

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Zora V. Četković

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

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Zora V. Četković

**FORMULATION AND *IN VITRO/IN SILICO*
CHARACTERIZATION OF LIPID-BASED DRUG
DELIVERY SYSTEMS WITH SIMVASTATIN AS
MODEL SUBSTANCE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Mentori

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

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

Komisija

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

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

Datum odbrane _____

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju
Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.*

*Želim da se zahvalim mentorima dr sc. Dragani Vasiljević i dr sc. Sandri Cvijić na podršci,
razumevanju i savetima koji su nesumnjivo doprineli kvalitetu objavljenih publikacija i same
doktorske disertacije, na njihovoj nesebičnoj pomoći, ohrabrenjima i savetima koje su mi pružile u
svim fazama izrade doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se i svim kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju na
kolegijalnoj podršci i razumevanju, kao i za pomoć u svim fazama eksperimentalnog rada.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici koji su mi bili osnovna inspiracija i motivacija za
izradu ove doktorske disertacije.*

Hvala mojim prijateljima koji su uvek tu za mene, koji me razumeju i podržavaju.

SAŽETAK

Više od 50% lekovitih supstanci koje se danas koriste u terapiji, kao i oko 90% novosintetisanih imaju nisku rastvorljivost u vodi/gastrointestinalnim (GI) tečnostima, koja je ograničavajući faktor za apsorpciju, a samim tim i biološku raspoloživost lekovite supstance. Jedan od pristupa za prevazilaženje ovog problema je izrada lipidnih formulacija, u koje spadaju i samomikroemulgujući sistemi (SMEDDS). Simvastatin je lekovita supstanca iz grupe statina, koja se koristi za snižavanje koncentracije holesterola u krvi, poseduje i vaskuloprotektivna svojstva, a najnovija istraživanja pokazuju i da ispoljava određenu efikasnost u lečenju tumora dojke, kolona i prostate. Zbog niske biološke raspoloživosti simvastatina nakon peroralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem, jedinog farmaceutskog oblika sa simvastatinom na tržištu, sve je veća potreba za razvojem savremenih nosača koji bi omogućili veću biološku raspoloživost ove lekovite supstance. Stoga, sveobuhvatni cilj ove doktorske disertacije je bio razvoj novih lipidnih formulacija sa aspekta potencijalne primene kao nosača nove generacije za peroralnu primenu simvastatina i njihova fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija.

U prvoj fazi istraživanja formulisani su tečni SMEDDS, kao potencijalni nosači za peroralnu primenu simvastatina, koji omogućavaju povećanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja ove lekovite supstance. Od ukupno 54 različite kombinacije ulja (oleoil makrogol-6 gliceridi, propilenglikol monokaprilat, propilenglikol monolaurat), surfaktanta (kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi) i kosurfaktanta (polisorbat 80 ili makrogol 15 hidrosistearat), odabrani su uzorci koji su odgovarali kriterijumima za SMEDDS u pogledu brzine samoemulgovanja (< 1 min), robusnosti prema razblaživanju (transparencija $> 99\%$), veličine kapi (< 100 nm) i raspodele veličine kapi ($PDI < 0,2$), kao i prihvatljive stabilnosti tokom šestomesečnog skladištenja na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C). Simvastatin se iz odabranih tečnih SMEDDS oslobađao brzo, čime je potvrđeno da se formulisanjem tečnih SMEDDS značajno povećava brzina rastvaranja simvastatina.

U drugoj fazi istraživanja, primenom kompjuterskog programa GastroPlus™, uspešno je razvijen simvastatin-specifični fiziološki zasnovan farmakokinetički (PBPK) model, koji na odgovarajući način opisuje apsorpciju, konverziju u simvastatin-kiselinu, raspodelu i eliminaciju simvastatina. Analizom literaturnih podataka, eksperimentalnih podataka i *in silico* predviđenih vrednosti parametara koji opisuju biofarmaceutska svojstva simvastatina i fiziološke karakteristike organizma, odabran je set ulaznih parametara koji su korišćeni za *in silico* modelovanje. Izgrađeni PBPK model je validiran poređenjem predviđenih sa *in vivo* vrednostima farmakokinetičkih parametara za simvastatin i simvastatin-kiselinu nakon peroralne primene 20 mg simvastatina u obliku tableta sa trenutnim oslobađanjem. Rezultati *in vitro* ispitivanja tečnih SMEDDS, punjenih u tvrde kapsule su pokazali da ove formulacije omogućavaju povećanje brzine rastvaranja simvastatina. Međutim, *in silico* modelovanjem je pokazano da se na ovaj način ne povećava biološka raspoloživost simvastatina, u poređenju sa tabletama simvastatina sa trenutnim oslobađanjem. Analizom rezultata simulacija je utvrđeno da su distalni delovi GI trakta optimalno mesto za apsorpciju simvastatina, te se razvojem formulacija sa modifikovanim (ciljnim) oslobađanjem simvastatina može postići smanjenje uticaja presistenskog metabolizma i povećanje biološke raspoloživosti ove lekovite supstance.

U trećoj fazi istraživanja formulisane su lipidne formulacije sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina, punjenjem odabranih tečnih SMEDDS u acidorezistentne kapsule, kao i mešanjem odabranih tečnih SMEDDS sa kopolimerima metakrilne kiseline, koji pokazuju pH zavisnu rastvorljivost. Korišćeni su polimeri Eudragit® L100, Eudragit® S100, kao i njihova kombinacija, u odnosu 1:1, a odnos SMEDDS:polimer je bio 2:1. Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja simvastatina pod uslovima izmene medijuma su pokazali da je punjenje tečnih SMEDDS u acidorezistentne kapsule omogućilo oslobađanje simvastatina nakon 90 min, u medijumu pH 6,4. Poređenjem rezultata *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja simvastatina iz formulacija, dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS sa Eudragit® polimerima punjenih u tvrde kapsule, zaključeno je da postoji jasna zavisnost između brzine rastvaranja/oslobađanja simvastatina i vrste Eudragit® polimera. Simvastatin se potpuno oslobodio iz svih formulacija sa Eudragit® L100 u toku 180 min, u

medijumu pH 6,9. Upotrebom Eudragit® S100 u formulacijama je postignuto potpuno oslobađanje simvastatina nakon 300 min, u medijumu pH 7,4. Primena kombinacije dva polimera, Eudragit® S100/Eudragit® L100, omogućila je potpuno oslobađanje lekovite supstance nakon 270 min, u medijumu pH 7,4. Rezultati matematičkog modelovanja profila brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem su pokazali da se simvastatin iz ispitivanih formulacija oslobađa različitom kinetikom, odnosno različitim mehanizmima, u zavisnosti od upotrebljenog Eudragit® polimera. Rezultati *in silico* modelovanja za tečne SMEDDS punjene u acidorezistentne kapsule su pokazali da primena ovih kapsula omogućava izvesno povećanje biološke raspoloživosti simvastatina. Primenom kopolimera metakrilne kiseline postignuto je još veće povećanje biološke raspoloživosti simvastatina, više od 80% za formulacije izrađene sa kombinacijom Eudragit® S100/Eudragit® L100, odnosno, više od 100% za formulacije sa Eudragit® S100, u odnosu na tablete sa trenutnim oslobađanjem. Mešanjem tečnih SMEDDS sa Eudragit® polimerima je došlo do očvršćavanja uzoraka 1 h nakon izrade, pri čemu su nastali čvrsti, rastegljivi, transparentni sistemi. Reološka ispitivanja su pokazala da ovi čvrsti uzorci pokazuju viskoelastična svojstva ($G' > G''$ i $\tan \delta < 1$), kao i da sa povećanjem udela surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida raste elastičnost sistema, verovatno kao posledica formiranja rigidnije gelske mreže. Dodatak simvastatina (3,33%, m/m) je doveo do određenog smanjenja elastičnih svojstava sistema. Razlike u formulaciji čvrstih sistema sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina su uticale na tvrdoću ovih uzoraka. Važno je istaći da uočene razlike u elastičnosti i tvrdoći uzoraka nisu uticale na modifikovano oslobađanje simvastatina. Rezultati ispitivanja stabilnosti čvrstih lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem su pokazali da su formulacije stabilne tokom šest meseci na sobnoj i povišenoj (45 ± 2 °C) temperaturi, s obzirom da nisu primećene promene u izgledu, boji i teksturi kapsula, kao i da je smanjenje sadržaja simvastatina bilo u granicama od 5%. Rezultati sprovedenih istraživanja su pokazali da novi lipidni sistemi, dobijeni mešanjem tečnih SMEDDS sa simvastatinom i Eudragit® polimerima, omogućavaju željeno modifikovano oslobađanje simvastatina i, posledično, povećanje biološke raspoloživosti simvastatina.

Ključne reči: samomikroemulgujući sistemi (SMEDDS); simvastatin; kopolimeri metakrilne kiseline; lipidne formulacije sa modifikovanim oslobađanjem; rastvorljivost; pH zavisna brzina rastvaranja; fiziološki zasnovano farmakokinetičko (PBPK) modelovanje

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

ABSTRACT

More than 50% of the marketed drugs and approximately 90% of new drug entities are poorly soluble in water/gastrointestinal (GI) fluids, which is a limiting factor for their absorption and bioavailability. One of the approaches to overcome this issue is based on the design of lipid-based drug delivery systems, including self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS). Simvastatin belongs to statins, the class of drugs used to lower cholesterol levels in the blood; it also has vasculoprotective properties, and recent research shows that simvastatin exhibits certain activity in the treatment of breast, colon and prostate cancer. Due to low bioavailability of this drug following oral administration of immediate-release tablets, the only dosage form of simvastatin available on the market, there is a growing need for the development of modern carriers that would improve its oral bioavailability. Therefore, the overall aim of this doctoral dissertation was to develop novel lipid-based drug delivery systems as carriers for oral administration of simvastatin, along with their physicochemical and biopharmaceutical characterization.

In the first phase of the study, liquid SMEDDS were formulated, as potential carriers for oral administration of simvastatin, which improved the drug solubility and dissolution rate. Out of 54 different combinations of oils (oleoyl macrogol-6 glycerides, propylene glycol monocaprylate, propylene glycol monolaurate), surfactant (caprylocaproyl macrogol-8 glycerides) and cosurfactant (polysorbate 80 or macrogol 15 hydroxystearate), only formulations with acceptable selfemulsification rate (< 1 min), robustness to dilution (transparency $> 99\%$), droplet size (< 100 nm) and polydispersity index ($PDI < 0.2$), which proved to be stable during six-month storage at room temperature (22 ± 2 °C) were selected. Simvastatin was rapidly released from the selected liquid SMEDDS, confirming that liquid SMEDDS significantly improved the dissolution rate of simvastatin.

In the second phase of the study, using the GastroPlus™ software, a drug-specific physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model was successfully developed, which appropriately describes the absorption, conversion to simvastatin-acid, distribution and elimination of simvastatin. After analyzing literature and experimental data, together with *in silico* predicted values to describe simvastatin biopharmaceutical properties and physiological characteristics of the human body, a set of input parameters used for *in silico* modeling was selected. The constructed PBPK model was validated by comparing the estimated values with the *in vivo* data on pharmacokinetic parameters for simvastatin and simvastatin-acid following oral administration of 20 mg simvastatin immediate-release tablets. *In vitro* drug dissolution profiles from liquid SMEDDS, filled into hard gelatin capsules, showed that these formulations improved the dissolution rate of simvastatin. However, *in silico* results demonstrated that this strategy would not lead to the enhancement of drug oral bioavailability compared to immediate-release tablets. In addition, simulation results showed that distal parts of the GI tract are the optimal place for simvastatin absorption, and that formulation of modified (targeted)-release oral dosage forms of simvastatin could reduce the effects of presystemic metabolism and improve oral bioavailability of this drug.

In the third phase of the study, modified-release lipid-based drug delivery systems were formulated by filling the selected liquid SMEDDS into acid-resistant capsules, as well as by mixing the selected liquid SMEDDS with pH-dependent methacrylic acid copolymers. Eudragit® L100 and Eudragit® S100 polymers, as well as their combination (in the ratio 1:1) were used, whereas the ratio SMEDDS:polymer was 2:1. *In vitro* dissolution results under medium-change conditions showed that liquid SMEDDS filled into acid-resistant capsules enabled complete drug release after 90 min in medium pH 6.4. Comparison of the *in vitro* dissolution test results for formulations obtained by mixing liquid SMEDDS with Eudragit® polymers filled into hard gelatin capsules, pointed out that there was a clear relationship between simvastatin release rate and the type of Eudragit® polymer. Simvastatin was completely released from all formulations with Eudragit® L100 after 180 min in medium pH 6.9. The presence of Eudragit® S100 in the formulations enabled complete simvastatin release after 300 min in medium pH 7.4. The combination of two polymers, Eudragit® S100/Eudragit® L100, enabled complete simvastatin release after 270 min in medium 7.4.

The obtained *in vitro* dissolution profiles, fitted into different mathematical models, showed that simvastatin release from the tested formulations followed different kinetics/mechanisms, depending on the type of Eudragit[®] polymer. *In silico* modeling results for the SMEDDS filled into acid-resistant capsules suggested that these capsules are expected to provide certain increase in oral bioavailability of simvastatin. Formulations containing methacrylic acid-based copolymers are expected to provide even higher increase in simvastatin oral bioavailability, i.e., more than 80% increase for formulations with the Eudragit[®] S100/ Eudragit[®] L100 combination, and more than 100% increase for formulations with Eudragit[®] S100 in comparison to immediate-release tablets. Mixing liquid SMEDDS with Eudragit[®] polymers led to solidification of the samples 1 h after preparation to form solid, ductile, transparent systems. Rheological measurements demonstrated that these samples exhibited viscoelastic properties ($G' > G''$ and $\tan \delta < 1$), and that the elasticity of the system increased as the proportion of caprylocaproyl macrogol-8 glyceride surfactant increased, probably due to formation of a more rigid gel network. The addition of simvastatin (3.33%, m/m) led to a certain decrease in the elastic properties of the system. Differences in the composition of simvastatin modified-release drug delivery systems affected the hardness of these samples. It is important to note that the observed differences in the elasticity and hardness between these samples did not affect simvastatin release rate. The stability testing results for solid modified-release lipid-based drug delivery systems demonstrated that these samples were stable during six-month storage at room and elevated (45 ± 2 °C) temperatures, since no changes in the appearance, color and texture of the capsules were observed. Also, it was demonstrated that simvastatin content was in the range of 5%.

The results of this study showed that novel lipid-based drug delivery systems, obtained by mixing liquid SMEDDS with simvastatin and Eudragit[®] polymers, enabled the desired modified release of simvastatin and, consequently, improved its bioavailability.

Keywords: self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS); simvastatin; polymethacrylate polymers; modified-release lipid-based formulations; solubility; pH-controlled drug release; physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical technology

Lista skraćenica

- ACAT - *Advanced Compartmental Absorption and Transit model* (srp. Unapređeni model apsorpcije i tranzita lekovite supstance)
- BCS - *Biopharmaceutics Classification System* (srp. Biofarmaceutski Sistem Klasifikacije, skr. BSK)
- B/P – *Blood/Plasma* (srp. Odnos koncentracije lekovite supstance u krvi/plazmi)
- CAT - *Compartmental Absorption and Transit model* (srp. Model apsorpcije i tranzita lekovite supstance)
- CES – Karboksiesteraze
- CL - Klirens
- C_{max} - Maksimalna koncentracija lekovite supstance u plazmi
- CMC – *Critical Micellar Concentration* (srp. Kritična micelarna koncentracija)
- Cs - Kosurfaktant
- CYP - Citohrom P
- EMA - *European Medicines Agency* (srp. Evropska agencija za lekove)
- F_a - Procenat apsorbovane lekovite supstance (u enterocitima)
- F_b - Biološka raspoloživost lekovite supstance
- FDA - *Food and Drug Administration* (srp. Američka uprava za hranu i lekove)
- FD_p – Procenat lekovite supstance u portalnom krvotoku
- f_{up} - Slobodna frakcija lekovite supstance u plazmi
- f_{ut} - Slobodna frakcija lekovite supstance u tkivu
- GI - Gastrointestinalni
- GRAS - *Generally Recognized as Safe* (srp. Opšte prepoznato kao bezbedno)
- HLB - Hidrofilno-lipofilni balans
- IC₅₀ – Srednja inhibitorna koncentracija
- K_{max} - *Michaelis-Mentenova* konstanta
- LD₅₀ – Srednja letalna doza
- LFCS - *Lipid Formulation Classification System* (srp. Sistem klasifikacije lipidnih formulacija)
- NLC - *Nanostructured lipid carriers* (srp. Nanostruktuirani lipidni nosači)
- PBPK - *Physiologically-Based Pharmacokinetic Model* (srp. Fiziološki zasnovan farmakokinetički model)
- PCS - *Photon Correlation Spectroscopy* (srp. Fotonska korelaciona spektroskopija)
- PDI - *Polydispersity index* (srp. Indeks polidisperziteteta)
- PIK_{0→∞} - Površina ispod krive
- Ph. Eur. - *The European Pharmacopoeia* (srp. Evropska farmakopeja)
- PStc - *Permeability surface area product*
- S - Surfaktant
- S/Cs - Maseni odnos surfaktant/kosurfaktant
- SD - Standardna devijacija
- SEDDS - *Self-emulsifying drug delivery systems* (srp. Samoemulgujući sistemi)
- SGF - *Simulated gastric fluid* (srp. Simulirana želudačna tečnost)
- SIF - *Simulated intestinal fluid* (srp. Simulirana intestinalna tečnost)
- SLN - *Solid lipid nanoparticles* (srp. Čvrste lipidne nanočestice)
- SMEDDS - *Self-microemulsifying drug delivery systems* (srp. Samomikroemulgujući sistemi)

SNEDDS - *Self-nanoemulsifying drug delivery systems* (srp. Samonanoemulgujući sistemi)

t_{\max} - Vreme potrebno da se dostigne maksimalna koncentracija lekovite supstance u plazmi

USP-NF - *The United States Pharmacopoeia-National Formulary* (srp. Američka farmakopeja-Nacionalni formular)

U/V - Ulje-u-vodi

V/U - Voda-u-ulju

Vd - Volumen distribucije

V_{\max} - Maksimalna brzina metabolizma lekovite supstance

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Lipidne formulacije	2
1.1.1. Definicija i klasifikacija lipidnih formulacija.....	2
1.1.2. Primeri lipidnih formulacija na tržištu	4
1.1.3. Lipidne formulacije tipa samomikroemulgujućih sistema (SMEDDS)	10
1.1.4. Ekscipijensi u sastavu SMEDDS za peroralnu primenu	10
1.1.4.1. Opšti kriterijumi za izbor ekscipijenasa u SMEDDS za peroralnu primenu	10
1.1.4.2. Vrste ekscipijenasa u SMEDDS za peroralnu primenu	11
1.1.5. Razvoj i karakterizacija SMEDDS	19
1.1.5.1. Mehanizam samoemulgovanja.....	19
1.1.5.2. Studije rastvorljivosti	20
1.1.5.3. Studije faznog ponašanja	20
1.1.5.4. Metode karakterizacije SMEDDS.....	21
1.1.6. Prednosti lipidnih formulacija tipa SMEDDS	23
1.2. Čvrste lipidne formulacije	23
1.2.1. Postupci za prevođenje tečnih SMEDDS u čvrste lipidne formulacije.....	24
1.2.2. Čvrste lipidne formulacije sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance	27
1.2.3. Izbor ekscipijenasa za ciljnu isporuku lekovite supstance	27
1.2.4. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz formulacija sa modifikovanim oslobađanjem.....	30
1.3. <i>In silico</i> modeli za procenu apsorpcije i biološke raspoloživosti lekovite supstance	30
1.4. Simvastatin	35
1.4.1. Mehanizam delovanja.....	35
1.4.2. Biofarmaceutske osobine simvastatina.....	36
1.4.3. Farmakokinetičke osobine simvastatina.....	37
1.4.4. Savremene lipidne formulacije sa simvastatinom	37
1.4.4.1. Samoemulgujući sistemi	38
1.4.4.2. Čvrste lipidne nanočestice	38
1.4.4.3. Nanostruktuirani lipidni nosači.....	39
1.4.4.4. Hibridne mikročestice silicijum-dioksida i lipida.....	40
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	41
3. EKSPERIMENTALNI DEO	42
3.1. Materijali	42
3.2. Metode.....	44
3.2.1. Prva faza eksperimentalnog rada.....	44

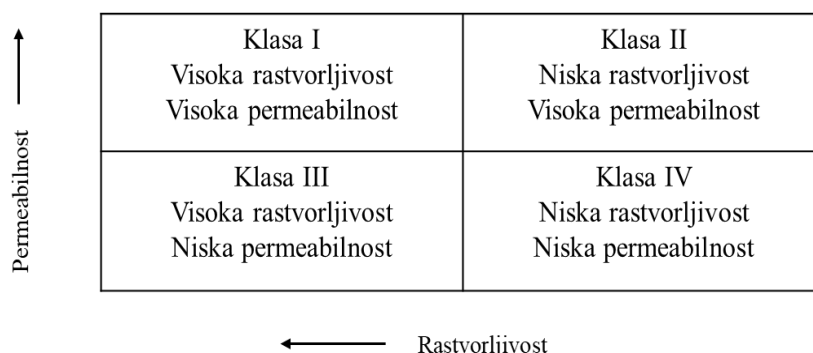
3.2.1.1. Ispitivanje rastvorljivosti simvastatina	44
3.2.1.2. Konstrukcija pseudoternarnih faznih dijagrama i određivanje mikroemulzione oblasti	45
3.2.1.3. Izrada tečnih SMEDDS.....	45
3.2.1.4. Fizičko-hemijska karakterizacija tečnih SMEDDS.....	45
3.2.1.4.1. Procena samoemulgovanja	46
3.2.1.4.2. Robustnost prema razblaživanju	46
3.2.1.4.3. Analiza veličine i raspodele veličine kapi	46
3.2.1.4.4. Ispitivanje stabilnosti tečnih SMEDDS.....	47
3.2.1.5. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS.....	47
3.2.1.6. Poređenje profila brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS	47
3.2.2. Druga faza eksperimentalnog rada	48
3.2.2.1. Razvoj simvastatin-specifičnog PBPK modela	48
3.2.3. Treća faza eksperimentalnog rada	52
3.2.3.1. Izrada lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina	52
3.2.3.2. Biofarmaceutska karakterizacija lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina	52
3.2.3.2.1. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem	52
3.2.3.2.2. Matematičko modelovanje kinetike oslobađanja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem	53
3.2.3.3. <i>In silico</i> simulacija apsorpcije simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem	55
3.2.3.4. Fizičko-hemijska karakterizacija lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina	55
3.2.3.4.1. Reološka karakterizacija	55
3.2.3.4.2. Ispitivanje tvrdoće	56
3.2.3.4.3. Ispitivanje stabilnosti.....	56
4. REZULTATI I DISKUSIJA	57
4.1. Prva faza eksperimentalnog rada.....	57
4.1.1. Ispitivanje rastvorljivosti simvastatina	57
4.1.2. Konstrukcija pseudoternarnih faznih dijagrama i određivanje mikroemulzione oblasti ..	58
4.1.3. Formulacija tečnih SMEDDS	68
4.1.4. Fizičko-hemijska karakterizacija i procena stabilnosti tečnih SMEDDS.....	68
4.1.4.1. Procena samoemulgovanja.....	68
4.1.4.2. Robustnost prema razblaživanju	69
4.1.4.3. Analiza veličine i raspodele veličina kapi	69
4.1.4.4. Ispitivanje stabilnosti tečnih SMEDDS sa simvastatinom	73

4.1.5. <i>In vitro</i> brzina rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS	74
4.2. Druga faza eksperimentalnog rada	77
4.2.1. Razvoj simvastatin-specifičnog PBPK modela	77
4.2.2. PBPK modelovanje apsorpcije i dispozicije simvastatina nakon peroralne primene tečnih SMEDDS	79
4.3. Treća faza eksperimentalnog rada	83
4.3.1. Razvoj lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina.....	83
4.3.2. Biofarmaceutska karakterizacija lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina	85
4.3.2.1. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem.....	85
4.3.2.2. Matematičko modelovanje kinetike oslobađanja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem	89
4.3.3. <i>In silico</i> simulacija apsorpcije simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem.....	93
4.3.4. Fizičko-hemijska karakterizacija lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina	98
4.3.4.1. Reološka karakterizacija	98
4.3.4.2. Ispitivanje tvrdoće.....	104
4.3.4.3. Ispitivanje stabilnosti	105
5. ZAKLJUČAK	107
6. LITERATURA	110
7. PRILOZI	129

1. UVOD

Peroralni put primene lekova je najpoželjniji za većinu pacijenata. Prema najnovijim podacima, više od 50% lekovitih supstanci koje su već na tržištu i oko 90% novosintetisanih lekovitih supstanci imaju nisku rastvorljivost u vodi (Huang i sar., 2021). S obzirom da je rastvaranje preduslov za apsorpciju lekovite supstance, niska rastvorljivost predstavlja ograničavajući faktor za apsorpciju i samim tim, biološku raspoloživost lekovite supstance primenjene peroralnim putem. Situacija je još nepovoljnija za lekovite supstance koje imaju i nisku permeabilnost (Huang i sar., 2021). Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekovitih supstanci (BSK) (engl. *Biopharmaceutical Classification System*, skr. *BCS*), uveden 1995. godine od strane Amidona i saradnika, omogućava da se na jednostavan način sve lekovite supstance klasifikuju prema rastvorljivosti i permeabilnosti (slika 1.1). U biofarmaceutskom smislu, lekovita supstanca se smatra visoko rastvorljivom ako maksimalna terapijska doza može da se rastvori u 250 ml ili manje medijuma u fiziološkom opsegu pH (1,2-6,8), na temperaturi 37 ± 1 °C i visoko permeabilnom kada je *in vivo* postignut obim apsorpcije lekovite supstance veći od 85% (EMA, 2020).

Lekovite supstance iz klase I, sa visokom rastvorljivošću i visokom permeabilnošću se lako apsorbuju. Lekovite supstance iz klase II odlikuje visoka permeabilnost, ali je apsorpcija ograničena njihovom niskom rastvorljivošću u GI traktu. U klasi III, apsorpcija lekovite supstance je ograničena niskom permeabilnošću. Za lekovite supstance iz klase IV, koje su i nisko rastvorljive i nisko permeabilne, očekuje se ograničena i varijabilna apsorpcija (Pouton, 2006).



Slika 1.1. Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekovitih supstanci (prilagođeno iz Pouton, 2006)

U razvoju farmaceutskih preparata sa lekovitim supstancama čija niska rastvorljivost i brzina rastvaranja u vodi, odnosno, gastrointestinalnim (GI) tečnostima ograničava apsorpciju, mogu se primeniti različiti pristupi, kao što su: hemijska modifikacija lekovite supstance (primena lekovite supstance u obliku proleka) (Jornada i sar., 2016; Stella i Nti-Addae, 2007), smanjenje veličine čestica lekovite supstance (Khadka i sar., 2014; Merisko-Liversidge i Liversidge, 2011), formiranje soli (Korn i Balbach, 2014; Serajuddin, 2007), prevođenje lekovite supstance u amorfnu obliku (Byrn i Henck, 2012), kompleksiranje sa ciklodekstrinima (Saokham i sar., 2018), izrada čvrstih disperzija (Alshehri i sar., 2020) i izrada lipidnih formulacija (engl. *Lipid-based formulations*) (Plaza-Oliver, 2021).

Izrada lipidnih formulacija u cilju povećanja rastvorljivosti nisko rastvorljivih lekovitih supstanci, a posledično i apsorpcije iz GI trakta se proučava dugi niz godina. Lipidne suspenzije i emulzije sulfonamida su opisane 50-ih godina prošlog veka (Svenson i sar., 1956, Daeschner i sar., 1957). Međutim, tek se 70-ih godina prošlog veka pojavilo veće interesovanje za lipidne formulacije, što je dovelo do detaljnije karakterizacije ovih sistema (Carrigan i Bates, 1973; Chakrabarti i Belpaire, 1978).

Početna istraživanja lipidnih formulacija kao nosača za nisko rastvorljive lekovite supstance, koji mogu da obezbede njihovu veću apsorpciju, bila su zasnovana na činjenici da se apsorpcija mnogih lekovitih supstanci povećava ukoliko se primene istovremeno sa hranom bogatom lipidima. Prisustvo lipida u hrani dovodi do sekrecije pankreasnih enzima koji iniciraju proces varenja lipida i omogućavaju solubilizaciju lekovite supstance formiranjem mešanih micela od žučnih soli, fosfolipida i holesterola. Upravo zahvaljujući dokazanoj sposobnosti da povećaju apsorpciju nisko rastvorljivih lekovitih supstanci, a u nekim slučajevima i smanje ili eliminišu uticaj hrane na apsorpciju, lipidne formulacije privlače veliku pažnju istraživača (Feeney i sar., 2016).

1.1. Lipidne formulacije

Jedinstvene osobine lipida, pre svega njihova biokompatibilnost i dokazana sposobnost da povećaju biološku raspoloživost nisko rastvorljivih lekovitih supstanci, doprinele su primeni lipidnih formulacija kao nosača za ovakve lekovite supstance (Porter i Charman, 2001; Pouton i Porter, 2008; Trevaskis i sar., 2008). Sa druge strane, ograničena rastvorljivost nekih hidrofobnih lekovitih supstanci u lipidima, izazovi u industrijskoj proizvodnji, nedostatak znanja o *in vivo* ponašanju, kao i nedostatak *in vitro* i *in vivo* metodologije za ispitivanje ovakvih formulacija, predstavljaju ograničenja za širu primenu lipidnih formulacija.

Lipidne formulacije obuhvataju veliki broj različitih formulacija, od jednostavnih rastvora lekovite supstance u ulju do složenijih formulacija, koje obuhvataju rastvore lekovite supstance u smeši dve ili više pomoćnih supstanci/ekscipijenasa (različita ulja, surfaktanti i/ili korastvarači) (Pouton i Porter, 2008). Groves i de Galindez (1976) su opisali lipidne formulacije koje mogu da se samoemulguju u želudačnoj tečnosti i na taj način otvorili put razvoju samoemulgujućih formulacija. Lipidne formulacije mogu biti tečne, ređe polučvrste konzistencije na sobnoj temperaturi i obično se pune u meke ili tvrde želatinske kapsule. Najčešće su namenjene peroralnoj primeni, ali se mogu koristiti i za lokalnu, parenteralnu ili inhalacionu primenu (Chakraborty i sar., 2009; Rajpoot i sar., 2020).

1.1.1. Definicija i klasifikacija lipidnih formulacija

S obzirom da lipidne formulacije obuhvataju različite tipove formulacija, Pouton je 2000. godine uveo sistem klasifikacije lipidnih formulacija (engl. *Lipid Formulation Classification System*, skr. *LFCS*). Prema ovom sistemu klasifikacije, lipidne formulacije su grupisane u tri kategorije (tip I, II i III), prema vrstama i udelu ekscipijenasa koje ulaze u njihov sastav (tabela 1.1).

Formulacije koje predstavljaju rastvor lekovite supstance u uljima/uljanoj fazi su klasifikovane kao tip I. Lipidne formulacije tipa I, kao uljanu fazu, mogu sadržati trigliceride, digliceride, monogliceride, ili njihove smeše. Ove formulacije su najpogodnije za izrazito lipofilne lekovite supstance, koje imaju visoku rastvorljivost u gliceridima ($\log P > 4$). Njihova prednost je jednostavnost formulacije i mala mogućnost za taloženje lekovite supstance nakon dispergovanja u vodenom medijumu/GI tečnostima. Glavni nedostatak lipidnih formulacija tipa I je ograničeni kapacitet za rastvaranje mnogih lekovitih supstanci (Williams i sar., 2013). Takođe, za formulacije tipa I neophodno je, posle peroralne primene, varenje lipida u prisustvu pankreasne lipaze/kolipaze, nakon čega dolazi do parcijalne lipolize triglicerida u GI traktu. Nastali monogliceridi i slobodne masne kiseline, zajedno sa endogenim fosfolipidima, proteinima i polisaharidima iz hrane i sastojcima žuči formiraju mešane micelle u kojima je solubilizovana lekovita supstanca (Pouton, 2006).

Lipidne formulacije tipa II su samoemulgujući sistemi (engl. *Self-emulsifying drug delivery systems*, skr. *SEDDS*), u kojima je lekovita supstanca rastvorena u smeši različitih ulja, koja mogu da čine 40-80% formulacije i odgovarajućeg lipofilnog surfaktanta (HLB < 12), koji može biti zastupljen 20-60%. Prilikom razblaživanja vodom, odnosno GI tečnostima, SEDDS formiraju ulje-u-vodi (U/V) emulziju, veličine kapi od 100 nm do 250 nm (Pouton, 2006; Pouton i Porter, 2008; Porter i sar., 2008). Do samoemulgovanja dolazi kada je sadržaj surfaktanta veći od 25%, a optimalan sadržaj surfaktanta je uglavnom 30-40%. Međutim, pri većem sadržaju surfaktanta (iznad 50-60%), stvaranje viskoznih tečnokristalnih faza na međupovršini ulja i vode može da ometa proces samoemulgovanja (Cuiné i sar., 2012). Prisustvo surfaktanata u lipidnim formulacijama tipa II obezbeđuje veću rastvorljivost lekovitih supstanci sa log P između 2 i 4, koje imaju nisku rastvorljivost i u lipidima i u vodi (Pouton, 2006). Međutim, zbog malog broja lipofilnih surfaktanata koji su odobreni za peroralnu primenu i sve veće popularnosti lipidnih formulacija tipa III i IV, u novije vreme se lipidne formulacije tipa II manje koriste (Williams i sar., 2013).

Formulacije tipa III su podeljene na dva podtipa, IIIA i IIIB. Lipidne formulacije tipa IIIA su SEDDS, koji sadrže uljanu fazu (40-80%), hidrofilne surfaktante (HLB > 12) (20-40%) i/ili korastvarače (0-40%). Ove formulacije u vodi spontano formiraju U/V emulziju, veličine kapi od 100 nm do 250 nm. Tip IIIB predstavlja sisteme sa većim sadržajem hidrofilnih surfaktanata i manjim udelom uljane faze u odnosu na tip IIIA (Pouton, 2006; Pouton i Porter, 2008; Porter i sar., 2008). Samomikroemulgujući sistemi (engl. *Self-microemulsifying drug delivery systems*, skr. *SMEDDS*) predstavljaju lipidne formulacije tipa IIIB, koji sadrže manje uljane faze (< 20%), a veće koncentracije hidrofilnih surfaktanata (20-50%) i korastvarača (20-50%). SMEDDS razblaživanjem vodom obrazuju bistre ili blago opalescentne mikroemulzije, sa kapima veličine ispod 100 nm (Porter i sar., 2008; Pouton, 2006; Pouton i Porter, 2008; Song, 2011). Iako kod lipidnih formulacija podtipa IIIB postoji veća mogućnost smanjenja kapaciteta za solubilizaciju lekovite supstance i veći rizik za precipitaciju lekovite supstance, u poređenju sa podtipom IIIA, lipidne formulacije podtipa IIIB su pogodnije za dispergovanje lekovite supstance (Porter i sar., 2008). Da bi nastale lipidne formulacije tipa III obično je potrebno i prisustvo kosurfaktanta (Cs). Udruživanjem surfaktanta i kosurfaktanta postiže se smanjenje međupovršinskog napona između uljane i vodene faze i odgovarajuća fluidnost međupovršinskog filma, odnosno nastaje međupovršinski film veće elastičnosti (Rahman i sar., 2012).

Razlika između SEDDS i SMEDDS lipidnih formulacija je u veličini kapi i optičkoj bistrini dobijene emulzije. SEDDS obično daje opalescentne emulzije sa veličinama kapi većim od 100 nm, dok SMEDDS (koji imaju veći sadržaj hidrofilnih surfaktanata i korastvarača) razblaživanjem u vodi tj. emulgovanjem, daju termodinamički stabilne i optički izotropne mikroemulzije, koje imaju manje kapi (< 100 nm) (Porter i sar., 2008). Prednost SMEDDS u odnosu na druge tipove tečnih lipidnih formulacija je manja veličina kapi koja omogućava brže oslobađanje lekovite supstance (Gurram i sar., 2015; Song i sar., 2014). Takođe, zahvaljujući brzom procesu samomikroemulgovanja koji ne zavisi od varenja lipida i sekrecije žuči i pankreasnog soka, omogućena je veća apsorpcija lekovite supstance i posledično, njena veća biološka raspoloživost (Feeney i sar., 2016).

Klasifikacija lipidnih formulacija je dopunjena 2006. godine (Pouton, 2006), kada je uveden i tip IV. Formulacije tipa IV ne sadrže uljanu fazu i predstavljaju sisteme sa najizraženijim hidrofilnim osobinama. Sadrže smešu surfaktanata nižih i viših HLB vrednosti (HLB < 12, u koncentraciji 0-20% i HLB > 12, u koncentraciji 30-80%) i hidrofilnih korastvarača (npr. makrogol (polietilenglikol) 400, propilenglikol, dietilen glikol monoetil etar (Transcutol®)), u koncentraciji 0-50%. Pokazano je da su formulacije tipa IV pogodni nosači za lekovite supstance koje su nisko rastvorljive i u vodi i u lipidima (Pouton, 2006). Kada se formulacije tipa IV disperguju u GI tečnostima, formiraju se micle koje sadrže solubilizovanu lekovitu supstancu, što omogućava brzo oslobađanje lekovite supstance i potencijalno dovodi do povećanja brzine apsorpcije (Song, 2011). Nedostatak lipidnih formulacija tipa IV je potencijalan gubitak kapaciteta za solubilizaciju i visok rizik za precipitaciju lekovite

supstance tokom prolaska kroz GI trakt, što može da smanji njenu dostupnost za apsorpciju (Porter i sar., 2008). Takođe, visoka koncentracija surfaktanata povećava rizik od iritacije sluzokoža i loše podnošljivosti u GI traktu (Rajpoot i sar., 2020).

Tabela 1.1. Klasifikacija lipidnih formulacija (Pouton, 2000; Pouton, 2006)

Sastav formulacije (%)	Tip I	Tip II	Tip IIIA	Tip IIIB	Tip IV
Mono-, di-, i trigliceridi	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	< 100	< 50
Uticaj dispergovanja formulacije na solubilizaciju supstance	Ograničen uticaj	Nema uticaja	Neznatan gubitak kapaciteta za solubilizaciju	Značajne fazne promene i potencijalan gubitak kapaciteta za solubilizaciju	Značajne fazne promene i potencijalan gubitak kapaciteta za solubilizaciju
Značaj digestije ekscipijenasu za apsorpciju supstance	Digestija je neophodna	Digestija nije neophodna, ali je poželjna	Digestija nije neophodna	Digestija nije neophodna	Digestija nije neophodna

1.1.2. Primeri lipidnih formulacija na tržištu

Danas se na tržištu nalazi veći broj registrovanih lekova za peroralnu primenu, tipa lipidnih formulacija. Najzastupljeni farmaceutski oblici lekova ovog tipa su meke i tvrde kapsule, dok je manji broj oralnih rastvora (tabela 1.2). Najveći broj lekovitih supstanci u ovim preparatima pripada BSK klasi II (npr. izotretinoin, ciklosporin, klofazimin, progesteron, amprenavir, fenofibrat, loratadin, enzalutamid, nintedanib).

Jedna od prvih lipidnih formulacija, koja je stavljena na tržište 1981. godine, bio je Sandimmune® oralni rastvor (Novartis, Švajcarska). Prvobitna Sandimmune® formulacija, oralni rastvor, sadržala je rastvor ciklosporina A u smeši maslinovog ulja i oleoil makrogol-6 glicerida (Labrafil® M 1944 CS). Na tržište su 1990. godine stavljene i Sandimmune® meke kapsule, koje su sadržale rastvor ciklosporina A u smeši kukuruznog ulja i linoleoil makrogol-6 glicerida (Labrafil® M 2125 CS). Sandimmune® formulacije (oralni rastvor i meke kapsule) nakon razblaživanja u vodi/GI tečnostima formiraju grubu emulziju. Iako je biološka raspoloživost ciklosporina A nakon peroralne primene Sandimmune® formulacija bila niska i varijabilna, ovi preparati su bili na tržištu dugi niz godina. 1994. godine na tržište su stavljeni Sandimmune Neoral®, meke kapsule i oralni rastvor (Novartis, Švajcarska), koje sadrže rastvor ciklosporina A u smeši mono-, di- i triglicerida iz ulja kukuruza, propilenglikola i makrogolglicerol hidrosistearata (makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje). Za razliku od prvobitnih Sandimmune® formulacija, Sandimmune Neoral® u vodi/GI tečnostima spontano formira bistru mikroemulziju, veličine kapi ispod 100 nm. Smatra se da je upravo manja veličina kapi odgovorna za povećanu apsorpciju ciklosporina A i smanjenje varijabilnosti u biološkoj raspoloživosti, povezane sa unetom hranom, nakon primene Sandimmune Neoral® preparata

(Beauchesne i sar., 2007; Klyashchitky i Owen, 1998; Mueller i sar., 1994). Klinički i komercijalni uspeh Sandimmune Neoral[®] formulacija povećao je interesovanje za upotrebu i doveo do daljeg razvoja ovih formulacija, sa različitim lekovitim supstancama (Huang i sar., 2021; Savla i sar., 2017). Posebno je povećano interesovanje za lipidne formulacije tipa III, koje spontano formiraju emulzije sa veličinama kapi u nanometarskom opsegu. Primeri lekova koji se nalaze na tržištu sa lipidnim formulacijama tipa III prikazani su u tabeli 1.2, a među novijim su Aptivus[®], meke kapsule, koje sadrže rastvor tipranavira u mono- i digliceridima kaprilne/kaprinske kiseline, makrogol-35 ricinusovom ulju, etanolu i propilenglikolu i Lipofen[®], tvrde kapsule, koje sadrže fenofibrat u lauroil makrogol-32 gliceridima (Gelucire[®] 44/14) (tabela 1.2).

Osim lipidnih formulacija tipa III, na tržištu su prisutni i preparati na bazi ostalih tipova lipidnih formulacija. Svi registrovani lekovi sa lipidnim formulacijama tipa I su meke kapsule (izuzev Detrol[®] LA), koje sadrže rastvor, ređe suspenziju lekovite supstance u odgovarajućim uljima. Primeri ovakvih lekova, njihov sastav i ostale karakteristike od značaja, navedeni su u tabeli 1.2. U poslednjih 15 godina na tržište su stavljeni: Zemplar[®] (rastvor parikalcitola u frakcionisanim trigliceridima srednje dužine lanaca iz kokosovog ulja ili ulja koštice palme), Amitiza[®] (rastvor lubiprostona u trigliceridima srednje dužine lanaca), Hycamtin[®] (rastvor topotekan-hidrohlorida u hidrogenizovanom biljnom ulju i gliceril monostearatu) i Xtandi[®] (rastvor enzalutamida u kaprilokaproil makrogol-gliceridima) (tabela 1.2). Iako je poznat nedostatak lipidnih formulacija tipa I da ne mogu uvek da obezbede dovoljan kapacitet solubilizacije za rastvaranje potrebne doze lekovite supstance u odgovarajućoj količini ulja, ovakve formulacije mogu da predstavljaju dobar izbor za lekovite supstance koje su namenjene za upotrebu u toku dužeg vremenskog perioda, jer ne sadrže surfaktante, čija bezbednost upotrebe tokom dužeg vremena može biti problematična (Rajpoot i sar., 2020; Savla i sar., 2017). Ofev[®], meke kapsule, registrovane 2014. godine, predstavljaju lipidnu formulaciju tipa II, u kojoj je lekovita supstanca nintedanib suspendovana u smeši triglicerida srednje dužine lanaca, čvrste masti i lecitina.

Lipidne formulacije tipa IV ne sadrže ulje, a nakon razblaživanja vodenim medijumom nastaje micelarni rastvor, što dovodi do brzog oslobađanja lekovite supstance i njene povećane apsorpcije. Glavni nedostatak ovih formulacija je osetljivost GI trakta na visoke koncentracije surfaktanata. Verovatno je iz ovog razloga samo nekoliko formulacija tipa IV prisutno na tržištu (tabela 1.2). Interesantno je primetiti da lek Aptivus[®] u obliku oralnog rastvora predstavlja lipidnu formulaciju tipa IV, odnosno rastvor tipranavira u sledećim ekscipijensima: d- α -tokoferil polietilenglikol 1000 sukcinat, makrogol 400, etanol i propilenglikol.

Neke lekovite supstance (izotretinoin i ciklosporin A) se nalaze na tržištu u obliku različitih lipidnih formulacija. Izotretinoin je dostupan i kao Roaccutane[®], meke kapsule, u koje je punjen rastvor izotretinoina u frakcionisanim trigliceridima iz kokosovog ulja (lipidna formulacija tipa I) i kao Absorica[®], tvrde kapsule, koje sadrže rastvor izotretinoina u sojinom ulju, stearoil makrogol-gliceridima i sorbitan monooleatu (lipidna formulacija tipa II). Takođe, ciklosporin A je na tržištu prisutan kao Sandimmune Neoral[®], meke kapsule, punjene rastvorom ciklosporina A u mono-, di- i trigliceridima iz ulja kukuriza, makrogol-40 hidrogenizovanom ricinusovom ulju, etanolu, glicerolu i propilenglikolu (lipidna formulacija tipa III) i kao Gengraf[®], tvrde kapsule, koje sadrže rastvor ciklosporina A u polisorbatu 80, makrogol-35 ricinusovom ulju, etanolu i propilenglikolu (lipidna formulacija tipa IV).

Tabela 1.2. Primeri lipidnih formulacija na tržištu (Huang i sar., 2021; Savla i sar., 2017)

INN (zaštićen naziv leka/proizvođač, zemlja)	Godina pojavljivanja na tržištu	Farmaceutski oblik	Tip lipidne formulacije	Lipidi (ulja)	Surfaktanti (HLB < 12)	Surfaktanti (HLB > 12)	Hidrofilni korastvarači
Ergokalciferol (Drisdol®/Sanofi, Francuska)	1941	tvrde kapsule	I	sojino ulje			
Kalcitriol (Rocaltrol®/Roche, Švajcarska)*	1978	meke kapsule	I	fracionisani trigliceridi srednje dužine lanaca iz kokosovog ulja			
Valproinska kiselina (Depakene®/Abbott Laboratories, SAD)	1978	meke kapsule	I	ulje kukuruza			
Ciklosporin A (Sandimmune®/Novartis, Švajcarska)	1981	oralni rastvor	II	maslinovo ulje	oleoil makrogol-6 gliceridi (Labrafil® M 1944 CS)		etanol 12,5%
Izotretinion (Roaccutane®/Roche, Švajcarska)*	1982	meke kapsule	I	žuti pčelinji vosak, rafinisano sojino ulje, hidrogenizovano sojino ulje, parcijalno hidrogenizovano sojino ulje			
Dronabinol (Marinol®/Roxane and Unimed, SAD)	1985	meke kapsule	I	susamovo ulje			
Klofazimin (Lamprene®/Novartis, Švajcarska)	1986	meke kapsule	I	pčelinji vosak			
Ciklosporin A (Sandimmune®/Novartis, Švajcarska)	1990	meke kapsule	II	ulje kukuruza	linoleoil makrogol-6 gliceridi (Labrafil® M 2125 CS)		etanol 12,7%
Ciklosporin A (Sandimmune Neoral®/Novartis, Švajcarska)*	1994	meke kapsule	III	mono-, di- i trigliceridi iz kukuruznog ulja		makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (Cremophor® RH 40)	etanol 11,9%, glicerol, propilenglikol

INN (zaštićen naziv leka/proizvođač, zemlja)	Godina pojavljivanja na tržištu	Farmaceutski oblik	Tip lipidne formulacije	Lipidi (ulja)	Surfaktanti (HLB < 12)	Surfaktanti (HLB > 12)	Hidrofilni korastvarači
Ciklosporin A (Sandimmun®/Novartis, Švajcarska)*	1994	oralni rastvor	III	mono-, di- i trigliceridi iz kukuruznog ulja		makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (Cremophor® RH 40)	etanol 11,9%, propilenglikol
Tretinoin (Vesanoid®/Roche, Švajcarska)*	1995	meke kapsule	I	žuti pčelinji vosak, rafinisano sojino ulje, hidrogenizovano sojino ulje, parcijalno hidrogenizovano sojino ulje			
Ritonavir (Norvir®/Abbott Laboratories, SAD)*	1996	meke kapsule	IIIA		oleinska kiselina	makrogol-35 ricinusovo ulje (Cremophor® EL)	etanol
Sakvinavir (Fortovase®/Roche, Švajcarska)	1997	meke kapsule	I	mono- i digliceridi srednje dužine lanaca			
Progesteron (Prometrium®/Cardinal Health Encapsulation Tech., SAD)	1998	meke kapsule	I	ulje kikirikija			
Amprenavir (Agenerase®/GlaxoSmithKline, Velika Britanija)	1999	meke kapsule	IV			d-α-tokoferil polietilenglikol 1000 sukcinat	makrogol 400, propilenglikol
Beksaroten (Targretin®/Ligand, SAD)	1999	meke kapsule	IV			polisorbat 20	makrogol 400
DocekalCIFerol (Hectorol®/Sanofi, Francuska)	1999	meke kapsule	I	kokosovo ulje			etanol 100%
Sirolimus (Rapamune®/Wyeth-Ayerst, SAD)*	1999	oralni rastvor	III	fosfatidilholin, mono- i digliceridi, masne kiseline iz sojinog ulja, askorbil palmitat		polisorbat 80	etanol 1,5-2,5%, propilenglikol

INN (zaštićen naziv leka/proizvođač, zemlja)	Godina pojavljivanja na tržištu	Farmaceutski oblik	Tip lipidne formulacije	Lipidi (ulja)	Surfaktanti (HLB < 12)	Surfaktanti (HLB > 12)	Hidrofilni korastvarači
Ciklosporin A (Gengraf®/Abbott Laboratories, SAD)	2000	tvrde kapsule	IV			makrogol-35 ricinusovo ulje (Cremophor® EL), sorbitan monooleat, polisorbat 80	etanol 12,8%, propilenglikol
Ciklosporin A (Gengraf®/Abbott Laboratories, SAD)	2000	oralni rastvor	IV			makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (Cremophor® RH 40), polisorbat 80	propilenglikol
Lopinavir i ritonavir (Kaletra®/Abbott Laboratories, SAD)	2000	meke kapsule	III		oleinska kiselina	makrogol-35 ricinusovo ulje (Cremophor® EL)	propilenglikol
Tolterodin-tartarat (Detrol® LA/Pfizer, SAD)	2000	tvrde kapsule sa produženim oslobađanjem	I	trigliceridi srednje dužine lanaca, oleinska kiselina			
Dutasterid (Avodart®/ GlaxoSmithKline, Velika Britanija)*	2001	meke kapsule	I	smeša mono- i diglicerida kaprilne/kaprinske kiseline			
Izotretinion (Clavaris®/Teva, Izrael)	2003	tvrde kapsule	/	hidrogenizovano biljno ulje, sojino ulje		polisorbat 80	
Etil estri omega-3-kiseline (Lovaza®/ GlaxoSmithKline, Velika Britanija)	2004	tvrde kapsule	I	sojino ulje			
Tipranavir (Aptivus®/Boehringer Ingelheim, Nemačka)	2005	meke kapsule	IIIA	mono- i digliceridi kaprilne/kaprinske kiseline		makrogol-35 ricinusovo ulje (Cremophor® EL)	etanol, propilenglikol
Tipranavir (Aptivus®/Boehringer Ingelheim, Nemačka)	2005	oralni rastvor	IV			d- α -tokoferil polietilenglikol 1000 sukcinat	makrogol 400, etanol, propilenglikol

INN (zaštićen naziv leka/proizvođač, zemlja)	Godina pojavljivanja na tržištu	Farmaceutski oblik	Tip lipidne formulacije	Lipidi (ulja)	Surfaktanti (HLB < 12)	Surfaktanti (HLB > 12)	Hidrofilni korastvarači
Paricalcitol (Zemplar®/Abbott Laboratories, SAD)*	2005	meke kapsule	I	frakcionisani trigliceridi srednje dužine lanca iz kokosovog ulja ili ulja koštice palme			
Lubiproston (Amitiza®/Takeda, Japan)	2006	meke kapsule	I	trigliceridi srednje dužine lanaca			
Fenofibrat (Lipofen®/Kowa Pharmaceuticals America, Inc., SAD)	2006	tvrde kapsule	III			lauroil makrogol-32 gliceridi (Gelucire® 44/14)	
Topotekan-hidrohlorid (Hycamtin®/GlaxoSmithKline, Velika Britanija)	2007	tvrde kapsule	I	hidrogenizovano biljno ulje	gliceril monostearat		
Loratadin (Claritin®/Bayer, Nemačka)	2008	meke kapsule	/	trigliceridi srednje dužine lanaca		polisorbat 80	
Izotretinoin (Absorica®/Sun Pharma, Indija)	2012	tvrde kapsule	/	sojino ulje, stearoil makrogolgliceridi (Gelucire® 50/13)	sorbitan monooleat		
Enzalutamid (Xtandi®/Astellas Pharma, Japan)*	2012	meke kapsule	I	kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi (Labrasol®)			
Nintedanib (Ofev®/Boehringer Ingleheim, Nemačka)*	2014	meke kapsule	II	trigliceridi srednje dužine lanaca, čvrsta mast	lecitin		

* sa dozvolom za lek (registrovani) na tržištu Republike Srbije

1.1.3. Lipidne formulacije tipa samomikroemulgujućih sistema (SMEDDS)

Samomikroemulgujući sistemi (SMEDDS) su izotropne smeše ulja, surfaktanta (HLB > 12) i hidrofилnih korastvarača/kosurfaktanata. U kontaktu sa vodom spontano i brzo se formiraju optički izotropne, transparentne, termodinamički stabilne mikroemulzije. Veličina kapi mikroemulzija nalazi se u opsegu od 10-100 nm. S obzirom na malu veličinu kapi, ukupna površina međupovršinskog filma je velika, te je kapacitet za solubilizaciju nisko rastvorljivih lekovitih supstanci visok, a samim tim i potencijal za poboljšanje njene apsorpcije i biološke raspoloživosti. Apsorpcija lekovite supstance ne zavisi od digestije lipida pod uticajem pankreasnih enzima (Pouton, 2000). SMEDDS se koriste pretežno kao nosači lekovitih supstanci za peroralnu primenu, a manje za parenteralnu i primenu na koži.

