilnosti i permeabilnosti. Dodavanjem različitih polimera ili liganada na njihovu površinu (Thirawong i sar., 2008; Wu i sar., 2015) i promenom njihove strukture (Conacher i sar., 2001; Niu i sar., 2012) dobijena je značajno veća stabilnost u GIT-u i apsorpcija, a takođe i bolji farmakokinetički i farmakodinamički profil (Hosny i sar., 2013).

Konvencionalni liposomi (unilamelarni i multilamelarni) imaju određena ograničenja, kao što su niska efikasnost inkapsulacije lekovitih supstanci koje su rastvorljive u vodi, ograničena stabilnost i nekontrolisano oslobađanje lekovite supstance nakon najmanjeg oštećenja njihove spoljašnje membrane (Mumper i Hoffman, 2000; Ran i Yalkowsky, 2003). Ovi nedostaci su uspešno prevaziđeni upotrebom nosača tipa multivezikularnog liposoma (Kim i sar., 1996). Sastoji se od mreže fosfolipidnih membrana koja okružuje multipla nekoncentrična vodena jezgra. Multivezikularni liposomi sadrže neutralni lipid (triolein, trikaprilen, trilaurin, tributirin, itd.) kao integralnu komponentu, koja je odgovorna za njihovu jedinstvenu multivezikularnu strukturu (Kim i sar., 1996). Multivezikularni liposomi su upotrebljeni za postizanje produženog oslobađanja nekoliko malih molekula, analgetika, antitumorskih lekova i antivirusnih lekova (Jain i sar., 2005). Jain i saradnici (2005) su formulisali multivezikularne liposome za intradermalnu isporuku aciklovir-natrijuma. Efikasnost inkapsulacije aciklovira u multivezikularne liposome (45-82%) bila je 3-6 puta veća nego kod multilamelarnih vezikula. *In vitro* oslobađanje aciklovira iz multivezikularnih liposoma je bilo produženo i 70% leka je oslobođeno tokom 96 h, dok su konvencionalni multilamelarni vezikuli oslobodili 80% leka tokom 16 h. Multivezikularni liposomi kao nosači za intradermalnu isporuku imaju prednosti koje uključuju veoma visoku efikasnost inkapsulacije i kontrolisano oslobađanje aciklovira

tokom produženog vremenskog perioda (Kim i sar., 1996; Langston i sar., 2003). Nakon intradermalne primene kod pacova *Wistar* soja, multivezikularni liposomi su pokazali: i) produženo održavanje terapijske koncentracije aciklovira u plazmi tokom 48 h u poređenju sa rastvorom slobodnog/neinkapsuliranog leka (12-16 h); ii) vrednosti C_{max} koje su bile 1,4 puta više u odnosu na rastvor slobodnog/neinkapsuliranog leka; i iii) AUC je bila trostruko veća u poređenju sa slobodnim/neinkapsuliranim lekom. Ovi rezultati sugerišu da se inkapsulacijom u multivezikularne liposome mogu smanjiti toksične reakcije i nedostaci konvencionalne *i.v.* i oralne terapije.

Law i saradnici (2000) su proučavali permeabilnost i apsorpciju aciklovira kroz rožnjaču upotrebom liposoma kao nosača. *In vitro* ispitivanja permeabilnosti pokazala su da pozitivno naelektrisani liposomi prolaze kroz rožnjaču u nižem procentu u odnosu na negativno naelektrisane liposome i rastvor čistog aciklovira. Naspram toga, *in vivo* studija pokazala je da je procenat apsorpcije aciklovira upotrebom pozitivno naelektrisanih liposoma bio veći nego nakon primene negativno naelektrisanih liposoma i rastvora slobodnog aciklovira. Koncentracija aciklovira u rožnjači nakon primene pozitivno naelektrisanih liposoma pokazala je da je depozicija aciklovira u rožnjači bila veća od depozicije nakon primene negativno naelektrisanih liposoma i rastvora slobodnog aciklovira. Morfološkim posmatranjem površine rožnjače tretirane liposomima uočeno je da pozitivno naelektrisani liposomi formiraju potpuno obloženi sloj na površini rožnjače. Čvrsto vezivanje liposoma na površini rožnjače dovelo je do povećanog zadržavanja, a time i povećane apsorpcije aciklovira.

Pavelić i saradnici (2001) su proučavali liposome kao nosače za kontrolisano i produženo oslobađanje tokom lokalne terapije ginekoloških bolesti, među kojima je i genitalna infekcija herpes virusom. Aciklovir je inkapsuliran u liposome pripremljene metodom rastvaranja poliola (Kikuchi i sar., 1994) i ispitane su tri različite formulacije, koje su sadržale fosfatidilholin iz jajeta/fosfatidilglicerol iz jajeta (9:1 mol/mol), fosfatidilholin iz jajeta i fosfatidilholin iz jajeta/stearilamin (9:3 mol/mol). Da bi se dobili približniji *in vivo* uslovi i bolja stabilnost, liposomi su inkorporirani u bioadhezivni hidrogel na bazi karbomera (Carbopol® 974P NF) sa odgovarajućom pH vrednosti i viskozitetom. *In vitro* studije oslobađanja iz liposoma

dispergovanih u hidrogelu su pokazale njihovu primenljivost u vaginalnoj isporuci sa lokalizovanim i produženim oslobađanjem inkapsuliranog aciklovira.

Takođe, Jain i saradnici (2008) su pokazali da elastični liposomi sa inkapsuliranim aciklovir-natrijumom mogu da poboljšaju penetraciju supstance u dublje slojeve kože i transdermalni fluks. Dobijeni fluks je bio skoro 2 puta veći nego nakon primene konvencionalnih liposoma sa inkapsuliranim aciklovir-natrijumom i 6,3 puta veći od rastvora (neinkapsuliranog) aciklovira. Proučavana formulacija sa deformabilnim liposomima za isporuku aciklovira je pokazala bolji transdermalni fluks, veću efikasnost inkapsulacije supstance, penetracije i transdermalne isporuke u poređenju sa konvencionalnim liposomima. *In vivo* studije su pokazale da je koncentracija aciklovir-natrijuma u plazmi bila približno 4,2 puta veća primenom deformabilnih liposoma u poređenju sa konvencionalnim liposomima.

Kajiwara i saradnici (2007) su proučavali dugocirkulišuće liposome sa ganciklovirom za *i.v.* i intraperitonealnu primenu u obliku injekcija. Ganciklovir je prolek aciklovira, a karakterišu ga kratko poluvreme eliminacije i dozno zavisna toksičnost. U ovoj studiji, pegilovani liposomi koji su sadržali fosfatidilholin iz jajeta: holesterol: stearylamin (5: 5: 1 mol/mol/mol) su bili pripremljeni metodom zamrzavanja i odmrzavanja koja omogućava značajno veću efikasnost inkapsuliranja ganciklovira u poređenju sa drugim metodama.

Upotrebom aciklovira inkapsuliranog u liposome u obliku mukoadhezivnog gela intranazalno je dobijena biološka raspoloživost od 60,72% što može da se poredi sa *i.v.* primenom (Alsarra i sar., 2008). U drugoj studiji, rezultati ispitivanja aciklovira inkapsuliranog u liposome i mast za oči su pokazali da je koncentracija u očnoj vodici i AUC bila značajno veća upotrebom formulacije sa liposomima (Chetoni i sar., 2004).

Niosomi su vezikule nejonskih surfaktanata koje se široko proučavaju kao ekonomična alternativa, nebiološkog porekla, liposomima. Imaju sve prednosti kao i liposomi, a pored toga i manje troškove proizvodnje, veću stabilnost i jednostavnije skladištenje. Ove karakteristike čine niosome pogodnijim za industrijsku proizvodnju (Biju i sar., 2006; Sahin, 2007). Lamelarne su strukture, veličine 10-1000 nm, amfifilne prirode, zbog koje omogućavaju inkapsulaciju i

hidrofilnih i hidrofobnih lekovitih supstanci. Holesterol i nejonski surfaktanti kao što su Span[®] (20, 40, 60, 85, 80), Tween[®] (20, 40, 60, 80) i Brij[®] (30, 35, 52, 58, 72, 76) su glavne komponente u strukturi niosoma. Takođe, u formulaciji mogu biti uključeni i stabilizatori kako bi se sprečila agregacija vezikula odbojnim, sternim efektom (korišćenjem npr. holesteril poli-24-oksietilen etra) ili elektrostatičkim efektima (korišćenjem npr. dicetil fosfata) (Chauhan i Luorence, 1989). Krupno ograničenje za primenu niosoma je nedovoljan broj istraživanja vezan za njihovu toksičnost. U određenim slučajevima, inkapsulacija lekovite supstance u niosome je smanjila njenu toksičnost, kao što je pokazano u studiji formulacije niosoma sa vinkristinom (Parthasarathi i sar., 1994). Attia i saradnici (2007) su proučavali niosome sa inkapsuliranim aciklovirom za poboljšanje niske i varijabne oralne biološke raspoloživosti. Nejonske vezikule, koje se sastoje od holesterola, Span[®] 60 i dicetil fosfata (65:60:5 mol/mol/mol) su pripremljene metodom hidratacije tankih filmova. U vezikule je inkapsulirano oko 11% aciklovira. *In vitro* profil oslobađanja leka je pokazao produženo oslobađanje aciklovira iz niosoma u odnosu na primenu rastvora čistog aciklovira. Rezultati *in vivo* studije su pokazali da se primenom niosoma udvostručila oralna raspoloživost aciklovira kod zečeva posle primene jedne doze od 40 mg/kg oralno u poređenju sa rastvorom čistog aciklovira. Niosomi su pokazali značajno povećanje prosečnog vremena zadržavanja (*engl.* mean residence time (MRT)) aciklovira na mestu apsorpcije, produženo oslobađanje, uz sugestiju istraživača da mogu biti odgovarajući nosači za oralnu isporuku aciklovira. U drugoj studiji, koju su sprovedi Mukherjee i saradnici (2007), su formulisani Span[®] 20-niosomi sa inkapsuliranim aciklovirom i ispitana je mogućnost postizanja produženog oslobađanja leka uz povećan MRT, a ispitana je i njegoa sistemska dozno-zavisna toksičnost u poređenju sa liposomima na bazi holesterola i soja L-alfa-lecitina. Procenat inkapsuliranja lekovite supstance u niosome je bio veći u poređenju sa liposomima. Takođe, *in vitro* oslobađanje lekovite supstance iz liposoma je bilo oko 90% tokom 150 min, dok je iz niosoma bilo samo 50% tokom 200 min. Ovi rezultati ukazuju na to da se niosomi mogu smatrati dobrim izborom kao nosači za *i.v.* primenu aciklovira. Primenom niosoma *in vivo* na kunićima je dobijena veća biološka raspoloživost i MRT odnosu na primenu čistog rastvora lekovite supstance (Attia i sar., 2007).

Etosomi su multilamelarne vezikule sastavljene od fosfolipida (sojin fosfatidilholin), etanola i vode. Poznato je da je etanol efikasan permeacioni inhenser. Etosomi imaju visoku efikasnost

inkapsulacije molekula različite lipofilnosti (Huff i sar., 1981; Touitou, 2002). *In vivo* ispitivanje na zečevima je pokazalo da su etosomi efikasniji u perkutanoj primeni aktivnih supstanci, u pogledu količine i dubine penetracije, u poređenju sa liposomima ili vodeno-alkoholnim rastvorima (Touitou, 2002). Smatra se da etosomi povećavaju permeabilnost svojom fuzijom sa lipidima iz kože otpuštajući lekovitu supstancu na različitim mestima duž puta prodiranja, što se može pripisati folikularnom transportnom mehanizmu. Replikacija virusa se odvija na bazalnom dermisu (Huff i sar., 1981). Kako bi prevazišao problem slabe penetracije do dermalnog sloja, koji se javlja kod konvencionalnih dermatoloških preparata aciklovira, Horwitz i saradnici (1999) su razvili formulaciju sa aciklovirom inkapsuliranim u etosome. Potvrđene su bolje karakteristike u dvostruko slepoj, randomiziranoj studiji u kojoj je korišćena formulacija aciklovira sa tržišta (Zovirax, krem, GlaxoSmithKline, Glaxo Wellcome UK Ltd, Middlesex, Velika Britanija) za poređenje. Opažen klinički napredak mogao je biti povezan sa efikasnom isporukom leka u terapijskim dozama u duboke slojeve kože.

1.2.3. Inkapsulacija aciklovira u nanočestice

Nanočestice su submikronski koloidni sistemi koji se sastoje od polimera (biorazgradivih ili ne), a veličina im je u opsegu od 10 do 1000 nm. Nanočestice se mogu formulirati koristeći različite polimere, kao što su poliestri i njihovi kopolimeri. Nasuprot tome, takođe se mogu koristiti i prirodni makromolekuli, kao što su proteini i polisaharidi, nepolarni lipidi i metalni oksidi i silicijum dioksid (Kubik i sar., 2005).

Primenom polimernih nanočestica se može omogućiti efikasna terapija na ćelijskom nivou, odnosno prolazak lekovite supstance do ciljnog mesta dejstva. Ovi nosači mogu ostvariti različite mehanizme isporuke inkapsulirane aktivne supstance u zavisnosti od vrste polimera i sastava formulacije. Giannavola i saradnici (2003) su pokazali da aciklovir može biti inkapsuliran u nanosfere na bazi polimlečne kiseline (PLA) čime se omogućava produženo oslobađanje i veća koncentracija leka u očnoj vodici nakon okularne primene. Farmakokinetika aciklovira inkapsuliranog u nanočestice nakon okularne primene je procenjena u *in vivo* testu i upoređena sa vodenom suspenzijom slobodnog leka. PEG obložene i neobložene PLA nanosfere pokazale su produženo oslobađanje aciklovira i veoma dobru podnošljivost od strane oka. Oba tipa PLA

nanosfera su omogućila povećanje koncentracije aciklovira u očnoj vodici i poboljšani farmakokinetički profil. PEG-obložene PLA nanosfere su bile mnogo efikasnije u poboljšanju biološke raspoloživosti aciklovira, i eventualnoj terapiji virusnih infekcija oka. Polimerne nanočestice se smatraju povoljnim nosačima i za oralnu primenu lekova. Među različitim tipovima nanočestica, polimerne nanočestice se dosta proučavaju zbog njihove stabilnosti i relativno jednostavnog modifikovanja njihove površine (Liu i sar., 2008). Od ovih koloidnih nosača se očekuje da stupaju u interakcije sa površinom sluznice i da se zadržavaju u gastrointestinalnom traktu, istovremeno štiteći inkapsuliranu aktivnu supstancu od enzimske degradacije, tokom celokupnog oslobađanja leka ili njegove apsorpcije. Većina istraživanja ukazuje na to da im je najbolje mesto za isporuku lekovite supstance na limfoepitelnim M ćelijama. Pokazano je da se mikročestice zadržavaju na ovim ćelijama, a nanočestice se sistemski distribuiraju (Hans i Lowman, 2002). U jednoj studiji (Gandhi i sar., 2014) su formulisane polimerne nanočestice sa aciklovirom uz optimizaciju njegove isporuke i uz prevazilaženje nedostataka. Eudragit® RLPO je korišćen kao polimer za pripremu nanočestica sa inkapsuliranim aciklovirom, zbog podataka iz literature o njegovoj visokoj permeabilnosti i primeni u sistemima za produženo oslobađanje leka. Eudragit® RLPO je polimer etilakrilata, metilmetakrilata i niske koncentracije estra metakrilne kiseline sa kvaternarnim amonijum grupama. Amonijum grupe su jonizovane i utiču na permeabilnost polimera. Efikasnost inkapsulacije lekovite supstance kod ovih nanočestica bila je u opsegu od $53,78 \pm 1,34\%$ do $79,34 \pm 1,64\%$. Među njima, najveću efikasnost ($79,34 \pm 1,64\%$) je pokazala formulacija dobijena korišćenjem lek:polimer u odnosu 1:2 i sa 0,25% m/v stabilizatora. Prosečna veličina čestica bila je u rasponu od $82 \pm 3,83$ nm do $532 \pm 4,86$ nm, a indeks polidisperziteta $0,308 \pm 0,24$ do $0,716 \pm 0,25$. Utvrđeno je da udeo polimera i koncentracija surfaktanta utiču na veličinu čestica i efikasnost inkapsulacije aciklovira u nanočestice koje su formulisane od Eudragita® RLPO. *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja leka u fosfatnom puferu (pH 7,4) iz ovih nanočestica sa aciklovirom, bilo je produženo tokom 24 h.

Mukoadezivni polimeri mogu produžiti vreme zadržavanja leka na mestu apsorpcije i smanjiti njegovu degradaciju u GIT-u, a takođe poboljšavaju penetraciju kroz mukoznu membranu, što omogućava povećanje biološke raspoloživosti (Roy i sar., 2009). Jedna od vrsta mukoadezivnih polimera su tiomeri koji se dobijaju vezivanjem sulfhidrilnih liganada za polimernu osnovu

(prirodni ili sintetski polimeri) (Ravi i sar., 2013). Mukoadhezija nastaje kao rezultat formiranja kovalentnih veza između tiolnih grupa prisutnih na polimeru i glikoproteina iz sluzokože putem reakcije disulfidne razmene (Kumar i Sinha, 2013). Mukus štiti sluzokožu u GIT-u, ali takođe stvara i sternu prepreku za penetraciju nanočestica. Problem kod primene nanočestica je njihovo naknadno ukljanjanje sa sluzokože. Upotrebom tiomernih nanočestica se prevazilaze ovi nedostaci jer prolaze kroz membranu sluzokože i dospevaju do apsorpcione površine (Ganem-Quintanar i sar., 1997). Osim toga, tiomerne nanočestice omogućavaju bolji kontakt redukovanog glutationa koji je odgovoran za otvaranje tesnih veza između ćelija zbog svoje male veličine i veće spoljašnje površine. Zbog toga, formulisanje tiomernih nanočestica može obezbediti sinergistički efekat koji može dovesti do povećanja gastrointestinalne apsorpcije lekova sa ograničenom permeabilnošću. Naučnici (Madgulkar i sar., 2016) su formulisali nanočestice sa inkapsuliranim aciklovirom koristeći tiomer prirodnog polisaharidnog ksiloglukana kako bi poboljšali permeabilnost i biološku raspoloživost leka (2,57 puta).

Takođe, čvrste lipidne nanočestice (*engl.* solid lipid nanoparticles, SLN) i nanostrukturirani lipidni nosači (*engl.* nanostructured lipid carriers, NLC) privukli su veliku pažnju u oralnoj isporuci lekova. SLN se sastoje od biorazgradivih lipida poput visoko prečišćenih triglicerida, monoglicerida, čvrstih masti, kompleksnih smeša glicerida ili voskova koji su čvrsti na fiziološkoj temperaturi. NLC sadrže smešu tečnih lipida (ulja) i čvrstih lipida u odgovarajućim proporcijama. Prisustvo tečnih lipida u NLC omogućava veću sposobnost za inkapsulaciju aktivnih supstanci i veću stabilnost nosača u poređenju sa SLN (Muchow i sar., 2008). Čvrst matriks SLN omogućava zaštitu hemijski nestabilnih supstanci od degradacije i produženo oslobađanje lekovite supstance. Osim toga, SLN se mogu koristiti za povećanje biološke raspoloživosti lekovite supstance povećanjem njihove difuzije kroz biološke membrane i zaštitom od metaboličkih enzima (Westesen i Siekmann, 2005). SLN imaju niz potencijalnih prednosti, a neki od njih su upotreba fizioloških lipida i širok raspon primene (dermalno, *per os*, *i.v.*). Zbog prisustva čvrstih lipida, SLN i NLC imaju sposobnost produženog oslobađanja lekovite supstance. Cortesi i saradnici (2011) su pokazali da u SLN može da se inkapsulira velika količina aciklovira i da se poveća difuzija leka 1,2 puta u poređenju sa rastvorom aciklovira, a samim tim i permeabilnost kroz površinski sloj kože *stratum corneum*. Velmurugan i saradnici (2011) su formulisali SLN sa aciklovirom za oralnu primenu metodom emulgovanja i

očvršćavanja na niskim temperaturama upotrebom lecitina iz soje kao surfaktanta, natrijum tauroholata kao kosurfaktanta i stearinske kiseline kao lipida. Optimizovana formulacija SLN sa aciklovirom je pokazala maksimalni procenat inkapsulacije lekovite supstance, a dobijeni procenat *in vitro* oslobađanja je bio oko 85,87% posle 12 h. Takođe, Cortesi i saradnici (2008) su dizajnirali SLN sa aciklovirom. Utvrđeno je da je antivirusna aktivnost aciklovira inkapsuliranog u SLN uporediva sa aktivnošću rastvora slobodnog aciklovira (1 – 0,5 μM), što je mereno na Vero ćelijama. Nedavna istraživanja takođe pokazuju da je moguće pripremiti SLN ili NLC u obliku praška koristeći tehnike vlažne granulacije i/ili adsorpcije. Takođe je moguće pripremiti SLN ili NLC sa anhidrovanim tečnostima kao što je PEG 600 i ova tečna disperzija može da se puni u meke ili tvrde želatinske kapsule. Međutim, na farmaceutskom tržištu još uvek nisu dostupni preparati tipa SLN ili NLC za oralnu primenu.

Takođe, u poslednje vreme pažnju istraživača u oblasti nanoinkapsulacije aciklovira u lipidne nanonosača privlače lipidne nanokapsule (*engl.* lipid nanocapsules (LNC)). Abozaid i saradnici (Abozaid i sar., 2018) su formulisali LNC na bazi hidrosietilceluloze sa aciklovirom (0,3%) u obliku gela za oromukoznu primenu. Kao rezultat je dobijena povećana permeabilnost aciklovira kroz membranu pilećeg embriona u *ex vivo* testu u poređenju sa komercijalno dostupnim kremom sa 5% aktivne supstance, što je ukazalo na mogućnost značajnog poboljšanja isporuke aciklovira u virusne lezije na bukalnoj sluzokoži.

1.2.4. Inkapsulacija aciklovira u nosače tipa mikroemulzija

Mikroemulzije su termodinamički stabilne, providne (transparentne) nanodisperzije koje se formiraju spontano u smešama surfaktanata, kosurfaktanta, ulja i vode koje su optimizovane u pogledu kvalitativnog i kvantitativnog sastava (Đekić, 2011; Đorđević, 2004). Veličina kapi dispergovane faze kod mikroemulzija je ispod 100 nm. Mikroemulzije pokazuju specifične prednosti u primeni slabo rastvorljivih lekovitih supstanci, uključujući visok kapacitet za rastvaranje ili solubilizaciju kao i potencijal za modifikovanje permeabilnosti bioloških membrana koje predstavljaju barijere za apsorpciju aktivnih supstanci (Đekić i Primorac, 2010; Đekić i Primorac, 2017).

Primenom mikroemulzije sa aciklovirom na kožu Glisoni i saradnici (2012) su postigli potpuno povlačenje herpetičkih lezija na koži. Voda-u-ulju mikroemulzija koja sadrži Tween[®] 80 i Span[®] 20 u odnosu 3:2 kao nejonske surfaktante i uz dodatak dimetilimidazolium dimetilfosfata je pokazala u *in vivo* studiji dobru permeabilnost kroz kožu, a samim tim i poboljšan terapijski efekat. Niska citotoksičnost je utvrđena primenom metode na modelu humanog epidermisa LabCiteTM epi-MODEL12 (Glisoni i sar., 2012).

Peira i saradnici (2009) su formulisali mikroemulzije koristeći 1-dekanol, oleinsku kiselinu i oleil alkohol kao uljanu fazu, dietilnglikol monoetiletar (Transcutol[®]) i 1,2-heksandiol kao surfaktante i fosfatni pufer pH 6,0 kao vodenu fazu, sa ciljem da se proceni uticaj različitih ulja na permeabilnost i akumulaciju aciklovira u/kroz svinjsku kožu pune debljine. Kod mikroemulzija sa 1-dekanolom postignuta je dvostruko veća akumulacija aciklovira, u poređenju sa kontrolnom suspenzijom aciklovira, pri čemu je struktura *stratum corneum*-a ostala intaktna.

Kandasamy i saradnici (2018) su formulisali jonska tečnost-u-ulju mikroemulzije sa aciklovirom i metotreksatom za transdermalnu primenu. Kao sastojci mikroemulzija korišćene su tri različite jonske tečnosti (1-etil-3-metilimidazolijum acetat, trietilamonijum acetat i dietilamonijum acetat), polisorbitat 80, sorbitan laurat i izopropilmiristar. Najbolja rastvorljivost ispitivanih aktivnih supstanci postignuta je korišćenjem amonijum acetata. Utvrđeno je da je na kapacitet za solubilizaciju jonskih tečnosti značajno uticao maseni odnos nejonskih surfaktanata, pri čemu je optimalna vrednost polisorbitat 80:sorbitan laurat iznosila 3:1. Izbor jonske tečnosti uticao je značajno na veličinu kapi dispergovane faze mikroemulzija i njihov kapacitet za inkapsulaciju aktivne supstance koji je bio veći u prisustvu trietilamonijum acetata i dietilamonijum acetata.

Ghosh i saradnici (2006) su formulisali mikroemulziju sa aciklovirom za peroralnu primenu sa ekscipijensima LabrafacTM (trigliceridi srednje dužine lanaca) kao uljane faze, Labrasol[®] (PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi) kao surfaktanta i Plurol[®] Oleique (poligliceril-3-dioleat) kao kosurfaktanta. Aciklovir, kao slabo rastvorljiva supstanca, je pokazao dobru rastvorljivost u mikroemulziji koja je u svom sastavu sadržala Labrafac[®] (10%), Labrasol[®] (32%), Plurol[®] Oleique (8%), i vodu (50%). *In vitro* test difuzije i *in vivo* ispitivanja su pokazali povećanje biološke raspoloživosti 12,78 puta nakon oralne primene u poređenju sa komercijalno dostupnim tabletama (Ghosh i sar., 2006). Veća pažnja posvećuje se razvoju prekoncentrata

mikroemulzija, koji sadrže sve komponente mikroemulzija osim vodene faze (samo-mikroemulgujući sistemi) zbog veće fizičke stabilnosti i visoke efikasnosti inkapsulacije aktivnih supstanci (Đekić i Primorac, 2010).

1.3. Samo-mikroemulgujući sistemi kao nosači lekovitih supstanci za peroralnu primenu

1.3.1. Kategorizacija samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci prema kriterijumima *Sistema klasifikacije lipidnih formulacija*

Peroralna primena lekova je jednostavna i prihvatljiva najširoj populaciji pacijenata, te je stoga razvoj novih strategija za poboljšanje apsorpcije nisko rastvorljivih i/ili permeabilnih aktivnih supstanci permanentan istraživački interes (Mrsny, 2012). Najviše su se do sada koristili različiti pristupi za prevazilaženje niske rastvorljivosti aktivnih supstanci u vodi, u poređenju sa svim ostalim ograničavajućim faktorima za peroralnu isporuku lekova (Porter i sar., 2007). Nasuprot tome, formulacioni pristupi koji poboljšavaju permeabilnost supstance kroz intestinalnu membranu su znatno ređe razmatrani. Za lekovite supstance sa niskom rastvorljivošću u vodi koje pokazuju ograničenu apsorpciju, razvijeno je i primenjeno nekoliko strategija koje uključuju povećanje njihove brzine rastvaranja i/ili rastvorljivosti u GIT-u. To podrazumeva smanjenje veličine čestica, primenu nanotehnologija, formiranje soli, ko-kristala, polimorfnih oblika, čvrstih disperzija i formulacija na bazi lipida (Kuminek i sar., 2016; Serajuddin, 2007; Taylor i Zhang, 2016; Williams i sar., 2013).

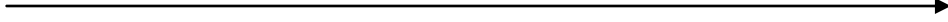
Razvoj formulacija na bazi lipida (*engl.* Lipid based formulations) se skoro dve decenije razmatra kao obećavajuća strategija za poboljšanje peroralne isporuke lekovitih supstanci koje pokazuju nisku rastvorljivost i/ili permeabilnost u gastrointestinalnom traktu (Feeney i sar., 2016). Iako se u literaturi pojavljuju primeri razvoja lipidnih formulacija od pre najmanje 50 godina (Bates i sar., 1966; Kraml i sar., 1962), prvi značajniji radovi pojavili su se tek krajem

osamdesetih godina (Myers i Stella, 1992; Palin i sar., 1982; Palin i Wilson, 1984; Pouton, 1985; Raymond i Sucker, 1988) a njihov broj se značajno povećao tokom poslednjih dvadeset godina kada je stavljen fokus na detaljnoj proceni uticaja lipida na povećanje apsorpcije lekova (Bloedow i Hayton, 1976; Yamahira i sar., 1978). Formulacije kao što su uljane suspenzije i emulzije sa sulfonamidima opisane su već u 1950-tim (Svenson i sar., 1956). Sve veća primena mekih želatinskih kapsula dodatno je olakšala oralnu primenu lipidnih formulacija, kao jednodoznih čvrstih farmaceutskih oblika, a kombinovanje lipida sa surfaktantima dovelo je do razvoja niza formulacija koje mešanjem sa tečnostima u GIT-u formiraju koloidne sisteme koji značajno povećavaju rastvorljivost lekova u biološkoj sredini.

Sistem klasifikacije lipidnih formulacija (*engl.* Lipid Formulation Classification System (LFCS)) je predložen 2000. godine (Pouton, 2000), a zatim dopunjen 2006. godine (Pouton, 2006) tako da sadrži četiri osnovna tipa lipidnih formulacija u zavisnosti od vrste i koncentracije upotrebljenih ekscipijenasa i karakteristika procesa *in vivo* kojima formulacija podleže u GIT-u i to: dispergovanje u GIT tečnostima, varenje (digestija) ekscipijenasa (u prvom redu lipida) i formiranje nosača koji solubilizuje lekovitu supstancu. Tabela 3 pokazuje osnovne razlike između lipidnih formulacija tipa I, II, IIIA, IIIB i IV, a koje se odnose na sastav, osnovne karakteristike i njihove prednosti i nedostake.

Mada sistem klasifikacije lipidnih formulacija olakšava skrining najprikladnijih formulacija za određene lekovite supstance, u skladu sa njihovim fizičko-hemijskim osobinama, kao i očekivanih procesa *in vivo* koji su od značaja za brzinu i obim apsorpcije aktivne supstance, još uvek nije detaljnih podataka i konačnih stavova o uticaju formulacionih parametara na procese u GIT-u i apsorpciju aktivne supstance, što predstavlja podsticaj za intenziviranje istraživanja u ovoj oblasti. Kao ključna karakteristika lipidnih formulacija koja ima kritični značaj za pospešivanje apsorpcije lekovitih supstanci uobičajeno se navodi njihov uticaj na poboljšanje rastvorljivosti aktivnih supstanci u GIT-u, međutim, poslednjih godina se polje istraživanja širi i na procenu značaja i uticaja ovih formulacija na permeabilnost peroralno primenjenih lekova (Feeney i sar., 2016).

Tabela 3. Sistem klasifikacije lipidnih formulacija (Porter i sar., 2008)

Tip formulacije	Tip I	Tip II	Tip IIIA	Tip IIIB	Tip IV
Sastav formulacije	Povećanje hidrofilnosti formulacije 				
Trigliceridi ili mešani gliceridi (%)	100	40-80	40-80	< 20	-
Surfaktanti (HLB < 12) (%)	-	20-60	-	-	0-20
Surfaktanti (HLB > 12) (%)	-	-	20-40	20-50	30-80
Hidrofilni korastvarači (%)	-	-	0-40	20-50	0-50
Veličina kapi nakon dispergovanja (nm)	>1000	100-250	100-250	50-100	< 50
Značaj procesa dispergovanja formulacije za solubilizaciju aktivne supstance	Ograničen uticaj	Nema uticaja na solubilizaciju	Rizik od smanjenja kapaciteta za solubilizaciju	Visok rizik od smanjenja kapaciteta za solubilizaciju	Vrlo visok rizik od smanjenja kapaciteta za solubilizaciju
Značaj digestije sastojaka formulacije u GIT-u za apsorpciju aktivnih supstanci	Digestija je neophodna	Digestija nije neophodna ali je poželjna	Digestija nije značajna ali je poželjno da ekscipijensi ne podležu ovom procesu	Digestija nije značajna	Digestija nije značajna

Lipidne formulacije **Tip I** predstavljaju rastvore aktivnih supstanci u smeši dugolančanih ili srednjelančanih triglicerida, samostalno ili u kombinaciji sa parcijalnim gliceridima. Pogodne su za inkorporiranje izrazito lipofilnih lekovitih supstanci sa koeficijentom lipidno-vodne raspodele $\log P > 4$ koje imaju zadovoljavajuću rastvorljivost u upotrebljenom uljanom vehikulumu (Pouton, 2000). Spontano dispergovanje ovakvih formulacija u GIT-u je vrlo ograničeno i neophodno je varenje lipida u prisustvu pankreasne lipaze/kolipaze, kao i endogene žučne soli i fosfolipida kako bi se obezbedilo formiranje koloidne disperzije endogenih micela u kojima je solubilizovana aktivna supstanca (Porter i sar., 2008). Glavni nedostaci ove grupe lipidnih formulacija je što nisu pogodne za lekovite supstance koje nisu izrazito lipofilnog karaktera, podložne su oksidaciji, a apsorpcija lekovitih supstanci je uslovljena varenjem lipida u GIT-u (Pouton, 2006).

Lipidne formulacije **Tip II** se obično označavaju kao samoemulgujući nosači lekovitih supstanci (*engl.* Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS)) i predstavljaju izotropne smeše ulja, lipofilnih surfaktanta sa HLB < 12 (*engl.* Hydrophilic–Lipophilic Balance – Hidrofilni-lipofilni balans) i aktivne supstance, koje mešanjem sa tečnostima u GIT-u spontano formiraju finu ulje-u-vodi (U/V) emulziju, uglavnom sa veličinom kapi 100 – 250 nm (Pouton, 2000). Prisustvo površinski aktivnih supstanci i korastvarača obezbeđuje značajno veću rastvorljivost lekovitih supstanci sa $2 < \log P < 4$, koje pokazuju slabu rastvorljivost u vodi i lipidima (Pouton, 2000). Proces samo-emulgovanja se generalno odvija pri sadržaju surfaktanta iznad 25%. Međutim, pri višem sadržaju surfaktanta (~ više od 50 – 60%, u zavisnosti od vrste) proces emulgovanja može biti kompromitovan stvaranjem viskoznih tečno kristalnih mezofaza na međupovršini ulje/voda (Cuine i sar., 2008; Pouton, 1985). Slabo rastvorljive lekovite supstance se mogu rastvoriti u formulaciji tipa SEDDS, koja se zatim može puniti u tvrde ili meke želatinske kapsule kako bi se dobio pogodan farmaceutski oblik. Lipidne formulacije Tip II omogućavaju prevazilaženje postepenog i sporog oslobađanja lekovite supstance, koje je uobičajeno kod konvencionalnih čvrstih farmaceutskih oblika, i formiranje relativno velike međupovršine na granici uljanih kapi i vodene sredine u GIT-u, preko koje se efikasno raspodeljuje i oslobađa lekovita supstanca i time postaje dostupna za apsorpciju (Carrigan i sar., 1973; Constantinides, 1995; Gershnik i Benita, 2000).

Lipidne formulacije **Tip III** sadrže aktivnu supstancu inkorporiranu u izotropnoj mešavini ulja, surfaktanata (uglavnom $HLB > 12$) i jednog ili više hidrofilnih korastvarača (Porter i sar., 2008). Da bi se napravila razlika između kvalitativno ekvivalentnih lipidnih formulacija Tip III prema sistemu klasifikacije lipidnih formulacija, uvedeni su podtipovi IIIA i IIIB (Pouton, 2006). Lipidne formulacije podtipa IIIA obično sadrže veću koncentraciju lipida (40 – 80%) i manji procenat surfaktanata (20 – 40%) i hidrofilnih korastvarača (0 – 40%) i u GIT-u formiraju ulje-u-vodi nanoemulzije sa prosečnom veličinom kapi od 100 – 250 nm. Zbog toga se uobičajeno označavaju kao samo-nanoemulgujući nosači lekovitih supstanci (*engl.* Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS)). Lipidne formulacije podtipa IIIB su hidrofilnije i u svom sastavu imaju niži sadržaj lipida ($< 20\%$) i višu koncentraciju surfaktanata (20 – 50 %), čiji je $HLB > 12$, i hidrofilnih korastvarača (20 – 50%), a sa vodenim medijumima i GIT tečnostima se spontano mešaju i formiraju nanodisperzni sistem tipa ulje-u-vodi mikroemulzije sa kapljicama veličine do 100 nm (Pouton, 2006), te se češće nazivaju samo-mikroemulgujući nosači lekovitih supstanci (*engl.* Self-microemulsifying drug delivery systems, SMEDDS). Prema tome, sastav SMEDDS i SNEDDS varira u pogledu vrste i/ili koncentracije upotrebljenih ekscipijenasa, čime se stvara razlika u brzini njihovog dispergovanja u biološkoj sredini, vrsti koloidnog sistema formiranog *in situ*, sudbini aktivne supstance i njenoj raspoloživosti za apsorpciju (Kuentz, 2012; Porter i sar., 2008; Pouton, 2006). Dosadašnja istraživanja u ovoj oblasti ukazuju na značajno veći potencijal SMEDDS za poboljšanje apsorpcije aktivnih supstanci, u poređenju sa SNEDDS, kao i u odnosu na ostale tipove formulacija na bazi lipida (Feeney i sar., 2016). To se prvenstveno dovodi u vezu sa specifičnim svojstvima *in situ* formiranih nosača tipa mikroemulzija. Mikroemulzije su termodinamički stabilni sistemi sa kapljicama dispergovane faze veličine do 100 nm. Za razliku od kinetički stabilnih nanoemulzija, proces samo-mikroemulgovanja je relativno brz u poređenju sa procesom (nano)emulgovanja i nije uslovljen u značajnoj meri uticajem hrane i endogenih faktora kao što su varenje lipida i sekrecija žuči i pankreasnog soka, što potencijalno doprinosi povećanju stepena uniformnosti i reproduktivnosti procesa apsorpcije i biološke raspoloživosti. Lipidne formulacije podtipa IIIB obično su pogodnije za dispergovanje u poređenju sa podtipom IIIA, iako se njihovom primenom javlja veći rizik za precipitaciju lekovite supstance, s obzirom da imaju niži sadržaj lipida (Porter i sar., 2008).

Lipidne formulacije **Tip IV** sadrže aktivnu supstancu rastvorenu u smeši surfaktanata visoke HLB vrednosti ($HLB > 12$) i/ili hidrofilne korastvarače. U ovom slučaju, u GIT-u se od molekula surfaktanata formiraju micelle koje sadrže solubilizovanu lekovitu supstancu, što dovodi do brzog oslobađanja i koje se može povoljno odraziti na njenu apsorpciju (Gao i sar., 1998). Međutim, postoji visoki rizik da se usled mešanja sa tečnostima u GIT-u koncentracija surfaktanata smanji ispod kritične micelarne koncentracije, zbog čega dolazi do precipitacije aktivne supstance, što zapravo ograničava njenu dostupnost za apsorpciju (Pouton, 2006). Takođe, izuzetno visoka koncentracija surfaktanata povećava rizik od iritacije sluzokože i loše gastrointestinalne podnošljivosti (Song, 2011), te zaostaju u pogledu biokompatibilnosti u odnosu na ostale tipove lipidnih formulacija.

Uzimajući u obzir navedene karakteristike različitih tipova lipidnih formulacija, lipidne formulacije Tipa III, a naročito podtipa IIIB (samo-mikroemulgujući nosači lekovitih supstanci, SMEDDS), su prepoznate kao potencijalno superiornije, što je bilo podsticajno za progresivni porast broja sprovedenih i objavljenih studija tokom protekle decenije (Feeney i sar., 2016; Đekić i Primorac, 2010; Đekić i Primorac, 2017). Ipak, aspekti formulacije, efikasnosti u pogledu poboljšanja apsorpcije aktivne supstance i bezbednosti ovih sistema, još uvek nisu istraženi u dovoljnoj meri za postavljanje generalnih zaključaka.

1.3.2. Izazovi u formulaciji samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci

Uz veliki izbor tečnih ili polučvrstih komercijalno dostupnih farmaceutskih ekscipijenasa iz grupe ulja, surfaktanata različite HLB vrednosti i hidrofilnih korastvarača, može se očekivati da je razvoj samo-mikroemulgujućih formulacija relativno jednostavan. Međutim, formulisanje sistema koji će ispuniti brojne zahteve u pogledu *in vitro* i *in vivo* performansi kao nosača lekovite supstance, pogodnosti za pripremu finalnog farmaceutskog oblika pogodnog za peroralnu primenu, stabilnosti i bezbednosti, zahteva detaljno i sveobuhvatno razmatranje formulacionih parametara (izbora sastojaka i njihovih koncentracija) (Đekić i Primorac, 2010; Đekić i Primorac, 2014; Đekić i Primorac, 2017). Iako SMEDDS u brojnim publikacijama predstavljaju važan pristup za poboljšavanje biološke raspoloživosti nakon oralne primene slabo rastvorljivih i/ili slabo permeabilnih lekovitih supstanci održavajući ih u rastvorenom stanju u *in*

situ formiranom nanodisperznom nosaču i/ili za povećanje brzine i stepena apsorpcije (Hintzen i sar., 2013; Hintzen i sar., 2014; Kollipara i Gandhi, 2014; Porter i sar., 2008), jedan od njihovih glavnih nedostataka je otežana formulacija zbog ograničenog broja pogodnih ekscipijenasa i teško predvidivih odnosa u kojima se oni mogu kombinovati da formiraju sistem navedenog tipa.

1.3.2.1. Kriterijumi za izbor ekscipijenasa u samo-mikroemulgujućim nosačima lekovitih supstanci

Ulja predstavljaju najvažniji ekscipijens u formulaciji SMEDDS za rastvaranje lipofilnih lekovitih supstanci u potrebnoj količini, utiču na proces samo-mikroemulgovanja, a takođe mogu doprineti i apsorpciji aktivnih supstanci u GIT-u pre svega povećavajući udeo inkorporiranog lipofilnog leka. Glavni kriterijum za odabir ulja je visoka rastvorljivost lekovite supstance u njemu, čime se smanjuje zapremina formulacije za primenu odgovarajuće doze. Biljna ulja imaju mnoge prednosti kada se koriste kao sastavni deo lipidnih formulacija, a jedna od najvažnijih je njihova bezbedna upotreba. Biljna ulja se sastoje od mešavine triglicerida koji sadrže masne kiseline različite dužine lanaca i različitog stepena nezasićenosti. Ulja iz različitih biljnih vrsta imaju različite udele masnih kiselina (Gibson, 2007; Jannin i sar., 2008). Trigliceridi se mogu podeliti na kratkolančane (manje od 5 ugljenikovih atoma), srednjelančane (6 – 12 ugljenikovih atoma) i dugolančane (više od 12 ugljenikovih atoma) trigliceride. Srednjelančani (*engl.* medium-chain triglycerides (MCT)) i dugolančani (*engl.* long-chain triglycerides (LCT)) trigliceridi, različitog stepena zasićenja, su česti sastojci lipidnih formulacija i pogodni su za rastvaranje liposolubilnih lekovitih supstanci. Generalno, biljna ulja sadrže nezasićene dugolančane trigliceride koji se dobijaju iz sojinog, šafranovog, maslinovog, kikiriki, suncokretovog i susamovog ulja, dok se zasićeni srednjelančani trigliceridi dobijaju esterifikacijom frakcionisanih masnih kiselina iz kokosovog i palminog ulja. Destilacijom kokosovog ulja se dobijaju trigliceridi srednje dužine lanaca, poznati i kao gliceril trikaprilat/kaprat, koji su dostupni od nekoliko dobavljača i često se sastoje od gliceril estara sa pretežno zasićenim C8 (50 – 80%) i C10 (20 – 45%) masnim kiselinama. Tačka očvršćavanja/topljenja određenog ulja se povećava proporcionalno sa povećanjem dužine lanca masnih kiselina i smanjuje se sa povećanjem stepena nezasićenosti što povećava njihovu osetljivost na oksidaciju. Trigliceridi su visoko lipofilni i njihova sposobnost rastvaranja

lekovitih supstanci se najčešće povezuje sa udelom estarskih grupa, zbog čega MCT obično imaju veći kapacitet za rastvaranje lekovitih supstanci od LCT (Anderson, 1999; Cao i sar., 2004). Takođe, prema Deckelbaumu i saradnicima (1990), MCT pokazuju veću pokretljivost (mobilnost) na međupovršini ulje/voda nego LCT, što je povezano sa njihovom bržom hidrolizom, zbog čega je potrebna veća koncentracija surfaktanta (kao što je na primer Cremophor® RH40) kada se koristi LCT kao uljana faza u poređenju sa MCT. Pored toga, MCT ne podležu oksidaciji, tako da predstavljaju prvi izbor kao sastavni deo lipidnih formulacija. Nemodifikovana biljna ulja predstavljaju biokompatibilne lipidne ekscipijense, ali ne omogućavaju rastvaranje velikih doza u vodi slabo rastvorljivih lekovitih supstanci i manje su efikasna u procesima samo-mikroemulgovanja, čime se ograničava njihova upotreba u formulaciji SMEDDS. Radi prevazilaženja nedostataka biljnih ulja, kao što je oksidativna degradacija, koriste se modifikovana i hidrogenizovana biljna ulja u kombinaciji sa nejonskim surfaktantima (Gershnik i Benita, 2000). Neki od primera ovakvih ulja su hidrogenizovano ulje semena pamuka (Lubritab®, JRS Pharma), hidrogenizovano palmino ulje (Dynasan®, Cremer Oleo Division), hidrogenizovano ricinusovo ulje (Cutina HR®, BASF Care Creations) i hidrogenizovano sojino ulje (Lipo®, Vantage). Noviji pristupi formulaciji SMEDDS podrazumevaju korišćenje polusintetskih derivata srednjelančanih triglicerida koji pokazuju svojstva surfaktanta i amfifilnih jedinjenja. U takvim slučajevima lipofilni surfaktanti mogu imati ulogu "hidrofilnog ulja" u formulaciji. Koncentracija ulja u formulaciji SMEDDS iznosi 40 – 80%, i uglavnom se koriste modifikovana i hidrogenizovana biljna ulja jer pokazuju veću rastvorljivost lekovitih supstanci i pogodna su za proces samo-mikroemulgovanja (Ingle, 2013). Takođe, mešanjem triglicerida sa mono- i di-gliceridima može se povećati rastvorljivost za hidrofobne lekove (Gao i sar., 1998; Ingle, 2013). Parcijalni gliceridi (smeša mono-, di- i triglicerida) nastaju kao proizvod glicerolize, odnosno transesterifikacije triglicerida sa glicerolom, zagrevanjem pomoću alkalnog katalizatora sa ciljem da se poveća hidrofilnost biljnih ulja i smanji podložnost oksidaciji. Najčešće korišćeni su: gliceril monokaprilokapat (Capmul® MCM, Abitec); gliceril monostearat (Geleol™ (Gattefosse), Invitor® 191 (Sancai Industry Co.), Cutina™ GMS (BASF) ili Tegin™ (Surfchem UK)); gliceril distearat (Precirol™ ATO 5, Gattefosse); gliceril monooleat (Peceol™, Gattefosse); gliceril monolinoleat (Maisine™ 35-1, Gattefosse); gliceril dibehenat (Compritol® 888 ATO, Gattefosse).