1.1.4. Ekscipijensi u sastavu SMEDDS za peroralnu primenu

Stepen apsorpcije lekovite supstance nakon peroralne primene SMEDDS zavisi od velikog broja formulacionih parametara, kao što su: vrsta ulja i surfaktanta, koncentracija surfaktanta i odnosa ulje/surfaktant. Pokazano je da samo određene kombinacije farmaceutskih ekscipijenasa mogu dovesti do nastanka SMEDDS. Racionalni pristup u odabiru odgovarajućih ekscipijenasa pomaže u skraćivanju vremena i smanjenju troškova potrebnih za razvoj SMEDDS, kao nosača lekovitih supstanci (Gurram i sar., 2015).

1.1.4.1. Opšti kriterijumi za izbor ekscipijenasa u SMEDDS za peroralnu primenu

Početna razmatranja u razvoju SMEDDS, kao nosača lekovitih supstanci, obuhvataju izbor ekscipijenasa (Kohli i sar., 2010; Kollipara i Gandhi, 2014). Na tržištu je dostupan veliki broj ekscipijenasa, a izbor adekvatnih ekscipijenasa zavisi od više faktora. Važan faktor pri izboru ekscipijenasa je bezbednost primene. Sa aspekta bezbednosti primene, nejonski surfaktanti se smatraju prihvatljivijim za peroralnu primenu, u poređenju sa katjonskim i anjonskim surfaktantima (Strickley, 2007). Prilikom razvoja SMEDDS, kao i drugih lipidnih formulacija, najviše se koriste nejonski surfaktanti tipa polisorbata ili polioksietilovana ricinusova ulja (makrogol-35 ricinusovo ulje, makrogol-40 hidrogenozovano ricinusovo ulje i makrogol-60 hidrogenizovano ricinusovo ulje), koji su bezbedniji u odnosu na jednolančane surfaktante. Takođe, nejonski surfaktanti tipa estara su bezbedniji u odnosu na nejonske surfaktante tipa etara (Strickley, 2007). Vrednosti peroralne srednje letalne doze (LD₅₀) za većinu nejonskih surfaktanata su veće od 50 g/kg, tako da se primena 1 g surfaktanta u jednodoznom preparatu za peroralnu primenu smatra bezbednom (Attwood i Florence, 1983). Lipidne formulacije na tržištu, koje su namenjene za upotrebu u toku dužeg vremenskog perioda, uglavnom ne sadrže surfaktante, zbog nedostatka podataka o njihovoj bezbednosti i toksičnosti tokom duže upotrebe. Međutim, određeni farmaceutski preparati na tržištu, tipa lipidnih formulacija, koji kao lekovite supstance sadrže inhibitore HIV proteaza, kao što su: amprenavir (Agenerase[®], GlaxoSmithKline, Velika Britanija), lopinavir i ritonavir (Kaletra[®], Abbott Laboratories, SAD) i ritonavir (Norvir[®], Abbott Laboratories, SAD) sadrže značajnu količinu surfaktanta u pojedinačnoj dozi, tj. u mekoj kapsuli. S obzirom da se kao terapijska doza primenjuje nekoliko kapsula 2-4 puta dnevno, pacijenti mogu uneti i 2-3 g makrogol-35 ricinusovog ulja (Cremophor[®] EL) ili d- α -tokoferil polietileneglikol 1000 sukcinat (Vitamin E[®]TPGS) dnevno. Iako većina nejonskih surfaktanata ima slične peroralne LD₅₀ vrednosti, u praksi se bira neki od surfaktanata koji je duže na tržištu i čija je bezbednost dobro dokumentovana (Strickley, 2007).

Kao pogodan izvor informacija o bezbednosnom profilu ekscipijenasa mogu se koristiti smernice koje je objavila FDA (www.fda.gov/cder). FDA je objavila listu supstanci koje se generalno smatraju bezbednim za upotrebu (engl. *Generally Recognized As Safe*, skr. *GRAS*). Pored toga, FDA je takođe

objavila „Vodič za ekscipijenase” (engl. *Inactive Ingredient Guide*, skr. *IIG*), u kojem su navedene maksimalne dozvoljene mase ili koncentracije ekscipijenasa za određeni put primene (<https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>).

Drugi važan faktor, koji se mora razmotriti pri odabiru ekscipijenasa, odnosi se na njihov hemijski sastav. Naime, biljna ulja iz različitih biljnih izvora, koja se koriste u lipidnim formulacijama, razlikuju se po hemijskom sastavu. Ukoliko se ova ulja dalje podvrgnu hidrolizi i esterifikaciji, to još više doprinosi raznolikosti (Meyer i sar., 2002). Iz praktičnih razloga ovi ekscipijensi obično dobijaju jednostavno hemijsko ime, koje ne ukazuje na složenost njihovog sastava. Stoga, pri razvoju lipidnih formulacija mora se uzeti u obzir da će postojati razlike između ekscipijenasa koji imaju isto hemijsko ime, a potiču se od različitih proizvođača (Williams i sar., 2013).

Na izbor ekscipijenasa utiče i to da li je on svarljiv, kao i kako se metabolišu i izlučuju proizvodi nastali varenjem ekscipijensa u GI traktu. S obzirom da se tečne SMEDDS često pune u kapsule (meke ili tvrde želatinske kapsule, ređe kapsule od hipromeloze (sin. *hidroksipropilmetilceluloza*, skr. *HPMC*), kao finalni farmaceutski oblik, važno je razmotriti kompatibilnost ekscipijenasa sa omotačem kapsula, kao i stabilnost farmaceutskog oblika. Svakako na izbor ekscipijenasa koji se koriste u formulaciji SMEDDS utiče i njihova cena (Williams i sar., 2013).

1.1.4.2. Vrste ekscipijenasa u SMEDDS za peroralnu primenu

Lipidi (Ulja)

Lipidi (ulja) predstavljaju važne ekscipijense u formulaciji SMEDDS. Svarljivi lipidi, kao što su trigliceridi, digliceridi, masne kiseline, fosfolipidi, holesterol i drugi, mogu povećati biološku raspoloživost lekovite supstance. Međutim, ukoliko se u formulaciji koriste nesvarljivi lipidi, može doći do smanjene apsorpcije i biološke raspoloživosti, usled zadržavanja lekovite supstance unutar nesvarenog dela lipidne formulacije. Lipidi su obično nerastvorljivi u vodi i razlikuju se po sadržaju masnih kiselina, tački topljenja, HLB broju i rastvorljivosti u nepolarnim organskim rastvaračima (Sharma i sar., 2016). Najčešće korišćeni lipidi su trigliceridi iz biljnih ulja. Ova klasa lipida je bezbedna za peroralnu primenu, s obzirom da su u potpunosti podložni digestiji i apsorpciji (Pouton i Porter, 2008; Kalepu, 2013). Iako su jestiva biljna ulja favorizovana, ona nemaju dovoljan kapacitet za solubilizaciju većih količina lipofilnih lekovitih supstanci, a zbog njihove velike molekulske mase otežan je proces samoemulgovanja (Đekić i Primorac, 2008). Umesto njih, češće se koriste hidrogenizovana biljna ulja, koja imaju bolju sposobnost emulgovanja (Gershnik i Benita, 2000).

Trigliceridi se prema dužini ugljovodoničnog lanca mogu podeliti na dugolančane (engl. *long chain triglycerides*, skr. *LCT*), srednjelančane (engl. *medium chain triglycerides*, skr. *MCT*) i kratkolančane (engl. *short chain triglycerides*, skr. *SCT*) trigliceride. Dugolančani trigliceridi imaju više od 12 ugljenikovih atoma, srednjelančani između 6 i 12, a kratkolančani manje od 5 ugljenikovih atoma. U kukuruznom, maslinovom, kikirikijevom i sojinom ulju, kao i u hidrogenizovanom sojinom i ostalim hidrogenizovanim biljnim uljima nalaze se dugolančani trigliceridi. Srednjelančani trigliceridi se dobijaju iz kokosovog ulja ili ulja palminog semena (Humberstone i Charman, 1997; Kalepu, 2013; Williams i sar., 2013).

U SMEDDS se najčešće koriste srednjelančani i dugolančani trigliceridi, čije se osobine značajno razlikuju zbog razlika u njihovoj strukturi. Smatra se da je kapacitet za solubilizaciju lekovitih supstanci određen brojem estarskih grupa u molekulu triglicerida (Cao i sar., 2004). Srednjelančani trigliceridi imaju veći kapacitet solubilizacije od dugolančananih, a takođe su manje sklone oksidaciji, zbog većeg sadržaja zasićenih masnih kiselina (Kaukonen i sar., 2004). Naime, dugolančani trigliceridi sadrže nezasićene masne kiseline, koje su sklone oksidaciji. Nastali peroksid može

nepovoljno uticati na stabilnost i oslobađanje lekovite supstance, a takođe može dovesti do oštećenja omotača kapsule, ako je SMEDDS punjen u kapsule. Ovaj problem se može rešiti na različite načine, kao na primer uključivanjem antioksidanasa u formulaciju (npr. α -tokoferol, β -karoten, propil galat, butilhidroksitoluol (BHT) ili butilhidroksianizol (BHA)), korišćenjem zasićenih triglicerida, ali i primenom specijalnih tvrdih želatinskih kapsula, koje nisu propustljive za kiseonik (Haus, 2007). Srednjelančani trigliceridi podležu bržoj digestiji, a samim tim je brža i apsorpcija inkorporirane lekovite supstance. Sa druge strane, prednost dugolančanih triglicerida je što nakon digestije u GI traktu nastaju proizvodi koji povećavaju transport lekovite supstance limfotokom u većem obimu, u poređenju sa srednjelančanim trigliceridima (Jannin i sar., 2008). Istraživanja su pokazala da se dve lekovite supstance, mepitiostan (prolek epitiostanola) i mepitiostaneolefin, u značajnom procentu transportuju putem limfe, kada se primenjuju pacovima zajedno sa dugolančanim trigliceridima (Yáñez i sar., 2011). U drugoj *in vivo* studiji na pacovima, pokazano je da je nakon peroralne primene SMEDDS sa sirolimusom postignut veći limfatični transport i veća biološka raspoloživost u slučaju formulacije sa $\geq 25\%$ srednjelančanih triglicerida, u poređenju sa formulacijom koja ne sadrži lipide (Sun i sar., 2011).

Parcijalnom hidrolizom triglicerida iz biljnih ulja nastaju smeše mono-, di- i triglicerida. Njihov sastav zavisi od početnog izvora i stepena hidrolize (Prajapati i sar., 2012). Parcijalni gliceridi su često bolji rastvarači od triglicerida (osim ako je lekovita supstanca visoko lipofilna) (Williams i sar., 2013). Najčešće korišćeni parcijalni gliceridi za formulaciju SMEDDS su (Rahman i sar., 2013):

- gliceril monokaprilokapat (Capmul[®] MCM, Abitec, Velika Britanija),
- gliceril monostearat (Geleol[™]; Gattefossé, Francuska; Imvitor[®] 191; IOI Oleochemical, Nemačka, Cutina[™] GMS; BASF, Nemačka; Tegin[™]; Surfachem, Velika Britanija),
- gliceril distearat (Precirol[™] ATO 5, Gattefossé, Francuska),
- gliceril monooleat (Peceol[™], Gattefossé, Francuska),
- gliceril monolinoleat (Maisine[™] 35-1, Gattefossé, Francuska),
- gliceril dibehenat (Compritol[®] 888 ATO, Gattefossé, Francuska)

Surfaktanti

Surfaktanti su ekscipijensi amfifilnog karaktera, koji su neophodni u formulisanju SMEDDS, jer omogućavaju smanjenje međupovršinskog napona između uljane i vodene faze nakon razblaživanja SMEDDS vodenim medijumom. Osnovne karakteristike surfaktanata povezane su sa amfifilnom prirodom molekula (Shobhit i sar., 2012). Surfaktanti sa HLB vrednostima ispod 12 imaju ograničenu rastvorljivost u vodi i malu sposobnost emulgovanja. Sa druge strane, surfaktanti sa HLB od 12 ili većom, imaju sposobnost da se udružuju i formiraju micelle u vodi, u koncentraciji iznad kritične micelarne koncentracije (engl. *critical micellar concentration*, skr. *CMC*) (Sheckey i sar., 2020). Danas je na tržištu prisutan veliki broj surfaktanata prirodnog, polusintetskog ili sintetskog porekla, pod različitim komercijalnim nazivima, koji se koriste za izradu SMEDDS za peroralnu primenu (Nardin i Köllner, 2019). Najčešće se koriste nejonski surfaktanti, kao što su: etoksilovani sorbitanski estri tj. polisorbati (Tween[®]-ovi), etoksilovani estri masnih alkohola (Acconon[®], Labrasol[®], Kolliphor[®]), kao i etoksilovani derivati ricinusovog ulja: makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (Cremophor[®] RH 40) i makrogol-35 ricinusovo ulje (Cremophor[®] EL) (Akula i sar., 2015; Baek i sar., 2013; Cui i sar., 2009; Dixit i sar., 2010; Jaiswal i sar., 2014; Mukherjee i Plakogiannis, 2010; Rao i sar., 2010; Wu i sar., 2015).

Uobičajena koncentracija surfaktanata u SMEDDS, potrebna da bi se formirala mikroemulzija u GI traktu je u opsegu od 30% do 60% (Akula i sar., 2014; Gautam i Shastri, 2018). Međutim, visoke koncentracije surfaktanata u formulaciji mogu prouzrokovati neželjene efekte kod pacijenata (Haus, 2007, Rajpoot i sar., 2020). Određeni surfaktanti, poput polisorbata, mogu da dovedu do gubitka vode iz tvrdih i mekih želatinskih kapsula, u koje se pune SMEDDS i samim tim učine kapsule krtime

(Hauss, 2007). Takođe, visoke koncentracije surfaktanata mogu dovesti do iritacije u GI traktu. Pokazano je da micelarna solubilizacija lipofilnih lekovitih supstanci sa visokim koncentracijama surfaktanata značajno smanjuje slobodnu frakciju lekovite supstance i stepen apsorpcije (Chiu i sar., 2003). Chiu i saradnici (2003) su pokazali da u prisustvu 0,2% makrogol-35 ricinusovog ulja (Cremophor® EL) dolazi do značajnog smanjenja permeabilnosti ciklosporina A, što je potvrdilo pretpostavku da micelarna solubilizacija ciklosporina A smanjuje slobodnu frakciju ove supstance. Iako je ovaj surfaktant i inhibitor P-glikoproteina, transportera lokalizovanog u apikalnoj membrani epitelnih ćelija intestinuma, koji je odgovoran za efluks različitih supstrata (supstanci) iz ćelije, pa samim tim utiče i na povećanje permeabilnosti ciklosporina A, smatra se da je efekat micelarne solubilizacije značajniji i odgovoran za ukupno smanjenje permeabilnosti ciklosporina A (Chiu i sar., 2003).

Surfaktanti, osim svoje tradicionalne uloge da solubilizuju lekovite supstance, imaju i uticaj na biofarmaceutske osobine lekovitih supstanci. Naime, surfaktanti mogu da povećaju apsorpciju lekovite supstance usled promene u permeabilnosti bioloških membrana (Shobhit i sar., 2012). Surfaktanti niske HLB vrednosti mogu da penetriraju i fluidiziraju biološke membrane, dok surfaktanti rastvorljivi u vodi imaju mogućnost solubilizacije komponenti bioloških membrana. Pokazano je da kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi (Labrasol®) povećavaju apsorpciju lekovitih supstanci, kao što su vankomicin i gentamicin, tako što povećavaju fluidnost bioloških membrana i posledično transcelularni transport lekovite supstance (Hu i sar., 2001; Koga i sar., 2006; Prasad i sar., 2003). McCartney i saradnici (2019) su koristeći *ex vivo* i *in situ* metode pokazali da kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi dovode do reverzibilnog otvaranja „tesnih veza“ (engl. *tight junctions*) između ćelija intestinalnog epitela kako bi omogućili prolazak insulina paracelularnim transportom. Dodatno, na povećanje intestinalne apsorpcije lekovite supstance u prisustvu kaprilokaproil makrogol-8 glicerida utiče i njihova sposobnost da inhibiraju P-glikoprotein u epitelnim ćelijama intestinuma, koji je odgovoran za efluks supstrata iz ćelija (Hu i sar., 2001). U studiji koju su sprovedi Hu i saradnici (2001) je pokazano da kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi povećavaju biološku raspoloživost gentamicina za 54,2%, što je značajno više u poređenju sa drugim nejonskim surfaktantom, polisorbitom 80 (Tween® 80), koji povećava biološku raspoloživost za 8,4%.

Jedan od često korišćenih lipofilnih surfaktanata u formulaciji SMEDDS je propilenglikol monokaprilat (Capryol™ 90). Novija istraživanja (Ukai i sar., 2020b) na pacovima pokazuju da propilenglikol monokaprilat povećava intestinalnu apsorpciju insulina. Efekat propilenglikol monokaprilata na povećanje intestinalne apsorpcije insulina je reverzibilan, a zavisi od upotrebene koncentracije. Takođe, efekat zavisi i od mesta apsorpcije, s obzirom da je pokazano da je povećanje apsorpcije insulina veće iz debelog creva, u poređenju sa tankim crevom, verovatno iz razloga što debelo crevo ima nižu aktivnost proteolitičkih enzima (Ukai i sar., 2020b). Mogući mehanizam kojim se može objasniti ovaj fenomen je povećana fluidnost membrana intestinalnog epitela u prisustvu propilenglikol monokaprilata, čime se povećava apsorpcija insulina transcelularnim putem. Takođe, povećanje apsorpcije insulina može se objasniti i otvaranjem „tesnih veza“ između epitelih ćelija intestinuma, što omogućava da se apsorpcija insulina odvija paracelularnim putem (Ukai i sar., 2020a). Navedeni autori (Ukai, 2020b) su pokazali da se dva surfaktanta istog naziva, propilenglikol monokaprilat, a različitih zaštićenih imena (Capryol™ 90 i Capryol™ PGMC), razlikuju u stepenu povećanja intestinalne apsorpcije insulina, što se objašnjava različitim hemijskim sastavom navedenih surfaktanata, odnosno različitim udelima monoestara kaprilne kiseline. Capryol™ 90, sa većim udelom monoestara (94%), pokazao je veći efekat na povećanje apsorpcije, u poređenju sa Capryol™ PGMC, koji ima manji udeo monoestara (64%). Stoga se može zaključiti da visok sadržaj monoestara kaprilne kiseline predstavlja ključni faktor odgovoran za povećanje apsorpcije lekovitih supstanci. Takođe, pokazano je da Capryol™ 90 efikasnije povećava apsorpciju insulina u poređenju sa drugim ekscipijensima koji se uobičajeno koriste u formulaciji SMEDDS, kao što su:

kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi (Labrasol[®]), propilenglikol monolaurat (Lauroglycol[®] 90 i Lauroglycol[®] FCC) i oleoil makrogol-6 gliceridi (Labrafil[®]) (Ukai, 2020b).

Određeni polioksietilenski surfaktanti, kao što su etoksilovani derivati ricinusovog ulja (Cremophor[®]), polisorbitat 80 i makrogol 15 hidrosistearat (Solutol[®] HS 15, sadašnji naziv Koliphor[®] HS 15), mogu da stupe u interakcije sa specifičnim proteinima eksprimiranim na apikalnoj membrani epitelnih ćelija intestinuma (Gurjar i sar., 2018; Hanke i sar., 2010; Hugger i sar., 2002; Shono i sar., 2004). U studiji Huggera i saradnika (2002) pokazano je da makrogol-35 ricinusovo ulje (Cremophor[®] EL), u koncentraciji 0,1% i polisorbitat 80 (Tween[®] 80), u koncentraciji 0,05%, delimično inhibiraju P-glikoprotein u Caco-2 ćelijama, dok u ćelijama MDCK-MDR1 nije pokazana inhibitorna aktivnost. Međutim, rezultati istraživanja drugih autora (Hanke i sar., 2010) su pokazali da pomenuti surfaktanti, u opsegu koncentracija 0,01-0,1%, ispoljavaju inhibitornu aktivnost prema P-glikoproteinu upravo na MDCK-ABCB1 ćelijama. Gurjar i saradnici (2018) su procenjivali inhibitorni efekat različitih surfaktanata prema P-glikoproteinu merenjem ćelijske akumulacije supstrata digoksina, na MDCK-MDR1 ćelijama. Izračunavanjem srednje inhibitorne koncentracije (IC₅₀), parametara koji pokazuje potentnost ekscipijensa da inhibira P-glikoprotein, pokazano je da najveću inhibitornu aktivnost ima makrogol-35 ricinusovo ulje (IC₅₀ = 11,92 μmol/L), zatim polisorbitat 80 (IC₅₀ = 45,29 μmol/L) i na kraju makrogol 15 hidrosistearat (IC₅₀ = 179,80 μmol/L) (Gurjar i sar., 2018). Dodatno, ovi rezultati ukazuju da sposobnost polioksietilenskih surfaktanata da inhibiraju P-glikoprotein zavisi od tipa ćelijskog modela korišćenog u studiji. Efekat inhibicije P-glikoproteina je uočen pri koncentracijama nižim od CMC ovih surfaktanata, što ukazuje da su pojedinačni molekuli surfaktanta odgovorni za inhibiciju P-glikoproteina (Hugger i sar., 2002).

Iako je za većinu lekovitih supstanci prethodno opisan fenomen značajan i može se iskoristiti kao prednost u formulaciji, treba voditi računa da povećanje biološke raspoloživosti u određenim slučajevima može dovesti i do povećanja toksičnosti lekovite supstance. Takođe, postoje podaci da određeni surfaktanti mogu da utiču na aktivnost metaboličkih enzima i transportera, što rezultira izmenjenom farmakokinetikom lekovitih supstanci (Gurjar i sar., 2018).

Važnu ulogu u *in vivo* solubilizaciji SMEDDS ima i sposobnost ekscipijenasa da podležu digestiji u GI traktu. Cuié i saradnici (2008) su pokazali da su nejonski polioksietilenski surfaktanti, makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (Cremophor[®] RH40), makrogol-35 ricinusovo ulje (Cremophor[®] EL), polisorbitat 80 (Tween[®] 80) i kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi (Labrasol[®]) svarljivi, pri čemu je makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje manje podložan digestiji u poređenju sa ostalim navedenim surfaktantima. Interesantno je da makrogolgliceridi, makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje i makrogol-35 ricinusovo ulje, iako strukturno slični, nisu na isti način podložni digestiji u GI traktu. Pokazano je da je makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje manje podložno digestiji od makrogol-35 ricinusovog ulja. Iako ove razlike nisu u potpunosti objašnjene, pretpostavlja se da veći broj etilenoksidnih jedinica makrogol-40 hidrogenizovanog ricinusovog ulja (40) u poređenju sa makrogol-35 ricinusovim uljem (35) može sterno da ometa prilaz pankreasne lipaze, koja je odgovorna za digestiju. Takođe, pomenuta razlika u procesu digestije se može objasniti i činjenicom da se u strukturi makrogol-40 hidrogenizovanog ricinusovog ulja nalazi hidrogenizovano ricinusovo ulje koje je teže svarljivo, u poređenju sa makrogol-35 ricinusovim uljem, koji sadrži nezasićeno ricinusovo ulje koje se lakše vari. U modelu *in vitro* digestije je uočeno da prisustvo velike količine svarljivih surfaktanata dovodi do smanjenja kapaciteta solubilizacije SEDDS-a i potencijalne precipitacije supstance. Ovo je pokazano poređenjem dve formulacije SEDDS koje sadrže isti udeo (55%) makrogol-40 hidrogenizovanog ricinusovog ulja i makrogol-35 ricinusovog ulja, pri čemu se veća precipitacija danazola dešavala nakon razblaživanja i digestije formulacije koja sadrži makrogol-35 ricinusovo ulje. Rezultati *in vivo* studije na psima su pokazali da je biološka raspoloživost danazola dva puta veća nakon peroralne primene SEDDS koje sadrže 55% makrogol-40 hidrogenizovanog ricinusovog ulju u poređenju sa formulacijom koja sadrži isti udeo makrogol-35 ricinusovog ulja. Ovi podaci sugerišu da ukoliko se u formulaciji koriste velike

količine svarljivih surfaktanata, njihova digestija dovodi do značajnog gubitka kapaciteta za solubilizaciju lekovite supstance i posledično, do smanjenja biološke raspoloživosti (Cuiné i sar., 2008).

U formulaciji SMEDDS često nije dovoljno prisustvo samo jednog surfaktanta, već je potrebno i prisustvo drugog surfaktanta ili hidrofilnog korastvarača (jednim imenom se nazvaju kosurfaktanti), da bi se nakon razblaženja vodom/GI tečnostima postiglo veće smanjenje međupovršinskog napona. Dodavanjem kosurfaktanta nastaje međupovršinski film odgovarajuće fluidnosti između dispergovanih kapi (uljane faze) i spoljašnje (vodene) faze, što dovodi do smanjenja prečnika kapi i povećanja stepena solubilizacije lekovite supstance (Patel i Sawant, 2009). Često korišćeni hidrofilni korastvarači u formulaciji SMEDDS su alkoholi kratke dužine lanaca (C3-C8), kao što su etanol, n-butanol, propilenglikol i polietilenglikol (Akula i sar., 2014; Kohli i sar., 2010). Dodatak alkohola kratke dužine lanaca omogućava nastajanje fleksibilnog međupovršinskog filma (Bagwe i sar, 2001). Međutim, alkoholi kratke dužine lanaca mogu da se adsorbuju na omotač kapsule, u koje se SMEDDS najčešće pune i prouzrokuju precipitaciju lekovite supstance (Pouton i Porter, 2008).

U tabeli 1.3 dat je prikaz savremenih ekscipijenasa za formulaciju SMEDDS za peroralnu primenu.

Tabela 1.3. Savremeni ekscipijensi za formulaciju SMEDDS za peroralnu primenu (Nardin i Köllner, 2019; Rahman i sar., 2012)

Zaštićen naziv ekscipijensa (proizvođač, zemlja)	Farmakopejski naziv [sastav]	HLB	Uloga u SMEDDS	Farmakopejski status
Captex [®] 200 (Abitec Corporation, SAD)	Propilenglikol dikaprilati/dikapрати	/	uljana faza	Ph. Eur.*
Captex [®] 300 (Abitec Corporation, SAD)	Trigliceridi srednje dužine lanaca	1	uljana faza	Ph. Eur.
Imwitor [®] 742 (IOI Oleo GmbH, Nemačka)	Mono-, di- i trigliceridi kaprilne i kaprinske kiseline [45-55% monogliceridi]	4	uljana faza	USP-NF**
Labrafac [®] Lipophile WL (Gattefossé, Francuska)	Trigliceridi srednje dužine lanaca [kaprilna kiselina 50-80% i kaprinska kiselina 20-50%]	1	uljana faza	Ph. Eur., USP-NF
Labrafac [®] PG (Gattefossé, Francuska)	Propilenglikol dikaprilokaprilat	1	uljana faza	USP-NF
Maisine [™] 35-1 (Gattefossé, Francuska)	Gliceril monolinoleat [linoleinska kiselina > 50%; oleinska kiselina 10-35%; stearinska kiselina < 6%; palimitinska kiselina 4-20%]	1	uljana faza	Ph. Eur., USP-NF
Miglyol [®] 810 (IOI Oleo GmbH, Nemačka)	Trigliceridi srednje dužine lanaca [kaprilna kiselina 65-80%; kaprinska kiselina 20-35%]	/	uljana faza	Ph.Eur., USP-NF
Miglyol [®] 812 (IOI Oleo GmbH, Nemačka)	Trigliceridi srednje dužine lanaca [kaprilna kiselina 50-65%; kaprinska kiselina 30-45%]	/	uljana faza	Ph.Eur., USP-NF
Miglyol [®] 840 (IOI Oleo GmbH, Nemačka)	Propilenglikol dikaprilokaprilat	/	uljana faza	Ph.Eur., USP-NF
Miglyol [®] 818 (IOI Oleo GmbH, Nemačka)	Trigliceridi srednje dužine lanaca [kaprilna kiselina 45-65%; kaprinska kiselina 30-45%; linoleinska kiselina 2-5%]	/	uljana faza	/
Peceol [®] (Gattefossé, Francuska)	Gliceril monooleat [oleinska kiselina > 60%; linoleinska kiselina < 35%; stearinska kiselina < 6%; palmitinska kiselina < 12%]	1	uljana faza	Ph. Eur., USP-NF
Capmul [®] PG-12 (Abitec Corporation, SAD)	Propilenglikol monolaurat, tip II	4,5	uljana faza/kosurfakant	Ph. Eur., USP-NF
Capmul [®] PG-8 (Abitec Corporation, SAD)	Propilenglikol monokaprilat, tip II	6,7	uljana faza/kosurfakant	Ph. Eur., USP-NF
Capmul [®] MCM (Abitec Corporation, SAD)	Gliceril monokaprilati [monogliceridi 58%, digliceridi 36%, trigliceridi 5%; kaprilna kiselina 80%, kaprinska kiselina 20%]	5-6	uljana faza/kosurfakant	Ph.Eur.
Capmul [®] MCM C8 (Abitec Corporation, SAD)	Gliceril monokaprilat [monogliceridi 68%, digliceridi 27%, trigliceridi 3%; kaprilna kiselina > 95%, kaprinska kiselina 3%]	5-6	uljana faza/kosurfakant	Ph.Eur.

Zaštićen naziv ekscipijensa (proizvođač, zemlja)	Farmakopejski naziv [sastav]	HLB	Uloga u SMEDDS	Farmakopejski status
Capmul [®] MCM C10 (Abitec Corporation, SAD)	Gliceril monokaprilat [monogliceridi > 45%; kaprinska kiselina > 45%]	5-6	uljana faza/kosurfaktant	Ph.Eur.
Capryol [™] PGMC (Gattefossé, Francuska)	Propilenglikol monokaprilat, tip I [> 60% monoestri kaprinske kiseline]	6	uljana faza/kosurfaktant	USP-NF
Capryol [™] 90 (Gattefossé, Francuska)	Propilenglikol monokaprilat, tip II [> 90% monoestri kaprinske kiseline]	6	uljana faza/kosurfaktant	USP-NF
Imwitor [®] 988 (IOI Oleo GmbH, Nemačka)	Gliceril monokaprilat tip I [monogliceridi 45-75%, digliceridi 20-50%]	5-6	uljana faza/kosurfaktant	Ph. Eur., USP-NF
Imwitor [®] 308 IOI Oleo GmbH, Nemačka)	Gliceril monokaprilat tip II [monogliceridi > 80%, digliceridi max 10%]	6-7	uljana faza/kosurfaktant	Ph. Eur., USP-NF
Labrafil [®] M 2130 CS (Gattefossé, Francuska)	Lauroil makrogol-6 gliceridi [laurinska kiselina i stearinska kiselina]	9	uljana faza/kosurfaktant	Ph. Eur.
Labrafil [®] M 2125 CS (Gattefossé, Francuska)	Linoleoil makrogol-6 gliceridi [oleinska kiselina 24-34% i linoleinska kiselina 53-63%]	9	uljana faza/kosurfaktant	Ph. Eur., USP-NF
Labrafil [®] M 1944 CS (Gattefossé, Francuska)	Oleoil makrogol-6 gliceridi [oleinska kiselina 58-68% i linoleinska kiselina 22-32%]	9	uljana faza/kosurfaktant	Ph. Eur., USP-NF
Labrafac [®] CM 10 (Gattefossé, Francuska)	C8-C10 poliglikozidni gliceridi [kaprilna kiselina 50% i kaprinska kiselina 50%]	10	uljana faza/kosurfaktant	/
Labrafil [®] WL 2609 BS (Gattefossé, Francuska)	Linoleoil makrogol gliceridi [oleinska kiselina 24-34% i linoleinska kiselina 53-63%]	6	uljana faza/kosurfaktant	/
Lauroglycol [™] FCC (Gattefossé, Francuska)	Propilenglikol monolaurat, tip I [monoestri laurinske kiseline 45-70%, 30-55% diestri laurinske kiseline]	3	uljana faza/kosurfaktant	Ph. Eur.
Lauroglycol [™] 90 (Gattefossé, Francuska)	Propilenglikol monolaurat, tip II [monoestri laurinske kiseline > 90%]	3	uljana faza/kosurfaktant	Ph. Eur.
Acconon [®] CC-6 (Abitec Corporation, SAD)	Kaprilokaproil makrogol-6 gliceridi	12,5	surfaktant	Ph.Eur., USP-NF
Acconon [®] MC-82 (Abitec Corporation, SAD)	Kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi	14	surfaktant	Ph.Eur., USP-NF
Cremphor [®] EL (BASF, Nemačka)	Makrogol-35 ricinusovo ulje	12-14	surfaktant	Ph. Eur., USP

Zaštićen naziv ekscipijensa (proizvođač, zemlja)	Farmakopejski naziv [sastav]	HLB	Uloga u SMEDDS	Farmakopejski status
Cremophor [®] RH 40 (BASF, Nemačka)	Makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje	14-16	surfaktant	Ph. Eur., USP
Cremophor [®] A25 (BASF, Nemačka)	Makrogol-25 cetostearil etar [stearinska kiselina i cetil alkohol]	15-17	surfaktant	Ph. Eur., USP
Gelucire [®] 44/14 (Gattefossé, Francuska)	Lauroil makrogol gliceridi [laurinska kiselina 40-50%; miristinska kiselina 14-24%; kaprilna kiselina 4-10%, kaprinska kiselina 3-9%, palmitinska kiselina 4-14%, stearinska kiselina 5-15%]	14	surfaktant	Ph.Eur., USP-NF
Gelucire [®] 50/13 (Gattefossé, Francuska)	Stearoil makrogol-32 gliceridi [palmitinska kiselina 40-50%; stearinska kiselina 48-58%]	13	surfaktant	Ph.Eur., USP-NF
Labrasol [®] (Gattefossé, Francuska)	Kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi [kaprilna kiselina 50-80% i kaprinska kiselina 20-50%]	12	surfaktant	USP-NF
Polisorbat 80 (Croda, Velika Britanija)	Polisorbat 80	15	surfaktant	Ph.Eur., USP-NF
Vitamin E [®] TPGS (BASF, Nemačka)	d- α -tokoferil polietilenglikol 1000 sukcinat	13	surfaktant	USP-NF
Imwitor [®] 928 (IOI Oleo GmBH, Nemačka)	Mono-, di- i trigliceridi zasićenih masnih kiselina kokosovog ulja [40% monogliceridi]	3-4	kosurfaktant	USP-NF
Plurol [®] Diisostearate (Gattefossé, Francuska)	Poligliceril-3 diizostearat	4,5	kosurfaktant	Ph.Eur.
Plurol Oleique [®] CC497 (Gattefossé, Francuska)	Poligliceril-3 dioleat	3	kosurfaktant	USP-NF
Transcutol [®] HP (Gattefossé, Francuska)	Dietilen glikol monoetil etar (> 99,9% visokoprečišćeni)	/	korastvarač	Ph.Eur., USP-NF
Transcutol [®] P (Gattefossé, Francuska)	Dietilen glikol monoetil etar	/	korastvarač	Ph.Eur., USP-NF

* Evropska farmakopeja (engl. *The European Pharmacopoeia*, skr. *Ph.Eur.*)

** Američka farmakopeja (engl. *The United States Pharmacopoeia – National Formulary*, skr. *USP-NF*)

1.1.5. Razvoj i karakterizacija SMEDDS

Poznato je da samo određene kombinacije ekscipijenasa mogu formirati SMEDDS. Da bi se bolje razumelo ponašanje SMEDDS nakon razblaživanja GI tečnostima, od izuzetne je važnosti da se dobijeni nosači za peroralnu primenu lekovite supstance opišu sa aspekta rastvorljivosti lekovite supstance u ekscipijensima koje ulaze u sastav SMEDDS, sposobnosti samoemulgovanja komponenti SMEDDS, brzine rastvaranja lekovite supstance iz ovih sistema, kao i njihove stabilnosti.

1.1.5.1. Mehanizam samoemulgovanja

Do samoemulgovanja dolazi kada je energija, potrebna za dispergovanje, veća od energije koja je neophodna za formiranje kapi. Slobodna energija emulzija je funkcija međupovršinske energije i može se opisati sledećom jednačinom (Reiss, 1975):

$$\Delta G = \sum N\pi r^2\sigma \quad (1)$$

gde su ΔG - slobodna energija, N - broj kapi, r - prečnik kapi, a σ - međupovršinska energija.

Jednačina (1) pokazuje da što je niža međupovršinska energija, to je niža i slobodna energija. Slobodna energija konvencionalne emulzije (makroemulzije) direktno zavisi od energije neophodne za formiranje nove površine između uljane i vodene faze. To znači da je slobodna energija kod emulzija vrlo visoka, budući da je neophodna velika energija kako bi se obrazovala nova površina između dve faze. Usled velike slobodne energije, konvencionalne emulzije nisu stabilne i dve faze vremenom teže da se razdvoje, kako bi se smanjila dodirna površina, a samim tim i slobodna energija sistema. Uloga surfaktanta (emulgatora) u emulziji je da formira međupovršinski film i smanji međupovršinski napon (Gursoy i Benita, 2004).

Za razliku od konvencionalnih emulzija, dodatkom SMEDDS spoljašnoj (vodenoj) fazi, uz blago mešanje, spontano nastaje mikroemulzija, jer je energija neophodna da bi se formirala mikroemulzija veoma niska ili čak negativna. U procesu samomikroemulgovanja dolazi do formiranja međupovršinskog filma na površini uljanih kapi. Daljom penetracijom vode kroz međupovršinski film dolazi do formiranja dispergovane tečnokristalne faze, čiji udeo zavisi od vrste i koncentracije surfaktanta. Formiranjem faza tečnih kristala na površini kapi one postaju otpornije na koalescenciju (Gursoy i Benita, 2004). Nastale mikroemulzije su termodinamički stabilni sistemi, koji se nalaze u stanju ravnoteže, tokom koje se kontinuirano odvijaju procesi spajanja malih kapi ulja u veće i fragmentacija velikih kapi ulja u manje kapi (Bagwe i sar., 2001). Dodatak lekovite supstance u sistem može da uzrokuje promenu faznog ponašanja usled njene interakcije sa komponentama SMEDDS. Ovaj uticaj je naročito izražen kod SMEDDS koje imaju mnogo manje kapi, u poređenju sa drugim samoemulgujućim formulacijama. Da bi se odredio uticaj inkorporirane supstance na sposobnost samoemulgovanja SMEDDS potrebno je sprovesti preformulacione studije, koje podrazumevaju određivanje rastvorljivosti lekovite supstance u komponentama SMEDDS i konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama (Gursoy i Benita, 2004). Bandivadeka i saradnici (2012) su proučavali efekat inkorporiranja atorvastatina na veličinu kapi i zaključili da povećanje količine lekovite supstance dovodi do povećanja veličine kapi SMEDDS. Ukoliko lekovita supstanca može da formira vodonične veze sa etoksilovanim lancima surfaktanta, to može uticati na povećanje veličine kapi SMEDDS. Sa druge strane, ukoliko je lekovita supstanca visoko lipofilna i nema sposobnost formiranja vodoničnih veza, dodatak lekovite supstance, čak i u visokim koncentracijama, imaće neznatan efekat na veličinu kapi SMEDDS (Pouton i Porter, 2008).

1.1.5.2. Studije rastvorljivosti

Izbor odgovarajućih ekscipijenasa koji ulaze u sastav SMEDDS je složen zadatak, koji zahteva poznavanje fizičko-hemijskih osobina ekscipijenasa, lekovite supstance, kao i faznog ponašanja sistema u kojima su ekscipijensi u različitim odnosima. Zato se prilikom razvoja SMEDDS najpre mora razmotriti rastvorljivost lekovite supstance u različitim uljima, surfaktantima/kosurfaktantima i korastvaračima (Sharma i sar., 2016).

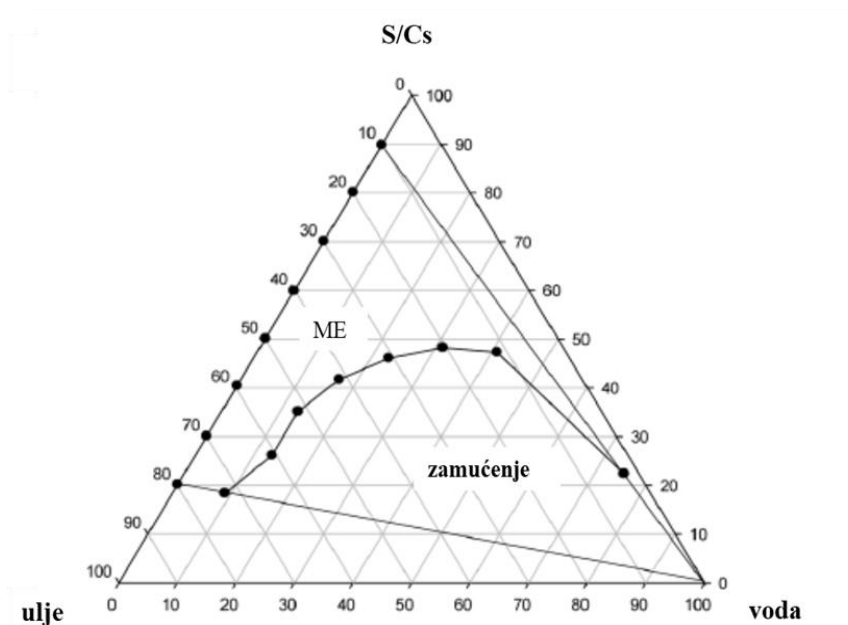
Određivanje rastvorljivosti lekovite supstance u odabranim ekscipijensima se izvodi sa ciljem odabira uljane faze koja najbolje rastvara određenu lekovitu supstancu, kao i surfaktanta, odnosno kosurfaktanta koji imaju najveći kapacitet za rastvaranje lekovite supstance (Singh i sar., 2009). Veoma je značajno odrediti optimalni udeo lekovite supstance u formulaciji, kako bi se smanjila mogućnost precipitacije lekovite supstance nakon razblaživanja SMEDDS-a u vodenim medijumom (Pouton, 2000). Ispitivanje rastvorljivosti se obično izvodi *shake flask* metodom u kojoj se lekovita supstanca dodaje u višku ispitivanim ekscipijensima, a nakon toga mučka u termostatiranom vodenom kupatilu ili na šejkeru, na sobnoj temperaturi, do postizanja stanja ravnoteže (obično 48 h). Uzorci se zatim centrifugiraju i filtriraju, a sadržaj lekovite supstance se određuje odgovarajućom analitičkom metodom (Akula i sar., 2014; Priyanka i Divyesh, 2018)

1.1.5.3. Studije faznog ponašanja

Drugi korak u razvoju SMEDDS predstavljaju studije faznog ponašanja. Konstruisanje faznih dijagrama i određivanje mikroemulzione oblasti primenjuje se za određivanje optimalnog udela sastojaka u formulaciji (Kohli i sar., 2010; Kollipara i Gandhi, 2014; Müllertz i sar., 2010).

Fazni dijagrami predstavljaju dijagrame pomoću kojih se mogu opisati fazne promene do kojih dolazi razblaživanjem SMEDDS vodom. Za konstruisanje faznih dijagrama najčešće se koristi titraciona metoda, odnosno dodavanje vodene faze u SMEDDS u određenim količinama („porcijama“), uz mešanje i vizuelno posmatranje bistrine i viskoziteta. Koristeći podatke dobijene titracijom SMEDDS, konstruišu se fazni dijagrami, najčešće primenom odgovarajućih kompjuterskih programa. Kako je navedeno, da bi se formirala mikroemulzija veoma često je u formulaciji, osim primarnog surfaktanta (S), prisutan i kosurfaktant (Cs). U tim slučajevima, smeša surfaktant/kosurfaktant (S/Cs) se u faznom dijagramu predstavlja kao jedna promenljiva, tzv. „pseudokomponenta“. Takav fazni dijagram se označava kao pseudodijagram. Najčešće se u ispitivanju faznog ponašanja koristi fazni dijagram tipa jednakostraničnog trougla, u čijim vrhovima se nalaze ulje, voda i smeša S/Cs, sa udelima 100% (slika 1.2). Pomeranjem od vrha trougla smanjuje se udeo te komponente, a povećava se udeo ostale dve komponente. Svaka tačka unutar trougla predstavlja potencijalni sastav smeše. Spajanjem ovih tačaka dobija se mikroemulziona oblast. Veća mikroemulziona oblast ukazuje na dobru sposobnost samoemulgovanja sistema (Akula i sar., 2014, Rajpoot i sar., 2020).

Na slici 1.2 dat je primer SMEDDS, koji se sastoji od propilenglikol monokaprilata (Capryol™ 90) kao uljane faze, kaprilokaproil makrogol-6 glicerida kao surfaktanta (Labrasol®) i dietilenglikol monoetil etra (Transcutol® HP) kao kosurfaktanta, u S/Cs odnosu 1:1. Fazno ponašanje smeše dva surfaktanta je znatno kompleksnije u odnosu na fazno ponašanje pojedinačnog surfaktanta, jer se površinska aktivnost smeše surfaktanata znatno razlikuje u odnosu na površinsku aktivnost pojedinačnog surfaktanta (Hong i sar., 2016).



Slika 1.2. Shematski prikaz pseudoternarnog faznog dijagrama (ME = mikroemulziona oblast) (prilagođeno iz Hong i sar., 2016)

Kako bi se utvrdio efekat dodavanja lekovite supstance u SMEDDS često se pseudoternarni fazni dijagrami konstruišu i u prisustvu lekovite supstance. Kao optimalni odnos komponenti u SMEDDS bira se onaj koji pri beskonačnom razblaživanju vodom ostaje bistar (Dixit i sar., 2010).

1.1.5.4. Metode karakterizacije SMEDDS

Nakon određivanja optimalnih udela vode, ulja i S/Cs smeše, koji daju SMEDDS, uobičajeno se pristupa *in vitro* karakterizaciji ovih sistema. Uobičajene metode za karakterizaciju SMEDDS su: metoda razblaživanja, procena samoemulgovanja, određivanje veličine i raspodele veličine kapi, *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance, kao i ispitivanje stabilnosti. Iako su neke od navednih metoda veoma jednostavne (npr. metoda razblaživanja i procena samoemulgovanja) ove metode su od izuzetnog značaja kako bi se procenila sposobnost samoemulgovanja sistema (Müllertz i sar., 2010; Kuentz, 2012, Rajpoot i sar., 2020).

Metode razblaživanja

Metode razblaživanja SMEDDS sprovode se razblaživanjem uzoraka sa lekovitom supstancom u različitim odnosima prečišćenom vodom, simuliranom želudačnom tečnošću (engl. *simulated gastric fluid*, skr. *SGF*), ili simuliranom intestinalnom tečnošću (engl. *simulated intestinal fluid*, skr. *SIF*) kako bi se oponašali uslovi u GI traktu (Bandivadeka i sar., 2012). Odsudstvo zamućenja nakon razblaživanja ukazuje da ne dolazi do precipitacije lekovite supstance (Singh i sar., 2008). Smatra se da se razblaživanjem u odnosu 1:100 postižu uslovi koji odgovaraju *in vivo* uslovima (Li i sar., 2005). Iako se uticaj pH sredine na samoemulgovanje SMEDDS može odrediti korišćenjem različitih medijuma, pokazano je da kod formulacija koje sadrže nejonske surfaktante nema razlike u procesu emulgovanja, bez obzira da li se dispeguju u vodi ili simuliranim biološkim tečnostima (Qureshi i sar., 2015). Procena uticaja razblaživanja na SMEDDS može se izvršiti vizuelno (posmatranjem promene bistrine), kao i spektrofotometrijskim merenjem transparentije (Bakhle i Avari, 2015). Vrednosti transparentije blizu 100% ukazuju da je nastala mikroemulzija (Singh i sar., 2009).

Procena samoemulgovanja

Procena samoemulgovanja SMEDDS, koji sadrže lekovitu supstancu, uobičajeno se izvodi dispergovanjem SMEDDS u vodenom medijumu pomoću standardne aparature za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance, sa rotirajućom lopaticom, pri brzini 50 obr/min i na temperaturi od 37 °C (Balakrishnan i sar., 2009). Na brzinu samoemulgovanja utiču vrsta uljane faze i odnos uljane i surfaktantne faze (Singh i sar., 2008).

Određivanje veličine i raspodele veličine kapi

Za mikroemulziju, nastalu razblaživanjem SMEDDS vodenim medijumom, od izuzetnog značaja je poznavanje veličine kapi, kao i raspodele veličina kapi (indeks polidisperziteta, engl. *polydispersity index*, skr. *PDI*), koja ukazuje na homogenost nastale mikroemulzije. Istraživanja su pokazala da od veličine kapi zavisi brzina oslobađanja lekovite supstance, a samim tim i apsorpcija lekovite supstance (Gurram i sar., 2015; Song i sar., 2014). Za određivanje veličine kapi i PDI uobičajeno se koristi uređaj Zetasizer, čiji rad se zasniva na tehnici fotonske korelacione spektroskopije (engl. *Photon Correlation Spectroscopy*, skr. *PCS*) (Borhade i sar., 2008; Kohli i sar., 2010, Rajpoot i sar., 2020).

Određivanje *in vitro* brzine rastvaranja lekovite supstance iz SMEDDS

Nakon razmatranja fizičko-hemijskih osobina SMEDDS i odabira optimalnih formulacija za peroralnu primenu, potrebno je odgovarajućom metodom odrediti *in vitro* brzinu rastvaranja lekovite supstance iz ovih formulacija (Hauss, 2007). Cilj *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance je da se proceni ponašanje lekovite supstance *in vivo* i prepoznaju mogući problemi vezani za njenu biološku raspoloživost. Ph.Eur.10.0 propisuje aparature za izvođenje ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz određenih farmaceutskih preparata, kao i opšte zahteve za ovo ispitivanje. U dosadašnjim istraživanjima su se za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz SMEDDS punjenih u kapsule najviše koristile aparatura za rotirajućom lopaticom (Assi i sar., 2020; Baek i sar., 2013; Balakrishnan i sar., 2009; Qureshi i sar., 2015; Singh i sar., 2009) i aparatura sa rotirajućom korpicom (Chudasama i sar., 2015; Kang i sar., 2004; Madan i sar., 2019; Sriamornsak i sar., 2015). Razvoj metode i odabir eksperimentalnih uslova za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance zavisi od osobina lekovite supstance, vrste farmaceutskog preparata i svrhe ispitivanja.