Surfaktanti koji se koriste u formulaciji SMEDDS treba da omoguće smanjenje međupovršinskog napona između uljane i vodene faze na vrednost koja olakšava obrazovanje mikroemulzije. Osnovne karakteristike surfaktanata povezane su sa amfilnom (bipolarnom) prirodom molekula, koja je uslovljena njihovom asimetričnom strukturom. Surfaktant može na različite načine da utiče na apsorpciju leka, obično tako što usporava brzinu pražnjenja želuca i kretanje leka do mesta apsorpcije povećanjem viskoziteta formulacije ili promenom permeabilnosti bioloških membrana (Shobhit i sar., 2012). Uobičajena koncentracija surfaktanta u samo-mikroemulgujućim nosačima lekovitih supstanci koja je potrebna da bi se formiralo i održalo stanje mikroemulzije u GIT-u, kreće se od 20% do 50%. Velika količina surfaktanta može dovesti do iritacije u GIT-u. Izbor surfaktanta kao farmaceutskog ekscipijensa obuhvata razmatranje toksičnosti date supstance, posebno kada se radi o formulisanju farmaceutskih oblika koji se primenjuju peroralno. Danas je na tržištu prisutan veliki broj surfaktanata prirodnog, polusintetskog ili sintetskog porekla, pod različitim komercijalnim nazivima, ali manji broj njih spada u kategoriju farmaceutskih ekscipijenasa. Prednost imaju surfaktanti prirodnog porekla (Constantinides, 1995; Holm i sar., 2002; Hauss i sar., 1998), međutim ova jedinjenja često poseduju nizak kapacitet za solubilizaciju lipofilnih i slabo rastvorljivih lekovitih supstanci.

Jedno od ranih zapažanja je da je za postizanje efikasne apsorpcije, neophodno da se spreči precipitacija lekovite supstance u lumenu GIT-a, održavajući je u solubilizovanom obliku na mestu resorpcije (Shah i sar., 1994). Prilikom formulisanja lipidnih formulacija najčešće se koriste nejonski surfaktanti sa visokom HLB vrednošću (Chen, 2008; Prasad i sar., 2013), ali se po kriterijumima sistema klasifikacije lipidnih formulacija mogu koristiti samo u formulacijama tipa III ili tipa IV. HLB vrednost predstavlja odnos hidrofilnih i hidrofobnih grupa u molekulu surfaktanta i ne uzima u obzir njegove interakcije sa uljem i vodom (Griffin, 1949). Surfaktanti sa $HLB \geq 12$ u koncentraciji koja je iznad kritične micelarne koncentracije, mogu obrazovati micelle u vodenim rastvorima (Wang i sar., 2011). Sposobnost micela da solubilizuju u vodi nerastvorne lekovite supstance ima veliki značaj za farmaceutsku primenu. Visoka HLB vrednost i hidrofilnost surfaktanata su neophodni za trenutno formiranje ulje – u – vodi mikroemulzija nakon kontakta SMEDDS sa vodenim medijumom i / ili brzo širenje formulacije kroz vodenu fazu. Takođe je poznato da su nejonski surfaktanti bezbedniji u poređenju sa jonskim površinski aktivnim materijama. Katjonski surfaktanti su više toksični u odnosu na anjonske, koji su više

toksični u odnosu na nejonske surfaktante. Postoji veliki broj nejonskih surfaktanta, za koje postoje podaci o njihovoj bezbednosti prilikom peroralne primene. Većina nejonskih surfaktanata poseduje peroralnu LD50 vrednost od 50 g/kg, tako da se uobičajene količine surfaktanta u formulacijama namenjenim za jednokratnu peroralnu primenu mogu smatrati bezbednim i dobro podnošljivim (Attwood i Florence, 1983).

Prilikom razvoja lipidnih formulacija najviše se koriste nejonski surfaktanti kao što su sorbitanski estri, polisorbati, makrogolni etri masnih kiselina i poloksameri. Masne kiseline koje ulaze u sastav nejonskih surfaktanata mogu biti nezasićene ili zasićene. Često korišćeni derivat ricinusovog ulja Cremophor[®] RH40 (makrogolglicerol hidroksistearat, odnosno makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje), tipičan je primer surfaktanta sa zasićenim alkil lancima koji je dobijen hidrogenizacijom biljnog ulja. Sličan sastav ima i Cremophor[®] EL (polioksietilovano ricinusovo ulje koje sadrži približno 40 oksietilenskih grupa na svaku trigliceridnu jedinicu), koji se takođe široko koristi, ali ima niži stepen etoksilacije, zbog čega ima ograničenu rastvorljivost u vodi, nije hidrogenizovan i nezasićen je. Takođe, nejonski surfaktanti tipa estara imaju bolji bezbedonosni profil i češće se koriste u odnosu na nejonske surfaktante tipa etara koji pritom i ne podležu varenju. Estri masnih kiselina i poliola su najveća grupa derivata biljnih ulja. Polioli mogu biti: poliglicerol (poligliceril oleat (Plurol[™] Oleique CC497, Gattefosse); propilen glikol (propilen glikol monokaprilat (Capriol[™] 90, Gattefosse), propilen glikol monolaurat (Lauroglycol[™] 90, Gattefosse); polietilenglikol (PEG-8 stearat (Mirj[®] 45, Sigma-Aldrich), PEG-40 stearat (Mirj[®] 52, Sigma-Aldrich), PEG-15 hidroksistearat (Solutol[®] HS15, Sigma-Aldrich), sorbitan ili monoanhidrosorbitol (sorbitan monooleat, (Span[®] 80, Sigma-Aldrich), polioksietilen-20 sorbitan monooleat ili polisorbati 80 (Tween[®] 80, Sigma-Aldrich). To su amfifilna jedinjenja sa srednje do visokim HLB vrednostima u zavisnosti od vrste alkohola i stepena esterifikacije (Katneni i sar., 2007; Seljak i sar., 2014).

Smanjenje međupovršinskog napona se retko postiže upotrebom jednog surfaktanta, što obično zahteva dodavanje kosurfaktanta. Odgovarajuća fluidnost međupovršinskog filma se postiže dodavanjem kosurfaktanata čime se omogućava spontani nastanak mikroemulzije, dok u njegovom odsustvu, surfaktant stvara rigidniji međupovršinski film zbog čega mikroemulzija može nastati ali samo u veoma ograničenom opsegu koncentracija. Prisustvo kosurfaktanta

povećava elastičnost međupovršinskog filma koji formira surfaktant između dispergovanih kapi i spoljašnje faze. Kao posledica toga dolazi do smanjenja dijametra kapi i povećanja stepena solubilizacije lekovite supstance u odnosu na čist surfaktant (Patel i Sawant, 2007). Alkoholi srednje dužine lanca (C3-C8), koji se obično dodaju kao kosurfaktanti, smanjuju međupovršinski napon, dok istovremeno povećavaju fluidnost međupovršinskog filma i na taj način povećavaju entropiju sistema (Lawrence i Rees, 2000).

Nekoliko registrovanih lipidnih formulacija u svom sastavu ima u vodi rastvorljive korastvarače (Strickley, 2004; Strickley, 2007). Najčešće korišćeni korastvarači su makrogol 400, propilen glikol, etanol i glicerol. Za opravdanost njihove upotrebe u okviru lipidnih formulacija se najčešće navode tri razloga. Etanol se koristio u prvim formulacijama sa ciklosporinom sa ciljem da poveća njegovu rastvorljivost. Takođe, koriste se i za povećanje kapaciteta formulacije za rastvaranje drugih lekovitih supstanci, međutim da bi se ovo postiglo, potrebne su visoke koncentracije korastvarača zbog čega se, s druge strane, povećava mogućnost da dođe do precipitacije lekovite supstance nakon dispergovanja formulacije u vodi. Za mnoge lekovite supstance važi da je odnos koncentracije korastvarača i rastvorljivosti logaritamski (Yalkowsky, 1999). Treći razlog za korišćenje korastvarača u lipidnim formulacijama je njihov povoljan uticaj na dispergovanje sistema koji sadrže visoku koncentraciju surfaktanata visoke HLB vrednosti. Postoje praktična ograničenja za koncentracije korastvarača, a neka od njih su njihovo ograničeno mešanje sa uljima i potencijalna inkompatibilnost sa omotačem kapsula (Cole i sar., 2008).

Upotreba hidrofilnih polimera u formulacijama samo-(mikro/nano)emulgujućih sistema sa visokim sadržajem slabo rastvorljivih lekovitih supstanci je opisana u literaturi (Morozowich i Gao, 2009). Makrogoli (polietilen glikoli, PEG) su netoksični i neiritabilni hidrofilni ekscipijensi koji su u širokoj upotrebi u farmaceutskim preparatima kao solubilizatori, plastifikatori i humektansi rastvorljivi u vodi i neisparljivim rastvaračima, kao stabilizatori emulzija (kada se koriste zajedno sa emulgatorima) i sredstva za geliranje u lipofilnim gelovima (Rowe i sar., 2009). Mogu se upotrebiti i kao solubilizatori teško rastvorljivih lekovitih supstanci u formulacijama tipa čvrstih disperzija (Kalepu i Nekkanti, 2015). Fizičko stanje makrogola na sobnoj temperaturi određeno je njihovom molekulskom masom. Tečni makrogoli molekulske

mase 200-600 g/mol su česte komponente tečnih samo-(mikro/nano)emulgujućih sistema (Kalepu i sar., 2013). Makrogoli molekulske mase ≥ 1000 g/mol su čvrsti na sobnoj temperaturi i imaju neutralan ukus i mogu se kombinovati sa drugim hidrofilnim ekscipijensima (npr. glicerolom) (Rowe i sar., 2009). Makrogol 8000 je beo čvrst vosak koji se na tržištu nalazi u obliku ljuspi. Pronađeno je da taj hidrofilni ekscipijens može da se upotrebi da se tečni sistem prevede u polučvrsti sistem (čvrsta disperzija), koji je bio pogodan za punjenje u tvrde kapsule (Law i sar., 2004), međutim, makrogol 8000 i drugi čvrsti makrogoli nisu do sada korišćeni kao sastojci SMEDDS.

1.3.2.2. Karakterizacija *in vitro* performansi samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci

Još uvek ne postoji jedinstveni pristup za brz skrining samo-mikroemulgujućih formulacija. Izbor polaznih supstanci uobičajeno se vrši na osnovu podataka o rastvorljivosti aktivne supstance, koji su dostupni u literaturi ili se eksperimentalno određuju. Novija razmatranja naglašavaju da zadovoljavajuća rastvorljivost lekovite supstance u pojedinačnim ekscipijensima ne podrazumeva i ekvivalentan kapacitet za njenu inkapsulaciju u samo-mikroemulgujućoj formulaciji, što zahteva širenje fokusa i na procenu rastvorljivosti u smešama ekscipijenasa (Patel i Patel, 2015). Pored toga, iako se prednost daje fizički stabilnijim formulacijama sa rastvorenim aktivnom supstancom, formulisanje suspenzije može da bude prihvatljivo za inkapsulaciju visoko doziranih teško rastvorljivih lekova, ali u ovom slučaju je neophodno pažljivo razmatranje stabilnosti (Feeney i sar., 2016). Pristup koji se uobičajeno primenjuje za određivanje udela sastojaka SMEDDS zasniva se na ispitivanju faznog ponašanja višekomponentnih sistema i mapiranju faznih dijagrama, pri čemu se nivo rezolucije povećava sa povećanjem broja pripremljenih formulacija i izvedenih pojedinačnih eksperimenata (Đekić, 2011). Opisani su pokušaji da se ovaj pristup racionalizuje integrisanjem sa matematičkim alatima kao što su veštačke neuronske mreže (Đekić i sar., 2011) i eksperimentalni dizajn (Krstić i sar., 2015; Sprunk i sar., 2012), međutim, broj formulacionih parametara koji se ovim putem mogu razmatrati simultano je ograničen i ne uzimaju se u obzir eksperimentalni uslovi pri kojima se odigrava proces dispergovanja formulacije (npr. temperatura, pH vodenog medijuma). Efikasnost samo-mikroemulgovanja, stabilnost i kapacitet *in situ* formiranog nosača za

solubilizaciju aktivne supstance u GIT-u predstavljaju ključna svojstva SMEDDS koja se dovode u vezu sa obimom i brzinom njenog oslobađanja i apsorpcije i poslednjih godina se razmatraju kao ključni kriterijumi za klasifikaciju samo-(mikro/nano)emulgujućih sistema (SMEDDS/SNEDDS) (Williams i sar., 2014). Time se u prvi plan ističe značaj razvoja i uključivanja *in vitro* testova za procenu disperzibilnosti, veličine kapi i profila oslobađanja aktivne supstance već u okviru skrininga SMEDDS formulacija (Feeney i sar., 2016; Morozowich i Gao, 2009).

Formulacija SMEDDS zahteva optimalan izbor biokompatibilnih ekscipijenasa (ulja, surfaktanata i korastvarača), kao i usklađivanje njihovih koncentracija, od čega zavise i dispergovanje SMEDDS i formiranje ulje-u-vodi mikroemulzionog nosača, pored fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance i uslova u GIT-u, kao što su temperatura, pH i jonski sastav gastrointestinalnih tečnosti. Visok sadržaj surfaktanata i hidrofilnih korastvarača je preduslov za zadovoljavajuću disperzibilnost sistema, međutim, nepovoljan je za očuvanje integriteta međupovršinskog filma i moguća je destabilizacija formiranog mikroemulzionog nosača i precipitacija aktivne supstance *in situ* što je čini nedostupnom za apsorpciju i stoga može da predstavlja ograničavajući faktor za razvoj i upotrebu SMEDDS (Đekić, 2011; Đekić i Primorac, 2014; Porter i sar., 2008; Pouton, 2006). Zbog toga je peroralna primena SMEDDS povezana sa rizikom od precipitacije aktivne supstance u GIT-u, ukoliko se smanji solubilizacioni kapacitet nosača, pa je potrebno optimizovati sadržaj i uzajamne kvantitativne odnose ekscipijenasa.

SMEDDS se brže disperguju u biološkoj sredini u poređenju sa SNEDDS, iako postoji veći rizik za precipitaciju lekovite supstance nakon dispergovanja zbog manjeg sadržaja lipida (Feeney i sar., 2016). Rizik za precipitaciju aktivne supstance se naročito povećava sa povećanjem koncentracije hidrofilnih korastvarača. Nakon dispergovanja SNEDDS nastaje neprozirna disperzija sa veličinom kapi > 100 nm dok nakon dispergovanja SMEDDS, koji ima veći sadržaj hidrofilnih surfaktanata i korastvarača, nastaje providna disperzija (ulje-u-vodi mikroemulzija) sa veličinom kapi ispod 100 nm (Feeney i sar., 2016). Međutim, kako je skoro zapaženo, u zanemarljivom broju slučajeva je vršena precizna identifikacija formiranog koloidnog sistema i diferencijacija mikroemulzija od nanoemulzija (Feeney i sar., 2016).

Pored značaja karakteristika koloidnog nosača za solubilizaciju aktivne supstance na mestu apsorpcije, od skora se naglašava i njegov potencijalni uticaj na permeabilnost (Feeney i sar., 2016). Razvoj metoda za procenu permeabilnosti je veoma složen, jer se moraju uzeti u obzir različiti faktori, a pre svega fizičko-hemijske osobine lekovite supstance i fiziološki uslovi na mestu resorpcije. Prema dostupnoj literaturi, najčešće korišćeni *in vitro* testovi za procenu permeabilnosti se izvode na veštačkim paralelnim membranama (*engl.* Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA)) i Caco-2 ćelijama. PAMPA je brz i ekonomičan test za procenu permeabilnosti lekovite supstance pasivnom difuzijom kroz biološke membrane GIT-a i pokazuje dobru korelaciju sa podacima dobijenim upotrebom Caco-2 ćelija (Avdeef i sar., 2005; Bermejo i sar., 2004; Yee, 1997).

1.3.2.3. Formulacija polučvrstih samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci

Formulacija polučvrstih samo-(mikro/nano)emulgujućih sistema iz odgovarajućih tečnih lipidnih formulacija može predstavljati novi pristup u razvoju nosača lekovitih supstanci koji ima za cilj da integriše prednosti polučvrstih farmaceutskih formulacija sa lipidnim formulacijama Tipa III (Jannin i sar., 2008). Uopšteno gledano, očekuje se da polučvrste samo-(mikro/nano)emulgujuće formulacije pokazuju:

- bolju fizičku stabilnost (naročito kod formulacija sa visokim sadržajem aktivne supstance),
- konzistenciju pogodniju za rukovanje u poređenju sa tečnim formulacijama niskog viskoziteta,
- mogućnost za postizanje kontrolisanog oslobađanja lekovite supstance (Dokania i Joshi, 2015; Pouton i Porter, 2008; Singh i Ranga, 2014).

Pored toga, dve novije studije (Hassan, 2014; Hassan i Mäder, 2015) su pokazale da polučvrsti samo-nanoemulgujući sistemi (SNEDDS) povećavaju rastvorljivost progesterona u različitim medijumima. U okviru istraživanja je za formulaciju polučvrstog samo-nanoemulgujućeg sistema prvi put korišćen PEG-30-di-polihidroksistearat (Cithrol[®] DPHS, Croda Inc.) kao ekscipijens iz grupe lipida, a pored njega je korišćen i gliceril monokaprilokaprat (Capmul[®]

MCM, Abitec) i makrogol-15 hidroksistearat (Kolliphor[®] HS15, BASF). Nakon dispergovanja, dobijen je nanodisperzni sistem sa veličinom kapi ispod 25 nm. Iako su formulacije na sobnoj temperaturi bile polučvrste, pokazale su veliku molekulsku pokretljivost tokom dispergovanja u vodenoj sredini na temperaturi tela, što je pokazano kao važno za predviđanje ponašanja samo-nanoemulgujućeg sistema *in vivo*. Pokazano je da polučvrsti SNEDDS omogućava povećanje rastvorljivosti progesterona (1% m/V) u različitim vodenim medijumima. Takođe, u zavisnosti od korišćenog medijuma, više od 80 – 90% progesterona nakon primene polučvrstog SNEDDS je ostao u rastvorenom obliku nakon 4 h od digestije. Glavna prednost upotrebe polučvrstog SNEDDS bila je smanjenje mogućnosti precipitacije progesterona nakon dispergovanja u gastrointestinalnim tečnostima. Obećavajući rezultati iz navedene dve studije su podsticajni za proširivanje ovog koncepta na nosače samo-mikroemulgujućeg tipa. Do sada nema objavljenih istraživanja koja se odnose na razvoj polučvrstih SMEDDS. Od posebnog interesa bi moglo da bude razmatranje aspekta stabilnosti polučvrstih SMEDDS, kao i značaj njihove disperzibilnosti u vodenim medijumima i molekularna pokretljivost inkapsulirane lekovite supstance u koloidnom nosaču koji se formira u vodenom medijumu na telesnoj temperaturi.

1.3.2.4. Formulacija tvrdih kapsula kao čvrstog farmaceutskog oblika samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci

Lekovi na bazi lipidnih formulacija čine oko 2-4% registrovanih lekova na tržištu Velike Britanije, SAD i Japana. Farmaceutski oblici ovih lekova su oralni rastvori, meke ili tvrde kapsule, pri čemu tvrde kapsule mogu biti izrađene od želatine ili hipromeloze (hidroksipropilmetilceluloza, HPMC). Pojedinačna doza lekovite supstance u kapsulama iznosi od 0,25 µg do 500 mg, a u oralnim rastvorima od 1 µg/ml do 100 mg/ml. Dnevna doza lekovite supstance koja se može primeniti u navedenim oblicima iznosi od 0,25 µg do 2000 mg (Haus, 2007). Primeri lekova u prometu zasnovanih na lipidnim formulacijama tip II i III koji su prisutni na tržištu su:

- Sandimmune[®], ciklosporin A, oralni rastvor i meke kapsule (Novartis) (SEDSS: kukuruzno ulje/maslinovo ulje, Labrafil[®] M 1944 CS, etanol, d- α -tokoferol);
- Neoral[®], ciklosporin A, oralni rastvor i meke kapsule (Novartis) (SMEDDS: mono-, di- i trigliceridi kukuruznog ulja, Cremophor[®] RH40, propilenglikol, etanol, d- α -tokoferol) ;

- Norvir[®], ritonavir, meke kapsule (Aesica Queenborough) (SEDDS: oleinska kiselina, Cremophor[®] EL, etanol, BHT);
- Kaletra[®], lopinavir + ritonavir, meke kapsule (Abbott) (SEDDS: oleinska kiselina, Cremophor[®] EL, propilenglikol);
- Rapamune[®], sirolimus, oralni rastvor (Wyeth-Ayerst) (SMEDDS: Phosal[®] 50, mono- i digliceridi, masne kiseline iz sojinog ulja, Polisorb 80, etanol, propilenglikol, askorbil-palmitat).

Peroralni put primene leka je često najprihvatljiviji za pacijenta, a lipidne formulacije nude velike mogućnosti jer se mogu naći u tečnim, polučvrstim i čvrstim farmaceutskim oblicima za peroralnu primenu. SMEDDS se mogu izraditi bez značajne dodatne energije ili zagrevanja, pa su pogodni i za inkapsulaciju termolabilnih lekovitih supstanci kao što su peptidi. Takođe, jednostavnost prebacivanja postupka izrade na uslove proizvodnje u pogonu (*engl.* scale-up) je još jedna od prednosti koja SMEDDS čini jedinstvenim u poređenju sa drugim nosačima lekovitih supstanci, poput čvrstih disperzija, liposoma i nanočestica, koji se takođe razmatraju za povećanje biološke raspoloživosti. Za proizvodnju SMEDDS se koristi uobičajena oprema kao što su jednostavne mešalice i punilica ukoliko se proizvodi oralni rastvor, čime se objašnjava i veliki interes industrije za ovaj tip sistema (Cole i sar., 2008; Hauss, 2007).

Tečni farmaceutski oblici sa lipidnim formulacijama, uključujući i samo-mikroemulgujuće nosače, imaju određene nedostatke, kao što su: niska stabilnost, ireverzibilna precipitacija lekovite supstance, visoki troškovi proizvodnje, otežan i zahtevan transport i relativno nizak stepen ponovljivosti (reproduktivnosti), nizak sadržaj lekovite supstance u samoj formulaciji, visok sadržaj surfaktanta koji mogu dovesti do potencijalne iritacije na nivou GIT-a. Tečni farmaceutski preparati u obliku oralnih rastvora tipa lipidnih formulacija su zbog navedenih nedostataka generalno manje pogodni za kliničku i komercijalnu primenu u poređenju sa čvrstim farmaceutskim oblicima (Cho i sar., 2013; Feeney i sar., 2016). SMEDDS su uglavnom tečni na sobnoj temperaturi zbog čega je neophodna inkapsulacija ili prevođenje u čvrst farmaceutski oblik, kako bi se olakšalo njihovo doziranje i prevazišli nedostaci tečnih farmaceutskih oblika. Zbog toga se poslednjih godina velika pažnja istraživača poklanja razvoju tvrdih kapsula kao čvrstog farmaceutskog oblika samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci. Prednosti punjenja samo-dispergujućih sistema u kapsule su: lakoća proizvodnje i lako doziranje

jednostavnom promenom volumena punjenja (Cole i sar., 2008; Strickley, 2007). Osim direktnog punjenja kapsula tečnim samo-mikroemulgujućim formulacijama, postupci koji se još navode u literaturi za prevođenje formulacije iz tečnog u čvrst farmaceutski oblik su: adsorpcija na čvrst nosač (Balakrishnan i sar., 2009), granulacija topljenjem (Gupta i sar., 2001), ekstruzija i sferonizacija (Newton i sar., 2001).

Lipidne formulacije, u koje se ubrajaju i SMEDDS, se uglavnom pune u meke ili tvrde kapsule uz izbor sastava omotača kapsule u zavisnosti od kompatibilnosti sa sadržajem formulacije i volumena punjenja. Omotači mekih i tvrdih kapsula se najčešće sastoje od želatine (iako su dostupne i druge polimerne alternative želatini) (Jones i sar., 2012), a sama upotreba kapsula ima određene prednosti i nedostatke. Zajednički nedostatak koji se javlja prilikom upotrebe tvrdih i mekih želatinskih kapsula je njihova mogućnost apsorpcije vlage bilo iz formulacije ili iz spoljašnje sredine, što može značajno promeniti izgled kapsule i narušiti njen integritet (Cole i sar., 2008). Kako bi se sprečila apsorpcija vlage iz okoline, predlaže se upotreba odgovarajućeg pakovanja. Prisustvo nečistoća (naročito peroksida (Jannin i sar., 2008)) u ekscipijensima može uticati na brzinu oslobađanja lekovite supstance (Hauss, 2007). Stoga hemijska i fizička stabilnost tečnih lipidnih formulacija mora biti razmatrana pre punjenja u kapsule (Stella, 2013), a dodatno treba razmotriti i kompatibilnost sa omotačem kapsule. Uprkos ovome, punjenje u kapsule je fleksibilan proces i predstavlja najprihvatljiviju strategiju za prevođenje lipidnih formulacija u čvrst farmaceutski oblik (Strickley, 2007).

Meke želatinske kapsule su zbog svojih debljih zidova kompatibilnije sa higroskopskim ekscipijensima kao što su makrogoli ili surfaktanti sa visokim HLB vrednostima i mogu se puniti skoro do maksimalnog kapaciteta (Hauss, 2007). Međutim, prisustvo plastifikatora u mekim želatinskim kapsulama može prouzrokovati migraciju lekovite supstance u omotač kapsule čime se utiče na njeno oslobađanje (Armstrong i sar., 1984). Pored toga, meke želatinske kapsule se moraju puniti pri relativno niskim temperaturama (najbolje oko 40 °C), što ograničava njihovu upotrebu za polučvrste formulacije, a njihovo punjenje je najčešće van mesta proizvodnje same formulacije, obično kod drugog ugovorenog proizvođača (Hauss, 2007). Sa druge strane, tvrde želatinske kapsule mogu da se pune na višim temperaturama i do 70 °C, mnogo lakše od mekih, a odsustvo plastifikatora smanjuje verovatnoću migracije lekovite supstance u omotač kapsule.

Pored toga, tvrde želatinske kapsule imaju niži sadržaj vlage što smanjuje mogućnost mešanja vode sa sadržajem kapsule. Rizik od curenja sadržaja je veći kod tvrdih kapsula, ali se može smanjiti pažljivim odabirom sadržaja za punjenje, dok se u tu svrhu koristi i proces zaptivanja kapsula kako bi se obezbedila dodatna zaštita (Cole i sar., 2008). Listu kompatibilnih tečnih i polučvrstih lipidnih ekscipijenasa sa omotačem tvrdih kapsula navode Cole i saradnici (Cole i sar., 2008). Glavna razmatranja u vezi tvrdih kapsula sa tečnim punjenjem povezana su sa kompatibilnošću punjenja sa omotačem kapsule (Cole i sar., 2008) i njihovom fizičkom stabilnošću (npr. curenje tečnih formulacija iz tvrdih kapsula, *Ostwald*-ovo sazrevanje kod suspenzija) (Jannin i sar., 2008; Kesisoglou i sar., 2007). Izbor tvrde kapsule zavisi pre svega od sastava i fizičkih karakteristika formulacije i temperature na kojoj proizvod treba da se puni. HPMC kapsule i polučvrste formulacije mogu se koristiti da poboljšaju probleme stabilnosti koji su tipični za želatinske kapsule sa hidrofilnim tečnim punjenjem (Cole i sar., 2008). Punjenje polučvrste lipidne formulacije u kapsule se vrši u četiri koraka: zagrevanje smeše lipidnih ekscipijenasa za približno 20 °C iznad temperature topljenja, rastvaranje ili suspendovanje lekovite supstance, punjenje kapsula formulacijom i naknadno hlađenje na sobnoj temperaturi. Ukoliko je lipidna formulacija tečna, proces punjenja kapsula je dvostepen i uključuje punjenje i zaptivanje kapsula, bilo dodatnom zaštitom na spoju dva dela tvrde želatinske kapsule ili mikrosprej zaptivanjem (oblaganje kapsula zaštitnim omotačem korišćenjem mikrospreja) (Jannin i sar., 2008). HPMC kapsule imaju niži sadržaj vlage (4 – 6%) u poređenju sa želatinskim kapsulama (13 – 15%), i stoga manju verovatnoću prolaska hidrofilnog ekscipijensa u omotač kapsule (Al-Tabakha, 2010). Pored toga, kompatibilnost sa većim brojem ekscipijenasa i hidrofilnim formulacijama, kao i zadovoljavajuća stabilnost pri visokim temperaturama (Honkanen i sar., 2002) predstavljaju potencijalne prednosti pri upotrebi HPMC kapsula, naročito kod polučvrstih SMEDDS. Prema tome, razvojem tvrdih kapsula kao čvrstog farmaceutskog oblika samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci mogle bi se kombinovati prednosti SMEDDS (poboljšana rastvorljivost i biorasploživost) sa prednostima čvrstih farmaceutskih oblika (visoka stabilnost i reproduktivnost, čvrst farmaceutski oblik pogodan za peroralnu primenu, jednostavnost rukovanja i transporta, niži troškovi proizvodnje, lakši prenos sa laboratorijskog na industrijski nivo, bolja prihvatljivost od strane pacijenta) (Prajapati i Patel, 2007; Tang i sar., 2008). U dosadašnjim istraživanjima nije razmatran razvoj polučvrstih SMEDDS u obliku tvrdih kapsula.

1.3.3. Karakteristike i značaj samo-mikroemulgujućih nosača za poboljšanje apsorpcije slabo rastvorljivih i/ili permeabilnih aktivnih supstanci

Većina novih lekovitih supstanci pokazuju nisku rastvorljivost u vodi (Dahan i sar, 2013; Lennernäs i Abrahamsson, 2005; Lipinski i sar., 2001), što može dovesti do nepotpune apsorpcije i smanjene biološke raspoloživosti (Martinez i Amidon, 2002; Wolk i sar., 2014). Da bi se prevazišli ovi nedostaci, razvijaju se različite formulacije koje povećavaju rastvorljivost lekovite supstance. Iako ovakve formulacije veoma često omogućavaju značajno povećanje prividne rastvorljivosti, njihov efekat na ukupnu apsorpciju je često mnogo manje izražen, a takođe, apsorpcija može ostati nepromenjena ili se čak smanjiti nakon njihove primene (Loftsson i sar., 2004; Rao i Stella, 2003). Na osnovu istraživanja koja su rađena u protekloj deceniji, pokazano je da veza između rastvorljivosti i drugog ključnog faktora koji reguliše apsorpciju - intestinalne permeabilnosti, može dovesti do ove pojave. Dok prividna rastvorljivost može dramatično da se poveća primenom odgovarajuće formulacije, intestinalna permeabilnost može istovremeno da se smanji (Dahan i Miller, 2012). Pasivna transcelularna permeabilnost se definiše kao transport supstance sa jedne strane ćelijske membrane na drugu, kroz lipidni dvosloj u smeru koncentracijskog gradijenta (Sugano i sar., 2010). Pokazano je da se pasivna permeabilnost smanjuje kada se koriste određene formulacije koje povećavaju rastvorljivost lekovite supstance (Beig i sar., 2015; Miller i sar., 2012), što može da se prikaže jednačinom 1:

$$P = DK / h \quad (1)$$

gde je P koeficijent permeabilnosti leka, D je koeficijent difuzije leka kroz membranu, K je koeficijent raspodele leka između vodenog intestinalnog medijuma i GIT membrane, a h je debljina membrane. Budući da je P proporcionalan sa K, a formulacije koje povećavaju rastvorljivost lekovite supstance smanjuju K, P bi takođe mogao da se smanji. Uticaj na rastvorljivost i permeabilnost nakon primene različitih formulacija ukazuje na značaj razvoja takvih formulacija jer je potrebno postizanje optimalnog balansa između ova dva ključna parametra. Upotrebom preciziranih količina ekscipijenasa u formulaciji koja omogućava solubilizaciju lekovite supstance tokom prolaska kroz GIT, može se izbeći nepoželjno smanjenje permeabilnosti.

Do sada je fokus istraživanja bio na ispitivanju uzajamnog dejstva rastvorljivosti i pasivne permeabilnosti, navodeći da formulacije koje povećavaju rastvorljivost omogućavaju povećanje prividne rastvorljivosti, ali da dovode do toga da prividna permeabilnost bude niža ili nepromenjena, u zavisnosti od vrste formulacije. Ipak, pokazano je da mnogi ekscipijensi poseduju karakteristike ili utiču na transportere kroz intestinalnu membranu (Buggins i sar., 2007; Goole i sar., 2010; Wagner i sar., 2001). U zavisnosti od fizičko-hemijskih osobina molekula leka, transporteri mogu uticati na apsorpciju, dispoziciju, izlučivanje (efluks) i biološku raspoloživost nakon oralne primene. Najrelevantniji i najviše proučavani efluksni transporter u GIT-u je p-glikoprotein (P-gp), koji se nalazi na apikalnoj membrani enterocita i utiče na vraćanje lekovitih supstanci nazad u lumen creva (Zhang i sar., 2016). Inhibicijom ove pumpe i / ili drugih pumpi za efluks, može se povećati ukupna permeabilnost leka (Giacomini i sar., 2010), čime se pokazuje značajan uticaj ekscipijensa koji omogućava i povećanje rastvorljivosti i inhibiciju P-gp (ili drugog efluksnog transportera) na povećanje i prividne rastvorljivosti i permeabilnosti lekovitih supstanci BSK grupe 2 i grupe 4 (Beig i sar., 2017).

Uzimajući u obzir vezu između permeabilnosti i rastvorljivosti, potrebno je da formulacije sadrže minimalne količine ekscipijensa koji povećava rastvorljivost i dovodi do inhibicije efluksa, čime se omogućava potpuno rastvaranje u fiziološkim uslovima u GIT-u i maksimalna inhibicija relevantnog efluks transportera. Svaki ekscipijens koji se doda iznad ovog praga može dovesti do smanjenja permeabilnosti i apsorpcije. Takođe, iako je uticaj svakog ekscipijensa na rastvorljivost i permeabilnost leka potrebno proučavati pojedinačno, u nekim slučajevima je potrebno ispitati i kombinaciju dva ili više ekscipijenasa koja se nalaze u konačnoj formulaciji, jer ona može biti efikasnija u postizanju optimalne ravnoteže između rastvorljivosti i permeabilnosti. Ipak, veza između rastvorljivosti i permeabilnosti još uvek nije u potpunosti istražena, i treba je uzeti u obzir prilikom dizajna optimalne formulacije. Višak ekscipijensa ne samo da može biti ekonomski nepoželjan, već može dovesti i do smanjenja permeabilnosti leka.

Lipidne formulacije tipa III su u literaturi prepoznate kao vodeće u pogledu potencijala za povećanje obima i smanjenje varijabilnosti u apsorpciji oralno primenjenih lekovitih supstanci. Solubilizacija lekovite supstance u intestinalnoj tečnosti, izmena transportnih mehanizama u enterocitima, izmena puta lekovite supstance u sistemsku cirkulaciju (portalni krvotok vs. limfni

sudovi) su neki od mehanizama kojima lipidi i lipidni ekscipijensi povećavaju biološku raspoloživost (Porter i sar., 2007). Poslednjih godina se intenzivno razmatra razvoj SMEDDS (Feeney i sar., 2016; Kalepu i sar., 2013) čija efikasnost za razliku od drugih lipidnih formulacija, nije uslovljena lipolizom, emulgovanjem u prisustvu žučnih soli, delovanjem pankreasnih lipaza i formiranjem mešanih micela. Neki autori smatraju da SMEDDS ne podležu ovakvim promenama na nivou GIT-a i da nije potrebno da dođe do njihove digestije pošto je lekovita supstanca u mikroemulgovanom obliku, u kom vrlo lako može da penetrira kroz spoljašnju membranu enterocita (Kyatanwar i sar., 2010). Pošto je površina ulje/voda međupovršinskog filma obrnuto proporcionalna prečniku kapi dispergovane uljane faze, smatra se da SMEDDS pruža veći kapacitet za solubilizaciju slabo rastvorljivih i/ili slabo permeabilnih lekovitih supstanci i brže oslobađanje leka, a koji su preduslovi za poboljšanje apsorpcije (Mu i sar., 2013; Porter i sar., 2008; Pouton, 2006). SMEDDS takođe omogućava povećanje kapaciteta za inkapsulaciju lekovitih supstanci u poređenju sa konvencionalnim rastvorima lipida, jer je rastvorljivost slabo rastvorljivih lekovitih supstanci u vodi niža u prirodnim lipidima nego u amfifilnim surfaktantima, kosurfaktantima i korastvaračima (Pouton, 1985). Rastvaranjem aktivne supstance u nosaču tipa SMEDDS eliminiše se značaj brzine rastvaranja u GIT-u kao potencijalno ograničavajućeg faktora za apsorpciju većine teško rastvorljivih lekovitih supstanci (Mu i sar., 2013; Porter i sar., 2008; Pouton, 2006). Značaj formulacionih parametara za efekte SMEDDS na apsorpciju aktivne supstance je jasno prepoznat ali slabo istražen (Feeney i sar., 2016). Jedinstvena karakteristika koja izdvaja SMEDDS u poređenju sa drugim sistemima za isporuku lekovitih supstanci je sposobnost isporuke različitih makromolekula kao što su peptidi, hormoni, supstrati enzima i inhibitori i omogućavanje njihove zaštite od enzimske hidrolize (Feeney i sar., 2016). Od ranije je poznato da se intestinalna hidroliza proleka u prisustvu holinesteraze može izbeći upotrebom polisorbata 20 u formulaciji (Armstrong i James, 1980).

Prvi farmaceutski proizvod tipa SMEDDS (Sandimmune[®] Neoral[®]) odobren je 1994. godine i predstavlja kliničku potvrdu ovog koncepta sa direktnim poboljšanjem biološke raspoloživosti aktivne supstance ograničene rastvorljivosti i permeabilnosti (imunosupresiv ciklosporin), kao i smanjenjem varijabilnosti zbog uticaja hrane i endogenih faktora (varenje lipida i sekrecija žuči i pankreasnog soka), kod pacijenata sa transplantiranom jetrom i nefunkcionalnom sekrecijom žuči (Choc, 1997). Iako se ovaj farmaceutski preparat smatra „zlatnim standardom“ u kategoriji

samo-dispergujućih formulacija, kauzalitet između veličine kapi koloidnog nosača i *in vivo* biološke raspoloživosti nije razjašnjen. Za proučavanje ovog aspekta, odabir SMEDDS za procenu biološke raspoloživosti trebalo bi da bude zasnovan na prethodnoj *in vitro* karakterizaciji procesa dispergovanja, podataka o veličini kapi i stabilnosti nastale mikroemulzije, kinetike oslobađanja i *in vitro* permeabilnosti aktivne supstance. Takav sveobuhvatan pristup gotovo da nije korišćen u dosadašnjim istraživanjima. S obzirom na brojnost različitih faktora u GIT-u i složenost mehanizama koji su uključeni u proces apsorpcije, za sveobuhvatno sagledavanje potencijala *in vitro* optimizovanih SMEDDS za peroralnu isporuku aktivne supstance, neophodna je *in vivo* evaluacija biološke raspoloživosti na animalnim modelima (Feeney i sar., 2016).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je da se ispita mogućnost za formulaciju nove generacije nosača lekovitih supstanci tipa polučvrstih SMEDDS, pogodnih za razvoj tvrdih kapsula kao finalnog čvrstog farmaceutskog oblika, kao i sveobuhvatna fizičko-hemijska, farmaceutsko-tehnološka i biofarmaceutska karakterizacija u cilju sagledavanja njihovog potencijala za peroralnu primenu aciklovira kao model aktivne supstance. Dodatno, kod sistema koji ispunjava postavljene kriterijume u pogledu fizičko-hemijskih i farmaceutsko-tehnoloških karakteristika, kao i biofarmaceutskog profila, bio je cilj da se izvrši procena uticaja samo-mikroemulgujućeg nosača na biološku raspoloživost aciklovira kao i da se ispita neškodljivost razvijenih sistema *in vivo* na animalnom modelu.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Prva faza istraživanja

U prvoj fazi eksperimentalnog rada izvršena je formulacija i *in vitro* karakterizacija tečnih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom. Formulacija je obuhvatila selekciju sastojaka pseudoternernih sistema tipa ulje / surfaktant / kosurfaktant / korastvarač i studiju faznog ponašanja u okviru koje su bili izrađeni i ispitani odgovarajući pseudoternerni sistemi sa ciljem da se identifikuju oni koji imaju karakteristike SMEDDS. Kao kriterijumi za diferenciranje

SMEDDS razmatrani su: brzina dispergovanja i transmitanca, fizička stabilnost i veličina kapi kod disperzija u vodenim medijumima (0,1 M HCl i fosfatni pufer pH 7,2). Kod uzoraka sa karakteristikama SMEDDS procenjeni su brzina difuzije aciklovira iz nosača i permeabilnost inkapsuliranog aciklovira *in vitro* testovima. Na osnovu rezultata ove faze eksperimentalnog rada formulisani su tečni SMEDDS koji su optimizirani u pogledu disperzibilnosti, brzine difuzije i permeabilnosti aciklovira, a dobijeni podaci su korišćeni za nastavak istraživanja u okviru sledeće faze eksperimentalnog rada.

3.1.1. Materijali koji su korišćeni u prvoj fazi eksperimentalog rada

Farmaceutski ekscipijensi koji su korišćeni kao potencijalni sastojci za pripremu SMEDDS su:

- 1) ulja (trigliceridi srednje dužine lanaca (Crodamol[®] GTCC, Croda, Velika Britanija) i oleinska kiselina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka));
- 2) nejonski surfaktanti (PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (Labrasol[®], Gattefosse, Francuska), polisorbit 20 (Ph. Eur. 9.0), makrogol glicerol hidroksistearat (Kolliphor[®] RH40, BASF, Nemačka), poligliceril-3-dioleat (Plurol[®] Oleique CC 497, Gattefosse, Francuska));
- 3) hidrofilni korastvarači (makrogol 400 (Ph. Eur. 9.0) i glicerol (85%) (Ph. Eur. 9.0)).

Kao model aktivna supstanca upotrebljen je aciklovir koji je kupljen od farmaceutske kompanije Zdravlje Actavis (Leskovac, Republika Srbija). Reagensi koji su korišćeni u eksperimentalnom radu su sastojci fosfatnog pufera (kalijum dihidrogen fosfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) i natrijum hidroksid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka)), 0,1 M hlorovodonična kiselina (Ph. Eur. 9.0) i prečišćena voda (Ph. Eur. 9.0). Dodekan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) i lecitin iz jajeta (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) su korišćeni kao reagensi u testu permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA test). Sve supstance su korišćene kao što su i nabavljene. Prečišćena voda je sveže pripremljena i upotrebljena kad god je to bilo potrebno.

3.1.2. Izbor sastojaka pseudoternernih sistema tipa ulje / surfaktant / kosurfaktant / korastvarač

Izbor farmaceutskih ekscipijenasa za formulisanje SMEDDS sa aciklovirom bio je zasnovan na proceni rastvorljivosti aktivne supstance u pojedinačnim ekscipijensima, ispitivanju faznog ponašanja pseudoternernih sistema ulje / surfaktant / kosurfaktant / korastvarač i proceni njihovog kapaciteta za rastvaranje aciklovira.

3.1.2.1. Određivanje rastvorljivosti aciklovira u individualnim ekscipijensima

Skrining sastojaka pseudoternernih sistema je izvršen na osnovu rastvorljivosti aciklovira u komercijalno dostupnim ekscipijensima iz grupe ulja (trigliceridi srednje dužine lanaca i oleinska kiselina), nejonskih surfaktanata (makrogol glicerol hidroksistearat (HLB = 13), polisorbitat 20 (HLB = 16,7), kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi (HLB = 12) i poligliceril-3-dioleat (HLB = 3)) i hidrofilnih korastvarača (makrogol 400 i glicerol). Kvalitet svih ekscipijenasa je bio u skladu sa odgovarajućim monografijama važećeg izdanja Evropske farmakopeje (Ph. Eur. 9.0) i korišćene su bez dodatnog prečišćavanja.

Rastvorljivost aciklovira u individualnim ekscipijensima (ulja, surfaktanti i korastvarači) koji su smatrani potencijalnim sastojcima pseudoternernog sistema ulja / surfaktant / kosurfaktant / korastvarač, je određena indirektno, na osnovu nerastvorenog dela supstance dodate u višku (50

mg) poznatoj količini ekscipijensa (1 ml) u erlenmajeru od 25 ml sa zatvaračem od brušenog stakla. Za mešanje smeše tokom 24 h na sobnoj temperaturi (20 ± 3 °C) pri brzini od 300 o/min je korišćen laboratorijski šejker (IKA KS 260-Basic, Ika, Nemačka). Nerastvorena frakcija je odvojena centrifugiranjem na 3000 o/min u trajanju od 30 minuta korišćenjem laboratorijske centrifuge MPW56 (MPW Med. Instruments, Poljska), a zatim je rastvorena u poznatoj količini 0,1 M HCl i koncentracija u rastvoru je kvantifikovana spektrofotometrijski na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije aciklovira (252 nm) korišćenjem UV-VIS spektrofotometra Evolution 300 (Thermo Scientific, SAD). Kontrolni uzorak (slepa proba) je pripremljen u skladu sa istim protokolom i nije sadržao aktivnu supstancu. Maksimalna količina rastvorene supstance je izračunata kao zapreminska koncentracija rastvorene supstance (M_r) na osnovu početne količine lekovite supstance ($M_u = 50$ mg), dobijene količine nerastvorenog dela lekovite supstance (M_{ner}) i zapremine ekscipijensa ($V = 1$ ml) (jednačina 3).

$$M_r = (M_u - M_{ner}) / V = 50 - M_{ner} \quad (3)$$

Ekscipijensi za koje je utvrđeno da je rastvorljivost aciklovira značajno manja u odnosu na ostale ispitivane ekscipijense, nisu dalje razmatrani kao sastojci pseudoternernih sistema.

3.1.2.2. Ispitivanje faznog ponašanja pseudoternernih sistema tipa ulje / surfaktant / kosurfaktant / korastvarač

Pseudoternerni sistemi tipa ulje / surfaktant / kosurfaktant / korastvarač su pripremljeni od precizno odmerenih sastojaka (ulja (trigliceridi srednje dužine lanca), surfaktanta (Labrasol[®], Kolliphor[®] RH40 ili polisorbat 20), kosurfaktanta (Plurol[®] Oleique CC 497) i hidrofilnog korastvarača (glicerol i makrogol 400)) koji su izabrani kao potencijalni sastojci. Koncentracija ulja u svim sistemima je iznosila 10%, a određena je kao povoljna za formulisanje SMEDDS na osnovu preliminarnih ispitivanja. Pripremljeni pseudoternerni sistemi su se razlikovali međusobno po vrsti korišćenog surfaktanta, masenom odnosu surfaktanta i kosurfaktanta (K_m), vrsti i/ili koncentraciji korastvarača. Pripremljene su četiri grupe pseudoternernih sistema, a sastav je prikazan u tabelama 4 i 5.

Tabela 4. Sastav pseudoternernih sistema koji su u svom sastavu sadržali 20% korastvarača

Km	Ulje ^a (%)	Surfaktant ^b (%)	Kosurfaktant ^c (%)	Korastvarač ^d (%)
9,00	10,00	63,00	7,00	20,00
2,33	10,00	49,00	21,00	20,00
1,00	10,00	35,00	35,00	20,00
0,43	10,00	21,00	49,00	20,00
0,11	10,00	7,00	63,00	20,00

^a Crodamol[®] GTCC

^b Labrasol[®], polisorbat 20 ili Kolliphor[®] RH40

^c PluroI[®] Oleique CC 497

^d Glicerol ili makrogol 400

Tabela 5. Sastav pseudoternernih sistema koji su u svom sastavu sadržali 30% korastvarača

Km	Ulje ^a (%)	Surfaktant ^b (%)	Kosurfaktant ^c (%)	Korastvarač ^d (%)
9,00	10,00	54,00	6,00	30,00
2,33	10,00	42,00	18,00	30,00
1,00	10,00	30,00	30,00	30,00
0,43	10,00	18,00	42,00	30,00
0,11	10,00	6,00	54,00	30,00

^a Crodamol[®] GTCC

^b Labrasol[®], polisorbat 20 ili Kolliphor[®] RH40

^c PluroI[®] Oleique CC 497

^d Glicerol ili makrogol 400

Pseudoternerni sistemi su se najpre razlikovali u pogledu koncentracije upotrebljenog korastvarača koja je iznosila 20% (Tabela 4) i 30% (Tabela 5), odnosno prema sadržaju smeše surfaktanta i kosurfaktanta koja je iznosila 70% (Tabela 4) i 60% (Tabela 5). U okviru svake grupe, pripremljene su po dve podgrupe sistema sa glicerolom ili makrogolom 400, kao korastvaračem. U okviru svake podgrupe pripremane su pseudoternerne smeše sa različitim surfaktantima (Labrasol[®], Kolliphor[®] RH40 ili polisorbitat 20). Kao kosurfaktant je upotrebljen Plurol[®] Oleique CC 497. U svakoj podgrupi vrednost Km je varirana u rasponu od 0,11 do 9,0. Ukupno je pripremljeno i ispitivano 60 pseudoternernih smeša. Svi uzorci su pripremljeni preciznim odmeravanjem potrebnih količina ulja, surfaktanta, kosurfaktanta i korastvarača u staklenu bočicu sa navojnim poklopcem, a potom su mešani korišćenjem laboratorijskog šejkera (HS 260 control, IKA, Nemačka) tokom 2 h, na sobnoj temperaturi (20 ± 3 °C). Mešavine su čuvane tokom 24 h pod ambijentalnim uslovima pre određivanja kapaciteta za inkapsulaciju aciklovira i ispitivanja disperzibilnosti sistema sa inkapsuliranim aktivnom supstancom.

3.1.2.3. Određivanje kapaciteta za inkapsulaciju aciklovira u ispitivanim pseudoternernim sistemima ulje / surfaktant / kosurfaktant / korastvarač

Kapacitet za inkapsulaciju aciklovira je određen nakon što je aciklovir dodat u višku poznatoj količini prethodno pripremljenih pseudoternernih smeša (1 ml) u erlenmajer od 25 ml sa zatvaračem od mekog stakla. Uzorci su kontinuirano mešani pri 300 o/min tokom 24 h korišćenjem laboratorijskog šejkera (IKA KS 260-Basic, IKA, Nemačka) na sobnoj temperaturi (20 ± 3 °C). Višak supstance je odvojen centrifugiranjem i rastvoren u odgovarajućoj količini 0,1 M HCl. Rastvorljivost aciklovira u ispitivanim pseudoternernim smešama izračunata je u skladu sa protokolom koji je prethodno opisan i primenjen za određivanje njegove rastvorljivosti u individualnim ekscipijensima (*3.1.2.1 Određivanje rastvorljivosti aciklovira u individualnim ekscipijensima*). U nastavku su pripremljeni uzorci sa aciklovirom, u koncentraciji koja je ekvivalentna kapacitetu za inkapsulaciju, a u cilju eliminisanja presićenih sistema kod ovih uzoraka je izvršen organoleptički pregled i UV spektrofotometrijsko određivanje transmitance na 600 nm UV-VIS spektrofotometrom (Evolution 300, Thermo Scientific, SAD) posle čuvanja tokom 48 h pod ambijentalnim uslovima.

3.1.2.4. Ispitivanje disperzibilnosti pseudoternarnih sistema sa aciklovirom u vodenim medijumima

Disperzibilnost uzoraka sa aciklovirom je procenjena nakon dispergovanja u 0,1 M HCl i fosfatnom puferu pH 7,2 (USP), u odnosu 1:25 V/V, prema proceduri koju su prethodno postavili Đekić i saradnici (Đekić i sar., 2013). U erlenmajer sa 5 ml vodenog medijuma (0,1 M HCl ili fosfatni pufer pH 7,2) je dodato 200 μ l uzorka, uz blago mešanje (150 o/min) na laboratorijskom šejkeru (IKA KS 260-Basic, Ika Nemačka) tokom 30 min, na sobnoj temperaturi (20 ± 3 °C). Kod pripremljenih disperzija je izvršen organoleptički pregled kako bi se proverila njihova homogenost i prozirnost, a nakon toga je urađeno UV spektrofotometrijsko određivanje transmitance na 600 nm korišćenjem uređaja Evolution 300 (Thermo Scientific, SAD) radi procene njihove optičke transparentnosti, korišćenjem vodenog medijuma kao kontrole.

Takođe, veličina kapi je određena tehnikom fotonske korelacione spektroskopije (*engl.* photon correlation spectroscopy (PCS)) pomoću uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Velika Britanija) koji je opremljen He-Ne laserom koji generiše upadnu koherentnu monohromatsku svetlost talasne dužine 633 nm. Prosečna veličina kapi (*Z-Ave*) određena je pod fiksnim uglom od 90°. Određivanje je izvedeno na temperaturi od $37 \pm 0,1$ °C. Pomoću integrisanog softvera (Dispersion Technology Software, DTS) su izračunati prosečni prečnik kapi sa standardnom devijacijom (S.D.) i indeks polidisperziteta (PdI). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri uzastopna merenja za svaki uzorak.

Pored toga, urađen je i test centrifugiranja pri brzini od 3000 o/min tokom 30 minuta na laboratorijskoj centrifugi MPW 56 / MPW (Med. Instruments, Poljska), kako bi se eliminisali metastabilni sistemi.

3.1.3. Biofarmaceutska karakterizacija samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom

Kriterijumi za eliminaciju su postavljeni analizom rezultata ispitivanja disperzibilnosti i bili su $Z\text{-ave} \leq 100$ nm, $PdI \leq 0,250$ i monomodalna raspodela veličine kapi, u skladu sa preporukama Goddeeris i saradnici (2006). Sistemi sa aciklovirom koji su ispunili ove kriterijume u oba

istražena vodena medijuma (0,1 M HCl i fosfatni pufer pH 7,2) klasifikovani su kao SMEDDS i uključeni su u dalju *in vitro* procenu difuzije i permeabilnosti lekovite supstance.

3.1.3.1. *In vitro* ispitivanje difuzije aciklovira iz samo-mikroemulgujućih sistema

Profil difuzije aciklovira iz SMEDDS je dobijen korišćenjem modela difuzione ćelije (politetrafluoroetilenska inhenser ćelija) (VanKel Industries, SAD) u standardnoj aparaturi sa lopaticom za ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance (Erweka DT70, Erweka, Nemačka). Za ispitivanje je upotrebljena količina uzorka koja sadrži aciklovir u dozi od 200 mg. Uzorak i akceptorski medijum su razdvojeni celuloznom membranom (Cuprophan[®], Medicell, Velika Britanija). Površina difuzione ćelije i membrane ćelije je bila 4 cm². Ispitivanje je ponovljeno tri puta za svaki SMEDDS. Inhenser ćelije su postavljene u standardne posude sa 900 ml fosfatnog pufera pH 7,2, koji je korišćen kao akceptorski medijum. Ispitivanje je izvođeno pri konstantnoj temperaturi akceptorskog medijuma od 37 ± 1 °C. Standardne lopatice od nerđajućeg čelika, koje su se okretale brzinom od 50 o/min, omogućile su blago mešanje akceptorskog medijuma. Približno 4 ml medijuma je uzorkovano iz posude u vremenskim intervalima od 10 min u ukupnom trajanju od 1 h (odnosno, uzorkovanje je izvršeno nakon 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min i 60 min). Količina uzorka koji je uzet za analizu svaki put je nadoknađen istom količinom zagrejanog akceptorskog medijuma. Kumulativna koncentracija oslobođenog aciklovira u prikupljenim uzorcima je određena UV spektrofotometrijski (Evolution 300, Thermo Scientific, USA) na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma supstance. Za svaki od ispitanih uzoraka eksperiment je ponovljen tri puta. U cilju izdvajanja uzoraka koji imaju značajno veću brzinu difuzije aciklovira primenjena je jednofaktorska analiza varijanse (*engl.* Analysis of variance, ANOVA) sa statističkom značajnošću p = 0,05. Dobijeni profili difuzije aciklovira su poređeni primenom model-nezavisnog matematičkog pristupa koristeći faktor razlike (f₁) (jednačina 4) i faktor sličnosti (f₂) (jednačina 5), koji je predložen od strane naučnika Moore i Flanner (1996):

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \cdot 100 \quad (4)$$

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\} \quad (5)$$

gde je:

n - broj uzorkovanja,

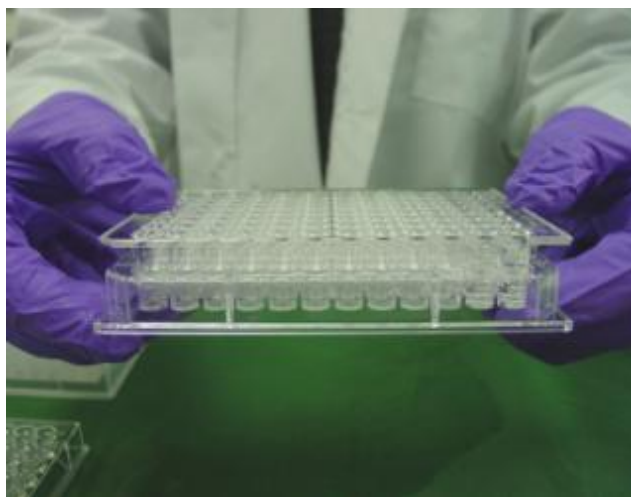
R_t - procenat lekovite supstance oslobođen nakon vremena t u slučaju referentnog preparata,

T_t - procenat lekovite supstance oslobođen nakon vremena t u slučaju ispitivanog (test) preparata.

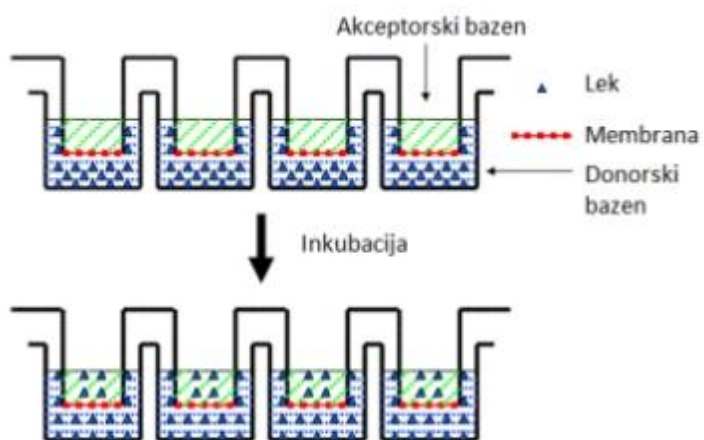
Faktor razlike (f₁) predstavlja procenat razlike između dve krive u svakoj vremenskoj tački, pri čemu se meri relativna greška između dve krive. Faktor sličnosti (f₂) predstavlja logaritamski recipročni kvadratni koren sume greški na kvadrat i odnosi se na merenje sličnosti u procentu oslobađanja između dve krive. Vrednosti f₁ između 0 i 15 i f₂ između 50 i 100 sugerišu sličnost između dva profila oslobađanja lekovite supstance, a suprotno ukazuju na različitost.

3.1.3.2. Test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA test)

Test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA test) je korišćen za *in vitro* procenu permeabilnosti aciklovira kroz veštačku membranu (Slika 3), na osnovu čega se može relativno jednostavno i brzo okarakterisati njena sposobnost za apsorpciju zasnovanu na mehanizmu transcelularne pasivne difuzije (Bermejo i sar., 2004). PAMPA test je izveden kod ispitivanih SMEDDS sa aciklovirom u poređenju sa čistom lekovitom supstancom, prema proceduri opisanoj u literaturi (Kansy i sar., 1998; Zhu i sar., 2002). Hidrofobne mikrofiltracione ploče od polivinilidenfluorida Multiscreen IP Filter Plate (Millipore Corporation, Bedford, SAD) od 96 odeljaka i veličinom pora 0,45 mm, su korišćene kao donorska i akceptorska ploča (Slika 4).



Slika 3. Izgled akceptorske ploče i donorske komore za izvođenje PAMPA testa



Slika 4. Shematski prikaz postupka izvođenja PAMPA testa

Svaki odeljak donorske ploče je impregniran sa 5 μl 1%-tnog rastvora lecitina iz jajeta u dodekanu, nakon toga ostavljen da rastvarač ispari, a zatim je u svaki odeljak preneto po 300 μl ispitivanog uzorka. Akceptorska ploča je stavljena preko donorske komore (Millipore, Billerica, MA, SAD). U donorsku komoru je prethodno naneto po 100-150 μl rastvora čistog aciklovira ili odgovarajućih količina ispitivanih formulacija u fosfatnom puferu pH 7,2. Istovremeno je u

bazene akceptorske ploče naneto po 300 µl fosfatnog pufera pH 7,2. Sistem je prekriven plastičnim poklopcem kako bi se sprečilo isparavanje rastvarača i inkubiran 15 h na sobnoj temperaturi. Posle inkubacije, određena je koncentracija aciklovira u uzorcima iz donorske komore upotrebom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (*engl.* High performance liquid chromatography (HPLC)), izračunat je koeficijent permeabilnosti (P_{app}) i procenjena je razlika u pogledu permeabilnosti aktivne supstance između ispitivanih uzoraka.

HPLC analiza izvršena je korišćenjem uređaja Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD), koji je opremljen binarnom pumpom, manuelnim injektorom i DAD detektorom. Za analizu je upotrebljena kolona Zorbax Rx- SIL (250 mm × 4,6 mm, veličine čestica 5 µm). Mobilna faza sadržala je 50 mM KH_2PO_4 i acetonitril (95:5, V/V). Temperatura kolone je bila 30 °C, a protok mobilne faze 1 ml/min. UV detekcija vršena je na 254 nm. Za analizu podataka je korišćen softver Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, Nemačka).

Koeficijent permeabilnosti (P_{app}) izračunat je primenom jednačina 6 i 7:

$$P_{app} = \frac{V_D V_R}{(V_D + V_R) S t} \ln \left[\frac{10_0 V_D}{10_0 V_D - \%T_r (V_D + V_R)} \right] \quad (6)$$

$$\%T_r = 100 A_R V_R / A_{D0} V_D \quad (7)$$

gde su:

V_D – zapremina donorskog rastvora (ml);

V_R – zapremina akceptorskog rastvora (ml);

A_{D0} – HPLC površina pika inicijalnog rastvora;

A_R – HPLC površina pika akceptorskog rastvora;

S – površina membrane između komora (0,28 cm², prema proizvođaču);

t – vreme inkubacije (s);

$\%T_r$ – procenat transporta (Zhu i sar., 2002).

Dobijene vrednosti za P_{app} upoređene su korišćenjem jednofaktorske analize varijanse (*engl.* analysis of variance (ANOVA)) ($p = 0,05$), u cilju selekcije uzoraka koji obezbeđuju značajno veću permeabilnost aciklovira.

3.2. Druga faza istraživanja

Druga faza istraživanja se odnosila na formulaciju, fizičko-hemijsku, farmaceutsko-tehnološku i biofarmaceutsku karakterizaciju polučvrstih SMEDDS za peroralnu primenu aciklovira u obliku tvrdih kapsula.

3.2.1. Materijali koji su korišćeni u drugoj fazi eksperimentalnog rada

Farmaceutski ekscipijensi koji su korišćeni za formulaciju polučvrstih SMEDDS bili su:

- trigliceridi srednje dužine lanca (Crodamol[®] GTCC, Croda, Velika Britanija),
- makrogol glicerol hidrosistearat (Kolliphor[®] RH40, BASF, Nemačka) (HLB ~ 14-16),
- poligliceril-3-dioleat (Plurol[®] Oleique CC 497, Gattefosse, Francuska) (HLB ~ 3),
- glicerol (85%) (Ph. Eur. 9.0),
- makrogol 8000 (Ph. Eur. 9.0).

Svi ekscipijensi su korišćeni bez dodatnog prečišćavanja. Aciklovir je kupljen od farmaceutske kompanije Zdravlje Actavis (Leskovac, Republika Srbija).

U okviru procene kompatibilnosti SMEDDS sa omotačem tvrdih kapsula od hipromeloze, pripremane su fizičke smeše ispitivanih formulacija sa ovim ekscipijensom. Upotrebljena je hipromeloza čiji kvalitet je bio u skladu sa odgovarajućom monografijom važećeg izdanja Evropske farmakopeje (Ph. Eur. 9.0).

Kvalitet hlorovodonične kiseline 37% koja je korišćena za pripremu 0,1 M HCl je bio u skladu sa odgovarajućom monografijom Evropske farmakopeje (Ph. Eur. 9.0). Hemijske supstance koje su korišćene kao sastojci fosfatnog pufera bili su kalijum dihidrogen fosfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) i natrijum hidroksid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). Za pripremu 0,1 M HCl i fosfatnog pufera je korišćena prečišćena voda koja je sveže pripremljena i upotrebljena kad god je to bilo potrebno.

3.2.2. Formulacija polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom

Formulacija polučvrstih SMEDDS izvršena je dodavanjem makrogola 8000 tečnim SMEDDS koji su optimizovani u prethodnoj fazi istraživanja u pogledu brzine difuzije i permeabilnosti aciklovira *in vitro*. Za pripremu su korišćeni trigliceridi srednje dužine lanaca (ulje), makrogol glicerol hidroksistearat (surfaktant), poligliceril-3-dioleat (kosurfaktant), glicerol (hidrofilni korastvarač) i makrogol 8000 (sredstvo za povećanje viskoziteta). Koncentracija ulja kod svih sistema je iznosila 10%. Koncentracija glicerola je iznosila 20% (pri masenom odnosu surfaktanta i kosurfaktanta 9,0) ili 30% (pri masenom odnosu surfaktanta i kosurfaktanta 2,33). Pri svakoj koncentraciji glicerola, grupa od tri sistema je pripremljena sa različitim sadržajem makrogola 8000 (5%; 7,5%; i 10%). Sastav svih formulisanih polučvrstih sistema (SD1-SD6) je prikazan u tabeli 6.

Tabela 6. Sastav polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom

Sistem	Ulje (%)	Surfaktant (%)	Kosurfaktant (%)	Hidrofilni korastvarač (%)	Sredstvo za povećanje viskoziteta (%)	Aktivna supstanca (%)
SD1	10,00	58,48	6,50	20,00	5,00	2,00
SD2	10,00	56,23	6,25	20,00	7,50	2,00
SD3	10,00	53,98	6,00	20,00	10,00	2,00
SD4	10,00	38,48	16,50	30,00	5,00	2,00
SD5	10,00	36,72	15,76	30,00	7,50	2,00
SD6	10,00	34,98	15,00	30,00	10,00	2,00

Polučvrsti sistemi su pripremljeni mešanjem odgovarajućih količina ekscipijenasa u staklenoj posudi pomoću magnetne mešalice IKAmag (IKA, Nemačka), na 60 ± 2 °C tokom 30 min, kako bi se dobila homogena smeša. Svako pojedinačnoj smeši ekscipijenasa dodat je aciklovir, a zatim izvršeno dispergovanje korišćenjem laboratorijske mešalice IKA RV 20 digital (IKA, Nemačka), sa propelerskim mešačem, pri brzini od 1000 o/min tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Koncentracija aciklovira je iznosila 2% u skladu sa rezultatima dobijenim u prethodnoj fazi istraživanja pri određivanju kapaciteta za inkapsulaciju aciklovira u odgovarajuće tečne SMEDDS. Pripremljeni uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi tokom ispitivanja. Kod uzoraka SD1-SD6 ispitani su reološko ponašanje i disperzibilnost u vodenim medijumima, kako bi se identifikovao polučvrsti SMEDDS sa zadovoljavajućim reološkim osobinama za punjenje u tvrde kapsule. Ispitivanja i karakterizacija polučvrstih sistema izvedeni su nakon 48 h od njihove izrade.

3.2.3. Fizičko-hemijska karakterizacija polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom

Fizičko-hemijska karakterizacija pripremljenih polučvrstih sistema sastojala se od ispitivanja reološkog ponašanja, u cilju identifikacije optimalnog polučvrstog SMEDDS za punjenje u tvrde kapsule. Polučvrsti SMEDDS koji su optimizovani u pogledu reološkog ponašanja ispitivani su nastavku istraživanja. Dodatno, izabrani polučvrsti sistemi upotrebljeni su da se pripreme i odgovarajući uzorci polučvrstih SMEDDS sa 33,33% aciklovira (korišćenjem istog postupka izrade kao i kod uzorka sa 2% aktivne supstance), u cilju sagledavanja performansi nosača pogodnog za primenu terapijske doze aktivne supstance u jednodoznom čvrstom farmaceutskom obliku tipa tvrdih kapsula. Kod pripremljenih uzoraka polučvrstih SMEDDS ispitana je disperzibilnost i izvršena analiza optičkom mikroskopijom i diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (*engl.* differential scanning calorimetry (DSC)), za procenu morfologije ispitivanih sistema i potencijalnih interakcija aktivne supstance i sastojaka formulacije.

3.2.3.1. Karakterizacija reološkog ponašanja polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom

Reološko ponašanje uzoraka SD1-SD6 je ispitivano na rotacionom reometru Rheolab MC120 (Paar Physica, Nemačka) uz korišćenje kupa-ploča mernog sistema MK 22 (prečnik 50 mm, ugao 1° , i na rastojanju od 50 μm), pri rasponu brzina smicanja od 0 do 200 s^{-1} i na $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Merenja su ponovljena tri puta za svaki uzorak, i dobijeni rezultati su korišćeni za određivanje tipa proticanja, minimalnog (η_{min}) i maksimalnog (η_{max}) prividnog viskoziteta i histerezne površine (A), upotrebom softverskog paketa US200 u sastavu uređaja.

3.2.3.2. Ispitivanje disperzibilnosti polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom

Sposobnost dispergovanja uzoraka polučvrstih SMEDDS je ispitana u vodenim medijumima različitog pH (0,1 M HCl (pH 1,2) i fosfatni pufer (pH 7,2)), u skladu sa protokolom koji su opisali Đekić i saradnici (Đekić i sar., 2013), a koji je u prethodnoj fazi istraživanja primenjen kod formulisanih pseudoternernih sistema sa aciklovirom. Precizno odmerena količina uzorka (200 μl) dodata je u erlenmajer, razblažena sa 5 ml medijuma i izvršeno je dispergovanje uz blago mućkanje (šejker IKA KS 260-Basic, Ika, Nemačka) tokom 30 min, pod ambijentalnim uslovima. Izvršen je organoleptički (subjektivan) pregled u cilju detektovanja zamućenosti, koalescencije kapi uljane faze ili raslojavanja, nakon čega je meren procenat transmitance (%T) korišćenjem UV-VIS spektrofotometra Evolution 300 (Thermo Scientific, USA) na 600 nm, uz upotrebu 0,1 M HCl (pH 1,2), odnosno fosfatnog pufera (pH 7,2) kao slepe probe. U cilju uočavanja i eliminisanja metastabilnih sistema, izvršeno je centrifugiranje dobijenih disperzija pri brzini od 3000 o/min tokom 30 minuta korišćenjem laboratorijske centrifuge MPW 56 / MPW (Med. Instruments, Poljska). U pripremljenim disperzijama određene su vrednosti Z-ave i PDI tehnikom fotonske korelacione spektroskopije korišćenjem uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Velika Britanija + Dispersion Technology Software, DTS) na temperaturi od $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri uzastopna merenja \pm S.D. za svaki uzorak.

3.2.3.3. Optička mikroskopija

Morfologija pripremljenih SMEDDS je ispitana primenom optičkog mikroskopa. Optička mikroskopija je izvedena na optičkom mikroskopu (Olympus System microscope BX50 /Olympus Reflected Light Fluorescence Attachment BX-FLA, Japan) koji je opremljen digitalnom kamerom (Sony Power HAD, 3CCD Color Video Camera, DXC-950P model, Japan).

3.2.3.4. DSC analiza

Potencijalne interakcije između sastojaka formulacije i aciklovira su procenjene primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC). DSC analiza uzoraka polučvrstih SMEDDS, čiste aktivne supstance je izvedena na uređaju Mettler Toledo DSC1 instrument (Mettler Toledo, Švajcarska). Uzorci su precizno odmereni, a DSC termogrami su snimljeni u rasponu temperatura od 0 °C do 300 °C, pri brzini zagrevanja od 10 °Cmin⁻¹, u prisustvu azota pri konstantnoj brzini protoka od 50 ml/min. Dobijeni podaci su analizirani pomoću STARe Software v12.10 (Mettler Toledo, Švajcarska).

3.2.4. Biofarmaceutska karakterizacija polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom

Biofarmaceutska karakterizacija obuhvatila je određivanje *in vitro* brzine oslobađanja aciklovira iz polučvrstih SMEDDS i suspenzije ekvivalentne količine aciklovira u akceptorskom medijumu, korišćenjem modela difuzione ćelije i pod istim uslovima koji su primenjeni u prvoj fazi eksperimentalnog rada kod tečnih SMEDDS (3.1.3.1. *In vitro* ispitivanje difuzije aciklovira iz samo-mikroemulgujućih sistema). Na osnovu prikupljenih podataka konstruisani su profili oslobađanja, odnosno, krive zavisnosti koncentracije oslobođenog aciklovira u akceptorskom medijumu od vremena. Model-zavisni pristup je korišćen za analizu dobijenih profila difuzije aciklovira i za izračunavanje brzine difuzije.

3.2.5. Procena kompatibilnosti polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom i omotačem tvrdih kapsula

Za izbor vrste tvrdih kapsula koje će biti upotrebljene za punjenje polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom izvršena su preliminarna razmatranja kompatibilnosti sadržaja sa omotačem kapsule. Polučvrsti SMEDDS sa aciklovirom u količini od 0,6 g punjeni su u odgovarajući broj tvrdih kapsula od želatine i HPMC (veličina 0) i razmatrana su njihova organoleptička svojstva i integritet tokom mesec dana čuvanja pod ambijentalnim uslovima. Dodatno, izvršena je DSC analiza fizičke smeše polučvrstih SMEDDS sa polimerom koji je gradivni sastojak omotača kapsula koje su pokazale zadovoljavajuća svojstva tokom preliminarnog ispitivanja. DSC ispitivanje fizičke smeše istih količina polimera, koji je gradivni sastojak omotača kapsule, i polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom, ispitana je korišćenjem postupka koji je opisan u odeljku 3.2.3.4. *DSC analiza.*

3.2.6. *In vitro* ispitivanje oslobađanja aciklovira iz polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema u obliku tvrdih kapsula

Profil oslobađanja aciklovira iz kapsula punjenih uzorkom polučvrstih SMEDDS je ispitivan u aparaturi sa rotirajućom lopaticom na uređaju Erweka DT70 (Erweka, Nemačka). Kao medijum je korišćen fosfatni puffer pH 7,2 u količini od 900 ml, koji je zagrejan na 37 ± 1 °C i čija se temperatura održavala nepromenjenom tokom ispitivanja, pri brzini mešanja od 50 ± 1 o/min. Periodično je uzorkovano približno 5 ml medijuma u toku 60 min (5, 10, 20, 30, 40, 50 i 60 min), i izvršena je nadoknada istom količinom zagrejanog medijuma. Kumulativna koncentracija oslobođenog aciklovira je određena UV spektrofotometrijski (Evolution 300 spectrophotometer, Thermo Scientific, SAD) na 252 nm. Dobijeni profili oslobađanja aciklovira su analizirani primenom model-zavisnih i model-nezavisnih pristupa u cilju procene mehanizama oslobađanja. Metoda koja je korišćena za poređenje profila brzine oslobađanja aciklovira iz polučvrstih SMEDDS u obliku tvrdih kapsula (test formulacija) jeste izračunavanje faktora razlike (f_1) (Moore i Flanner, 1996). Ispitivani profili se mogu smatrati sličnim ako je $0 < f_1 < 15$.

3.2.7. Procena stabilnosti polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom u obliku tvrdih kapsula

Dovoljan broj tvrdih kapsula (veličina 0) je punjeno sa 0,6 g ispitivanih polučvrstih SMEDDS radi ispitivanja fizičke i hemijske stabilnosti pod uslovima od 25 °C/60% RH (u klima komori Climatic Chamber EKOCH 1500 (Angelantoni, Italija)) i na 5±3 °C (u frižideru) tokom tri meseca. Uzorci su čuvani u dobro zatvorenim bocama od tamnog stakla sa širokim grlom i zatvaračem od teflona. U određenim vremenskim periodima (1, 2 i 3 meseca) su sprovedena ispitivanja. Ispitivane su organoleptičke karakteristike (oblik, boja, integritet, mehanička svojstva), sadržaj aciklovira, kao i disperzibilnost i prosečna veličina kapi i profil *in vitro* oslobađanja lekovite supstance. Za svaki vremenski period ispitivanja su ponovljena na tri uzorka, koja su poređena sa polučvrstim SMEDDS koji nisu punjeni u kapsule (bulk) i čuvani su pod istim uslovima.

3.2.7.1. Određivanje sadržaja aciklovira u polučvrstim samo-mikroemulgujućim sistemima u obliku tvrdih kapsula

Sadržaj aciklovira u tvrdim kapsulama sa polučvrstim SMEDDS u određenim vremenskim periodima (1, 2 i 3 meseca) je određen metodom HPLC na uređaju Agilent 1260 Infinity (AgilentTechnologies, SAD), opremljenim sa UV/Vis detektorom. Korišćena je kolona Agilent Zorbax Extend C-18 150 x 4,6 mm, veličine čestica 5 µm. Za analizu podataka je korišćen softver Agilent Open LAB (AgilentTechnologies, SAD).

3.2.7.2. Ispitivanje disperzibilnosti polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom u obliku tvrdih kapsula

Disperzibilnost u fosfatnom puferu pH 7,2 je procenjena u određenim vremenskim periodima (1, 2 i 3 meseca) tokom testa *in vitro* ispitivanja oslobađanja aciklovira na osnovu merenja transparentije, određivanja prosečne veličine kapi i polidisperziteta i testa centrifugiranja disperzija formiranih od oslobođenog polučvrstog SMEDDS iz tvrdih kapsula. Navedena

ispitivanja su izvedena pod istim uslovima kao prilikom prethodnog ispitivanja disperzibilnosti tečnih i polučvrstih SMEDDS (3.1.2.4. *Ispitivanje disperzibilnosti pseudoternarnih sistema sa aciklovirom u vodenim medijumima* i 3.2.3.2. *Ispitivanje disperzibilnosti polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom*).

3.2.7.3. *In vitro* ispitivanje oslobađanja aciklovira iz polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema u obliku tvrdih kapsula

Za svaki vremenski period ispitivanja (1, 2 i 3 meseca) izvršeno je *in vitro* ispitivanje oslobađanja aciklovira iz polučvrstih SMEDDS u obliku tvrdih kapsula i *bulk SMEDDS* formulacija postupkom koji je opisan u odeljku 3.2.7. *In vitro ispitivanje oslobađanja aciklovira iz polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema u obliku tvrdih kapsula*.

3.3. Treća faza istraživanja

Treća faza eksperimenata obuhvatila je izvođenje *in vivo* bioloških testova u cilju procene biološke raspoloživosti aciklovira iz peroralno primenjenih SMEDDS i njihove neškodljivosti. U biološkim testovima su upotrebljeni uzorci polučvrstih SMEDDS koji su u okviru prethodne faze ispitivanja pokazali najpovoljniji profil oslobađanja aciklovira uz zadovoljavajuću fizičku i hemijsku stabilnost u obliku tvrdih kapsula.

3.3.1. Materijali koji su korišćeni u trećoj fazi eksperimentalnog rada

Reagensi koji su korišćeni za izvođenje biohemijskih testova kupljeni su od Beckman Coulter Inc. (Pasadena, Kalifornija, SAD). Za uvođenje životinja u opštu anesteziju korišćen je rastvor uretana 25% V/V (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA). Mravlja kiselina, acetonitril i voda su nabavljeni od Fisher Scientific. Ovi rastvarači su bili LC-MS klase.

3.3.2. Eksperimentalne životinje

Ispitivanje je izvedeno u oktobru i decembru 2016. godine na Katedri za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju, na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu. *In vivo* eksperimenti su sprovedeni na polno zrelim, zdravim belim laboratorijskim pacovima soja *Wistar*, muškog pola, telesne mase 230 – 330 grama, koji su odabrani metodom slučajnog izbora iz okota sa Vojnotehničkog Instituta iz Beograda. Laboratorijske životinje su boravile u ormanima za čuvanje laboratorijskih životinja, sa filterskim sistemom za protok vazduha (Uni-Protect, Ehret, Emendingen, Nemačka), pod standardnim uslovima, na Katedri za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. Životinje su čuvane na prosečnoj temperaturi 20 – 25 °C, uz kontrolu vlažnosti vazduha (RH 55 ± 1,5%), izložene smeni dana i noći u trajanju od po 12 časova i bio im je omogućen slobodan pristup vodi i hrani. Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama. Izvođenje oglada je odobrila Etička komisija Univerziteta u Novom Sadu dajući svoju saglasnost za plan ovog ispitivanja, broj odobrenja 01-78/16-3.

3.3.3. Priprema uzoraka za *in vivo* ispitivanja

3.3.3.1. Priprema polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema bez lekovite supstance

Polučvrsti samo-mikroemulgujući sistem bez lekovite supstance je pripremljen kao što je prethodno opisano (3.2.2. *Formulacija polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom*) mešanjem potrebnih količina ulja, surfaktanta, kosurfaktanta, hidrofilnog korastvarača i makrogola 8000, korišćenjem magnetne mešalice IKAmag (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Nemačka), na 60 ± 2 °C tokom 30 min, kako bi se dobila homogena smeša. Smeša je ostavljena da se ohladi do sobne temperature i nakon toga je čuvana pod ambijentalnim uslovima u dobro zatvorenoj boci od tamnog stakla.

3.3.3.2. Priprema polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom

Polučvrsti SMEDDS sa aciklovirom pripremljen je mešanjem odgovarajuće količine aciklovira i prethodno pripremljenog polučvrstog SMEDDS pomoću mešalice IKA RW 20 digital (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Nemačka) pri 1000 o/min tokom 24 h, na sobnoj temperaturi. Koncentracija aciklovira u pripremljenom polučvrstom SMEDDS uzorku je bila 2,5 mg/ml.

3.3.3.3. Priprema vodenog rastvora i suspenzije aciklovira

Rastvor i suspenzija aciklovira su pripremljeni preciznim odmeravanjem potrebnih količina aciklovira i vode u staklenu posudu sa navojnim poklopcem, a potom mešanjem na laboratorijskom šejkeru (HS 260 control, IKA, Nemačka) tokom 24 h, na sobnoj temperaturi. Smeše su čuvane tokom 24 h pod ambijentalnim uslovima pre početka eksperimenta. Koncentracija aciklovira u pripremljenom rastvoru odnosila je 1,0 mg/ml, a u pripremljenoj suspenziji 2,5 mg/ml.

3.3.4. *In vivo* ispitivanje biološke raspoloživosti aciklovira iz polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema

Ispitivanje uticaja samo-mikroemulgujućeg nosača na farmakokinetičke osobine aciklovira u poređenju sa čistom supstancom kod pacova izvedeno je na 18 jedinki, a životinje su metodom slučajnog izbora podeljene u 3 grupe po 6 jedinki.

1. Prvoj grupi pacova je intravenski, u lateralnu repnu venu, dato 5 mg/kg vodenog rastvora aciklovira.
2. Drugoj grupi pacova je peroralno, preko gastrične sonde, dato 5 mg/kg suspenzije aciklovira.
3. Trećoj grupi pacova je peroralno, preko gastrične sonde, dat polučvrst samo-mikroemulgujući sistem sa aciklovirom (5 mg/kg aciklovira).

Nakon obavljenih tretmana kod životinja iz grupe broj 1, 2, 3, u određenim vremenskim intervalima (5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 480 min) uzorkovana je krv iz lateralne repne vene. Nakon toga je merena koncentracija aciklovira u svakom uzorku HPLC metodom kako bi se ispitala biološka raspoloživost aciklovira nakon primene različitih farmaceutskih formulacija. Uzorkovanje krvi se vršilo u ependorf kivete.

Uzorci krvi za ispitivanje su pripremljeni dodavanjem 1000 μ l acetonitrila u 200 μ l seruma, nakon čega je izvršeno mešanje korišćenjem vorteksa. Nakon centrifugiranja 1 min na $10000 \times g$, 1000 μ l supernatanta je izdvojeno, izvršena je evaporacija pomoću azota (N_2) a potom i rekonstitucija pomoću mobilne faze do volumena od 200 μ l.

Hromatografska analiza uzoraka, odnosno određivanje koncentracije aciklovira u serumu je izvršena na Accela Thermo Scientific UHPLC sistemu, opremljenim Accela pumpom i autosemplerom (ThermoScientific™, SAD). Mobilna faza se sastojala od acetonitrila i 0,1% mravlje kiseline (30:70 V/V), sa protokom od 500 μ l/min. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C8 150 x 4,6 mm, veličine čestica 3,5 μ m, sa pretkolonom Phenomenex C8 (Agilent Technologies, SAD). Temperatura kolone je bila podešena na 30 °C. Detekcija aciklovira se vršila u pozitivnom modu, primenom tranzicije m/z 226 - m/z 152, na TSQ Quantum Access MAX triplkvadripolskom masenom spektrometru, opremljenom elektrosprej jonizacionim izvorom (HESI) (Thermo Scientific™, SAD).

Farmakokinetički parametri su izračunati, ispitivanjem uzoraka seruma, iz pojedinačnih grafika zavisnosti koncentracije leka u funkciji vremena pomoću nekompaktanskog farmakokinetičkog modela (NCA). Uzorak u nultom vremenu je služio kao osnovna vrednost. Vrednosti C_{max} i T_{max} dobijene su direktno iz profila zavisnosti koncentracije lekovite supstance i vremena. Površine ispod krive zavisnosti koncentracija/vreme (AUC_{0-t} i $AUC_{0-\infty}$) izračunate su koristeći linearne metode up/down. Konstanta brzine eliminacije (kel), kao i poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$) izračunate su iz faze terminalne eliminacije (koristeći 5-6 tačke). Izračunat je i volumen distribucije (Vd), srednje vreme zadržavanja (MRT) i klirens (Cl). Takođe, nulta koncentracija (C_0) i volumen raspodele stacionarnog stanja (V_{ss}) su procenjeni pomoću krive zavisnosti koncentracije leka i vremena nakon intravenske primene. Odnos prosečnih vrednosti $AUC_{0-\infty}$ nakon oralne primene

suspenzije ili polučvrstog SMEDDS i $AUC_{0-\infty}$ nakon intravenske primene predstavljen je kao stepen apsorpcije iz svake formulacije (apsolutna biološka raspoloživost (BA)). Statistička analiza je sprovedena pomoću ANOVA testa, korišćenjem SPSS 17,0 (Systat Software Inc., San Jose, CA). Razlike su se smatrale statistički značajnim pri $p < 0,05$.

3.3.5. Procena neškodljivosti polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom

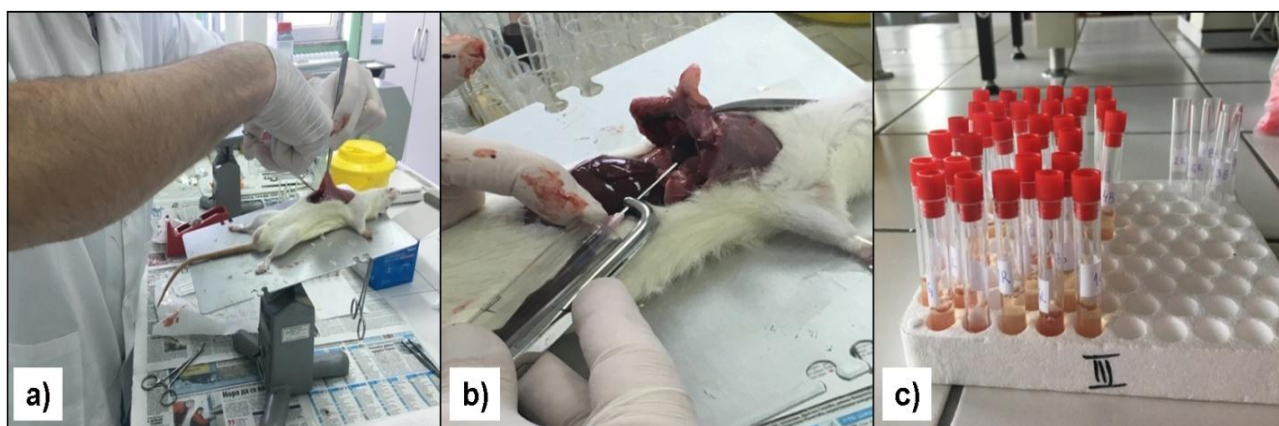
Nakon perioda od 10 poluvremena eliminacije, 36 životinja su korišćene za dalja ispitivanja neškodljivosti formulacija. Životinje su raspoređene u 6 grupa po 6 jedinki (grupe 1-6) (Tabela 7).

Tabela 7. Plan davanja ispitivanih uzoraka eksperimentalnim životinjama pri proceni neškodljivosti

Grupa	Broj životinja u grupi	Uzorak	Količina	Vreme (dan)
1.	6	Oralni rastvor aciklovira	5 mg/kg	21
2.	6	Polučvrst SMEDDS bez aciklovira	0,5 ml	21
3.	6	Polučvrst SMEDDS	5 mg/kg	21
4.	6	Oralni rastvor aciklovira	5 mg/kg	7
5.	6	Polučvrst SMEDDS bez aciklovira	0,5 ml	7
6.	6	Polučvrst SMEDDS	5 mg/kg	7

Prvoj grupi pacova je peroralno, preko gastrične sonde, davan oralni rastvor aciklovira (5 mg/kg) tokom 21 dana. Drugoj grupi pacova je peroralno, preko gastrične sonde, davan polučvrst SMEDDS u količini od 0,5 ml, tokom 21 dana. Trećoj grupi pacova je peroralno, preko gastrične sonde, davan polučvrst SMEDDS sa aciklovirom (5 mg/kg) tokom 21 dana. Četvrtoj grupi pacova je peroralno, preko gastrične sonde, davan oralni rastvor aciklovira (5 mg/kg) tokom 7 dana. Petoj grupi pacova je peroralno, preko gastrične sonde, davan polučvrst SMEDDS u količini od 0,5 ml, tokom 7 dana. Šestoj grupi pacova je peroralno, preko gastrične sonde, davan polučvrst SMEDDS sa aciklovirom (5 mg/kg) tokom 7 dana.

Nakon obavljenog tretmana, životinje iz grupa 1-6 uvedene su u opštu anesteziju izazvanu 25% w/w rastvorom uretana u dozi od 0,75 g/kg aplikovanog intraperitonealno. Životinje su potom žrtvovane kardijalnom punkcijom u cilju uzimanja dovoljne količine krvi za biohemijska ispitivanja (Slika 5). Serum je dobijen centrifugiranjem krvi (na 2000 o/min) nakon završetka procesa koagulacije. U serumu su određivani: aktivnost jetrenih aminotransferaza (alanin transaminaze (ALT) i aspartat transaminaze (AST)), koncentracija mokraćne kiseline, uree i kreatinina.



Slika 5. Sakupljanje biološkog materijala za biohemijsku analizu i procenu biološke raspoloživosti: kardijalna punkcija (a i b) i uzorci seruma (c)

Sve analize su rađene prema standardnim spektrofotometrijskim metodama na automatskom sistemu za hemijske analize AU 480 (Beckman Coulter Inc., SAD) korišćenjem originalnog seta reagenasa.

3.3.5.1. Procena parametara jetrene funkcije

Katalitička koncentracija AST u serumu životinja je merena metodom Međunarodne federacije za kliničku hemiju i laboratorijsku medicinu (*engl.* International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)) (Bergmeyer i sar., 1986). U reakciji transaminacije, između L-Aspartata i 2-ketoglutarata nastaje oksalacetat. Oksalacetat u sledećoj, indikatorskoj

reakciji, katalizovanoj od strane malat dehidrogenaze, oksiduje nikotinamid adenin dinukleotid (NADH). U ovoj metodi promena brzine oksidacije NADH u indikatorskoj reakciji je proporcionalna koncentraciji AST (Spasić i sar., 2018).

Katalitička koncentracija ALT u serumu životinja je merena metodom IFCC. U reakciji transaminacije, između L-Alanina i 2-oksoglutarata nastaje piruvat. Piruvat u sledećoj, indikatorskoj reakciji, katalizovanoj od strane laktat dehidrogenaze, oksiduje NADH. U ovoj metodi promena brzine oksidacije NADH u indikatorskoj reakciji je proporcionalna koncentraciji ALT (Spasić i sar., 2018).

3.3.5.2. Procena parametara bubrežne funkcije

Koncentracija kreatinina u serumu životinja je određena metodom Jaffe (Spasić i sar., 2018). U reakciji kreatinina sa alkalnim pikratom nastaje Janovski kompleks, koji je crvenonaranđaste boje. Merenjem apsorbance je određena koncentracija kreatinina (O'Leary i sar., 1992; Viaishya i sar., 2010).

Koncentracija uree u serumu životinja je određena metodom GLDH-UV (Spasić i sar., 2018). U prvoj reakciji urea, pod uticajem enzima ureaze, hidrolizuje na amonijak i ugljen-dioksid. U indikatorskoj reakciji formirani amonijumovi joni reaguju sa α -ketoglutaratom, u reakciji katalizovanoj od strane glutamat dehidrogenaze (GLDH), gde istovremeno dolazi do oksidacije NADH. Smanjenje koncentracije NADH je direktno proporcionalno sa koncentracijom uree u uzorku.

Koncentracija mokraćne kiseline je određena upotrebom urikaza-peroksidaza kinetičke metode (Spasić i sar., 2018).

Statistička analiza je sprovedena pomoću ANOVA testa, korišćenjem SPSS 17,0 (Systat Software Inc., SAD). *Post hoc* testiranje je urađeno korišćenjem Tukey testa. Razlike su se smatrale statistički značajnim pri $p < 0,05$.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezultati i diskusija I faze istraživanja

4.1.1. Izbor sastojaka pseudoternernih sistema tipa ulje/surfaktant/kosurfaktant/korastvarač

Početni korak u razvoju SMEDDS sa aciklovirom odnosio se na odabir farmaceutskih ekscipijensa koji će biti upotrebljeni kao sastojci nosača. Kao polazni kriterijum za izbor ekscipijensa razmatrana je eksperimentalno određena rastvorljivost aktivne supstance u pojedinačnim sastojcima (uljima, surfaktantima i hidrofilnim korastvaračima). Rezultati određivanja rastvorljivosti aciklovira u ekscipijensima, koje je urađeno u okviru ove faze, prikazani su u tabeli 8.