Nakon peroralne primene preparata tipa SMEDDS dolazi do digestije lipida, koji ulaze u njihov sastav i formiranja različitih koloidnih struktura. Smatra se da se lekovita supstanca nalazi u mešanim micelama pre nego što se apsorbuje. Konvencionalne metode za ispitivanje brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz preparata za peroralnu primenu često nisu adekvatne za *in vitro* procenu samoemulgujućih sistema, jer ne uzimaju u obzir da ekscipijensi mogu biti skloni lipolitičkoj hidrolizi u GI traktu. Stoga, *in vitro* lipolitički modeli imaju važnu ulogu u objašnjavanju oslobađanja lekovite supstance iz samoemulgujućih sistema, kao i u postizanju racionalnog pristupa u razvoju ovih sistema. *In vivo* digestija lipida obuhvata veliki broj složenih procesa, a da bi se *in vitro* lipolizom dobile korisne informacije važno je da eksperimentalni uslovi budu što bliži *in vivo* uslovima. *In vitro* lipoliza izvodi se u medijumu koji sadrži žučne soli, fosfolipide i pankreatin svinjskog porekla, kao izvor pankreasnih enzima (pankreasna lipaza/kolipaza, fosfolipaza A2 i holesterol esteraza), u termostatiranoj posudi pri određenoj brzini mešanja. Najveći broj istraživanja je bio usmeren ka razvoju *in vitro* lipolitičkih modela, koji podražavaju lipolizu u proksimalnim delovima tankog creva. Međutim, značaj lipolize u želucu, koju katalizuje želudačna lipaza, takođe je značajan, pa su razvijeni i modeli koji obuhvataju lipolizu i u želucu i u tankom crevu (Larsen i sar., 2011).

Ispitivanje stabilnosti

Studije stabilnosti se uobičajeno sprovode kod uzoraka SMEDDS, punjenih u kapsule, prema ICH (engl. *International Conference on Harmonization*, skr. *ICH*) smernicama. Tokom studija stabilnosti, u određenim vremenskim intervalima ispituje se da li je došlo do promene izgleda uzorka, sadržaja lekovite supstance, veličine kapi nakon razblaživanja, kao i profila *in vitro* brzine rastvaranja lekovite supstance. Ukoliko nije došlo do promene praćenih parametara tokom studija stabilnosti, smatra se da je SMEDDS pokazao dobru stabilnost (Baek i sar., 2013; Borhade i sar., 2008; Singh i sar., 2008).

1.1.6. Prednosti lipidnih formulacija tipa SMEDDS

Formulisanje farmaceutskih preparata sa SMEDDS može da omogući sledeće prednosti:

- Iritacija GI trakta, izazvana produženim kontaktom lekovite supstance sa intestinalnim epitelom, može se smanjiti primenom SMEDDS. Nakon razblaživanja SMEDDS u GI sredini, lekovita supstanca se u obliku malih kapi prenosi duž GI trakta, čime se smanjuje njen iritacioni potencijal (Jing-ling i sar., 2007);
- Nakon razblaživanja SMEDDS vodenim medijumima, formiraju se male kapi sa velikom međupovršinom, što omogućava solubilizaciju lipofilne lekovite supstance u vodenoj fazi (Jing-ling i sar., 2007);
- Prednost SMEDDS u odnosu na emulzije je veća stabilnost, jednostavniji proizvodni proces i kraće vreme potrebno za izradu/proizvodnju (Gursoy i Benita, 2004);
- Formulisanjem SMEDDS može se povećati brzina rastvaranja, a samim tim i apsorpcija lekovite supstance (Gurram i sar., 2015);
- Određeni surfaktanti, koji se koriste u formulaciji SMEDDS, kao što su kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi (Labrasol[®]) i propilenglikol monokaprilat (Capryol[™] 90), mogu da povećavaju apsorpciju lekovitih supstanci transcelularnim transportom, povećanjem fluidnosti bioloških membrana (Hu i sar., 2001; Koga i sar., 2006; Prasad i sar., 2003; Ukai i sar., 2020a). Takođe, smatra se da navedeni surfaktanti dodatno povećavaju apsorpciju lekovite supstance povećanjem paracelularnog transporta, otvaranjem „tesnih veza“ između epitelnih ćelija intestinuma (McCartney i sar., 2019; Ukai sar., 2020a). Pokazano je da na povećanje intestinalne apsorpcije lekovite supstance u prisustvu kaprilokaproil makrogol-8 glicerida, etoksilovanih derivata ricinusovog ulja, polisorbata 80, makrogol 15 hidrosistearata može da utiče i njihova sposobnost da inhibiraju P-glikoprotein u epitelnim ćelijama intestinuma, koji je odgovoran za efluks supstrata iz ćelija (Gurjar i sar., 2018; Hanke i sar., 2010; Hu i sar., 2001; Hugger i sar., 2002; Shono i sar., 2004);
- Lekovite supstance koje su podložne hemijskoj ili enzimskoj degradaciji u GI traktu mogu se zaštititi formulisanjem preparata tipa SMEDDS (Gursoy i Benita, 2004);
- SMEDDS su povoljniji u odnosu na SEDDS, jer se proces samomikroemulgovanja brže odvija i ne zavisi od digestije lipida, što omogućava bolju apsorpciju lekovite supstance (Feeny i sar., 2016).

1.2. Čvrste lipidne formulacije

Od prve savremene lipidne formulacije za peroralnu primenu koja se pojavila na tržištu 1981. godine (Sandimmune[®], oralni rastvor, Novartis) do danas, lipidne formulacije se intenzivno proučavaju, jer predstavljaju dobru strategiju za poboljšanje apsorpcije lekovitih supstanci koje pokazuju nisku rastvorljivost i/ili permeabilnost u GI traktu. Tečne lipidne formulacije, uključujući SMEDDS, imaju određene nedostatke, kao što su: ograničena stabilnost, mogućnost ireverzibilne precipitacije lekovite supstance, otežan i zahtevan transport i skladištenje. Takođe, lipidne formulacije tipa SMEDDS uglavnom imaju visok sadržaj surfaktanata (30-60%), koji nakon primene mogu dovesti do iritacije

GI trakta (Feeney i sar., 2016; Rajpoot i sar., 2020). Kako bi se ovi nedostaci prevazišli, u manjoj ili većoj meri, primenjuju se različite tehnike prevođenja tečnih u čvrste lipidne formulacije. Razvoj čvrstih lipidnih formulacija, kao nosača lekovitih supstanci je poslednjih godina privukao veliku pažnju istraživača zbog mogućnosti kombinovanja prednosti tečnih lipidnih formulacija sa osobinama čvrstih farmaceutskih oblika (niži troškovi proizvodnje, mogućnost kontrole procesa proizvodnje, visoka stabilnost i reproduktivnost, lakši transport i čuvanje, precizno doziranje, bolja aderenza pacijenata) (Plaza-Oliver i sar. 2021; Rajpoot i sar., 2020; Tan i sar., 2013).

1.2.1. Postupci za prevođenje tečnih SMEDDS u čvrste lipidne formulacije

Najčešći postupci za prevođenje tečnih SMEDDS u čvrste lipidne formulacije su: punjenje u kapsule, adsorpcija na čvrste nosače, sušenje raspršivanjem, sušenje smrzavanjem, granulacija topljenjem i ekstruzija-sferonizacija (Jannin i sar., 2008; Kesisoglou i sar., 2007; Midha i sar., 2017; Rajpoot i sar., 2020; Tan i sar., 2013; Tung i sar., 2018).

Punjenje u kapsule

Tečne SMEDDS se uglavnom pune u meke ili tvrde kapsule različitog sastava omotača. Omotači mekih i tvrdih kapsula se najčešće sastoje od želatine, ali se mogu koristiti i drugi materijali, kao što je hipromeloza. Izbor vrste kapsula zavisi od kompatibilnosti ekscipijenasa u SMEDDS sa omotačem kapsule i volumena punjenja. Prednosti punjenja tečnih SMEDDS u kapsule su: jednostavnost dobijanja finalnog farmaceutskog oblika i mogućnost dobijanja preparata različitih jačina (doza) lekovite supstance, jednostavnom promenom veličine tj. volumena punjenja kapsula (Cole i sar., 2008; Strickley, 2007). Sa druge strane, kapsule imaju i određene nedostake, kao što su mogućnost apsorpcije vlage iz formulacije ili spoljašnje sredine, što može da naruši njen izgled i integritet, kao i mogućnost curenja sadržaja iz kapsula (Cole i sar., 2008; Dening i sar., 2016; Tan i sar., 2013).

Meke kapsule su čvrsti farmaceutski oblici koji mogu da sadrže punjenje u tečnom ili polučvrstom stanju i obično su duguljastog ili ovalnog oblika. Meke kapsule imaju deblje zidove i najčešće se izrađuju od želatine. Kompatibilne su sa higroskopskim ekscipijensima, kao što su makrogoli ili surfaktanati sa visokim HLB vrednostima. Međutim, prisustvo plastifikatora (glicerola ili sorbitola) u mekim želatinskim kapsulama povećava njihovu propustljivost za kiseonik. U praksi se ovaj problem može rešiti promenom vrste ili sadržaja plastifikatora. S obzirom na higroskopnu prirodu plastifikatora veća je mogućnost apsorpcije vlage kod mekih želatinskih kapsula u poređenju sa tvrdim želatinskim kapsulama. Punjenje mekih želatinskih kapsula se mora odvijati pri relativno niskim temperaturama (oko 40 °C), što predstavlja ograničenje za polučvrste formulacije, koje uglavnom moraju da se otope pre punjenja u kapsule (Cole i sar., 2008; Hauss, 2007).

Postupak punjenja tečnih SMEDDS u tvrde želatinske kapsule uključuje: punjenje i zaptivanje kapsula dodatnom zaštitom na spoju dva dela kapsule ili oblaganjem zaštitnim omotačem korišćenjem mikrospreja (Jannin i sar., 2008). Prednost tvrdih kapsula je što se punjenje polučvrste formulacije može odvijati na temperaturama do 70 °C. Rizik od curenja sadržaja je veći kod tvrdih kapsula, ali se može smanjiti procesom zaptivanja (Jannin i sar., 2008; Cole i sar., 2008). Osim od želatine, mogu se koristiti i kapsule od hipromeloze. Kapsule od hipromeloze imaju niži sadržaj vlage (4-6%) u poređenju sa želatinskim kapsulama (13-16%), stoga su pogodne za inkapsulaciju supstanci koje su osetljive na prisustvo vlage, a takođe ostaju stabilne pri različitim ambijentalnim uslovima (Chong i sar., 2016).

Korišćenjem različitih vrsta tvrdih kapsula koje su dostupne na tržištu se, osim prevođenja u čvrste farmaceutske oblike, može postići i modifikovano oslobađanje lekovite supstance. Prema navodima

proizvođača Capsugel, DRcaps® su acidorezistentne kapsule od hipromeloze biljnog porekla, koje omogućavaju zaštitu sadržaja od kisele sredine želuca (Capsugel, 2014).

Adsorpcija na čvrste nosače

Fizička adsorpcija na čvrste nosače je jedna od metoda kojom se tečni SMEDDS mogu prevesti u čvrste lipidne formulacije. S obzirom da postoji veliki broj čvrstih nosača, mogućnost dobijanja čvrstih farmaceutskih oblika sa različitim fizičko-hemijskim i biofarmaceutskim karakteristikama je velika. Postupak adsorpcije na nosače se izvodi mešanjem tečnih SMEDDS sa odgovarajućim čvrstim adsorbensom (Midha i sar., 2017; Tan i sar., 2013).

Široku primenu u formulaciji čvrstih lipidnih sistema našli su visokoporozni nosači na bazi silicijum-dioksida (Sylsya®), magnezijum-aluminometasilikata (Neusilin®) i kalcijum-silikata (Florite®). Ovi nosači su slične hemijske strukture, a međusobno se razlikuju po poroznosti strukture, specifičnoj površini, veličini, zapremini i obliku pora. Navedeni adsorbensi imaju prihvatljive toksikološke osobine, a mogu adsorbovati velike količine tečnih SMEDDS (Tan i sar., 2013).

Vrsta i osobine čvrstih nosača SMEDDS utiču na brzinu oslobađanja lekovite supstance. Yeom i saradnici (2016) su ispitivali uticaj različitih čvrstih nosača na brzinu oslobađanja atorvastatina iz čvrstih SMEDDS. Kao nosači korišćeni su manitol i laktoza monohidrat, kao čvrsti nosači rastvorljivi u vodi i silicijum-dioksid porozne strukture (Sylsya® 350) i silicijum-dioksid neporozne strukture (Aerosil® 200), kao čvrsti nosači nerastvorljivi u vodi. Rezultati *in vitro* ispitivanja su pokazali da se atorvastatin brže oslobađa iz čvrstih SMEDDS izrađenih sa nosačima rastvorljivim u vodi, u poređenju sa čvrstim SMEDDS koje su izrađene sa nosačima koji nisu rastvorljivi u vodi. Ovakvi rezultati su pokazali da upotrebom rastvorljivih nosača, poput manitola i laktoze, dolazi do potpune solubilizacije nosača u vodenoj fazi i, posledično, oslobađanja lekovite supstance. Sa druge strane, između silanolnih grupa silicijum-dioksida i atorvastatina dolazi do formiranja vodoničnih veza, te je oslobađanje lekovite supstance nepotpuno. Takođe, uočeno je da je brzina oslobađanja atorvastatina značajno veća iz čvrstih SMEDDS izrađenih sa Sylsya®350 u poređenju sa Aerosil® 200, upravo zbog porozne strukture Sylsya® 350. Rezultati *in vivo* studija na pacovima su pokazali da je biološka raspoloživost atorvastatina nakon primene čvrstih SMEDDS izrađenih sa manitolom slična kao i nakon primene tečnih SMEDDS (Yeom i sar., 2016).

Polimeri, kao što su hipromeloza, karmeloza-natrijum (natrijum-karboksimetil celuloza), polivinilpirolidon ili poloksameri, osim što omogućavaju dobijanje čvrstih lipidnih formulacija, mogu da obezbede i modifikovano oslobađanje lekovite supstance (Tran i sar., 2013). Modifikovanjem oslobađanja lekovite supstance moguće je smanjiti njenu precipitaciju u GI traktu i/ili zaobići presistemski metabolizam, čime se poboljšava adsorpcija i/ili produžava terapijski efekat (Dening i sar., 2016).

Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem (engl. *spray drying*) je tehnika prevođenja tečnih SMEDDS u čvrste lipidne formulacije, koja se izvodi mešanjem tečnih SMEDDS i čvrstog nosača, dispergovanog u pogodnom rastvaraču i raspršivanjem nastale smeše u komori za sušenje pod kontrolisanim uslovima temperature i protoka vazduha. Isparavanjem rastvarača dobija se prašak koji se može puniti u kapsule ili tabletirati. Kao čvrsti nosači mogu se koristiti: dekstran, laktoza, hipromeloza, mikrokristalna celuloza, koloidni silicijum-dioksid, magnezijum-aluminometasilikat. Izbor odgovarajućeg čvrstog nosača zavisi od njegovih osobina, kao što su rastvorljivost u vodi i

molekulska masa (Kang i sar., 2012; Li i sar., 2013; Parakh i sar., 2015; Singh i sar. 2020; Truong i sar., 2016; Yi i sar., 2008).

Istraživanja su pokazala da se izradom čvrstih SMEDDS postupkom sušenja raspršivanjem može postići povećanje biološke raspoloživosti lekovitih supstanci, kao što su mebendazol, kanaglifoazin, erlotinib i nimodipin (Parakh i sar., 2015; Singh i sar., 2020; Truong i sar., 2016; Yi i sar., 2008). Nedostatak ove metode je što visoka temperatura može negativno uticati na stabilnost ekscipijensa, poput kaprilokaproil makrogolglicerida (Labrasol®) i dietilen glikol monoetil etra (Transcutol®), koji često ulaze u sastav SMEDDS (Rajpoot i sar., 2020; Tan i sar., 2013).

Sušenje smrzanjem

Sušenje smrzanjem (engl. *freeze drying*) je tehnika u kojoj se smeša, dobijena mešanjem tečnih SMEDDS i čvrstog nosača, dispergovanog u pogodnom rastvaraču, raspršuje u komori za hlađenje i u kontaktu sa hladnim vazduhom tečne kapi prelaze u čvrste sferne čestice, odnosno nastaje sitan, fini prašak. Uobičajeno se ovom metodom dobijaju praškovi dobrih protočnih osobina i kompresibilnosti, koji se mogu puniti u kapsule ili tabletirati (Singh i sar, 2013).

Ekstruzija-sferonizacija

Ekstruzija je postupak prevođenja materijala (smeše) sa plastičnim svojstvima u proizvod ujednačenog oblika i gustine, potiskivanjem kroz ekstruder u uslovima kontrolisane temperature, protoka materijala i potisnog pritiska. Ovom metodom može da se dobije proizvod sa visokim udelom (60%) i ujednačenim sadržajem lekovite supstance. Veličina otvora ekstrudera određuje približnu veličinu nastalih ekstrudata. Metoda ekstruzije se često kombinuje sa sferonizacijom, pri čemu se dobijaju pelete. Kada su u pitanju tečni SMEDDS, postupak ekstruzije-sferonizacije uključuje sledeće korake: mešanje tečnih SMEDDS i nosača (mikrokristalne celuloze i/ili koloidnog silicijum-dioksida) da bi se dobio homogeni prašak, vlažnu granulaciju dodavanjem rastvora sredstva za vezivanje (npr. polivinilpirolidona), ekstruziju, sferonizaciju ekstrudata do peleta ujednačenih veličina, sušenje i prosejavanje radi postizanja željene raspodele veličinečestica (Tung i sar., 2018).

I u ovom slučaju, vrsta i osobine nosača utiču na brzinu oslobađanja lekovite supstance iz dobijenog čvrstog SMEDDS. Tung i saradnici (2018) su pokazali da se brzina oslobađanja l-tetrahidropalmitina iz čvrstog SMEDDS, izrađenog postupkom ekstruzije/sferonizacije sa koloidnim silicijum-dioksidom (Aerosil® 200) kao nosačem, smanjuje zbog hidrofobne prirode nosača. Dodatno, formiranje vodoničnih veza između silanolnih grupa silicijum-dioksida i lekovite supstance dovelo je do manje brzine i stepena oslobađanja supstance. S druge strane, kada je kao nosač korišćena mikrokristalna celuloza (Avicel® PH101) nije uočeno smanjenje brzine oslobađanja lekovite supstance u poređenju sa tečnim SMEDDS, s obzirom da u ovom slučaju ne dolazi do formiranja vodoničnih veza između nosača i komponenata tečnog SMEDDS (Tung i sar., 2018).

Granulacija topljenjem

Granulacija topljenjem je metoda u kojoj se granulacija praška postiže dodavanjem sredstava za vezivanje koji omekšavaju ili se tope na relativno niskoj temperaturi. Ovo je jednostavna metoda koja ne zahteva primenu rastvarača. Glavni faktori koji određuju proces granulacije su: brzina mešanja, vreme mešanja, veličina čestica/kapljica i viskozitet otopljenog vezivnog sredstva. Kao sredstva za vezivanje se najčešće koriste hidrofilni makrogoli, lipidi iz grupe Gelucire® (smeše mono-, di- i

triglicerida i makrogol estara masnih kiselina), lecitin, parcijalni gliceridi i polisorbati (Aleksić i sar., 2015; Rajpoot i sar., 2020).

Kishore i saradnici (2015) su poredili brzinu oslobađanja atorvastatina iz čvrstih SMEDDS, dobijenih adsorbovanjem tečnog SMEDDS na čvrsti nosač, koloidni silicijum-dioksid (Aerosil® 200) ili granulacijom topljenjem sa hidrofilnim makrogolom 2000. Pokazali su da je brzina oslobađanja atorvastatina iz čvrstih SMEDDS izrađenih metodom adsorpcije veća u poređenju sa brzinom oslobađanja atorvastatina iz čvrstih formulacija dobijenih granulacijom topljenjem. Ovo se može objasniti razlikama koje nastaju pri kontaktu nosača sa vodenim medijumom. Naime, kada čvrste SMEDDS, dobijene adsorbovanjem tečnih SMEDDS na koloidni silicijum-dioksid, dođu u kontakt sa vodom, dolazi do brzog stvaranja mikroemulzije. Sa druge strane, do oslobađanja atorvastatina iz čvrstog SMEDDS dobijenog granulacijom topljenjem dolazi tek nakon solubilizacije makrogola, te se oslobađanje atorvastatina odvija sporije.

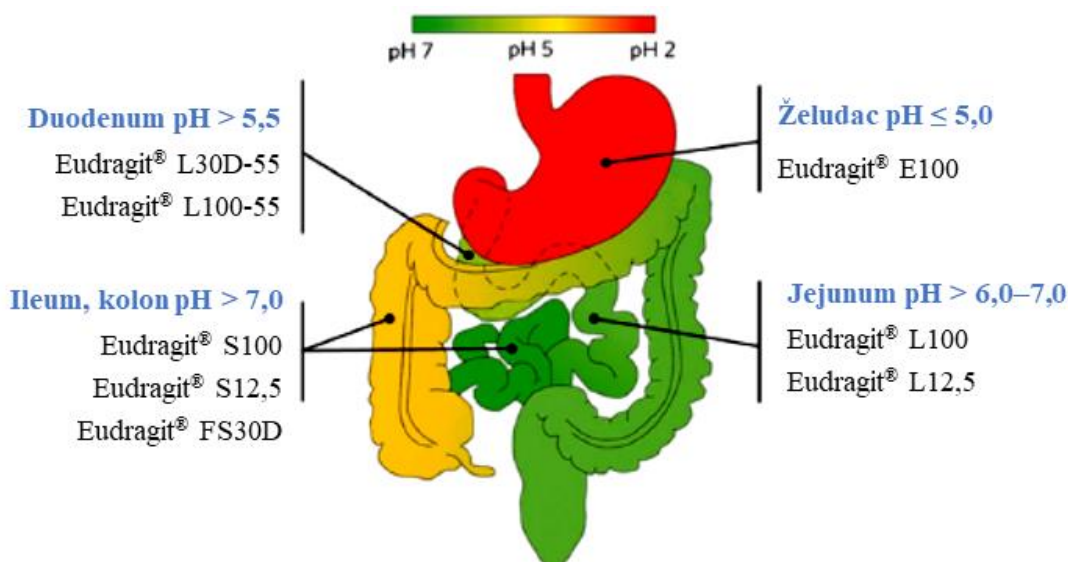
1.2.2. Čvrste lipidne formulacije sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance

Tečni SMEDDS punjeni u konvencionalne kapsule formulisani su da oslobađaju lekovitu supstancu odmah nakon peroralne primene. Korišćenjem specijalnih ekscipijenasa i/ili posebnim postupcima izrade mogu se dobiti čvrste lipidne formulacije sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance. Modifikacijom oslobađanja se mogu postići manje fluktuacije koncentracije lekovite supstance u plazmi, produžen terapijski efekat i/ili ciljna isporuka lekovite supstance, uz manje neželjenih efekata i bolju komplijansu (Charman i Charman, 2003; Joyce i sar., 2019; Rajpoot i sar., 2020).

1.2.3. Izbor ekscipijenasa za ciljnu isporuku lekovite supstance

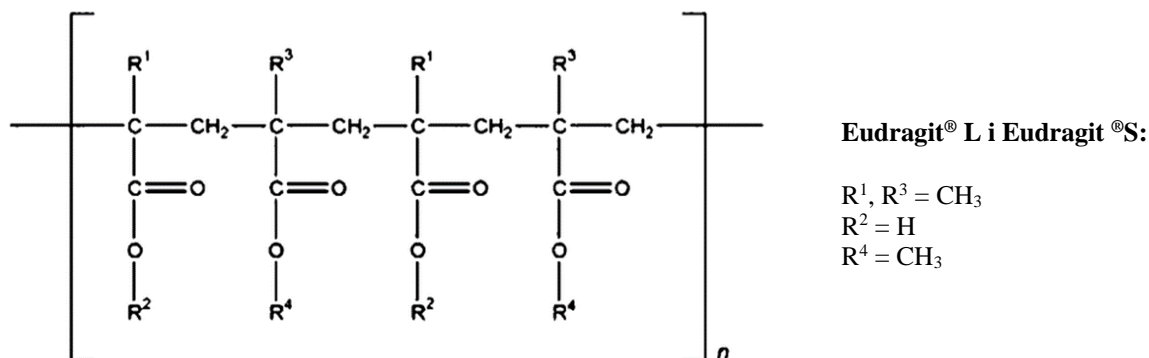
Jedan od pristupa za postizanje ciljne isporuke lekovite supstance u određeni deo GI trakta zasniva se na razlikama u pH vrednostima u različitim delovima GI trakta. Naime, pH GI trakta se progresivno povećava od želuca (pH 1,2-5,0) do tankog creva (pH 5,5-7,8) i kolona (pH 5,0-8,0), u zavisnosti od prisustva hrane i drugih faktora (Abuhelma i sar., 2016; Koziolk i sar., 2014, Maurer i sar., 2015). Na osnovu navedenih podataka se može videti da se pH vrednosti u GI traktu mogu značajno razlikovati u različitim stanjima, kao i između pojedinaca.

Jedan od načina kojim se obezbeđuje pH-zavisno oslobađanje lekovite supstance je oblaganje jezgra tableta ili višestrukih sistema (npr. peleta, granula, mikrokapsula) gastrozistentnom oblogom. Gastrozistentni omotač je najčešće izrađen od polimera, koji se ne rastvaraju na nižim pH vrednostima proksimalnog dela GI trakta, a rastvaraju se pri neutralnom ili blago alkalnom pH distalnog ileuma i kolona. Najčešće korišćeni polimeri, koji ulaze u sastav gastrozistentnog omotača, su Eudragit® polimeri L serije (Eudragit® L100, L12,5, L100-55, L30D-55), Eudragit® polimeri S serije (Eudragit® S100, S12,5) i Eudragit® FS30D (slika 1.3) (Barbosa i sar., 2019; Bhilegaonkar i Parvatkar, 2020).



Slika 1.3. Shematski prikaz mogućih mesta isporuke lekovite supstance iz farmaceutskih preparata koji sadrže Eudragit® polimere (prilagođeno iz Barbosa i sar., 2019)

Eudragit® L100 i Eudragit® S100 su zaštićeni nazivi anjonskih kopolimera metakrilne kiseline i metil metakrilata, u odnosima 1:1 i 1:2 (slika 1.4). Ovi kopolimeri metakrilne kiseline, sintetskog porekla oficinalni su u Ph.Eur.10.0 pod nazivima polimer metakrilne kiseline i metil metakrilata 1:1 (Eudragit® L100) i polimer metakrilne kiseline i metil metakrilata 1:2 (Eudragit® S100). Oba polimera su praškovi bele boje, karakterističnog mirisa, molekulske mase 125000 g/mol (Ph.Eur. 10.0). Kao slabe kiseline, pri niskim pH vrednostima nalaze se u nerastvornom molekulskom obliku, dok pri određenom pH prelaze u jonizovan rastvorni oblik, usled čega dolazi do rastvaranja omotača i oslobađanja lekovite supstance iz jezgra. Eudragit® L100 se rastvara u vodi pri pH vrednostima većim od 6,0, dok se Eudragit® S100 rastvara na pH 7,0 obrazujući bistrer do blago zamućene rastvore. Razlike u rastvorljivosti dva navedena Eudragit® polimera su posledica razlika u hemijskoj strukturi (slika 1.4). Naime, Eudragit® L100 počinje da se rastvara pri nižoj pH vrednosti zbog većeg udela slobodnih u odnosu na esterifikovane masne kiseline. Kada se koriste pojedinačno ili u kombinaciji, ovi polimeri mogu da obezbede selektivno oslobađanje lekovite supstance od duodenuma do kolona (Thakral i sar., 2013).



Slika 1.4. Strukturna formula Eudragit® L i Eudragit® S polimera (prilagođeno iz Date i sar., 2010)

Dew i saradnici (1982, 1983) su prvi opisali upotrebu Eudragit® S za ciljnu isporuku 5-amino salicilne kiseline u distalni deo kolona, kod pacijenata za kolitisom. S obzirom da je 5-aminosalicilna kiselina nestabilna u kiseloj sredini i da se apsorbuje u tankom crevu, jedini način da se primeni peroralnim putem, a da se obezbedi ciljno lokalno delovanje u distalnim delovima GI trakta je da se omogući isporuka lekovite supstance u kolon. Rezultati ovih studija su pokazali da se 5-aminosalicilna kiselina primenjena u obliku kapsula obloženih Eudragit® S oslobađa u kolonu. Rezultati ovih studija su pružili osnovu za dalji razvoj i komercijalizaciju farmaceutskih preparata sa modifikovanim oslobađanjem koji sadrže pomenuti polimer (Dew i sar., 1982; 1983).

Danas se na tržištu nalazi veliki broj farmaceutskih preparata sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance koji u svom sastavu imaju Eudragit® L100 i Eudragit® S100 polimere. Na ovaj način formulisane su gastrozistentne tablete za oslobađanje mesalazina (Asacol®, Claversal®, Salofalk®, Calitofalk®, Liada®, Mesavant®, Mesren®, Ipokol®, Apriso®), kao i gastrozistentne kapsule budesonida (Budenofalk®) (Sandborn i Hanauer, 2003; Thakral i sar., 2013). Farmaceutski oblici (tablete i kapsule) za ciljnu isporuku lekovitih supstanci u kolon, obloženi Eudragit® polimerima, opisani su za veći broj lekovitih supstanci poput insulina (Jain i sar., 2005), prednizolona (Thomas i sar., 1985), kamptotecina (Thakral i sar., 2012) i naproksena (Hardy i sar., 1987). Rezultati određenih *in vivo* ispitivanja su pokazali da se upotrebom samo Eudragit® S (koji se rastvara pri pH > 7,0) ne može postići odgovarajuća isporuka lekovite supstance u kolon, jer su pH vrednosti u distalnom regionu GI trakta obično niže (Watts i Illum, 1997). Ovaj problem se može prevazići upotrebom odgovarajuće kombinacije polimera Eudragit® S100 i Eudragit® L100, što omogućava da se lekovita supstanca oslobodi iz obloženih tableta čak i kod pacijenata kod kojih pH vrednost tečnosti u distalnom delu GI trakta ne dostiže više od pH 6,8 (Khan i sar., 1999). Kombinacija ova dva polimera omogućava da rastvaranje gastrozistentne obloge počne već pri ulasku u tanko crevo, iako debljina obloge sprečava njeno potpuno rastvaranje i razgradnju dok ne dođe u distalne delove GI trakta (Watts i Illum, 1997).

Takođe, upotreba Eudragit® S100 polimera u određenim stanjima/bolestima ne može da da ponovljive rezultate, s obzirom da je kod nekih pacijenata, npr. u slučaju inflamatorne bolesti creva, pH distalnih delova GI trakta (ileuma i kolona) niža od pH vrednosti pri kojoj dolazi do rastvaranja ovog polimera (Nugent i sar., 2001). *In vivo* studija koju su sprovedli Ibekwe i saradnici (2006) je pokazala da tablete prednizolona, obložene Eudragit® S i FS, polimerima pokazuju varijabilne rezultate *in vivo*. Naime, tablete obložene vodenom disperzijom Eudragit® S polimera su se raspale pre nego što su stigle do distalnih delova GI trakta, dok se tablete obložene etanolnim rastvorom Eudragit® S polimera nisu uopšte raspale kod pojedinih ispitanika. Sa druge strane, primenom Eudragit® FS prednizolon se oslobodio u ileocekalnom spoju i ascendentnom kolonu kod 14 od ukupno 16 ispitanika. Ovakvi rezultati se mogu pripisati relativno uskom pH gradijentu između tankog creva i kolona, razlikama u vremenu prolaska farmaceutskog preparata kroz GI trakt, razlikama u zapremini GI tečnosti između ispitanika, kao i razlikama pH vrednosti koje postoje u preprandijalnom i postprandijalnom stanju (Ibekwe i sar., 2006).

Osim primene Eudragit® polimera za oblaganje konvencionalnih farmaceutskih oblika poput tableta i kapsula, novija istraživanja su pokazala da se navedenim polimerima mogu oblagati i mikrosfere (Agrawal i sar., 2017; Thakral i sar., 2010; Umadevi i sar., 2010; Vilas i sar., 2021; Zhang i sar., 2011), kao i pelete (Desai i Momin, 2020; Hirjäu i sar., 2020), kako bi se omogućila ciljna isporuka lekovite supstance. Umadevi i saradnici (2010) su formulisali mikrosfere sa hitozanom, obložene Eudragit® S100 i L100 (u odnosu 1:4), sa aceklofenakom kao lekovitim supstancem. Rezultati *in vivo* studije na albino pacovima su pokazali da se samo 3% aceklofenaka oslobodilo tokom prolaska kroz gornje delove GI trakta, dok se nakon 8 h oslobodilo 93,6% aceklofenaka u kolonu (Umadevi i sar., 2010). Slično prethodnoj studiji, Thakral i saradnici (2010) formulisali su mikrosfere sa hitozanom, obložene Eudragit® S100, za ciljnu isporuku valdekoksiba u kolon.

Eudragit® S i L se mogu koristiti i za izradu organogelova za rektalnu primenu, koji omogućavaju odloženo oslobađanje lekovitih supstanci kao što su salicilna kiselina, natrijum-salicilat, ketoprofen i prokain. Navedeni organogelovi su dobijeni mešanjem Eudragit® polimera, u visokoj koncentraciji (30-40%) i polihidroksilnih alkohola (glicerol ili propilenglikol) ili tečnih makrogola (Goto i sar., 1991).

1.2.4. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz formulacija sa modifikovanim oslobađanjem

Razvoj odgovarajuće metode za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance treba da se zasniva na fizičko-hemijskim karakteristikama lekovite supstance i karakteristikama farmaceutskog preparata. Za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskih preparata sa modifikovanim oslobađanjem potrebno je razviti *in vitro* metode koje na najbolji način oponašaju uslove u GI traktu. Preporuka vodiča *Guideline on quality of oral modified release products* je da ove preparate treba ispitati pod različitim uslovima, uzimajući u obzir sastav i zapreminu medijuma za ispitivanje, pH medijuma (uobičajeno je da opseg bude 1,0-7,5; a u slučajevima kada se smatra potrebnim i do pH 8,0), hidrodinamičke uslove (brzinu mešanja/uranjanja/protoka) koji oponašaju peristaltiku u GI traktu, kao i dužinu trajanja ispitivanja i učestalost uzorkovanja (EMA, 2014).

Jedna od aparatura koju propisuju Ph.Eur. i USP za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata sa produženim oslobađanjem je aparatura sa cilindrom sa povratnim kretanjem (engl. *Reciprocating Cylinder Apparatus, BioDis*). Ova aparatura daje mogućnost izmene medijuma u toku ispitivanja, što odgovara uslovima kojima lekovita supstanca podleže u organizmu. Navedeni uređaj se može koristiti za ispitivanje različitih farmaceutskih preparata sa produženim oslobađanjem lekovite supstance (Fukui i sar., 2017; Pezini i Ferraz, 2009; Ikeuchi i sar., 2018).

1.3. *In silico* modeli za procenu apsorpcije i biološke raspoloživosti lekovite supstance

Novi trendovi u razvoju formulacija farmaceutskih preparata obuhvataju primenu *in silico* (računarski podržanog) modelovanja i simulacija, kao korisnog načina za procenu apsorpcije i biološke raspoloživosti lekovite supstance. To znači da, pored primene *in vitro* i *in vivo* metoda ispitivanja, *in silico* metode zauzimaju svoje mesto u različitim fazama razvoja novog leka, počevši od predviđanja biofarmaceutskih svojstava i toksičnog potencijala lekovite supstance, preko odabira optimalne formulacije, do predviđanja ishoda studija biološke raspoloživosti i biološke ekvivalentnosti lekova. Takođe, ovakvim pristupom moguće je mehanistički objasniti procese kojima lekovita supstanca podleže u organizmu i identifikovati ključne faktore koji utiču na njenu apsorpciju i biološku raspoloživost (Grbić i sar., 2013; Piñero i sar., 2018; Wu i sar., 2020; Zhuang i Lu, 2016).

In silico modelovanje se do sada najviše koristilo za predviđanje apsorpcije i raspodele lekovite supstance nakon peroralne primene preparata. Modeli koji se koriste u ove svrhe zasnovani su na primeni sistema diferencijalnih jednačina, koje opisuju procese kojima lekovita supstanca podleže u GI traktu (rastvaranje, taloženje, degradacija, presistemski metabolizam, prolazak kroz membranu enterocita) i kasnije, prilikom prolaska kroz različite sisteme organa (raspodela, metabolizam, eliminacija), kako bi se na osnovu neophodnog seta ulaznih podataka predvidele karakteristike farmaceutskog preparata u *in vivo* uslovima. Ulazni podaci se odnose na karakteristike lekovite supstance, izvesne karakteristike farmaceutskog preparata (najčešće brzina rastvaranja lekovite supstance iz preparata) i fiziološke karakteristike organizma, a mogu biti eksperimentalno određeni, *in silico* predviđeni ili preuzeti iz literature. Odabir ulaznih podataka otežava i činjenica da su u literaturi često dostupni različiti, a ponekad i kontradiktorni podaci (Sager i sar., 2015; Zhuang i Lu, 2016).

S obzirom na veliki broj neophodnih ulaznih parametara, kao i mogućnosti za podešavanje modela, rezultate simulacija je poželjno (često i neophodno) validirati poređenjem sa podacima dobijenim u kliničkim studijama. Kada je moguće, validaciju treba sprovesti sa različitim dozama i/ili farmaceutskim oblicima lekovite supstance. Validiran model je specifičan za određenu lekovitu supstancu i promenom određenih ulaznih parametara (npr. doza, veličina čestica, rastvorljivost,

brzina rastvaranja lekovite supstance, farmaceutski oblik leka) moguće je predvideti očekivane ishode uslovljene ovakvim promenama (Jones i Rowland-Yeo, 2013, Lin i Wong, 2016).

In silico modelovanje omogućava da se u kraćem vremenu, uz manje troškove i bez izvođenja nepotrebnih kliničkih studija dođe do optimalnih rešenja u toku razvoja farmaceutskih preparata (Sjörgeren i sar., 2016). Dodatno, nova saznanja o humanoj fiziologiji i promenama nastalim usled bolesti omogućila su *in silico* procenu delovanja lekovitih supstanci kod različitih pacijenata. Neki od *in silico* modela za procenu apsorpcije i biološke raspoloživosti lekova integrisani su u komercijalne programske pakete, kao što su GastroPlus™ (SimulationsPlus Inc, SAD), Simcyp™ Simulator (Simcyp Limited, Certara Inc, Velika Britanija) i PK-Sim® (Bayer Technology Services GmbH, Nemačka) (Agoram i sar., 2001; Zhuang i Lu, 2016).

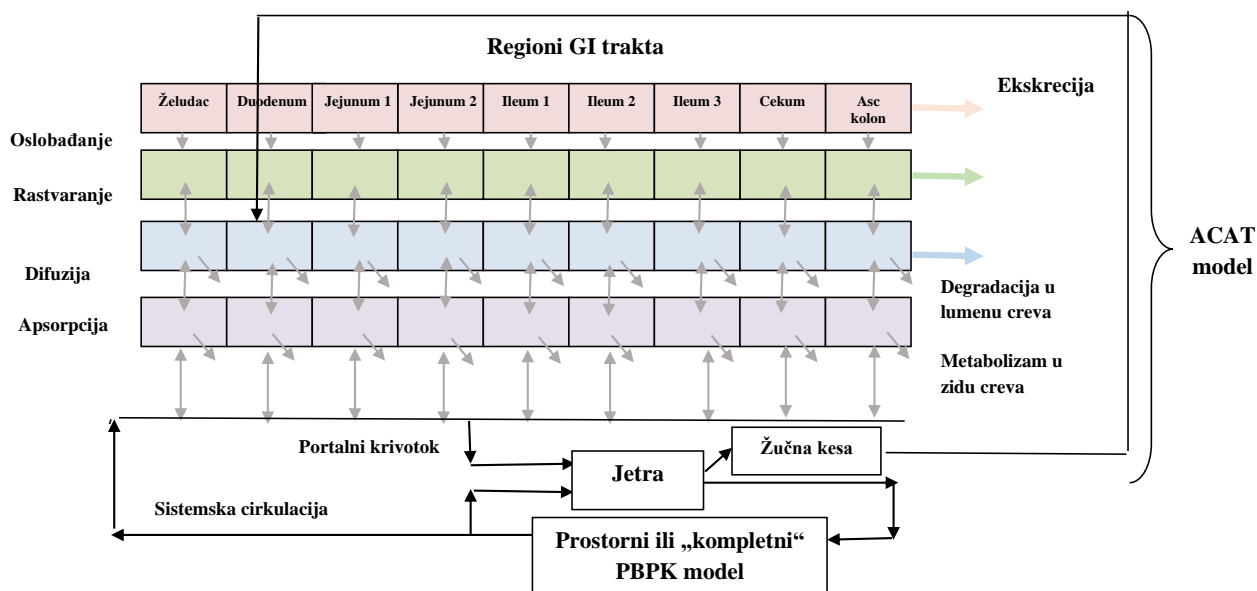
Modeli za opisivanje apsorpcije i transporta lekovite supstance kroz GI trakt

Integralni deo *in silico* modela za predviđanje ponašanja peroralno primenjenih lekova predstavljaju matematički modeli koji opisuju prolazak lekovite supstance kroz GI trakt, kao i stepen i/ili brzinu apsorpcije lekovite supstance. Yu i Amidon (1999) su razvili osnovni prostorni model apsorpcije i transporta lekovite supstance kroz GI trakt (engl. *Compartmental Absorption and Transit Model*, skr. CAT), po kome je tanko crevo podeljeno na 7 regiona. CAT model se zasniva na setu diferencijalnih jednačina, koje opisuju istovremeni prolazak rastvorene lekovite supstance kroz GI trakt i njegovu apsorpciju, u svakom od regiona tankog creva. Ovaj model je baziran na određenim pretpostavkama (Yu i sar., 1996):

- (i) apsorpcija lekovite supstance se odvija pasivnom difuzijom,
- (ii) kinetika transporta lekovite supstance je linearna,
- (iii) vrednost konstante brzine prolaska lekovite supstance je ista u svim regionima GI trakta,
- (iv) lekovita supstanca se „trenutno“ rastvara i
- (v) obim apsorpcije lekovite supstance iz želuca i kolona je zanemarljiv.

CAT model je unapređen uvođenjem dodatnih opcija, kao što su pH-zavisna rastvorljivost lekovite supstance, kontrolisano oslobađanje lekovite supstance iz preparata, apsorpcija lekovite supstance u želucu ili kolonu, efekti presistenskog metabolizma u crevima i jetri, degradacija i precipitacija lekovite supstance u GI traktu, izmene u površini za apsorpciju između različitih regiona GI trakta i *Michaelis-Menten*-ove kinetika aktivnog transporta lekovite supstance kroz membranu enterocita. Na ovaj način razvijen je unapređeni prostorni model apsorpcije i transporta lekovite supstance kroz GI trakt (engl. *Advanced Compartmental Absorption and Transit Model*, skr. ACAT) (slika 1.5). Za supstance koje imaju nisku rastvorljivost ili nisku permeabilnost, apsorpcija u tankom crevu može biti nepotpuna, zbog čega je potrebno razmotriti i apsorpciju u kolonu. Uvođenje dodatnog regiona GI trakta, kolona, značajno je doprinelo tačnosti predviđanja apsorpcije kod supstanci kod kojih apsorpcija nije završena u tankom crevu. Takođe, nakon primene farmaceutskih preparata sa produženim oslobađanjem, apsorpcija lekovite supstance u kolonu može biti značajna i mora se uzeti u razmatranje (Agoram i sar., 2001). U ACAT model su uključeni linerna kinetika transporta (pasivna difuzija) lekovite supstance kroz GI trakt, nelinearna kinetika metabolizma i aktivnog transporta kroz enterocite, 6 stanja u kojima lekovita supstanca može da se nađe u svakom regionu GI trakta (neoslobodena, nerastvorena, rastvorena, razgrađena, metabolisana i apsorbovana), 9 regiona GI trakta (7 u tankom crevu i po 1 u želucu i kolonu), kao i 3 stanja ekskretovanog materijala (neoslobodjen, nerastvoren, rastvoren). Na osnovu *in vitro* podataka o aktivnosti enzima i transportnih proteina (izraženih kao maksimalna brzina metabolizma lekovite supstance, V_{max} , i *Michaelis-Menten*-ova konstanta, k_{max}) moguće je simulirati nelinearnu saturabilnu *Michaelis-Menten*-ovu kinetiku metabolizma i aktivnog transporta lekovite supstance kroz membranu enterocita (Agoram i sar., 2001; Back i sar., 2020; Tubić-Grozdanić i sar., 2008). ACAT model je uspešno primenjen u predviđanju apsorpcije određenih lekovitih supstanci koje podležu presistemskom metabolizmu, kao

što su: propranolol, midazolam, sakvinavir, simvastatin, atorvastatin, nifedipin, verapamil, diltiazem, salbutamol, takrolimus, ciklosporin A (Agoram i sar., 2001; Heikkinen i sar., 2012). Dodatno, ovaj model je pokazao dobar potencijal za predviđanje interakcija između lekovitih supstanci i komponenata hrane na nivou metaboličkih enzima (npr. interakcije koje se javljaju nakon istovremene primene soka od grejpfruta i lekovitih supstanci koje su supstrati za CYP3A4 enzim, kao što su sakvinavir, midazolam, felodipin, nimodipin (Agoram i sar., 2001; Wagner i sar., 2013)), kao i između lekovitih supstanci koje su supstrati za transportere u zidu tankog creva (npr. rifampicin, digoksin, itrakonazol, verapamil, klaritromicin i endoksaban kao supstrati za P-glikoprotein (Hanke i sar., 2018; Kato i sar., 2021; Moj i sar., 2017; Neuhoff i sar., 2013)).



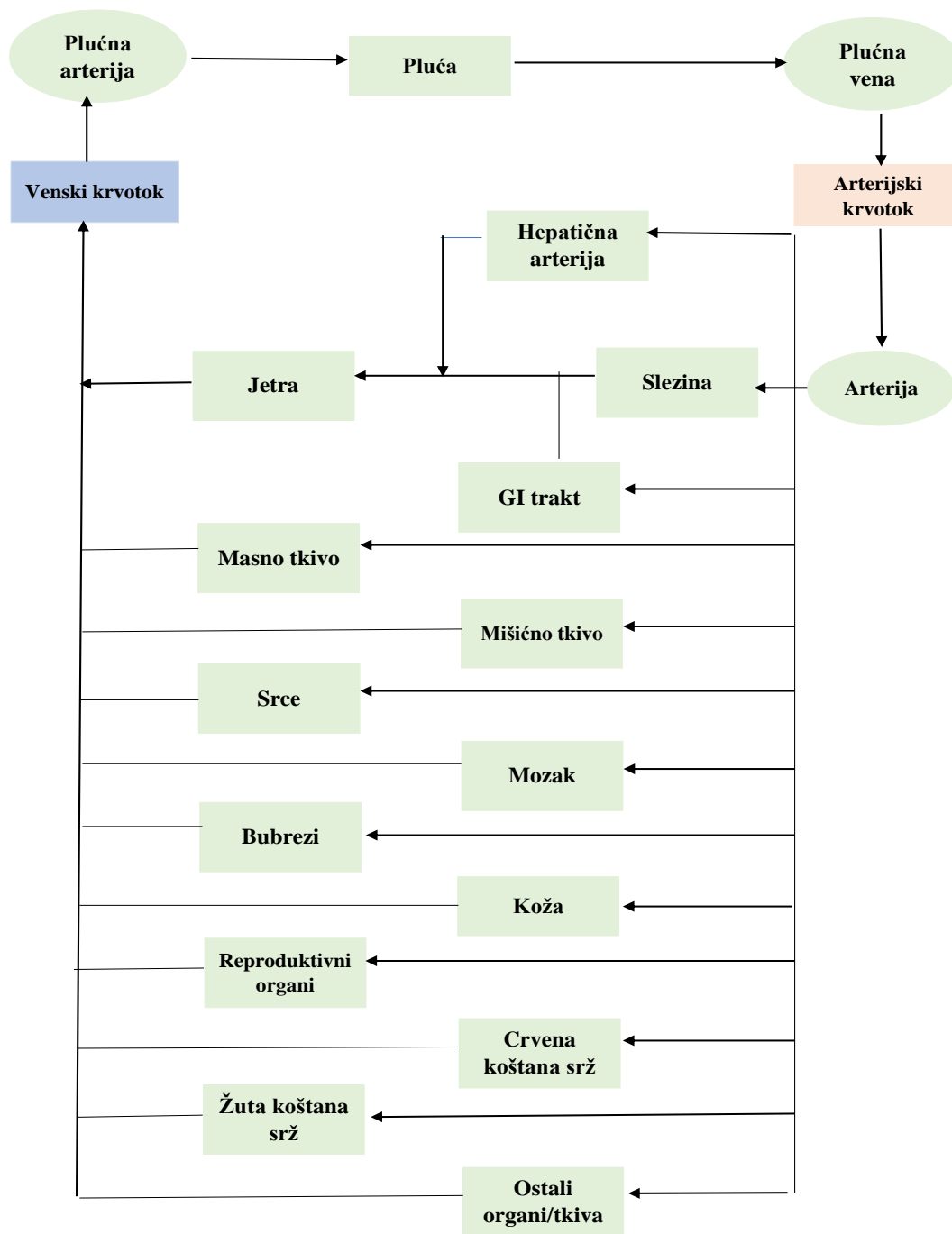
Slika 1.5. Shematski prikaz osnovnih elementata ACAT modela (prilagođeno iz Cvijić i sar., 2020)

Modeli za predviđanje raspodele, metabolizma i eliminacije lekova

Za predviđanje raspodele, metabolizma i eliminacije lekovite supstance u okviru *in silico* modela moguće je primeniti dva pristupa. Prvi, jednostavniji pristup, zasniva se na opisivanju raspodele lekovite supstance pomoću prostornih (engl. *compartmental*) modela koji uključuju najviše tri prostora. Ovaj pristup je pogodan za lekovite supstance koje se eliminišu linearnom kinetikom i čija je farmakokinetika dobro poznata, jer se kao ulazni podaci za modelovanje unose odgovarajuće vrednosti klirensa (CL), volumena distribucije (Vd) i konstanti distribucije između „prostora“ (k_{12} , k_{21} , k_{13} , k_{31}). Drugi, kompleksniji pristup podrazumeva simulaciju raspodele lekovite supstance kroz sistem organa/tkiva, kao i njen metabolizam i eliminaciju, i označava se terminom „kompletni“ fiziološki zasnovan farmakokinetički model (engl. *Full/Whole body Physiologically-Based Pharmacokinetic Model*, skr. *PBPK*) (slika 1.6). Primenom „kompletnog“ PBPK modela moguće je predvideti profil koncentracije lekovite supstance u različitim organima i tkivima u toku vremena i identifikovati ključne mehanizme koji utiču na raspodelu lekovite supstance. Na ovaj način se dobijaju informacije o koncentraciji lekovite supstance na ciljnom mestu delovanja, kao i podaci o potencijalnoj akumulaciji lekovite supstance, što je od značaja sa aspekta procene bezbednosti (GastroPlus™ Manual, 2019; Jones i sar., 2015).