Tabela 8. Rastvorljivost aciklovira u ekscipijensima koji su razmatrani kao potencijalni sastojci SMEDDS

Ekscipijens	Rastvorljivost aciklovira (mg/ml)				
	Eksperimentalno određena rastvorljivost	Shishu i sar. (2009)	Kumar i sar. (2011)	Dedakia i Majumdar (2012)	Ramadan i sar. (2013)
Trigliceridi srednje dužine lanaca	4,87 ^a	-	-	-	0,215 ± 0,019 ^b
Oleinska kiselina	3,305	-	-	-	-
Polisorbat 20	10,03	-	1,37 ± 0,5	21 ± 1,2	-
Labrasol [®]	12,06	0,04	-	-	0,620 ± 0,031
Kolliphor [®] RH40	11,78 ^c	-	-	-	-
Plurol [®] Oleique CC 497	10,19	-	-	-	-
Glicerol	9,38	7,96	-	25 ± 1,5	-
Makrogol 400	10,19	-	3,19 ± 0,5	-	-

^a Crodamol[®] GTCC

^b Labrafac[®] Lipophile WL 1349

^c Određeno na temperaturi 30 ± 1 °C

U istoj tabeli su takođe navedeni i odgovarajući podaci o rastvorljivosti aciklovira iz dostupne literature koji su eksperimentalno određeni od strane drugih autora (Dedakia i Majumdar, 2012; Kumar i sar., 2011; Ramadan i sar., 2013; Shishu i sar., 2009). Pri izboru ulja, pored procene rastvorljivosti aktivne supstance, kao dodatni kriterijum razmatrana je i pogodnost ulja za mikroemulgovanje. Prema podacima iz literature, rastvorljivost aciklovira u biljnim uljima je relativno visoka (npr. u sojinom ulju ($15 \pm 0,5$ mg/ml), maslinovom ulju ($3,0 \pm 0,1$ mg/ml) i suncokretovom ulju ($9,3 \pm 0,3$ mg/ml) (Dedakia i Majumdar, 2012)), međutim, navedena ulja sadrže trigliceride dugog lanca koji nisu povoljni za spontano formiranje kapljica nanometarskih dimenzija i dispergovanje u vodenoj fazi, u kombinaciji sa nejonskim tenzidima tipa polioksietilena i poligliceril estara masnih kiselina. Kao što je već pokazano (Đekić i Primorac, 2008), ulja sa relativno niskom molarnom zapreminom, kao što su trigliceridi srednje dužine lanca i estri masnih kiselina, u kombinaciji sa nejonskim tenzidima polioksietilenskog tipa i poliglicerolskih estara masnih kiselina, su prikladniji za mikroemulgovanje. Takođe, studija Ramadana i saradnika (2013) ukazala je na to da ulja sa malom molarnom zapreminom, uključujući trigliceride srednje dužine lanca, omogućavaju veću rastvorljivost aciklovira u odnosu na druga ulja. Zbog toga su trigliceridi srednje dužine lanca izabrani kao ulje za pripremu pseudoternernih sistema u ovoj fazi eksperimentalnog rada. Eksperimentalno određena rastvorljivost aciklovira u ovom ekscipijensu iznosila je 4,87 mg/ml, a bila je i značajno veća od već objavljene rastvorljivosti u ovom ulju (Tabela 8) i od eksperimentalno određene rastvorljivosti u oleinskoj kiselini koja je takođe razmatrana kao potencijalni sastojak formulacije (3,305 mg/ml). Dobijeno odstupanje između podataka o rastvorljivosti koji su objavili različiti autori može se pripisati potencijalnim kvantitativnim i kvalitativnim razlikama između komercijalno dostupnih ekscipijenasa različitih proizvođača i/ili raznolikosti eksperimentalnih pristupa i analitičkih metoda koje su korišćene za određivanje ovog parametra.

Surfaktanti koji su bili razmatrani kao potencijalni sastojci SMEDDS odabrani su u skladu sa relevantnim podacima iz studija koje su pokazale da su povoljni za izradu samo-dispergujućih formulacija i smatra se da mogu uticati na povećanje biološke raspoloživosti oralno primenjenih aktivnih supstanci (Fatouros i sar., 2007; Hauss, 2007). Nejonski tenzidi tipa polioksietilenskih derivata (Labrasol[®] (HLB 12), polisorbat 20 (~ HLB 16,7), i Kolliphor[®] RH40 (HLB 14 – 16)) su ispitani kao potencijalni surfaktanti.

Mikroemulzioni sistemi, kao i SMEDDS, koji praktično predstavljaju mikroemulzione prekoncentrate, uobičajeno se formulišu sa visokim koncentracijama površinski aktivnih materija da bi se obezbedio nizak međupovršinski napon koji je preduslov za proces mikroemulgovanja (Wennerstrom i sar., 2006). Međutim, visoki nivoi surfaktanta često nisu prihvatljivi zbog neželjenih efekata u GIT-u ili ekonomskih razloga. Zbog toga je izbor vrste površinski aktivnih materija i njihovih koncentracija od ključnog značaja prilikom dizajna ovih sistema. Dobro je poznato da inkorporiranje drugog amfifila, kao kosurfaktanta, omogućava održavanje efikasnosti surfaktanta kao kada se on primenjuje u određenoj koncentraciji samostalno (Hiuberts i Shah, 1997; Sagitani i Friberg, 1980). Interesovanje za korišćenje biokompatibilnih nejonskih surfaktanata niže HLB vrednosti kao kosurfaktanta u SMEDDS je potencijalno značajno za postizanja veće stabilnosti sistema, kao i niže toksičnosti i iritacije u GIT-u (Lawrence i Rees, 2000), međutim, ovaj pristup do sada nije detaljno proučavan. U cilju povećanja biokompatibilnosti SMEDDS sa aciklovirom, u okviru ove faze istraživanja je razmotrena mogućnost upotrebe poligliceril-3-dioleata (Plurol[®] Oleique CC 497), kao kosurfaktanta. To je nejonski surfaktant iz grupe biorazgradivih i biokompatibilnih poliglicerolskih glicerida niske HLB vrednosti (HLB ~ 3).

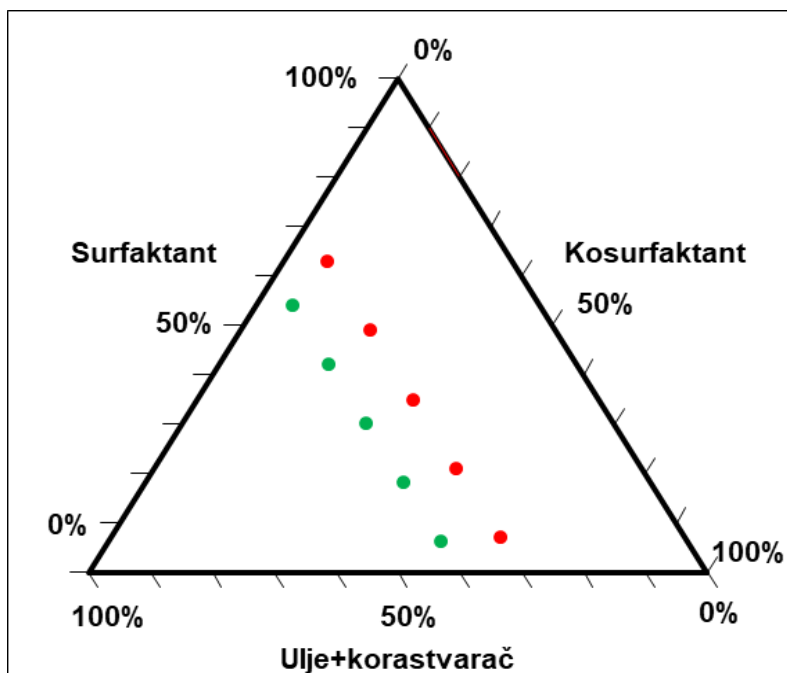
Podaci u literaturi za rastvorljivost aciklovira bili su dostupni za polisorbata 20 i Labrasol[®], a značajno su se razlikovali među studijama različitih istraživača (Tabela 8). Eksperimentalno određene vrednosti za rastvorljivost aciklovira za ova dva surfaktanta bile su značajno različite u poređenju sa literaturnim podacima. S druge strane, eksperimentalno određene vrednosti za rastvorljivost aciklovira bile su slične međusobno i kod surfaktanata visoke HLB vrednosti, kao i kod kosurfaktanta, čija je HLB vrednosti bila znatno niža, što je moglo da se smatra kao dodatna pogodnost pri izboru kosurfaktanta za formulisanje SMEDDS sa ovom aktivnom supstancom (Tabela 8).

Na osnovu literaturnih podataka, makrogol 400 i glicerol se mogu smatrati hidrofilnim korastvaračima sa visokom rastvorljivošću aciklovira (Tabela 8). Rastvorljivost u ovim korastvaračima, koja je eksperimentalno određena u ovom istraživanju, bila je takođe slična sa podacima dobijenim za rastvorljivost u surfaktantima. Relativno visoke vrednosti eksperimentalno određene rastvorljivosti aciklovira u izabranim ekscipijensima činile su ih

odgovarajućim kandidatima za formulaciju samo-dispergujućih sistema sa potencijalno visokim kapacitetom za inkorporiranje ove aktivne supstance.

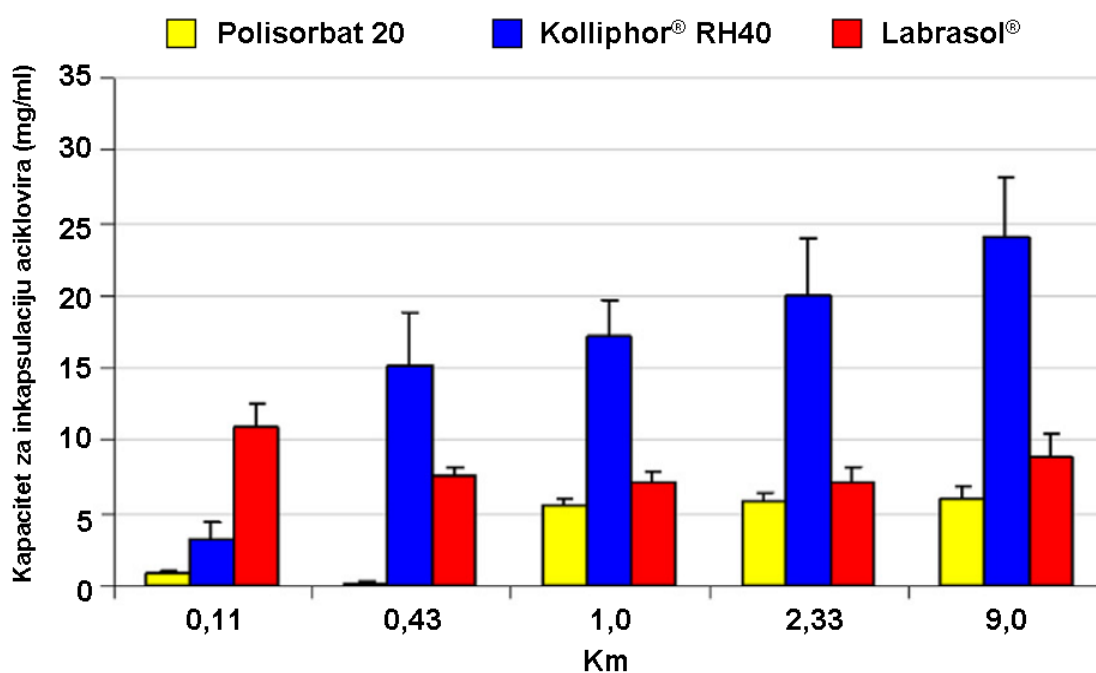
4.1.2. Fazno ponašanje pseudoternernih sistema tipa ulje/surfaktant/kosurfaktant/korastvarač

Ukupno je pripremljeno 60 pseudoternernih sistema tipa trigliceridi srednje dužine lanaca/surfaktant/poligliceril-3-dioleat/korastvarač koji su se međusobno razlikovali po vrsti surfaktanta, masenom odnosu surfaktanta i kosurfaktanta (Km vrednost), vrsti i sadržaju korastvarača, kako je prethodno opisano u tabelama 4 i 5. Na slici 6 prikazan je kvantitativni sastav pripremljenih pseudoternernih sistema tipa trigliceridi srednje dužine lanaca/surfaktant/poligliceril-3-dioleat/korastvarač u faznom dijagramu tipa izoternskog pseudoternernog trougla. Kao pseudokomponenta u faznom trouglu prikazan je zbir udela ulja (10%) i korastvarača (20%, odnosno, 30%).

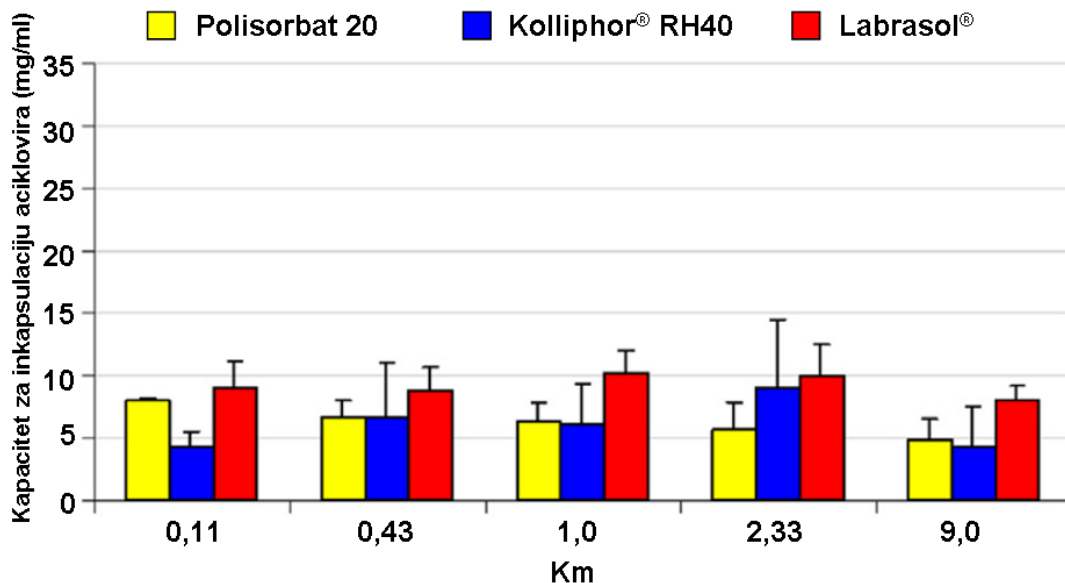


Slika 6. Fazni dijagram tipa pseudoternernog trougla sa prikazanim kvantitativnim sastavom ispitivanih pseudoternernih sistema tipa trigliceridi srednje dužine lanaca/surfaktant/poligliceril-3-dioleat/korastvarač sa 20% korastvarača (●) i 30% korastvarača (●)

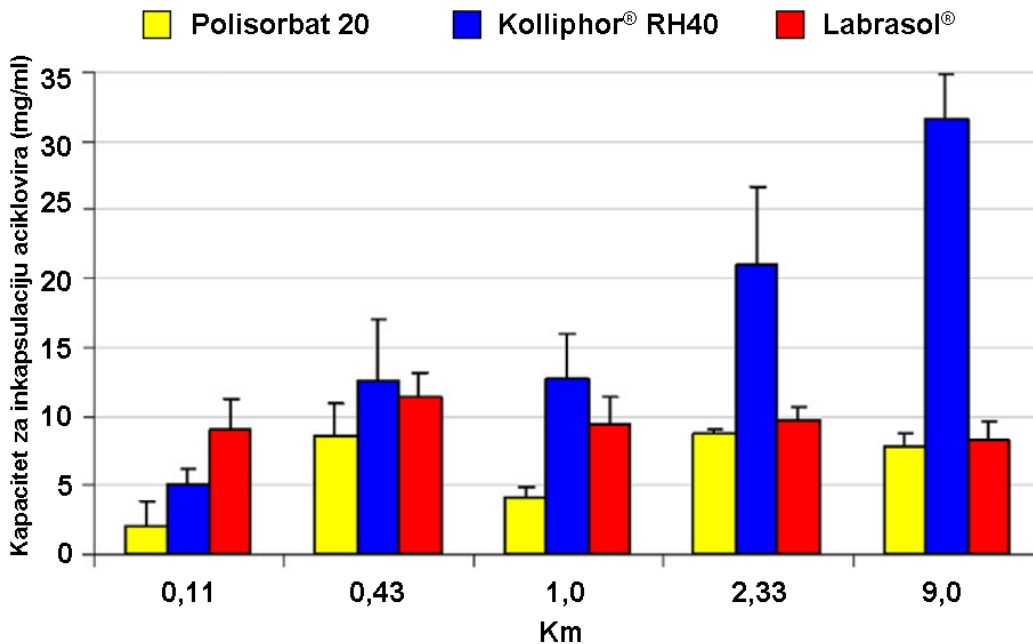
Pripremljeni pseudoternerni sistemi su bili homogeni i transparentni (izmereni procenat transmitance (% T) iznosio je $\geq 99\%$). Pripremljeni uzorci sa aciklovirom su čuvani 48 časova pod ambijentalnim uslovima. Tokom i nakon ovog perioda nisu uočene promene njihovih organoleptičkih osobina (boja, homogenost, prozirnost) koje bi ukazivale na nepotpunu uzajamnu rastvorljivost (mešljivost) ekscipijenasa. Ispitan je njihov kapacitet za inkapsulaciju aciklovira, a eksperimentalno određene vrednosti za rastvorljivost aciklovira u ispitivanim pseudoternernim sistemima su prikazane na slikama 7-10.



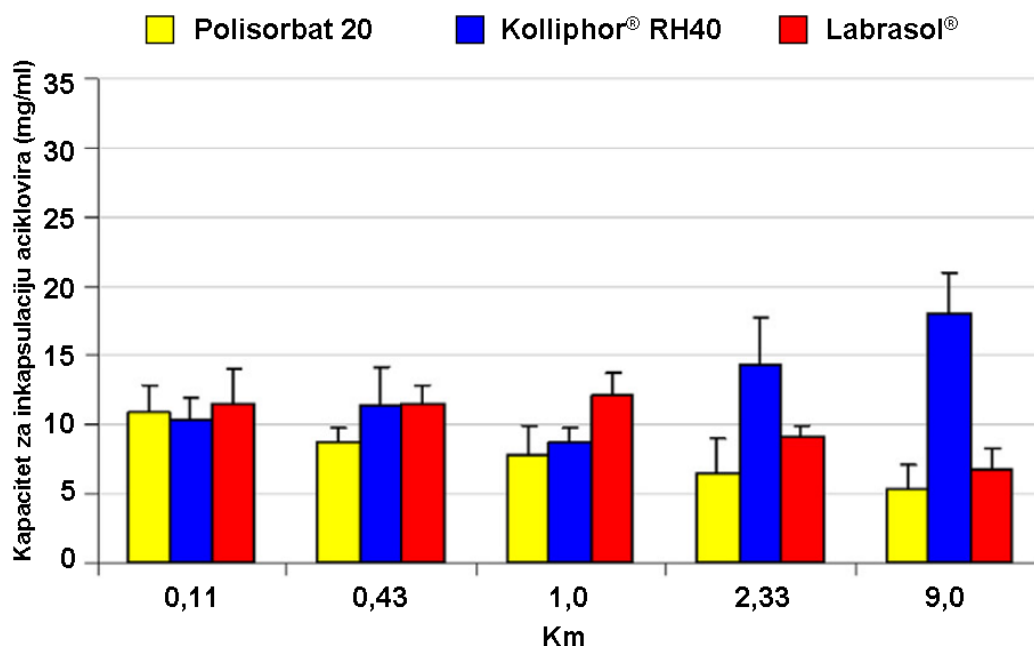
Slika 7. Kapacitet za inkapsulaciju aciklovira u funkciji Km ispitivanih pseudoternernih sistema koji sadrže različite surfaktante (polisorbat 20, Kolliphor® RH40 ili Labrasol®) i korastvarač glicerol u koncentraciji 20%



Slika 8. Kapacitet za inkapsulaciju aciklovira u funkciji Km ispitivanih pseudoternernih sistema koji sadrže različite surfaktante (polisorbat 20, Kolliphor® RH40 ili Labrasol®) i korastvarač makrogol 400 u koncentraciji 20%



Slika 9. Kapacitet za inkapsulaciju aciklovira u funkciji Km ispitivanih pseudoternernih sistema koji sadrže različite surfaktante (polisorbat 20, Kolliphor® RH40 ili Labrasol®) i korastvarač glicerol u koncentraciji 30%



Slika 10. Kapacitet za inkapsulaciju aciklovira u funkciji Km ispitivanih pseudoternernih sistema koji sadrže različite surfaktante (polisorbat 20, Kolliphor® RH40 ili Labrasol®) i korastvarač makrogol 400 u koncentraciji 30%

Rastvorljivost aciklovira u ispitivanim pseudoternernim sistemima varirala je od 0,18 mg/ml do 31,66 mg/ml. Uočeno je da vrsta surfaktanta i korastvarača, kao i njihove koncentracije značajno utiču na kapacitet ispitivanih pseudoternernih sistema za inkorporiranje lekovite supstance. Maksimalna rastvorljivost aciklovira je određena u sistemima koji su pripremljeni sa 20% glicerola i iznosila je 5,92 mg/ml, 10,98 mg/ml i 24,06 mg/ml, kada su kao surfaktanti korišćeni polisorbat 20, Labrasol® i Kolliphor® RH40, redom. U sistemima sa polisorbatom 20 i Kolliphor® RH40 primećeno je da povećanje vrednosti Km (tj. sadržaja surfaktanta u smeši sa kosurfaktantom) povećava rastvorljivost aciklovira, dok se u sistemima sa Labrasol®-om kapacitet inkorporiranja lekovite supstance nije značajno promenio u ispitivanom opsegu Km vrednosti (Slika 7). Rastvorljivost aciklovira u pseudoternernim sistemima sa 20% glicerola i sa Labrasol®-om ili polisorbatom 20 bila je u domenu rastvorljivosti lekovite supstance u pojedinačnim surfaktantima. Kapacitet za inkorporiranje aciklovira u pseudoternernom sistemu

sa 20% glicerola i polisorbatom 20 bio je sličan rastvorljivosti lekovite supstance u trigliceridima srednje dužine lanca koji su upotrebljeni kao lipidna komponenta.

Rastvorljivost aciklovira u pseudoternernim sistemima koji su pripremljeni sa 20% makrogola 400 i Labrasol[®]-om takođe nije bila značajno promenjena na različitim Km vrednostima, a kretala se od 8,06 mg/ml do 10,09 mg/ml. Međutim, kada je kao surfaktant upotrebljen polisorbat 20, rastvorljivost se smanjivala od 7,9 mg/ml do 4,77 mg/ml sa povećanjem Km vrednosti, a kada je Kolliphor[®] RH40 korišćen kao surfaktant kretala se u opsegu od 4,28 do 9,04 mg/ml (Slika 8). Ovi rezultati su bili u opsegu rastvorljivosti aciklovira u pojedinačnim ekscipijensima (Tabela 8). Prema tome, izbor korastvarača, odnosno zamena glicerola sa makrogolom 400, imao je uticaj na kapacitet inkorporiranja aciklovira samo u pseudoternernim sistemima pripremljenim sa Kolliphor[®] RH40.

Maksimalna rastvorljivost aciklovira u pseudoternernim sistemima kod kojih je glicerol upotrebljen u koncentraciji od 30%, bila je 8,65 mg/ml, 11,49 mg/ml i 31,66 mg/ml, kada je kao surfaktant korišćen polisorbat 20, Labrasol[®] i Kolliphor[®] RH40, redom. Slično kao i za pseudoternerne sisteme sa 20% glicerola, primećeno je da je rastvorljivost aciklovira bila slična kao u pojedinačnim ekscipijensima kada se kao surfaktant koristi polisorbat 20 ili Labrasol[®]. U prisustvu surfaktanta Kolliphor[®] RH40 došlo je do povećanja rastvorljivosti sa povećanjem Km vrednosti (Slika 9).

Rastvorljivost aciklovira u pseudoternernim sistemima pripremljenim sa 30% makrogol 400, bila je nešto viša u prisustvu polisorbata 20 (6,75 - 12,15 mg/ml) i Labrasol[®]-a (5,27 - 10,9 mg/ml) (Slika 10), u poređenju sa pseudoternernim sistemima koji su pripremljeni sa nižim koncentracijama istog korastvarača (Slika 8). Međutim, samo u sistemima koji u svom sastavu imaju Kolliphor[®] RH40, rastvorljivost lekovite supstance se značajno povećala u opsegu od 8,67 mg/ml do 18,02 mg/ml, što je praćeno povećanjem Km vrednosti (Slika 10).

Prikazani rezultati pokazali su da povećanje koncentracije korastvarača, glicerola ili makrogola 400, uprkos smanjenju ukupnog sadržaja nejonskih surfaktanata i ulja, može dovesti do povećanja rastvorljivosti aciklovira u pseudoternernim sistemima sa sadržajem korastvarača u

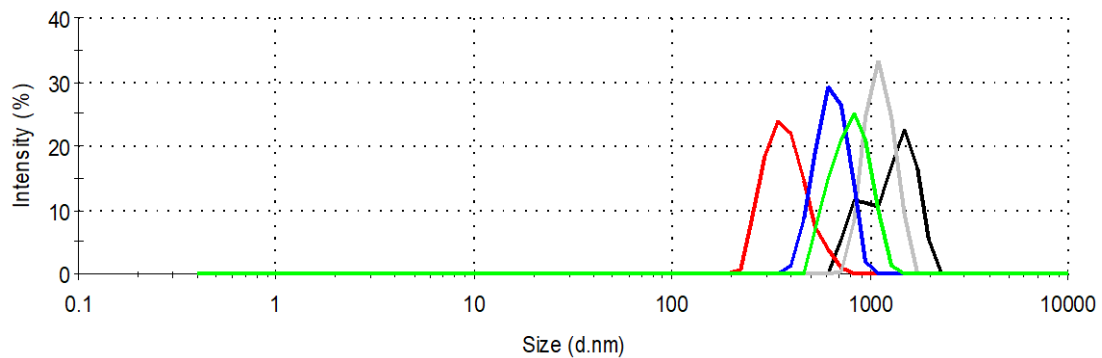
koncentraciji od 30%, kada je Kolliphor[®] RH40 korišćen kao surfaktant. Izbor korastvarača za obe ispitivane koncentracije, uticao je na rastvorljivost aciklovira u uzorcima, koja je bila povećana prilikom upotrebe glicerola, iako je eksperimentalno određeno da je rastvorljivost aciklovira u oba korastvarača bila slična (Tabela 8). Osim toga, uticaj K_m vrednosti na kapacitet inkapsulacije aciklovira u pseudoternernim sistemima bio je najizraženiji u sistemima izrađenim sa Kolliphor[®]-om RH40 i dostigao je maksimum pri najvišem ispitivanom K_m (9,0) u prisustvu: 20% glicerola (24,6 mg/ml), 20% makrogola 400 (18,02 mg/ml) i 30% glicerola (31,66 mg/ml). Dobijeni rezultati su ukazivali da je polarnost ovih sistema bila najpovoljnija za rastvaranje aciklovira.

U nastavku istraživanja kod formulisanih pseudoternernih sistema sa aciklovirom ispitivan je uticaj formulacionih parametara na disperzibilnost i *in vitro* permeabilnost aktivne supstance.

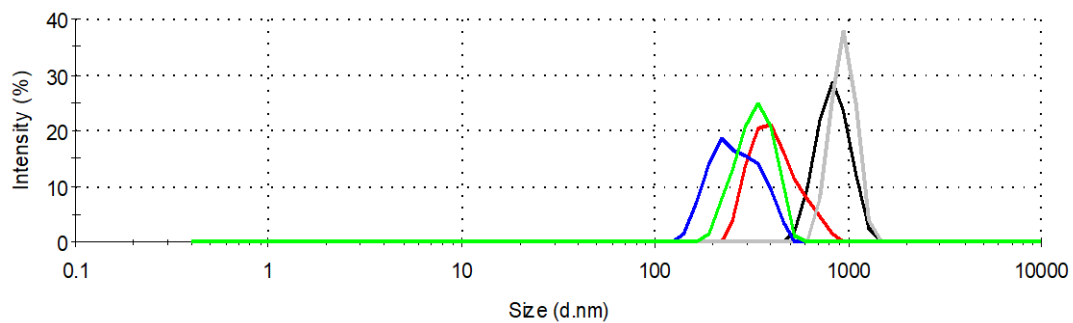
4.1.3. Uticaj surfaktanata, kosurfaktanta i korastvarača na disperzibilnost ispitivanih pseudoternernih sistema sa aciklovirom

Disperzibilnost pseudoternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/surfaktant/poligliceril-3-dioleat/korastvarač sa aciklovirom je procenjena u vodenim medijumima različitih pH vrednosti. Sve ispitivane formulacije brzo su formirale vodene disperzije. Dobijene disperzije su posmatrane kako bi se vizuelno proverila njihova prozirnost i homogenost. Korišćenjem tehnike UV/Vis spektrofotometrije izmerena je transmitanca (%T) nastalih disperzija i određena je prosečna veličina kapi i njihova raspodela primenom tehnike PCS.

Na slikama 11 i 12 prikazana je raspodela veličine kapi prema intenzitetu rasute svetlosti u disperzijama koje su dobijene iz pseudoternernih sistema koji su u svom sastavu imali Labrasol[®] kao surfaktant i glicerol kao korastvarač. Njihova transmitanca navedena je u tabeli 9.

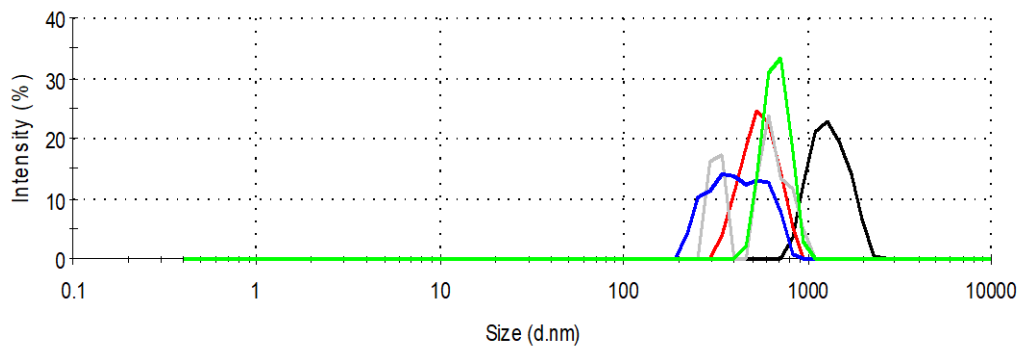


a)

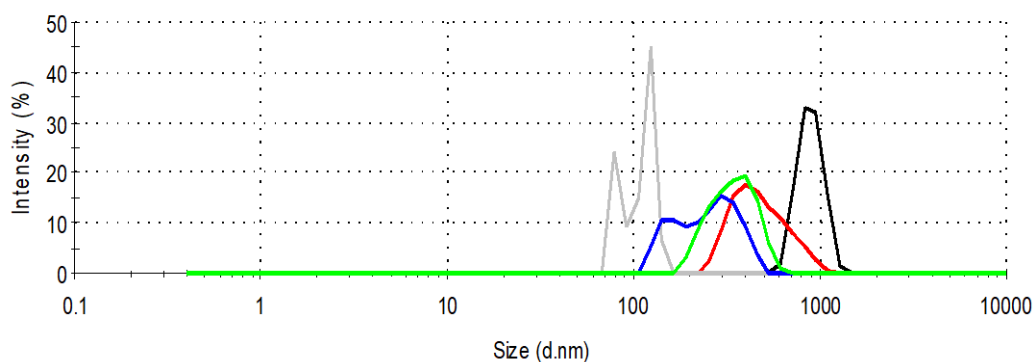


b)

Slika 11. Raspodela veličine kapi prema intenzitetu rasute svetlosti u disperziji pseudoternernih sistema sa acikloviromu 0,1 M HCl (a) i fosfatnom puferu pH 7,2 (b). Pseudoternerni sistemi su pripremljeni sa Labrasol[®]-om kao surfaktantom i 20% glicerola, a Km vrednost je iznosila: 9,0 (—), 2,33 (—), 1,0 (—), 0,43 (—) i 0,11 (—)



a)



b)

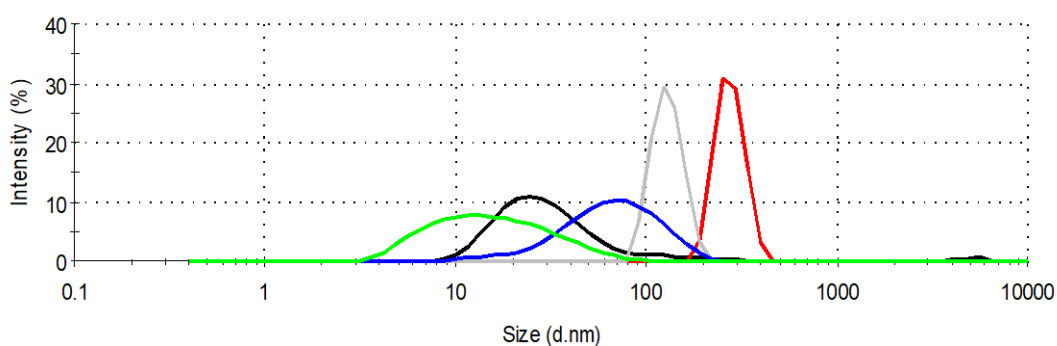
Slika 12. Raspodela veličine kapi prema intenzitetu rasute svetlosti u disperziji pseudoternernih sistema sa acikloviromu 0,1 M HCl (a) i fosfatnom puferu pH 7,2 (b). Pseudoternerni sistemi su pripremljeni sa Labrasol®-om kao surfaktantom i 30% glicerola, a Km vrednost je iznosila: 9,0 (—), 2,33 (—), 1,0 (—), 0,43 (—) i 0,11 (—)

Tabela 9. Transmitanca (%T) disperzija pseudoternernih sistema sa aciklovirom i Labrasol[®]-om u kiselom i baznom medijumu (n=3) koji sadrže korastvarač glicerol u koncentraciji 20% i 30%

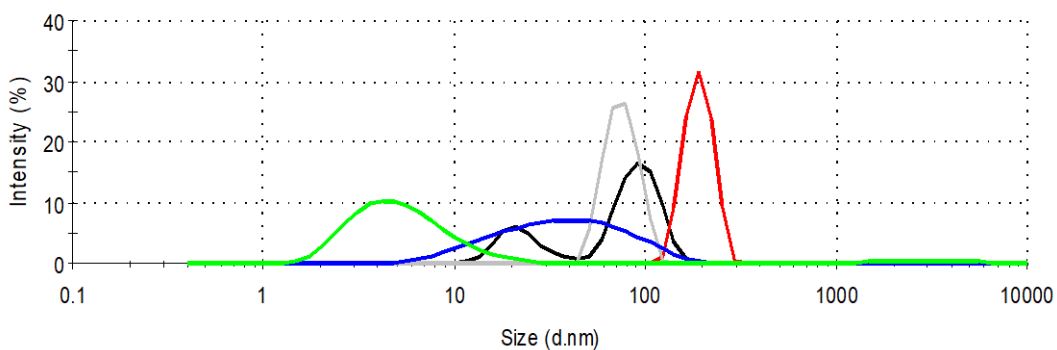
Koncentracija glicerola	Km	0,1 M HCl	Fosfatni pufer pH 7,2
		% (T)	% (T)
20%	9,00	0,53 ± 0,05	0,67 ± 0,03
	2,33	0,33 ± 0,02	0,33 ± 0,01
	1,00	0,46 ± 0,03	0,65 ± 0,03
	0,43	0,83 ± 0,01	0,11 ± 0,02
	0,11	0,85 ± 0,01	0,13 ± 0,01
30%	9,00	0,83 ± 0,02	16,37 ± 1,33
	2,33	0,29 ± 0,01	0,46 ± 0,02
	1,00	0,74 ± 0,05	0,73 ± 0,04
	0,43	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,01
	0,11	1,81 ± 0,01	0,10 ± 0,01

Primećen je značajan uticaj vrste surfaktanta, Km vrednosti i vrste i koncentracije korastvarača na %T, Z-ave i PdI dobijenih disperzija. Transmitanca uzoraka disperzija pripremljenih iz sistema sa Labrasol[®]-om je bila manja od 20% (Tabela 9), a prosečna veličina kapi bila je u opsegu od 200 – 1000 nm u kiseloj sredini (0,1 M HCl), i od 300 nm do 1500 nm u baznom medijumu (fosfatni pufer pH 7,2), sa visokim indeksom polidisperziteteta (PdI > 0,250) (Slike 11 i 12). Ovo ukazuje na vrlo ograničenu sposobnost sistema koji sadrže Labrasol[®] za samo-dispergovanje u ispitivanim vodenim medijumima kako bi se formirala mikroemulzija (samo-mikroemulgovanje), te nisu ispunili kriterijume na osnovu kojih su mogli da budu klasifikovani kao SMEDDS, i to za sve ispitivane Km vrednosti.

Raspodela veličine kapi u disperzijama pseudoternernih sistema koji su kao surfaktant sadržali polisorbata 20 i kao korastvarač glicerol prikazana je na slikama 13 i 14. Njihova transmitanca navedena je u tabeli 10. Pseudoternerni sistemi sa polisorbatom 20 takođe nisu ispunili kriterijume koji su postavljeni za SMEDDS. Iako je prosečna veličina kapi bila u rasponu od 5 – 300 nm u oba medijuma, u ovim uzorcima raspodela veličine kapi je bila veoma široka i u nekim slučajevima je bila bimodalna ili su uočeni višestruki pikovi, tako da se moglo smatrati da vrednosti Z -ave nisu imale fizički značaj. Godderris i saradnici su na sličan način tumačili rezultate analize veličine kapi u polidisperznim nanodisperzijama (Goddeeris i sar., 2006).

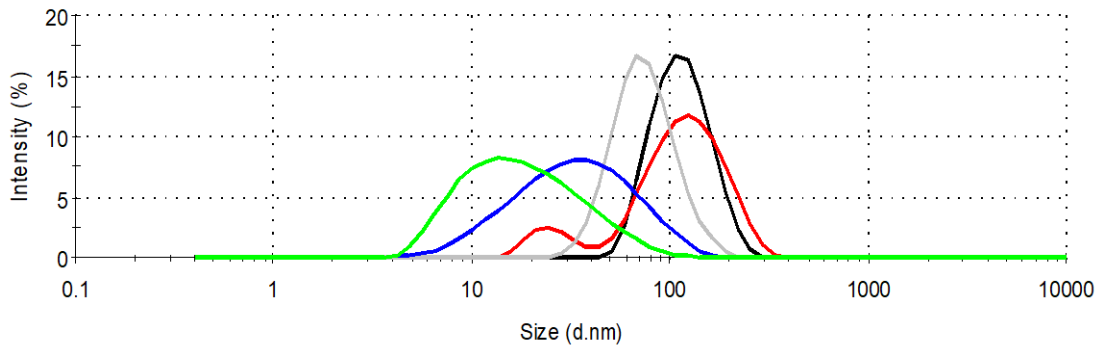


a)

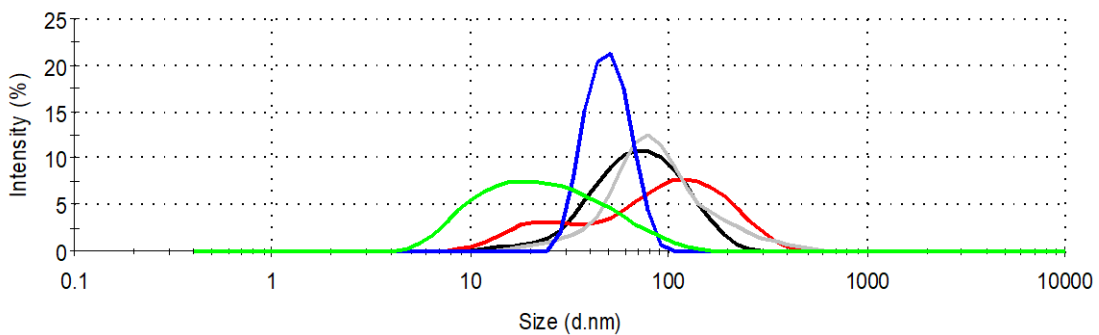


b)

Slika 13. Raspodela veličine kapi prema intenzitetu rasute svetlosti u disperziji pseudoternernih sistema sa acikloviromu 0,1 M HCl (a) i fosfatnom puferu pH 7,2 (b). Pseudoternerni sistemi su pripremljeni sa polisorbatom 20 kao surfaktantom i 20% glicerola, a K_m vrednost je iznosila: 9,0 (—), 2,33 (—), 1,0 (—), 0,43 (—) i 0,11 (—)



a)



b)

Slika 14. Raspodela veličine kapi prema intenzitetu rasute svetlosti u disperziji pseudoternernih sistema sa acikloviromu 0,1 M HCl (a) i fosfatnom puferu pH 7,2 (b). Pseudoternerni sistemi su pripremljeni sa polisorbitom 20 kao surfaktantom i 30% glicerola, a K_m vrednost je iznosila: 9,0 (—), 2,33 (—), 1,0 (—), 0,43 (—) i 0,11 (—)

Tabela 10. Transmitanca (%T) disperzija pseudoternernih sistema sa aciklovirom i polisorbatom 20 u kiselom i baznom medijumu (n=3) koji sadrže korastvarač glicerol u koncentraciji 20% i 30%

Koncentracija glicerola	Km	0,1 M HCl	Fosfatni pufer pH 7,2
		% (T)	% (T)
20%	9,00	97,24 ± 1,17	68,33 ± 1,05
	2,33	0,27 ± 0,02	0,14 ± 0,02
	1,00	0,06 ± 0,03	0,04 ± 0,03
	0,43	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01
	0,11	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
30%	9,00	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,03
	2,33	0,07 ± 0,03	0,05 ± 0,03
	1,00	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,02
	0,43	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02
	0,11	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01

Rezultati u vezi sa disperzibilnošću pseudoternernih sistema koji su u svom sastavu imali surfaktante Labrasol[®] i polisorbitat 20 u kombinaciji sa hidrofobnim kosurfaktantom poligliceril-3-dioleatom ukazivali su na njihovu nedovoljnu sposobnost za stabilizaciju nanodisperzija tipa ulje – u – vodi i za solubilizaciju aciklovira.

Za razliku od pseudoternernih sistema sa Labrasol[®]-om i polisorbatom 20, disperzije određenih pseudoternernih sistema pripremljenih sa Kolliphor[®]-om RH40 imali su karakteristike koje su bile u skladu sa postavljenim kriterijumima za SMEDDS. Poredak HLB vrednosti ispitivanih surfaktanta bio je: polisorbitat 20 > Kolliphor[®] RH40 > Labrasol[®], dok se dužina polioksietilenskog lanca smanjivala sledećim redosledom: Kolliphor[®] RH40 > polisorbitat 20 > Labrasol[®]. Prema tome, uočene razlike u smislu disperzibilnosti pseudoternernih sistema

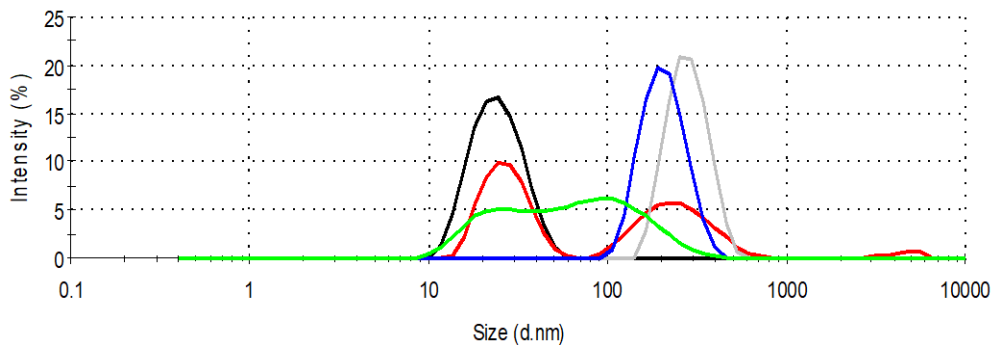
pripremljenih sa različitim surfaktantima, mogle su se objasniti pre svega razlikama u njihovoj hemijskoj strukturi i sposobnosti za solubilizaciju ulja i lekovite supstance u vodenoj fazi, nego sa HLB vrednostima. Kao što je poznato, mogućnost solubilizacije nejonskih surfaktanata polioksietilenskog tipa povećava se sa povećanjem dužine hidrofilnog polioksietilenskog lanca (Đekić i Primorac, 2008). Detaljni rezultati merenja transmitance i karakterizacija veličine kapi nakon dispergovanja uzoraka sa aciklovirom i Kolliphor® RH40 u kiselom i baznom medijumu, prikazani su u tabelama 11-14 i na slikama 15-18.

Tabela 11. Transmitanca (%T) disperzija pseudoternernih sistema sa aciklovirom i Kolliphor® RH40 u kiselom i baznom medijumu (n=3) koji sadrže korastvarač glicerol u koncentraciji 20% i 30%

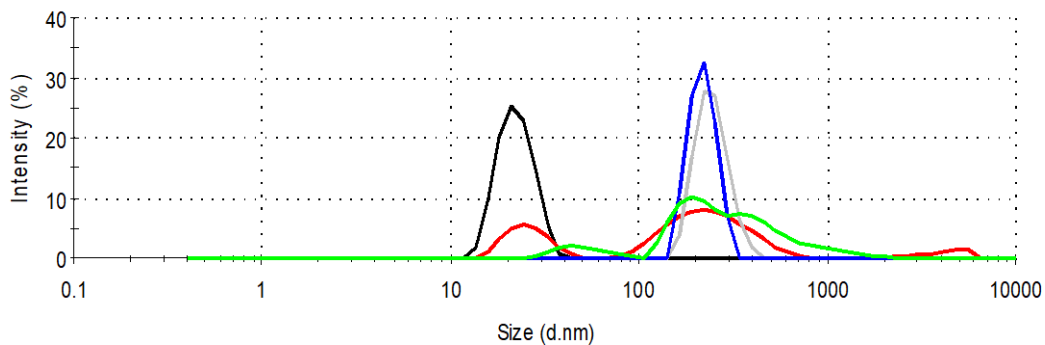
Koncentracija glicerola	Km	0,1 M HCl	Fosfatni pufer pH 7,2
		% (T)	% (T)
20%	9,00	96,75 ± 1,58	96,53 ± 1,43
	2,33	80,82 ± 0,93	49,95 ± 1,33
	1,00	0,66 ± 0,07	0,12 ± 0,03
	0,43	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01
	0,11	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,02
30%	9,00	84,39 ± 1,60	10,73 ± 2,44
	2,33	80,73 ± 3,80	80,03 ± 1,27
	1,00	0,21 ± 0,05	0,02 ± 0,01
	0,43	0,22±0,06	0,14±0,02
	0,11	0,07±0,02	0,04±0,01

Među ispitivanim formulacijama, najveći procenat transmitance ($\%T \geq 95\%$) izmeren je u disperzijama pseudoternernog sistema koji sadrži 20% glicerola, pri $K_m 9,0$ (Tabela 11), tj. kada sadržaj surfaktanta višestruko prevladava nad sadržajem kosurfaktanta. Ovo je bilo očekivano usled niske solubilizacione moći kosurfaktanta, pa se solubilizaciona moć smeše surfaktanta i kosurfaktanta povećavala sa povećanjem K_m i dostiže maksimum pri maksimalnom ispitivanom udelu surfaktanta u smeši ($K_m 9,0$). Međutim, u preliminarnom ispitivanju sličnih ternernih sistema ulje/surfaktant/korastvarač, bez kosurfaktanta, pokazano je da njihove karakteristike u pogledu homogenosti, transparentnosti i disperzibilnosti u korišćenim vodenim medijumima nisu bile zadovoljavajuće kako bi se oni mogli klasifikovati kao SMEDDS.

Procenat transmitance koji je izmeren za pseudoternerni sistem koji sadrži 20% glicerola pri $K_m 2,33$ je bio 80,82% u kiselom medijumu, ali je u baznom medijumu bio manji od 50% (Tabela 11). Vrednost ovog parametra bila je manja od 50% za disperzije svih ostalih ispitivanih pseudoternernih sistema, a kod $K_m \leq 1,0$ bile su manje od 1%. Kod pseudoternernih sistema koji sadrže više koncentracije korastvarača (30% glicerola), maksimalna vrednost transmitance iznosila je do 84,39% u disperzijama pri $K_m 9,0$ i 2,33. Procenat transmitance kod ostalih disperzija dobijenih iz drugih pseudoternernih sistema sa 30% glicerola, bio je veoma nizak ($\%T < 1\%$) na $K_m \leq 1,0$, u oba medijuma (Tabela 11). Uočeno je da se izgled disperzija menjao od prozirnih, preko opalescentnih do zamućenih, a procenat transmitance se smanjivao od vrednosti blizu 100% do vrednosti manje od 1%, srazmerno smanjenju sadržaja surfaktanta u smeši sa kosurfaktantom. Dobijeni rezultati su povezani sa smanjenjem hidrofилности ispitivanih sistema pri $K_m \leq 1,0$, pri čemu je došlo do gubitka sposobnosti spontanog dispergovanja (mikroemulgovanja) nakon mešanja sa upotrebljenim vodenim medijumima.