„Kompletni“ PBPK model opisuje sistem osnovnih organa/tkiva (pluća, slezina, jetra, creva, masno tkivo, mišićno tkivo, srce, mozak, bubrezi, koža, reproduktivni organi, crvena i žuta koštana srž i „ostali“ organi/tkiva) povezan sistemskom cirkulacijom. Svaki organ/tkivo je opisan setom fizioloških parametara, a raspodela lekovite supstance po pojedinačnim tkivima/organima je ograničena perfuzijom krvi kroz tkivo (engl. *perfusion limited*) ili permeabilnošću supstance (engl.

permeability limited). Ukoliko je permeabilnost lekovite supstance visoka, ona može pasivno da prolazi kroz membrane i njena količina u tkivu je ograničena samo brzinom protoka krvi kroz tkivo. Na osnovu koeficijenta raspodele tkivo/plazma (K_p) može se izračunati količina lekovite supstance u tkivu u svakom trenutku. Koeficijent raspodele se procenjuje iz fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance (particioni koeficijent ($\log P$), pK_a , odnos koncentracije lekovite supstance u krvi/plazmi (engl. *blood/plasma*, skr. B/P), slobodna frakcija lekovite supstance u plazmi (f_{up}) i slobodna frakcija lekovite supstance u tkivu (f_{ut})). Ukoliko je permeabilnost lekovite supstance niska, količina lekovite supstance koja dospeva u tkivo ograničena je njenom permeabilnošću i dostupnom površinom kroz koju se vrši transport (engl. *permeability surface area*). Izračunavanjem tzv. PStc faktora (engl. *permeability surface area product*, skr. PStc) može se odrediti brzina transporta lekovite supstance iz/u tkivo. Koeficijent raspodele se koristi za određivanje koncentracije lekovite supstance u ekstracelularnim regionima, dok PStc faktor opisuje brzinu transporta lekovite supstance iz/u tkiva. Pored pasivne difuzije, transport lekovite supstance u/iz tkiva može da se odvija i pomoću transporterata. U ovom slučaju se u model može uključiti veliki broj transporterata na apikalnoj ili bazolateralnoj membrani ćelija (GastroPlus™ Manual, 2016; Jones i Rowland-Yeo, 2013). „Kompletni“ PBPK model je uspešno primenjen u previđanju apsorpcije i raspodele brojnih lekovitih supstanci, kao što su rifampicin, digoksin, itrakonazol, klaritromicin, midazolam, alfentanil, ciprofloksacin, flutamid, gefitinib i dr. (Bi i sar., 2016; Hanke i sar., 2018; Sadiq i sar., 2020; Sharma i sar., 2020).



Slika 1.6. Shematski prikaz PBPK modela (prilagođeno iz GastroPlus™ Manual, 2019)

Modeli za praćenje metabolita

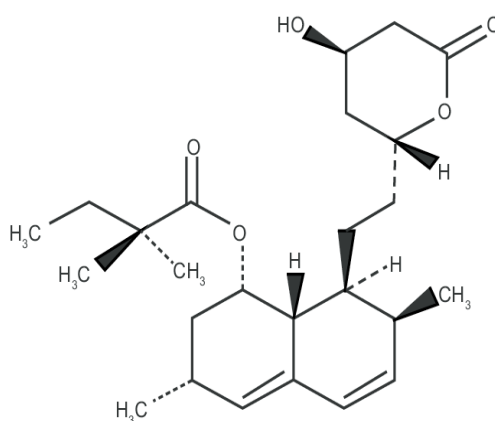
U slučaju primene farmaceutskih preparata koji sadrže prolek, kao i u slučaju primene lekova koji se metabolišu do aktivnih ili toksičnih metabolita, od velikog je značaja predviđanje profila koncentracije jednog ili više metabolita u plazmi i/ili pojedinačnim organima/tkivima, što je moguće postići primenom „kompletnih“ PBPK modela. Da bi se sprovele ovakve simulacije, neophodno je, pored ulaznih podataka koji se odnose na primenjenu supstancu (prolek ili lekovitu supstancu), uneti i podatke koji opisuju biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva metabolita. Takođe, potrebno je definisati organ/tkivo u kome dolazi do metaboličke konverzije i enzim(e) koji je(su) zadužen(i) za ovaj proces, kao i vrednosti parametara koji opisuju aktivnost enzima (K_m i V_{max}). Mnoge studije su pokazale da ovaj mehanistički pristup može da omogući predviđanje apsorpcije i raspodele lekovite supstance i njenih metabolita, kao u slučaju imipramina i dezimipramina, selegilina i njegovih metabolita, metamfetamina i dezmetil selegilina, midostaurina i njegovih aktivnih metabolita (Gu i sar., 2018; Nguyen i sar., 2016, 2017; Puttrevu i sar., 2020).

Uprkos sve većoj upotrebi *in silico* modelovanja za predviđanje apsorpcije i raspodele lekovitih supstanci, postoji mnogo izazova koji ograničavaju njihovu primenu. Zbog velikog broja parametara potrebnih za modelovanje i ograničene dostupnosti *in vivo* podataka za verifikaciju ishoda simulacija, predviđanja modela mogu biti nepouzdana. Na primer, za lekovite supstance koje se zbog niske rastvorljivosti ne mogu primeniti intravenskim putem, farmakokinetički parametri se ne mogu precizno odrediti, već se najčešće optimizuju, što dovodi u pitanje validnost ovakvih vrednosti, a time i rezultata simulacija (Edginton i Joshi, 2011; Jones i sar., 2015; Sjöstedt i sar., 2014).

1.4. Simvastatin

1.4.1. Mehanizam delovanja

Simvastatin (SV) (hemijski naziv: 1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[2-[(2R,4R)-4-hidroksi-6-oksotetrahidro-2H-piran-2-il]etil]-3,7-dimetil-1,2,3,7,8,8a-heksahidronaftalen-1-il-2,2 dimetilbutanoat; Ph.Eur. 10.0) (slika 1.7) je jedan od najčešće korišćenih lekova iz grupe statina, inhibitora enzima 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktaze (HMG CoA-reduktaze) (Schachter, 2005).

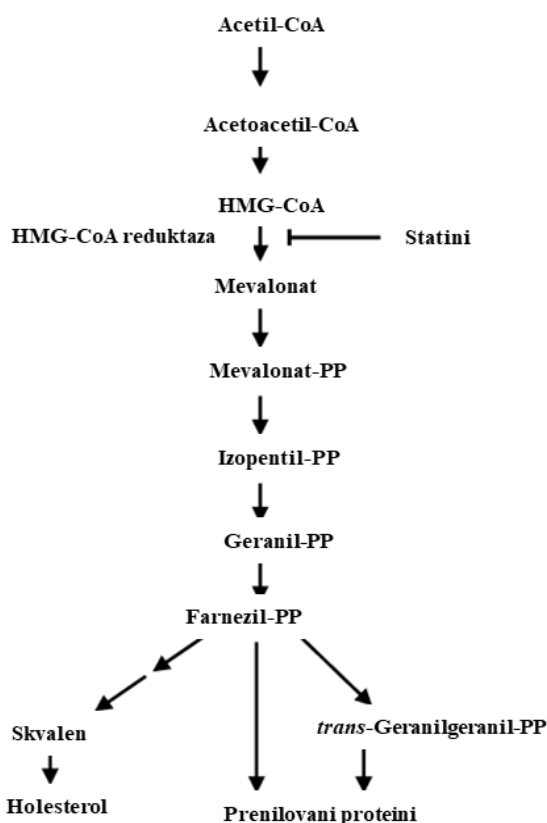


Slika 1.7. Strukturna formula simvastatina (Ph.Eur.10.0)

Simvastatin je prolek, lakton, koji prelazi u aktivni oblik, β,δ -dihidroksi kiselinu (simvastatin-kiselinu, skr. SVK), pomoću nespecifičnih enzima karboksijesteraza u GI traktu, jetri i u određenoj meri u plazmi, ili neenzimskom hidrolizom (Tubić-Grozdaniš i sar., 2008). Simvastatin-kiselina je odgovorna za snižavanje nivoa holesterola u krvi kroz reverzibilnu i kompetitivnu inhibiciju HMG CoA-reduktaze, enzima uključenog u reakciju redukcije HMG CoA u mevalonat,

koja predstavlja ključni korak biosinteze holesterola u jetri (slika 1.8) (Schachter, 2005). Dodatno, simvastatin poseduje i pleiotropna, vaskuloprotektivna svojstva, koja su primarno odgovorna za antiishemijsko i antianginozno delovanje (Tiwari i Pathak, 2011b, Lardizabal i Deedwania, 2011). Najnovija istraživanja su pokazala da simvastatin deluje i na crevnu mikrobiotu tako što inhibira rast nekih bakterija, koje imaju značajnu ulogu u sintezi lipida (Ashrafizadeh i Ahmadi, 2020; Zhang i sar., 2020).

Od početka 90-ih godina prošlog veka uočeno je da statini ispoljavaju i određenu efikasnost u lečenju tumora, kao monoterapija i u kombinaciji sa drugim hemoterapeuticima. Iako nije u potpunosti proučen mehanizam kojim statini deluju na ćelije tumora, u određenim studijama je pokazano da antitumorsku aktivnost ispoljavaju tako što inhibiraju proliferaciju ovih ćelija i izazivaju programiranu ćelijsku smrt (apoptozu) (Di Bello i sar., 2020; Matusiewicz i sar., 2020). Najviše proučavani statin u lečenju tumora je simvastatin, za koji je pokazana *in vitro* i *in vivo* efikasnost u lečenju tumora dojke, kolona i prostate (Ghosh-Choudry i sar., 2010; Kochuparambil i sar., 2011; Relja i sar., 2010).



Slika 1.8. Shematski prikaz biosinteze holesterola u jetri (prilagođeno iz Corsini i sar., 1999)

1.4.2. Biofarmaceutske osobine simvastatina

Simvastatin je beo ili skoro beo, kristalan prašak, relativne molekulske mase 418,6 g/mol (Ph.Eur. 10.0).

Literaturni podaci za rastvorljivost simvastatina u vodi se značajno razlikuju i nalaze se u opsegu od 0,00145 do 0,03 mg/ml (Chen i sar., 2002; Serajuddin i sar., 1991; O' Neil, 2006; Tubić-Grozdanis i sar., 2008).

Simvastatin (lakton) ima $pK_a=13,49$, a pK_a simvastatin-kiseline iznosi 4,31 (Pasanen i sar., 2006; Tubić-Grozdanis i sar., 2008). Simvastatin-kiselina je skoro potpuno jonizovana u krvi pri fiziološkom pH (7,4), dok je simvastatin lakton u nejonizovanom obliku u opsegu fizioloških pH vrednosti (Pasanen i sar., 2006). U literaturi se mogu pronaći različiti podaci za particioni koeficijent simvastatina u sistemu n-oktanol/voda (logP) i nalaze se u opsegu od 4,38 do 4,71 (Fatima i sar., 2013; Gertz i sar., 2011; Wang i sar., 2001; <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00641>). Vrednosti particionog koeficijenta ukazuju na lipofilnu prirodu simvastatin laktone, koji može lako da difunduje kroz membrane (Pasanen i sar., 2006). Sa druge strane, vrednosti logP simvastatin-kiseline se razlikuju u zavisnosti od pH rastvora i iznose: 4,49 (na pH 2,0) i 3,62 (na pH 5,0) (Serajuddin i sar., 1991).

S obzirom da ima nisku rastvorljivost i visoku intestinalnu permeabilnost, simvastatin pripada II grupi BSK (Kuentz, 2012).

1.4.3. Farmakokinetičke osobine simvastatina

Simvastatin se, nakon peroralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem, relativno brzo i dobro apsorbuje u GI traktu, ali prolazi intenzivan metabolizam u jetri pre ulaska u sistemsku cirkulaciju (tzv. presistemski metabolizam), zbog čega manje od 5% dospeva u sistemsku cirkulaciju (Mauro, 1993; Thomas i sar., 2013).

Simvastatin ima složenu farmakokinetiku koja se ne može u potpunosti objasniti konvencionalnim farmakokinetičkim modelom. Jin i saradnici (2014) su proučavali farmakokinetiku simvastatina i njegovog aktivnog metabolita i zaključili da u obimu i brzini apsorpcije simvastatina postoji velika inter- i intraindividualna varijabilnost. Takođe, uočili su postojanje višestrukih pikova u profilima koncentracije lekovite supstance u plazmi, što je objašnjeno uticajem dinamičkih promena u GI traktu koje se dešavaju u toku vremena (Jin i sar., 2014).

Metabolizam simvastatina odvija se u jetri dejstvom enzima CYP3A4 i CYP3A5, a biotransformacijom nastaju 3',5'-dihidrodiol, 3'-hidroksi, 6'-eksometilen metaboliti. CYP3A4 ispoljava veći afinitet za simvastatin, u poređenju sa CYP3A5 enzimom (Prueksaritanont i sar., 1997). Peroralnom primenom doze od 40 mg dnevno, sistemski koncentracija simvastatina je manja od 100 nmol/l, što je značajno manje od koncentracije koja je potrebna za inhibiciju P-glikoproteina, što ukazuje da je uloga P-glikoproteina u apsorpciji i dispoziciji simvastatina zanemarljiva (Hochman i sar., 2004).

Simvastatin se prvenstveno izlučuje putem fecesa (60% doze), dok se 13% primenjene doze izlučuje putem urina. Količina u fecesu je količina apsorbovane lekovite supstance izlučene putem žuči i neapsorbovana frakcija lekovite supstance (Schachter, 2005).

1.4.4. Savremene lipidne formulacije sa simvastatinom

Razvoj lipidnih formulacija za peroralnu primenu simvastatina, u cilju poboljšanja njegove biološke raspoloživosti, privukao je pažnju mnogih istraživača. S obzirom na nove potencijalne indikacije simvastatina, koje se intenzivno proučavaju poslednjih godina, formulisanje lipidnih sistema je usmereno na poboljšanje njegove niske rastvorljivosti, a time i na povećanje apsorpcije i biološke raspoloživosti.

1.4.4.1. Samoemulgujući sistemi

Do sada je objavljeno više naučnih studija u kojima je primenjena strategija formulisanja različitih samoemulgujućih sistema, sa ciljem prevazilaženja problema niske rastvorljivosti simvastatina u vodi i poboljšanja brzine rastvaranja ove lekovite supstance iz farmaceutskih preparata (Karim i sar., 2015; Mahmoud i sar., 2013; Thomas i sar., 2012).

Karim i saradnici (2015) su formulisali SEDDS koristeći 70% propilenglikol monokaprilata (Capryol™ 90) i 30% polisorbata 80 (Tween® 80), iz kojih je postignuto potpuno oslobađanje simvastatina za samo 20 min. U *in vivo* studiji koju su sprovedi na miševima, praćen je nivo holesterola kao pokazatelj efikasnosti ove samoemulgujuće formulacije. Rezultati *in vivo* studija su pokazali da je nakon 5 dana peroralne primene ovog SEDDS došlo do značajnog sniženja nivoa holesterola (46-54 mg/dl) u odnosu na primenjenu čistu supstancu, koja je dovela do sniženja holesterola do nivoa od 60-63 mg/dl (Karim i sar., 2015).

Patil i saradnici (2007) su formulisali SEEDS, koristeći diestre kaprilne/kaprinske kiseline (Captex® 355) i propilenglikol monolaurat (Lauroglycol™ 90) kao uljanu fazu i makrogol-35 ricinusovo ulje (Cremophor® EL) i/ili mono- i digliceride kaprilne/kaprinske kiseline (Capmul® MCM). Iako nakon početnih sat vremena nisu pokazane razlike u oslobađanju simvastatina iz izrađenih SEDDS, formulacija sa najmanjom veličinom kapi (124,86 nm), koja sadrži jednake količine makrogol-35 ricinusovog ulja i mono- i digliceride kaprilne/kaprinske kiseline, je pokazala veći obim oslobađanja simvastatina. U *in vivo* studiji na pacovima, odabrana formulacija je ispoljila značajno smanjenje nivoa holesterola i nivoa triglicerida u plazmi, dok je nivo HDL holesterola bio dvostruko veći u poređenju sa referentnom formulacijom, suspenzijom simvastatina, nakon 21 dan studije (Patil i sar., 2007).

Mahmoud i saradnici (2013) su formulisali samonanoemulgujuće tablete, sa ciljem poboljšanja *in vitro* brzine rastvaranja simvastatina. Korišćenjem različitih odnosa ulja, surfaktanta i kosurfaktanta izrađeni su SNEDDS, čiji je sastav optimizovan izvođenjem studija rastvorljivosti, konstrukcijom pseudoternarnog faznog dijagrama i određivanjem veličine kapi. Optimalni SNEDDS adsorbovani su na čvrste nosače, mikrokristalnu celulozu i koloidni silicijum-dioksid i komprimovani u tablete. Rezultati su pokazali da se korišćenjem 10% propileglikol monokaprilata (Capryol™ PGMC i Capryol™ 90) kao ulja, 60% makrogol-40 hidrogenizovanog ricinusovog ulja (Cremophor® RH 40) kao surfaktanta i 30% dietilen glikol monoetil etra (Transcutol® HP) kao kosurfaktanta, dobija optimalni SNEDDS, koji se koristio za izradu tableta. Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja simvastatina su ukazali da se nakon 10 min iz samonanoemulgujućih tableta oslobodilo 84% simvastatina, što je značajno više u poređenju sa referentnim preparatom, tabletama sa tržišta (Zocor®), iz kojih se tokom istog perioda oslobodilo svega 33% simvastatina (Mahmoud i sar., 2013).

Rezultati pomenutih istraživanja su pokazali da se formulisanjem različitih samoemulgujućih sistema postiže povećanje rastvorljivosti, brzine rastvaranja, a određena istraživanja su potvrdila i povećanje biološke raspoloživosti simvastatina. Međutim, ni u jednoj od pomenutih studija nije razmatran presistemski metabolizam simvastatina, koji može značajno smanjiti njegovu sistemsku i hepatičku raspoloživost, naročito u slučajevima kada su rastvorljivost i/ili brzina rastvaranja simvastatina povećani (Tiwari i Pathak, 2011b).

1.4.4.2. Čvrste lipidne nanočestice

Čvrste lipidne nanočestice (engl. *Solid lipid nanoparticles*, skr. *SLN*) su čestice submikronske veličine (1-1000 nm), koje predstavljaju novije nosače za isporuku lekovitih supstanci. SLN se izrađuju od biodegradabilnih lipida i u njih se mogu inkorporirati različite lekovite supstance.

Primenom SLN se omogućava kontrolisano/produženo oslobađanje inkorporiranih lekovitih supstanci, sa manje neželjenih efekata, kao i ciljno delovanje (Shah i Pathak, 2010).

Kako bi se izbegao presistemski metabolizam i povećala biološka raspoloživost simvastatina, ideja Raju i saradnika (2014) je bila da se formulišu SLN koje bi omogućile odloženo oslobađanje simvastatina i transport putem limfotoka. Koristeći faktorijalni dizajn, formulisane su SLN sa trimiristinom (čvrst lipid) i poloksamerom 188 (surfaktant) koje su obezbedile produženo oslobađanje simvastatina (37,8%) tokom 36 h. Rezultati su ukazali da je simvastatin homogeno dispergovan u nosaču, iz kojeg se oslobađa kinetikom nultog reda (Raju i sar., 2014). Shah i Pathak (2010) su, koristeći takođe jednu od metoda eksperimentalnog dizajna (pun faktorijalni dizajn), formulisali SLN sa simvastatinom za peroralnu primenu. Dobijene optimalne SLN sa lipidima gliceril monostearatom i gliceril dibehenatom (Compitrol® 888 ATO) su imale veličinu čestica 258,5 nm, efikasnost inkapsulacije 75,81% i omogućile su oslobađanje 82,67% simvastatina tokom 55 h. Produženo oslobađanje simvastatina je odgovaralo *Higuchi*-jevom modelu, što je ukazalo da se simvastatin iz ovih nosača oslobađa kombinovanim mehanizmom difuzije iz matriksa i erozijom matriksa usled degradacije lipida (Shah i Pathak, 2010).

Padhye i Nagersenker (2013) su izrađivali SLN simvastatina od čvrstih lipida (gliceril behenat i gliceril palmitostearat) i surfaktanta polisorbata 80. Ove SLN su pokazale dobru efikasnost inkapsulacije (> 96%) i veličinu čestica ispod 200 nm. U *in vivo* studiji koja je sprovedena na pacovima, nakon primene dobijenih SLN postignuto je smanjenje ukupnog nivoa holesterola i povećanje HDL holesterola, u poređenju sa čistom lekovitom supstancom, što je ukazalo na poboljšanu biološku raspoloživost simvastatina iz izrađenih SLN (Padhye i Nagersenker, 2013).

Cilj studije koju su sproveli Ahmed i saradnici (2018) je bio da se formulišu SLN sa simvastatinom koje bi se inkorporirale u termosenzitivni *in situ* gel za intranazalnu primenu, kako bi se omogućila brza apsorpcija lekovite supstance i izbegao presistemski metabolizam. SLN su izrađene korišćenjem gliceril monostearata i stearinske kiseline, kao lipida. Rezultati *ex vivo* studije su pokazali da je inkorporiranjem SLN sa simvastatinom u *in situ* termoreverzibilni gel, dobijen upotrebom 22% poloksamera 407 i 0,5% karbomera 940, postignuta bolja mukoadhezija i dublje prodiranje lekovite supstance u nosnu sluznicu, u poređenju sa gelom sa čistom supstancom (Ahmed i sar., 2018).

1.4.4.3. Nanostruktuirani lipidni nosači

Da bi se prevazišli nedostaci SLN, kao što su ograničena mogućnost inkorporiranja lekovite supstance i mogućnost njenog „curenja“ tokom čuvanja, razvijeni su nanostrukturirani lipidni nosači (engl. *Nanostructured lipid carriers*, skr. *NLC*), tzv. lipidne nanočestice druge generacije. NLC omogućavaju veći stepen inkapsulacije lekovite supstance, u odnosu na SLN, sprečavaju gubitak lekovite supstance u toku čuvanja, a pružaju veće mogućnosti za modifikaciju oslobađanja lekovite supstance (Fonseca-Santos i sar., 2020).

U studiji koju su sproveli Tiwari i Pathak (2011a) formulisane su NLC sa simvastatinom, koristeći gliceril monostearat, oleinsku kiselinu i poloksamer 407, a zatim upoređivane sa SLN, izrađenim od trimiristina i poloksamera 188. Pokazano je da je nakon 55 h oslobođeno više od 90% simvastatina iz NLC, dok se iz SLN oslobodilo manje od 80% (u odnosu na deklarisanu količinu u uzorku). Rezultati *in vivo* studija na miševima su pokazali da je iz NLC postignuta 4,8 puta veća biološka raspoloživost u poređenju sa suspenzijom simvastatina, kao i 2,29 puta veća biološka raspoloživost u poređenju sa SLN sa simvastatinom. Takođe, potvrđena je akumulacija NLC u jetri, što se smatra poželjnim, budući je jetra ciljni organ za delovanje simvastatina. Autori su pretpostavili da je tečna oleinska kiselina u NLC glavni faktor odgovoran za poboljšanu biološku raspoloživost i biodistribuciju simvastatina (Tiwari i Pathak, 2011a).

Safwat i saradnici (2017) su proučavali novu primenu dva različita makrogolglicerida (Labrafil[®] i Labrasol[®]), za dobijanje NLC sa simvastatinom, jer se smatra da makrogolgliceridi imaju veću sposobnost inkapsulacije i lipofilnih i hidrofilnih lekovitih supstanci. Poređenja su vršena u odnosu na NLC izrađene sa trigliceridima srednje dužine lanaca (Labrafac Lipophile[®] WL 1349). Sve formulacije pokazale su profil oslobađanja simvastatina sa dva izražena pika: inicijalno naglo oslobađanje simvastatina i produženo oslobađanje tokom 96 h. Rezultati studija preuzimanja simvastatina od strane MCF-7 ćelija tumora dojke su pokazali da je veće preuzimanje simvastatina iz NLC sa kaprilokaproil makrogol-8 gliceridima (Labrasol[®]) u poređenju sa ostalim formulacijama (Safwat i sar., 2017).

Fathi i saradnici (2018) su formulisali NLC sfernog oblika, veličine čestica < 200 nm, sa uskom raspodelom veličine čestica i visokom efikasnošću inkapsulacije simvastatina (> 75%). Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja simvastatina su pokazali da je inicijalno došlo do naglog oslobađanja (*burst* efekat) simvastatina, kao posledica rastvaranja simvastatina zarobljenog na površini ovih nanočestica, nakon čega je usledilo kontinuirano oslobađanje tokom 24 h. U *in vivo* studiji na pacovima je pokazano produženo smanjenje nivoa ukupnog holesterola u poređenju sa suspenzijom simvastatina. Posle peroralne primene jedne doze NLC sa simvastatinom, biološka raspoloživost je bila četiri puta veća u poređenju sa suspenzijom simvastatina (Fathi i sar., 2018).

Brito Raj i saradnici (2019) su formulisali NLC sa simvastatinom koristeći gliceril dibehenat (Compritol[®] 888 ATO) i makrogol-6 glicerol kaprilokaprata (Softigen[®]) kao lipidnu fazu i sorbitan monooleat (Span[®] 80) i poloksamer 188 (Pluronic[®] F 68) kao surfaktantnu fazu, a zatim ih inkorporirali u transdermalne flastere. Rezultati *ex vivo* studija su pokazali da se simvastatin iz transdermalnih flastera oslobađa kinetikom nultog reda. U *in vivo* studiji na albino pacovima Wistar soja je pokazano da transdermalni flasteri pokazuju bolju biološku raspoloživost simvastatina za 18,40% u poređenju sa tabletama simvastatina (Zocor[®]).

1.4.4.4. Hibridne mikročestice silicijum-dioksida i lipida

Hibridne mikročestice silicijum-dioksida i lipida (engl. *Silica-lipid hybrid microparticles*, skr. *SLH mikročestice*) predstavljaju nove čvrste lipidne formulacije, koje imaju sposobnosti da povećaju biološku raspoloživost nisko rastvorljivih lekovitih supstanci (Meola i sar., 2020).

Meola i saradnici (2020) su formulisali SLH mikročestice sa simvastatinom, korišćenjem silicijum-dioksida dva različita proizvođača, sa zaštićenim nazivima Aerosil[®] 300 i Syloid[®] 244. Dobijene mikročestice su se razlikovale u zavisnosti od upotrebljenog silicijum-dioksida. Sa Aerosil[®] 300 dobijene su sferne porozne mikročestice, dok su sa Syloid[®] 244 dobijene mikročestice nepravilnog oblika. Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja iz SLH mikročestica su pokazali da se simvastatin rastvorio brže i 3,5 puta više iz SLH mikročestica, u poređenju sa čistim simvastatinom. Prisustvo hidrofilnog silicijum-dioksida (Aerosil[®] 300) olakšava kvašenje i oslobađanje lekovite supstance, te se simvastatin više oslobodio iz mikročestica dobijenih sa Aerosil[®] 300, iako razlika između ovih formulacija nije bila statistički značajna. *In vivo* studije na pacovima su pokazale da SLH mikročestice povećavaju biološku raspoloživost simvastatina 6,1 put u poređenju sa čistim simvastatinom, odnosno 2,9 puta u poređenju sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem (Simvastatin Sandoz[®]), kao i da nije bilo statistički značajne razlike između mikročestica izrađenih sa Aerosil[®] 300 i Syloid[®] 244 u pogledu povećanja biološke raspoloživosti (Meola i sar., 2020).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Sveobuhvatni cilj istraživanja bio je razvoj lipidnih formulacija sa aspekta potencijalne primene kao nosača nove generacije za peroralnu primenu simvastatina, nisko rastvorljive model supstance i njihova fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija. Ovaj cilj je realizovan kroz tri faze istraživanja, sa sledećim pojedinačnim ciljevima:

Cilj prve faze eksperimentalnog rada bila je formulacija i karakterizacija tečnih SMEDDS sa simvastatinom, u cilju poboljšanja njegove rastvorljivosti. Da bi se formulisali tečni SMEDDS potrebno je izvršiti izbor ekscipijenasa (ulja, surfaktanata i kosurfaktanata) i odrediti njihov optimalan udeo u formulaciji, na osnovu određivanja mikroemulzione oblasti, koju obrazuju dobijeni sistemi. Na osnovu rezultata prve faze eksperimentalnog rada, odabrani su tečni SMEDDS, koji pokazuju najpogodnije osobine u pogledu brzine samoemulgovanja, transparentije nakon razblaživanja vodom, veličine i raspodele veličine kapi.

Druga faza ekperimentalnog rada obuhvatila je razvoj i primenu *in silico* modela za procenu apsorpcije i biološke raspoloživosti simvastatina nakon peroralne primene različitih preparata, na osnovu biofarmaceutskih osobina navedene lekovite supstance. Simvastatin-specifičan model izgrađen je analizom i odabirom podataka iz literature, u kombinaciji sa eksperimentalnim i *in silico* predviđenim vrednostima parametara koji opisuju biofarmaceutska svojstva simvastatina i fiziološke karakteristike organizma. Poređenjem rezultata predviđanja sa podacima iz kliničkih studija za tablete sa trenutnim oslobađanjem simvastatina, izabran je optimalan set ulaznih parametara, koji na odgovarajući način opisuje apsorpciju simvastatina, konverziju u simvastatin-kiselinu i raspodelu i eliminaciju simvastatina. Izgrađeni model je dalje korišćen da se, na osnovu podataka o *in vitro* brzini rastvaranja simvastatina iz odabranih SMEDDS, dobijenih u prvoj fazi eksperimentalnog rada, predvide očekivani stepen i brzina apsorpcije date lekovite supstance *in vivo*, nakon peroralne primene izrađenih formulacija. Na osnovu mehanističke analize rezultata simulacija identifikovano je optimalno mesto za apsorpciju simvastatina, kako bi se dizajnirale odgovarajuće formulacije sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance i, posledično, poboljšanom biološkom raspoloživošću.

Cilj treće faze eksperimentalnog rada bila je formulacija i karakterizacija lipidnih sistema sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina, koji su definisani na osnovu rezultata *in silico* predviđanja. U skladu sa navedenim, u prvom delu ovih istraživanja tečni SMEDDS su punjeni u acidorezistentne kapsule. U drugom delu istraživanja formulisani su sistemi sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina, dobijeni od odabranih tečnih SMEDDS i odgovarajućih čvrstih polimernih nosača, koji mogu da omoguće modifikovano oslobađanje lekovite supstance u GI traktu. Na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja simvastatina iz navedenih formulacija, primenom simvastatin-specifičnog *in silico* modela razvijenog u drugoj fazi eksperimentalnog rada, izvršeno je predviđanje očekivanog stepena i brzine apsorpcije simvastatina nakon peroralne primene dobijenih formulacija i razmatranje eventualnog povećanja biološke raspoloživosti.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

U prvoj fazi eksperimentalnog rada, za izradu tečnih SMEDDS, kao uljana faza korišćeni su: oleoil makrogol-6 gliceridi (Labrafil[®] M 1944 CS), propilenglikol monokaprilat (Capryol[™] PGMC) i propilenglikol monolaurat (Lauroglycol[™] 90). Kao surfaktant korišćen je kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi (Labrasol[®]), dok su kao kosurfaktanti upotrebljeni polisorbit 80 ili makrogol 15 hidrosistearat (Kolliphor[®] HS 15). Svi navedeni ekscipijensi su odobreni za peroralnu primenu (Strickley, 2004; Gattefossé, 2021), a njihov kvalitet odgovara zahtevima monografija Ph. Eur. 10.0, osim propilenglikol monokaprilata koji odgovara zahtevima USP 41-NF 36. U tabeli 3.1 prikazani su zaštićeni i farmakopejski nazivi ekscipijenasa korišćenih za formulaciju tečnih SMEDDS, njihovi proizvođači, kao i najvažnije fizičko-hemijske osobine.

U drugoj fazi eksperimentalnog rada, osim ekscipijenasa korišćenih u prvoj fazi rada, kao čvrsti polimerni nosači upotrebljeni su sintetski kopolimeri metakrilne kiseline i metil metakrilata, u odnosu 1:1 (Eudragit[®] L100), odnosno 2:1 (Eudragit[®] S100), proizvođača Evonik Health Care, Nemačka. Kao model lekovita supstanca korišćen je simvastatin (Zhejiang Jiangbei Pharmaceutical Co, Kina).

Za određivanje veličine i raspodele veličine kapi tečnih SMEDDS korišćena je visoko prečišćena voda, dobijena dejonizacijom. U svim ostalim ispitivanjima korišćena je prečišćena voda, dobijena destilacijom.

Za ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina iz dobijenih formulacija korišćeni su medijumi različitih pH vrednosti (1,2-7,4). Za pripremu medijuma pH vrednosti 1,2 korišćena je hlorovodonična kiselina (~37%) (Fisher Scientific, Velika Britanija). Za izradu fosfatnih pufera upotrebljeni su kalijum-dihidrogenfosfat i natrijum-hidroksid, proizvođača Sigma Aldrich, Nemačka. U tabeli 3.2 prikazan je sastav fosfatnih pufera prema USP 41-NF 36, koji su korišćeni za ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina.

Sve ostale supstance i reagensi upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su farmakopejskog (Ph. Eur.) kvaliteta i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja.

Tabela 3.1. Zaštićeni i farmakopejski nazivi i osobine ekscipijenas korišćenih za formulaciju tečnih SMEDDS

Zaštićen naziv	Proizvođač	Farmakopejski naziv (Ph. Eur. 10.0, engl.)	Farmakopejski naziv (Ph. Eur. 10.0, srp.)	Farmakopejski naziv (USP 41-NF 36, srp.)	Osobine	HLB
Labrafil® M 1944 CS	Gattefossé, Francuska	Oleoyl macrogol-6 glycerides	Oleoil makrogol-6 gliceridi	Oleoil polioksil-6 gliceridi	Uljasta prozirna tečnost, slabog mirisa	9
Capryol™ PGMC	Gattefossé, Francuska	/	/	Propilenglikol monokaprilat	Uljasta prozirna tečnost, slabog mirisa	6
Lauroglycol™ 90	Gattefossé, Francuska	Propylene glycol monolaurate	Propilenglikol monolaurat	Propilenglikol monolaurat	Uljasta prozirna tečnost, slabog mirisa	3
Labrasol®	Gattefossé, Francuska	Caprylocaproyl macrogol-8 glycerides	Kaprilokaproiil makrogol-8 gliceridi	Kaprilokaprioil polioksil-8 gliceridi	Uljasta, žuta, prozirna tečnost, slabog mirisa	12
Polisorbat 80	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka	Polysorbate 80	Polisorbat 80	Polisorbat 80	Uljasta, žuta, viskozna tečnost, slabog mirisa	15
Kolliphor® HS 15	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka	Macrogol 15 hydroxystearate	Makrogol 15 hidroksistearat	Polioksil 15 hidroksistearat	Žućkasto-bela zrnca (pelete) (na sobnoj temperaturi); tope se na temperaturi od ~ 30 °C	15

Tabela 3.2. Sastav fosfatnih pufera (1 l) za ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina (USP 41-NF 36)

Naziv supstance	pH fosfatnog pufera				
	6,0	6,4	6,9	7,0	7,4
Kalijum-dihidrogenfosfat (g)	6,805	6,805	6,805	6,805	6,805
Natrijum-hidroksid (g)	0,224	0,464	1,030	1,164	1,564
Prečišćena voda (l)	do 1,000	do 1,000	do 1,000	do 1,000	do 1,000

3.2. Metode

3.2.1. Prva faza eksperimentalnog rada

U okviru prve faze eksperimentalnog rada izvršena je formulacija i karakterizacija tečnih SMEDDS sa simvastatinom, u cilju poboljšanja njegove rastvorljivosti. U ovom delu su opisane metode ispitivanja rastvorljivosti simvastatina u vodi i različitim ekscipijensima, procene faznog ponašanja pseudoternarnih sistema ulje/surfaktant/kosurfaktant/voda i određivanja mikroemulzione oblasti u cilju formulisanja tečnih SMEDDS, kao i odabrane metode fizičko-hemijske karakterizacije i ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS.

3.2.1.1. Ispitivanje rastvorljivosti simvastatina

Rastvorljivost simvastatina u vodi i pojedinačnim ekscipijensima: uljima (oleoil makrogol-6 gliceridi, propilenglikol monokaprilat, propilenglikol monolaurat), surfaktantu (kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi) i kosurfaktantima (polisorbitat 80 i makrogol 15 hidroksistearat), određena je *shake flask* metodom (Higuchi i Conors, 1965).

Za određivanje rastvorljivosti simvastatina u vodi i tečnim ekscipijensima *shake flask* metodom, simvastatin je dodat u višku u 2 ml svakog ispitivanog ekscipijensa, a dobijene smeše mešane su na orbitalnom šejkeru (IKA® KS 260B, IKA, Nemačka), tokom 48 h na temperaturi od 22 ± 2 °C, pri brzini od 350 obr/min. Uzorci su zatim centrifugirani (centrifuga MPW-56, MPW Med. Instruments, Poljska) 30 min, pri brzini od 3000 obr/min, nakon čega je odvojeni supernatant filtriran kroz membranski filter od celuloznih estara veličine pora 0,45 µm (Merck Millipore, SAD), razblažen 96% V/V etanolom, a koncentracija simvastatina određena spektrofotometrijski primenom UV spektrofotometra (Evolution 300, Thermo Scientific, Velika Britanija), na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije simvastatina (239 nm). UV spektrofotometrijska metoda je jedna od metoda za određivanje sadržaja simvastatina (Kalarani i sar., 2009; More i sar., 2016). Koncentracija simvastatina izračunata je primenom odgovarajuće kalibracione krive ($r^2 = 0,999$). Specifičnost, linearnost, tačnost, preciznost i osetljivost primenjene metode potvrđene su internom validacijom.

Rastvorljivost simvastatina u makrogol 15 hidroksistearatu nije mogla da se odredi prethodno navedenom metodom, zbog polučvrste konzistencije ovog ekscipijensa. Iz navedenog razloga, makrogol 15 hidroksistearat je prvo otopljen na temperaturi koja je za 10 °C viša od njegove temperature topljenja (30 °C), a zatim je simvastatin dodat u višku u 2 ml otopljenog ekscipijensa. Dobijena smeša je mešana na termostatiranom vodenom kupatilu sa šejkerom (Grant LSB 18, Grant, Velika Britanija), tokom 48 h, na temperaturi od $40 \pm 0,1$ °C, pri brzini od 100 obr/min (Rao i sar., 2013), nakon čega je, kao i pri određivanju rastvorljivosti simvastatina u tečnim ekscipijensima, odvojeni supernatant profiltriran kroz membranski filter od celuloznih estara veličine pora 0,45 µm (Merck Millipore, SAD), razblažen 96% V/V etanolom, a koncentracija simvastatina određena spektrofotometrijski na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije.

Ispitivanje rastvorljivosti simvastatina u vodi i različitim ekscipijensima sprovedeno je u triplicatu i rezultati su izraženi kao srednje vrednosti tri ponovljena ispitivanja. Rezultati su statistički analizirani primenom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA), koristeći nivo značajnosti (α) 0,05. U slučaju statistički značajnih razlika u okviru dobijenih vrednosti, korišćen je *post-hoc Tukey* test, kako bi se utvrdilo između kojih srednjih vrednosti postoji statistički značajna razlika. Pomoću *Tukey* testa izračunava se kritična razlika D sa kojom se upoređuju apsolutne vrednosti razlika između srednjih vrednosti. Razlika između dve vrednosti smatra se značajnom ako je izračunata D vrednost veća od kritične D vrednosti ($\alpha = 0,05$).

3.2.1.2. Konstrukcija pseudoternarnih faznih dijagrama i određivanje mikroemulzione oblasti

Konstrukcija pseudoternarnih faznih dijagrama i određivanje mikroemulzione oblasti izvršeno je primenom metode titracije vodom, odnosno dodavanjem prečišćene vode u homogenu smešu uljane faze, surfaktanta i kosurfaktanta, na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C) i vizuelnim praćenjem promena (zamućenja) (Patel i Vavia, 2007). Na ovaj način je određeno koja vrsta ulja i kosurfaktanta omogućava izradu tečnih SMEDDS sa većom mikroemulzionom oblašću, kao i koji odnos surfaktanta i kosurfaktanta (tzv. surfaktantna faza, u odnosima 1:1, 2:1 i 3:1) je optimalan za formulaciju navedenih SMEDDS.

Određivanje mikroemulzione oblasti sprovedeno je na sledeći način: komponente surfaktantne faze, kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi, kao surfaktant (S) i polisorbit 80, odnosno makrogol 15 hidrosistearat, kao kosurfaktant (Cs), izmerene su u S/Cs odnosima: 1:1, 2:1 i 3:1. Nakon toga, surfaktantnoj fazi je dodato ulje i izrađene su smeše surfaktantna faza/ulje, u 9 različitih odnosa, od 9:1 do 1:9 (ukupno 54 uzoraka). Smeše su titrirane dodavanjem prečišćene vode, kap po kap, uz mešanje na magnetnoj mešalici. Uzorci su posmatrani vizuelno, a završna tačka titracije je definisana kao trenutak zamućenja smeše. Da bi se utvrdio uticaj dodatka lekovite supstance na mikroemulzionu oblast, izrađenim smešama je dodat simvastatin (5%, m/m) i one su titrirane na isti način kao i smeše bez simvastatina.

Na osnovu dobijenih podataka konstruisani su pseudoternarni fazni dijagrami pomoću kompjuterskog programa SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., SAD) pomoću kojih je identifikovana mikroemulziona oblast za sve ispitivane sisteme. Određivanje površine mikroemulzionih oblasti sprovedeno je korišćenjem kompjuterskog programa SketchAndCalc™ (Elliot M. Dobbs, SAD). Svi uzorci koji su bili homogeni, transparentni i niskoviskozni označeni su kao mikroemulzije i korišćeni za dalja ispitivanja.

3.2.1.3. Izrada tečnih SMEDDS

Odabrani uzorci na osnovu pseudoternarnih faznih dijagrama, označeni kao SMEDDS, izrađivani su tako što je najpre kaprilokaproil makrogol-8 gliceridima, kao surfaktantu, dodat polisorbit 80, odnosno makrogol 15 hidrosistearat, kao kosurfaktant, u različitim S/Cs odnosima, a potom je dodavana uljana faza (oleoil makrogol-6 gliceridi ili propilenglikol monokaprilat). Uzorci su mešani tokom 10 min na magnetnoj mešalici. Inkorporiranje simvastatina, u koncentraciji od 5%, izvršeno je nakon izrade tečnih SMEDDS, uz kontinuirano mešanje na magnetnoj mešalici, do potpunog rastvaranja simvastatina. Izrađeni uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C), u staklenim epruvetama sa navojem, zatvorenim plastičnim čepom, zaštićeni od svetlosti, kako bi se sprečila fotodegradacija simvastatina.

3.2.1.4. Fizičko-hemijska karakterizacija tečnih SMEDDS

U cilju fizičko-hemijske karakterizacije tečnih SMEDDS sprovedene su sledeće analize: procena samoemulgovanja, određivanje robusnosti prema razblaživanju, određivanje veličine i raspodele veličine kapi, kao i ispitivanje stabilnosti tečnih SMEDDS, skladištenih šest meseci na sobnoj temperaturi. Određivanje vremena potrebnog za samoemulgovanje i robusnosti nakon razblaživanja prečišćenom vodom, izvedene su sa tečnim SMEDDS sa simvastatinom, primenom odgovarajućih metoda, opisanim u nastavku. Analiza veličine i raspodele veličine kapi, kao i procena stabilnosti tečnih SMEDDS, sprovedene su kod tečnih SMEDDS bez i sa simvastatinom, kako bi se odredio uticaj lekovite supstance na izrađene SMEDDS.

3.2.1.4.1. Procena samoemulgovanja

Procena samoemulgovanja tečnih SMEDDS sa simvastatinom izvedena je korišćenjem standardne aparature za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance sa rotirajućom lopaticom (Erveka DT70, Nemačka), pri brzini od 50 obr/min. Po 1 ml svakog SMEDDS sa simvastatinom dispergovan je u 250 ml prečišćene vode, na temperaturi od $37 \pm 0,5$ °C. Prečišćena voda je odabrana kao medijum, budući da je pokazano da nema razlike u procesu emulgovanja formulacija koje sadrže nejonske surfaktante, bez obzira da li se dispeguju u vodi ili simuliranim biološkim tečnostima (Qureshi i sar., 2015). Vreme samoemulgovanja (u sekundama) procenjivano je vizuelnim posmatranjem, a rangiranje uzoraka (tip I-V) je izvršeno prema skali, prikazanoj u tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Vizuelna procena samoemulgovanja (Padia i sar., 2015; Shen i Zhong, 2006)

Tip	Disperzibilnost i izgled	Vreme samoemulgovanja
I	Bistra ili blago plavičasta mikroemulzija, brzo nastaje	< 1 min
II	Plavičasto-bela emulzija, brzo nastaje	< 2 min
III	Mlečno-bela emulzija, brzo nastaje	< 3 min
IV	Sivkasto-bela emulzija, sporo nastaje	> 3 min
V	Slabo emulgovanje, velike kapi ulja prisutne na površini	> 3 min

3.2.1.4.2. Robustnost prema razblaživanju

Robusnost prema razblaživanju određivana je nakon razblaživanja (10, 100, 250 i 1000 puta) tečnih SMEDDS koji sadrže simvastatin, prečišćenom vodom, a dobijeni uzorci su posmatrani vizuelno, radi procene bistrine. Transparencija je merena 2 h posle razblaživanja, na 650 nm, pomoću UV spektrofotometra (Evolution 300, Thermo Scientific, Velika Britanija), uz prečišćenu vodu, kao slepu probu (Bakhle i Avari, 2015). Rezultati su statistički analizirani *Studentovim* t-testom, sa nivoom značajnosti od 0,05.

3.2.1.4.3. Analiza veličine i raspodele veličine kapi

Za određivanje veličine i raspodele veličine kapi (indeks polidisperziteta, engl. *polydispersity index*, skr. *PDI*) korišćena je tehnika fotonske korelacione spektroskopije (engl. *Photon Correlation Spectroscopy*, skr. *PCS*). Osnovni principi fotonske korelacione spektroskopije zasnivaju se na merenju stepena fluktuacije intenziteta rasute svetlosti, koja nastaje usled Braunovog kretanja kapi u uzorku (Tscharnuter, 2006). Ova metoda se obično primenjuje za uzorke koji imaju veličinu kapi u opsegu od 0,002 do 2 μ m. Dobijeni rezultati se putem kompjuterskog programa prevode u veličinu kapi korišćenjem *Stokes-Einstein*-ove jednačine (Tscharnuter, 2006).

Odabrane tečne SMEDDS, bez i sa simvastatinom, nakon razblaživanja visoko prečišćenom vodom u odnosu 1:10, podvrgnute su merenju veličine i raspodele veličina kapi pomoću uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Velika Britanija), na temperaturi od $20 \pm 0,1$ °C. Uređaj je opremljen sa He-Ne laserom, koji generiše upadnu koherentnu monohromatsku svetlost talasne dužine 633 nm. Nakon prolaska kroz kivetu sa uzorkom, rasuta svetlost se detektuje pod uglom od 90°. Rad uređaja je integrisan sa kompjuterskim programom (Dispersion Technology Software, DTS, Velika Britanija), koji omogućava optimalno podešavanje optičke konfiguracije instrumenta za svaki set eksperimentalnih uslova, sprovodi merenje, vrši analizu podataka i kreira izveštaj. Dobijeni rezultati izraženi su kao srednja vrednost veličine kapi, PDI i standardna devijacija (SD) tri uzastopna merenja za svaki uzorak.

3.2.1.4.4. Ispitivanje stabilnosti tečnih SMEDDS

Procena stabilnosti odabranih tečnih SMEDDS sprovedena je vizuelnim posmatranjem i određivanjem prosečne veličine kapi i PDI, nakon jednog, tri i šest meseci čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C), u staklenim epruветama sa navojem, zatvorenim plastičnim čepom, zaštićenim od svetlosti, kako bi se izbegla fotodegradacija simvastatina. Uzorci su čuvani nerazblaženi, a razblaživanje je vršeno naposredno pre merenja, u navedenim vremenskim intervalima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost veličine kapi, PDI i SD tri uzastopna merenja za svaki uzorak.

Dodatno, u cilju procene stabilnosti tečnih SMEDDS, sprovedeno je i određivanje sadržaja simvastatina inicijalno, u sveže izrađenim uzorcima SMEDDS, kao i u uzorcima nakon jednog, tri i šest meseci čuvanja na sobnoj temperaturi. Uzorci su najpre rastvoreni u 96% V/V etanolu, mešanjem na ultrazvučnom kupatilu (Bandelin Sonorek Super RK 102 H, Bandelin electronic, Nemačka), a zatim je sadržaj simvastatina određen UV spektrofotometrijski, na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije simvastatina.

3.2.1.5. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS

Ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS, punjenih u masi od 0,4 g u tvrde želatinske kapsule veličine „0“, sprovedeno je u aparaturi sa rotirajućom korpicom Erweka DT70 (Erweka, Nemačka), pri brzini rotiranja korpice od 75 obr/min. Kao medijum za ispitivanje brzine rastvaranja korišćen je fosfatni pufer pH 7,0, zapremine 900 ml, na temperaturi od $37 \pm 0,5$ °C. Izabrani eksperimentalni uslovi su u skladu sa USP zahtevima za određivanje brzine rastvaranja simvastatina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem, uz modifikaciju koja je isključivala dodavanje 0,5% natrijum-laurilsulfata u medijum. Dodavanje surfaktanta natrijum-laurilsulfata u medijum smanjilo bi diskriminatornu moć testa, odnosno, onemogućilo bi razlikovanje profila brzine rastvaranja simvastatina iz različitih SMEDDS, s obzirom da surfaktanti povećavaju brzinu rastvaranja lekovite supstance (Atef i Belmonte, 2008; Mahmoud i sar., 2013; Margulis-Goshen i Magdassi, 2009). Po 5 ml uzorka je uzimano u unapred utvrđenim vremenskim intervalima, uz nadoknadu medijuma nakon svakog uzorkovanja. Uzorkovanje je vršeno nakon 5, 10, 15, 30, 45 i 60 min. Koncentracija rastvorenog simvastatina određena je UV spektrofotometrijski, na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije simvastatina, prema metodi Chavan i saradnika (2014). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti i SD, za tri ponovljena ispitivanja.

3.2.1.6. Poređenje profila brzine rastvaranje simvastatina iz tečnih SMEDDS

Sličnost *in vitro* dobijenih profila brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS procenjena je model-nezavisnim pristupom, pomoću faktora sličnosti (f_2), koji se izračunava iz jednačine (2):

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad (2)$$

gde je n broj uzorkovanja, a R_t i T_t predstavljaju srednje vrednosti procenta rastvorene supstance za referentnu formulaciju/formulaciju sa kojom se poredi (R) i ispitivanu formulaciju/formulaciju koja se poredi (T) u vremenu t . Opisana metoda izračunavanja faktora sličnosti odobrena je od strane Evropske agencije za lekove (engl. *European Medicines Agency*, skr. *EMA*) i Američke uprave za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, skr. *FDA*) kao prihvatljiva metoda za poređenje profila brzine rastvaranja (EMA, 2020; FDA, 2017). Dobijeni profili brzine rastvaranja se smatraju sličnim ako je $50 < f_2 < 100$.

3.2.2. Druga faza eksperimentalnog rada

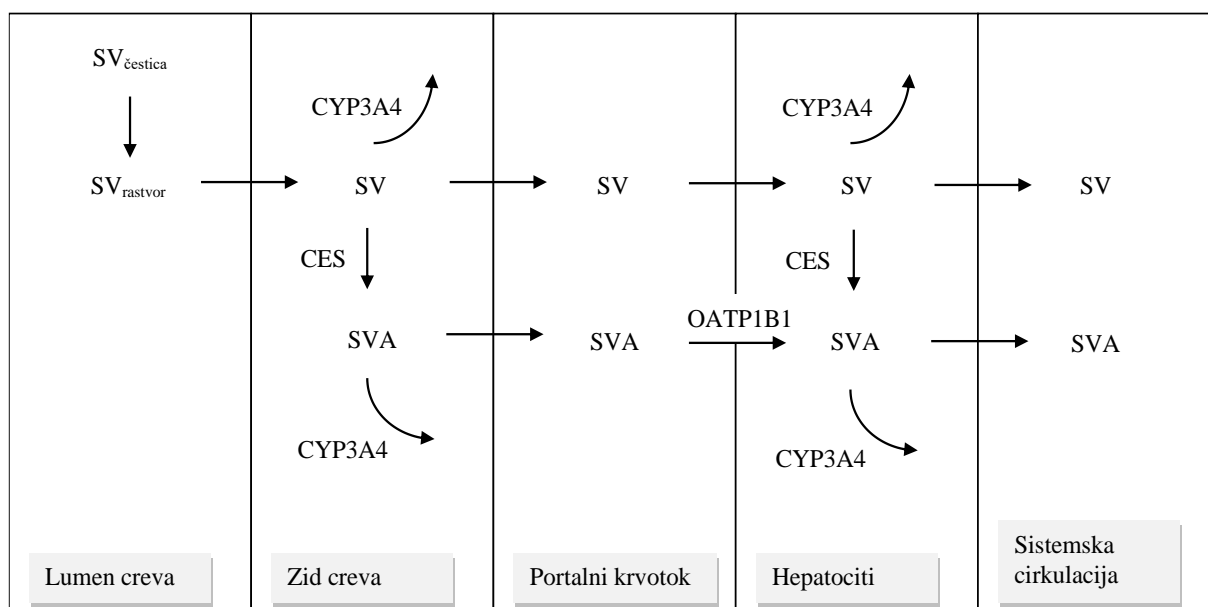
Druga faza ekperimentalnog rada je obuhvatila razvoj i primenu *in silico* modela za procenu apsorpcije i biološke raspoloživosti simvastatina, nakon peroralne primene različitih preparata. U ovom delu je opisan razvoj simvastatin-specifičnog PBPK modela, koji je dalje korišćen da se, na osnovu podataka o *in vitro* brzini rastvaranja simvastatina iz odabranih formulacija dobijenih u prvoj fazi eksperimentalnog rada, predvide očekivani stepen i brzina apsorpcije *in vivo* i odredi optimalno mesto za apsorpciju simvastatina.

3.2.2.1. Razvoj simvastatin-specifičnog PBPK modela

Za *in silico* modelovanje i simulacije korišćen je GastroPlus™ programski paket (verzija 9.0.0007, SimulationsPlus Inc., SAD). Ovaj kompjuterski program, na osnovu odabranog seta ulaznih podataka, simulira prolazak kroz GI trakt, rastvaranje, apsorpciju, dispoziciju (raspodelu) i eliminaciju lekovite supstance. Za simulaciju procesa kojima podležu lekovi primenjeni peroralnim putem koristi se tzv. ACAT model.

Primenjeni pristup modelovanja se sastojao iz dve faze, pri čemu je prva faza predstavljala razvoj simvastatin-specifičnog modela, a druga faza je bila primena modela. Simvastatin-specifičan model je izgrađen analizom i odabirom podataka iz literature, u kombinaciji sa eksperimentalnim i *in silico* predviđenim vrednostima parametara koji opisuju biofarmaceutska svojstva simvastatina i fiziološke karakteristike organizma. Poređenjem rezultata predviđanja sa podacima iz kliničkih studija za tablete sa trenutnim oslobađanjem simvastatina, izabran je optimalan set ulaznih parametara koji na odgovarajući način opisuje apsorpciju, konverziju u simvastatin-kiselinu, raspodelu i eliminaciju simvastatina (tabela 3.4). S obzirom da se dostupni podaci iz kliničkih studija odnose na tablete sa trenutnim oslobađanjem simvastatina (Tubić-Grozdaniš i sar., 2008), brzina rastvaranja lekovite supstance u fiziološkim uslovima predviđena je pomoću *Johnson*-ovog modela rastvaranja, koji je zasnovan na modifikovanoj *Nernst-Bruner*-ovoj jednačini (Lu i sar., 1993; Zaborenko i sar., 2019). Svi ostali parametri ACAT modela su podešeni na podrazumevane (*default*) vrednosti, koje opisuju humanu fiziologiju u preprandijalnom i postprandijalnom stanju.

Da bi se simulirali dispozicija i metabolizam lekova u različitim tkivima, ACAT model je povezan sa tzv. „kompletnim“ PBPK modelom. Izabrani PBPK model koristi GastroPlus™ podrazumevane vrednosti fizioloških parametara za odraslu osobu bele rase, starosti 30 godina i telesne mase 70 kg. Ovi podaci predstavljaju srednje vrednosti za odabranu populaciju i dobijeni su metaanalizom objavljenih podataka iz različitih *in vivo* studija. Simvastatin-specifičan model je izgrađen korišćenjem opcije za praćenje metabolita koja istovremeno opisuje konverziju simvastatina u simvastatin-kiselinu i njihovu farmakokinetiku, kao što je prikazano na slici 3.1. U model je uključena i konverzija simvastatina u simvastatin-kiselinu pomoću enzima karboksilesteraze (CES) u crevima i jetri, kao i metabolizam simvastatina i simvastatin-kiseline pomoću enzima CYP3A4 u crevima i jetri. Vrednosti za *Michaelis-Mentenovu*-ovu konstantu (K_m) i maksimalnu brzinu enzimske reakcije (V_{max}) za CES u crevima i jetri, klirens CYP3A4 za simvastatin, kao i vrednost K_m za metabolizam simvastatin-kiseline pomoću CYP3A4, preuzete su iz literature. Vrednost V_{max} za klirens simvastatin-kiseline pomoću CYP3A4 je optimizovana kako bi se generisani farmakokinetički profili za simvastatin i simvastatin-kiselinu slagali sa *in vivo* podacima (Tubić-Grozdaniš i sar., 2008). Podaci o distribuciji CYP3A4 po regionima GI trakta i ekspresija CYP3A4 u jetri su preuzeti iz GastroPlus™ baze podataka za izabranu populaciju (vrednosti izračunate na osnovu publikovanih podataka (Paine i sar., 1997)). Ekspresija CES u jetri je izračunata na osnovu literaturnih podataka (Ross i sar., 2012) i podrazumevane vrednosti programa za koncentraciju mikrozomalnih proteina u jetri (38 mg proteina/g jetre).



Slika 3.1. Shematski prikaz apsorpcije, transporta i metabolizma simvastatina i simvastatin-kiseline

Izgrađeni model podrazumeva da lekovita supstanca može pasivno da prolazi kroz biološke membrane, što znači da je količina lekovite supstance u tkivu ograničena samo brzinom protoka krvi kroz tkivo. U skladu sa tim, svi organi/tkiva, osim jetre, posmatrani su kao organi/tkiva u kojima je raspodela lekovite supstance ograničena perfuzijom krvi. Koeficijenti raspodele tkivo/plazma (K_p) za ove organe/tkiva izračunati su korišćenjem modifikovane *Rodgers-Single (Lukacova)* jednačine, pri čemu je slobodna frakcija lekovite supstance u tkivu (f_{ut}) izračunata pomoću S+ jednačine, integrisane u okviru programa (Lukacova i sar., 2008). Kako bi se uzeo u obzir transport simvastatin-kiseline preko bazolateralne membrane hepatocita posredstvom OATP1B1 transportera, jetra je definisana kao organ u kome je raspodela ograničena permeabilnošću simvastatina i simvastatin-kiseline. Podaci o ekspresiji OATP1B1 transportera u jetri su preuzeti iz literature (Badée i sar., 2015), kao i odgovarajuća vrednost K_m (Huang, 2010), dok je vrednost V_{max} optimizovana. Osim aktivnog transporta, model uzima u obzir i pasivnu difuziju slobodne simvastatin-kiseline preko bazolateralne membrane hepatocita. Doprinos pasivne difuzije određen je pomoću tzv. PStc faktora za jetru, koji opisuje permeabilnost supstance difuzijom u odnosu na dostupnu površinu kroz koju se vrši transport. PStc je izračunata na osnovu klirensa pasivne difuzije simvastatin-kiseline od $4 \mu\text{l}/\text{min}/10^6$ ćelija (Tsamandouras i sar., 2015). Kako je, za razliku od simvastatin-kiseline, transport lipofilnog simvastatina kroz bazolateralnu membranu hepatocita ograničen perfuzijom (a ne permeabilnošću supstance) (Tsamandouras i sar., 2015), pretpostavljeno je da je vrednost PStc za ovaj oblik lekovite supstance 10000 puta veća od protoka krvi kroz jetru.

S obzirom da su učesnicima u referentnoj studiji (Tubić-Grozdanić i sar., 2008) dati standardni obroci nakon 4 h i 10 h od primene leka, u model je uključena opcija „mešovito doziranja” (engl. *mixed multiple doses*, skr. *MMD*), koja omogućava promenu vrednosti fizioloških parametara iz preprandijalnog u postprandijalno stanje i obratno.

Validnost, odnosno, sposobnost predviđanja izgrađenog modela testirana je poređenjem ishoda simulacije sa literaturnim podacima o profilima koncentracije simvastatina i simvastatin-kiseline u plazmi u funkciji vremena i odgovarajućim farmakokinetičkim parametrima, dobijenim nakon peroralne primene 20 mg simvastatina u obliku tableta sa trenutnim oslobađanjem (Tubić-Grozdanić i sar., 2008). Za očitavanje numeričkih vrednosti sa grafičkih prikaza iz publikovanih radova korišćen je DigIt™ program (verzija 1.0.4, SimulationsPlus, Inc., SAD).

U drugoj fazi modelovanja, izgrađeni model je korišćen da se, na osnovu podataka o *in vitro* brzini rastvaranja simvastatina iz odabranih formulacija dobijenih u prvoj fazi eksperimentalnog rada, predvide očekivani stepen i brzina apsorpcije *in vivo*, nakon peroralne primene izrađenih formulacija. Na osnovu mehanističke analize rezultata simulacija identifikovano je optimalno mesto za apsorpciju simvastatina, kako bi se dizajnirale odgovarajuće formulacije sa ciljnim, modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance i, posledično, poboljšanom biološkom raspoloživošću.

Tabela 3.4. Ulazni parametri za simulaciju apsorpcije simvastatina i simvastatin-kiseline u GastroPlus™ programu

Parametar	Vrednost (simvastatin)	Vrednost (simvastatin-kiseline)
Molekulska težina	418,60 g/mol	436,60 g/mol
logD (pH 7,0)	4,40 ^a	1,88 ^a
pK _a	13,49 ^b	4,31 ^b
Efektivna permeabilnost kroz humani jejunum, P _{eff}	3,20 x 10 ⁻⁴ cm/s ^c	-
Doza	20 mg ^d	-
Zapremina tečnosti uzeta sa lekom	200 ml ^d	-
Rastvorljivost (u vodi)	20 µg/ml ^e	-
Srednje vreme precipitacije	900 s ^f	-
Koeficijent difuzije	6,42 x 10 ⁻⁶ cm ² /s ^g	-
Gustina čestica lekovite supstance	1,20 g/ml ^f	-
Veličina čestica lekovite supstance	9 µm ^h	-
Odnos koncentracije lekovite supstance u krvi/plazmi	0,57 ⁱ	0,56 ^h
Slobodna frakcija lekovite supstance u plazmi	1,34% ^h	5,48% ^h
CES K _m u crevima	237,60 mg/l ^j	-
CES V _{max} u crevima	0,09 mg/s ^j	-
CES K _m u jetri	85,10 mg/l ^j	-
CES V _{max} u jetri	0,40 mg/s ^j	-
CYP3A4 K _m	2,01 mg/l ^k	11,06 mg/l ^l
CYP3A4 V _{max}	0,57 mg/s ^k	800 mg/s ^m
OATP1B1 K _m	-	1,10 mg/l ⁿ
OATP1B1 V _{max}	-	1 x 10 ⁻⁵ mg/s/mg transporter ^m

^a Podatak iz literature (Ishigami i sar., 2001)

^b Podatak iz literature (Pasanen i sar., 2006)

^c Vrednost izračunata na osnovu pasivne permeabilnosti određene na LLC-PK1 ćelijskoj liniji (Hochman i sar., 2004), uz pomoć konvertera integrisanog u okviru softvera

^d Podatak iz literature (Tubić-Grozdanis i sar., 2008)

^e Eksperimentalna vrednost

^f GastroPlus™ podrazumevana vrednost

^g GastroPlus™ predviđena vrednost

^h Podatak iz literature (Tsamondouras i sar., 2015)

ⁱ Podatak iz literature (Gertz i sar., 2011)

^j Vrednost konvertovana iz *in vitro* podataka (Imai i Ohtawa, 1992), uz pomoć konvertera integrisanog u okviru softvera

^k Vrednost konvertovana iz *in vitro* podataka (Ishigami i sar., 2001), uz pomoć konvertera integrisanog u okviru softvera

^l Vrednost konvertovana iz *in vitro* podataka (Prueksaritanont i sar., 2003), uz pomoć konvertera integrisanog u okviru softvera

^m Optimizovana vrednost

ⁿ Vrednost konvertovana iz *in vitro* podataka (Gelissena i sar., 2014), uz pomoć konvertera integrisanog u okviru softvera

3.2.3. Treća faza eksperimentalnog rada

U trećoj fazi eksperimentalnog rada primenjena su dva pristupa u izradi lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina. Prvi pristup je podrazumevao punjenje odabranih tečnih SMEDDS u acidorezistentne kapsule od hipromeloze, a drugi mešanje tečnih SMEDDS sa čvrstim polimernim nosačima. Dobijene formulacije su podvrgnute biofarmaceutskoj karakterizaciji, a zatim na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja simvastatina, primenom simvastatin-specifičnog *in silico* modela razvijenog u drugoj fazi eksperimentalnog rada, izvršeno je predviđanje očekivanog stepena i brzine apsorpcije simvastatina. U poslednjoj fazi odabrane su lipidne formulacije koje su pokazale željeno oslobađanje simvastatina i sprovedena je njihova fizičko-hemijska karakterizacija i procena stabilnosti.

3.2.3.1. Izrada lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina

U cilju dobijanja lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina, u prvom delu treće faze eksperimentalnog rada, odabrani tečni SMEDDS punjeni su u acidorezistentne kapsule od hipromeloze veličine „0“ (DRcaps™, Capsugel, SAD). U drugom delu su tečni SMEDDS, odabrani na osnovu prve faze eksperimentalnog rada, mešani u pateni pomoću pistila, sa Eudragit® polimerima (Eudragit® L100, Eudragit® S100 i smeša Eudragit® S100/Eudragit® L100, u odnosu 1:1), u odnosu SMEDDS:polimer 1:1 i 2:1 m/m. Mešanje praška Eudragit® polimera i tečnog SMEDDS je vršeno u toku 5 min, da bi se dobila homogena smeša.

3.2.3.2. Biofarmaceutska karakterizacija lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina

3.2.3.2.1. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem

Ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS, punjenih u acidorezistentne kapsule od hipromeloze, kao i iz uzoraka dobijenih mešanjem odabranih tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera, punjenih u tvrde želatinske kapsule, sprovedeno je u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem (Bio-Dis Extended Release Tester, VanKel Technology Group, SAD), prikazanoj na slici 3.2. Ova aparatura omogućava kontinuirano ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance u medijumima različitih pH vrednosti (npr. 1,2; 6,0; 6,4; 6,9 i 7,4), čime se oponašaju promene u fiziološkim uslovima u toku prolaska leka kroz GI trakt.



Slika 3.2. Aparatura sa cilindrom sa povratnim kretanjem (Bio-Dis Extended Release Tester, VanKel Technology Group, SAD)

Izabrani eksperimentalni uslovi koji oponašaju transport farmaceutskog oblika leka kroz GI trakt u preprandijalnom stanju prikazani su u tabeli 3.5. U toku eksperimenta, po 5 ml uzorka je uzimano u unapred utvrđenim vremenskim intervalima (15, 30, 45, 60, 90, 120, 135, 150, 180, 195, 210, 240, 270, 300 i 330 min), uz nadoknadu medijuma nakon svakog uzorkovanja. Nakon filtriranja uzoraka (membranski filter od celuloznih estara veličine pora 0,45 μm, Merck Millipore, SAD), sadržaj oslobođenog simvastatina određen je UV spektrofotometrijski, na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije simvastatina. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti i SD za tri ponovljena ispitivanja.

Tabela 3.5. Uslovi *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranje simvastatina pomoću aparature sa cilindrom sa povratnim kretanjem

Red	I	II	III	IV	V
Predstavljeni region GI trakta	želudac	duodenum	proksimalni jejunum	distalni jejunum	distalni ileum
pH vrednost	pH 1,2	pH 6,0	pH 6,4	pH 6,9	pH 7,4
Vreme zadržavanja (min)	15	15	90	60	150
Vreme odlaganja (s)	30				
Vreme ceđenja (s)	60				

3.2.3.2.2. Matematičko modelovanje kinetike oslobađanja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem

Analiza *in vitro* profila brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem sprovedena je za uzorke dobijene mešanjem tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera, primenom različitih matematičkih modela. Naime, da bi se objasnili kinetika i mehanizmi oslobađanja simvastatina iz lipidnih formulacija dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera, dobijeni profili brzine rastvaranja simvastatina su modelovani pomoću različitih matematičkih jednačina i izračunati su koeficijenti determinacije (r^2). Najviša vrednost za r^2 ukazuje na matematički model koji najbolje opisuje profil oslobađanja lekovite supstance. Za opisivanje kinetike oslobađanja simvastatina primenjeni su sledeći matematički modeli: kinetika nultog reda, kinetika prvog reda (Costa i sar., 2001), *Higuchi* (Higuchi, 1963), *Korsmeyer-Peppas* (Korsmeyer i sar., 1983), i *Hixon-Crowell* model (Hixon i Crowell, 1931). U tabeli 3.6 dat je pregled navedenih matematičkih modela i jednačine koje ih opisuju.

Tabela 3.6. Prikaz matematičkih modela primenjenih za opisivanje kinetike oslobađanja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem

Model	Jednačina
<i>Kinetika nultog reda</i>	$Wt = Wo - k_0 \times t$
<i>Kinetika prvog reda</i>	$\ln Wt = \ln Wo + k_1 \times t$
<i>Higuchi</i>	$Q = k_h \times t^{0,5}$
<i>Korsmeyer-Peppas</i>	$Q = k \times t^n$
<i>Hixon-Crowell</i>	$Wo^{\frac{1}{3}} - Wt^{\frac{1}{3}} = k_c \times t$

Wo – početna količina lekovite supstance u farmaceutskom obliku

Wt – količina nerastvorene lekovite supstance nakon vremena t

Q – količina lekovite supstance oslobođena/rastvorena nakon vremena t

k_0, k_1, k_h, k, k_c – konstante brzine oslobađanja/rastvaranja u odgovarajućim modelima

Kinetika nultog reda odlikuje se konstantnom brzinom rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika. To znači da se ista količina lekovite supstance oslobodi/rastvori u svakoj jedinici vremena, što se u nekim slučajevima smatra idealnim za postizanje produženog oslobađanja (Costa i sar., 2001).

Kinetika prvog reda opisuje rastvaranje lekovite supstance koje je srazmerno koncentraciji lekovite supstance. To znači da se količina rastvorene lekovite supstance eksponencijalno smanjuje u jednakim vremenskim intervalima, a zavisi od preostale (nerastvorene) količine lekovite supstance (Costa i sar., 2001).

Higuchi model opisuje proces oslobađanja/rastvaranja lekovite supstance koji se zasniva na *Fick*-ovom zakonu difuzije, odnosno količina oslobođene/rastvorene lekovite supstance je direktno srazmerna kvadratnom korenu vremena. Ovaj model se najčešće koristi za opisivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskih oblika sa modifikovanim oslobađanjem (Higuchi, 1963).

Korsmeyer i saradnici (1983) su razvili relativno jednostavan semiempirijski model, gde je k konstanta koja opisuje geometriju i strukturu sistema, a n je eksponent koji opisuje mehanizam oslobađanja lekovite supstance. Ovaj model je koristan za opisivanje oslobađanja/rastvaranja lekovite supstance iz polimernih sistema kada mehanizam oslobađanja nije poznat ili kada je uključeno više mehanizama oslobađanja lekovite supstance (Korsmeyer i sar., 1983). Zavisno od vrednosti eksponenta n , razlikuju se četiri slučaja (tabela 3.7). U slučaju nosača cilindričnog oblika, kada je vrednost eksponenta $n = 0,45$, mehanizam oslobađanja lekovite supstance je *Fick*-ova difuzija. U tom slučaju, brzina difuzije je mnogo veća od procesa relaksacije polimernih lanaca. Kada je $0,45 < n < 0,89$, model koji opisuje kinetiku oslobađanja lekovite supstance je *ne-Fick*-ov ili anomalni transport, a mehanizmi oslobađanja lekovite supstance su difuzija i bubrenje polimernih lanaca. Kada je $n = 0,89$, model je *ne-Fick*-ov („slučaj II transporta“), a brzina oslobađanja lekovite supstance odgovara kinetici oslobađanja nultog reda, dok su mehanizmi koji pokreću oslobađanje bubrenje ili relaksacija polimernih lanaca. Na kraju, model „super slučaj II transporta“ opisuje situacije kada je $n > 0,89$ i predstavlja ekstremni oblik transporta (Costa i sar., 2001). U ovom slučaju, tokom procesa sorpcije dolazi do naprezanja i lomljenja polimernih lanaca.

Tabela 3.7. Mehanizmi oslobađanja lekovite supstance u zavisnosti od eksponenta n (Costa i sar., 2001)

Vrednost eksponenta*	Mehanizam oslobađanja lekovite supstance	Brzina oslobađanja/rastvaranja u funkciji vremena
$n = 0,45$	<i>Fick</i> -ova difuzija	$t^{-0,5}$
$0,45 < n < 0,89$	anomalni transport	t^{n-1}
$n = 0,89$	slučaj II transporta	kinetika nultog reda
$n > 0,89$	super slučaj II transporta	t^{n-1}

*za nosače cilindričnog oblika

Hixon i Crowell (1931) su, pri razvoju modela koji opisuje oslobađanje lekovite supstance, pošli od pretpostavke da je površina čestica (koja utiče na brzinu rastvaranja) proporcionalna kubnom korenu zapremine čestica. Koristeći ovaj odnos, došli su do jednačine koja opisuje brzinu rastvaranja lekovite supstance, predstavljenu u tabeli 3.6. Ova jednačina se primenjuje za opisivanje brzine rastvaranja iz nosača čija se površina, preko koje se vrši oslobađanje, proporcionalno smanjuje tokom vremena, a geometrijski oblik održava konstantnim. *Hixon-Crowell* model se može primeniti na farmaceutske oblike kao što su tablete, pri čemu se površina vremenom proporcionalno smanjuje, a geometrijski oblik održava konstantnim (Hixon i Crowell, 1931).

3.2.3.3. *In silico* simulacija apsorpcije simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem

Simvastatin-specifičan GastroPlus™ model, razvijen u drugoj fazi eksperimentalnog rada, korišćen je za predviđanje očekivanog stepena i brzine apsorpcije simvastatina nakon peroralne primene lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem. Kao dodatni ulazni parametri za simulacije korišćeni su *in vitro* profili brzine rastvaranja simvastatina iz navedenih formulacija. Svi ostali ulazni parametri su odgovarali vrednostima navedenim u tabeli 3.4.

Samo one lipidne formulacije koje su pokazale odgovarajući, modifikovani profil oslobađanja/brzine rastvaranja simvastatina podvrgnute su daljoj karakterizaciji.

3.2.3.4. Fizičko-hemijska karakterizacija lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina

U cilju fizičko-hemijske karakterizacije čvrstih lipidnih formulacija sa željenim modifikovanim oslobađanjem simvastatina, dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera, sprovedena su oscilatorna reološka merenja, ispitivanje tvrdoće i stabilnosti.

3.2.3.4.1. Reološka karakterizacija

Priprema uzoraka za reološka merenja izvršena je na sledeći način: uzorci, dobijeni mešanjem tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera izliveni su, u količini od 4 g, u plastične kutije, prečnika 5 cm. Nakon 48 h stajanja, očvrslili uzorci su pažljivo izvađeni iz kutija i izvršena su oscilatorna reološka merenja.

Oscilatorna (dinamička) reološka merenja su sprovedena korišćenjem reometra Rheolab MC 120 (Paar Physica, Nemačka), upotrebom kupa/ploča mernog sistema MK 22 (prečnik kupe 50 mm, 1° ugao nagiba, rastojanje između kupe i ploče 50 μm), na temperaturi od 20 ± 0,2 °C.

U toku oscilatornih merenja prati se ponašanje sledećih viskoelastičnih parametara (Mezger, 2015):

- G' – elastični modul (modul sačuvane energije) je pokazatelj elastičnog ponašanja i predstavlja sposobnost sistema da sačuva elastičnu energiju po ciklusu povratne elastične deformacije;
- G'' – viskozni modul (modul izgubljene energije) je mera dinamičkog viskoznog ponašanja i predstavlja rasipanje energije u toku nepovratne viskozne deformacije;
- $\tan \delta$ – tangens faznog ugla je neimenovani broj, koji predstavlja odnos viskoznog i elastičnog modula. On je mera odnosa izgubljene prema sačuvanoj energiji u cikličnoj deformaciji i parametar je za poređenje koji istovremeno kombinuje doprinos elastične i viskozne komponente u sistemu. Odnos između G' , G'' i $\tan \delta$ je:

$$\tan \delta = G''/G' \quad (3)$$

U prvoj fazi merenja sproveden je test promene amplitude deformacija (engl. *amplitude sweep*), kako bi se odredio linearni viskoelastični region uzoraka. Ovim ispitivanjem opisuje se ponašanje uzoraka u toku vremena, pri malim pomeranjima mernog tela i ispituje granica prilikom koje dolazi do narušavanja unutrašnje strukture sistema. Područje deformacija u kojima reološki parametri elastični modul, viskozni modul i tangens faznog ugla pokazuju konstantne vrednosti se označava kao linearni viskoelastični region. Vrednosti deformacija u linearnom viskoelastičnom regionu nisu dovoljne da poremete ili sruše strukturu sistema. Na ovaj način se dobijaju informacije o strukturi sistema u „stanju mirovanja“ (Ramya i sar., 2020). Nakon određivanja viskoelastičnog regiona, u drugoj fazi merenja su uzorci podvrgnuti testu promene frekvencije (engl. *frequency sweep*), pri konstantnoj deformaciji. U ovom testu se deformacija održavala konstantnom (0,6%), dok se frekvencija

postepeno menjala, od 0,1 do 1,0 Hz. Rezultati oscilatornih reoloških merenja prikazani su kao srednja vrednost i SD tri uzastopna merenja.

3.2.3.4.2. Ispitivanje tvrdoće

Ispitivanje tvrdoće čvrstih formulacija dobijenih mešanjem odabranih tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera izvedeno je korišćenjem uređaja Texture Analyzer EZ-LX (Shimadzu Corporation, Japan), upotrebom merne ćelije od 500 N, na koju je pričvršćen cilindar prečnika 7 mm i visine 40 mm. Vizuelizacija opterećenja i položaja cilindra izvedena je korišćenjem softverskog paketa TrapeziumX, verzija 1.5 (Shimadzu Corporation, Japan). Uređaj je podešen tako da se merna ćelija spušta brzinom od 1,0 mm/s. Kao početak merenja odabran je trenutak kad je cilindar dodirnuo površinu uzorka i kompjuterski program očitao vrednost sile od 0,1 N. Očitavana je sila utiskivanja, koja odgovara pomeraju od 5 mm, tj. utiskivanju cilindra 5 mm u uzorak.

Uzorci za ovo ispitivanje su pripremljeni tako što je 4 g svake formulacije (sa ili bez simvastaina) izliveno u staklene čaše zapremine 10 ml (unutrašnji prečnik čaše 22,38 mm, visina 35,40 mm). Sva merenja su sprovedena 48 h nakon izrade, na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C), u triplikatu.

3.2.3.4.3. Ispitivanje stabilnosti

Procena stabilnosti lipidnih formulacija nastalih mešanjem odabranih tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera, punjenih u tvrde želatinske kapsule, je sprovedena vizuelnim posmatranjem kapsula (izgled, boja, tekstura), kao i određivanjem sadržaja simvastatina, u sveže pripremljenim uzorcima i u uzorcima nakon šest meseci čuvanja na sobnoj (22 ± 2 °C) i povišenoj (45 ± 2 °C) temperaturi (termostat Sutjeska, Srbija). Kapsule sa ispitivanim uzorcima su čuvane pod navedenim uslovima u tamnim staklenim bocama sa bakelitnim zatvaračima sa navojem. Sadržaj simvastatina je određivan UV spektrofotometrijski, na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije, nakon rastvaranja sadržaja kapsule u 96% V/V etanolu i mešanja na ultrazvučnom kupatilu (Bandelin Sonorek Super RK 102 H, δδBandelin electronic, Nemačka).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Prva faza eksperimentalnog rada

4.1.1. Ispitivanje rastvorljivosti simvastatina

Niska rastvorljivost simvastatina u vodi ($0,026 \pm 0,0009$ mg/ml; eksperimentalno određena vrednost) ograničava njegovu apsorpciju iz GI trakta i, posledično, biološku raspoloživost i predstavlja izazov pri formulisanju farmaceutskih oblika sa simvastatinom. Međutim, u odnosu na nisku rastvorljivost u vodi, rastvorljivost simvastatina u ispitivanim ekscipijensima je veća i ukazuje da je simvastatin lipofilna supstanca, što je u skladu sa visokom vrednošću particionog koeficijenta (logP), koji je u opsegu od 4,40 do 4,70 (Ishigami i sar., 2001; Serajuddin i sar., 1991; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Simvastatin#section=Computed-Properties>). Rezultati eksperimentalnog određivanja rastvorljivosti simvastatina u odabranim ekscipijensima prikazani su u tabeli 4.1. Sposobnost uljane faze da rastvori lekovitu supstancu predstavlja prvi korak u odabiru uljane faze za izradu SMEDDS (Pouton i Porter, 2008). Dobijeni rezultati su pokazali da uljana faza propilenglikol monokaprilat znatno bolje rastvara simvastatin (115,18 mg/ml), u poređenju sa drugim ispitivanim uljanim fazama, propilenglikol monolauratom (89,88 mg/ml) i oleoil makrogol-6 gliceridima (54,34 mg/ml). Može se pretpostaviti da je za dobru rastvorljivost simvastatina u propilenglikol monokaprilatu zaslužna kaprilna kiselina, prisutna u ovom ekscipijensu (tabela 1.3), kao što je pokazano u studiji sa atorvastatinom (Bandivadeka i sar., 2012). Bandivadeka i saradnici (2012) su pokazali da se rastvorljivost atorvastatina povećava u uljima koja imaju veći sadržaj kaprilne kiseline. To se može pripisati većoj polarnosti kaprilne kiseline (C8) u poređenju sa laurinskom (C12) i oleinskom (C18) kiselinom (Bandivadeka i sar., 2012). U studiji koju su sprovedi Lee i saradnici (2018) pokazano je da je rastvorljivost lipofilnih lekovitih supstanci u masnim kiselinama srednje dužine ugljovodoničnog lanca (C8-C12) veća u poređenju sa njihovom rastvorljivošću u masnim kiselinama dužeg ugljovodoničnog lanca ($C \geq 14$). To znači da je kapacitet solubilizacije ekscipijensa koji sadrže masne kiseline kraćeg lanca veći nakon digestije u GI traktu, u odnosu na ekscipijense koji sadrže masne kiseline dužeg lanca (Lee i sar., 2018).

Takođe, kada se upoređi sposobnost solubilizacije ispitivanog surfaktanta i kosurfaktanata, uočava se da je rastvorljivost simvastatina veća u kaprilokaproil makrogol-8 gliceridima (90,64 mg/ml), koji sadrže 80% kaprilne kiseline u odnosu na polisorbit 80 (73,49 mg/ml) i makrogol 15 hidrosistearat (43,14 mg/ml). Eksperimentalno određene vrednosti rastvorljivosti simvastatina su u saglasnosti sa rezultatima sličnih studija i nalaze se unutar ili blizu očekivanih vrednosti (tabela 4.1) (Kang i sar., 2004; Karim i sar., 2015; Mahmoud i sar., 2013). Određena odstupanja između eksperimentalno određenih vrednosti i literaturnih podataka o rastvorljivosti mogu se objasniti potencijalnim razlikama između kvaliteta ekscipijensa različitih proizvođača i/ili razlikama u eksperimentalnim i analitičkim metodama koje su korišćene za određivanje ovog parametra. Dobijeni rezultati za rastvorljivost simvastatina su najmanje odstupali od rezultata studije koji su sprovedi Kang i saradnici (2004), što se može objasniti najvećom sličnošću u primenjenoj metodi za ispitivanje rastvorljivosti simvastatina na sobnoj temperaturi.

Eksperimentalno određene visoke vrednosti rastvorljivosti simvastatina u ispitivanim ekscipijensima čine ih potencijalnim kandidatima za formulaciju tečnih SMEDDS sa navedenom lekovitom supstancom. Međutim, konačni izbor uljane faze zavisice i od ostalih sastojaka prisutnih u SMEDDS, koji svi zajedno utiču na sposobnost samoemulgovanja formulacije (Date i Nagarsenker, 2007).

Tabela 4.1. Rastvorljivost simvastatina (mg/ml) u ispitivanim ekscipijensima – eksperimentalni i literaturni podaci

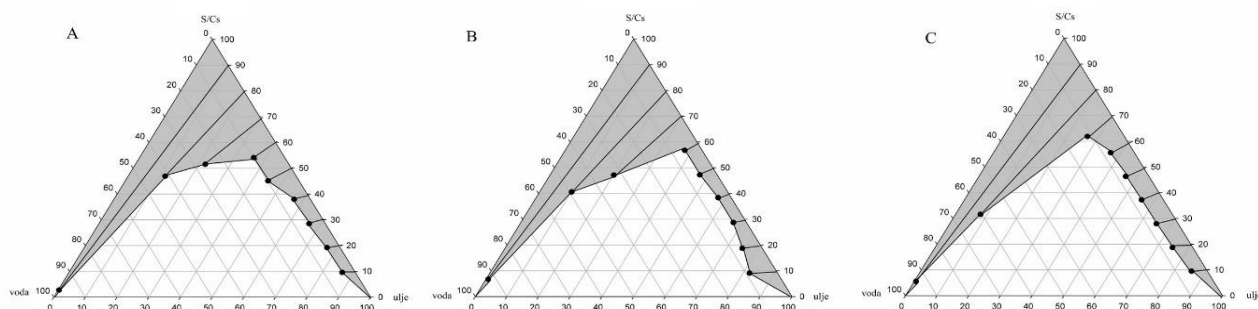
Ekscipijens	Eksperimentalni podaci*	Literaturni podaci		
		Kang i sar., 2004*	Mahmoud i sar., 2013	Karim i sar., 2015
Oleoil makrogol-6 gliceridi	54,34 ± 8,89	40,96 ± 0,91	42,33	32,0
Propilenglikol monokaprilat	115,18 ± 7,32	/	169,70	105,0
Propilenglikol monolaurat	89,88 ± 12,51	99,83 ± 5,84	111,63	26,0
Kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi	90,64 ± 13,42	76,45 ± 0,31	/	78,0
Polisorbat 80	73,49 ± 6,02	68,63 ± 1,06	70,87	117,0
Makrogol 15 hidroksistearat	43,14 ± 4,64	/	/	/

*srednja vrednost ± SD

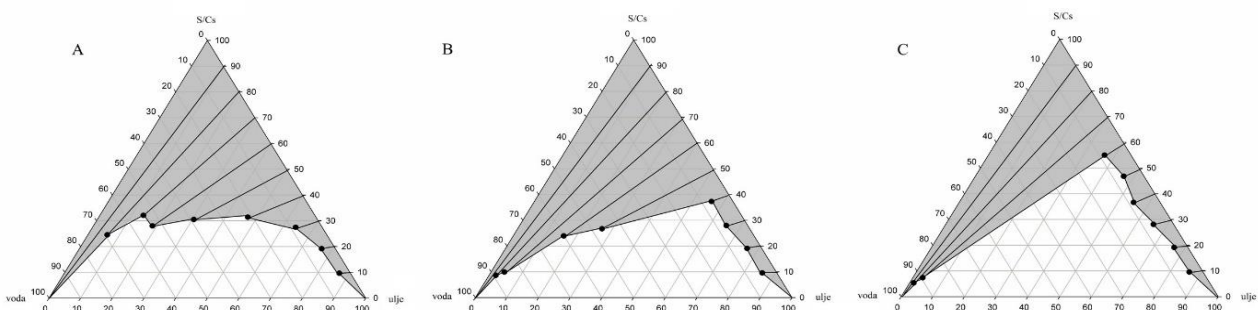
4.1.2. Konstrukcija pseudoternarnih faznih dijagrama i određivanje mikroemulzione oblasti

Cilj ispitivanja različitih kombinacija i odnosa uljane faze, surfaktanta i kosurfaktanta bio je da se odredi njihova sposobnost da dodatkom vode formiraju transparentne mikroemulzije (Zhang i sar, 2008). Naime, tokom titracije vodom lipidnih sistema koji se sastoje od uljane faze, surfaktanta i kosurfaktanta, vizuelno su praćene promene izgleda, od transparentnog do pojave zamućenja. Određivanjem pojave zamućenja, kao završne tačke titracije, dobijeni su podaci potrebni za konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama. Pseudoternarni fazni dijagrami predstavljaju grafički prikaz sistema sa različitim masenim udelima uljane faze, surfaktantne faze i vodene faze, pri čemu je maksimalni udeo svake od ovih faza prikazan kao ugao jednakostraničnog trougla (Lawrence i Rees, 2012). Tačke, unutar pseudoternarnih dijagrama, označavaju koncentraciju vode (% m/m), pri kojoj je došlo do zamućenja i njihovim spajanjem dobija se oblast, koja predstavlja mikroemulzionu oblast (na slikama 4.1-4.12 osenčena sivom bojom). Povezivanjem ovih tačaka sa procentima koji predstavljaju udele surfaktantne faze dobijene su linije razblaživanja koje označavaju sisteme ulje/surfaktant/kosurfaktant/voda, koji su tokom titracije vodom zadržali transparentnost.

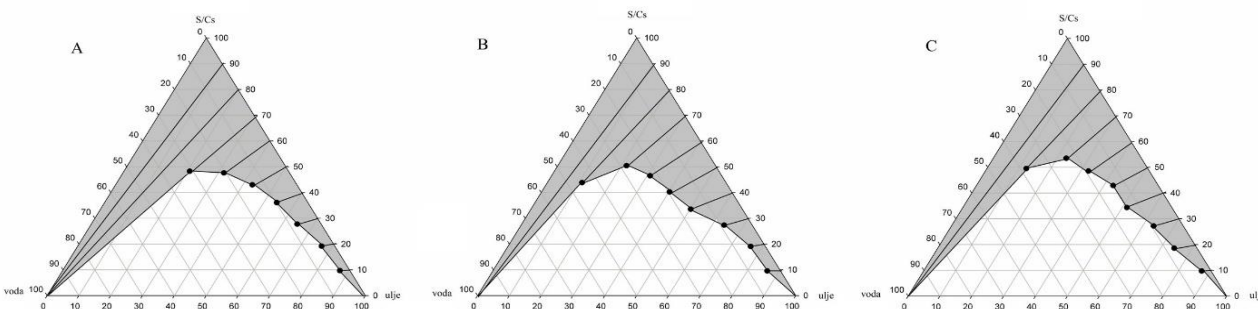
Na slikama 4.1-4.3 prikazani su pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme izrađene sa polisorbatom 80 kao kosurfaktantom i različitim uljima, koji ne sadrže simvastatin, dok su na slikama 4.4-4.6 predstavljeni pseudoternarni fazni dijagrami ovih sistema sa lekovitom supstancom.



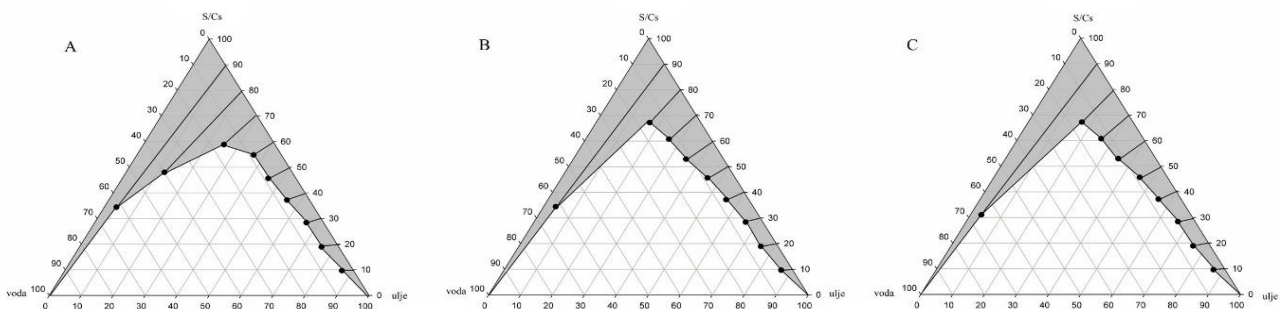
Slika 4.1. Pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme bez simvastatina, sa propilenglikol monolauratom kao uljanom fazom i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/polisorbat 80, u odnosima 1:1 (A), 2:1 (B) i 3:1 (C)



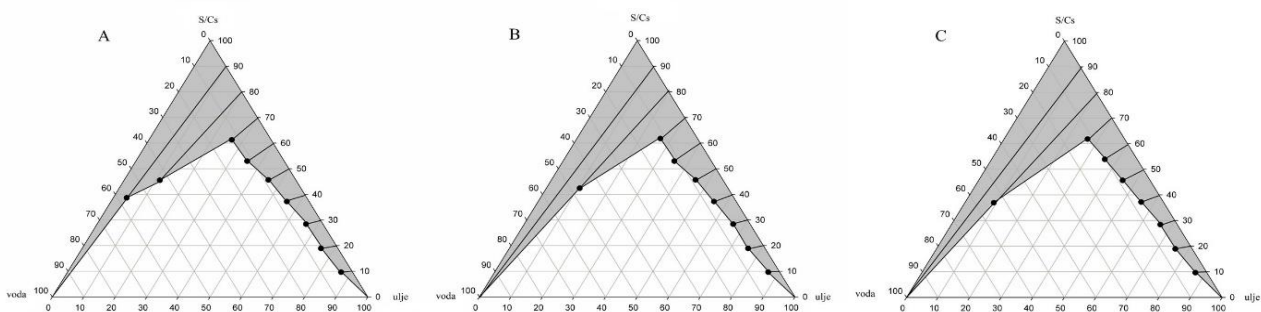
Slika 4.2. Pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme bez simvastatina, sa propilenglikol monokaprilatom, kao uljanom fazom i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/polisorbat 80 u odnosima 1:1 (A), 2:1 (B) i 3:1 (C)



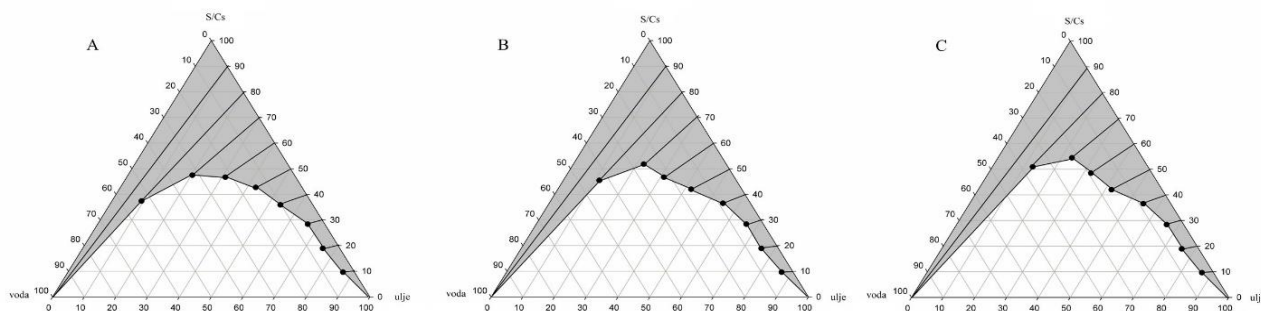
Slika 4.3. Pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme bez simvastatina, sa oleoil makrogol-6 gliceridima, kao uljanom fazom i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/polisorbat 80 u odnosima 1:1 (A), 2:1 (B) i 3:1 (C)



Slika 4.4. Pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme sa simvastatinom, propilenglikol monolauratom, kao uljanom fazom i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/polisorbat 80 u odnosima 1:1 (A), 2:1 (B) i 3:1 (C)



Slika 4.5. Pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme sa simvastatinom, propilenglikol monokaprilatom, kao uljanom fazom i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/polisorbat 80 u odnosima 1:1 (A), 2:1 (B) i 3:1 (C)



Slika 4.6. Pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme sa simvastatinom, oleoil makrogol-6 gliceridima, kao uljanom fazom i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/polisorbat 80 u odnosima 1:1 (A), 2:1 (B) i 3:1 (C)

U tabeli 4.2. prikazane su izračunate površine (kompjuterski program SketchAndCalc™) mikroemulzionih oblasti (cm²) sistema sa polisorbatom 80, kao kosurfaktantom.

Tabela 4.2. Površine mikroemulzionih oblasti (cm²) sistema sa polisorbatom 80, kao kosurfaktantom

Uljana faza	S:Cs	Bez simvastatina	Sa simvastatinom	Promena mikroemulzione oblasti po dodatku simvastatina (%)
Propilenglikol monolaurat	1:1	83,11	72,61	-12,63
	2:1	82,17	66,70	-18,83
	3:1	80,90	65,45	-19,10
Propilenglikol monokapilat	1:1	122,97	74,68	-39,27
	2:1	125,01	79,41	-36,48
	3:1	103,04	77,81	-24,49
Oleoil makrogol-6 gliceridi	1:1	99,95	93,58	-6,03
	2:1	97,58	90,85	-6,90
	3:1	88,68	85,60	-3,47

Na pseudoternarnim faznim dijagramima za sisteme bez simvastatina, sa polisorbatom 80 kao kosurfaktantom, može se uočiti da uzorci u kojima je uljana faza propilenglikol monolaurat (slika 4.1) imaju manju mikroemulzionu oblast, u poređenju sa sistemima u kojima je uljana faza propilenglikol monokaprilat ili oleoil makrogol-6 gliceridi (slike 4.2 i 4.3). Ovo je potvrđeno i izračunavanjem površina mikroemulzionih oblasti (tabela 4.2). Uzorci bez simvastatina, izrađeni sa propilenglikol monolauratom imali su mikroemulzionu oblast čija je površina bila od 80,90 do 83,11 cm², dok je mikroemulziona oblast sistema sa oleoil makrogol-6 gliceridima bila od 88,68 do 99,95 cm², a sa propilenglikol monokaprilatom od 103,04 do 125,01 cm². Dobijeni rezultati ukazuju da vrsta uljane faze ima značajnu ulogu u procesu samoemulgovanja. Propilenglikol monolaurat ima najmanju HLB vrednosti (HLB = 3) i najmanju sposobnost solubilizacije, te daje sisteme koji imaju najmanju mikroemulzionu oblast. Generalno, povećanje udela surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida dovodi do smanjenja mikroemulzione oblasti. Ovo se može objasniti podatkom da kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi imaju nižu HLB (HLB = 12) u poređenju sa polisorbatom 80 (HLB = 15) i da se sa povećanjem udela surfaktanta, a smanjenjem udela kosurfaktanta polisorbata 80 smanjuje mikroemulziona oblast.

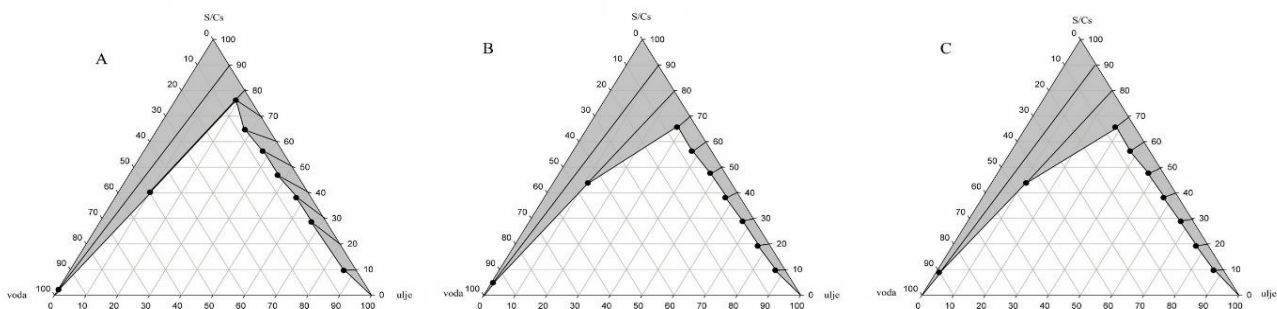
U ovim istraživanjima, kod svih sistema sa propilenglikol monolauratom pri dodavanju vode je dolazilo do zamućenja, odnosno nijedan uzorak nije davao mikroemulziju. Sa druge strane, pokazano je da su sistemi sa propilenglikol monokaprilatom i oleoil makrogol-6 gliceridima, pri odnosu ulje:surfaktantna faza 1:9, u svim ispitivanim odnosima S/Cs (1:1, 2:1, 3:1), tokom titracije vodom sve vreme bili homogeni i transparentni. Takođe, kod sistema sa oleoil makrogol-6 gliceridima i odnosom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi:polisorbata 80 1:1 (slika 4.3A), pri odnosu ulje:surfaktantna faza 2:8, tokom titracije vodom nije došlo do zamućenja. Ovi rezultati ukazuju da dodavanjem male količine vode ovi sistemi verovatno daju V/U mikroemulzije, koje daljim razblaživanjem vodom prelaze u stabilne U/V mikroemulzije (Đekić i sar., 2011; Hauss, 2007). Kod svih ostalih izrađenih smeša ulje/surfaktant/kosurfaktant, uočeno je da nakon dodatka određene količine vode, dolazi do gubitka transparentnosti sistema i pojave zamućenja ili mlečno bele boje. Sa povećanjem udela uljane faze u sistemu, odnosno smanjenjem udela surfaktantne faze, javljalo se zamućenje, ili mlečno bela boja pri nižim koncentracijama vodene faze. Smatra se da ovakvi sistemi tokom titracije vodom formiraju samo V/U mikroemulzije, koje pri daljem razblaženju vodom prelaze u termodinamički nestabilne sisteme, nanoemulzije, odnosno grube (makro) emulzije (Đekić i sar., 2011; Hauss, 2007).

Poznato je da dodatak lekovite supstance može uticati na mikroemulzionu oblast SMEDDS (Balakrishnan i sar., 2010; Pouton, 2000; Qureshi i sar., 2015), što je potvrđeno i u ovim istraživanjima. Mahmoud i saradnici (2013) su pokazali da se korišćenjem iste koncentracije simvastatina u svim ispitivanim SMEDDS isključuje efekat variranja koncentracije lekovite supstance na samoemulgujuću efikasnost sistema.