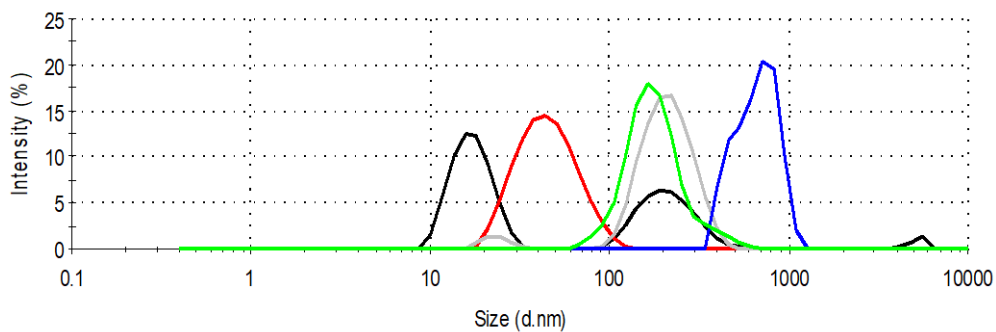


a)

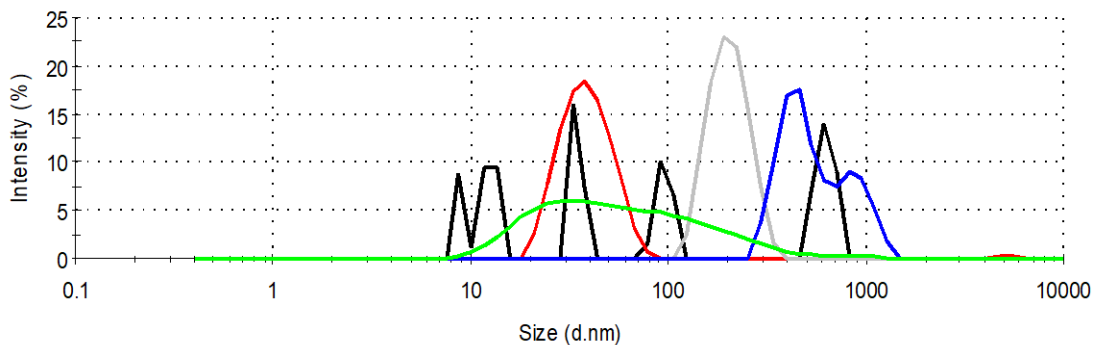


b)

Slika 15. Raspodela veličine kapi prema intenzitetu rasute svetlosti u disperziji pseudoternernih sistema sa acikloviromu 0,1 M HCl (a) i fosfatnom puferu pH 7,2 (b). Pseudoternerni sistemi su pripremljeni sa Kolliphor[®]-om RH40 kao surfaktantom i 20% glicerola, a Km vrednost je iznosila: 9,0 (—), 2,33 (—), 1,0 (—), 0,43 (—) i 0,11 (—)



a)



b)

Slika 16. Raspodela veličine kapi prema intenzitetu rasute svetlosti u disperziji pseudoternernih sistema sa acikloviromu 0,1 M HCl (a) i fosfatnom puferu pH 7,2 (b). Pseudoternerni sistemi su pripremljeni sa Kolliphor[®]-om RH40 kao surfaktantom i 30% glicerola, a Km vrednost je iznosila: 9,0 (—), 2,33 (—), 1,0 (—), 0,43 (—) i 0,11 (—)

Tabela 12. Prosečna veličina kapi (Z-ave) i polidisperzni indeks (PdI) ispitivanih pseudoternernih sistema sa aciklovirom koji sadrže Kolliphor® RH 40 kao surfaktant i glicerol kao korastvarač u koncentraciji 20% i 30% nakon dispergovanja u vodenim medijumima (0,1 M HCl i fosfatni pufer pH 7,2) (srednja vrednost ± S.D., n=3)

Koncentracija glicerola	Km	0,1 M HCl		Fosfatni pufer pH 7,2	
		Z-ave	PdI	Z-ave	PdI
20%	9,00ⁱ	22,91±1,16	0,128±0,016	30,12±5,97	0,172±0,032
	2,33	47,53±1,04	0,545±0,098	86,71±5,38	0,818±0,189
	1,00	236,6±12,4	0,053±0,043	268,5±7,9	0,726±0,445
	0,43	173,8±2,8	0,160±0,129	267±18	1,00
	0,11	43,59±1,20	0,411±0,048	214,7±32,2	0,348±0,241
30%	9,00	29,86±1,52	0,61±0,050	3607±3931	0,902±0,109
	2,33ⁱⁱⁱ	42,12±2,17	0,139±0,006	37,46±1,23	0,15±0,019
	1,00	161,2±9,5	0,228±0,031	193,3±6,3	0,059±0,008
	0,43	862,2±84,7	1,00	629,2±167,8	0,619±0,473
	0,11	169,6±20,6	0,156±0,104	42,46±2,17	0,374±0,074

ⁱ SMEDDS1, ⁱⁱⁱ SMEDDS3

Uticaj Km vrednosti i vrste i udela korastvarača na Z-ave i indeks polidisperziteta (PdI) u ispitivanim disperzijama prikazan je u tabeli 12 i na slikama 15 i 16. Rezultati karakterizacije veličine kapi bili su u skladu sa rezultatima merenja transmitance za disperzije koje su pripremljene iz pseudoternernog sistema koji je klasifikovan kao SMEDDS, a imao je u svom sastavu 20% glicerola pri Km 9,0. Procenat transmitance ovog sistema je bio blizu 100% i odgovarao je prosečnoj veličini kapi koja je u opsegu nanoveličina. Z-ave vrednost u ovom sistemu sa glicerolom je iznosila je 22,91 nm (u kiselom medijumu) i 30,12 nm (u alkalnom

medijumu) (Tabela 12), dok su raspodele veličine kapi bile monomodalne u relativno uskom opsegu veličina ($PdI < 0,250$) (Slika 15 i 16). Zbog toga se moglo očekivati da ovaj sistem verovatno može da formira mikroemulziju sa inkorporiranim aciklovirom nakon dispergovanja u kiseloj i baznoj vodenoj sredini u želucu, odnosno, tankom crevu. Ostali pseudoternerni sistemi koji su u svom sastavu imali 20% glicerola nisu imali disperzibilnost i transmitancu u okviru granica koje su postavljene kao kriterijumi za njihovo diferenciranje kao SMEDDS. Pretpostavljeno je da ovi sistemi verovatno imaju nisku i nedovoljnu hidrofilnost, jer imaju niži sadržaj surfaktanta i ne mogu da obezbede očuvanje integriteta međupovršinskog filma, pa se nakon dispergovanja u vodenim medijumima ne formira termodinamički stabilna nanodisperzija već nastaju privremeno stabilne (metastabilne) ili fizički nestabilne disperzije. Fizička nestabilnost formiranih disperzija verovatno se ogleda u flokulaciji i koalescenciji kapi uljane faze, što povećava njihov polidisperzitet i smanjuje transmitancu. Pored toga, u fizički nestabilnim disperzijama kapacitet za solubilizaciju aktivne supstance može biti ograničen, odnosno, povećava se rizik od njene precipitacije, što je takođe moglo da doprinese smanjenju vrednosti transmitance.

Vrednosti ispitivanih parametara kod disperzija pseudoternernih sistema koji su u svom sastavu imali 30% glicerola pri K_m vrednosti 2,33 bile su u okviru postavljenih granica za SMEDDS (Tabela 12, Slika 16). Rezultati su pokazali da ukoliko se poveća koncentracija korastvarača od 20% do 30%, optimalna hidrofilnost i disperzibilnost sistema su bili postignuti sa nižim udelom surfaktanta, tj. pri nižim K_m vrednostima. Iz tabele 12 može se videti da je vrednost Z -ave u disperzijama koje su dobijene iz sistema pripremljenih sa 30% glicerola u kiselom i alkalnom medijumu pri K_m vrednosti 2,33, bila nešto veća (42,12 nm i 37,46 nm, redom), u poređenju sa disperzijama koje su dobijene iz odgovarajućih sistema pripremljenih sa 20% glicerola pri K_m 9,0. Uočeno povećanje veličine kapi pripisano je razlikama u koncentraciji lekovite supstance, surfaktanta, kosurfaktanta i korastvarača, između sistema, što se moglo odraziti i na geometriju međupovršinskog filma i na hidrodinamički prečnik dispergovane faze. Veća Z -ave vrednost kod sistema sa 30% glicerola bila je povezana sa nižim sadržajem surfaktanta kao glavne komponente međupovršinskog filma.

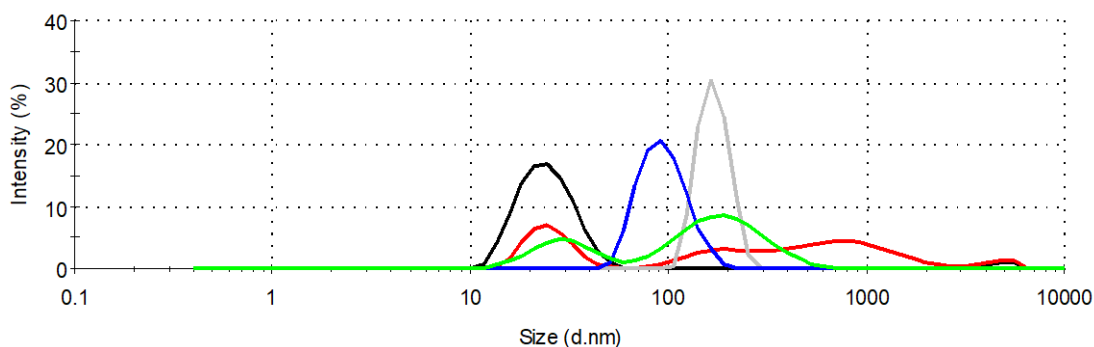
Rezultati određivanja disperzibilnosti pseudoternernih sistema sa različitim vrstama surfaktanata (polisorbat 20, Kolliphor[®] RH40, Labrasol[®]) i glicerolom kao korastvaračem (20%, 30%) pokazali su da su karakteristike SMEDDS imali samo oni koji su izrađeni sa surfaktantom Kolliphor[®] RH 40. Ostali sistemi koji su izrađeni od polisorbata 20 i Labrasola[®] su isključeni iz daljih istraživanja, a u nastavku je ispitana i disperzibilnost pseudoternernih sistema sa Kolliphorom[®] RH40, korišćenjem makrogola 400 kao korastvarača.

Tabela 13. Transmitanca (%T) disperzija pseudoternernih sistema sa aciklovirom i Kolliphor[®] RH40 u kiselom i baznom medijumu (n=3) koji sadrže korastvarač makrogol 400 u koncentraciji 20% i 30%

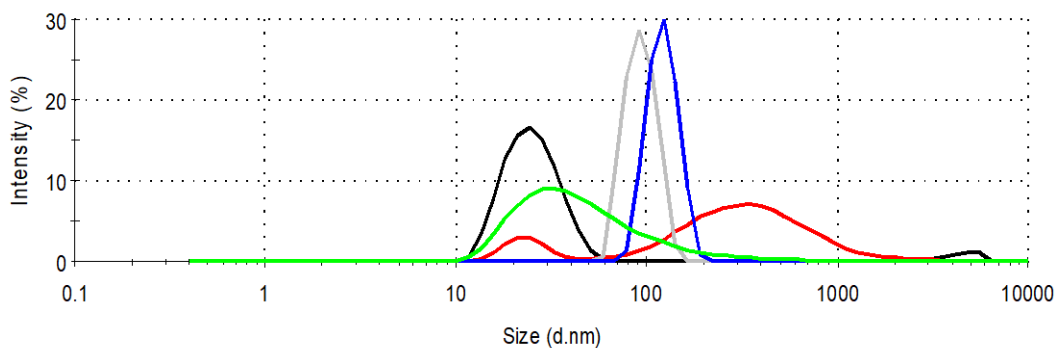
Koncentracija makrogola 400	Km	0,1 M HCl	Fosfatni pufer pH 7,2
		% (T)	% (T)
20%	9,00	95,26 ± 1,16	95,82 ± 1,22
	2,33	38,60 ± 1,56	8,48 ± 2,18
	1,00	0,29 ± 0,01	0,06 ± 0,02
	0,43	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01
	0,11	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,03
30%	9,00	83,96 ± 4,40	86,25 ± 2,12
	2,33	85,08 ± 1,63	63,88 ± 1,85
	1,00	1,90 ± 0,06	0,11 ± 0,03
	0,43	1,96 ± 0,09	0,08 ± 0,02
	0,11	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01

Među ispitivanim formulacijama sa makrogolom 400 kao korastvaračem, najveći procenat transmittance (%T ≥ 95%) izmeren je u disperzijama pseudoternernog sistema koji sadrži 20% makrogola 400, pri maksimalnom ispitivanom udelu surfaktanta u smeši (Km 9,0) (Tabela 13),

dok je procenat transmitance bio manji od 50% za disperzije svih ostalih ispitivanih pseudoternernih sistema, a kod $K_m \leq 1,0$ bio je manji od 1%. Kod pseudoternernih sistema koji sadrže više koncentracije korastvarača (30% makrogola 400), maksimalna vrednost transmitance iznosila je do 86,25% u disperzijama pri K_m 9,0 i 2,33. Procenat transmitance kod ostalih disperzija dobijenih iz drugih pseudoternernih sistema sa 30% makrogola 400, bio je veoma nizak ($\%T < 2\%$) na $K_m \leq 1,0$, u oba medijuma (Tabela 13).

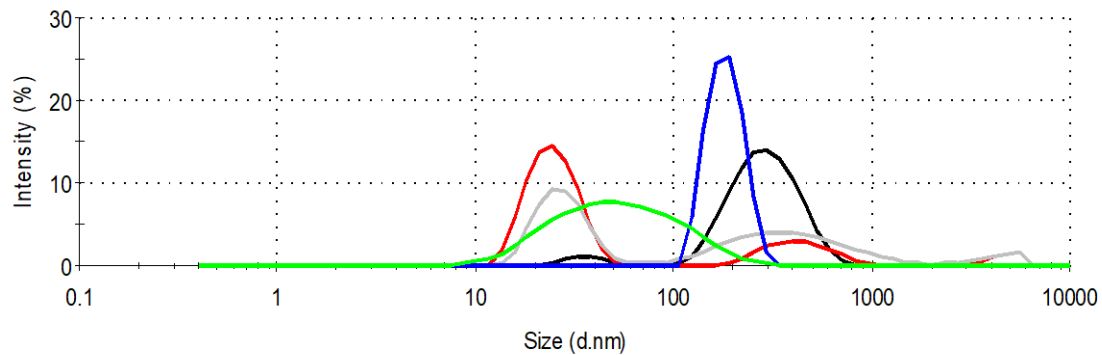


a)

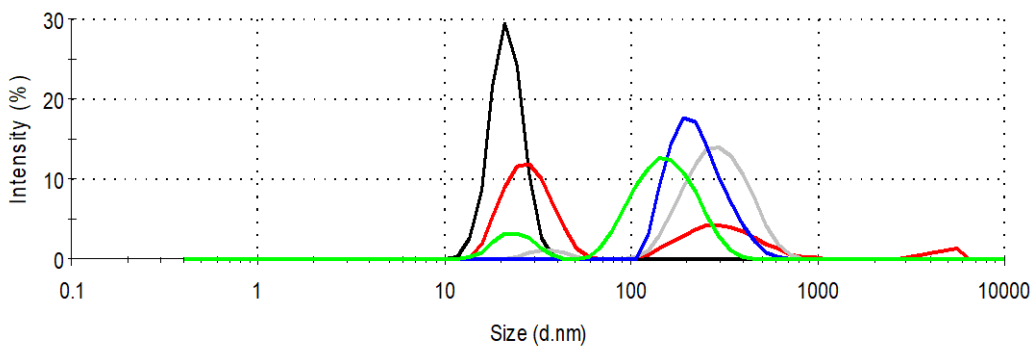


b)

Slika 17. Raspodela veličine kapi prema intenzitetu rasute svetlosti u disperziji pseudoternernih sistema sa acikloviromu 0,1 M HCl (a) i fosfatnom puferu pH 7,2 (b). Pseudoternerni sistemi su pripremljeni sa Kolliphor®-om RH40 kao surfaktantom i 20% makrogola 400, a K_m vrednost je iznosila: 9,0 (—), 2,33 (—), 1,0 (—), 0,43 (—) i 0,11 (—)



a)



b)

Slika 18. Raspodela veličine kapi prema intenzitetu rasute svetlosti u disperziji pseudoternernih sistema sa acikloviromu 0,1 M HCl (a) i fosfatnom puferu pH 7,2 (b). Pseudoternerni sistemi su pripremljeni sa Kolliphor[®]-om RH40 kao surfaktantom i 30% makrogola 400, a K_m vrednost je iznosila: 9,0 (—), 2,33 (—), 1,0 (—), 0,43 (—) i 0,11 (—)

Tabela 14. Prosečna veličina kapi (Z-ave) i polidisperzni indeks (PdI) ispitivanih pseudoternernih sistema sa aciklovirom koji sadrže Kolliphor® RH 40 kao surfaktant i makrogol 400 kao korastvarač u koncentraciji 20% i 30% nakon dispergovanja u vodenim medijumima (0,1 M HCl i fosfatni pufer pH 7,2) (srednja vrednost ± S.D., n=3)

Koncentracija makrogola 400	Km	0,1 M HCl		Fosfatni pufer pH 7,2	
		Z-ave	PdI	Z-ave	PdI
20%	9,00ⁱⁱ	23,86 ± 1,43	0,203 ± 0,003	24,77 ± 1,55	0,202 ± 0,010
	2,33	82,97 ± 14,03	0,928 ± 0,125	153 ± 14,3	0,673 ± 0,023
	1	187,1 ± 16,5	0,248 ± 0,152	99,52 ± 4,29	0,534 ± 0,082
	0,43	91,22 ± 4,37	0,074 ± 0,089	143 ± 6	0,987 ± 0,023
	0,11	74,43 ± 2,53	0,57 ± 0,033	36,14 ± 1,69	0,253 ± 0,018
30%	9,00	244 ± 3	0,535 ± 0,058	32,03 ± 1,58	0,438 ± 0,006
	2,33	43,37 ± 1,48	0,506 ± 0,048	54,61 ± 3,06	0,752 ± 0,022
	1	222,3 ± 21,5	0,264 ± 0,047	104,3 ± 3,1	0,629 ± 0,157
	0,43	204,2 ± 25,2	0,134 ± 0,055	189,4 ± 5,2	0,340 ± 0,160
	0,11	93,01 ± 5,17	0,425 ± 0,114	41,77 ± 3,05	0,299 ± 0,055

ⁱⁱ SMEDDS2

U tabeli 14 i na slikama 17 i 18 je prikazan uticaj Km vrednosti i udela korastvarača (makrogola 400) na Z-ave i indeks polidisperziteta (PdI) u ispitivanim disperzijama. Kao i kod formulacija sa glicerolom, rezultati karakterizacije veličine kapi bili su u skladu sa rezultatima merenja transmitance za disperzije koje su pripremljene iz pseudoternernih sistema sa makrogolom 400 koji su klasifikovani kao SMEDDS, a imali su u svom sastavu 20% makrogola 400 pri Km 9,0. Z-ave vrednost u ovom sistemu je iznosila 23,86 nm (u kiselom medijumu) i 24,77 nm (u alkalnom medijumu) (Tabela 14), dok su raspodele veličine kapi bile monomodalne u relativno uskom opsegu veličina (PdI <0,250) (Slika 17). Takođe, ostali pseudoternerni sistemi koji su u svom sastavu imali 20% makrogola 400 nisu imali disperzibilnost i transmitancu u okviru granica koje su postavljene kao kriterijumi za njihovo diferenciranje kao SMEDDS.

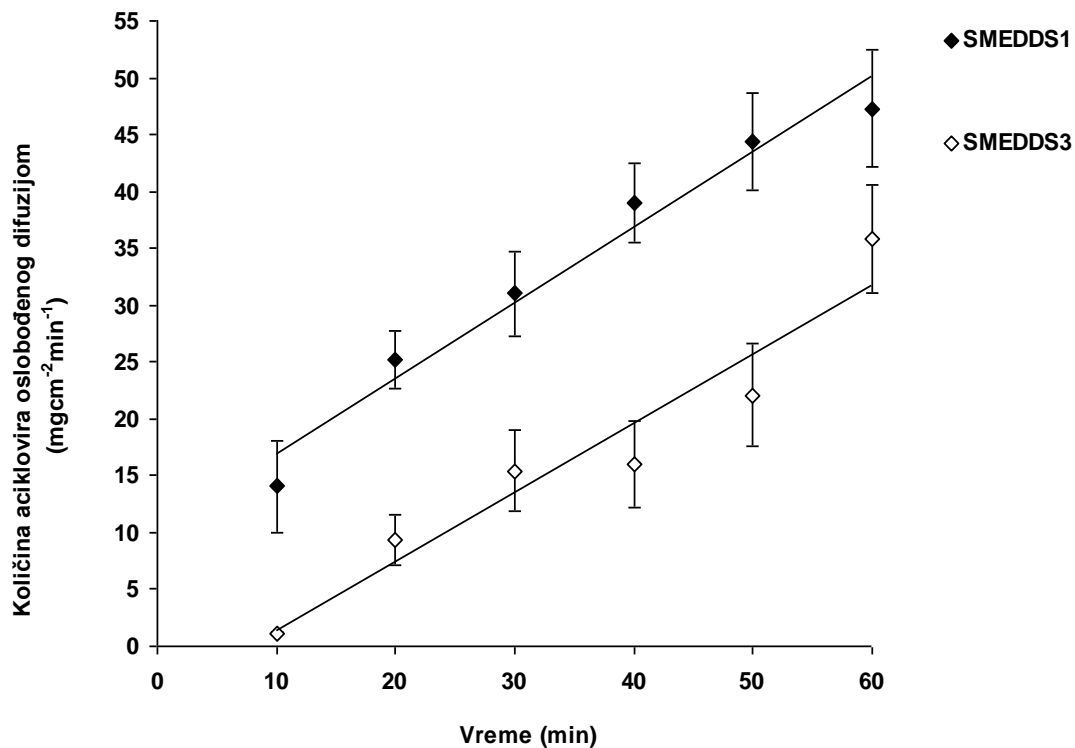
U pseudoternernim sistemima koji sadrže 30% makrogola 400, nisu bili ispunjeni kriterijumi postavljeni za Z-ave za SMEDDS (Tabela 14). Veći sadržaj i hidrofilnost makrogola 400 ($\log P = -4,8$) (Ma i sar., 1990) čine ove sisteme znatno hidrofilnijim u odnosu na odgovarajuće sisteme pripremljene sa glicerolom ($\log P = -1,76$) (Hansch i sar., 1995). Pretpostavljeno je da je u uzorcima sa 30% makrogola 400, tokom dispergovanja u vodenim medijumima, došlo do desorpcije molekula surfaktanata i korastvarača sa međupovršinskog filma, ali ne i do formiranja kapi sa Z-ave ≤ 100 nm. U ovom slučaju je verovatno bila nedovoljna koncentracija surfaktanata i korastvarača na međupovršini, koji po pretpostavci značajno utiču na proces mikroemulgovanja i solubilizaciju aciklovira.

Dobijeni rezultati ukazivali su na to da se odgovarajuće karakteristike pseudoternernog sistema koji ima svojstva SMEDDS mogu postići kombinovanjem surfaktanata visokih i niskih HLB vrednosti u odgovarajućem masenom odnosu sa optimalnom koncentracijom odgovarajućeg korastvarača, kako bi se optimizovala hidrofilnost sam-odispergujuće (samo-mikroemulgujuće) formulacije. Rezultati određivanja disperzibilnosti pseudoternernih sistema pokazali su da su karakteristike SMEDDS imali oni koji su izrađeni sa 20% glicerola pri Km 9,0 (SMEDDS1), 20% makrogola 400 pri Km 9,0 (SMEDDS2) i 30% glicerola pri Km 2,33 (SMEDDS3) (kao što je navedeno u tabelama 12 i 14). Ostali sistemi koji su izrađeni od 20% glicerola ili 20% makrogola 400 pri Km 2,33; 1,00; 0,43; 0,11, 30% glicerola pri Km 9,00; 1,00; 0,43; 0,11 i 30% makrogola pri Km 9,00; 2,33; 1,00; 0,43; 0,11 nisu ispunili postavljene kriterijume u pogledu

disperzibilnosti i optičkih karakteristika i isključeni su iz daljih istraživanja. Kapacitet inkorporiranja aktivne supstance u SMEDDS razmatran je kao dodatni kriterijum za odabir sistema za dalju evaluaciju. Kapacitet inkorporiranja aciklovira iznosio je 24,06 mg/ml (SMEDDS1), 9,04 mg/ml (SMEDDS2) i 21,12 mg/ml (SMEDDS3). Poznato je da je najčešće korišćena terapijska doza aciklovira 200 mg, a kada se primenjuje oralno u ovoj količini ima profil lekovitih supstanci iz grupe 3 BSK (visoka rastvorljivost i niska permeabilnost) (Arnal i sar., 2008). Za svaki odabrani sistem, u skladu sa eksperimentalno određenim kapacitetom za inkorporiranje aktivne supstance, zapremine koje su sadržale aciklovir u dozi od 200 mg bile su 8,31 ml (SMEDDS1), 22,12 ml (SMEDDS2) i 9,47 ml (SMEDDS3). Iako su zapremine SMEDDS bile u rangu uobičajeno primenljivih zapremina oralnih rastvora (Lein i Ng, 2015), sa stanovišta adherence, prednost se daje manjim količinama farmaceutskog preparata. Prema tome, za dalju procenu *in vitro* kinetike oslobađanja i permeabilnosti aciklovira su izabrani SMEDDS1 i SMEDDS3. Takođe, SMEDDS1 i SMEDDS3 su imali sličan sadržaj aciklovira, dok su se razlikovali u pogledu koncentracije upotrebljenog glicerola kao korastvarača (20% i 30%, redom) i Km vrednosti (9,0 i 2,33, redom), i bili su pogodni za dodatno razmatranje ovih formulacionih parametara.

4.1.4. *In vitro* kinetika difuzije aciklovira iz tečnih samo-mikroemulgujućih sistema

U nastavku istraživanja razmatrana je brzina difuzije aciklovira iz sistema SMEDDS1 i SMEDDS3. Budući da je aktivna supstanca bila rastvorena u sličnoj koncentraciji u oba uzorka, ovo ispitivanje je sprovedeno sa ciljem da se utvrdi potencijalni uticaj izbora sastojaka SMEDDS na brzinu oslobađanja rastvorene aktivne supstance difuzijom. Dobijeni profili difuzije aciklovira iz uzoraka SMEDDS1 i SMEDDS3 su prikazani na slici 19. Odnos koncentracije oslobođenog aciklovira i vremena bio je linearan, pa su konstante brzine oslobađanja određene kao nagibi dobijenih krivih i navedene su u tabeli zajedno sa ukupnom količinom oslobođenog aciklovira na kraju eksperimenta, u poslednjoj merenoj vremenskoj tački.



Slika 19. Profili in vitro difuzije aciklovira iz SMEDDS1 i SMEDDS3

Uočena linearnost pokazala je da je brzina oslobađanja lekovite supstance bila konstantna i nezavisna od koncentracije lekovite supstance u nosaču. S druge strane, ovakav rezultat je prvenstveno bio povezan sa uticajem membrane od regenerisane celuloze koja se koristila u modelu difuzione ćelije i koja je mogla imati ulogu membrane koja kontroliše brzinu oslobađanja aktivne supstance difuzijom iz uzorka koji se nalazio u inhenser ćeliji. Analiza dobijenih profila oslobađanja aciklovira uključivala je izračunavanje faktora sličnosti (f_1) 47,16 i faktora razlike (f_2) 53,21 čime je pokazano da oni nisu slični. Količina oslobođene lekovite supstance iz ispitivanih SMEDDS na kraju eksperimenta (posle 60 minuta) iznosila je $47,30 \pm 2,64\%$ (SMEDDS1) i $35,79 \pm 2,46\%$ (SMEDDS3) (Tabela 15), što znači da je iz SMEDDS1 oslobođena značajno veća količina aciklovira nakon 60 min, iako su početne koncentracije lekovite supstance u ova dva sistema bile veoma slične.

Tabela 15. Parametri difuzije aciklovira iz ispitivanih formulacija SMEDDS1 i SMEDDS3: brzina difuzije (k_0), koeficijent korelacije (R^2), količina oslobođene supstance nakon 60 minuta (Q_{60})

Formulacija	k_0 (mgcm⁻²min⁻¹)	R^2	Q_{60} (%)
SMEDDS1	0,325	0,9734	47,30 ± 2,64
SMEDDS3	0,323	0,9832	35,79 ± 2,46

S obzirom na rezultate prethodno izvršene karakterizacije, uočene razlike u pogledu obima i brzine difuzije aciklovira iz ispitivanih sistema su pripisane mogućem formiranju koloidnog nosača (ulje – u – vodi mikroemulzije) iz ispitivanog SMEDDS u difuzionom sloju formulacije neposredno ispod semipermeabilne membrane. Opisane promene i formiranje koloidnog sistema su pretpostavljene na osnovu činjenice da je bila moguća difuzija molekula vode iz akceptorskog medijuma, kroz membranu, u inhenser ćeliju i mešanje sa ispitivanim uzorkom. Ukoliko je došlo do formiranja mikroemulzionog nosača, on je mogao da obezbedi relativno veliku ulje/voda međupovršinu, preko koje se oslobađa aciklovir, koji je u takvom nosaču najverovatnije solubilizovan u međupovršinskom filmu, i difunduje u akceptorski medijum. Polazeći od navedene pretpostavke za tumačenje dobijenih rezultata, uzeti su u obzir sledeći parametri: prosečna veličina kapi, koncentracija korastvarača i K_m vrednost za svaku formulaciju. Prosečna veličina kapi disperzije koja je nastala od SMEDDS1 bila je nešto niža nego kod SMEDDS3, sadržaj korastvarača je bio niži, a sadržaj hidrofilnog surfaktanta značajno veći. Zbog toga je bilo očekivano da je, međupovršinski film dostupan za oslobađanje lekovite supstance, bio veći kod SMEDDS1. Sa druge strane, prethodna karakterizacija je pokazala da postoji rizik od desorpcije hidrofilnih molekula surfaktanata i korastvarača sa međupovršine između uljane i vodene faze ako im se koncentracije povećaju. Ovo je moglo da ima za posledicu smanjenje hidrofobnih interakcija, kao i kapacitet nosača za solubilizaciju aciklovira, a time i da poveća njegovo oslobađanje iz nosača. Uzimajući u obzir kvalitativni i kvantitativni sastav, a naročito K_m vrednost, kod SMEDDS1 su se verovatno mogle očekivati opisane promene u većoj meri, u poređenju sa SMEDDS3 koji sadrži manji procenat hidrofilnih komponenata, i u skladu sa tim veći obim oslobađanja aciklovira difuzijom kroz membranu u akceptorski medijum.

4.1.5. *In vitro* permeabilnost aciklovira iz tečnih samo-mikroemulgujućih sistema

Permeabilnost aciklovira iz ispitivanih SMEDDS ispitana je korišćenjem PAMPA testa i upoređena je sa permeabilnošću čiste lekovite supstance. S obzirom da aciklovir predstavlja supstancu koja permeira kroz biološke membrane mehanizmom pasivne difuzije (Zhu i sar., 2002), PAMPA test je korišćen kao prikladan za procenu njegove permeabilnosti. Rezultati PAMPA testa prikazani su u tabeli 16.

Tabela 16. Koeficijent permeabilnosti (P_{app}) aciklovira (čiste supstance) i aciklovira inkorporiranog u SMEDDS1 i SMEDDS3

Uzorak	P_{app} (cm s^{-1} , $\times 10^{-7}$)
Aciklovir	0,84
SMEDDS1	1,35
SMEDDS3	2,04

Permeabilnost čistog aciklovira je bila slična već objavljenim rezultatima iz studije Zhu i saradnici (2002). Dva ispitivana SMEDDS su pokazala značajno veću permeabilnost u poređenju sa čistim aciklovirom ($p < 0,05$), što je potvrdilo da formulisani SMEDDS omogućavaju povećanje permeabilnosti ove aktivne supstance u baznom medijumu *in vitro*. Količine aciklovira u uzorcima SMEDDS1 i SMEDDS3 koje su korišćene u PAMPA testu su bile približno iste (7,21 mg i 6,34 mg, redom) i nije dobijena statistički značajna razlika među formulacijama SMEDDS1 i SMEDDS3 (SMEDDS1 vs. SMEDDS3 $p = 0,07$). Dobijeni rezultati idu u prilog stavu da PAMPA test ima potencijal da se koristi kao opšti model koji simulira različite apsorpcione barijere, a dobijeni rezultati pokazali su da su oba ispitivana SMEDDS imala sličan uticaj na permeabilnost aciklovira *in vitro*. Kako su rezultati *in vitro* ispitivanja difuzije aciklovira pokazali da je kumulativna količina oslobođene aktivne supstance bila značajno veća iz SMEDDS1, ovaj sistem je razmatran u daljim fazama istraživanja.

4.2. Rezultati i diskusija II faze istraživanja

Formulacija polučvrstih SMEDDS iz tečnih SMEDDS, optimizovanih u prethodnoj fazi istraživanja, izvršena je dodavanjem makrogola 8000 u koncentraciji od 5-10%. Uzorci polučvrstih SMEDDS su pripremljeni mešanjem precizno odmerenih količina sastojaka (ulja, surfaktanta, kosurfaktanta, hidrofilnog korastvarača i makrogola 8000) uz zagrevanje na temperaturi od 60 °C. Aciklovir je dodat uz mešanje laboratorijskom mešalicom sa propelerskim mešačem, u koncentraciji koja je ekvivalentna kapacitetu za inkapsulaciju (koji je određen u prethodnoj fazi istraživanja), kao i u koncentraciji pri kojoj se terapijska doza od 200 mg primenjuje u punjenju kapsule veličine 0. Uzorci polučvrstih SMEDDS su dalje čuvani na sobnoj temperaturi, a njihova ispitivanja su sprovedena posle 48 h čuvanja pod ambijentalnim uslovima. Polučvrsti SMEDDS SD1-SD6 bili su pregledani vizualno u smislu boje, homogenosti i konzistencije. Tokom postupka pripreme primećeno je da dodavanje makrogola 8000 homogenim i prozirnim mešavinama lipida, sufraktanata i glicerola utiče na njihov makroskopski izgled i konzistenciju. Na sobnoj temperaturi, među samo-dispergujućim formulacijama sa aciklovirom koje sadrže 20% glicerola, ona koja je sadržala 5% makrogola 8000 bila je viskozna tečnost, dok su uzorci sa 7,5% i 10% polimera bili homogeni, neprozirni i polučvrsti. Sve samo-dispergujuće formulacije sa 30% glicerola bile su tečne ugušćene konzistencije.

Drugom fazom istraživanja su pored formulacije polučvrstih SMEDDS iz tečnih uzoraka dodatkom makrogola 8000, bila obuhvaćena i fizičko-hemijska, farmaceutsko-tehnološka i biofarmaceutska karakterizacija polučvrstih SMEDDS za peroralnu primenu aciklovira u obliku HPMC kapsula, u cilju identifikacije optimalnog polučvrstog SMEDDS za dalja *in vivo* ispitivanja.

4.2.1. Fizičko-hemijske karakteristike polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom

Fizičko-hemijska karakterizacija pripremljenih uzoraka je obuhvatila ispitivanja reološkog ponašanja na osnovu čega je identifikovan najpogodniji polučvrst SMEDDS za punjenje u tvrde kapsule. Takođe, za optimizovanu formulaciju ispitana je disperzibilnosti u vodenim medijumima, a primenom optičke mikroskopije i DSC analize je procenjena morfologija ispitivanih sistema i potencijalne interakcije aktivne supstance i sastojaka formulacije.

4.2.1.1. Reološko ponašanje polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom

Ispitivanje reološkog ponašanja formulisanih polučvrstih SMEDDS pokazalo je da su imali pseudoplastično proticanje i njihov prividni viskozitet se smanjivao sa povećanjem brzine smicanja. Vrednosti maksimalnog i minimalnog prividnog viskoziteta i histerezne površine uzoraka prikazani su u tabeli 17.

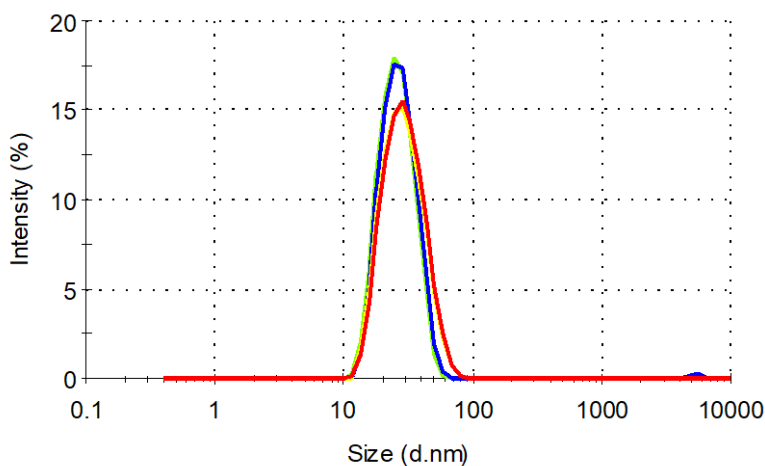
Tabela 17. Vrednosti maksimalnog prividnog viskoziteta (η_{max}) (određenog na $22,2 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$), minimalnog prividnog viskoziteta (η_{min}) (određenog na $200 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$), i histerezne površine (A) polučvrstih SMEDDS SD1 - SD6

Uzorak	η_{max} (Pas)	η_{min} (Pas)	A (Pas ⁻¹)
SD1	18,65 ± 0,07	4,15 ± 0,06	35328,02
SD2	20,75 ± 1,34	5,99 ± 0,05	52559,18
SD3	43,20 ± 3,25	6,42 ± 0,35	84456,42
SD4	14,58 ± 0,17	4,34 ± 0,15	23913,70
SD5	16,80 ± 0,28	3,52 ± 0,04	26903,47
SD6	19,80 ± 0,71	4,28 ± 0,22	38222,61

Preliminarna reološka karakterizacija dva tečna samo-dispergujuća sistema koja su izrađena sa 20% glicerola pri Km 9,0 (SMEDDS1) i 30% glicerola pri Km 2,33 (SMEDDS3), i koja nisu sadržala polimer, je pokazala da su to Njutnovske tečnosti niskog viskoziteta čije su vrednosti iznosile $1,01 \pm 0,01$ Pas (SMEDDS1) i $0,81 \pm 0,02$ Pas (SMEDDS3). Stoga je promena u reološkom ponašanju, odnosno, pseudoplastično reološko ponašanje ispitanih polučvrstih SMEDDS bila direktno povezana sa uticajem polimera. U studiji koju su objavili Noda i saradnici (2011) navedeno je da makrogol 4000, kada se doda u odgovarajuću ulje – u – vodi emulziju (tečni parafin, cetanol, polietilenglikol monostearat, izopropil miristat, glicerol, d-sorbitol), formira trodimenzionalnu matriksnu strukturu sa lipidnim sastojcima. Pretpostavljeno je da kod ispitivanih uzoraka SD1-SD6 makrogol 8000 takođe formira polimerni matriks sa smešom ulja, sufraktanata i korastvarača koji su upotrebljeni kao sastojci ispitivanih tečnih i polučvrstih SMEDDS. Pored toga, primećeno je da su vrednosti prividnog viskoziteta bile značajno različite između polučvrstih SMEDDS koji sadrže različite koncentracije glicerola (uzorci SD1-SD3 sa 20% glicerola u odnosu na uzorke SD4-SD6 sa 30% glicerola). Vrednosti minimalnog i maksimalnog prividnog viskoziteta polučvrstih SMEDDS sa 20% glicerola bile su u rasponu od 18,65 Pas do 43,20 Pas i od 4,15 Pas do 6,42 Pas. U uzorcima sa 30% glicerola, vrednosti minimalnih i maksimalnih prividnih viskoziteta su uopšteno bile niže i kretale su se u rasponu od 14,58 Pas do 19,80 Pas i od 3,52 Pas do 4,34 Pas (Tabela 17). Polimerni matriks nastaje usled preplitanja polimernih lanaca makrogola 8000. Viši sadržaj glicerola verovatno je uticao na smanjenje prividnog viskoziteta polimernog matriksa, zbog težnje da razblaži koncentrovani region umreženih polimernih lanaca, čak i kada je koncentracija makrogola 8000 bila 10%. Za obe koncentracije glicerola, kada je sadržaj polimera bio 5%, tiksotropija SMEDDS bila je niska (Tabela 17). Tiksotropne polučvrste formulacije su pogodne za sprečavanje curenja iz kapsule i smanjenje sedimentacije suspendovanih čestica lekovite supstance (Cole i sar., 2008). Polučvrsta konzistencija i odgovarajuća tiksotropija postignute su u uzorku SD2 koji sadrži nižu ispitivanu koncentraciju glicerola (20%) i polimer u koncentraciji od 7,5%. Celokupan sastav ovog nosača bio je trigliceridi srednje dužine lanaca (10%), makrogol glicerol hidrosistearat (56,25%), poligliceril-3-dioleat (6,25%), glicerol (20%) i makrogol 8000 (7,5%). Sistem SD2 je korišćen za dalje ispitivanje.

4.2.1.2. Disperzibilnost polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom u vodenim medijumima

Disperzije SD2 u 0,1 M HCl (pH 1,2) i fosfatnom puferu (pH 7,2) formirale su se relativno brzo (tokom 1 min) i bile su transparentne sa transmitancijom (%T) 98,31% i 98,41%. Kako bi se ispitalo da li su dobijene disperzije termodinamički stabilne, odnosno, u cilju eliminisanja metastabilnih (privremeno stabilnih) sistema, izvršen je test centrifugiranja. Nije primećeno da je došlo do pojave zamućenja ili formiranja taloga (zbog precipitacije aktivne supstance) ili raslojavanja ili separacije uljane i vodene faze. Raspodela veličine kapi po intenzitetu rasute svetlosti bila je unimodalna (Slika 20) i u uskom rasponu veličina kojima je odgovarao indeks polidisperziteteta (PDI) od $0,158 \pm 0,030$ i $0,150 \pm 0,026$, i prosečnom veličinom kapi (Z -ave) od $26,04 \pm 1,73$ nm i $25,10 \pm 0,99$ nm. Dobijeni rezultati su jasno potvrdili da su ispitivane disperzije bile termodinamički stabilni sistemi organizovani na nanoskali što su ključna svojstva sistema tipa mikroemulzija. Sistem SD2 imao je karakteristike SMEDDS na čiju *in vitro* disperzibilnost u vodenim medijumima i prosečnu veličinu kapi nije značajno uticala pH vrednost medijuma.



Slika 20. Raspodela veličine kapi prema intenzitetu rasute svetlosti u disperzijama ispitivanih polučvrstih SMEDDS. Legenda: disperzija SD2 u 0,1 M HCl (—) i fosfatnom puferu pH 7,2(—); S-SD2 disperzije u kiselom medijumu (—) i alkalnom medijumu (—)

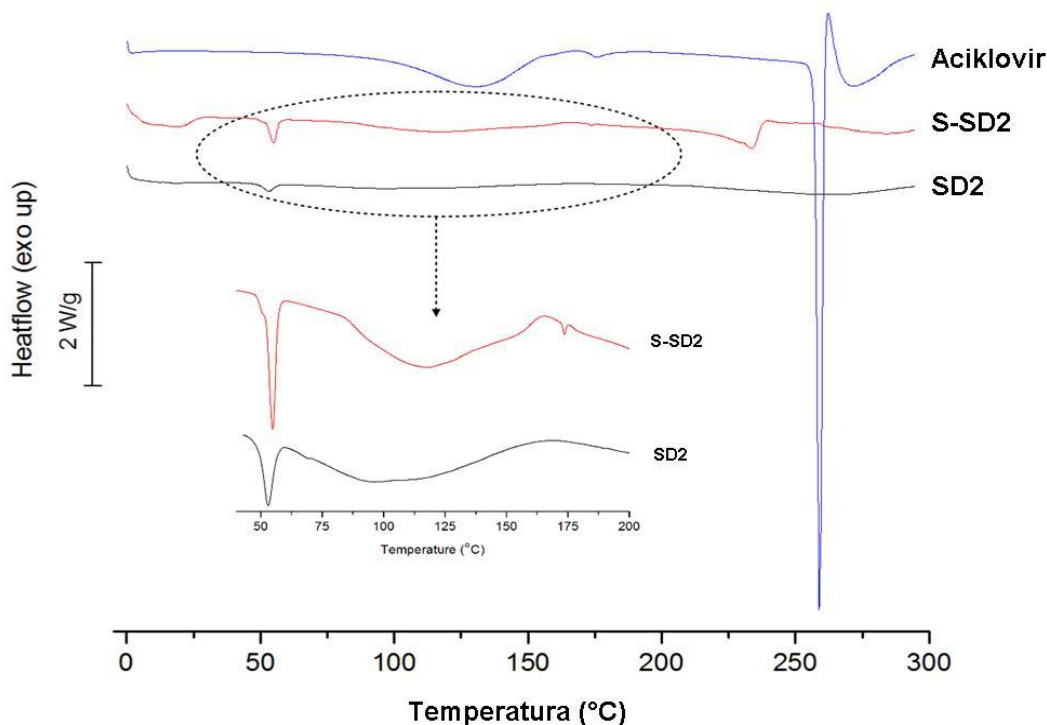
Poređenja radi, takođe je ispitana disperzibilnost u vodenim medijumima za polučvrsti SMEDDS (SD5) koji sadrži 30% glicerola i istu količinu makrogola 8000 kao i SD2 (7,5%). Nasuprot SD2, disperzije uzorka SD5 su bile opalescentne u oba vodena medijuma, sa odgovarajućim vrednostima transmitance (%T) koje su bile manje od 95%. Takođe, raspodela veličina kapi u ovim disperzijama, po svojim karakteristikama nije bila tipična za sisteme tipa SMEDDS. Razlike u disperzibilnosti uzoraka SD2 i SD5 objašnjene su njihovom različitom ukupnom hidrofilnošću. Moglo se smatrati da je sistem SD2 bio hidrofilniji zbog višeg relativnog sadržaja surfaktanta u odnosu na kosurfaktant, u poređenju sa sistemom SD5. Iz analize raspodela veličine kapi zaključeno je da se sa povećanjem relativne količine surfaktanta, verovatno povećavala i adsorpcija molekula surfaktanta i kosurfaktanta na međupovršini ulje/voda, što je dovelo do smanjenja međupovršinskog napona koje je neophodno za formiranje homogenih disperzija uljanih nanokapi u kontinuiranoj vodenoj fazi. Ukupna hidrofilnost sistema SD5 bila je niža i nije bila optimalna za proces samo-mikroemulgovanja u ispitivanim vodenim medijumima. Hassan i saradnici (2014) su za samo-nanoemulgujuće sisteme uočili da se pri većem udelu lipofilnih ekscipijenasa povećava hidrodinamički prečnik kapi i polidisperzitet disperzije u puferskom medijumu. Nepravilna distribucija veličine kapi pri nižem sadržaju surfaktanta u odnosu na kosurfaktant kod SD5 potvrđena je i razdvajanjem faza nakon testa centrifugiranja. Na osnovu dobijenih rezultata, rezimirano je da je na disperzibilnost uzoraka SD2 i SD5 uticao maseni odnos surfaktanta i kosurfaktanta i koncentracija hidrofilnog korastvarača. Polučvrsti SMEDDS SD2 izabran je za dalju karakterizaciju.

Pored uzorka SD2 koji je sadržao 2% aciklovira, u pogledu disperzibilnosti u vodenom medijumu je ispitan i uzorak tipa suspenzije, sa oznakom S-SD2, koji je imao veći sadržaj aciklovira (33,33%), trigliceride srednje dužine lanaca (10%), glicerol (20%), makrogol 8000 (7,5%) i Km 9,0. Proces dispergovanja uzorka S-SD2 u ispitivanim vodenim medijumima je takođe bio brz. Formirane disperzije bile su prozirne (%T > 95%), a raspodela veličina kapi bila je uskom rasponu veličina (Slika 20) i vrednošću Z-ave od $26,84 \pm 1,24$ nm (PdI $0,130 \pm 0,004$) u kiselom medijumu (0,1 M HCl (pH 1,2)) i $27,35 \pm 1,07$ nm (PdI $0,129 \pm 0,010$) u alkalnom medijumu (fosfatni pufer (pH 7,2)). Veličina kapi u disperzijama S-SD2 bila je slična sa veličinom kapi disperzija SD2, iako je sadržaj inkorporirane lekovite supstance bio značajno veći, verovatno zbog nekoliko pretpostavljenih mehanizama: progresivne difuzije vode u

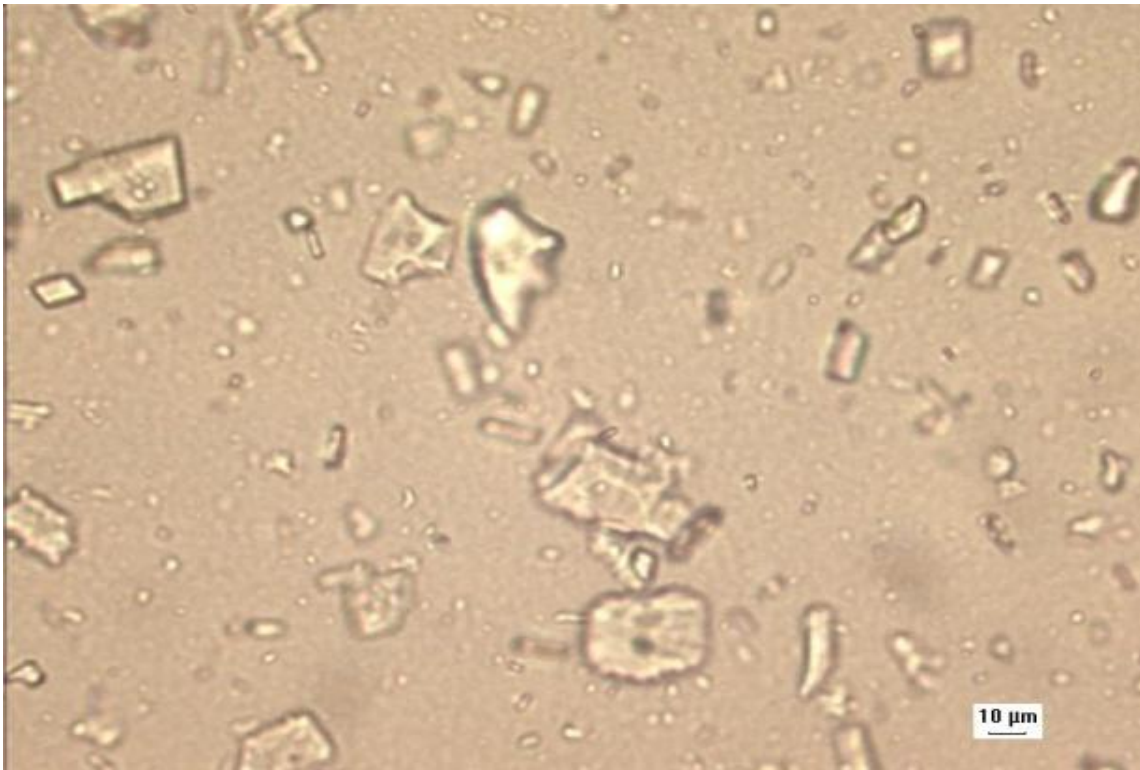
polučvrsti matriks; inhibicije precipitacije čestica lekovite supstance usled hidrofobnih interakcija ili vodoničnih veza između leka i hidrofilnog polimera (Overhoff i sar., 2008); brzog formiranja mikroemulzionog nanonosača sa dovoljno visokim kapacitetom za rastvaranje lekovite supstance.

4.2.1.3. Uticaj sadržaja aciklovira na optičke i termalne karakteristike polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema

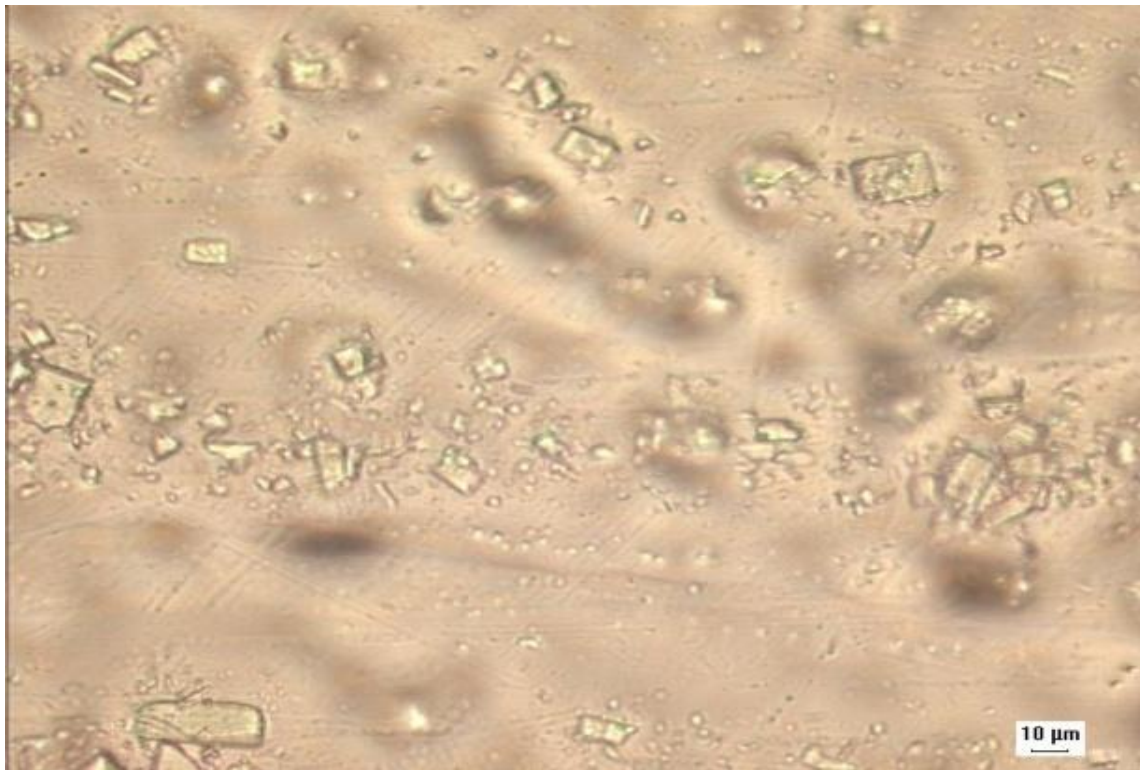
Dalje ispitivanje uključivalo je dva polučvrsta SMEDDS koji su sadržali aciklovir u koncentracijama od 2% (SD2) i 33,33% (S-SD2). Oba sistema su bila bele boje, homogena i polučvrsta na sobnoj temperaturi. Fizički status inkorporiranog aciklovira ispitan je primenom optičke mikroskopije i DSC analizom i dobijeni rezultati prikazani su na slikama 21 i 22.



Slika 21. DSC termogramski uzorci SD2, S-SD2 i aciklovira



(a)



(b)

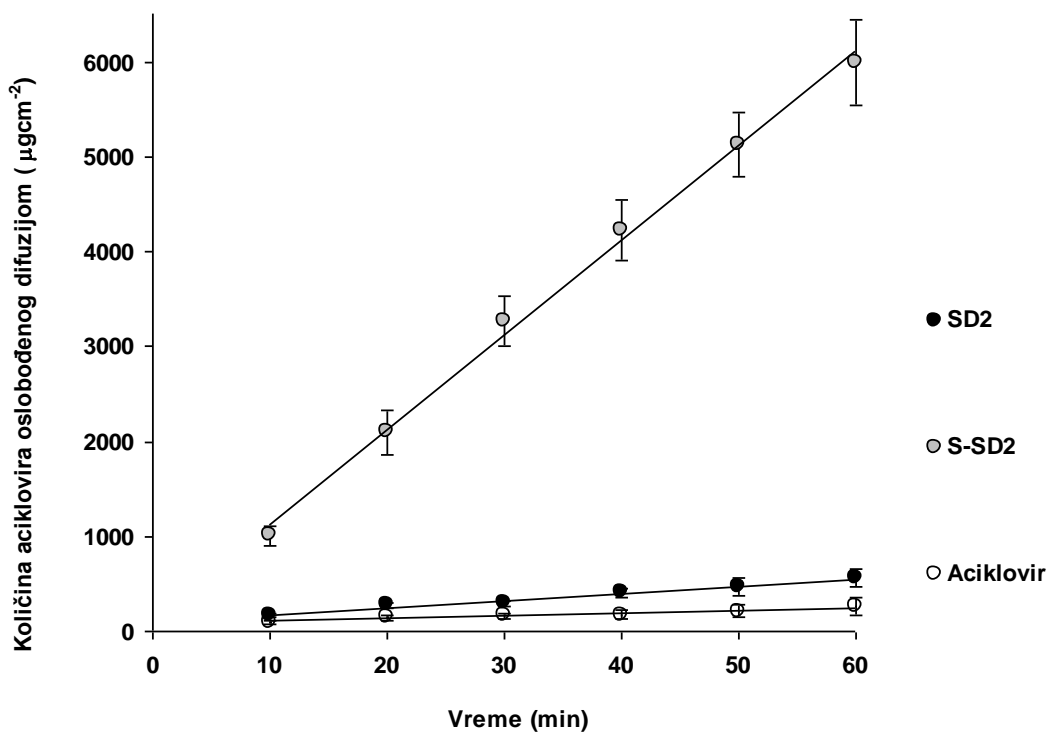
Slika 22. Fotomikrografije polučvrstih SMEDDS sa inkorporiranim aciklovirom u koncentraciji od: 2% (SD2) (a) i (33,33%) (S-SD2) (b) (uvećanje 400 x)

Na mikrografijama oba sistema uočeno je prisustvo kristala aciklovira koji je bio suspendovan u homogenom polučvrstom vehukulumu (Slika 22). Aciklovir kao sintetski purinski nukleozidni analog sa inhibitornom aktivnošću protiv *Herpes simplex* virusa, ima nekoliko vrsta polimorfnih oblika i hidrata. Birnbaum i saradnici (1984) su istraživali kristalnu strukturu komercijalno dostupnog aciklovira (hidrat aciklovir/voda 3:2) i razmatrali njegove konformacijske osobine. Lutker i saradnici (2011) su proučavali kristalnu strukturu anhidrida i novog hidrata aciklovir/voda 1:2, koristeći ne samo tehniku difrakcije X-zraka, već i različite spektroskopske tehnike, kao što su Ramanska, IR i NMR spektroskopija. Oni su pokazali da aciklovir može da ima najmanje dva bezvodna oblika koja su stabilna pri ambijentalnim uslovima, dva oblika koja se ne stvaraju pri ambijentalnim uslovima, i dva hidrata. Međutim, precizan mehanizam fazne transformacije koji se odnosi na proces dehidratacije još nije razjašnjen. Značajne razlike u međumolekulskim vodoničnim vezama uočene su među različitim oblicima aciklovira i konzistentne su sa rezultatima analize NMR-om i vibracionom spektroskopijom koje pokazuju različita hemijska pomeranja i frekvencije vibracija. Yonemochi i saradnici (2013) su ispitivali mehanizam fazne transformacije za svaki oblik aciklovira (dva oblika anhidrata, 2/3 hidrat i dihidrat) razmatrajući njihovu kristalnu strukturu i ponašanje pri promeni temperature i vlažnosti. Novije studije su ukazale na amorfizaciju aciklovira nakon inkapsulacije u polimerne nanočestice (Gandhi i sar., 2014) i tiol-ksiloglukan polisaharidne nanočestice (Madgulkar i sar., 2016), čime je omogućeno homogeno dispergovanje u polimernom matriksu. Kako bi se objasnilo fizičko stanje i termalne karakteristike aciklovira u ispitivanim uzorcima SD2 i S-SD2, izvršena je i DSC analiza i dobijeni termogrami su upoređeni sa termogramom čiste supstance (Slika 21). U dobijenim termogramima prvi pik je uočen na 53 °C (SD2), odnosno, 54,8 °C (S-SD2), nakon čega je usledio endotermni proces u širem rasponu temperatura između približno 70 °C i 160 °C. Uočeni endotermni profili povezani su sa topljenjem polučvrstog vehikuluma za koji je prethodno pretpostavljeno da sadrži matriks polimera makrogola 8000 (tačka topljenja čistog polimera je 55 – 62 °C (Ph. Eur. 9.0)), kao i sa termičkim razlaganjem triglicerida srednje dužine lanca koje se odigrava u blizini temperature od 160 °C. Ovo zapažanje podržavalo je prethodnu pretpostavku da je formiranje polučvrstog sistema bilo zasnovano na stvaranju svojevrsnog polimernog matriksa u tečnom SMEDDS. Relativno visoka tačka topljenja uzoraka SD2 i S-SD2 ukazala je da njihova polučvrsta konzistencija može ostati nepromenjena na temperaturama do 50 °C, te stoga curenje iz tvrdih kapsula nije očekivano na temperaturama

koje su uobičajene za skladištenje i upotrebu farmaceutskih preparata. Na termogramu čiste supstance (Slika 21), oštar i jasan endotermni pik topljenja aciklovira je jasno detektovan na 259 °C, međutim, u termogramima uzoraka SD2 i S-SD2 nije uočen identičan pik. Uočeno odstupanje od tipičnog pika topljenja za lekovitu supstancu je verovatno posledica delimičnog rastvaranja aciklovira u polučvrstom matriksu, koje je pospešeno zagrevanjem u toku DSC analize, a koje se odigravalo pre dostizanja tačke topljenja lekovite supstance. Hassan i Mäder (2015) takođe su ispitivali smanjenje tačke topljenja lekovite supstance u DSC termogramima koji su dobijeni za polučvrste SNEDDS sa progesteronom. Pokazano je da pri upotrebi formulacija sa višim koncentracijama leka (15 mg/g i 50 mg/g), dolazi do smanjenja tačke topljenja i količine toplote koja je razmenjena tokom endotermnog procesa topljenja u odnosu na čistu supstancu, usled rastvaranja supstance u polučvrstom matriksu zbog zagrevanja tokom DSC analize. Pored toga, termogram uzorka SD2 pokazuje širok pik slabog intenziteta na oko 260 °C. Takođe, na termogramu S-SD2 endotermni pik od aciklovira bio je slabog intenziteta i pomeren je na vrednost 233,5 °C. Uočene razlike u termogramima SD2 i S-SD2 povezane su sa različitim koncentracijama lekovite supstance u ovim uzorcima. Uzorak SD2 sadrži nižu koncentraciju aciklovira, dok uzorak S-SD2 sadrži višestruko veću koncentraciju suspendovane lekovite supstance, pa se moglo očekivati da je frakcija nerastvorenog aciklovira, koja podleže topljenju, bila srazmerno veća kod uzorka S-SD2.

4.2.1.4. *In vitro* kinetika difuzije aciklovira iz polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema

Profili difuzije aciklovira iz uzoraka SD2, S-SD2 i suspenzije aciklovira, koji su dobijeni na osnovu rezultata *in vitro* testa korišćenjem modela difuzione ćelije, bili su linearni (Slika 23) sa koeficijentima korelacije $R^2 > 0,95$ (tj., vrednosti R^2 iznosile su 0,9798, 0,9962, i 0,963, redom).



Slika 23. Profili difuzije aciklovira iz ispitivanih polučvrstih SMEDDS (SD2 (●) i S-SD2 (○)) u poređenju sa suspenzijom aciklovira (○)

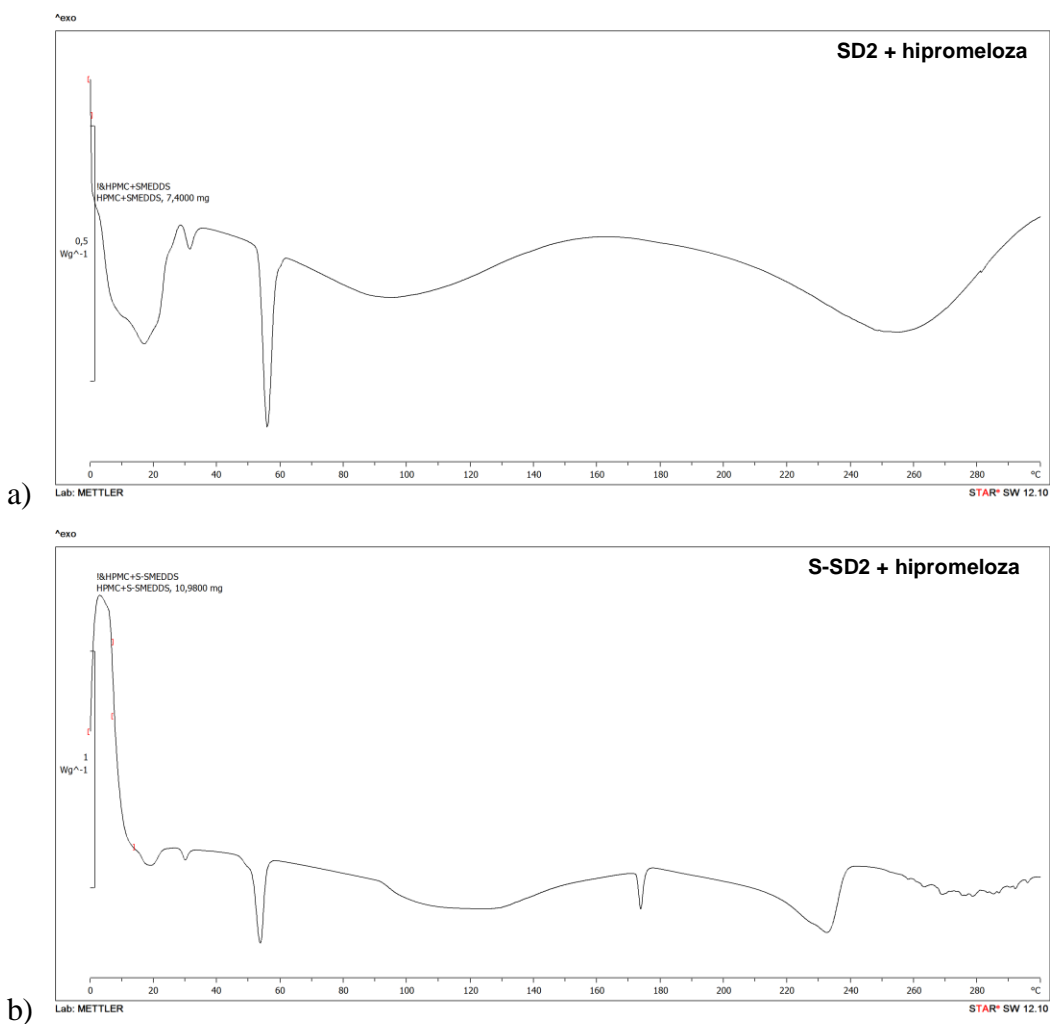
Utvrđena linearnost, iako tipična za kinetiku nultog reda koja je uobičajena kod sistema sa kontrolisanim oslobađanjem aktivne supstance, u ovom slučaju pripisana je membranom kontrolisanoj difuziji aciklovira iz formulacije u okolni akceptorski medijum. Brzine difuzije bile su određene na osnovu nagiba krivih i upoređene. Minimalna brzina oslobađanja aciklovira difuzijom dobijena je za suspenziju ($2,91 \mu\text{gcm}^{-2}\text{min}^{-1}$), koja sadrži istu koncentraciju (33,33%) lekovite supstance kao S-SD2 ($99,80 \mu\text{gcm}^{-2} \text{min}^{-1}$). Brzina oslobađanja aciklovira iz SD2 ($7,41 \mu\text{gcm}^{-2} \text{min}^{-1}$) bila je slična brzini oslobađanja iz suspenzije, iako je koncentracija aciklovira u ovom uzorku bila višestruko niža (2%). Kao što je očekivano, brzina oslobađanja aciklovira iz uzorka S-SD2 bila je značajno veća u poređenju sa SD2, pošto je sadržaj lekovite supstance bio višestruko viši. Uopšteno, difuzija aciklovira iz ispitanih polučvrstih SMEDDS bila je značajno povećana u poređenju sa čistim aciklovirom. Pretpostavljeno je da prolazak akceptorskog medijuma u SMEEDS propagira difuziju lekovite supstance. Lucas i saradnici (1987) su prethodno pokazali visoku mobilnost vankomicin-hidrohlorida u matriksu na bazi makrogola.

Druge studije opisuju funkciju makrogola kao komponenti koje formiraju svojevrsne “kanale” u okviru strukture polučvrstih matriksa koji se sastoje iz hidrofilnih i lipofilnih ekscipijenasa, i tako omogućavaju difuziju vode u matriks, usled osmotskog efekta (Baykara i Yuksel, 1991). Pored toga, nedavne studije su pokazale da se hidrofilni polimeri, konkretno poloksamer 407 (polietilenoksid (PEO)–polipropilenoksid (PPO)–PEO [(EO)₁₀₁–(PO)₅₆–(EO)₁₀₁] triblok kopolimer), mogu ponašati kao kosufraktanti u tečnim mikroemulzijama na bazi nejonskih surfaktanata (Đekić i sar., 2015a) kao i u polučvrstim hidrogelovima baziranim na lecitinu (Đekić i sar., 2015b), koji doprinose stabilizaciji koloidnih disperzija. Uprkos dobro poznatom termoreverzibilnom karakteru vodenih rastvora poloksamera 407 *per se*, pokazano je, kao i kod primene polietilenglikola, prvenstveno njegov uticaj kao potencijalnog kosurfaktanta i uticaj na fizičko-hemijska svojstva nosača kao i na profil oslobađanja lekovite supstance *in vitro*.

4.2.2. Kompatibilnost polučvrstih polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom sa omotačem tvrdih kapsula

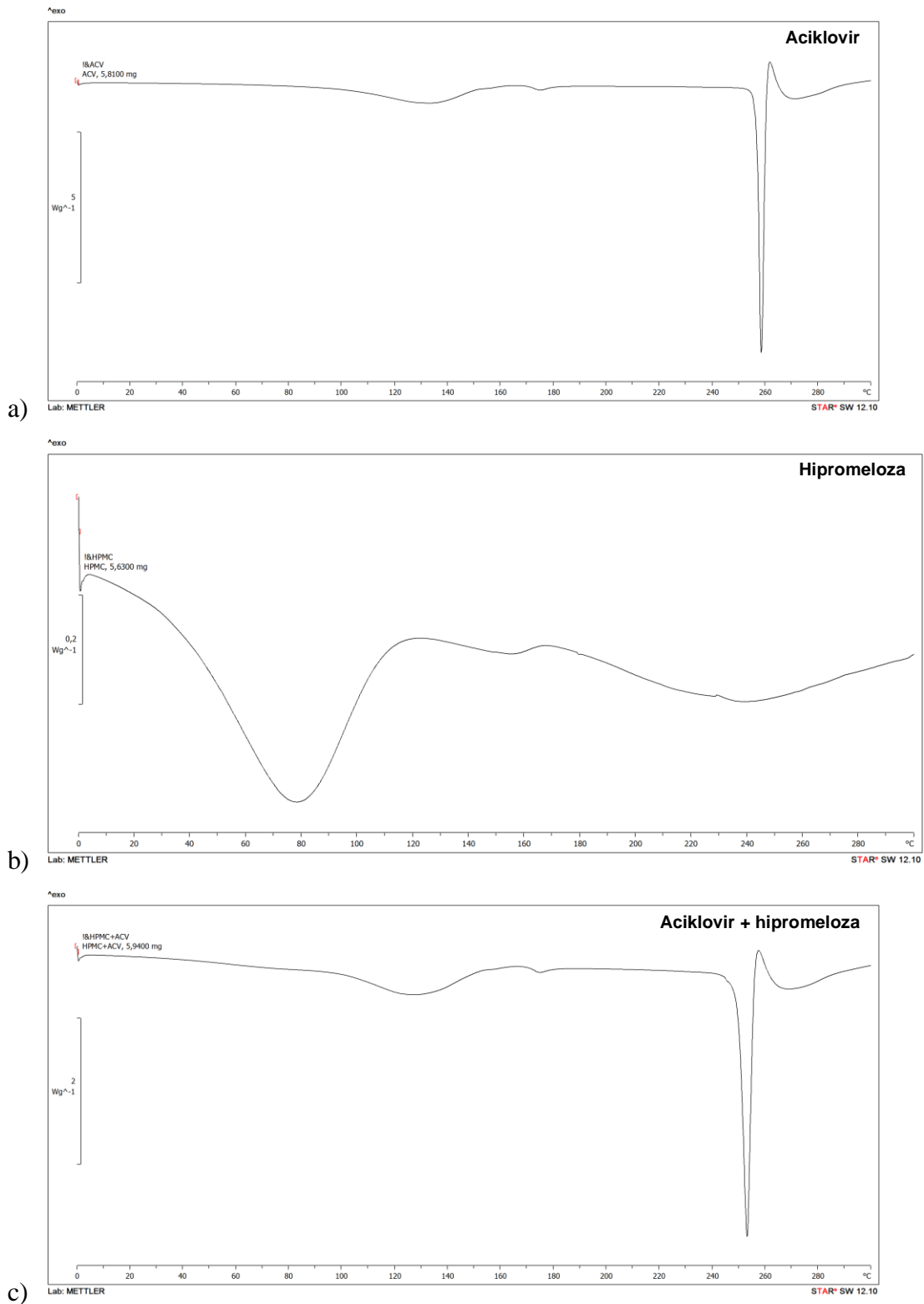
Preliminarna ispitivanja su obuhvatila ispitivanje kompatibilnosti uzorka SD2 (trigliceridi srednje dužine lanaca (10%), makrogol glicerol hidroksistearat (56,25%), poligliceril-3-dioleat (6,25%), glicerol (20%), makrogol 8000 (7,5%)) polučvrste konzistencije i odgovarajućih tvrdih želatinskih kapsula. Želatinske kapsule su bile napunjene sa 0,6 g SD2 i čuvane tokom perioda od mesec dana pod ambijentalnim uslovima. Organoleptička svojstva i integritet kapsula su vizuelno praćena i merena je njihova masa. Nakon isteka perioda ispitivanja, težina, boja i fizički integritet kapsula bili su vidno promenjeni. Zbog prisustva relativno visoke koncentracije (20%) glicerola u ispitivanim formulacijama, došlo je do prolaska ovog hidrofilnog korastvarača u omotač kapsule zbog čega je bio narušen njen fizički integritet. HPMC kapsule se najčešće koriste da se prevaziđu problemi vezani za stabilnost koji su tipični za želatinske kapsule, jer imaju niži sadržaj vlage (4 – 6%) u poređenju sa želatinskim kapsulama (13 – 15%), i stoga manju verovatnoću prolaska hidrofilnih ekscipijenasa u njen omotač (Al-Tabakha, 2010). Prema podacima iz literature, sufraktant (Cremophor[®] RH 40), kosufraktant (Plurol Oleique[®] CC 497), i makrogol 8000, koji su korišćeni kao ekscipijensi u ispitivanim polučvrstim SMEDDS, ponaosob se smatraju kompatibilnim sa HPMC kapsulama (Cole i sar., 2008; Honkanen i sar.,

2002; Nagata, 2002). Međutim, pri proceni stabilnosti tvrdih HPMC kapsula kao finalnog farmaceutskog oblika, bilo je neophodno razmotriti kompatibilnost formulisanih SMEDDS sa takvim omotačem kapsule. DSC termogrami za smeše hipromeloze i ispitivanih SMEDDS (Slika 24), podudarali su se sa odgovarajućim termogramima uzoraka SD2 i S-SD2 bez hipromeloze. Zaključeno je da hipromeloza nije uticala na endotermne procese uzoraka SD2 i S-SD2, što je ukazivalo na nizak rizik od interakcija omotača HPMC kapsula sa ispitanim polučvrstim SMEDDS.



Slika 24. DSC termogrami fizičkih smeša ispitivanih SMEDDS i hipromeloze: a) SD2/hipromeloza; b) S-SD2/hipromeloza

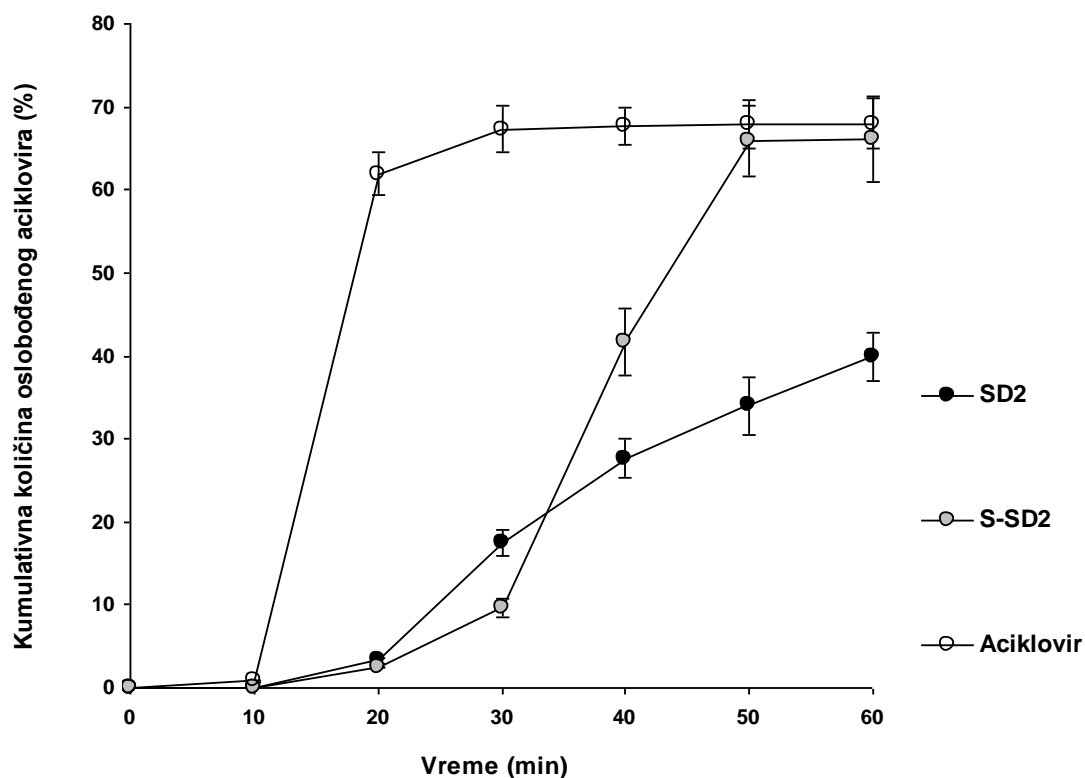
Kako bi se ispitala potencijalne interakcije između SD2 i S-SD2 i hipromeloze, primenom DSC tehnike izvršena je termalna analiza fizičkih smeša hipromeloze sa aciklovikom, SD2 i S-SD2 (Slika 25).



Slika 24. DSC termogramaci aciklovira (a), hipromeloze (b) i fizičke smeše aciklovir/hipromeloza (c)

4.2.3. *In vitro* oslobađanje aciklovira iz polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema u obliku tvrdih kapsula

Kumulativna količina oslobođenog aciklovira iz SD2 i S-SD2, u obliku tvrdih kapsula, u funkciji vremena, prikazana je na slici 26. Sa ciljem da se proceni uticaj SMEDDS nosača na profil oslobađanja aciklovira, odnosno, eliminiše uticaj omotača kapsule, dobijeni profili upoređeni su sa onim koji je dobijen za čistu supstancu, koja je u odgovarajućoj dozi bila napunjena u tvrde HPMC kapsule, koje su korišćene i za ispitivane SMEDDS.



Slika 26. Profil oslobađanja aciklovira iz tvrdih kapsula sa SD2 (●), S-SD2 (○) i čiste supstance (○) u obliku tvrdih kapsula

Za ispitivane polučvrste SMEDDS (SD2, S-SD2) kao i za čist aciklovir nakon prvih 10 minuta uočeno je neznatno oslobađanje aktivne supstance, što je najverovatnije posledica postepene

hidratacije i bubrenja omotača kapsula od hipromeloze u termostatiranom medijumu (fosfatni pufer pH 7,2). Tokom ove faze, bio je očuvan fizički integritet omotača kapsule što je ograničilo dostupnost aciklovira za rastvaranje u medijumu. Nakon toga, postepeno je došlo do raspadanja omotača kapsula i oslobađanja SMEDDS, odnosno, čistog aciklovira u okolni medijum. Maksimalna količina rastvorenog aciklovira iz kapsule sa čistom aktivnom supstancom iznosila je $67,98 \pm 3,01$ mg i postignuta je za 30 min od početka eksperimenta. Nepotpuno rastvaranje aciklovira navelo je na pretpostavku da je preostali deo doze aciklovira bio fizički zadržan u hidratanim i nabubrelim delovima omotača HPMC kapsule. U prilog ovoj pretpostavci išao je i rezultat DSC analize fizičke smeše hipromeloze i aciklovira koji je ukazao na potencijal za fizičke interakcije između aktivne supstance i ovog polimera. U skladu sa zapažanjima Zillera (1988) da se u suspenziji acetaminofena na površinu čestica ireverzibilno adsorbuje polivinilpirolidon, uspostavljanjem specifičnih veza između odgovarajućih funkcionalnih grupa aktivne supstance i polimera, bez uticaja na brzinu njenog rastvaranja, postojala je mogućnost da se u slučaju ispitivanih SMEDDS, polimerni lanci hipromeloze adsorbuju na površini čestica aciklovira, čime je bio ograničen njen kontakt sa medijumom i proces rastvaranja.

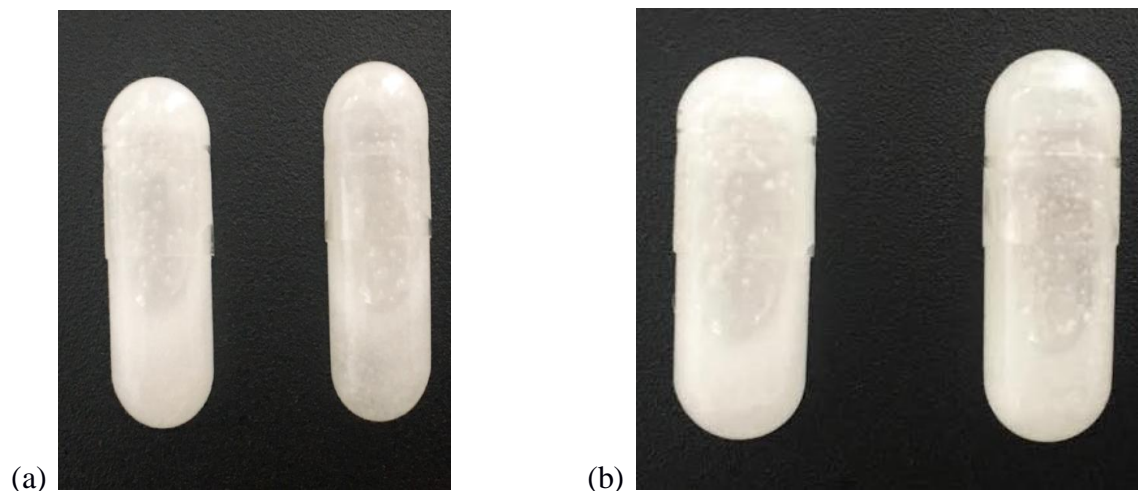
Profili oslobađanja aciklovira iz tvrdih kapsula sa SD2 i S-SD2 značajno su se razlikovali u poređenju sa čistom supstancom u istom obliku. Vrednost f_1 je iznosila 63,31 (SD2) i 44,29 (S-SD2). Na osnovu rezultata prethodne karakterizacije disperzibilnosti ispitivanih polučvrstih SMEDDS, očekivano je da su se ovi sistemi, nakon narušavanja mehaničkog integriteta omotača kapsula, dispergovali spontano u medijumu formirajući ulje-u-vodi mikroemulziju sa lekovitom supstancom solubilizovanom u međupovršinskom filmu na granici dispergovane uljane faze i vodene faze. Molekuli lekovite supstance oslobađali su se iz formiranog koloidnog nosača u medijum, odnosno, odigravao se proces raspodele između koloidnog nosača i medijuma. Nakon početnih 10 min, profil oslobađanja aciklovira iz uzorka SD2 bio je linearan, pa je zaključeno da je oslobađanje lekovite supstance bilo kontrolisano formiranim koloidnim nosačem. Količina oslobođenog aciklovira na kraju testa, nakon 60 min, iznosila je $39,89 \pm 1,05$ mg, što je bilo manje u poređenju sa čistom supstancom. Linearost u profilu oslobađanja lekovite supstance iz S-SD2 primećena je između 30-og i 50-og minuta, a količina oslobođene lekovite supstance nakon 60 min iznosila je $66,10 \pm 2,98$ mg. Značajno veća količina oslobođenog aciklovira iz S-SD2 u poređenju sa SD2 (f_1 34,14) konzistentna je sa prethodno uočenom značajno većom

difuzijom aciklovira iz polučvrstog matriksa S-SD2. Na osnovu rezultata prethodne karakterizacije očekivana je veća mobilnost i oslobađanje molekula aciklovira iz mikroemulzije formirane iz S-SD2. Dobijeni rezultati *in vitro* oslobađanja aciklovira direktno su pokazali da ispitivani SMEDDS, odnosno, formirani koloidni nosač, značajno utiču na brzinu rastvaranja inkorporiranog aciklovira i modifikuje ovaj proces u poređenju sa čistom (čvrstom) lekovitom supstancom koja se oslobađala iz tvrde kapsule i rastvarala u medijumu. U poslednjem slučaju, kada je lekovita supstanca bila rastvorena u koncentraciji koja je bliska zasićenom rastvoru, može doći do smanjenja rastvorljivosti i precipitacije, dok je solubilizacijom lekovite supstance u formiranom koloidnom nosaču minimizovan rizik od precipitacije ili interakcija u GIT-u (Feeney i sar., 2016; Đekić i Primorac, 2014; Porter i sar., 2008; Pouton, 2006). Sa druge strane, molekuli lekovite supstance oslobođeni iz koloidnog nosača dostupni su za apsorpciju (Jannin i sar., 2008). Stoga, može se smatrati da razvijeni polučvrsti SMEDDS koji se sastoji od triglicerida srednje dužine lanaca (10%), makrogol glicerol hidroksistearata (56,25%), poligliceril-3-dioleata (6,25%), glicerola (20%) i makrogola 8000 (7,5%) predstavlja nosač sa potencijalnom da obezbedi efikasnu solubilizaciju aciklovira u slabo alkalnoj sredini (npr. kao što je u tankom crevu), te ga može učiniti dostupnim za apsorpciju uz minimalan rizik od smanjenja rastvorljivosti na mestu apsorpcije.

4.2.4. Stabilnost polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom u obliku tvrdih kapsula

Stabilnost polučvrstih SMEDDS u obliku tvrdih kapsula razmatrana je kod formulacije sa 2% aciklovira (SD2), sa ciljem da se minimizira značaj procesa rastvaranja suspendovanog aciklovira, kada je prisutan u većim koncentracijama, na procese hemijske degradacije, dispergovanja SMEDDS, solubilizacije aktivne supstance i brzine njene difuzije iz formiranog koloidnog nosača.

HPMC kapsule su bile napunjene sa po 0,6 g SD2 ili S-SD2 i čuvane su tokom 3 meseca na 25 °C/60% RH, odnosno, na 5 ± 3 °C. Organoleptička svojstva i integritet kapsula su vizuelno praćena i merena je njihova masa. Masa, boja i fizički integritet kapsula (Slika 27) ostali su nepromenjeni tokom celokupnog perioda ispitivanja.



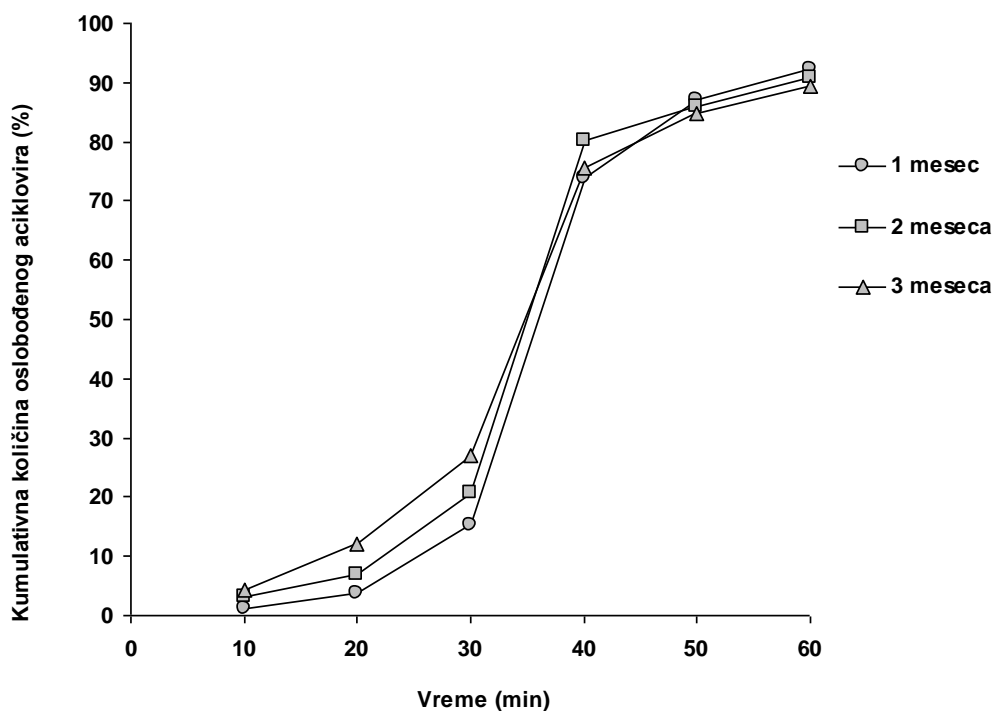
Slika 27. Izgled HPMC kapsulana punjenih formulacijama SD2 (a) i S-SD2 (b) koje su čuvane tokom 3 meseca na 25 °C/60% RH (leva kapsula) i 5 ± 3 °C (desna kapsula). Kroz zidove kapsule su se mogli videti sitni mehurići vazduha koji su inkorporirani tokom pripreme SMEDDS, zbog relativno visokog sadržaja surfaktanata

Sadržaj aciklovira u kapsulama SD2 i uzorcima SD2 čuvanih kao bulk je određen metodom HPLC nakon 1, 2 i 3 meseca čuvanja na 25 °C/60% RH, odnosno, 5 ± 3 °C i dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 18. Rezultati su pokazali da nije bilo značajnih promena u sadržaju lekovite supstance kod uzoraka čuvanih pod navedenim uslovima tokom celokupnog perioda ispitivanja.

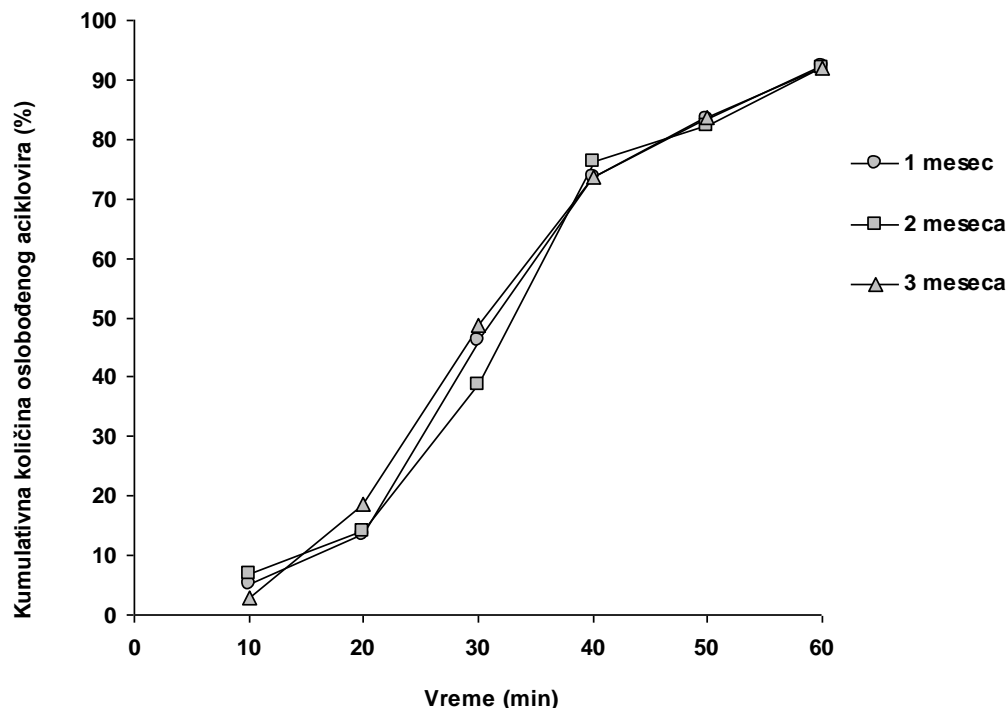
Tabela 17. Sadržaj aciklovira u uzorcima SD2 u obliku kapsula i bulk nakon 1, 2 i 3 meseca čuvanja na 25 °C/60% RH, odnosno, 5 ± 3 °C

Uslovi čuvanja	Sadržaj aciklovira (%) posle određenog vremenskog perioda čuvanja					
	1 mesec		2 meseca		3 meseca	
	<i>Tvrda kapsula</i>	<i>Bulk</i>	<i>Tvrda kapsula</i>	<i>Bulk</i>	<i>Tvrda kapsula</i>	<i>Bulk</i>
25 °C/60% RH	99,52	99,48	99,15	98,99	97,82	98,02
5 ± 3 °C	98,55	99,01	97,34	99,00	96,25	97,98

Profili oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstog SMEDDS SD2 koji su čuvani pod različitim uslovima tokom tri meseca (Slika 28 i 29) bili su slični sa inicijalnim profilima oslobađanja ($0 < f_1 < 15$).