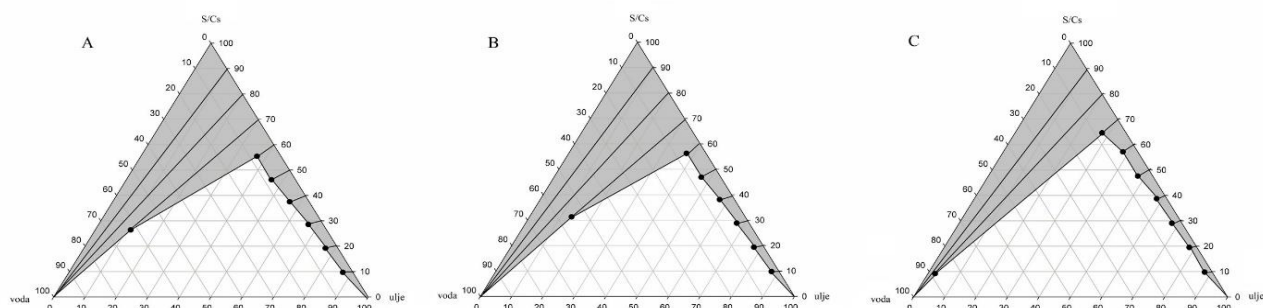
Dodatak simvastatina (5%, m/m) u ispitivane sisteme izrađene sa polisorbatom 80, kao kosurfaktantom, doveo je do smanjenja mikroemulzione oblasti svih uzoraka. Nakon dodatka simvastatina najveću mikroemulzionu oblast (od 85,60 do 93,58 cm²) su imali uzorci izrađeni sa oleoil makrogol-6 gliceridima kao uljanom fazom (tabela 4.2). Izračunate površine mikroemulzionih oblasti pokazale su da se najveće smanjenje mikroemulzione oblasti javlja kod sistema sa propilenglikol monokaprilatom (smanjenje površine od 24,49% do 39,27%), dok je dodatak simvastatina imao najmanji uticaj na mikroemulzionu oblast sistema sa oleoil makrogol-6 gliceridima (smanjenje površine od 3,47% do 6,90%). Smanjenje mikroemulzione oblasti dodatkom lekovite supstance može se objasniti inkorporiranjem supstance u kapi ulja, što rezultira njihovim bubrenjem i širenjem uljane faze u sistemu, što znači da je potreban veći udeo surfaktanata da bi se formirala mikroemulzija (Balakrishnan i sar., 2010; Qureshi i sar., 2015). Qureshi i saradnici (2015) su pokazali da inkorporiranjem 10 mg/ml lovastatina u SMEDDS koji čine gliceril monooleat kao uljana faza, makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje kao surfaktant i dietilenglikolmonoetil etar kao kosurfaktant, dolazi do značajnog smanjenja mikroemulzione oblasti. U studiji koju su sproveli Balakrishnan i saradnici (2010) pokazano je da dodatak 100-300 mg (10-30%) deksibuprofena u SEDDS, koji su izrađeni sa oleoil makrogol-6 gliceridima kao uljanom fazom, kaprilokaproil makrogol-8 gliceridima kao surfaktantom i propilenglikol monokaprilatom kao kosurfaktantom, dovodi do smanjenja mikroemulzione oblasti. Sa povećanjem koncentracije deksibuprofena smanjenje mikroemulzione oblasti je bilo više izraženo.

Sistemi sa oleoil makrogol-6 gliceridima kao uljanom fazom, pri odnosu ulje:surfaktantna faza 1:9, u svim ispitivanim odnosima S/Cs (1:1, 2:1, 3:1), tokom titracije vodom su ostali bistri. Međutim, pri odnosu uljana faza:surfaktantna faza 2:8 (slika 4.6A), tokom titracije vodom došlo je do zamućenja i ovi sistemi se ne mogu smatrati mikroemulzijama. Dodatak supstance uticao je i na sisteme sa propilenglikol monokaprilatom, tako što sistemi koji sadrže S/Cs u odnosu 1:1, dodatkom vode nisu zadržali transparentnost, za razliku od sistema bez simvastatina. Kako je ranije navedeno, uzorci izrađeni sa simvastatinom i propilenglikol monolauratom kao uljanom fazom, u svim ispitivanim odnosima, nisu davali mikroemulzije.

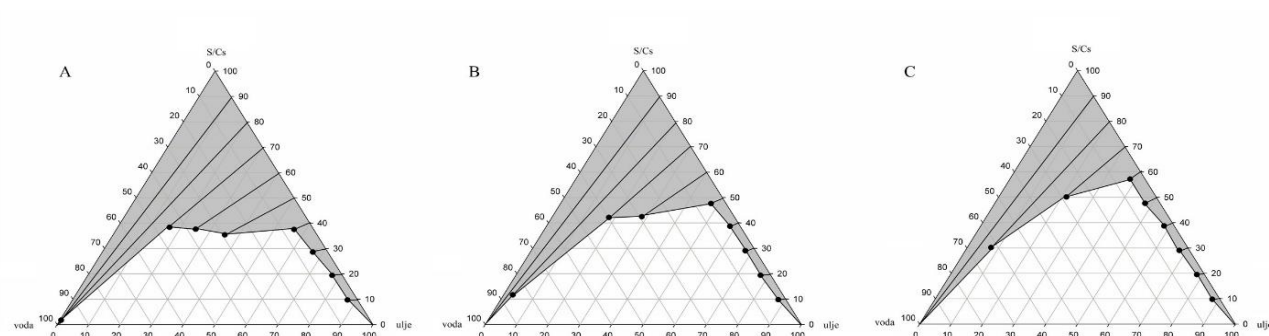
Osim lipidnih formulacija u kojima je kao kosurfaktant korišćen polisorbat 80, u ovim istraživanjima izrađivani su i uzorci sa makrogol 15 hidrosistearatom kao kosurfaktantom. Na slikama 4.7-4.9 prikazani su pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme sa makrogol 15 hidrosistearatom kao kosurfaktantom i različitim uljima, koji ne sadrže simvastatin, dok su na slikama 4.10-4.12 predstavljene mikroemulzione oblasti navedenih sistema sa lekovitim supstancom.



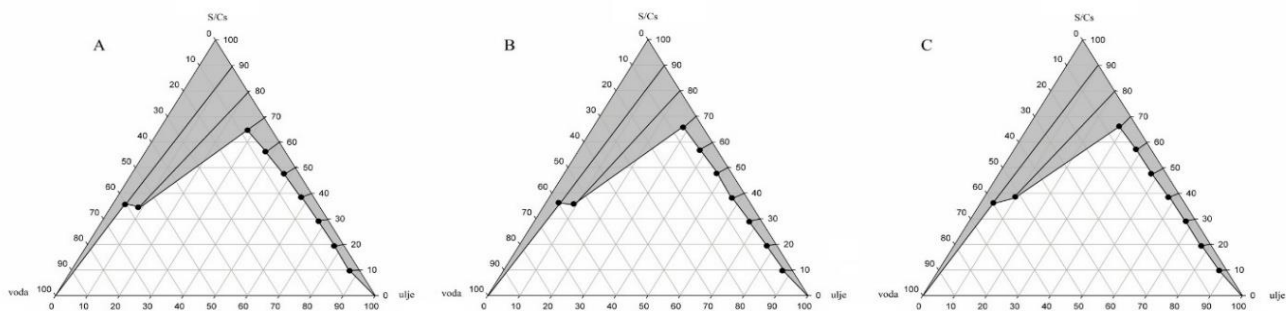
Slika 4.7. Pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme bez simvastatina, sa propilenglikol monolauratom kao uljanom fazom i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/makrogol 15 hidrosistearat u odnosima 1:1 (A), 2:1 (B) i 3:1 (C)



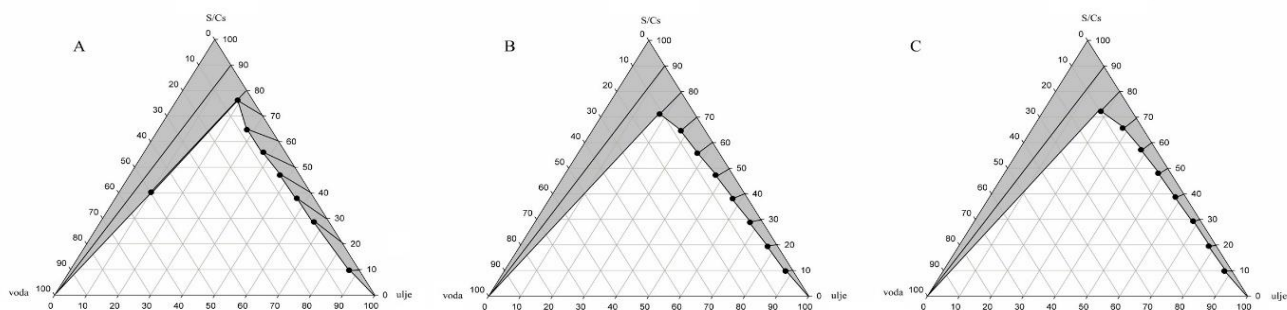
Slika 4.8. Pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme bez simvastatina, sa propilenglikol monokaprilatom kao uljanom fazom i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/makrogol 15 hidrosistearat u odnosima 1:1 (A), 2:1 (B) i 3:1 (C)



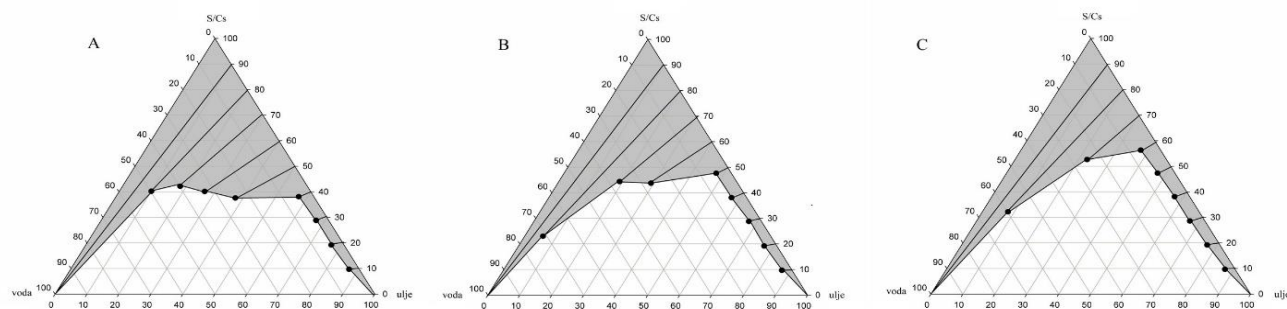
Slika 4.9. Pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme bez simvastatina, sa oleoil makrogol-6 gliceridima kao uljanom fazom i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/makrogol 15 hidrosistearat u odnosima 1:1 (A), 2:1 (B) i 3:1 (C)



Slika 4.10. Pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme sa simvastationom i propilenglikol monolauratom, kao uljanom fazom i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/makrogol 15 hidroksistearat u odnosima 1:1 (A), 2:1 (B) i 3:1 (C)



Slika 4.11. Pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme sa simvastatinom i propilenglikol monokaprilatom, kao uljanom fazom i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/makrogol 15 hidroksistearat u odnosima 1:1 (A), 2:1 (B) i 3:1 (C)



Slika 4.12. Pseudoternarni fazni dijagrami za sisteme sa simvastatinom i oleoil makrogol-6 gliceridima, kao uljanom fazom i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/makrogol 15 hidroksistearat u odnosima 1:1 (A), 2:1 (B) i 3:1 (C)

U tabeli 4.3. prikazane su izračunate površine (kompjuterski program SketchAndCalc™) mikroemulzionih oblasti (cm²) sistema sa makrogol 15 hidroksistearatom, kao kosurfaktantom.

Tabela 4.3. Površine mikroemulzionih oblasti (cm²) sistema sa makrogol 15 hidroksistearatom, kao kosurfaktantom

Uljana faza	S:Cs	Bez simvastatina	Sa simvastatinom	Promena mikroemulzione oblasti po dodatku simvastatina (%)
Propilenglikol monolaurat	1:1	62,60	68,42	9,29
	2:1	70,66	66,47	-5,93
	3:1	67,14	63,46	-5,48
Propilenglikol monokapilat	1:1	95,19	71,62	-24,76
	2:1	90,09	61,98	-31,20
	3:1	76,88	58,01	-24,54
Oleoil makrogol-6 gliceridi	1:1	107,45	98,65	-8,19
	2:1	91,94	91,22	-0,78
	3:1	77,84	76,43	-1,81

Na pseudoternarnim faznim dijagramima za sisteme bez simvastatina, sa makrogol 15 hidroksistearatom kao kosurfaktantom, može se uočiti da najmanju mikroemulzionu oblast imaju uzorci sa propilenglikol monolauratom kao uljanom fazom (slika 4.7). Određivanjem površine mikroemulzione oblasti iz konstruisanih faznih dijagrama može se zaključiti da se navedena oblast uzoraka bez simvastatina smanjuje u zavisnosti od upotrebljene uljane faze, sledećim redosledom: propilenglikol monolaurat < propilenglikol monokaprilat < oleoil makrogol-6 gliceridi (tabela 4.3), što ponovo ukazuje da uljana faza ima značajnu ulogu u procesu samoemulgovanja. Kod sistema bez simvastatina, mikroemulziona oblast je najmanja kod uzorka sa propilenglikol monolauratom kao uljanom fazom (u opsegu od 62,60 do 70,66 cm²), a najveća kod sistema sa oleoil makrogol-6 gliceridima, kao uljanom fazom (od 77,84 do 107,45 cm²). Prisustvo propilenglikol monolaurata, niske HLB vrednosti (HLB = 3), otežava proces samoemulgovanja u poređenju sa propilenglikol monokaprilatom (HLB = 6) i oleoil makrogol-6 gliceridima (HLB = 9), čime se mogu objasniti manje mikroemulzione oblasti na ovim faznim dijagramima. Sistemi sa propilenglikol monolauratom, bez obzira na udeo surfaktantne faze i S/Cs odnos, tokom titracije vodom su postali zamućeni ili mlečno bele boje i ne mogu se smatrati mikroemulzijama. Sa druge strane, sistemi sa propilenglikol monokaprilatom i oleoil makrogol-6 gliceridima, u zavisnosti od masenog udela komponenti, mogu da formiraju mikroemulzije.

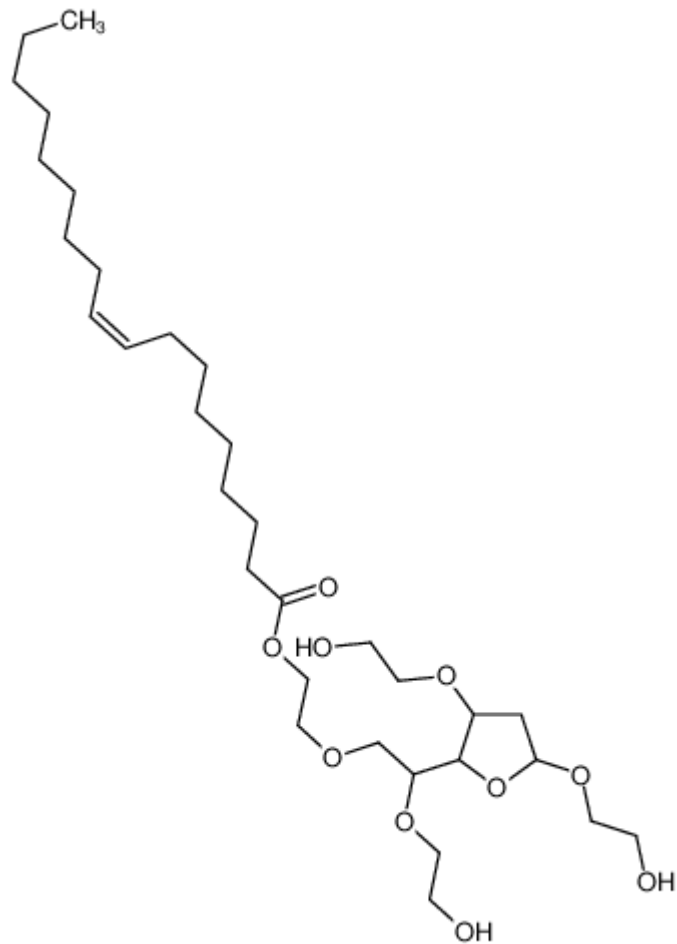
Sistemi sa propilenglikol monokaprilatom ili oleoil makrogol-6 gliceridima, kao uljanim fazama i S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi:makrogol 15 hidroksistearat (u svim ispitivanim S/Cs odnosima - 1:1, 2:1 i 3:1) i pri odnosu ulje:surfaktantna faza 1:9, formirali su transparentne homogene sisteme dodatkom vode. Kod uzoraka sa propilenglikol monokaprilatom, koji sadrže S/Cs smešu u odnosima 1:1 (slika 4.8A) i 2:1 (slika 4.8B), pri odnosu ulje:surfaktantna faza 2:8, tokom titracije vodom takođe nije došlo do zamućenja. Kod svih ostalih izrađenih uzoraka, razblaživanje vodom uzrokovalo je zamućenje ili pojavu mlečno bele boje, te se ti sistemi ne mogu smatrati mikroemulzijama.

Slično kao i kod uzoraka izrađenih sa polisorbatom 80 kao kosurfaktantom, dodatak simvastatina (5%, m/m) je doveo do smanjenja mikroemulzione oblasti uzoraka izrađenih sa makrogol 15 hidroksistearatom, osim uzorka sa uljanom fazom propilenglikol monolauratom i odnosom S/Cs 1:1, gde je uočeno određeno povećanje mikroemulzione oblasti po dodatku simvastatina (od 62,60 cm² na 68,42 cm², odnosno 9,29%; tabela 4.3.). Najveće smanjenje mikroemulzione oblasti je zabeleženo kod sistema sa propilenglikol monokaprilatom (od 24,54 do 39,27%). Kao što je ranije navedeno,

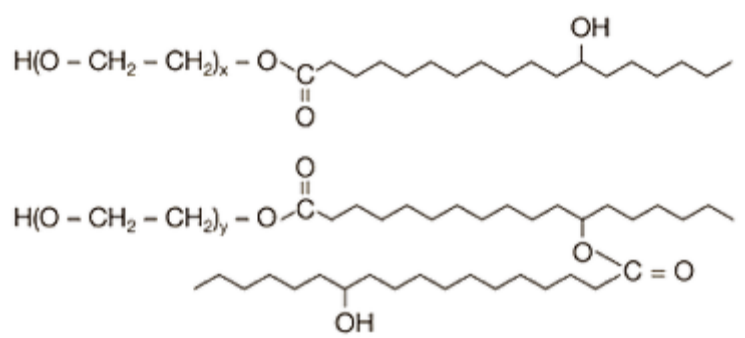
inkorporiranje lekovite supstance u kapi ulja dovodi do njihovog bubrenja i širenja uljane faze u sistemu, što znači da je potreban veći udeo surfaktanata da bi se formirala mikroemulzija. Samim tim, ovi sistemi imaju manju mikroemulzionu oblast (Balakrishnan i sar., 2010; Qureshi i sar., 2015).

Sistemi sa simvastatinom, sa oleoil makrogol-6 gliceridima ili propilenglikol monokaprilatom kao uljanom fazom, pri odnosu ulje:surfaktantna faza 1:9, u svim ispitivanim S/Cs odnosima (1:1, 2:1, 3:1), tokom titracije vodom su ostali bistri. Međutim, sistemi sa propilenglikol monokaprilatom koji sadrže S/Cs u odnosu 1:1 i 2:1 (slike 4.11A i 4.11B), pri odnosu ulje:surfaktantna faza 2:8, dodatkom vode nisu zadržali transparentnost, za razliku od sistema bez simvastatina. I ovi rezultati su pokazali da je dodatak lekovite supstance uticao na smanjenje sposobnosti samoemulgovanja.

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da su sistemi (bez i sa simvastatinom), u kojima se kao kosurfaktant koristio makrogol 15 hidroksistearat, imali manju mikroemulzionu oblast, u poređenju sa sistemima izrađenim sa polisorbatom 80, izuzev sistema sa oleoil makrogol-6 gliceridima (u odnosima S/Cs 2:1 i 1:1), koji je imao nešto veću mikroemulzionu oblast. Jedan od ključnih faktora koji utiče na formiranje mikroemulzionih sistema je HLB vrednost korišćenih površinski aktivnih materija (PAM). PAM sa HLB vrednošću 12-15, kao što su kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi (HLB = 12), polisorbit 80 (HLB = 15) i makrogol 15 hidroksistearat (HLB = 15), koji ulaze u sastav surfaktantnih faza u ovim sistemima, imaju dobre osobine samoemulgovanja (Thi i sar., 2009). Veličina mikroemulzione oblasti određena je fizičko-hemijskim osobinama uljane, vodene i surfaktantne faze, kao što je istaknuto u ranijoj studiji (El Maghraby, 2008). Smanjenje površinske aktivnosti na međupovršini između uljane i vodene faze, prisustvo elastičnog međupovršinskog filma surfaktanta i udruživanje molekula uljane faze sa površinskim filmom surfaktanata, predstavljaju preduslove za stvaranje mikroemulzije (El Maghraby, 2008). S obzirom na iste HLB vrednosti upotrebljenih kosurfaktanata (polisorbit 80 i makrogol 15 hidroksistearat) očekivano je da izrađeni sistemi imaju slične mikroemulzione oblasti. Međutim, razlike u hemijskoj strukturi korišćenih kosurfaktanata utiču na veličinu mikroemulzione oblasti. U ranijim studijama pokazano je da PAM sa većom hidrofilnom glavom i dužim ugljovodoničnim lancem imaju veću moć solubilizacije (Kahlweit, 1999; Sjöblom i sar., 1996). S obzirom da polisorbit 80 ima veću hidrofilnu glavu i duži hidrofobni lanac u svojoj strukturi (slika 4.13), u poređenju sa makrogol 15 hidroksistearatom (slika 4.14), može se očekivati da ima veću moć solubilizacije. Takođe, rezultati prethodnih studija su pokazali da prisustvo dvostruke veze u hidrofobnom ugljovodoničnom lancu u strukturi polisorbata 80 omogućava nastajanje mikroemulzija i pri većem razblaživanju vodom zahvaljujući njegovoj sposobnosti da formira fleksibilni međupovršinski film (Dai i sar., 1997; Shah i sar., 2018). Dai i saradnici (1997) su proučavali uticaj strukture nejonskih surfaktanata na proces emulgovanja i pokazali da bi za proces emulgovanja struktura PAM i fleksibilnost nastalog međupovršinskog filma mogli biti značajniji faktor od samog HLB broja PAM. Dodatno, polisorbit 80 ima 20 etilenoksidnih jedinica, dok makrogol 15 hidroksistearat sadrži 15 etilenoksidnih jedinica, što ukazuje da polisorbit 80 ima nižu kritičnu micelarnu koncentraciju (CMC iznosi 0,012 mmol/l) (Lu i sar., 2018; Bhairi i sar., 2007) u poređenju sa makrogol 15 hidroksistearatom (CMC u opsegu 0,06-0,1 mmol/l) (Shubber i sar., 2015). Navedeni podaci mogu objasniti zašto uzorci sa polisorbatom 80 imaju nešto veću mikroemulzionu oblast, u odnosu na odgovarajuće uzorke sa makrogol 15 hidroksistearatom.



Slika 4.13. Hemijska struktura polisorbata 80 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polysorbate-80>)



Slika 4.14. Hemijska struktura makrogol 15 hidroksistearata (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Hydroxyethyl-12-hydroxyoctadecanoate>)

4.1.3. Formulacija tečnih SMEDDS

S obzirom da nakon razblaženja vodom uzorci sa propilenglikol monolauratom kao uljanom fazom, nisu dali mikroemulzije, ovi uzorci su isključeni iz daljih ispitivanja. Za dalju karakterizaciju odabrani su uzorci tečnih SMEDDS, u kojima je odnos ulje:surfaktantna faza bio 1:9, a koji sadrže:

- oleoil makrogol-6 gliceride kao uljanu fazu i S/Cs smešu kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi:polisorbat 80 (u odnosima 1:1, 2:1 i 3:1), odnosno propilenglikol monokaprilat kao uljanu fazu i S/Cs smešu kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi:polisorbat 80 (u odnosima 2:1 i 3:1) (oznake uzoraka F1-F5; tabela 4.4),
- oleoil makrogol-6 glicerideili propilenglikol monokaprilat kao uljanu fazu i S/Cs smešu kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi:makrogol 15 hidroksistearat (u oba slučaja u odnosima 1:1, 2:1 i 3:1) (oznake uzoraka T1-T6; tabela 4.4).

Sastav odabranih uzoraka tečnih SMEDDS predstavljen je u tabeli 4.4. Svi uzorci sa lekovitom supstancom sadrže 5% (m/m) simvastatina, a obeleženi su sa F1s-F5s, odnosno sa T1s-T6s.

Tabela 4.4. Sastav (% , m/m) odabranih uzoraka tečnih SMEDDS

Oznaka uzorka	Oleoil makrogol-6 gliceridi	Propilenglikol monokaprilat	Kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi	Polisorbat 80	Makrogol 15 hidroksistearat
F1	10,0	/	45,0	45,0	/
F2	10,0	/	60,0	30,0	/
F3	10,0	/	67,5	22,5	/
F4	/	10,0	60,0	30,0	/
F5	/	10,0	67,5	22,5	/
T1	10,0	/	45,0	/	45,0
T2	10,0	/	60,0	/	30,0
T3	10,0	/	67,5	/	22,5
T4	/	10,0	45,0	/	45,0
T5	/	10,0	60,0	/	30,0
T6	/	10,0	67,5	/	22,5

4.1.4. Fizičko-hemijska karakterizacija i procena stabilnosti tečnih SMEDDS

4.1.4.1. Procena samoemulgovanja

Procena samoemulgovanja je jedna od metoda karakterizacije SMEDDS, kojom se procenjivalo vreme potrebno za samoemulgovanje tečnih SMEDDS sa simvastatinom. Vizuelnim posmatranjem utvrđeno je da je vreme samoemulgovanja za sve uzorke ispod 60 s, što ukazuje na brzo stvaranje mikroemulzije po dodavanju prečišćene vode. Nakon razblaživanja prečišćenom vodom, svi uzorci SMEDDS formirali su bistrine mikroemulzije, te prema podeli koju su predložili autori Shen i Zhong (2006) i Padia i saradnici (2015) (tabela 3.3), ovi sistemi pripadaju tipu I, odnosno bistrim mikroemulzijama koje se formiraju tokom jednog minuta.

4.1.4.2. Robustnost prema razblaživanju

Kako bi se procenila robusnost tečnih SMEDDS sa simvastatinom prema razblaživanju, uzorci su razblaživani sa vodom u odgovarajućim odnosima, a zatim je izvršena vizuelna procena bistrine, kao i određivanje transparentije razblaženih uzoraka spektrofotometrijskom metodom.

Vizuelnom procenom bistrine mikroemulzija, dobijenih razblaživanjem odabranih tečnih SMEDDS sa simvastatinom, prečišćenom vodom u odnosima 1:10, 1:100, 1:250 i 1:1000, pokazano je da su svi uzorci transparentni. Rezultati spektrofotometrijskog merenja transparentije uzoraka, 2 h nakon razblaženja, prikazani su u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Transparentija tečnih SMEDDS sa simvastatinom nakon razblaživanja vodom

Oznaka uzorka	1:10	1:100	1:250	1:1000
F1s	98,87 ± 0,19	99,19 ± 0,16	99,59 ± 0,28	99,97 ± 0,10
F2s	98,67 ± 0,29	99,33 ± 0,39	99,32 ± 0,21	99,89 ± 0,12
F3s	98,16 ± 0,19	99,34 ± 0,08	99,90 ± 0,24	100,03 ± 0,07
F4s	98,11 ± 0,39	99,01 ± 0,59	99,19 ± 0,40	99,37 ± 0,45
F5s	98,06 ± 0,43	99,12 ± 0,61	99,27 ± 0,26	99,23 ± 0,56
T1s	99,79 ± 0,12	99,86 ± 0,10	99,89 ± 0,09	99,91 ± 0,15
T2s	99,78 ± 0,09	99,83 ± 0,15	99,85 ± 0,14	99,89 ± 0,21
T3s	99,68 ± 0,25	99,74 ± 0,09	99,76 ± 0,10	99,82 ± 0,15
T4s	99,22 ± 0,41	99,45 ± 0,51	99,55 ± 0,28	99,58 ± 0,37
T5s	98,90 ± 0,34	99,39 ± 0,32	99,41 ± 0,54	99,43 ± 0,57
T6s	99,04 ± 0,62	99,34 ± 0,42	99,38 ± 0,36	99,55 ± 0,12

srednja vrednost ± SD

Sve vrednosti transparentije nakon razblaživanja, uzoraka sa polisorbatom 80 kao kosurfaktantom, nalaze se u opsegu 98,06-100,03%. Kod uzoraka sa makrogol 15 hidrosistearatom kao kosurfaktantom vrednosti transparentije nalaze se u opsegu 98,90-99,91%. Rezultati transparentije od približno 100% predstavljaju potvrdu da je nakon dodatka vode nastala mikroemulzija, odnosno da se izrađeni sistemi mogu smatrati SMEDDS (Bakhle i Avari, 2015; Singh i sar., 2009). Statističkom analizom pomoću *Studentovog* t-testa, sa nivoom značajnosti od 0,05, utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između ispitivanih uzoraka ($p > 0,05$), bez obzira na vrstu kosurfaktanta i razblaženje.

4.1.4.3. Analiza veličine i raspodele veličina kapi

Analiza veličine kapi predstavlja važnu metodu karakterizacije SMEDDS, jer poznavanjem ovog parametra mogu se delom predvideti brzina i obim oslobađanja, kao i apsorpcija lekovite supstance iz SMEDDS (Constantinides i sar., 1994). Pokazano je da sitnije kapi omogućavaju brže oslobađanje lekovite supstance i obezbeđuju veću površinu za njenu apsorpciju (Liu i sar., 2009). Parametar koji se koristi za karakterizaciju raspodele veličine kapi jeste PDI, koji opisuje stepen neujednačenosti raspodele veličine kapi u uzorku. Vrednosti PDI od 0,2 i niže se u praksi najčešće smatraju prihvatljivim za lipidne formulacije (Danaei i sar., 2018).

Vrednosti prosečne veličine kapi i PDI mikroemulzija dobijenih razblaživanjem tečnih SMEDDS visoko prečišćenom vodom u odnosu 1:10, izrađenih sa kosurfaktantom polisorbatom 80, bez simvastatina (oznake F1-F5) i sa lekovitom supstancom (oznake F1s-F5s) predstavljeni su u tabeli 4.6. Svi tečni SMEDDS bez simvastatina, razblaženi vodom 1 h nakon izrade, imali su veličinu kapi

između 10,25 nm i 18,58 nm, sa relativno uskom raspodelom veličina kapi (PDI u opsegu 0,132-0,189). Inkorporiranje simvastatina (5%, m/m) nije dovelo do značajne promene veličine kapi i PDI, kod tečnih SMEDDS u kojima je kao uljana faza korišćen oleoil makrogol-6 gliceridi. Kod ovih uzoraka (F1s-F3s) prosečna veličina kapi, 1 h nakon izrade, bila je između 13,57 nm i 17,45 nm (tabela 4.6.), a PDI između 0,168 i 0,183. Međutim, uzorci sa propilenglikol monokaprilatom kao uljanom fazom (F4s i F5s) imali su veće kapi (57,55 nm i 46,41 nm) i veći PDI (0,536 i 0,286). Vrednosti PDI > 0,2 smatraju se neprihvatljivim i ukazuju na neujednačenost raspodele veličine kapi i nestabilnost ovih uzoraka (Danaei i sar., 2018). Ovakvi rezultati se mogu objasniti činjenicom da propilenglikol monokaprilat ima nižu HLB vrednost (HLB = 6) u poređenju sa oleoil makrogol-6 gliceridima (HLB = 9), koji formiraju SMEDDS sa manjom veličinom i homogenom raspodelom veličina kapi. Takođe, oleoil makrogol-6 gliceridi u svojoj strukturi sadrže nezasićenu oleinsku kiselinu (C18, jedna dvostruka veza), za koju se smatra da omogućava nastajanje fleksibilnog međupovršinskog filma i, posledično, stvaranje stabilnijih mikroemulzija, manje veličine kapi (Wang i sar., 2009).

Veličina kapi mikroemulzija dobijenih razblaživanjem tečnih SMEDDS izrađenih sa makrogol 15 hidroksistearatom (T1-T6) visoko prečišćenom vodom 1 h nakon izrade, bila je u opsegu od 10,54 nm do 12,12 nm, sa relativno uskom raspodelom veličina kapi (PDI u opsegu od 0,088 do 0,157) (tabela 4.7). Kao i u slučaju formulacija sa polisorbatom 80, dodatak simvastatina značajnije je uticao na veličinu kapi samo kod SMEDDS izrađenih sa propilenglikol monokaprilatom kao uljanom fazom (T4s-T6s). Naime, uzorci sa oleoil makrogol-6 gliceridima (T1s-T3s) imali su inicijalno prosečnu veličnu kapi između 13,10 i 14,36 nm, dok su uzorci sa propilenglikol monokaprilatom (T4s-T6s) imali prosečnu veličinu kapi između 17,39 i 23,49 nm, što je za oko 38% više, u odnosu na uzorke sa oleoil makrogol-6 gliceridima. Ovo se može objasniti višom HLB vrednošću i prisusutvom dvostruke veze u strukturi oleoil makrogol-6 glicerida, koji u kombinaciji sa surfaktantom smešom povećava fluidnost međupovršinskog filma.

Wang i saradnici (2009) su, koristeći jednačinu za određivanje HLB vrednosti surfaktantne smeše, ukazali na odnos između veličine kapi i HLB vrednosti surfaktantne smeše. Vrednosti HLB smeša PAM (HLB_{mix}) mogu se izračunati koristeći masene udele odgovarajućih PAM, kao što je prikazano jednačinom (4):

$$HLB_{mix} = f_A \times HLB_A + f_B \times HLB_B \quad (4)$$

u kojoj su HLB_A, HLB_B vrednosti HLB surfaktanta, odnosno kosurfaktanta, redom, a f_A, f_B su njihovi maseni udeli. Ova jednačina pokazuje da do povećanja vrednosti HLB_{mix} dolazi ukoliko se poveća udeo PAM visokog HLB broja, uz istovremeno smanjenje udela PAM nižeg HLB broja.

U sprovedenoj studiji, surfaktantna smeša je izrađena od kaprilokaproil makrogol-8 glicerida (S) (HLB = 12) i polisorbata 80 (Cs) (HLB = 15), odnosno makrogol 15 hidroksistearata (Cs) (HLB = 15), koji su varirani u 3 odnosa: 1:1, 2:1 i 3:1. Odgovarajući maseni udeli komponenti surfaktantne smeše prikazani su u tabeli 4.4. Koristeći prikazanu jednačinu (4) i date podatke, izračunate su vrednosti HLB_{mix} za sva 3 odnosa, koje su iznosile: 12,15 (1:1), 11,70 (2:1) i 11,47 (3:1). To znači da uzorci koji sadrže najveći udeo kaprilokaproil makrogol-8 glicerida imaju najnižu HLB_{mix} vrednost, odnosno da se sa smanjenjem udela kaprilokaproil makrogol-8 glicerida HLB_{mix} vrednost povećava. Ovi rezultati se mogu povezati sa izmerenom prosečnom veličinom kapi izrađenih uzoraka, s obzirom da se generalno može uočiti da najsitnije kapi imaju uzorci sa najvećom HLB_{mix} vrednosti, odnosno najmanjom koncentracijom surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida.

Tabela 4.6. Prosečne vrednosti veličine kapi (nm) i indeksa polidisperziteta (PDI) tečnih SMEDDS izrađenih sa polisorbitom 80

	Prosečna veličina kapi				PDI			
	1 h nakon izrade	nakon 1 meseca	nakon 3 meseca	nakon 6 meseci	1 h nakon izrade	nakon 1 meseca	nakon 3 meseca	nakon 6 meseci
F1	10,25 ± 0,07	10,30 ± 0,05	10,98 ± 0,06	13,40 ± 0,01	0,132 ± 0,007	0,121 ± 0,003	0,144 ± 0,003	0,174 ± 0,010
F2	11,90 ± 0,14	11,97 ± 0,06	12,11 ± 0,09	14,91 ± 0,06	0,189 ± 0,006	0,150 ± 0,008	0,121 ± 0,005	0,146 ± 0,005
F3	11,68 ± 0,12	11,92 ± 0,04	13,73 ± 0,04	19,78 ± 0,03	0,137 ± 0,016	0,110 ± 0,007	0,130 ± 0,005	0,156 ± 0,009
F4	17,07 ± 0,06	17,60 ± 0,06	19,16 ± 0,07	25,65 ± 0,22	0,202 ± 0,007	0,198 ± 0,005	0,194 ± 0,006	0,227 ± 0,001
F5	18,58 ± 0,04	19,14 ± 0,08	20,88 ± 0,09	28,37 ± 0,20	0,155 ± 0,005	0,158 ± 0,006	0,162 ± 0,007	0,202 ± 0,005
F1s	13,57 ± 0,06	13,58 ± 0,02	14,20 ± 0,06	15,61 ± 0,04	0,181 ± 0,006	0,147 ± 0,005	0,147 ± 0,006	0,180 ± 0,003
F2s	16,03 ± 0,03	16,04 ± 0,03	16,30 ± 0,06	15,76 ± 0,09	0,183 ± 0,010	0,175 ± 0,004	0,160 ± 0,010	0,135 ± 0,007
F3s	17,45 ± 0,04	17,73 ± 0,06	17,91 ± 0,09	18,15 ± 0,06	0,168 ± 0,005	0,161 ± 0,002	0,168 ± 0,003	0,136 ± 0,005
F4s	57,55 ± 0,49	36,14 ± 0,17	27,22 ± 0,16	31,73 ± 0,05	0,536 ± 0,044	0,291 ± 0,005	0,223 ± 0,011	0,243 ± 0,005
F5s	46,41 ± 0,17	34,95 ± 0,58	29,71 ± 0,21	41,06 ± 0,35	0,286 ± 0,001	0,229 ± 0,003	0,182 ± 0,011	0,204 ± 0,007

srednja vrednost ± SD

Tabela 4.7. Prosečne vrednosti veličine kapi (nm) i indeksa polidisperziteta (PDI) tečnih SMEDDS izrađenih sa makrogol 15 hidroksistearatom

	Prosečna veličina kapi				PDI			
	1 h nakon izrade	nakon 1 meseca	nakon 3 meseca	nakon 6 meseci	1h nakon izrade	nakon 1 meseca	nakon 3 meseca	nakon 6 meseci
T1	10,65 ± 0,14	10,96 ± 0,02	12,40 ± 0,08	12,59 ± 0,16	0,157 ± 0,018	0,065 ± 0,020	0,093 ± 0,020	0,093 ± 0,010
T2	10,97 ± 0,08	11,21 ± 0,08	12,02 ± 0,17	12,30 ± 0,19	0,143 ± 0,015	0,082 ± 0,011	0,088 ± 0,010	0,092 ± 0,009
T3	10,54 ± 0,06	11,35 ± 0,02	12,54 ± 0,17	12,79 ± 0,19	0,105 ± 0,006	0,078 ± 0,008	0,098 ± 0,008	0,067 ± 0,010
T4	10,83 ± 0,04	13,15 ± 0,09	13,23 ± 0,04	13,27 ± 0,12	0,097 ± 0,011	0,082 ± 0,005	0,094 ± 0,008	0,081 ± 0,001
T5	11,48 ± 0,14	14,49 ± 0,08	14,19 ± 0,05	14,25 ± 0,03	0,103 ± 0,012	0,101 ± 0,012	0,088 ± 0,005	0,086 ± 0,001
T6	12,12 ± 0,10	17,06 ± 0,05	17,45 ± 0,18	17,65 ± 0,14	0,088 ± 0,005	0,095 ± 0,006	0,099 ± 0,004	0,088 ± 0,002
T1s	13,10 ± 0,12	13,12 ± 0,03	13,31 ± 0,23	13,82 ± 0,11	0,112 ± 0,012	0,082 ± 0,013	0,094 ± 0,015	0,147 ± 0,007
T2s	13,38 ± 0,09	13,50 ± 0,09	13,53 ± 0,12	13,73 ± 0,06	0,090 ± 0,012	0,092 ± 0,017	0,088 ± 0,005	0,099 ± 0,010
T3s	14,36 ± 0,07	14,67 ± 0,05	14,72 ± 0,02	15,75 ± 0,01	0,085 ± 0,011	0,090 ± 0,002	0,084 ± 0,012	0,121 ± 0,006
T4s	17,39 ± 0,16	17,91 ± 0,19	18,74 ± 0,01	20,33 ± 0,10	0,146 ± 0,012	0,139 ± 0,004	0,134 ± 0,001	0,162 ± 0,006
T5s	22,27 ± 0,44	23,38 ± 0,36	24,78 ± 0,14	25,53 ± 0,06	0,131 ± 0,005	0,121 ± 0,015	0,159 ± 0,008	0,201 ± 0,002
T6s	23,49 ± 0,53	24,41 ± 0,44	27,57 ± 0,06	27,99 ± 0,30	0,124 ± 0,004	0,108 ± 0,008	0,134 ± 0,011	0,176 ± 0,003

srednja vrednost ± SD

4.1.4.4. Ispitivanje stabilnosti tečnih SMEDDS sa simvastatinom

SMEDDS predstavljaju lipidne formulacije, koje razblaživanjem u vodi daju termodinamički stabilne i optički izotropne mikroemulzije (Porter i sar., 2008). Kako bi se potvrdilo da li se odabrani uzorci mogu smatrati stabilnim sistemima i koristiti za dalje istraživanje, sprovedena je studija stabilnosti tečnih SMEDDS sa simvastatinom, čuvanih tokom šest meseci na sobnoj temperaturi, u zatvorenim staklenim epruvetama zaštićenim od svetlosti, u toku koje je posmatran izgled uzoraka, a praćeni su parametri veličine i raspodele veličine kapi, kao i sadržaj simvastatina.

U toku šestomesečnog skladištenja tečnih SMEDDS sa simvastatinom, na sobnoj temperaturi, nisu primećene promene u izgledu, boji, mirisu, transparentnosti i homogenosti uzoraka.

Čuvanjem uzoraka F1s-F3s, koji sadrže polisorbit 80 kao kosurfaktant, tokom mesec dana nije došlo do promena veličine kapi (13,58-17,73 nm), a nakon tri meseca je primećeno samo neznatno povećanje veličine kapi (14,20-17,91 nm). Nakon šest meseci povećanje veličine kapi ovih uzoraka je bilo nešto više izraženo (15,61-18,15 nm), ali i dalje u nanometarskom opsegu (tabela 4.6). U toku šestomesečnog čuvanja, ovi uzorci zadržali su PDI < 0,20, pa homogena raspodela veličine kapi ukazuje na njihovu stabilnost. Sa druge strane, kod uzoraka sa propilenglikol monokaprilatom (F4s i F5s) došlo je do većih promena u veličini kapi tokom perioda od šest meseci (tabela 4.6). Naime, u poređenju sa inicijalno izmerenim vrednostima veličine kapi (57,55 nm i 46,41 nm), nakon mesec dana veličina kapi se приметно smanjila (36,14 nm i 34,95 nm), a posle tri meseca kapi su bile još sitnije (27,22 nm i 29,27 nm), kod uzoraka F4s i F5s. Ovaj trend se nije nastavio, budući da je merenje nakon šest meseci pokazalo da se veličina kapi ponovo povećala i iznosila 31,73 nm i 41,06 nm. Slično kao i veličina kapi, zabeležene su fluktuacije PDI ovih sistema tokom vremena, od inicijalno izmerenih PDI vrednosti 0,536 i 0,286 do 0,243 i 0,204, nakon šest meseci (tabela 4.6.).

Studija stabilnosti je sprovedena na isti način i sa uzorcima koji su izrađeni sa makrogol 15 hidrosistearatom, kao kosurfaktantom. Nakon šest meseci nije došlo do većih promena u veličini kapi i PDI kod uzoraka T1s-T3s (tabela 4.7.). Ovi uzorci, sa oleoil makrogol-6 gliceridima su zadržali skoro istu veličinu kapi nakon mesec dana (13,10-14,36 nm), tri meseca (13,12-14,67 nm) i šest meseci (13,73-15,75 nm). Tokom čuvanja nije došlo do приметne promene PDI vrednosti (< 0,15), što ukazuje na relativno homogenu raspodelu veličina kapi i stabilnost ovih uzoraka. Sa druge strane, uzorci sa propilenglikol monokaprilatom (T4s-T6s) su imali inicijalno nešto veće kapi (17,39-23,46 nm), a promene u toku šest meseci su bile više izražene. Posle mesec dana čuvanja na sobnoj temperaturi, veličina kapi ovih uzoraka je bila u opsegu 17,91-24,41 nm, a nakon tri meseca u opsegu 18,74-27,57 nm. Tendencija povećanja kapi se nastavila i nakon šest meseci (20,33-27,99 nm), što je za 12,8-15,0% veće u odnosu na početne vrednosti. Posmatrajući promenu raspodele veličine kapi ovih uzoraka kroz parametar PDI, primećeno je da je povećanje nakon šest meseci u odnosu na početne vrednosti bilo i do 35%, u uzorku T5s (tabela 4.7).

Dobijeni rezultati su ukazali da su tečne SMEDDS, izrađene sa oleoil makrogol-6 gliceridima, bez obzira na vrstu upotrebljenog kosurfaktanta, fizički stabilne nakon šest meseca čuvanja na 22 ± 2 °C, bez većih promena u ispitivanim parametrima. Takođe, pokazano je da vrsta uljane faze ima važnu ulogu u procesu emulgovanja, s obzirom da SMEDDS sa propilenglikol monokaprilatom imaju inicijalno veće kapi (57,55 i 46,41 nm; za SMEDDS sa polisorbitom 80; odnosno 17,39-23,46 nm; za SMEDDS sa makrogol 15 hidrosistearatom). Takođe, kod ovih uzoraka tokom čuvanja dolazi do većih promena u veličini kapi, a imaju i veće PDI vrednosti. Ovakvi rezultati se mogu objasniti razlikama u osobinama uljane faze, odnosno činjenicom da oleoil makrogol-6 gliceridi imaju veću HLB vrednost ($HLB = 9$) od propilenglikol monokaprilata ($HLB = 6$).

S obzirom da je simvastatin sklon fotodegradaciji (Gigovska i sar., 2018), u uzorcima koji kao uljanu fazu sadrže oleoil makrogol-6 gliceride, a kao kosurfaktant polisorbit 80 ili makrogol 15

hidroksistearat (F1s-F3s, T1s-T3s) određen je i sadržaj simvastatina. Navedeni uzorci čuvani su nerazblaženi u zatvorenim staklenim epruvetama, zaštićeni od svetlosti, na sobnoj temperaturi, tokom perioda od šest meseci, a sadržaj je izražen kao % simvastatina u odnosu na teorijsku vrednost.

U tabeli 4.8 prikazan je sadržaj simvastatina u uzorcima F1s-F3s i T1s-T3s, određen nakon izrade, kao i nakon jednog, tri i šest meseci. Rezultati određivanja sadržaja simvastatina su pokazali da je tokom šest meseci čuvanja na sobnoj temperaturi sadržaj simvastatina bio u opsegu od 94,95% do 96,85%, odnosno da nije došlo do značajne degradacije supstance.

Tabela 4.8. Sadržaj simvastatina (%) u ispitivanim tečnim SMEDDS

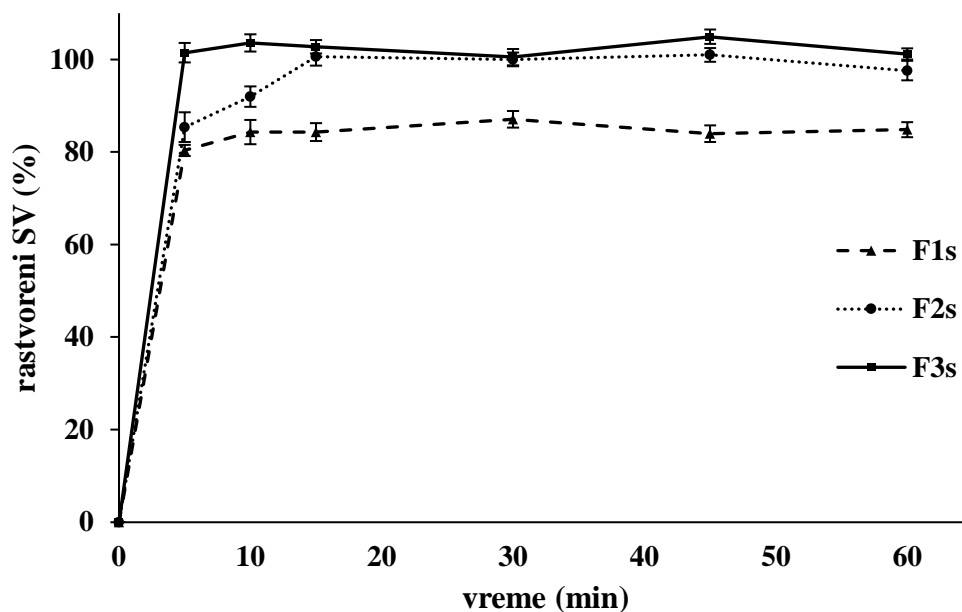
	Nakon izrade	Nakon 1 meseca	Nakon 3 meseca	Nakon 6 meseci
F1s	99,60	98,25	97,55	96,85
F2s	99,35	97,25	96,65	96,20
F3s	99,15	97,70	97,20	96,65
T1s	97,25	97,05	96,05	94,95
T2s	98,75	98,15	97,50	96,75
T3s	99,70	98,75	98,20	97,25

Rezultati sprovedenih ispitivanja su potvrdili prihvatljivu stabilnost tečnih SMEDDS sa oleoil makrogol-6 gliceridima, s obzirom da kod njih nije došlo do značajnih promena u izgledu, veličini i raspodeli veličina kapi, kao ni u sadržaju simvastatina tokom šestomesečnog čuvanja na sobnoj temperaturi. Iz ovih razloga, za dalja istraživanja su odabrane SMEDDS koje kao uljanu fazu sadrže oleoil makrogol-6 gliceride, a kao kosurfaktant polisorbitat 80 (F1s-F3s) ili makrogol 15 hidroksistearat (T1s-T3s).

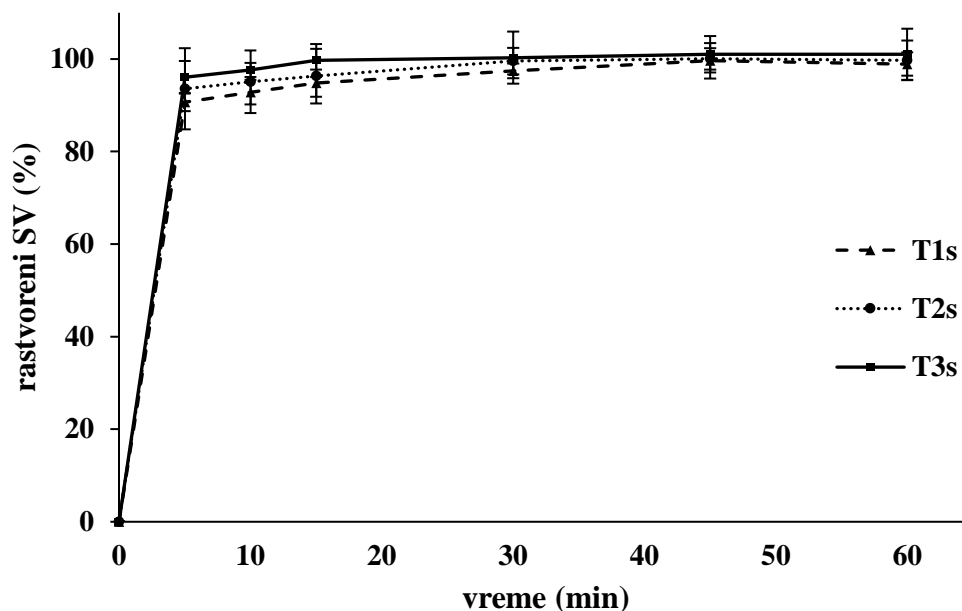
4.1.5. *In vitro* brzina rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS

Jedan od preduslova za oralnu apsorpciju lekovite supstance jeste da se ona nađe u rastvorenom obliku u GI traktu. Apsorpcija nisko rastvorljivih i visoko permeabilnih lekovitih supstanci, poput simvastatina, je ograničena njihovom rastvorljivošću i brzinom rastvaranja, što posledično utiče i na biološku raspoloživost supstance (Devadasu i sar., 2018). Međutim, u slučaju primene formulacija na bazi SMEDDS, supstanca se već nalazi u solubilizovanom obliku, tako da brzina oslobađanja/rastvaranja iz formulacije ograničava brzinu njene apsorpcije. Brzinu rastvaranja lekovite supstance *in vivo* nije moguće direktno odrediti, te se ovo ispitivanje uobičajeno sprovodi u *in vitro* uslovima. Iako *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance ne može direktno da ukaže na biološku raspoloživost lekovite supstance (jer lekovita supstanca nakon apsorpcije u enterocite, a pre dospeća u sistemsku cirkulaciju, potencijalno podleže dodatnim procesima u organizmu), ovo ispitivanje je značajno za procenu kinetike, odnosno, mehanizma oslobađanja lekovite supstance iz formulacija, kao i za procenu brzine kojom lekovita supstanca postaje dostupna za apsorpciju. Dodatno, uporednim ispitivanjem brzine rastvaranja lekovite supstance iz različitih formulacija moguće je izabrati optimalnu formulaciju, koja pokazuje željeni profil oslobađanja date supstance (Zaborenko i sar., 2019).

Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS F1s-F3s i T1s-T3s, punjenih u tvrde želatinske kapsule, u količini od 0,4 g, koja odgovara terapijskoj dozi od 20 mg simvastatina, prikazani su na slikama 4.15 i 4.16.



Slika 4.15. Profili brzine rastvaranja simvastatina iz formulacija F1s-F3s (srednje vrednosti i SD)



Slika 4.16. Profili brzine rastvaranja simvastatina iz formulacija T1s-T3s (srednje vrednosti i SD)

Dobijeni rezultati za uzorke koji su izrađivani sa S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/polisorbat 80 (F1s-F3s) (slika 4.15), su pokazali da je u prvih 5 min više od 85% simvastatina oslobođeno iz formulacija F2s i F3s, dok je oslobađanje simvastatina iz formulacije F1s bilo nešto sporije i dostiglo približno 80% nakon 5 min. Nakon 15 min ispitivanja oslobođena je celokupna količina simvastatina iz formulacija F2s i F3s, dok je oslobađanje simvastatina iz F3s formulacije dostiglo plato već nakon 10 min ispitivanja, kada se oslobodilo približno 84% supstance.

Izračunata f_2 vrednost za F2s i F3s od 53,55 ukazuje da su profili brzine rastvaranja simvastatina iz ove dve formulacije međusobno slični. Međutim, poređenje formulacija F1s i F2s ($f_2 = 44,69$) i F1s i F3s ($f_2 = 36,65$) ukazuje da se profil brzine rastvaranja simvastatina iz formulacije F1s razlikuje u

odnosu na ostale dve formulacije. Naime, simvastatin se sporije oslobađao iz formulacije F1s, koja sadrži najmanju količinu surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida. Iako su Kang i saradnici (2004) pokazali da sitnije kapi omogućavaju brže oslobađanje simvastatina iz SMEDDS, rezultati dobijeni u ovom istraživanju nisu mogli da potvrde navedeno zapažanje. Iako je formulacija F1s imala nešto manje kapi od formulacija F2s i F3s (tabela 4.6), razlike u veličini kapi između ovih formulacija su neznatne, a veličina kapi svih formulacija je ispod 18 nm. Sa druge strane, u studiji koji su sprovedi Kang i saradnici (2004), razlike u veličini kapi između ispitivanih SMEDDS su bile mnogo veće, u opsegu od 33 nm do 150 nm, te je pokazano da značajno smanjenje veličine kapi može omogućiti brže oslobađanje simvastatina.

U slučaju SMEDDS koji su izrađivani sa S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/makrogol 15 hidroksistearat (T1s-T3s), u prvih 5 min je oslobođeno više od 90% simvastatina iz sve tri formulacije („veoma brzo“ rastvaranje), usled čega se ovi profili mogu smatrati sličnim. Nakon 30 min ispitivanja, ukupni procenat oslobođenog simvastatina bio je gotovo isti za sve ispitivane formulacije, nezavisno od odnosa surfaktanta i kosurfaktanta i iznosio je približno 100% (slika 4.16).

Na osnovu dobijenih rezultata *in vitro* brzine rastvaranja, za formulacije sa različitim kosurfaktantima, može se zaključiti da je oslobađanje simvastatina iz ispitivanih tečnih SMEDDS relativno brzo („veoma brzo“) i da između ispitivanih formulacija, različitih po vrsti korišćenog kosurfaktanta, ne postoji značajna razlika u profilima brzine rastvaranja lekovite supstance, sa izuzetkom F1s formulacije. Ovakvi podaci pokazuju da formulisanje tečnih SMEDDS značajno povećava brzinu rastvaranja nisko rastvorljive model supstance, simvastatina. Brzo oslobađanje simvastatina bilo je naročito izraženo u slučaju uzorka F3s, koji je izrađivan sa S/Cs smešom kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi/polisorbata 80 (u odnosu 3:1), iz kojeg se već u prvih 5 min ispitivanja oslobodila celokupna količina simvastatina.

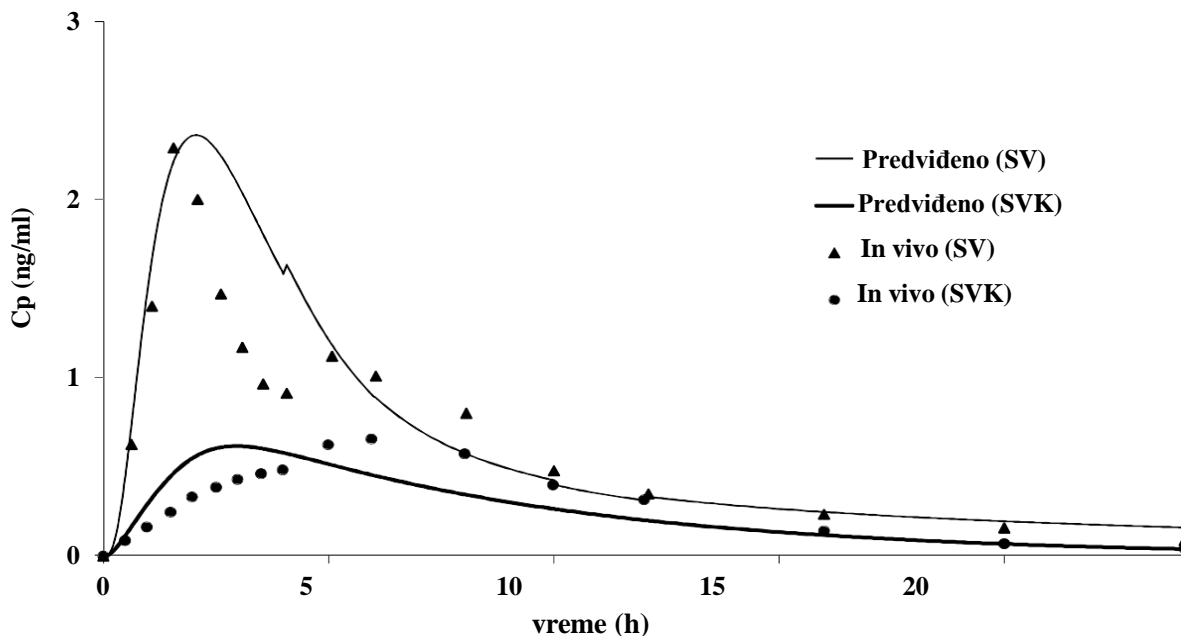
4.2. Druga faza eksperimentalnog rada

4.2.1. Razvoj simvastatin-specifičnog PBPK modela

Simvastatin-specifičan PBPK model je izgrađen tako da opisuje ključne procese koji utiču na farmakokinetiku simvastatina, a da istovremeno bude što jednostavniji. No, i ključni farmakokinetički procesi kojima podleže simvastatin nakon peroralne primene su prilično složeni, te je prikaz ovih procesa u *in silico* modelu predstavljao veliki izazov. Do sada je objavljeno nekoliko studija čiji je cilj bio da razjasne osnovne mehanizme koji određuju apsorpciju, distribuciju i metabolizam simvastatina i simvastatin-kiseline (Gertz i sar., 2011; Jin i sar., 2014; Lippert i sar., 2012; Tsamandouras i sar., 2014; 2015). Međutim, značajna varijabilnost humane populacije po pitanju farmakogenetike simvastatina, tačnije polimorfizam gena koji kodiraju metaboličke enzime i transportere za koje su simvastatin i simvastatin-kiselina supstrati (Birmingham i sar., 2015; Cheng i sar., 1992; Ramsey i sar., 2014; Tsamandouras i sar., 2014), kao i razlike u objavljenim vrednostima parametara koji opisuju biofarmaceutska svojstva simvastatina, predstavljaju ograničenje za tačno predviđanje farmakokinetike simvastatina kod pojedinca. Na osnovu analize publikovanih radova, moglo bi se reći da populacioni model simvastatina, razvijen primenom integrisanog populacionog PBPK pristupa, najdetaljnije opisuje farmakokinetiku simvastatina (Tsamandouras i sar., 2015). Međutim, složenost ovog modela ograničava njegovu širu primenu.

PBPK model simvastatina, izgrađen u ovoj studiji, na osnovu odabranih vrednosti ulaznih parametara prikazanih u tabeli 3.4, odnosi se na prosečnog ispitanika (engl. *population representative*). Varijabilnost populacije u vrednostima fizioloških i farmakokinetičkih parametara je u ovom slučaju zanemarena, s obzirom da je svrha *in silico* modelovanja bila da se proceni uticaj faktora formulacije na očekivanu koncentraciju simvastatina u plazmi. U skladu sa tim, dobijeni *in silico* rezultati se odnose na „prosečnu“ osobu bele rase, telesne mase od 70 kg. No, izgrađeni model se može prilagoditi fiziologiji osoba širokog raspona telesnih masa, prilagođavanjem vrednosti minutnog volumena srca i linearnim skaliranjem vrednosti zapremine pojedinačnih organa/tkiva i brzine perfuzije krvi kroz date organe/tkiva za određenu telesnu masu, odnosno minutni volumen srca (Li i sar., 2012; Samant i sar., 2017).

Predviđeni profili koncentracije simvastatina i simvastatin-kiseline u plazmi, u funkciji vremena, prikazani su na slici 4.17, zajedno sa odgovarajućim vrednostima preuzetim iz literature (Tubić-Grozdanić i sar., 2008). Tabela 4.9 daje sumarni prikaz predviđenih i *in vivo* određenih vrednosti farmakokinetičkih parametara za simvastatin i simvastatin-kiselinu nakon peroralne primene 20 mg simvastatina, u obliku tablete sa trenutnim oslobađanjem.



Slika 4.17. Predviđeni i *in vivo* profili (Tubić-Grozdaniš i sar., 2008) koncentracije simvastatina (SV) i simvastatin-kiseline (SVK) u plazmi, u funkciji vremena, nakon peroralne primene 20 mg simvastatina u obliku tablete sa trenutnim oslobađanjem

Prema rezultatima *in silico* modelovanja, procenjeno je da 4,66% simvastatina, nakon peroralnog unosa doze od 20 mg, dolazi do sistemske cirkulacije, što odgovara literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti simvastatina, koja je manja od 5% (Mauro, 1993; Thomas i sar., 2013). Predviđene maksimalne koncentracije u plazmi (C_{max}) i površine ispod krive ($PIK_{0 \rightarrow \infty}$) za simvastatin i simvastatin-kiselinu (tabela 4.9) uklapaju se u opseg vrednosti iz referentne *in vivo* studije (Tubić-Grozdaniš i sar., 2008). Najveće odstupanje u poređenju sa *in vivo* podacima zabeleženo je za parametar koji se odnosi na vreme potrebno da se dostigne maksimalna koncentracija simvastatin-kiseline u plazmi (t_{max}), ali ova razlika se može pripisati velikoj varijabilnosti u kinetici aktivnog transporta simvastatin-kiseline u hepatocite i brzini daljeg metabolizma. Drugo odstupanje se odnosi na pojavu dvostrukog pika u profilu koncentracije simvastatina u plazmi u funkciji vremena, koji je uočen u različitim *in vivo* studijama (Cheng i sar., 1992; Jin i sar., 2014; Tubić-Grozdaniš i sar., 2008). Predloženo je nekoliko hipoteza koje su pokušale da objasne ova zapažanja, uključujući uticaj enterohepatične cirkulacije, varijabilnosti u vremenu pražnjenja želuca i vremenu prolaska leka kroz creva, regionalno-zavisna apsorpcija u GI traktu sa različitim vremenima odlaganja i brzinom apsorpcije, kao i promene u procesu apsorpcije u zavisnosti od vremena primene leka, zbog promena fizioloških uslova u GI traktu u toku dana, a koji utiču na rastvaranje lekovite supstance (Jin i sar., 2014; Tubić-Grozdaniš i sar., 2008). Iako dizajnirani model nije uspeo da u potpunosti simulira drugi pik uočen u referentnoj studiji (Tubić-Grozdaniš i sar., 2008), rezultati simulacije sa aktiviranom opcijom „mešovito doziranja“ u okviru modela, koji pokazuju vidljivu „kvržicu“ u predviđenom profilu koncentracije lekovite supstance u plazmi, a koja odgovara vremenu obroka 4 h nakon primene leka (slika 4.17), ukazuju da bi unos hrane mogao biti delimično odgovoran za uočene višestruke pikove u profilima koncentracije simvastatina u plazmi.

Tabela 4.9. Poređenje predviđenih i *in vivo* određenih vrednosti farmakokinetičkih parametara za simvastatin (SV) i simvastatin-kiselinu (SVK) nakon peroralne primene 20 mg simvastatina

Parametar	Predviđena vrednost	<i>In vivo</i> vrednost ^a (Tubić-Grozdanis i sar., 2008)
SV C _{max} (ng/ml)	2,36	2,68 ± 1,33
SV t _{max} (h)	2,08	2,4 ± 1,65
SV PIK _{0→∞} (ng h/ml)	18,62	14,81 ± 7,28
SVK C _{max} (ng/ml)	0,62	0,73 ± 0,36
SVK t _{max} (h)	2,96	6,1 ± 1,34
SVK PIK _{0→∞} (ng h/ml)	6,19	7,27 ± 3,40
F _a ^b (%)	99,97	/
FD _p ^c (%)	19,38	/
F _b ^d (%)	4,66	/

^a srednja vrednost ± SD

^b F_a - procenat apsorbovane lekovite supstance (u enterocitima)

^c FD_p - procenat lekovite supstance u portalnom krvotoku

^d F_b - biološka raspoloživost lekovite supstance (izražena kao procenat u odnosu na dozu od 20 mg)

4.2.2. PBPK modelovanje apsorpcije i dispozicije simvastatina nakon peroralne primene tečnih SMEDDS

Izgrađeni PBPK model je u narednoj fazi rada korišćen za predviđanje apsorpcije i dispozicije simvastatina nakon peroralne primene tečnih SMEDDS (F1s-F3s i T1s-T3s), punjenih u tvrde želatinske kapsule. Za opisivanje brzine rastvaranja simvastatina u organizmu korišćeni su eksperimentalno dobijeni *in vitro* profili brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS sa polisorbatom 80 i makrogol 15 hidroksistearatom kao kosurfaktantom (slike 4.15 i 4.16).

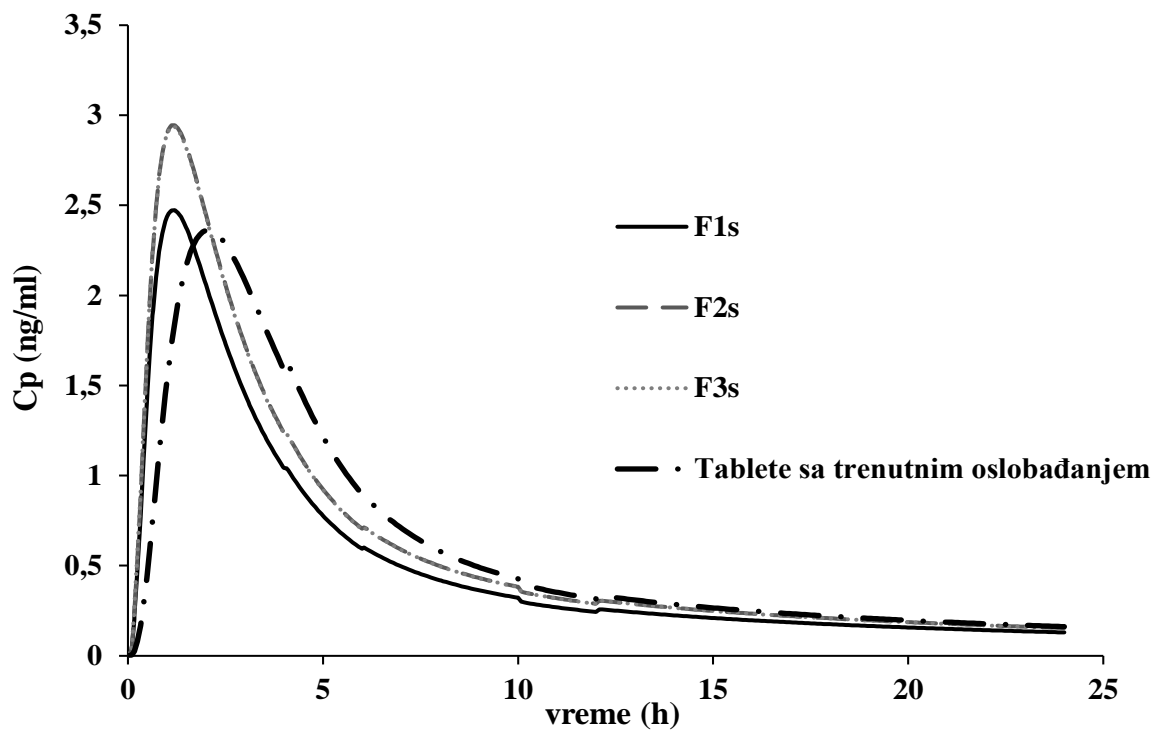
Generisani profili koncentracije simvastatina u plazmi za formulacije F1s-F3s i T1s-T3s prikazani su na slikama 4.18 i 4.19, zajedno sa simuliranim profilom za tablete sa trenutnim oslobađanjem simvastatina. Odgovarajući farmakokinetički parametri su prikazani u tabeli 4.10. Dobijeni rezultati pokazuju da samo poboljšanje rastvorljivosti simvastatina, postignuto formulisanjem tečnih SMEDDS, ne povećava biološku raspoloživost simvastatina (tabela 4.10). Naime, iako je apsorpcija lekovite supstance iz tečnih SMEDDS brža (skoro duplo manja t_{max} vrednost u odnosu na tablete sa trenutnim oslobađanjem), nema velike razlike u koncentraciji lekovite supstance u sistemskej cirkulaciji za tečne SMEDDS u poređenju sa vrednošću simuliranoj za tablete sa trenutnim oslobađanjem (manje od 20% razlike za sve tri formulacije, odnosno, 16,43% razlike u PIK vrednosti za formulaciju F1s i svega 0,81%, 0,97%, 0,75%, 1,34% i 1,40% razlike za formulacije F2s, F3s, T1s, T2s i T3s, redom). Ovo se može objasniti činjenicom da veliki deo simvastatina, koji je dominantno apsorbovan iz proksimalnih delova GI trakta (slike 4.20 i 4.21), podleže presistemske metabolizmu u crevima i jetri. Ovakav ishod simulacija ukazuje da primena različitih tehnika samo sa ciljem da se poboljša rastvorljivost simvastatina ne predstavlja najbolju strategiju u formulisanju farmaceutskih preparata sa poboljšanom biološkom raspoloživošću simvastatina.

Tabela 4.10. Predviđeni farmakokinetički parametri za peroralno primenjen simvastatin u obliku tečnih SMEDDS i tablete sa trenutnim oslobađanjem

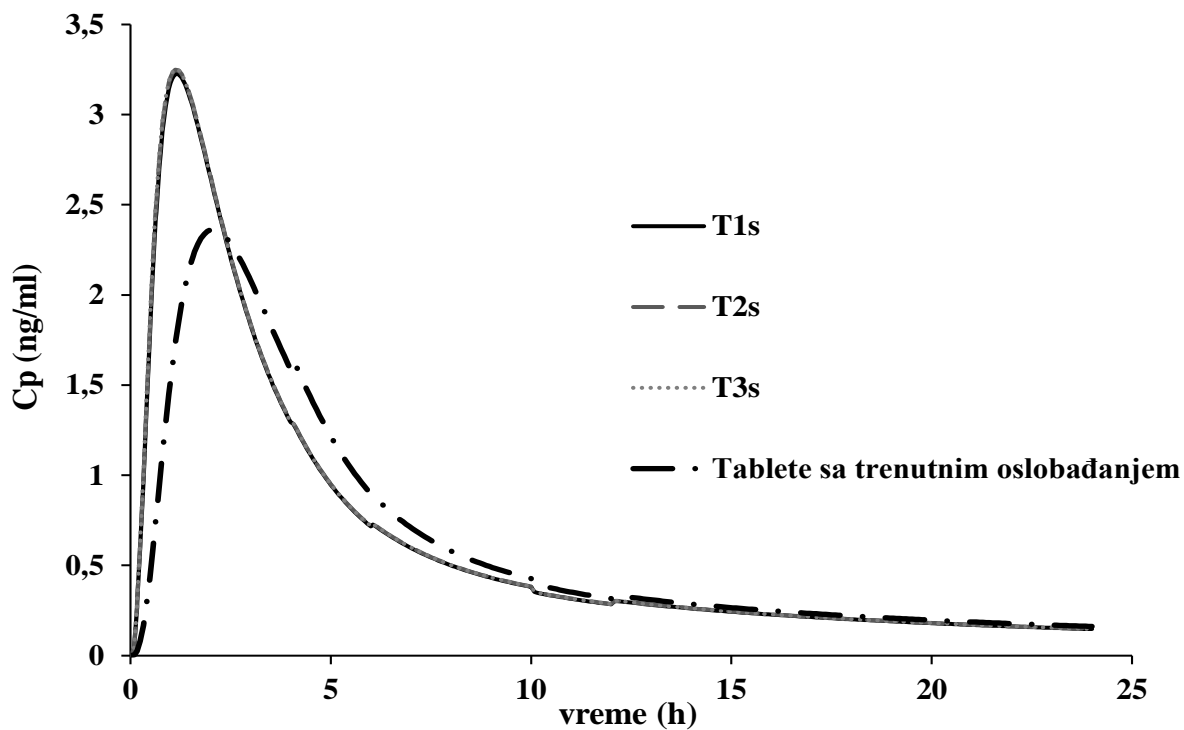
Parametar	F1s ^a	F2s ^a	F3s ^a	T1s ^a	T2s ^a	T3s ^a	Tableta sa trenutnim oslobađanjem ^b
F _a (%)	87,05	100,00	100,00	99,62	100,00	100,00	99,97
FD _p (%)	16,26	19,30	19,27	19,14	19,26	19,27	19,38
F _b (%)	3,84	4,56	4,56	5,18	5,21	5,21	4,66
C _{max} (ng/ml)	2,47	2,94	2,94	3,22	3,25	3,25	2,36
t _{max} (h)	1,20	1,20	1,20	1,12	1,12	1,12	2,08
PIK _{0→∞} (ng h/ml)	15,56	18,47	18,44	18,76	18,87	18,88	18,62

^a Brzina rastvaranja simvastatina *in vitro* je uneta kao ulazni parameter za simulaciju

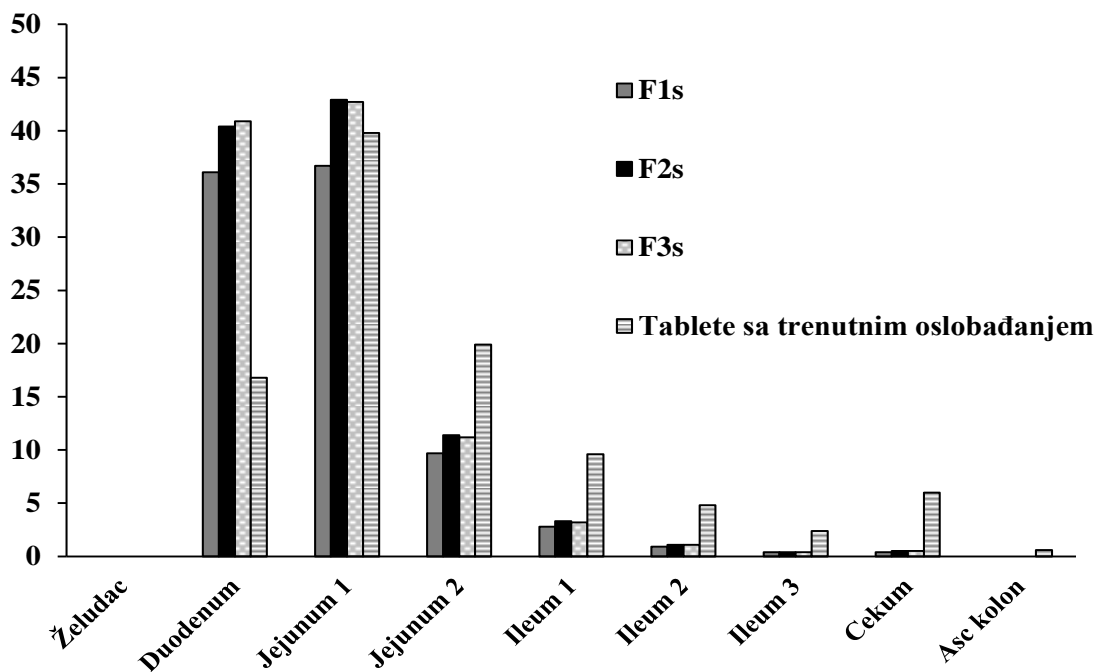
^b Brzina rastvaranja simvastatina *in vivo* je predviđena pomoću softvera (*Johnson-ov model*)



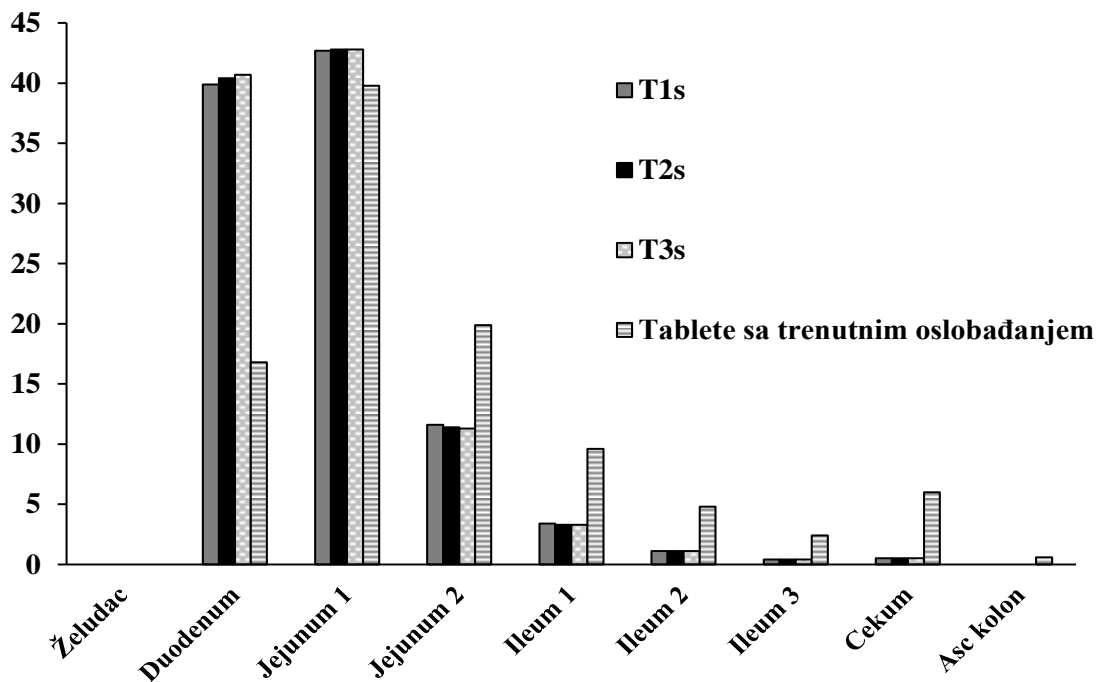
Slika 4.18. Profili koncentracije simvastatina u plazmi u funkciji vremena za formulacije F1s-F3s i tablete sa trenutnim oslobađanjem



Slika 4.19. Profili koncentracije simvastatina u plazmi u funkciji vremena za formulacije T1s-T3s i tablete sa trenutnim oslobađanjem; profili T2s i T3s se poklapaju



Slika 4.20. Regionalna raspodela apsorpcije simvastatina nakon peroralne primene formulacija F1s-F3s i tableta sa trenutnim oslobađanjem



Slika 4.21. Regionalna raspodela apsorpcije simvastatina nakon peroralne primene formulacija T1s-T3s i tableta sa trenutnim oslobađanjem

4.3. Treća faza eksperimentalnog rada

4.3.1. Razvoj lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina

S obzirom na to da su rezultati simulacija za tečne SMEDDS pokazali da se izradom formulacije sa povećanom brzinom rastvaranja simvastatina ne postiže povećanje biološke raspoloživosti lekovite supstance, usled intenzivnog presistemskog metabolizma, pristupilo se izradi formulacija sa modifikovanim (odloženim) oslobađanjem simvastatina. Ideja je bila dizajnirati sisteme koji simvastatin oslobađaju brzo, ali u ciljnom delu GI trakta, kako bi se uticaj presistemskog metabolizma smanjio na najmanju moguću meru.

U prvom delu istraživanja, tečni SMEDDS su punjeni u tvrde acidorezistentne kapsule od hipromeloze, komercijalno dostupne pod nazivom DRcaps[®], kako bi se obezbedila zaštita sadržaja kapsule u kiseloj sredini želuca i omogućilo odloženo oslobađanje lekovite supstance, bez potrebe za drugim ekscipijensima. Prema navodima proizvođača DRcaps[®] (Capsugel, SAD), sastojci kapsule usporavaju njeno rastvaranje nakon gutanja i omogućavaju zaštitu sadržaja kapsule od kisele sredine želuca, bez dodavanja sastojaka za oblaganje, koji povećavaju vreme i troškove proizvodnje (Capsugel, 2014). Do sada su ove kapsule korišćene za formulaciju dijetetskih suplemenata i nema mnogo podataka o njihovoj primeni u proizvodnji farmaceutskih preparata, te je ova studija pokušala da doprinese njihovoj široj primeni.

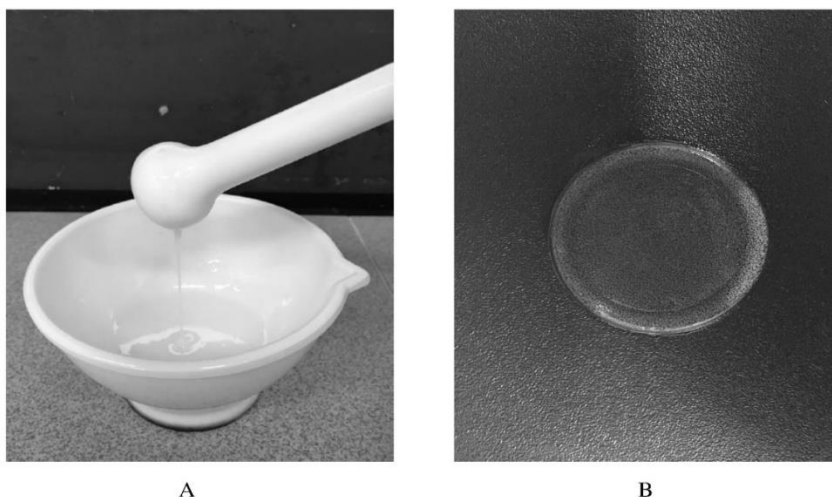
U drugom delu istraživanja, formulisani su i izrađeni sistemi, dobijeni od odabranih tečnih SMEDDS i odgovarajućih čvrstih polimernih nosača, kopolimera metakrilne kiseline, sa ciljem da se postigne modifikovano oslobađanje lekovite supstance. Ovi polimeri, poznati pod komercijalnim nazivom Eudragit[®] (Evonik, Nemačka), smatraju se generalno bezbednim i netoksičnim (Gupta i sar., 2015; Thakral i sar., 2013).

Eudragit[®] kopolimeri metakrilne kiseline omogućavaju oslobađanje lekovite supstance u različitim delovima GI trakta, počev od duodenuma, preko jejunuma i ileuma, do kolona (Thakral i sar., 2013). Često se koriste dva ili više kopolimera metakrilne kiseline u jednoj formulaciji, kako bi se postiglo željeni profili oslobađanja lekovitih supstanci.

U ovoj studiji korišćeni su sintetski kopolimeri metakrilne kiseline i metil metakrilata, u odnosu 1:1 (Eudragit[®] L100), koji se rastvara na pH 6,0 i kopolimeri metakrilne kiseline i metil metakrilata u odnosu 2:1 (Eudragit[®] S100), koji se rastvara pri pH 7,0. Eudragit[®] L100 omogućava oslobađanje lekovite supstance u distalnom jejunumu (pH > 6,0), dok Eudragit[®] S100 obezbeđuje da se lekovita supstanca oslobađa u distalnom ileumu i kolonu (pH > 7,0) (Das Neves i Sarmento, 2014). U do sada objavljenim studijama, Eudragit[®] L100 i Eudragit[®] S100 polimeri su korišćeni kao sredstva za oblaganje jezgra tableta, peleta, mikrosfera i nanočestica (Desai i Momin, 2020; Hirjäu i sar., 2020; Kumar i sar., 2018; Subudhi i sar., 2015; Rai i sar., 2016; Chen i sar., 2017, Mehta i sar., 2013; Sareen i sar., 2016). Međutim, nijedna od pomenutih studija nije razmatrala upotrebu navedenih Eudragit[®] polimera kao nosača za tečne SMEDDS.

U toku ili nakon mešanja odabranih tečnih SMEDDS sa Eudragit[®] L100 i S100 polimerima (u odnosima 1:1 i 2:1) primećeno je da dolazi do očvršćavanja uzoraka. Naime, pri odnosu SMEDDS:polimer 1:1 došlo je do gotovo trenutnog očvršćavanja uzoraka, koji su postali žilavi, te su takvi uzorci bili teški za dalju manipulaciju i punjenje u kapsule, kao finalni farmaceutski oblik. Takođe, u slučaju odnosa SMEDDS:polimer 1:1, količina uzorka kojom je potrebno napuniti kapsulu (da sadrži dozu od 20 mg simvastatina) je bila veća nego što je kapacitet tvrde kapsule veličine „0“. Sa druge strane, za sisteme sa odnosom SMEDDS:polimer 2:1 dobijeni su bistri uzorci tečne konzistencije, koji su se neposredno nakon izrade lako izlivali (slika 4.22A), ali je tokom 1 h došlo do spontanog očvršćavanja, pri čemu su nastali čvrsti, rastegljivi i transparentni uzorci (slika 4.22B).

S obzirom da je samo odnos SMEDDS:polimer od 2:1 dao uzorke koji mogu da se lako pune u tvrde kapsule, tako da 0,6 g formulacije u kapsuli sadrži 20 mg simvastatina, a zatim u toku 1 h od izrade očvršćavaju, čime se onemogućava curenje uzoraka iz kapsule, ovaj odnos je izabran kao konačni odnos SMEDDS i polimera. Sastav lipidnih formulacija dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS sa Eudragit® polimerima, bez i sa simvastatinom, prikazan je u tabeli 4.11.



Slika 4.22. Izgled uzoraka dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera u odnosu 2:1 neposredno nakon izrade (A) i 48 h nakon izrade (B)

Tabela 4.11. Sastav lipidnih formulacija dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS sa Eudragit® polimerima (odnos 2:1)

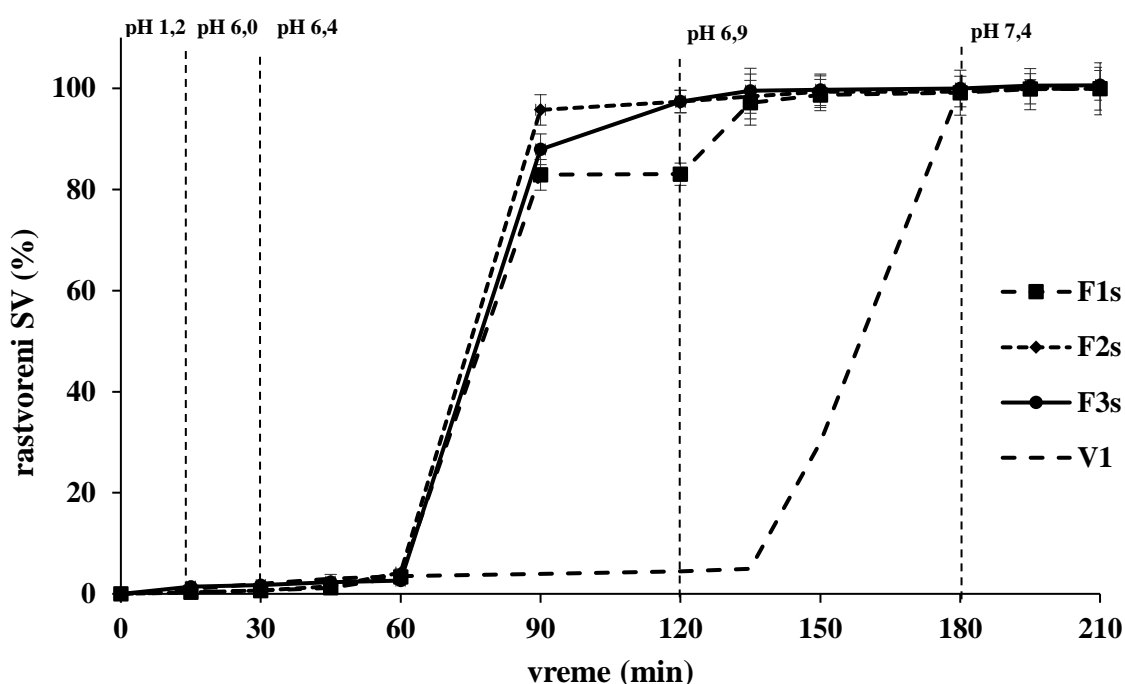
Oznaka uzorka	Sastav
F1 S100-F3 S100	Eudragit® S100:SMEDDS F1-F3 = 1:2 bez simvastatina
F1s S100-F3s S100	Eudragit® S100: SMEDDS F1s-F3s = 1:2 sa simvastatinom
F1 SL100-F3 SL100	Eudragit® S100/Eudragit® L100: SMEDDS F1-F3 = 1:2 bez simvastatina
F1s SL100-F3s SL100	Eudragit® S100/Eudragit® L100: SMEDDS F1s-F3s = 1:2 sa simvastatinom
T1 S100-T3 S100	Eudragit® S100: SMEDDS T1-T3 = 1:2 bez simvastatina
T1s S100-T3s S100	Eudragit® S100: SMEDDS T1s-T3s = 1:2 sa simvastatinom
T1 SL100-T3 SL100	Eudragit® S100/Eudragit® L100: SMEDDS T1-T3 = 1:2 bez simvastatina
T1s SL100-T3s SL100	Eudragit® S100/Eudragit® L100: SMEDDS T1s-T3s = 1:2 sa simvastatinom

Imajući u vidu da su tečne SMEDDS trokomponentni sistemi, sledeći korak je bio razmotriti koja komponenta dovodi do fenomena očvršćavanja. Mešanjem pojedinačnih komponenti (oleoil makrogol-6 glicerida, kaprilokaproil makrogol-8 glicerida, polisorbata 80 i makrogol 15 hidrosistearat) koje ulaze u sastav tečnih SMEDDS i Eudragit® S100/Eudragit® L100 polimera, je utvrđeno da jedino kombinacija surfaktanta, kaprilokaproil makrogol-8 glicerida sa oba pojedinačna Eudragit® polimera dovodi do stvaranja čvrstih, rastegljivih uzoraka. Može se pretpostaviti da usled formiranja intermolekulskih veza između kaprilokaproil makrogol-8 glicerida i Eudragit® polimera dolazi do stvaranja gelske mreže. Dalja ispitivanja ovog fenomena biće opisana u okviru poglavlja koja slede.

4.3.2. Biofarmaceutska karakterizacija lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina

4.3.2.1. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem

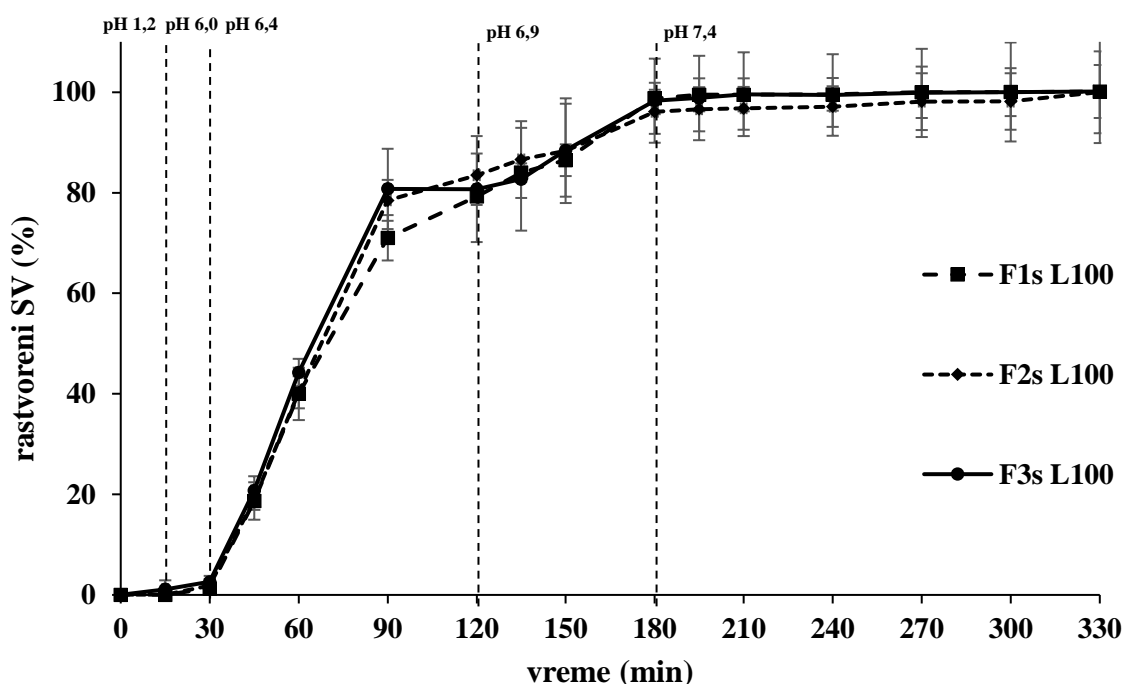
U prvom delu ove faze eksperimentalnog rada, ispitana je *in vitro* brzina rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS izrađenih sa kosurfaktantom polisorbitom 80 (F1s-F3s), punjenih u tvrde acidorezistentne kapsule od hipromeloze. S obzirom da je u prethodnim istraživanjima pokazano da su profili oslobađanja simvastatina iz tečnih SMEDDS slični, nezavisno od tipa upotrebljenog kosurfaktanta, za ovu fazu istraživanja su korišćeni samo tečni SMEDDS izrađeni sa polisorbitom 80, da bi se procenilo da li acidorezistentne kapsule utiču na brzinu oslobađanja simvastatina iz tečnih SMEDDS, kojima su navedene kapsule napunjene. Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja simvastatina iz tečnih SMEDDS punjenih u acidorezistentne kapsule, prikazani su na slici 4.23.



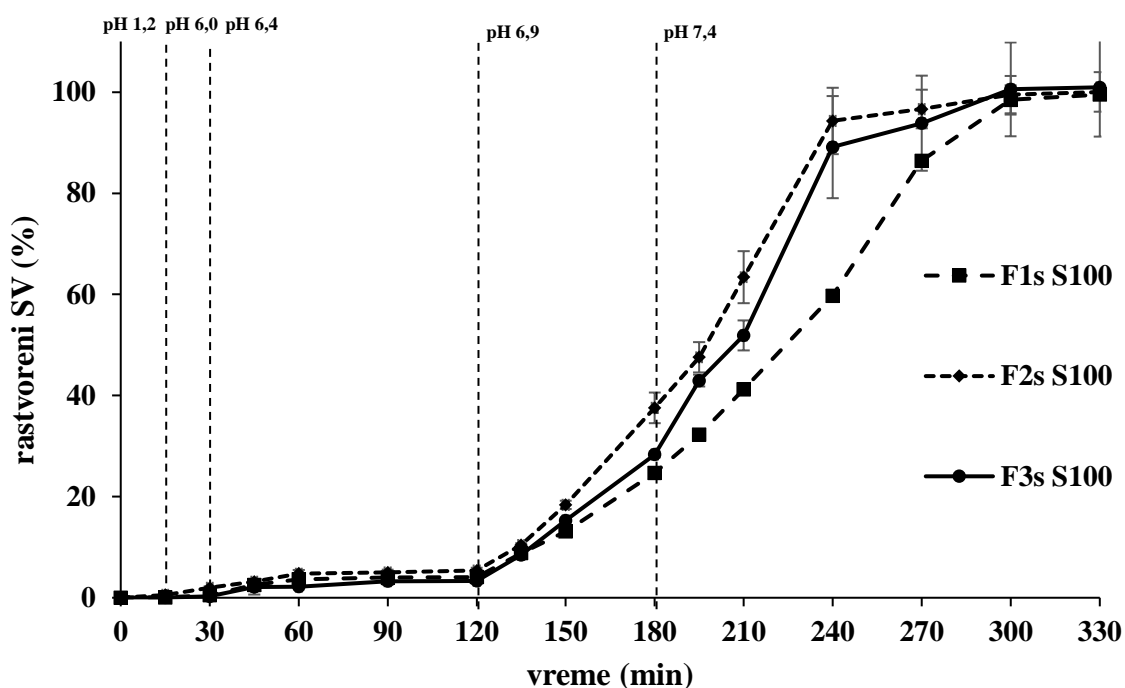
Slika 4.23. Profili brzine rastvaranja simvastatina iz formulacija F1s-F3s, punjenih u acidorezistentne kapsule (srednje vrednosti i SD); V1 se odnosi na virtuelni profil brzine rastvaranja koji pokazuje 100% oslobađanje simvastatina nakon 3 h (u medijumu pH 6,9)

Dobijeni profili brzine rastvaranja simvastatina su pokazali da se punjenjem tečnih SMEDDS, sa trenutnim oslobađanjem supstance, u acidorezistentne kapsule može postići odloženo oslobađanje simvastatina. Naime, u medijumima pH 1,2 i pH 6,0 nije došlo do oslobađanja lekovite supstance. Raspadanje kapsula je počelo u medijumu pH 6,4, dok se potpuno oslobađanje/rastvaranje simvastatina postiglo nakon 90 min ispitivanja u istom medijumu. Na slici 4.23 je prikazan i virtuelni profil brzine rastvaranja simvastatina (V1), koji oslikava profil rastvaranja lekovite supstance u situaciji kada se 100% lekovite supstance rastvara za 180 min. Ovaj profil je konstruisan tako da ilustruje oslobađanje/rastvaranje lekovite supstance u distalnom jejunumu (pH 6,9) i kasnije je korišćen u *in silico* studiji za procenu uticaja promena u brzini oslobađanja lekovite supstance na očekivani farmakokinetički profil. Naime, pomenuti virtuelni profil je služio za procenu uticaja dodatnog odlaganja oslobađanja simvastatina (u odnosu na profile oslobađanja/brzine rastvaranja iz formulacija F1s-F3s, punjenih u acidorezistentne kapsule).

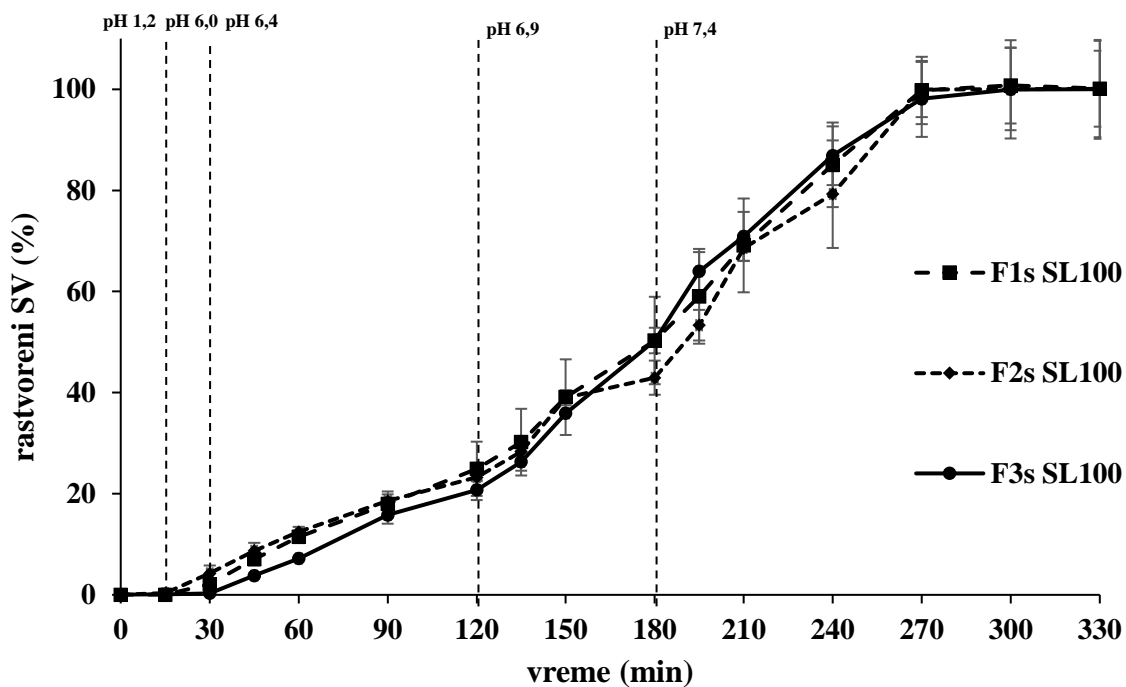
U drugom delu ove faze eksperimentalnog rada, ispitana je brzina rastvaranja simvastatina iz formulacija dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS sa Eudragit® S100 i L100 polimerima i punjenih u tvrde želatinske kapsule. Profili brzine rastvaranja simvastatina iz navedenih formulacija sa polisorbitom 80 (F1s L100-F3s L100, F1s S100-F3s S100 i F1s SL100-F3s SL100), predstavljeni su na slikama 4.24-4.26. Profili brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija sa makrogol 15 hidroksisteatom (T1s L100-T3s L100, T1s S100-T3s S100 i T1s SL100-T3s SL100) prikazani su na slikama 4.27-4.29.