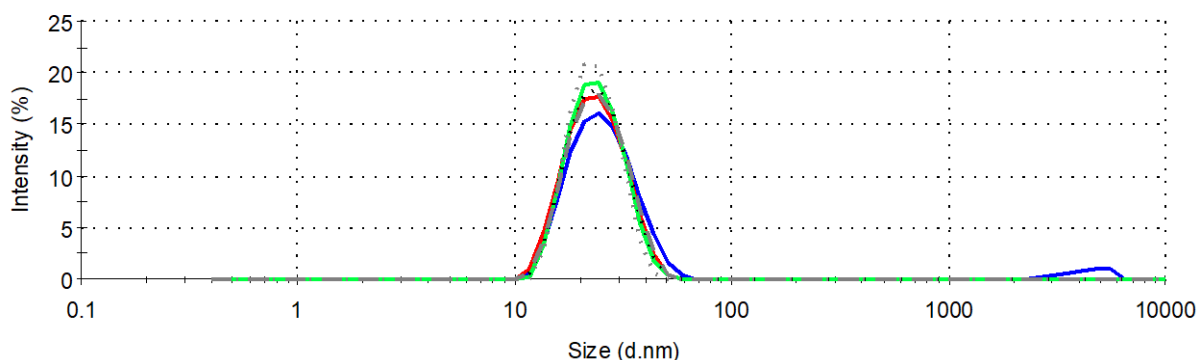


Slika 28. Profili oslobađanja aciklovira iz polučvrstih SMEDDS (SD2) u obliku tvrdih kapsula nakon čuvanja na 25 °C/60% RH tokom 3 meseca (S.D. bila je manja od 20% i nije prikazana na grafikonu zbog preglednosti)

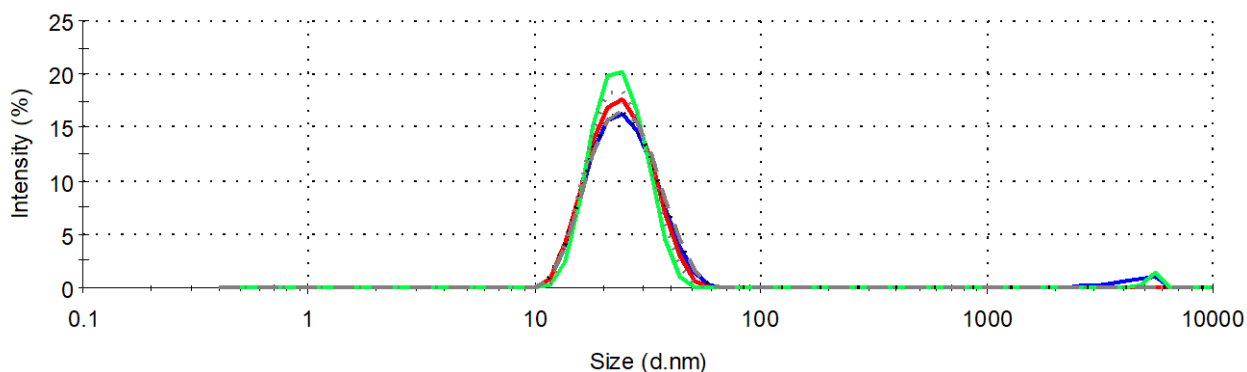


Slika 29. Profili oslobađanja aciklovira iz polučvrstih SMEDDS (SD2) u obliku tvrdih kapsula koji su čuvani na temperaturi od 5 ± 3 °C tokom 3 meseca (S.D. bila je manja od 20% i nije prikazana na grafikonu zbog preglednosti)

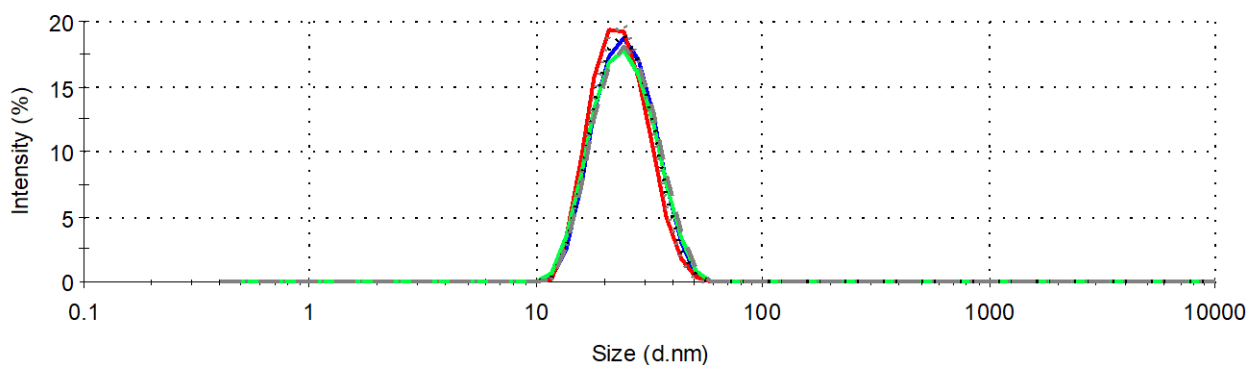
Detaljni rezultati merenja veličine kapi (Z-ave) i indeksa polidisperziteteta (PdI) nakon dispergovanja uzoraka polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom (SD2) u obliku tvrdih kapsula čuvanih na 25 °C/60% RH, odnosno, na 5 ± 3 °C i polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom (SD2) čuvanih kao bulk na 25 °C/60% RH, odnosno, na 5 ± 3 °C u kiselom i baznom medijumu, prikazani su u tabeli 18 i na slikama 30-33. Uzorci su nakon 1 meseca, 2 meseca i 3 meseca dispergovani u fosfatnom puferu (pH 7,2) i 0,1 M HCl (pH 1,2), a dobijeni rezultati bili su slični sa inicijalnim merenjima i u okviru postavljenih granica za SMEDDS, čime je jasno potvrđeno da su ispitivane disperzije termodinamički stabilni sistemi organizovani na nanoskali. Takođe je potvrđeno da na njihovu *in vitro* disperzibilnost u vodenim medijumima i prosečnu veličinu kapi nije značajno uticala pH vrednost medijuma.



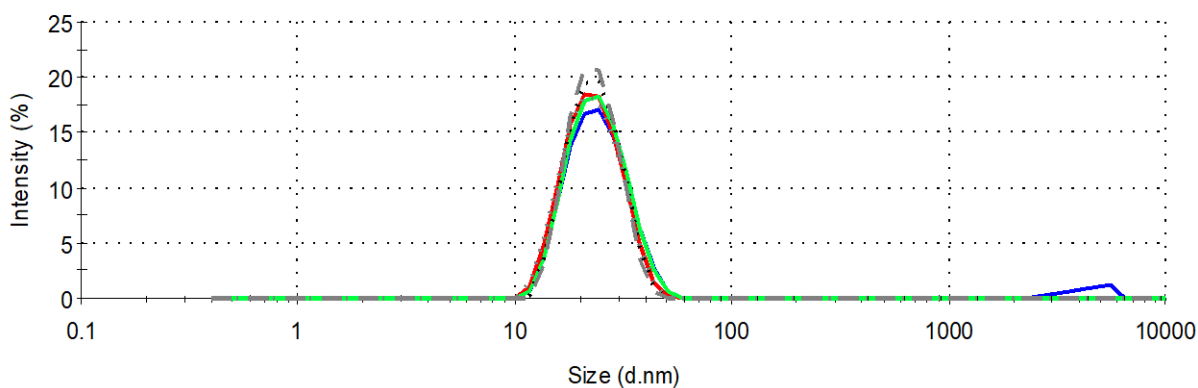
Slika 30. Raspodela veličine kapi po intenzitetu rasute svetlosti u disperzijama ispitivanog polučvrstog SMEDDS (SD2) sa aciklovirom u obliku tvrdih kapsula čuvanih na 25 °C/60% RH u klima komori nakon: 1 meseca u fosfatnom puferu (pH 7,2) (—) i 0,1 M HCl (pH 1,2) (—); 2 meseca u fosfatnom puferu (pH 7,2) (—) i 0,1 M HCl (pH 1,2) (---); 3 meseca u fosfatnom puferu (pH 7,2) (— —) i 0,1 M HCl (pH 1,2) (---)



Slika 31. Distribucija veličine kapi po intenzitetu u disperzijama ispitivanog polučvrstog SMEDDS (SD2) sa aciklovirom punjenim u HPMC kapsule i čuvanih na 5 ± 3 °C u klima komori nakon: 1 meseca u fosfatnom puferu (pH 7,2) (—) i 0,1 M HCl (pH 1,2) (—); 2 meseca u fosfatnom puferu (pH 7,2) (—) i 0,1 M HCl (pH 1,2) (---); 3 meseca u fosfatnom puferu (pH 7,2) (— —) i 0,1 M HCl (pH 1,2) (---)



Slika 32. Distribucija veličine kapi po intenzitetu u disperzijama ispitivanog polučvrstog SMEDDS (SD2) sa aciklovirom čuvanog kao bulk na 25 °C/60% RH u klima komori nakon: 1 meseca u fosfatnom puferu (pH 7,2) (—) i 0,1 M HCl (pH 1,2) (—); 2 meseca u fosfatnom puferu (pH 7,2) (—) i 0,1 M HCl (pH 1,2) (---); 3 meseca u fosfatnom puferu (pH 7,2) (— —) i 0,1 M HCl (pH 1,2) (---)



Slika 33. Distribucija veličine kapi po intenzitetu u disperzijama ispitivanog polučvrstog SMEDDS (SD2) sa aciklovirom čuvanog kao bulk na 5 ± 3 °C u klima komori nakon: 1 meseca u fosfatnom puferu (pH 7,2) (—) i 0,1 M HCl (pH 1,2) (—); 2 meseca u fosfatnom puferu (pH 7,2) (—) i 0,1 M HCl (pH 1,2) (---); 3 meseca u fosfatnom puferu (pH 7,2) (— —) i 0,1 M HCl (pH 1,2) (---)

Tabela 19. Prosečna veličina kapi (Z-ave) i indeks polidisperziteta (PdI) (srednja vrednost ± S.D., n = 3) u disperzijama ispitivanih SMEDDS sa aciklovirom čuvanih pod različitim uslovima. Uzorci su nakon 1 meseca, 2 meseca i 3 meseca dispergovani u fosfatnom puferu (pH 7,2) i 0,1 M HCl (pH 1,2) i analizirani primenom tehnike fotonske korelacione spektroskopije

Uzorak		Disperzije polučvrstog SMEDDS sa aciklovirom (SD2) u obliku tvrdih kapsula čuvanih na 25 °C (RH ~ 60%)		Disperzije polučvrstog SMEDDS sa aciklovirom (SD2) u obliku tvrdih kapsula čuvanih na 4 °C (RH ~ 60%)		Disperzije polučvrstog SMEDDS sa aciklovirom (SD2) čuvanog kao <i>bulk</i> na 25 °C (RH ~ 60%)		Disperzije polučvrstog SMEDDS sa aciklovirom (SD2) čuvanog kao <i>bulk</i> na 4 °C (RH ~ 60%)	
Vreme	Medijum	Z-ave (nm)	PdI	Z-ave (nm)	PdI	Z-ave (nm)	PdI	Z-ave (nm)	PdI
1 mesec	pH 7,2	24,80 ± 0,83	0,199 ± 0,001	24,27 ± 0,074	0,188 ± 0,010	23,51 ± 1,11	0,073 ± 0,014	23,86 ± 0,97	0,206 ± 0,005
	pH 1,2	22,30 ± 0,64	0,082 ± 0,016	22,75 ± 0,82	0,083 ± 0,007	23,56 ± 0,88	0,192 ± 0,032	21,86 ± 0,80	0,067 ± 0,012
2 meseca	pH 7,2	23,10 ± 1,04	0,145 ± 0,043	26,92 ± 1,20	0,227 ± 0,006	23,52 ± 1,06	0,151 ± 0,015	23,16 ± 1,20	0,139 ± 0,036
	pH 1,2	22,68 ± 1,15	0,075 ± 0,006	23,18 ± 1,02	0,107 ± 0,009	23,24 ± 1,16	0,077 ± 0,027	22,19 ± 0,83	0,066 ± 0,003
3 meseca	pH 7,2	22,84 ± 0,37	0,076 ± 0,005	23,37 ± 1,20	0,102 ± 0,005	23,74 ± 1,18	0,083 ± 0,003	22,73 ± 0,31	0,145 ± 0,001
	pH 1,2	22,31 ± 0,89	0,039 ± 0,020	22,57 ± 0,75	0,086 ± 0,030	22,92 ± 0,91	0,058 ± 0,013	21,51 ± 0,24	0,078 ± 0,000

4.3. Rezultati i diskusija III faze istraživanja

U prethodnoj fazi istraživanja pripremljen je i ispitan SMEDDS sa nosačem koji sadrži 7,5% makrogola 8000 i 20% glicerola, kako bi se postiglo odgovarajuće reološko ponašanje (prividni viskozitet i tiksotropija) za punjenje u tvrde kapsule pogodne za oralnu upotrebu kao čvrst farmaceutski oblik. Dobijeni rezultati su potvrdili da ovaj uzorak, nakon razblaživanja u kiselom i alkalnom vodenom medijumu (0,1 M HCl i fosfatni pufer pH 7,2), prelazi u mikroemulziju sa dovoljnim kapacitetom za solubilizaciju aciklovira. Pored toga, *in vitro* studija brzine oslobađanja pokazala je da je pokretljivost molekula lekovite supstance u polučvrstom matriksu SMEDDS nosača bila velika, kao i da je formirani nosač tipa mikroemulzije omogućio izbegavanje rizika za precipitaciju lekovite supstance kada je njen sadržaj u SMEDDS-u do 33,33%. Stoga se ovaj sistem mogao smatrati optimizovanim u pogledu kriterijuma koji su na početku studije postavljeni za nosač tipa polučvrstog SMEDDS, te je bio najbolji kandidat za *in vivo* studiju koja je sprovedena u završnoj fazi istraživanja. Pri tom je razmatran uticaj *in vitro* optimizovanog polučvrstog SMEDDS nosača na farmakokinetički profil aciklovira i njegovu neškodljivost nakon peroralne primene kod *Wistar* pacova.

4.3.1. Uticaj polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema na biološku raspoloživost aciklovira

U tabeli 19 su prikazani farmakokinetički parametri koji su određeni nakon oralne primene ispitivanog uzorka polučvrstog SMEDDS (trigliceridi srednje dužine lanaca (10%), makrogol glicerol hidrosistearat (56,25%), poligliceril-3-dioleat (6,25%), glicerol (20%), makrogol 8000 (7,5%)) sa aciklovirom u koncentraciji 2,5 mg/ml (5 mg/kg aciklovira), oralne primene suspenzije aciklovira (5 mg/kg aciklovira) i *i.v.* primene rastvora aciklovira (5 mg/kg aciklovira).

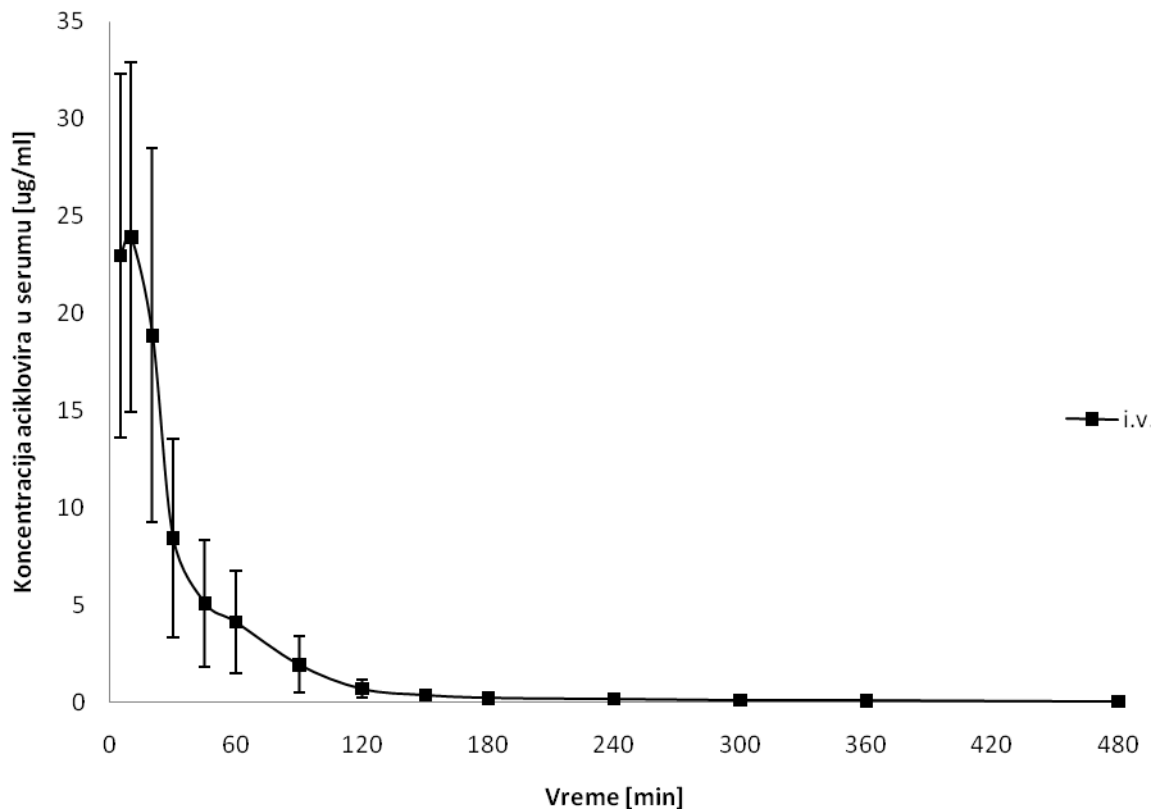
Tabela 20. Farmakokinetički parametri (maksimalna koncentracija (C_{max}), koncentracija u nultoj tački (C_0), prosečno vreme potrebno za dostizanje C_{max} (T_{max}), površine ispod krive zavisnosti koncentracije od vremena (AUC_{0-t} i $AUC_{0-\infty}$), konstanta eliminacije (k_{el}), poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$), volumen raspodele stacionarnog stanja (V_{ss}), klirens (Cl), srednje vreme zadržavanja (MRT) i apsolutna biološka raspoloživost (BA)) aciklovira posle i.v. primene rastvora i oralne primene suspenzije i polučvrstih SMEDDS (podaci su predstavljeni kao prosečna vrednost \pm S.D. (minimalna-maksimalna vrednost))

Parametar	Rastvor aciklovira primenjen i.v.	Suspenzija aciklovira primenjena per os	Polučvrst SMEDDS (SD2) primenjen per os
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	26,23 \pm 9,30 (16,72 - 38,08)	0,29 \pm 0,09 (0,17 - 0,39) #	0,92 \pm 0,21 (0,58 - 1,13)##, \times
C_0 ($\mu\text{g/ml}$)	25,94 \pm 12,41 (11,18 - 38,52)	/	/
T_{max} (min)	8,00 \pm 2,74 (5 - 10)	26,00 \pm 5,48 (20 - 30) #	14 \pm 10,84 (5 - 30)##
$AUC_{0-\infty}$ (min $\mu\text{g/ml}$)	928,01 \pm 219,25 (762,72 - 1306,16)	34,62 \pm 14,20 (26,69 - 59,82) #	55,23 \pm 15,87 (41,71 - 79,28) \times
AUC_{0-t} (min $\mu\text{g/ml}$)	925,05 \pm 218,23 (760,62 - 1302,06)	30,91 \pm 7,49 (26,18 - 44,01) #	54,97 \pm 15,71 (41,57 - 79,02) ##, \times
k_{el} (1/min)	0,02 \pm 0,004 (0,01 - 0,02)	0,01 \pm 0,005 (0,004 - 0,01) #	0,02 \pm 0,004 (0,01 - 0,02) ##
$t_{1/2}$ (min)	44,99 \pm 12,75 (34,47-65,86)	98,83 \pm 52,97 (48,45 - 178,69) #	43,71 \pm 11,96 (30,98 - 59,23)##
V_d (ml/kg)*	366,68 \pm 139,02 (203,81 - 586,61)	20107,36 \pm 6173,33 (13094,28 - 25925,56) #	5750,79 \pm 712,08 (4845,33 - 6747,25)##
V_{ss} (ml/kg)	238,52 \pm 102,27 (89,96 - 322,26)	/	/
Cl (ml/min/kg)*	5,59 \pm 1,07 (3,83 - 6,56)	158,50 \pm 43,26 (83,58 - 187,33) #	96,01 \pm 24,15 (63,06 - 119,87)##, \times
MRT (min)	41,71 \pm 15,72 (14,55 - 52,79)	137,32 \pm 37,42 (97,63 - 192,49) #	87,45 \pm 31,73 (54,02 - 137,93)##
BA (%)		3,7	5,9

*nakon oralne primene u zavisnosti od frakcije apsorbovanog aciklovira (F) drug (F), $V_d \cdot F$, $Cl \cdot F$

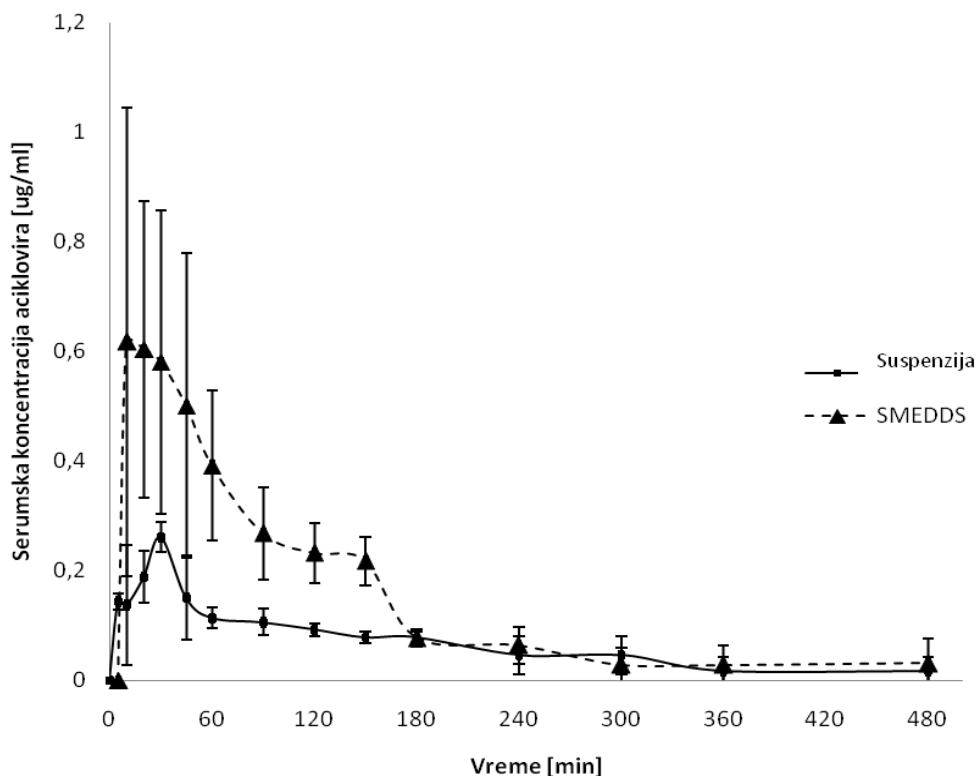
i.v. primenjen rastvor aciklovira vs oralno primenjena suspenzija aciklovira, $p \leq 0,05$; \times i.v.primenjen rastvor aciklovira vs.oralno primenjen SMEDDS (oznaka), $p \leq 0,05$; ## oralno primenjena suspenzija aciklovira vs oralno primenjen SMEDDS (oznaka), $p \leq 0,05$

Profil koncentracije aciklovira u serumu nakon *i.v.* primenjenog vodenog rastvora aciklovira kod muških *Wistar* pacova ukazao je na brz metabolizam, pri čemu je više od 50% primenjene doze aciklovira bilo metabolisano za 30 minuta (Slika 34).



Slika 34. Profil koncentracije aciklovira u serumu tokom 480 minuta dobijen nakon *i.v.* primene vodenog rastvora aciklovira (5 mg/kg) (podaci su predstavljani kao srednje vrednosti \pm S.D.)

Koncentracija ispitivane lekovite supstance u serumu u funkciji vremena nakon oralne primene suspenzije aciklovira je prikazana na slici 35. Dobijeni profil zavisnosti koncentracije i vremena je pokazao da je apsorpcija aciklovira iz gastrointestinalnog trakta nakon primene suspenzije ograničena (C_{max} 0,29 mg/ml, BA 3,7%) (Slika 35).



Slika 35. Koncentracioni profil aciklovira u serumu tokom 480 minuta dobijen nakon oralne primene suspenzije (crni kvadrati) i SMEDDS (crni trouglovi) u dozi od 5 mg/kg (podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm S.D.)

Slaba apsorpcija aciklovira se obično povezuje sa njegovom niskom rastvorljivošću u vodi i većini nepolarnih rastvarača, kao i sa njegovom niskom permeabilnošću. Povećanje rastvorljivosti formiranjem kompleksa aciklovira sa ciklodekstrinima, kao i postizanje povećanja biološke raspoloživosti je dat kao primer jedne afirmativne studije (Anroop i sar., 2014). Druga relevantna istraživanja sugerišu da je mehanizam apsorpcije aciklovira pretežno pasivna difuzija (Bork, 2000; Meadows i Dressman, 1990), tako da su glavni faktori niske biološke raspoloživosti nizak koeficijent lipidno-vodne raspodele ($\log P$ -1,59 u n-oktanol/voda smeši na 25 °C) (Kasim i sar., 2004) ili kratko zadržavanje na mestu apsorpcije (duodenum i jejunum) (Meadows i

Dressman, 1990). Takođe, neki autori sugerišu da apsorpcija aciklovira zavisi od vrste formulacije koja se primenjuje, kao i od stanja u GIT-u, a biološka raspoloživost se smanjuje sa povećanjem doze (Akiyama i sar., 1996; Alcorn i McNamara, 2002, De Miranda i Blum, 1983; Thomsen i sar., 2004). Frederick i saradnici (1995) su dobili prosečne vrednosti za C_{max} u rasponu od 0,4 - 0,8 $\mu\text{g/ml}$ nakon oralne primene čvrstih farmaceutskih oblika (tableta) u jačini od 200 mg i C_{max} 1,6 $\mu\text{g/ml}$ nakon primene doze od 800 mg.

U okviru ove faze ispitivanja, aciklovir koji je primenjen oralno u sastavu ispitivanog polučvrstog SMEDDS pokazao je 1,6 puta veću biološku raspoloživost, a C_{max} je iznosila od $0,92 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ posle $14 \pm 10,84$ minuta u poređenju sa dobijenom C_{max} nakon oralne primene suspenzije aciklovira ($0,29 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ posle $26 \pm 5,48$ minuta) (Tabela 19, Slika 35). Dobijene vrednosti za C_{max} ukazuju na povećanje obima apsorpcije aciklovira u sistemsku cirkulaciju upotrebom ispitivanog polučvrstog SMEDDS. Takođe, upotreba SMEDDS dovela je do statistički značajnog smanjenja T_{max} i statistički značajnog povećanja površine ispod krive zavisnosti koncentracije od vremena (AUC_{0-t}) u poređenju sa oralno primenjenom suspenzijom aciklovira (Tabela 19). Veće vrednosti AUC i koncentracije leka u krvi ukazivale su na povećanu apsorpciju aciklovira upotrebom polučvrstog SMEDDS u poređenju sa primenjenom suspenzijom aciklovira oralnim putem. Patel i Sawant (2007) takođe su u svom radu postigli skoro 3,5 puta veću biološku raspoloživost aciklovira nakon primene nosača tipa SMEDDS, kod muških albino pacova. Međutim, u ovoj studiji je za poređenje korišćen rastvor lekovite supstance, zbog čega slaba rastvorljivost i proces rastvaranja nisu bili kritični parametri za procenu apsorpcije. Ghosh i saradnici (2006) su u svom istraživanju utvrdili 12,78 puta veću biološku raspoloživost aciklovira posle peroralne primene formulacije tipa mikroemulzije u poređenju sa komercijalno dostupnim tabletama. C_{max} je postignuta nakon 3 sata, verovatno usled spore difuzije lekovite supstance iz disperzne uljane faze u vodeni medijum, dok je T_{max} za tablete bio 30 minuta. Povećanje apsorpcije lekovite supstance upotrebom ispitivanog polučvrstog SMEDDS je povezano sa izostankom precipitacije lekovite supstance zbog efikasnog procesa samo-mikroemulgovanja koji je prethodno definisan u *in vitro* studiji. Određena je prosečna veličina kapi od $26,04 \pm 1,73 \text{ nm}$ u kiselom medijumu (0,1 M HCl (pH 1,2)) i $25,10 \pm 0,99 \text{ nm}$ u baznom medijumu (fosfatni puffer pH 7,2) i potvrđeno je brzo formiranje nanodisperzija sa kapljicama ujednačene veličine, što pokazuju vrednosti

odgovarajućeg indeksa polidisperziteteta ($PdI\ 0,158 \pm 0,030$ u upotrebljenom kiselom medijumu i $0,150 \pm 0,026$ u baznom puferu, što je bilo u opsegu fizioloških vrednosti u GIT-u. Podaci su potvrdili očekivanja zasnovana na rezultatima koji su dobijeni u prethodnim fazama istraživanja, pre svega u pogledu formiranja mikroemulzije nakon primene polučvrstih SMEDDS u lumenu GIT-a sa malim veličinama kapi i velikom specifičnom međupovršinom na granici uljane i vodene faze odgovornom za solubilizaciju molekula aciklovira, kao i sa dovoljnom stabilnošću tokom procesa apsorpcije. Procenat apsorpcije je verovatno povećan zbog očekivano brzog procesa dispergovanja, rastvaranja i oslobađanja lekovite supstance iz nosača u fiziološkim uslovima *in vivo*, kao što je to prethodno pokazano i *in vitro*.

Pored toga, povećanje biološke raspoloživosti aciklovira primenom polučvrstih SMEDDS moglo je biti povezano sa povećanjem permeabilnosti lekovite supstance kroz membrane GIT-a posredovanim nosačem tipa mikroemulzije i njegovih sastavnih komponenti. Ovo je bilo u skladu sa prethodno uočenim *in vitro* povećanjem permeabilnosti aciklovira u PAMPA testu, gde je poređen tečni SMEDDS sličnog sastava sa čistom lekovitom supstancom. Efekat poboljšanja permeabilnosti može biti povezan i sa prisustvom ulja i surfaktanata, komponenata SMEDDS, koji dovode do povećanja rastvorljivosti i do inhibicije efluksa jer kao i mnogi drugi ekscipijensi poseduju karakteristike transportera kroz intestinalnu membranu, čime se omogućava potpuno rastvaranje lekovite supstance u fiziološkim uslovima u GIT-u i maksimalna inhibicija relevantnog efluks transportera (Shah, 2011).

Dobijene vrednosti za Cl i MRT kod primene polučvrstih SMEDDS bile su smanjene, što je ukazivalo na veću eliminaciju aciklovira u poređenju sa primenom oralne suspenzije. Povećana eliminacija aciklovira primenjenog u polučvrstom SMEDDS takođe je bila primećena kroz niže vrednosti $t_{1/2}$ i veću vrednost k_{el} u poređenju sa oralnom suspenzijom (Tabela 19). Konstanta eliminacije bila je slična onoj nakon *i.v.* primene. Treba napomenuti da, iako su vrednosti za Vd i Cl mnogo veće nakon oralne primene, uzimajući u obzir frakciju koja se apsorbuje, ovi parametri nisu statistički različiti od onih nakon *i.v.* primene, što ukazuje na to da ispitivani polučvrsti SMEDDS nije bitno uticao na distribuciju aciklovira.

4.3.2. Neškodljivost polučvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom

Aciklovir ispoljava svoju antivirusnu aktivnost kompetitivnom inhibicijom virusne DNK pomoću svog selektivnog vezivanja na HSV-timidin kinazu sa 200 puta većim afinitetom nego za isti enzim kod sisara (De Clercq, 2004), čime se potvrđuje njegova bezbedna primena kod čoveka. Iako su ekscipijensi koji su korišćeni kao sastavni deo ispitivanih polučvrstih SMEDDS dobro poznati i odobreni za oralnu primenu, njihova bezbednost nakon ponovljene primene polučvrstih SMEDDS, procenjena je kvantifikacijom biohemijskih parametara u serumu pacova koji su povezani sa funkcijom jetre i bubrega. Poređen je polučvrsti SMEDDS sa aciklovirom sa polučvrstim SMEDDS bez aciklovira i rastvorom aciklovira.

Jetra je veliki, kompleksan organ koji ima centralnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata, proteina i masti, a ima i bitnu ulogu u metabolizmu i detoksikaciji raznih ksenobiotika koji mogu dovesti do oštećenja organizma, pa i nje same (Soares i sar., 2013). Hepatotoksičnost je definisana kao oštećenje jetre koje je povezano sa poremećenom funkcijom jetre uzrokovanom izloženošću lekom ili nekom drugom neinfektivnom agensu (Soares i sar., 2013). Hepatotoksični agensi mogu reagovati sa osnovnim ćelijskim strukturama i samim tim dovesti do skoro svih vrsta lezija jetre. Oštećenjem hepatocita dolazi do oslobađanja i porasta koncentracije enzima aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) u serumu. Ova dva enzima se nalaze u visokoj koncentraciji u hepatocitima, pa je zato njihova serumska koncentracija najbolji pokazatelj oštećenja jetre (Soares i sar., 2013).

Poredeći serumsku koncentraciju AST grupa životinja koje su dobijale različite ispitivane formulacije u dva različita vremenska intervala sa vrednostima kontrolnih grupa, nije uočena razlika (Tabela 20). Iako u ovoj studiji u gotovo svakoj eksperimentalnoj grupi nije povećana koncentracija AST u serumu, statistički značajna promena u koncentraciji AST je uočena samo kod grupe koja je tokom 21 dan primala vodeni rastvor aciklovira ($p < 0,05$). Povećanje AST moglo je biti povezano sa ćelijskom nekrozom mnogih tkiva. Na primer, dobro je poznato da patološki procesi koji uključuju skeletne ili srčane mišiće i/ili jetreni parenhim, omogućavaju oslobađanje velikih količina ovog enzima u krv (Kaneko, 1980).

Tabela 21. Rezultati biohemijke analize, kontrola po Raškoviću (Rašković i sar., 2014; Rašković i sar., 2015)

Biohemijski parametar	Kontrola	Oralni rastvor aciklovira 7 dana	Polučvrst SMEDDS bez aciklovira 7 dana	Polučvrst SMEDDS sa aciklovirom 7 dana	Oralni rastvor aciklovira 21 dan	Polučvrst SMEDDS bez aciklovira 21 dan	Polučvrst SMEDDS sa aciklovirom 21 dan
AST [U/l]	127,3 ± 7,2	153,17 ± 25,57	134,33 ± 15,95	121,17 ± 12,75	146,2 ± 8,44 *	160,25 ± 26,40	170,50 ± 35,89
ALT [U/l]	47,3 ± 3,8	46,67 ± 7,17	47,67 ± 5,01	40,0 ± 6,07	45,80 ± 6,30	47,25 ± 5,91	42,25 ± 4,72

* - $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu

Tabela 21. Rezultati biohemijske analize, kontrola po Raškoviću (Rašković i sar., 2014; Rašković i sar., 2015)

Biohemijski parametar	Kontrola	Oralni rastvor aciklovira 7 dana	Polučvrst SMEDDS bez aciklovira 7 dana	Polučvrst SMEDDS sa aciklovirom 7 dana	Oralni rastvor aciklovira 21 dan	Polučvrst SMEDDS bez aciklovira 21 dan	Polučvrst SMEDDS sa aciklovirom 21 dan
Urea [mmol/l]	9,22 ± 0,44	4,67 ± 2,35 *	4,75 ± 0,48 *	4,75 ± 0,21 *	5,3 ± 0,37 *	5,55 ± 0,40 *	5,02 ± 0,50 *
Kreatinin [μmol/l]	45,50 ± 0,72	38,33 ± 1,75 *	37,5 ± 2,26 *	36,0 ± 1,79 *	41,00 ± 2,74 *	43 ± 1,83	42,75 ± 3,10
Mokraćna kiselina [μmol/l]	62,0 ± 1,73	71,33 ± 17,6	55,17 ± 9,04	67,0 ± 17,56	66,6 ± 10,83	48,0 ± 10,86	56,0 ± 20,86

* - $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu

Kako se AST nalazi u dovoljnoj koncentraciji i u kardiomiocitima, neuronima, nefronima, miocitima i crvenim krvnim zrnima, a ALT u veoma niskim koncentracijama u miocitima i nefronima, ALT predstavlja specifičniji indikator oštećenja jetre (Giannini i sar., 2005; Ozer i sar., 2008; Soares i sar., 2013). U ovom ispitivanju nisu dobijene statistički značajno različite vrednosti ALT kod životinja iz svih šest grupa u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 20). Merenje vrednosti ALT je posebno korisno u proceni jetrene nekroze, naročito kod malih životinja (Cornelius, 1989). Zbog toga je povećanje serumskih nivoa ALT specifičniji pokazatelj oštećenja jetre. Aktivnosti ova dva enzimska markera oštećenja jetre nisu bile značajno promenjene kod životinja tretiranih dugoročno (21 dan) i kratkoročno (7 dana) polučvrstim SMEDDS sa aciklovirom, u poređenju sa kontrolnom grupom, čime je dokazano da ova formulacija nije hepatotoksična.

Pored određivanja uticaja ispitivanog polučvrstog SMEDDS na funkcije jetre, u studiji je takođe istražen uticaj pripremljenih formulacija uključujući sve grupe životinja na bubrežnu funkciju. Kako bi se pratila funkcija bubrega u ovom istraživanju određivani su serumski koncentracija kreatinina, mokraćne kiseline i uree. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 21. Ovi biohemijski parametri su korisni u proceni toksičnosti formulacija. Povećanje nivoa mokraćne kiseline kod pacova odnosi se na povećanje katabolizma proteina, a nivo uree ukazuje na renalno oštećenje (Eraslan i sar., 2007). U ovoj studiji, dobijena vrednost za ureu je bila statistički značajno smanjena u svim grupama eksperimentalnih životinja u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Kreatinin je statistički značajno smanjen u grupama koje su primale čist rastvor aciklovira oralno 21 dan, čist rastvor aciklovira oralno 7 dana, polučvrst SMEDDS tokom 7 dana, i polučvrst SMEDDS sa aciklovirom 7 dana u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,05$) (Tabela 21). Vrednosti mokraćne kiseline nisu bile statistički značajno različite u svim grupama u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 21). Ponovljeni i kratkoročni unos polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom nije značajno uticao na bubrežnu funkciju izlučivanja.

5. ZAKLJUČAK

- I. Pravilan odabir hidrofilnih ekscipijenasa i usklađivanje njihovih koncentracija za formulaciju tečnih samo-mikroemulgujućih sistema (SMEDDS) baziran je na sveobuhvatnom razmatranju 60 pseudoternernih sistema sastava ulje (trigliceridi srednje dužine lanaca), surfaktanti (makrogol glicerol hidroksistearat, polisorbat 20 ili PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi), kosurfaktant (poligliceril-3-dioleat), i korastvarač (glicerol ili makrogol 400). Navedeni ekscipijensi su odabrani na osnovu eksperimentalno dobijene relativno visoke vrednosti rastvorljivosti aciklovira u njima, koje su ih činile odgovarajućim kandidatima za formulaciju potencijalnih SMEDDS sa visokim kapacitetom za inkorporiranje ove aktivne supstance.

- II. Procenjen je uticaj vrste surfaktanta i korastvarača, njihovih koncentracija, kao i masenog odnosa surfaktanta i kosurfaktanta (K_m vrednost) na kapacitet ispitivanih pseudoternernih sistema za inkorporiranje lekovite supstance. Ispitivanjem pseudoternernih sistema sa 20% i 30% glicerola ili makrogola 400, primećeno je da je rastvorljivost aciklovira bila slična kao u pojedinačnim ekscipijensima kada se kao surfaktant koristi polisorbat 20 ili PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi, pri svim vrednostima K_m . U prisustvu surfaktanta makrogol glicerol hidroksistearata, koji ima najduži hidrofilni polioksietilenski lanac, došlo je do povećanja rastvorljivosti aciklovira sa povećanjem K_m vrednosti i koncentracije korastvarača (glicerola, odnosno, makrogola 400). Maksimalan kapacitet ispitivanih pseudoternernih sistema za inkapsulaciju aciklovira je postignut korišćenjem makrogol glicerol hidroksistearata kao surfaktanta pri najvišem ispitivanom K_m (9,0) i iznosio je: 24,6 mg/ml (u prisustvu 20% glicerola), 18,02 mg/ml (sa 30% makrogola 400) i 31,66 mg/ml (sa 30% glicerola).

- III. Razmatrani formulacioni parametri (vrsta i koncentracija surfaktanta, maseni odnos surfaktanta i kosurfaktanta (K_m) i vrsta i koncentracija korastvarača) imali su značajan uticaj na brzinu dispergovanja i formiranje ulje-u-vodi mikroemulzija po dispergovanju pseudoternernih sistema u vodenim medijumima različitih pH vrednosti (0,1 M HCl i fosfatni pufer pH 7,2). Na osnovu izmerene transmitance i dobijene raspodele veličine kapi prema intenzitetu rasute svetlosti u disperzijama, pseudoternerni sistemi koji sadrže PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceride ($Z\text{-ave} > 200$ nm, $PdI > 0,250$ $T\% < 20$) ili polisorbat

20 (veoma široka raspodela veličine kapi), pri svim Km vrednostima pokazali su ograničenu sposobnost za samo-mikroemulgovanje u ispitivanim vodenim medijumima i nisu ispunili kriterijume na osnovu kojih su mogli da budu klasifikovani kao SMEDDS ($Z\text{-ave} \leq 100$ nm, $PdI \leq 0,250$). Karakteristike SMEDDS su imali samo oni sistemi koji su u svom sastavu imali makrogol glicerol hidrosistearat kao surfaktant i koji su izrađeni sa 20% glicerola pri Km 9,0 (SMEDDS1), 20% makrogola 400 pri Km 9,0 (SMEDDS2) i 30% glicerola pri Km 2,33 (SMEDDS3). Određen je i kapacitet inkapsulacije aciklovira u ova tri sistema i iznosio je 24,06 mg/ml (SMEDDS1), 9,04 mg/ml (SMEDDS2) i 21,12 mg/ml (SMEDDS3), zbog čega je iz daljeg istraživanja isključen SMEDDS2.

- IV. Ispitan je uticaj izbora sastojaka SMEDDS1 i SMEDDS3 na permeabilnost i na brzinu oslobađanja rastvorene aktivne supstance difuzijom. Dva ispitivana SMEDDS su pokazala međusobno sličnu ali značajno veću permeabilnost u poređenju sa čistim aciklovirom u baznom medijumu (fosfatni pufer pH 7,2) *in vitro*. Ukupna količina oslobođene lekovite supstance iz ispitivanih SMEDDS iznosila je $47,30 \pm 2,64\%$ (SMEDDS1) i $35,79 \pm 2,46\%$ (SMEDDS3), što znači da je iz SMEDDS1 oslobođena značajno veća količina aciklovira, iako su početne koncentracije lekovite supstance u ova dva sistema bile veoma slične. Razlog za uočenu razliku je povezan sa razlikama u njihovom sastavu, odnosno, sadržaju korastvarača i hidrofilnog surfaktanta i sledstveno hidrofobnih interakcija između aciklovira i nosača. SMEDDS1 je korišćen za dalja ispitivanja.
- V. U nastavku istraživanja formulisani su polučvrsti SMEDDS iz tečnog SMEDDS1, uvođenjem makrogola 8000 kao sredstva za povećanje viskoziteta. Reološka karakterizacija polučvrstih SMEDDS pokazala je da je na njihov prividni viskozitet značajno uticala koncentracija makrogola 8000, kao sastojka za formiranje matriksa, i glicerola, kao hidrofilnog korastvarača, a optimalan prividni viskozitet i tiksotropija za čvrsto punjenje kapsule postignuti su u sistemu sastava trigliceridi srednje dužine lanaca (10%), makrogol glicerol hidrosistearat (56,25%), poligliceril-3-dioleat (6,25%), glicerol (20%), makrogol 8000 (7,5%).

- VI. Formulirani polučvrsti SMEDDS je omogućio formiranje nosača tipa mikroemulzija u kiselom i alkalnom vodenom medijumu (0,1 M HCl i fosfatni pufer pH 7,2) sa dovoljnim kapacitetom za solubilizaciju lekovite supstance. Karakterizacija spektroskopskim tehnikama pokazala je da su ispitivane disperzije bile termodinamički stabilni sistemi organizovani na nanoskali što su ključna svojstva sistema tipa mikroemulzija.
- VII. Uticaj sadržaja aciklovira (2% i 33,33%) na optičke i termalne karakteristike polučvrstih SMEDDS (SD2, odnosno, S-SD2) je ispitan primenom optičke mikroskopije i DSC analizom. Mikrografije oba sistema su pokazale prisustvo kristala aciklovira koji je bio suspendovan u homogenom polučvrstom vehukulumu, a pomoću dobijenih endotermnih profila potvrđena je pretpostavka da je formiranje polučvrstog sistema bilo zasnovano na stvaranju svojevrsnog polimernog matriksa u tečnom SMEDDS.
- VIII. Analiza *in vitro* kinetike difuzije aciklovira iz ispitivanih polučvrstih SMEDDS dokazala je da je mobilnost molekula lekovite supstance u polučvrstom matriksu SMEDDS bila relativno visoka i da je *in situ* formiran nosač tipa ulje-u-vodi mikroemulzije omogućio izbegavanje brzog rastvaranja lekovite supstance i rizika od precipitacije i time potencijalno obezbedio dostupnost lekovite supstance za apsorpciju.
- IX. Kompatibilnost uzoraka polučvrstih SMEDDS (SD2 i S-SD2) sa omotačem tvrdih kapsula od hipromeloze (HPMC) je ispitana primenom DSC tehnike i bila je zadovoljavajuća tokom mesec dana čuvanja pod ambijentalnim uslovima. Dobijeni rezultati pokazali su da curenje iz tvrdih kapsula nije očekivano na temperaturama koje su uobičajene za skladištenje i upotrebu farmaceutskih preparata. Hipromeloza nije uticala na endotermne procese uzoraka SD2 i S-SD2, što je ukazivalo na nizak rizik od interakcija omotača HPMC kapsula sa ispitanim polučvrstim SMEDDS.
- X. *In vitro* ispitivanje kinetike oslobađanja aciklovira iz uzoraka SD2 i S-SD2 u obliku tvrdih kapsula je izvršeno sa ciljem da se proceni uticaj SMEDDS nosača na profil oslobađanja aciklovira iz navedenog čvrstog farmaceutskog oblika, odnosno, da se razmotri eventualni uticaj samog omotača kapsule na ovaj biofarmaceutski aspekt.

Analiza dobijenih profila oslobađanja pokazala je da su ispitivani SMEDDS, odnosno, *in situ* formirani koloidni nosač, značajno uticali na brzinu rastvaranja inkorporiranog aciklovira i mehanizam ovog procesa u poređenju sa čistom (čvrstom) lekovitom supstancom koja se oslobađala iz tvrde HPMC kapsule i rastvarala u medijumu pod istim uslovima. Potvrđen je potencijal ispitivanih polučvrstih SMEDDS da obezbede efikasnu solubilizaciju aciklovira u slabo alkalnoj sredini (npr. kao što je u tankom crevu), uz minimalan rizik od smanjenja rastvorljivosti pod navedenim uslovima, te ga mogu učiniti dostupnijim za apsorpciju u poređenju sa konvencionalnim formulacijama sa čvrstom lekovitom supstancom.

- XI. Stabilnost ispitivanih polučvrstih SMEDDS u obliku tvrdih kapsula razmatrana je kod formulacije sa 2% aciklovira (SD2) tokom 3 meseca na 25 °C/60% RH, odnosno, 5±3 °C (u frižideru). Rezultati su pokazali da nije bilo značajnih promena u sadržaju lekovite supstance kod ispitivanih uzoraka. Takođe, rezultatima merenja veličine kapi (Z-ave) i indeksa polidisperziteta (PdI) nakon dispergovanja u vodenim medijumima u opsegu fizioloških pH, kao i na osnovu dobijenih profila oslobađanja lekovite supstance iz ispitivanih uzoraka, koja su ponovljena nakon 1, 2 i 3 meseca, potvrđeno je da su kod ispitivanog sistema u čvrstom farmaceutskom obliku pogodnom za peroralnu primenu, očuvana svojstva SMEDDS pod navedenim uslovima čuvanja.
- XII. Utvrđen je značajan uticaj polučvrstih SMEDDS na farmakokinetički profil aciklovira oralno primenjenih kod Wistar pacova sa 1,6 puta povećanom biološkom raspoloživošću u poređenju sa čistom supstancom (primenjenom kao suspenzija). Dobijene vrednosti za C_{\max} 0,92 ± 0,21 µg/ml, $AUC_{0-\infty}$ 55,23 ± 15,87 minµg/ml i AUC_{0-t} 54,97 ± 15,71 minµg/ml ukazale su na povećanu količinu apsorbovanog aciklovira u sistemsku cirkulaciju iz ispitivanog polučvrstog SMEDDS, najverovatnije zbog brzog procesa samo-mikroemulgovanja i oslobađanja lekovite supstance iz *in situ* formiranog nanonosača u intestinalnom lumenu pacova, koji su ranije postignuti pod uslovima *in vitro*. Takođe, upotreba polučvrstih SMEDDS dovela je do statistički značajnog smanjenja T_{\max} (14 ± 10,84 min). Dobijene vrednosti za Vd i Cl nisu bile statistički značajno različite od onih nakon *i.v.* primene, što je ukazalo na to da ispitivani polučvrsti

SMEDDS nije bitno uticao na distribuciju aciklovira. Dobijeni farmakokinetički parametri bili su povezani sa brzim odvijanjem procesa u GIT lumenu, uključujući dispergovanje polučvrstih SMEDDS, rastvaranje i oslobađanje lekovite supstance iz koloidnog nosača, kao i efekat povećanja permeabilnosti lekovite supstance kroz membrane GIT-a posredovanim nosačem tipa mikroemulzije i njegovih sastavnih komponenti.

- XIII. Praćeni su i osnovni biohemijski parametri koji su povezani sa funkcijom jetre i bubrega u serumu životinja koje su tretirane polučvrstim SMEDDS tokom 7 i 21 dan, i nije bilo promena koje bi ukazivale na oštećenje jetre i bubrega. Poređen je polučvrsti SMEDDS sa aciklovirom sa polučvrstim SMEDDS bez aciklovira i rastvorom aciklovira. Nije uočena indukcija promena serumskih transaminaza, odnosno aktivnosti dva enzimska markera oštećenja jetre (aspartat aminotransferaza (AST) i alanin aminotransferaza (ALT)) nisu bile značajno promenjene kod životinja tretiranih dugoročno (21 dan) i kratkoročno (7 dana) polučvrstim SMEDDS sa aciklovirom, u poređenju sa kontrolnom grupom, čime je dokazano da ova formulacija nije hepatotoksična. Dobijeni nivoi uree i kreatinina su bili niži od kontrolnih vrednosti, čime je pokazano da ponovljeni i kratkoročni unos polučvrstih SMEDDS sa aciklovirom nije značajno uticao ni na bubrežnu funkciju izlučivanja i mogao se smatrati neškodljivim.
- XIV. Celokupno razmatranje rezultata sprovedenih istraživanja jasno je ukazalo da su formulisani polučvrsti SMEDDS sa aciklovirom imali svojstva nove generacije biokompatibilnih nosača tipa lipidnih formulacija, čiji specifičan sastav obezbeđuje željene *in vitro* karakteristike u pogledu brzog formiranja nanonosača tipa ulje-u-vodi mikroemulzije u kontaktu sa vodenim medijumima različitih pH, zadovoljavajućeg kapaciteta za solubilizaciju aciklovira u koncentraciji koja je prikladna za *per os* primenu terapijske doze od 200 mg ove aktivne supstance u jednodoznom čvrstom farmaceutskom obliku (tvrda kapsula veličine 0) i sa demonstriranim potencijalom za poboljšanje oralne biološke raspoloživosti aciklovira *in vivo* na animalnom modelu.

6. LITERATURA

- Abozaid D, Ramadan A, Barakat H, Khalafallah N. Acyclovir lipid nanocapsules gel for oromucosal delivery: A preclinical evidence of efficacy in the chicken pouch membrane model. *Eur J Pharm Sci.* 2018;121:228-235.
- Akiyama H, Telfer BA, Rowland M. Transport of acyclovir across cell membranes: studies with rat erythrocyte and perfused liver. *Eur J Pharm Sci.* 1996;4:196-198.
- Alcorn J, McNamara PJ. Acyclovir, ganciclovir, and zidovudine transfer into rat milk. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:1831-1836.
- Al-Tabakha MM. HPMC Capsules: Current Status and Future Prospects. *J Pharm Pharm Sci.* 2010;13(3):428-442.
- Alsarra IA, Hamed AY, Alanazi FK. Acyclovir liposomes for intranasal systemic delivery: Development and pharmacokinetics evaluation. *Drug Deliv.* 2008;15:313-321.
- Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification - the correlation of in-vitro drug product dissolution and in-vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995;12:413-420.
- Anderson BD. Chemical and related factors controlling lipid solubility. *Bull Tech Gattefosse.* 1999;92:11-18.
- Anroop BN, Mahesh A, Bandar EA, Jyoti W, Sree H, Mueen A. Enhanced oral bioavailability of acyclovir by inclusion complex using hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Drug Deliv.* 2014;21(7):540-547.
- Armstrong NA, James KC. Drug release from lipid-based dosage forms. II. *Int J Pharm.* 1980;6:195-204.
- Armstrong NA, James KC, Pugh WK. Drug migration into soft gelatin capsule shells and its effect on in-vitro availability. *J Pharm Pharmacol.* 1984;36:361-365.
- Arnal J, Gonzalez Alvarez I, Bermejo M, Amidon GL, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB, Barends DM. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Aciclovir. *J Pharm Sci.* 2008;97(12):5061-5073.
- Attia IA, El-Gizawy SA, Fouda MAA, Donia AM. Influence of a niosomal formulation on the oral bioavailability of acyclovir in rabbits. *AAPS Pharm SciTech.* 2007;8:206-212.
- Attwood D, Florence AT. *Surfactant systems: their chemistry, pharmacy and biology.* London, United Kingdom: Chapman and Hall; 1983.
- Avdeef A, Artursson P, Neuhoff S, Lazorova L, Grasjo J, Tavelin S. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the double-sink PAMPA pKa (flux) method. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(4):333-349.
- Balakrishnan P, Lee BJ, Oh DH, Kim JO, Hong MJ, Jee JP, Kim JA, Yoo BK, Woo JS, Yong CS, Choi HG. Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72(3):539-545.
- Bates TR, Gibaldi M, Kanig JL. Solubilizing properties of bile salt solutions. II. Effect of inorganic electrolyte, lipids, and amixed bile salt system on solubilization of glutethimide, griseofulvin, and hexestrol. *J Pharm Sci.* 1966;55:901-906.

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.

Beig A, Fine-Shamir N, Lindley D, Miller JM, Dahan A. Advantageous solubility-permeability interplay when using amorphous solid dispersion (ASD) formulation for the BCS class IV P-gp substrate rifaximin: simultaneous increase of both the solubility and the permeability. *AAPS J.* 2017;19(3):806-813.

Beig A, Miller JM, Lindley D, Carr RA, Zocharski P, Agbaria R, Dahan A. Head-to-head comparison of different solubility-enabling formulations of etoposide and their consequent solubility-permeability interplay. *J Pharm Sci.* 2015;104:2941-2947.

Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). *J Clin Chem Clin Biochem.* 1986;24:481-495.

Bergstrom CA, Strafford M, Lazorova L, Avdeef A, Luthman K, Artursson P. Absorption classification of oral drugs based on molecular surface properties. *J Med Chem.* 2003;46:558-570.

Bermejo M, Avdeef A, Ruiz A, Nalda R, Ruell JA, Tsinman O, González I, Fernández C, Sánchez G, Garrigues TM, Merino V. PAMPA—a drug absorption in vitro model [7] comparing rat in situ Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *Eur J Pharm Sci.* 2004;21:429-441.

Biju SS, Talegaonkar S, Mishra PR, Khar RK. Vesicular systems: an overview. *Ind J Pharm Sci.* 2006;68:141-153.

Birnbaum GI, Cygler M, Shugar D. Conformational features of acyclonucleosides: structure of acyclovir, an antiherpes agent. *Can J Chem.* 1984;62(12):2646-2652.

Bloedow DC, Hayton WL. Effects of lipids on bioavailability of sulfisoxazole acetyl, dicumarol, and griseofulvin in rats. *J Pharm Sci.* 1976;65:328-334.

Blum MR, Liao SHT, Miranad PD. Overview of acyclovir pharmacokinetic disposition in adults and children. *Am J Med.* 1982;73:186-192.

Bork K, Kaiser T, Benes P. Transfer of aciclovir from plasma to human breast milk. *Arzneimittelforschung.* 2000;50:656-658.

British Pharmacopoeia 2015. London: Her Majesty's Stationery Office, 2015.

Buggins TR, Dickinson PA, Taylor G. The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. *Adv Drug Del Rev.* 2007;59:1482-1503.

Cao Y, Marra M, Anderson BD. Predictive relationships for the effects of triglyceride ester concentration and water uptake on solubility and partitioning of small molecules into lipid vehicles. *J Pharm Sci.* 2004;93:2768-2779.

- Carrigan PJ, Bates TR. Biopharmaceutics of drugs administered in lipid-containing dosage forms I: Gi absorption of griseofulvin from an oil-in-water emulsion in the rat. *J Pharm Sci.* 1973;62:1476-1479.
- Chauhan S, Luorence MJ. The preparation of polyoxyethylene containing non-ionic surfactant vesicles. *J Pharm Pharmacol.* 1989;41:361-368.
- Chen ML. Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: A regulatory perspective. *Adv Drug Del Rev.* 2008;60(6):768-777.
- Chetoni P, Rossi S, Burgalassi S, Monti D, Mariotti S, Saettone MF. Comparison of liposome encapsulated acyclovir with acyclovir ointment: Ocular pharmacokinetics in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2004;20:169-177.
- Cho W, Kim MS, Kim JS, Park J, Park HJ, Cha KH. Optimized formulation of solid selfmicroemulsifying sirolimus delivery systems. *Int J Nanomed.* 2013;8:1673-1682.
- Choc MG. Bioavailability and pharmacokinetics of cyclosporine formulations: Neoral[®] vs Sandimmune[®]. *Int J Dermatol.* 1997;36:1-6.
- 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 Del Rev.* 2008;60:747-756.
- Conacher M, Alexander J, Brewer JM. Oral immunisation with peptide and protein antigens by formulation in lipid vesicles incorporating bile salts (bilosomes). *Vaccine.* 2001;19:2965-2974.
- Constantinides PP. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm Res.* 1995;12:1561-1572.
- Cornelius CE. Liver function. In: Kaneko JJ, editor. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* San Diego: Academic Press; 1989. pp. 364-397.
- Cortesi R, Ajanji SC, Sivieri E, Manservigi M, Fundueanu G, Menegatti E, Esposito E. Eudragit microparticles as a possible tool for ophthalmic administration of acyclovir. *J Microencapsul.* 2007;24:445-456.
- Cortesi R, Ravani L, Menegatti E, Drechsler M, Esposito E. Colloidal Dispersions for the Delivery of Acyclovir: A Comparative Study. *Ind J Pharm Sci.* 2011;73(6):687-693.
- Cortesi R, Drechsler M, Esposito E. Acyclovir delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv.* 2008;5(11):1217-1230.
- Cuine JF, McEvoy CL, Charman WN, Pouton CW, Edwards GA, Benameur H, Porter CJ. Evaluation of the impact of surfactant digestion on the bioavailability of danazol after oral administration of lipidic self-emulsifying formulations to dogs. *J Pharm Sci.* 2008;97:993-1010.
- Dahan A, Miller JM. The solubility-permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs. *The AAPS Journal.* 2012;14(2):244-251.
- Dahan A, Wolk O, Kim YH, Ramachandran C, Crippen GM, Takagi T, Bermejo M, Amidon GL. Purely in silico BCS classification: science based quality standards for the world's drugs. *Mol Pharm.* 2013;10:4378-4390.

- De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol.* 2004;30(2):115-133.
- De Miranda P, Blum MR. Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration. *J Antimicrob Chemother.* 1983;12(Suppl B):29-37.
- Dedakia J, Majumdar SH. Formulation and evaluation of microemulsion based tablets of acyclovir for better patient compliance. *Int J Pharm Technol Res.* 2012;4(4):1730-1734.
- Deckelbaum RJ, Hamilton JA, Moser A, Bengtsson-Olivecrona G, Butbul E, Carpentier YA, Gutman A, Olivecrona T. Medium-chain vs long-chain triacylglycerol emulsion hydrolysis by lipoprotein lipase and hepatic lipase: implications for the mechanisms of lipase action. *Biochemistry.* 1990;29(5):1136-1142.
- Dhaliwal S, Jain S, Singh HP, Tiwary AK. Mucoadhesive Microspheres for Gastroretentive Delivery of Acyclovir: In Vitro and In Vivo Evaluation. *The AAPS Journal.* 2008;10:322-330.
- Dokania S, Joshi AK. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) – challenges and road ahead. *Drug Deliv.* 2015;22:675-690.
- Douglas JM, Davis LG, Remington ML, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of the effect of chronically administered acyclovir on sperm production in men with frequently recurring genital herpes. *J Infect Dis.* 1988;157:588-90.
- Durai RD. Drug delivery approaches of an antiviral drug: A comprehensive review. *Asian J Pharm.* 2015;9:1-12.
- Đekić Lj, Ćirković V, Heleta M, Krajišnik D, Primorac M. Water-dilutable biocompatible microemulsion systems: Design and characterization. *Tenside Surf Det.* 2013;50:409-413.
- Đekić Lj, Primorac M. Microemulsion systems – application in delivery of poorly soluble drugs. In: Fanun M, editor. *Colloids in Drug Delivery.* Boca Raton: Taylor & Francis Group, CRC Press; 2010. pp. 245-270.
- Đekić Lj, Primorac M. Microemulsions and nanoemulsions as carriers for delivery of NSAIDs. In: Čalija B, editor. *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs.* Philadelphia: Elsevier; 2017. pp. 69-94.
- Đekić Lj, Martinović M, Stepanović-Petrović R, Tomić M, Micov A, Primorac M. Design of block copolymer costabilized nonionic microemulsions and their in vitro and in vivo assessment as carriers for sustained regional delivery of ibuprofen via topical administration. *J Pharm Sci.* 2015;104:2501–2512. (a)
- Đekić Lj, Krajišnik D, Martinović M, Đorđević D, Primorac M. Characterization of gelation process and drug release profile of thermosensitive liquid lecithin/poloxamer 407 based gels as carriers for percutaneous delivery of ibuprofen. *Int J Pharm.* 2015;490:180–189. (b)
- Đjekić Lj, Primorac M. The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. *Int J Pharm.* 2008;352 (1-2):231-239.
- Đekić Lj, Ibrić S, Primorac M. Application of artificial neural networks (ANNS) in development of pharmaceutical microemulsions. In: Kwon SJ, editor. *Focus on Artificial Neural Networks.* New York: Nova Science Publishers Inc; 2011. pp. 1-28.

Dekić Lj. Formulaciona istraživanja nejonskih mikroemulzija kao potencijalnih nosača za lokalnu primenu nesteroidnih antiinflamatornih lekova. Doktorska disertacija. Univerzitetu u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Beograd, 2011.

Dekić Lj, Primorac M. Formulation and Characterisation of self-microemulsifying drug delivery systems based on biocompatible nonionic surfactants. *Chemical Industry*. 2014;68(5):565-73.

Dekić Lj. Liposomes: Properties and Therapeutic Applications. In: Keservani RK, Sharma AK, Kesharwani RK, editors. *Novel Approaches for Drug Delivery*. Hershey: IGI Global; 2017. pp. 27-51.

Dorđević Lj. Karakterizacija mikroemulzionih sistema sa makrogolgliceridima kao potencijalnih nosača lekovitih supstanci za lokalnu primenu. Magistraska teza. Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Beograd, 2004.

Elshafeeya AH, Kamelb AO, Awadb GAS. Ammonium methacrylate units polymer content and their effect on acyclovir colloidal nanoparticles properties and bioavailability in human volunteers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010; 75:398-404.

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.

European Pharmacopoeia 9th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2016.

Fahr A, Liu X. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2007;4(4):403-416.

Fatouros DG, Karpf DM, Nielsen FS, Mullertz A. Clinical studies with oral lipid based formulations of poorly soluble compounds. *Ther Clin Risk Manag*. 2007;3(4):591-604.

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 Del Rev*. 2016;101:167-194.

Frederick GH, Hardman JG, Limbird AE. Acyclovir drug profile. In: Hardman JG, Limbird LE, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th Edition. New York: Mc Graw Hill; 1995. pp. 1193-1198.

Gandhi S, Jana K, Sen K. In-vitro release of acyclovir loaded Eudragit RLPO[®] nanoparticles for sustained drug delivery. *Int J Biol Macromolec*. 2014;67:478-482.

Ganem-Quintanar A, Kalia YN, Falson-Rieg F, Buri P. Mechanisms of oral permeation enhancement. *Int J Pharm*. 1997;156:127-142.

Gao ZG, Choi HG, Shin HJ, Park KM, Lim SJ, Hwang KJ, Kim CK. Physicochemical characterization and evaluation of a micro emulsion system for oral delivery of cyclosporine A. *Int J Pharm*. 1998;161:75-86.

Genta I, Conti B, Perugini P, Pavanetto F, Spadaro A, Puglisi G. Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir. *J Pharm Pharmacol*. 1997;49:737-742.

Gershanik T, Benita S. Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm*. 2000;50:179-188.

- 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(3):172-177.
- Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang L. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9:215-236.
- Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 2005;172(3):367-379.
- Giannavola C, Bucolo C, Maltese A, Paolino D, Vandelli AM, Puglisi G, Lee HL, Fresta M. Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-d,l-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharm Res*. 2003; 20:584-590.
- Gibson L. Lipid-based excipients for oral drug delivery. In: Hauss DJ, editor. *Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly water soluble drugs*. New York: Informa Healthcare, Inc; 2007. pp. 33–61.
- Glisoni RJ, Chiappetta DA, Moglioni AG, Sosnik A. Novel 1-indanone thiosemicarbazone antiviral candidates: aqueous solubilization and physical stabilization by means of cyclodextrins. *Pharm Res*. 2012;29:739-755.
- Goddeeris C, Cuppo F, Reynaers H, Bouwman WG, Van den Mooter G. Light scattering measurements on microemulsions: estimation of droplet sizes. *Int J Pharm*. 2006;312:187-195.
- Goole J, Lindley DJ, Roth W, Carl SM, Amighi K, Kauffmann JM, Knipp GT. The effects of excipients on transporter mediated absorption. *Int J Pharm*. 2010;393:17-31.
- Gregoriadis G. *Liposome technology*. 3rd edition. volume 1. Florida: CRC Press; 2007.
- Griffin WC. Classification of Surface Active Agents by HLB. *J Soc Cosmet Chem*. 1949;1:311-326.
- Gunawardana M, Remedios-Chan M, Miller CS, Fanter R, Yang F, Marzinke MA, Hendrix CW, Beliveau M, Moss JA, Smith TJ, Baum MM. Pharmacokinetics of Long-acting Tenofovir Alafenamide (GS-7340) Subdermal Implant for HIV Prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(7):3913-3919.
- Gupta MK, Goldman D, Bogner RH, Tseng YC. Enhanced drug dissolution and bulk properties of solid dispersions granulated with a surface adsorbent. *Pharm Dev Technol*. 2001;6(4):563-572.
- Hansch C, Leo A, Hoekman D. *Exploring QSAR—Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*. Washington, DC: American Chemical Society; 1995. p. 7.
- Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2002;6:319-327.
- Hassan TH, Metz H, Mäder K. Novel semisolid SNEDDS based on PEG-30-dipolyhydroxystearate: Development and characterization. *Int J Pharm*. 2014;477:506-518.

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.

Hauss DJ. Oral lipid-based formulations. *Adv Drug Del Rev.* 2007;59 (7):667-676.

Hauss DJ, Fogal SE, Ficorilli JV, Price CA, Roy T, Jayaraj AA, Keirns JJ. Lipid-based delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a poorly water-soluble LTB₄ inhibitor. *J Pharm Sci.* 1998;87:164-169.

Hintzen F, Laffleur F, Sarti F, Müller C, Bernkop-Schnürch A. In vitro and ex vivo evaluation of an intestinal permeation enhancing self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS). *J Drug Del Sci Tech.* 2013;23:261-267.

Hintzen F, Perera G, Hauptstein S, Müller C, Laffleur F, Bernkop-Schnürch A. In vivo evaluation of an oral self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for leuprorelin. *Int J Pharm.* 2014;472:20-26.

Hiuberts PDT, Shah DO. Evidence for synergism of nonionic surfactant mixtures: enhancement of solubilization in water-in-oil microemulsions. *Langmuir.* 1997;13:5762-5765.

Holm R, Porter CJH, Müllertz A, Kristensen HG, Charman WN. Structured triglyceride vehicles for oral delivery of halofantrine: examination of intestinal lymphatic transport and bioavailability in conscious rats. *Pharm Res.* 2002; 9:1354-1361.

Honkanen O, Pia L, Janne M, Sari M, Raimo T, Martti M. Bioavailability and in vitro oesophageal sticking tendency of hydroxypropyl methylcellulose capsule formulations and corresponding gelatine capsule formulations. *Eur J Pharm Sci.* 2002;15:479-488.

Horwitz E, Pisanty S, Czerninski R, Helser M, Eliav E, Touitou E. A clinical evaluation of a novel liposomal carrier for acyclovir in the topical treatment of recurrent herpes labialis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 88:700-705.

Hosny KM, Alahdal AM. Utilization of Solid Dispersion Technique to Improve Solubility and Flowability of Acyclovir. *Life Sci J.* 2013;10(4):40-44.

Hosny KM, Ahmed OA, Al-Abdali RT. Enteric-coated alendronate sodium nanoliposomes: a novel formula to overcome barriers for the treatment of osteoporosis. *Exp Opin Drug Deliv.* 2013;10:741-746.

Huff JC, Kreuger GC, Overall JC, Copeland J, Spruance SL. The histopathologic evolution of recurrent herpes simplex labialis. *J Am Acad Dermatol.* 1981;5:550-557.

Ingle LM. New Approaches for Development and Characterization of SMEDDS. *Int J Pharm Pharm Sci Res.* 2013;3(1):7-14.

Jain SK, Jain RK, Chourasia MK, Jain AK, Chalasani KB, Soni V, Jain A. Design and development of multivesicular liposomal depot delivery system for controlled systemic delivery of acyclovir sodium. *AAPS Pharm SciTech.* 2005;6:35-41.

Jain SK, Gupta Y, Jain A, Rai K. Enhanced transdermal delivery of acyclovir sodium via elastic liposomes. *Drug Deliv.* 2008;15:141-147.

Jannin V, Musakhanian J, Marchaud D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Adv Drug Del Rev.* 2008;60:734-746.

Jensen SM, Christensen CJ, Petersen JM, Treusch AH, Brandl M. Liposomes containing lipids from *Sulfolobus islandicus* withstand intestinal bile salts: an approach for oral drug delivery? *Int J Pharm.* 2015;493:63-69.

Jones BE, Basit AW, Tuleu C. The disintegration behaviour of capsules in fed subjects: a comparison of hypromellose (carrageenan) capsules and standard gelatin capsules. *Int J Pharm.* 2012;424:40-43.

Kajiwara E, Kawano K, Hattori Y, Fukushima M, Hayashi K, Maitani Y. Long-circulating liposome-encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy. *J Control Release.* 2007;120:104-110.

Kalepu S, Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5:442-453.

Kalepu S, Manthina M, Padavala V. Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. *Acta Pharm Sin.* 2013;3(6):361-372.

Kandasamy S, Moniruzzaman M, Sivapragasam M, Shamsuddin MR, Abdul Mutalib MI. Formulation and characterization of acetate based ionic liquid in oil microemulsion as a carrier for acyclovir and methotrexate. *Separation and Purification Technology.* 2018;196:149-156.

Kaneko JJ. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* New York: Academic Press; 1980.

Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem.* 1998;41(7):1007-1010.

Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernas H. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm.* 2004;1:85-96.

Katneni K, Charman SA, Porter CJ. Impact of cremophor-EL and polysorbate-80 on digoxin permeability across rat jejunum: delineation of thermodynamic and transporter related events using the reciprocal permeability approach. *J Pharm Sci.* 2007;96(2):280-293.

Kesisoglou F, Panmai S, Wu Y. Nanosizing - oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Adv Drug Del Rev.* 2007;59:631-644.

Kikuchi H, Yamauchi H, Hirota S. A polyol dilution method for mass production of liposomes. *J Liposome Res.* 1994;4:71-91.

Kim T, Murdane S, Gruber A, Kim S. Sustained-release morphine for epidural analgesia in rats. *Anesthesiology.* 1996;85:331-338.

Kollipara S, Gandhi RK. Pharmacokinetic aspects and in vitro–in vivo correlation potential for lipid-based formulations. *Acta Pharm Sin B.* 2014;4:333-349.

Kraml M, Dubuc J, Beall D, L'Heureux N. Gastrointestinal absorption of griseofulvin I: effect of particle size, addition of surfactants, and corn oil on the level of griseofulvin in the serum of rats. *Can J Biochem Physiol.* 1962;40:1449-1451.

- Kristl A, Srcic S, Vrečer F, Sustar B, Vojnovic D. Polymorphism and pseudopolymorphism: Influencing the dissolution properties of the guanine derivative aciclovir. *Int J Pharm.* 1996;139:231-235.
- Krstić M, Ražić S, Đekić, Lj, Dobričić V, Momčilović M, Vasiljević D, Ibrić S. Application of a mixture experimental design in the optimization of the formulation of solid self-emulsifying drug delivery systems containing carbamazepine. *Lat Am J Pharm.* 2015;34(5):885-894.
- Kubik T, Bogunia-Kubik K, Sugisaka M. Nanotechnology on duty in medical applications. *Curr Pharm Biotechnol.* 2005;6:17-33.
- Kuentz M. Lipid-based formulations for oral delivery of lipophilic drugs. *Drug Discov Today Technol.* 2012;9:97-104.
- Kumar R, Sinha VR. Thiomers: a potential carrier for therapeutic delivery. *React Funct Polym.* 2013; 73:1156-1166.
- 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(1):83-94.
- Kuminek G, Cao F, Bahia de Oliveira da Rocha A, Rodríguez-Hornedo N. Cocrystals to facilitate delivery of poorly soluble compounds beyond-rule-of-5. *Adv Drug Del Rev.* 2016;101:143-166.
- Kyatanwar AU, Jadhav KR, Kadam VJ. Self micro-emulsifying drug delivery system (SMEDDS): Review. *J Pharm Res.* 2010;3(1):75-83.
- Langston MV, Rampresad MP, Karali TT, Galluppi GR, Katre NV. Modulation of the sustained delivery of myelopoietin (Leridistim) encapsulated in multivesicular liposomes (DepoFoam). *J Control Release.* 2003;89:87-99.
- Law SL, Huang KJ, Chiang CH. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. Corneal penetration and absorption. *J Control Rel.* 2000; 63:135-140.
- 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(3):563-570.
- Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Del Rev.* 2000;45:89-121.
- Lein A, Ng SW. Oral liquids. In: Bouwman Y, Fenton-May V, Le Brun P, editors. *Practical Pharmaceutics. An International Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products.* Switzerland: KNMP and Springer International Publishing; 2015. pp. 77-98.
- Lennernäs H, Abrahamsson B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *J Pharm Pharmacol.* 2005;57: 273-285.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Del Rev.* 2001;46:3-26.

- Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z. Polysaccharide-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv Drug Del Rev.* 2008; 60:1650-1662.
- Liu Y, Luo X, Xu X, Gao N, Liu X. Preparation, characterization and in vivo pharmacokinetic study of PVP-modified oleanolic acid liposomes. *Int J Pharm.* 2017;517:1-7.
- Loftsson T, Brewster ME, Másson M. Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. *Am J Drug Deliv.* 2004;2:261-275.
- 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.
- Lutker KM, Quinones R, Xu J, Ramamoorthy A, Matzder AJ. Polymorphs and hydrates of acyclovir. *J Pharm Sci.* 2011;100:949-963.
- Ma TY, Hollander D, Krugliak P, Katz K. PEG 400: a hydrophilic molecular probe for measuring intestinal permeability. *Gastroenterology.* 1990;98:39-46.
- Madgulkar A, Bhalekar MR, Dikpati AA. Improving oral bioavailability of acyclovir using nanoparticulates of thiolated xyloglucan. *Int J Biol Macromol.* 2016;89:689-699.
- Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol.* 2002;42:620-643.
- Meadows KC, Dressman JB. Mechanism of acyclovir uptake in rat jejunum. *Pharm Res.* 1990;7(3):299-303.
- Miller JM, Beig A, Carr RA, Webster GK, Dahan A. The solubility-permeability interplay when using cosolvents for solubilization: revising the way we use solubility-enabling formulations. *Mol Pharm.* 2012;9:581-590.
- Mondal D. Acyclovir. Reference Module in Biomedical Sciences. 2016,1-4.
- Moore JW, Flanner HH. Mathematical comparison of curves with an emphasis on dissolution profiles. *Pharm Technol.* 1996;20:64-74.
- Morozowich W, Gao P. Improving the Oral Absorption of Poorly Soluble Drugs Using SEDDS and S-SEDDS Formulations. In: Qiu Y, Chen Y, Zhang GGZ, Liu L, Porter W, editors. *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory & Practice.* Cambridge: Academic Press; 2009. pp. 443-468.
- Mrsny RJ. Oral drug delivery research in Europe. *J Control Release.* 2012;161:247-253.
- Mu H, Holm R, Müllertz A. Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm.* 2013;453:215-224.
- Muchow M, Maincent P, Muller RH. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* 2008;34:1394-1405.
- Mukherjee B, Patra B, Layek B, Mukherjee A. Sustained release of acyclovir from nano-liposomes and nano-niosomes: an in vitro study. *Int J Nanomed.* 2007;2(2):213-225.
- Mumper RJ, Hoffman AS. The stabilization and release of hirudin from liposomes or lipid-assemblies coated with hydrophobically modified dextran. *AAPS Pharm SciTech.* 2000; 1-3.

Myers RA, Stella VJ. Systemic bioavailability of penclomedine (NSC-338720) from oil-in-water emulsions administered intraduodenally to rats. *Int J Pharm.* 1992;78:217-226.

Nacionalni registar lekova 2018. Beograd: Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, 2018.

Nagata S. Advantages to HPMC capsules: A new generation's hard capsule. *Drug Deliv Technol.* 2002;2:34-39.

Newton M, Petersson J, Podczek F, Clarke A, Booth S. The influence of formulation variables on the properties of pellets containing a self-emulsifying mixture. *J Pharm Sci.* 2001;90:987-995.

Niu M, Lu Y, Hovgaard L, Guan P, Tan Y, Lian R, Jianping Qi, Wei Wu. Hypoglycemic activity and oral bioavailability of insulin-loaded liposomes containing bile salts in rats: the effect of cholate type, particle size and administered dose. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;81:265-272.

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.

O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Kittner SJ, Bond MG, Wolfson SK, Bommer W, Price TR, Gardin JM, Savage PJ. Distribution and correlates of sonographically detected carotid artery disease in the Cardiovascular Health Study. The CHS Collaborative Research Group. *Stroke.* 1992;23(12):1752-1760.

Overhoff KA, McConville JT, Yang W, Johnston KP, Peters JI, 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(1):167-175.

Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology.* 2008;245(3):194-205.

Palin KJ, Wilson CG, Davis SS, Phillips AJ. The effect of oils on the lymphatic absorption of DDT. *J Pharm Pharmacol.* 1982;34:707-710.

Palin KJ, Wilson CG. The effect of different oils on the absorption of probucol in the rat. *J Pharm Pharmacol.* 1984;36:641-643.

Mehta P. Acyclovir. *Antimicrobials in Clinical Practise (Pediatric Infectious Disease).* 2013;178-180.

Parthasarathi G, Udupa N, Umadevi P, Pillai G. Niosome encapsulated of vincristine sulfate improved anticancer activity with reduced toxicity in mice. *J Drug Target.* 1994;2:173-182.

Patel D, Sawant KK. Oral bioavailability enhancement of acyclovir by self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS). *Drug Dev Ind Pharm.* 2007;33(12):1318-1326.

Patel J, Hayes B, Bauler L, Mastenbrook J. Neurologic Acyclovir Toxicity in the Absence of Kidney Injury. *The Journal of Emergency Medicine, In press, corrected proof*, Available online 4 June 2019 (<https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2019.03.050>).

- 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.
- Pavelić Z, Skalko-Basnet N, Schubert R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. *Int J Pharm* 2001; 219:139-149.
- Peira D, Chirio ME, Carlotti R, Spagnolo M. Formulation studies of microemulsions for topical applications of acyclovir. *J Drug Del Sci Technol.* 2009;19(3):191-196.
- Porter CJH, Pouton CW, Cuine JF, Charman WN. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Adv Drug Del Rev.* 2008;60 (6):673-691.
- Porter CJH., Trevaskis NJ, Charman WN. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:231-248.
- Pott Junior H, Bocchi de Oliveira MF, Gambero S, Amazonas RB. Randomized clinical trial of famciclovir or acyclovir for the treatment of herpes zoster in adults. *International Journal of Infectious Diseases.* 2018;72:11-15.
- 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.
- Pouton CW, Porter CJH. Materials, methods and strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:625-637.
- Pouton CW. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci.* 2000;2:93-98.
- Pouton CW. Self-emulsifying drug delivery systems: assessment of the efficiency of emulsification. *Int J Pharm.* 1985;27:335-348.
- Pradeep S, Manthena VSV, Harmander PSC, Ramesh P. Absorption enhancement, mechanistic and. toxicity studies of medium chain fatty acids, cyclodextrins and bile salts as peroral absorption enhancers. *Farmaco.* 2005;60:884-893.
- Prajapati BG, Patel MM. Conventional and alternative pharmaceutical methods to improve oral bioavailability of lipophilic drugs. *Asian J Pharm.* 2007;1:1-8.
- Prasad D, Chauhan H, Atef E. Studying the effect of lipid chain length on the precipitation of a poorly water soluble drug from self-emulsifying drug delivery system on dispersion into aqueous medium. *J Pharm Pharmacol.* 2013;65(8):1134-1144.
- Ramadan E, Borg Th Abdelghani GM, Saleh NM. Formulation and evaluation of acyclovir microemulsions. *Bull Pharm Sci., Assiut University* 2013;36 (1):31-47.
- Ran Y, Yalkowsky SH. Halothane, a novel solvent for the preparation of liposomes containing 2-40-amino-30-methylphenyl benzothiazole (AMPB), an anticancer drug: a technical note. *AAPS Pharm SciTech.* 2003;4-20.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Pharmacology, fifth edition.* Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003.

Rao VM, Stella VJ. When can cyclodextrins be considered for solubilization purposes? *J Pharm Sci.* 2003;92:927-932.

Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Čebović T, Vukmirović S, Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC complementary and alternative medicine.* 2014;14(1):225-234.

Rašković A, Pavlović N, Kvrđić M, Sudji J, Mitić G, Čapo I, et al. Effects of pharmaceutical formulations containing thyme on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *BMC complementary and alternative medicine.* 2015;15(1):442-453.

Ravi V, Mahendra C, Datta V, Gowda DV, Shivakumar HG, Bhargav E. Thiomers fresh drift of polymers & their prospective in pharmaceuticals: a review. *World J Pharm Pharm Sci.* 2013;3:204-220.

Reymond JP, Sucker H. In vitro model for Ciclosporin intestinal absorption in lipid vehicles. *Pharm Res.* 1988;5:673-676.

Ritschel WA. The LADMER system: liberation, absorption, distribution, metabolism, elimination and response. In: Ritschel WA, editor. *Handbook of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications.* Hamilton: Drug Intelligence, Hamilton; 1992. pp. 19-24.

Rohani S, Sarkar A. Cocrystals of Acyclovir with Promising Physicochemical Properties. *J Pharm Sci.* 2015;104(1):98-105.

Rokhade AP, Patil SA, Aminabhavi TM. Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. *Carbohydr Polym.* 2007;67:605-613.

Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition,* Pharmaceutical Press, London, and American Pharmaceutical Association, Washington, D.C.; 2009. p. 517-522.

Roy S, Pal K, Anis A, Pramanik K, Prabhakar B. Polymers in mucoadhesivedrug delivery system: a brief note. *Des Monomers Polym.* 2009;12:483-495.

Sagitani H, Friberg S. Microemulsion systems with a non-ionic cosurfactant. *J Disper Sci Technol.* 1980;1:151-164.

Sahin NO. Niosomes as nanocarrier systems. In: Mozafari MR, editor. *Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications.* The Netherlands: Springer, Dordrecht; 2007. pp. 67-82.

Salama NN, Scott KR, Eddington ND. DM27, an enaminone, modifies the in vitro transport of antiviral therapeutic agents. *Biopharm Drug Dispos.* 2004;25:227-236.

Satish P, Navanath VK, Duttagupta S. Design and evaluation of self-micro emulsifying drug delivery systems of acyclovir. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014;6(4):677-681.

Seljak KB, Berginc K, Trontelj J, Zvonar A, Kristl A, Gasperlin M. A selfmicroemulsifying drug delivery system to overcome intestinal resveratrol toxicity and presystemic metabolism. *J Pharm Sci.* 2014;103(11):3491-3500.

Serajuddin AT. Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Del Rev.* 2007;59:603-616.

Shah NH, Carvajal MT, Patel CI, Infeld NH, Malick AW. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. *Int J Pharm.* 1994;106:15-23.

Shah I. Development and characterization of oil-in-water nanoemulsions from self-microemulsifying mixtures. Dissertation. The University of Toledo Digital Repository, 2011.

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 (2):559-565.

Shobhit K, Satish KG, Pramod KS. Self-emulsifying drug delivery systems for oral delivery of lipid based formulations - a review. *Afr. J. Basic Appl. Sci.* 2012;4(1):7-11.

Singh D, Ranga S. A review on self emulsifying drug delivery system: promising approach to enhance bioavailability. *J Drug Discov Ther.* 2014;2:1-12.

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.

Song L. Studies of solubilization of poorly water-soluble drugs during in vitro lipolysis of a model lipid-based drug delivery system and in mixed micelles. Doctoral dissertation, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, UK, 2011.

Spasić S, Jelić Ivanović Z, Spasojević Kalimanovska V. Opšta biohemija. Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd; 2018.

Sprunk A, Strachan SJ, Graf A. Rational formulation development and in vitro assessment of SMEDDS for oral delivery of poorly water soluble drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2012;46:508-515.

Stahlmann R, Klug S, Lewandowski C, Chahoud I, Bochert G, Merker HJ, Neubert D. Teratogenicity of acyclovir in rats. *Infection.* 1987;15:261-262.

Stella V. Chemical drug stability in lipids, modified lipids, and polyethylene oxide containing formulations. *Pharm Res.* 2013;30:3018-3028.

Strickley RG. Currently marketed oral lipid-based dosage forms: drugs products and excipients. In: Hauss DJ, editor. *Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly water soluble drugs.* New York: Informa Healthcare, Inc; 2007. pp. 1-31.

Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations, *Pharm Res.* 2004;21:201-230.

Sugano K, Kansy M, Artursson P, Avdeef A, Bendels S, Di L, Ecker GF, Faller B, Fischer H, Gerebtzoff G, Lennernaes H, Senner F. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:597-614.

Susantakumar P, Gaur A, Sharma P. Feasibility biowaiver extension of immediate release oral acyclovir 800 mg tablet formulations: a BSC class III drug. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011;3(4):384-391.

Svenson SE, Delorenzo WF, Engelberg R, Spooner M, Randall LO. Absorption and chemotherapeutic activity of acetyl sulfisoxazole suspended in an oil in water emulsion. *Antibiotic Med Clin Ther.* 1956;2:148-152.

- Tang B, Cheng G, Gu Jian-C, Xu, Cai-H. Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Discov Today* 2008;13:13-14.
- Tang WH, Chen WC, Diako C, Ross CF, Li SD. Development of a rapidly dissolvable oral pediatric formulation for mefloquine using liposomes. *Mol Pharm*. 2017;14:1969-1979.
- Tao Y, Lu Y, Sun Y, Gu B, Lu W, Pan J. Development of mucoadhesive microspheres of Acyclovir with enhanced bioavailability. *Int J Pharm*. 2009;378:30-36.
- Taylor LS, Zhang GGZ. Physical chemistry of supersaturated solutions and implications for oral absorption. *Adv Drug Del Rev*. 2016;101(1):122-142.
- Thirawong N, Thongborisute J, Takeuchi H, Sriamornsak P. Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin–liposome nanocomplexes. *J Control Release*. 2008;125:236-245.
- Thomsen AE, Christensen MS, Bagger MA, Steffansen B. Acyclovir prodrug for the intestinal di/tri-peptide transporter PEPT1: comparison of in vivo bioavailability in rats and transport in Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci*. 2004;23:319-325.
- Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:145-160.
- Touitou E. Drug delivery across the skin. *Expert Opin Biol Ther*. 2002;2:723-733.
- The United States Pharmacopeia 40, The National Formulary 35. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2017.
- Velmurugan S, Senthil SP. Formulation and characterization of acyclovir loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Chem Pharm Sci*. 2011;2(3):26-31.
- Vergin H, Kikuta C, Mascher H, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of different formulations of acyclovir. *Arzneimittelforschung*. 1995;45:508-515.
- Viaishya R, Aroras SB, Mallika V. Modification of Jaffe's kinetic method decreases bilirubin interference. *Ind J Clin Biochem*. 2010;25:64-66.
- Wagner D, Spahn-Langguth H, Hanafy A, Koggel A, Langguth P. Intestinal drug efflux: formulation and food effects. *Adv Drug Del Rev*. 2001;50(1):13-31.
- Wang Y, Sun J, Zhang T, Liu H, He F, He Z. Enhanced oral bioavailability of tacrolimus in rats by self-microemulsifying drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*. 2011;37(10):1225-1230.
- Wennerstrom H, Balogh J, Olsson U. Interfacial tensions in microemulsions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*. 2006;291:69-77.
- Westesen K, Siekmann B. Biodegradable colloidal drug carrier systems based on solid lipids. In: Benita S, editor. *Microencapsulation-Methods and Industrial Applications*, Second Edition. New York: Marcel Dekker; 2005. pp. 213-258.
- 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.

Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, Shanker RM, Charman WN, Pouton CW, Porter CJH. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol Rev.* 2013;65:315-499.

Wolk O, Agbaria R, Dahan A. Provisional in-silico biopharmaceutics classification (BCS) to guide oral drug product development. *Drug Des Dev Ther.* 2014;8:1563-1575.

Wu W, Lu Y, Qi J. Oral delivery of liposomes. *Ther Deliv.* 2015;6:1239-1241.

Yalkowsky SH. *Solubility and Solubilization in Aqueous Media.* Oxford University Press: New York; 1999.

Yamahira Y, Noguchi T, Takenaka H, Maeda T. Bippharmaceutical studies of lipid containing oral dosage forms: relationship between drug absorpoin and gastric emptying of lipid formulations. *J Pharmacobiodyn.* 1978;1:160-167.

Yee S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man-fact or myth. *Pharm Res.* 1997;14:763-766.

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.

Zhang W, Li Y, Zou P, Wu M, Zhang Z, Zhang T. The effects of pharmaceutical excipients on gastrointestinal tract metabolic enzymes and transporters-an update. *AAPS J.* 2016;18:830-843.

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.

Ziller KH. Control of crystal growth in drug suspensions. *Drug Dev Ind Pharm.* 1988;14:2341-2370.

BIOGRAFIJA

Jovana Janković je rođena 14.04.1987. godine u Novom Sadu. Osnovnu školu “Svetozar Marković Toza” u Novom Sadu završila je školske 2001/2002. godine, a zatim i Gimnaziju “Isidora Sekulić” u Novom Sadu tokom školske 2005/2006. godine. Dobitnik je nagrade “Vuk Stefanović Karadžić” za postignut uspeh u osnovnoj i srednjoj školi. Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu – Integrisane akademske studije farmacije (Farmacija – Magistar farmacije) upisala je školske 2006/2007. godine i diplomirala 07.07.2011. godine sa opštim uspehom 9,35 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Tokom studija bila je koautor dva studentska naučno-istraživačka rada. U toku studija dodeljena joj je stipendija Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka. Pripravnički staž obavila je u Zdravstvenoj ustanovi „Apoteka Janković“ i položila stručni ispit za magistra farmacije 26.07.2012. godine.

Od 01.09.2011. godine zaposlena je u Zdravstvenoj ustanovi “Apoteka Janković” u Novom Sadu. Doktorske akademske studije iz farmaceutske tehnologije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2011/2012. godine. Komentor je jednog naučno-istraživačkog rada studenata pod naslovom “Dizajn i karakterizacija samo-mikroemulgujućih sistema sa aciklovirom” (Autori: Bjelić I., Bogavac A., Ćirić A. Mentori: Doc. dr Ljiljana Đekić, mag. farm. Jovana Janković), koji je prezentovan na Osmom studentskom mini kongresu, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, Beograd, 6-8. april 2015. godine.

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
Др Зорана Ђинђића 1
21000 Нови Сад
Република Србија



UNIVERSITY OF NOVI SAD
Dr. Zorana Đinđića 1
21000 Novi Sad
Republic of Serbia

Телефон / Phone: +381 21 485 2000, 485 2020 | Факс / Fax: +381 21 450 418 | Е-mail: rektorat@uns.ac.rs | <http://www.uns.ac.rs>

Број: 01-73/16-5

Дана: 26.04.2016. године

Број документа ЕК: I-2016-03

МИШЉЕЊЕ

Овим се потврђује да Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Универзитета у Новом Саду даје сагласност за све експерименталне протоколе на огледним животињама укључене у извођење експерименталног дела рада **Јоване Јанковић**, магистра фармације, у оквиру израде докторске дисертације под називом **„In vivo испитивање биолошке расположивости, акутне и хроничне токсичности ацикловира који је нипансулиран у носач типа самомикроемулгујућег система након оралне употребе.**

Сви експерименти ће бити изведени и руковођени у сагласности са европском легислативом која покрива заштиту животиња у истраживањима, посебно Директивом 2010/63/ЕУ од 22. 09. 2010. год. о заштити животиња које се користе у научне сврхе, као и Законом о добробити животиња Републике Србије од 10.06.2009.год. Из образложења програма истраживања може да се закључи да ће принципи ЗР у раду бити примењени.

Лица која спроводе оглед су компетентни и искусни истраживачи који су обучени за рад са огледним животињама.



ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКЕ КОМИСИЈЕ ЗЗДОЖ УНС

Дец. др Зденко Каначки,

Пољопривредни факултет Универзитета у Новом Саду

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јована Јанковић

Број индекса 28/11

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Формулација и карактеризација получврстих само-микроемулгујућих система као потенцијалних носача нове генерације за пероралну примену ацикловира

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

Потпис аутора

У Београду, 22.10.2019.

Јована Јанковић

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Јована Јанковић
Број индекса 28/11
Студијски програм докторске академске студије из фармацеутске технологије
Формулација и карактеризација получврстих само-микроемулгујућих система као
Наслов рада потенцијалних носача нове генерације за пероралну примену ацикловира
Ментор Др сц. Љиљана Ђекић, ванредни професор

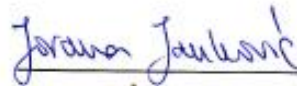
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 22.10.2019.



Изјава о коришћењу

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

Формулација и карактеризација получврстих само-микроемулгујућих система као потенцијалних носача нове генерације за пероралну примену ацикловира која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 22.10.2019.