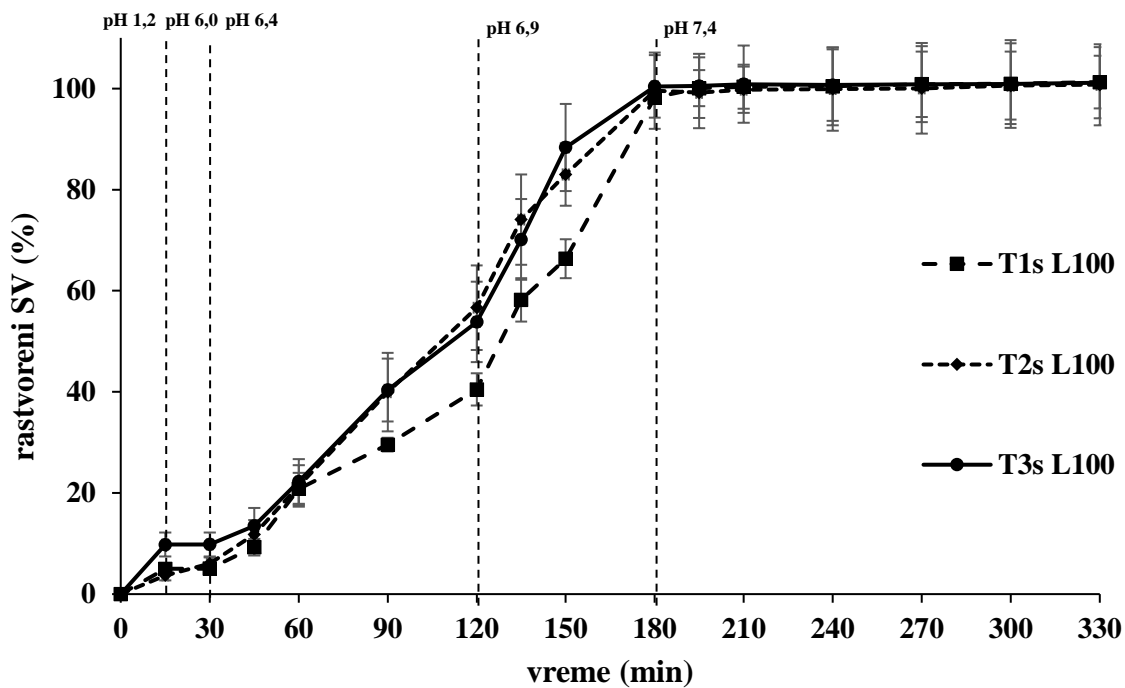
Slika 4.24. Profili brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija F1s L100-F3s L100 (srednje vrednosti i SD)



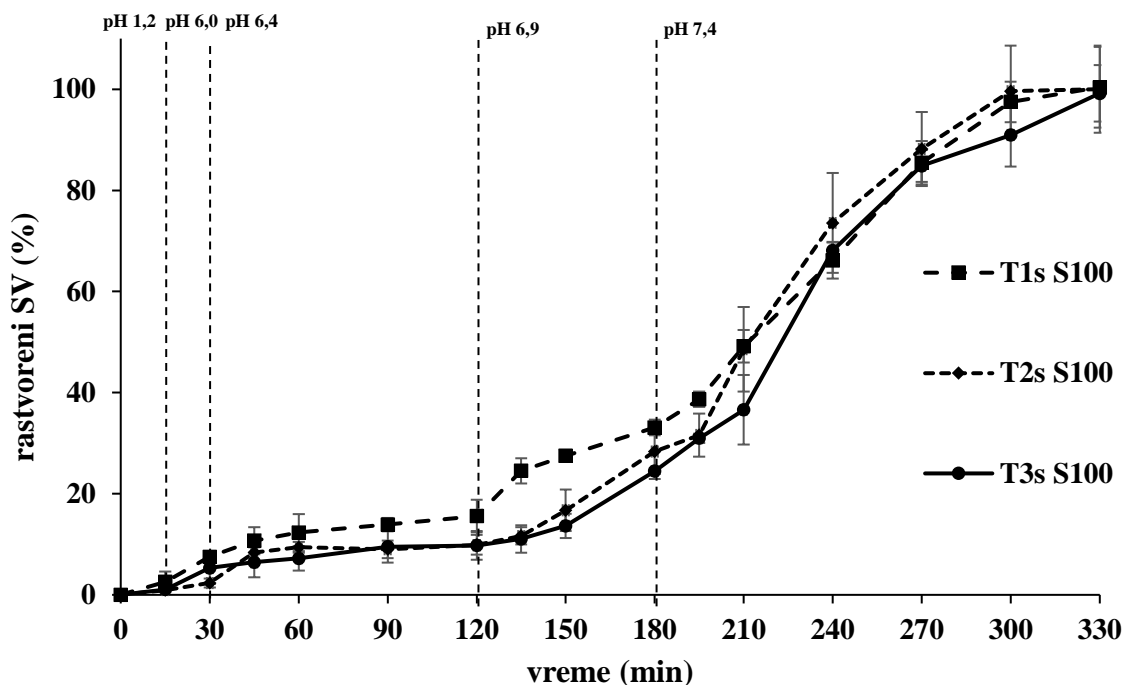
Slika 4.25. Profili brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija F1s S100-F3s S100 (srednje vrednosti i SD)



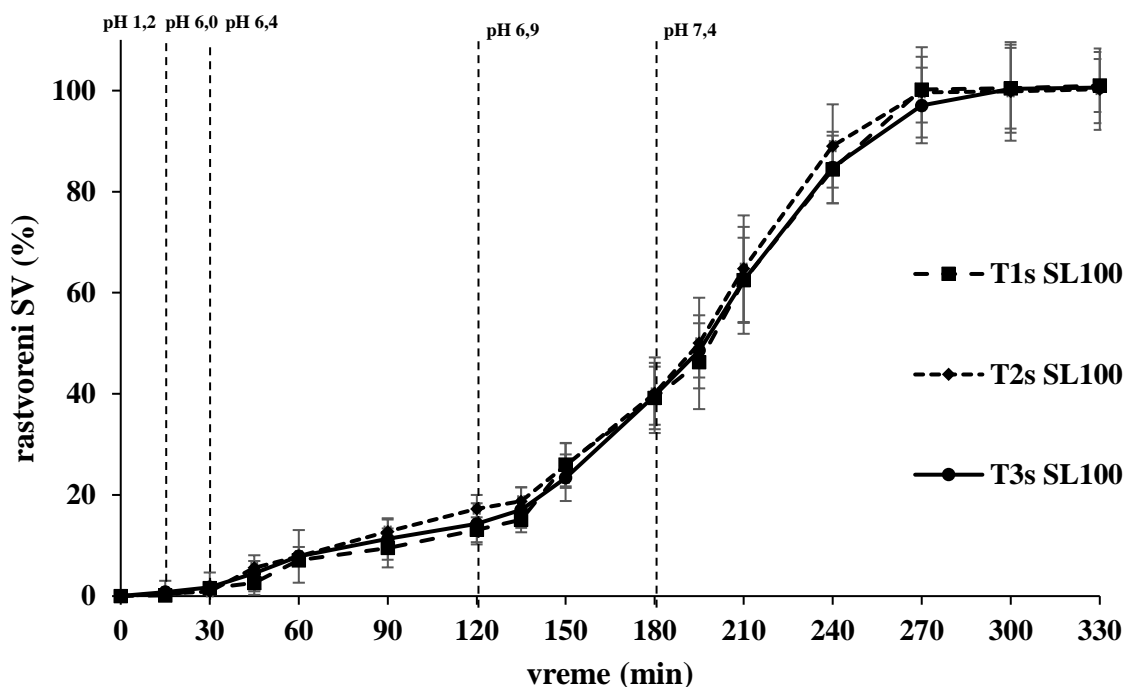
Slika 4.26. Profili brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija F1s SL100-F3s SL100 (srednje vrednosti i SD)



Slika 4.27. Profili brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija T1s L100-T3s L100 (srednje vrednosti i SD)



Slika 4.28. Profili brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija T1s S100-T3s S100 (srednje vrednosti i SD)



Slika 4.29. Profili brzine rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija T1s SL100-T3s SL100 (srednje vrednosti i SD)

Prikazani profili brzine rastvaranja simvastatina su pokazali da se oslobađanje simvastatina uglavnom odvija brže iz formulacija sa polisorbatom 80 (formulacije koje nose oznaku F), u poređenju sa formulacijama koje sadrže makrogol 15 hidroksistearat (formulacije koje nose oznaku T). Delimično odstupanje od ovog zapažanja se odnosi samo na brzinu rastvaranja simvastatina iz formulacija sa Eudragit® S100, gde su formulacije sa polisorbatom 80 pokazale sporije oslobađanje lekovite supstance u toku prvih 150 min ispitivanja, a dalje oslobađanje lekovite supstance je teklo sporije iz

formulacija sa makrogol 15 hidrosistearatom. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da postoji jasna zavisnost između brzine rastvaranja simvastatina i vrste polimera koji je korišćen za izradu uzoraka. Simvastatin se potpuno oslobodio iz svih formulacija sa Eudragit® L100 u toku 180 min, odnosno u medijumu pH 6,9. To znači da bi se simvastatin u *in vivo* uslovima oslobodio pre nego što dođe do distalnog ileuma. Sa druge strane, prisustvo Eudragit® S100 u formulacijama je dodatno odložilo oslobađanje simvastatina, te je potpuno oslobađanje postignuto nakon 300 min ispitivanja, u medijumu pH 7,4. Ovi rezultati ukazuju da bi se iz formulacija koje sadrže Eudragit® S100 simvastatin oslobodio tek u distalnom ileumu ili kolonu. Dodatno, ispitan je i uticaj kombinacije dva polimera, Eudragit® S100/Eudragit® L100 (u odnosu 1:1) na profile brzine rastvaranja simvastatina, što je prikazano na slikama 4.26 i 4.29. U ovom slučaju, iz svih ispitivanih formulacija se manje od 20% simvastatina oslobodilo tokom prvih 120 min ispitivanja, u medijumu 6,4, koji odgovara proksimalnim delovima GI trakta, dok se potpuno oslobađanje lekovite supstance postiglo nakon 270 min.

Dobijeni rezultati pokazuju da mešanje tečnih SMEDDS sa izabranim Eudragit® polimerima uspešno modifikuje, odnosno, odlaže rastvaranje simvastatina iz nastalih lipidnih formulacija. Naime, kopolimeri metakrilne kiseline, koji imaju pH zavisnu rastvorljivost, omogućavaju da ispitivane formulacije zadrže integritet i spreče rastvaranje lekovite supstance u medijumima koji predstavljaju uslove u želucu i delu tankog creva, da bi na kraju oslobodile lekovitu supstancu u medijumima koji predstavljaju više distalne delove GI trakta.

U literaturi je opisano mnogo primera konvencionalne upotrebe navedenih Eudragit® polimera za formiranje gastrozistentne obloge, u kojima je potvrđeno da se primenom ovih polimera može omogućiti modifikovano oslobađanje lekovite supstance iz farmaceutskih preparata. U studiji koju su sproveli Umadevi i saradnici (2010) na albino pacovima pokazano je da se iz mikrosfera obloženih polimerima Eudragit® S100 i L100 (u odnosu 1:4) oslobodilo samo 3% aceklofenaka tokom prolaska kroz gornje delove GI trakta, dok se nakon 8 h oslobodilo 93,6% aceklofenaka u kolonu (Umadevi i sar., 2010). Međutim, sa aspekta formulacije sistemi ispitani u ovom radu su najslabiji organogelovima za rektalnu primenu koje su formulisali i okarakterisali Goto i saradnici (1991). Mešanjem Eudragit® S100/Eudragit® L100 polimera u visokoj koncentraciji (30-40%) i propilenglikola, formulisani su organogelovi za rektalnu primenu koji omogućavaju odloženo oslobađanje lekovitih supstanci (Goto i sar., 1991; Kawata i sar., 1991). U ovim istraživanjima je potvrđeno da uzorci nastali mešanjem 33,3% Eudragit® polimera (S100, L100, ili njihova kombinacija u odnosu 1:1) i 66,6% odgovarajućeg SMEDDS omogućavaju modifikovano oslobađanje simvastatina.

4.3.2.2. Matematičko modelovanje kinetike oslobađanja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem

Da bi se procenio mehanizam oslobađanja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance, dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera, ispitana je kinetika oslobađanja simvastatina iz navedenih formulacija. Za analizu kinetike oslobađanja korišćeni su različiti matematički modeli: nultog reda, prvog reda, *Higuchi*, *Korsmeyer-Peppas*, *Hixon-Crowell*. Dobijeni podaci o *in vitro* brzini rastvaranja simvastatina su uklapani u navedene matematičke modele, a stepen uklapanja sa svakim modelom je procenjen na osnovu izračunatih vrednosti koeficijenta determinacije (r^2).

Rezultati modelovanja prikazani su u tabelama 4.12. i 4.13. Izračunate vrednosti r^2 su ukazale da između formulacija sa polisorbitom 80 i formulacija sa makrogol 15 hidrosistearatom postoje razlike u mehanizmu oslobađanja lekovite supstance, te se dobijeni profili opisuju različitim matematičkim modelima.

Kada su u pitanju formulacije sa polisorbatom 80 (oznake F), najveća varijabilnost u kinetici oslobađanja lekovite supstance uočena je za formulacije izrađene sa Eudragit® L100. Naime, formulacije F1s L100 i F3s L100 slede *Hixson-Crowell*-ov model oslobađanja, a formulacija F2s L100 oslobađanje kinetikom prvog reda, mada su za sve tri formulacije vrednosti r^2 relativno visoke za oba modela. S obzirom da *Hixson-Crowell*-ov model opisuje sisteme kod kojih je oslobađanje lekovite supstance praćeno promenom površine, ovi rezultati ukazuju da kod uzoraka sa Eudragit® L100 preovlađuje erozija matriksa kao osnovni mehanizam oslobađanje lekovite supstance. Visoke vrednosti r^2 ($r^2 \geq 0,92$) sugerisale su da formulacije izrađene sa Eudragit® S100 (F1s S100-F3s S100) slede *Korsmeyer-Peppas*-ov model kinetike oslobađanja. U slučaju ovih formulacija, visoke vrednosti eksponenta oslobađanja ($n > 0,89$) (tabela 4.14) ukazale su da se simvastatin iz formulacija oslobađa anomalnim transportom, koji odgovara „super slučaju II transporta“. Oslobađanje simvastatina iz formulacija F1s SL100-F3s SL100 se najbolje može opisati kinetikom nultog reda, koja se odlikuje konstantnom brzinom oslobađanja lekovite supstance iz uzoraka. To znači da se iz ovih sistema oslobađa konstantna količina lekovite supstance po jedinici vremena, što omogućava da oslobađanje bude kontrolisano i produženo.

Za razliku od formulacija sa polisorbatom 80, sve formulacije sa makrogol 15 hidroksistearatom pokazale su kinetiku oslobađanja simvastatina koja se najbolje može opisati *Korsmeyer-Peppas*-ovim modelom (za sve formulacije $r^2 \geq 0,89$). Izračunate n vrednosti *Korsmeyer-Peppas*-ove jednačine ($n > 0,89$ za sve formulacije; tabela 4.15) pokazuju da se simvastatin oslobađa anomalnom difuzijom koja odgovara „super slučaju II transporta“. Ovi rezultati ukazuju da je pH-kontrolisano rastvaranje/erozija nosača na bazi kopolimera metakrilne kiseline odgovorno/a za postepeno oslobađanje simvastatina iz formulacija sa makrogol 15 hidroksistearatom kao kosurfaktantom.

Kao što je već navedeno, dobijeni sistemi se najpribližnije mogu uporediti sa oleogelovima koje su formulisali Goto i saradnici (1991) i Kawata i saradnici (1991). Proučavanjem mehanizma i kinetike oslobađanja salicilne kiseline iz sistema dobijenih mešanjem Eudragit® S100/ Eudragit® L100 i propilenglikola, ovi autori su pokazali da su mehanizmi oslobađanja iste lekovite supstance iz Eudragit® S100 i L100 organogelova bili sasvim različiti, kao i da je razlika verovatno posledica različite rastvorljivosti ovih Eudragit® polimera (Kawata i sar., 1991). Kawata i saradnici (1991) su pokazali da se salicilna kiselina oslobađa iz Eudragit® L organogelova mehanizmom erozije matriksa koja se opisuje kinetikom nultog reda, odnosno, tokom vremena se oslobađa konstantna količina salicilne kiseline, dok se iz Eudragit® S polimera salicilna kiselina oslobađa mehanizmom difuzije iz matriksa organogela. Međutim, zbog složenosti tečnih SMEDDS ispitanih u okviru ove disertacije, dobijene rezultate nije moguće porediti sa opisanom studijom iz literature (Kawata i sar., 1991). Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da kinetika oslobađanja simvastatina iz lipidnih formulacija, dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera, zavisi i od vrste upotrebljenog kosurfaktanta i od vrste polimera, ukazujući na to da su u proces oslobađanja simvastatina uključeni kombinovani mehanizmi.

Tabela 4.12. Koeficijenti determinacije (r^2) za različite matematičke modele koji opisuju kinetiku oslobađanja simvastatina iz lipidnih formulacija sa polisorbatom
80

Kinetika	F1s L100	F2s L100	F3s L100	F1s S100	F2s S100	F3s S100	F1s SL100	F2s SL100	F3s SL100
Nultog reda	0,7378	0,7010	0,7235	0,8749	0,8882	0,8784	0,9716	0,9622	0,9635
Prvog reda	0,9088	0,9541	0,9487	0,5987	0,6842	0,6317	0,5296	0,4325	0,6831
<i>Hixon-Crowell</i>	0,9486	0,9137	0,9702	0,7544	0,8201	0,7744	0,8403	0,8045	0,872
<i>Korsmeyer-Peppas</i>	0,7207	0,7558	0,8230	0,9600	0,9232	0,9607	0,824	0,9474	0,9545
<i>Higuchi</i>	0,8666	0,8363	0,8556	0,7493	0,7915	0,7693	0,9202	0,8992	0,9091

Tabela 4.13. Koeficijenti determinacije (r^2) za različite matematičke modele koji opisuju kinetiku oslobađanja simvastatina iz lipidnih formulacija sa makrogol 15
hidroksistearatom

Kinetika	T1s L100	T2s L100	T3s L100	T1s S100	T2s S100	T3s S100	T1s SL100	T2s SL100	T3s SL100
Nultog reda	0,8620	0,8293	0,8253	0,9223	0,8783	0,8618	0,9244	0,9301	0,9278
Prvog reda	0,6010	0,8487	0,8006	0,6281	0,5308	0,6372	0,6924	0,6358	0,6382
<i>Hixon-Crowell</i>	0,8531	0,9219	0,8405	0,7449	0,7414	0,7589	0,7800	0,8230	0,8056
<i>Korsmeyer-Peppas</i>	0,9441	0,9471	0,9269	0,9431	0,9213	0,8965	0,9773	0,9753	0,9807
<i>Higuchi</i>	0,9056	0,9099	0,8977	0,8182	0,7623	0,7382	0,8354	0,8492	0,8394

Tabela 4.14. Eksponent oslobađanja (n) iz *Korsmeyer-Peppas* jednačine koji se odnosi na lipidne formulacije sa polisorbitom 80 i Eudragit® S100

	F1s S100	F2s S100	F3s S100
Eksponent oslobađanja	2,2711	1,7748	2,4927

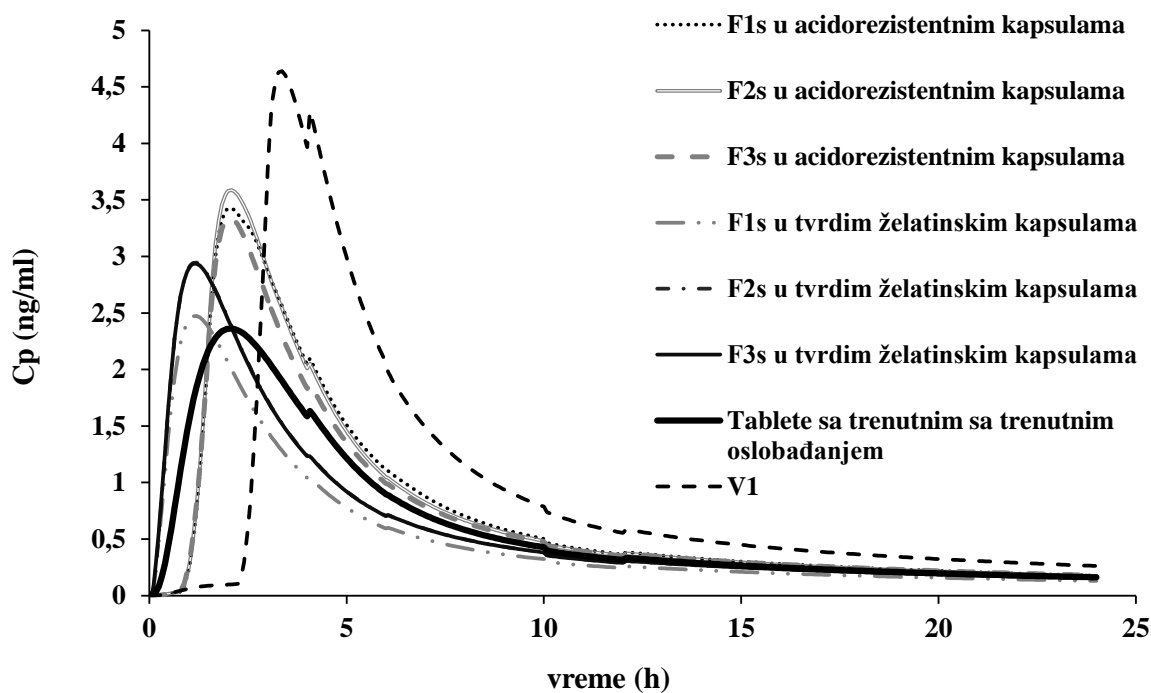
Tabela 4.15. Eksponent oslobađanja (n) iz *Korsmeyer-Peppas* jednačine koji se odnosi na lipidne formulacije sa makrogol 15 hidroksistearatom

	T1s L100	T2s L100	T3s L100	T1s S100	T2s S100	T3s S100	T1s SL100	T2s SL100	T3s SL100
Eksponent oslobađanja	1,1957	1,2066	0,9620	1,1214	1,4640	1,3409	2,0210	1,8077	1,6543

4.3.3. *In silico* simulacija apsorpcije simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem

Do sada je publikovano svega par radova koji se bave modelovanjem apsorpcije lekovite supstance iz SMEDDS (Abraham-Vieira i sar., 2020; Fei i sar., 2013). Ovo je prva studija koja se bavi *in silico* modelovanjem SMEDDS sa simvastatinom. Da bi se procenio uticaj faktora formulacije na očekivani profil koncentracije simvastatina u plazmi, *in vitro* dobijeni profili rastvaranja simvastatina iz lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem su korišćeni kao ulazni podaci za PBPK modelovanje.

Na slici 4.30 prikazani su simulirani profili apsorpcije simvastatina iz tečnih SMEDDS F1s-F3s, punjenih u acidorezistentne kapsule, zajedno sa profilima simuliranim za iste formulacije punjene u konvencionalne tvrde kapsule. Odgovarajući farmakokinetički parametri simvastatina za različite formulacije primenjene peroralnim putem prikazani su u tabeli 4.16. U poređenju sa tečnim SMEDDS punjenim u konvencionalne, tvrde želatinske kapsule, punjenje tečnih SMEDDS u tvrde acidorezistentne kapsule dovelo je do povećanja predviđene biološke raspoloživosti simvastatina oko 22% u odnosu na tablete sa trenutnim oslobađanjem (tabela 4.16).



Slika 4.30. Predviđeni profili koncentracije simvastatina u plazmi za različite formulacije tečnih SMEDDS primenjene peroralnim putem, kao i profil predviđen na osnovu virtuelne brzine rastvaranja V1

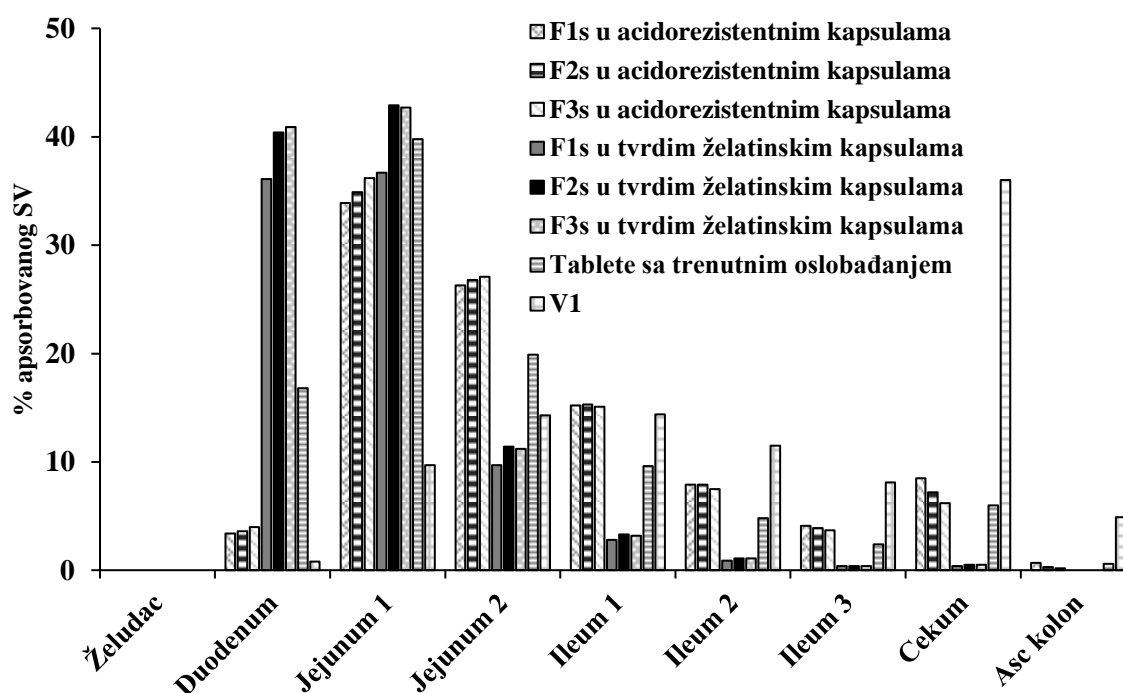
In silico rezultati su pokazali da se punjenjem tečnih SMEDDS u acidorezistentne kapsule postiže odloženo rastvaranje i apsorpcija simvastatina (slike 4.30 i 4.31), što u izvesnoj meri dovodi do smanjenja hidrolize i presistemskog metabolizma pomoću CYP3A4 enzima, pretežno zastupljenih u proksimalnim delovima tankog creva. Predviđanja zasnovana na virtuelnom profilu rastvaranja, generisanom tako da odražava situaciju kada se 100% lekovite supstance rastvara za 180 min, u distalnom jejunumu (pH 6,9) (slika 4.23, profil V1), su ukazala da dodatno odlaganje oslobađanja simvastatina može da poveća njegovu biološku raspoloživost preko 7% (tabela 4.16). Drugim rečima, dobijeni rezultati pokazuju da formulisanje preparata koji oslobađa lekovitu supstancu u solubilizovanom obliku u distalnim delovima GI trakta može poboljšati biološku raspoloživost simvastatina za više od 50% u poređenju sa konvencionalnim tabletama sa trenutnim oslobađanjem. Značajnije povećanje koncentracije simvastatina u plazmi bilo bi ograničeno obimnim presistemskim metabolizmom u jetri.

Tabela 4.16. Predviđeni farmakokinetički parametri simvastatina za različite formulacije tečnih SMEDDS primenjene peroralnim putem, kao i podaci koji se odnose na virtuelnu brzinu rastvaranja V1

	F _a (%) ^a	F _b (%) ^b	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (h)	PIK _{0-∞} (ng h/ml)
F1s u acidorezistentnim kapsulama	99,95	5,98	3,43	2,08	21,33
F2s u acidorezistentnim kapsulama	99,89	5,90	3,59	2,08	21,08
F3s u acidorezistentnim kapsulama	99,99	5,14	3,34	2,08	20,52
F1s u tvrdim želatinskim kapsulama	87,05	3,84	2,47	1,20	15,56
F2s u tvrdim želatinskim kapsulama	100,00	4,56	2,94	1,20	18,47
F3s u tvrdim želatinskim kapsulama	100,00	4,56	2,94	1,20	18,44
Tablete sa trenutnim oslobađanjem	99,97	4,66	2,36	2,08	18,62
Virtuelni profil oslobađanja simvastatina (V1)	99,81	7,20	4,64	3,36	27,95

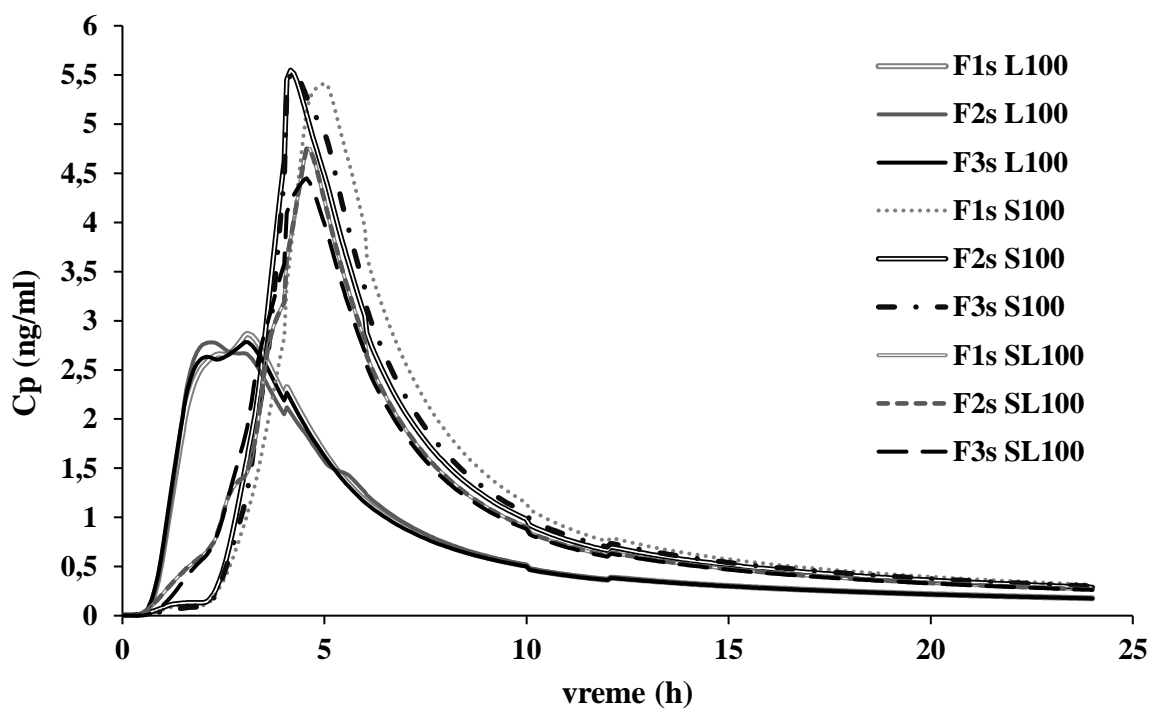
^a F_a - procenat apsorbirane lekovite supstance (u enterocitima)

^b F_b - biološka raspoloživost lekovite supstance (izražena kao procenat u odnosu na dozu od 20 mg)

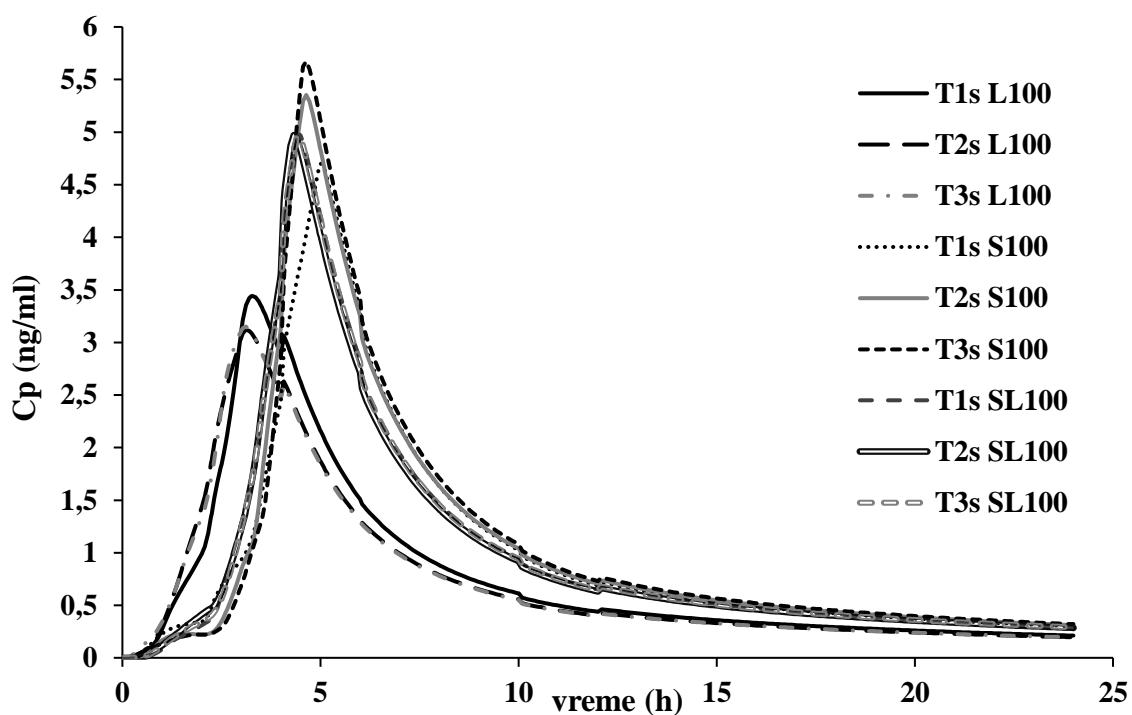


Slika 4.31. Predviđena regionalna apsorpcija simvastatina iz različitih formulacija tečnih SMEDDS primenjenih peroralnim putem, kao i podaci koji se odnose na virtuelnu brzinu rastvaranja V1

Na slikama 4.32 i 4.33 prikazani su generisani profili koncentracije lekovite supstance u plazmi koji se odnose na peroralnu primenu simvastatina u obliku različitih lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem, dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS i Eudragit® polimera. Predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara navedene su u tabeli 4.17. Rezultati simulacija su pokazali da očekivana brzina i obim apsorpcije simvastatina iz ispitivanih uzoraka značajno zavise od profila oslobađanja/brzine rastvaranja ove supstance. Naime, pokazano je da uočene razlike u brzini rastvaranja simvastatina, na koje utiče vrsta polimera, kao i da li se radi o pojedinačnim ili kombinaciji polimera, mogu prouzrokovati varijacije u profilu apsorpcije ove lekovite supstance.



Slika 4.32. Profili koncentracije simvastatina u plazmi u funkciji vremena za lipidne formulacije sa polisorbatom 80



Slika 4.33. Profili koncentracije simvastatina u plazmi u funkciji vremena za lipidne formulacije sa makrogol 15 hidroksistearatom

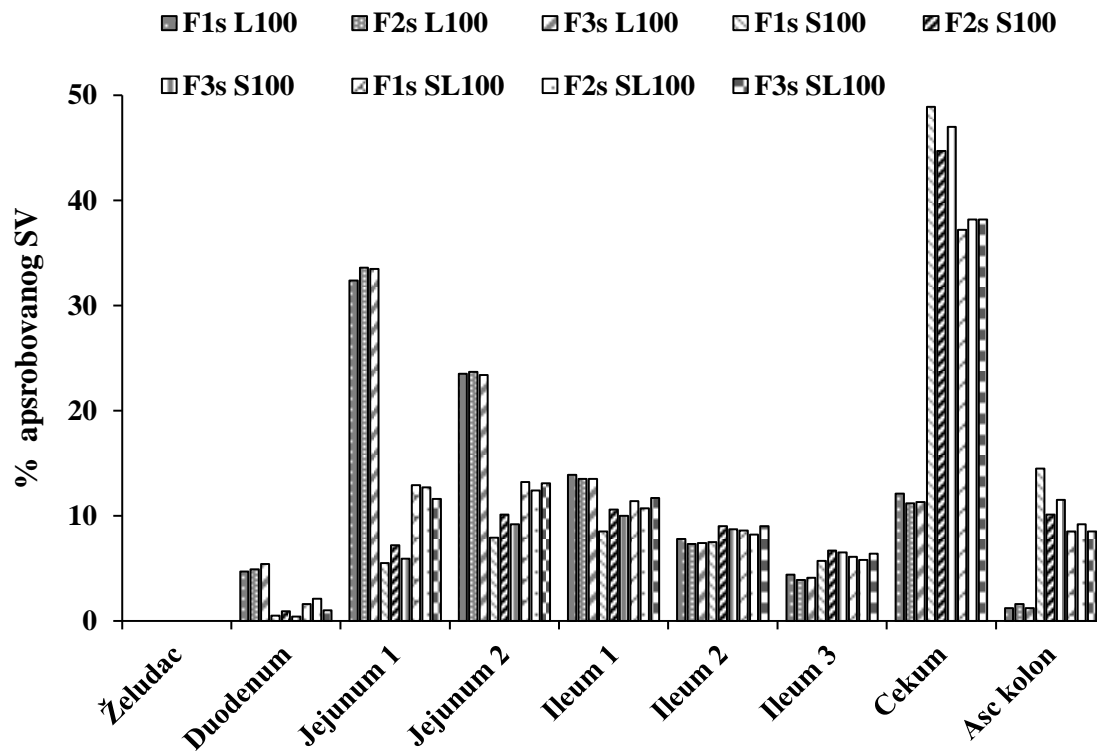
Tabela 4.17. Predviđeni farmakokinetički parametri za lipidne formulacije sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina

	F _a (%) ^a	F _b (%) ^b	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (h)	PIK _{0-∞} (ng h/ml)
F1s L100	99,95	5,94	2,33	4,07	21,10
F2s L100	99,88	5,95	2,78	2,16	21,15
F3s L100	99,95	5,90	2,78	3,09	20,96
F1s S100	98,86	9,87	5,42	5,00	33,50
F2s S100	99,37	9,21	5,55	4,16	31,43
F3s S100	99,23	9,55	5,54	4,24	32,49
F1s SL100	99,45	8,35	4,55	4,56	28,63
F2s SL100	99,38	8,51	4,75	4,56	29,15
F3s SL100	99,45	8,43	4,45	4,56	28,92
T1s L100	99,90	5,91	3,44	3,28	23,19
T2s L100	99,93	5,53	3,12	3,12	21,78
T3s L100	99,94	5,48	3,15	3,09	21,62
T1s S100	99,01	8,02	4,70	5,00	30,57
T2s S100	99,15	8,37	5,35	4,64	31,80
T3s S100	99,06	8,58	5,67	4,64	32,54
T1s SL100	99,36	7,92	4,98	4,48	30,24
T2s SL100	99,42	7,78	4,97	4,32	29,71
T3s SL100	99,37	7,88	4,95	4,40	30,08
Tablete sa trenutnim oslobađanjem	99,97	4,66	2,36	2,08	18,62

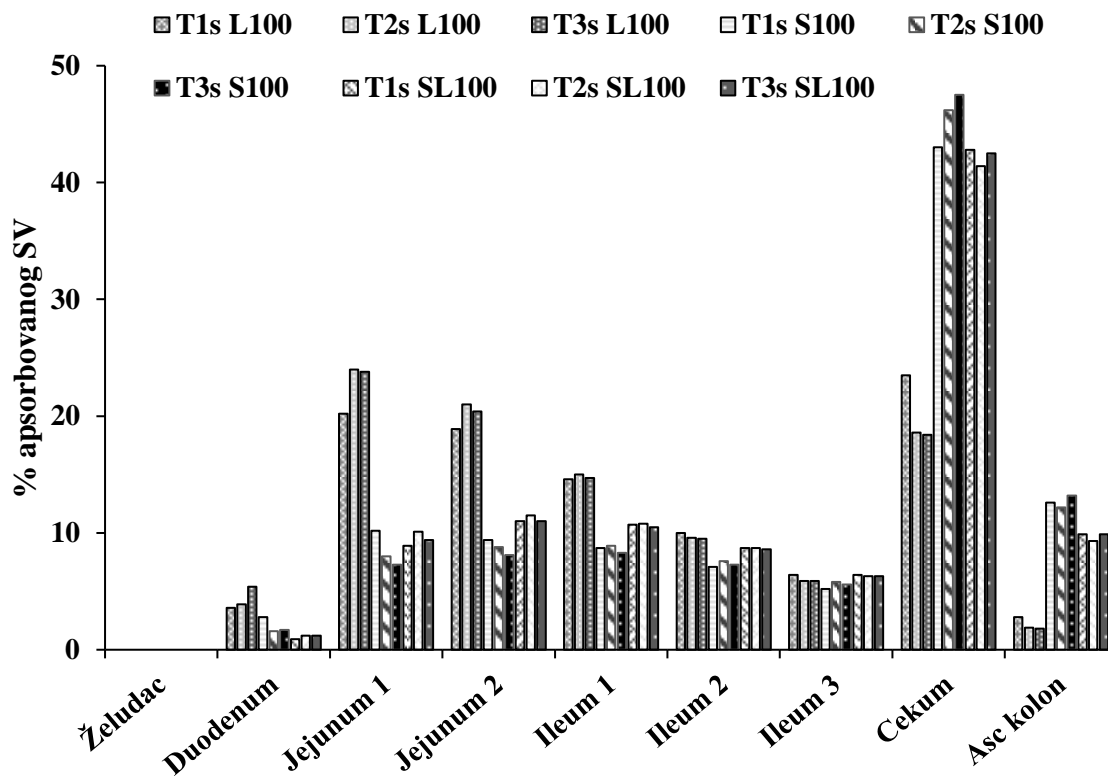
^a Fa - procenat apsorbovane lekovite supstance (u enterocitima)

^b Fb - biološka raspoloživost lekovite supstance (izražena kao procenat u odnosu na dozu od 20 mg)

Postepeno oslobađanje simvastatina tokom 180 min iz lipidnih formulacija koje sadrže polimer Eudragit® L100 dovelo je do povećanja biološke raspoloživosti simvastatina za oko 24% u poređenju sa biološkom raspoloživošću supstance iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. Upotrebom Eudragit® S100 polimera ili kombinacije polimera Eudragit® S100/Eudragit® L100 (u odnosu 1:1) postignut je još veći porast biološke raspoloživosti simvastatina (do 8,5% za formulacije sa Eudragit® S100/Eudragit® L100, odnosno, do 9,9% za formulacije sa Eudragit® S100), što predstavlja više od 80% povećanja (za formulacije sa Eudragit® S100/Eudragit® L100), odnosno, više od 100% povećanja (za formulacije sa Eudragit® S100) u odnosu na biološku raspoloživost iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. Ovakvi rezultati se mogu objasniti predviđenom apsorpcijom simvastatina po regionima GI trakta (slike 4.34 i 4.35). Naime, očigledno je da odloženo/usporeno oslobađanje simvastatina iz navedenih formulacija dovodi do povećanja apsorpcije simvastatina iz distalnih delova GI trakta, što rezultuje povećanom ukupnom biološkom raspoloživošću.



Slika 4.34. Predviđena regionalna apsorpcija simvastatina iz lipidnih formulacija sa polisorbitom 80 kao kosurfaktantom



Slika 4.35. Predviđena regionalna apsorpcija simvastatina iz lipidnih formulacija sa makrogol 15 hidroksistearatom kao kosurfaktantom

S obzirom da je pokazano da se primenom lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem koje su izrađene od Eudragit® S100 polimera ili kombinacije polimera Eudragit® S100/Eudragit® L100 (u odnosu 1:1) može postići najveće povećanje biološke raspoloživosti simvastatina, samo ove formulacije su izabrane za dalju fizičko-hemijsku karakterizaciju.

4.3.4. Fizičko-hemijska karakterizacija lipidnih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem simvastatina

4.3.4.1. Reološka karakterizacija

Kako je ranije navedeno, mešanjem odabranih tečnih SMEDDS (66,6%) sa Eudragit® polimerima (33,3%) nastaju čvrsti, rastegljivi, transparentni sistemi. Za reološku karakterizaciju su izabrani uzorci izrađeni sa polimerom Eudragit® S100 i kombinacijom (1:1) polimera Eudragit® S100/Eudragit® L100, koji su pokazali odgovarajuće modifikovano oslobađanje simvastatina. Da bi se procenio uticaj simvastatina na reološke karakteristike, merenja su sprovedena i u uzorcima bez simvastatina.

Reološka merenja ovih sistema, sprovedena 48 h nakon izrade, su pokazala da uzorci imaju viskoelastična svojstva, jer je u svim slučajevima elastični modul veći od viskoznog ($G' > G''$), a $\tan \delta < 1$. Ovakvo ponašanje su pokazali uzorci izrađeni sa oba kosurfaktanta, polisorbatom 80 i makrogol 15 hidrosistearatom (slike 4.36-4.43; tabele 4.18 i 4.19). Takođe je primećeno da, nezavisno od upotrebljenog kosurfaktanta, sa povećanjem udela surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida $\tan \delta$ opada, odnosno raste elastičnost sistema (tabele 4.18 i 4.19). Najviše izražena elastična svojstva su imali uzorci sa najvećim udelom surfaktanta (67,5% u SMEDDS), verovatno kao posledica formiranja rigidnije gelske mreže.

Kod uzoraka sa polisorbatom 80 kao kosurfaktantom, sistemi izrađeni sa polimerom Eudragit® S100 bili su elastičniji ($\tan \delta$ je bio 0,51-0,62), u poređenju sa sistemima izrađenim sa kombinacijom polimera Eudragit® S100/Eudragit® L100 ($\tan \delta$ je bio 0,72-0,79) (tabela 4.18). Dodatak simvastatina (5%, m/m u SMEDDS, odnosno 3,33%, m/m u lipidnim formulacijama sa modifikovanim oslobađanjem) je doveo do određenog smanjenja elastičnih svojstava sistema izrađenih sa polisorbatom 80, a ovo smanjenje je bilo više izraženo kada je korišćena kombinacija polimera Eudragit® S100/Eudragit® L100 (tabela 4.18). I drugi autori su pokazali da dodatak lekovite supstance može uticati na elastičnost sličnih uzoraka. Naime, Hare i saradnici (1998) su utvrdili da inkorporiranje ibuprofena (20 i 50 mg/cm²) u transdermalne filmove izrađene sa Eudragit® E 100 polimerom dovodi takođe do smanjenja elastičnosti navedenih filmova. Može se pretpostaviti da u ovom slučaju postoje privlačne sile između polioksietilenskih lanaca polisorbata 80 i hidrofilnog dela molekula simvastatina, što utiče na slabljenje gelske mreže, koju formiraju Eudragit® polimeri sa kaprilokaproil makrogol-8 gliceridima. Dodatno, Goto i saradnici (1991) su pokazali da struktura gelske mreže organogelova zavisi i od kiselih, odnosno baznih osobina inkorporirane lekovite supstance. Ovi autori su formulisali organogelove za rektalnu primenu sa produženim oslobađanjem lekovite supstance. Korišćene su lekovite supstance različitih osobina (salicilna kiselina, natrijum-salicilat, prokain i ketoprofen), u različitim koncentracija (od 1,23% do 11,1%, m/m), koje su pojedinačno rastvorene u propilenglikolu, a dobijeni rastvori mešani sa Eudragit® S i L polimerima. Koncentracija Eudragit® L polimera u finalnim formulacijama organogelova bila je 30%, a Eudragit® S 40%. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da dodatak prokaina ($pK_a = 8,85$) više utiče na intermolekulske vodonične veze između Eudragit® polimera i propilenglikola što posledično dovodi do smanjenja rigidnosti gelske mreže, u poređenju sa lekovitim supstancama kiselih osobina, kao što su ketoprofen ($pK_a = 3,90$) i salicilna kiselina ($pK_a = 2,97$). Autori (Goto i sar., 1991) takođe navode da sadržaj lekovite supstance u organogelu treba da bude mali, do 1,23%, da bi njen uticaj bio zanemarljiv. S obzirom da ispitivani uzorci sadrže 3,33% simvastatina, čija je

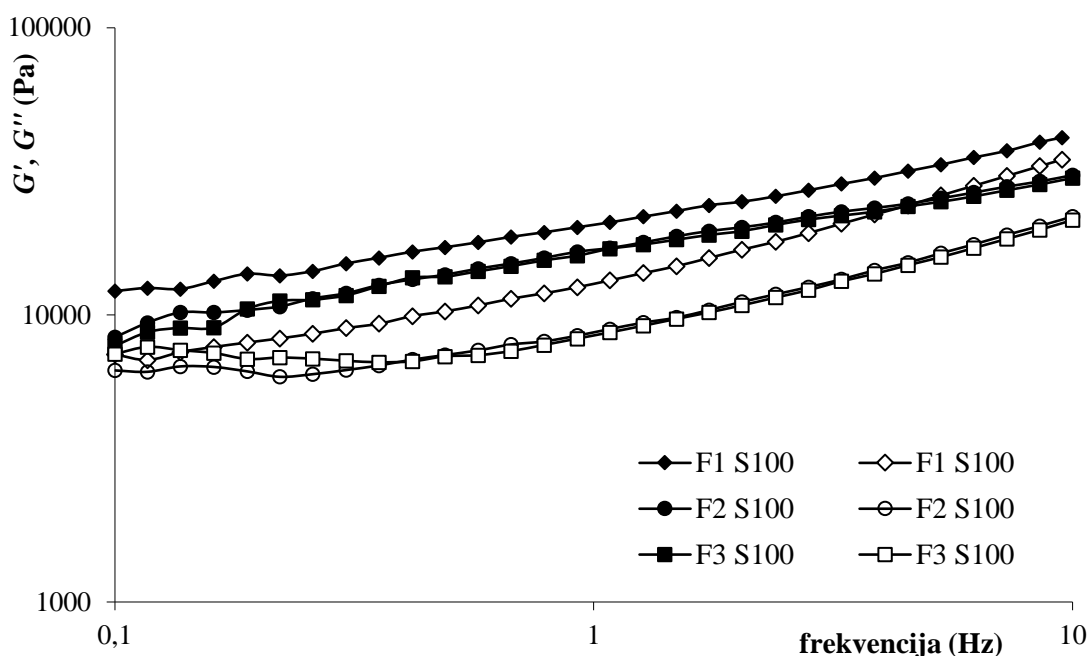
pKa vrednost 13,49, svakako se uticaj navedene lekovite supstance na reološke osobine uzorka ne može zanemariti.

Od svih izrađenih čvrstih, rastegljivih sistema sa polisorbatom 80, najmanju elastičnost je ispoljio uzorak izrađen sa simvastatinom, najnižom koncentracijom surfaktanta u SMEDDS (45%) i kombinacijom polimera Eudragit® S100/Eudragit® L100 (uzorak F1s SL100). U ovom slučaju, $\tan \delta$ je bio veoma blizak jedinici, odnosno 0,96 (tabela 4.18).

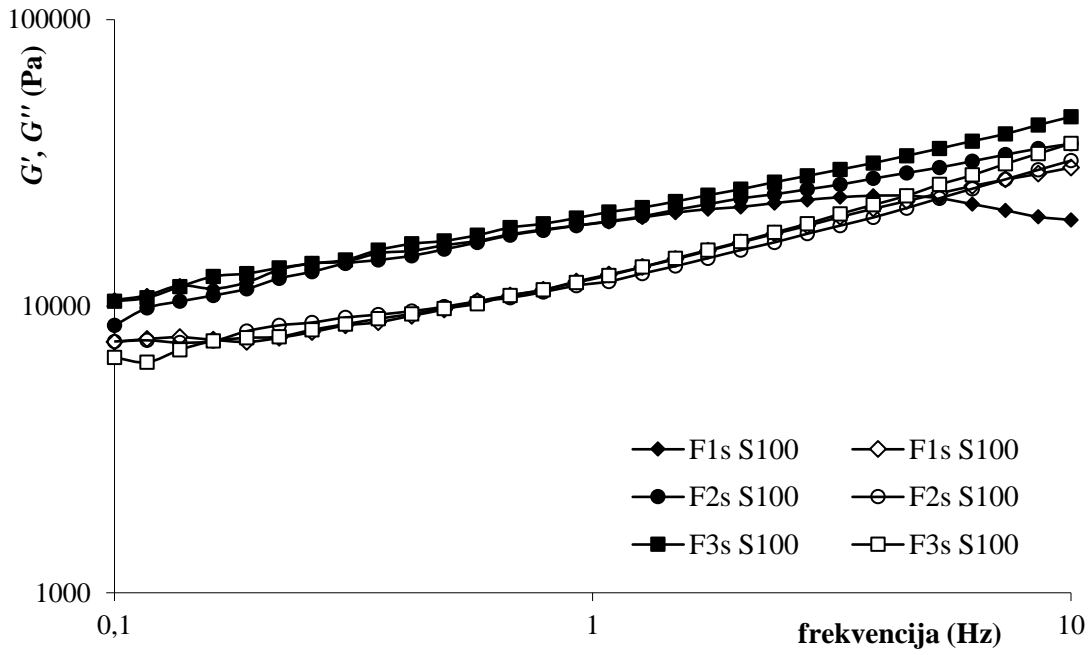
Tabela 4.18. Elastični modul (G'), viskozni modul (G'') i tangens faznog ugla ($\tan \delta$) ispitivanih uzoraka sa polisorbatom 80 (na frekvenciji od 1 Hz)

	G' (Pa)	G'' (Pa)	$\tan \delta$
F1 S100	20633 ± 1594,8	12800 ± 300,0	0,62 ± 0,038
F2 S100	16867 ± 251,7	8690 ± 138,6	0,51 ± 0,006
F3 S100	16500 ± 529,2	8467 ± 308,6	0,51 ± 0,006
F1s S100	19367 ± 251,7	12533 ± 971,3	0,65 ± 0,037
F2s S100	19433 ± 929,2	11967 ± 1124,0	0,62 ± 0,047
F3s S100	20733 ± 1285,8	12433 ± 950,4	0,60 ± 0,065
F1 SL100	38200 ± 3996,2	30167 ± 3742,1	0,79 ± 0,017
F2 SL100	34067 ± 1939,9	26067 ± 2003,3	0,76 ± 0,030
F3 SL100	29167 ± 1301,3	21100 ± 435,9	0,72 ± 0,039
F1s SL100	15633 ± 950,4	14967 ± 802,1	0,96 ± 0,055
F2s SL100	28133 ± 1847,5	25633 ± 1665,3	0,91 ± 0,044
F3s SL100	30467 ± 850,5	26400 ± 1473,1	0,86 ± 0,026

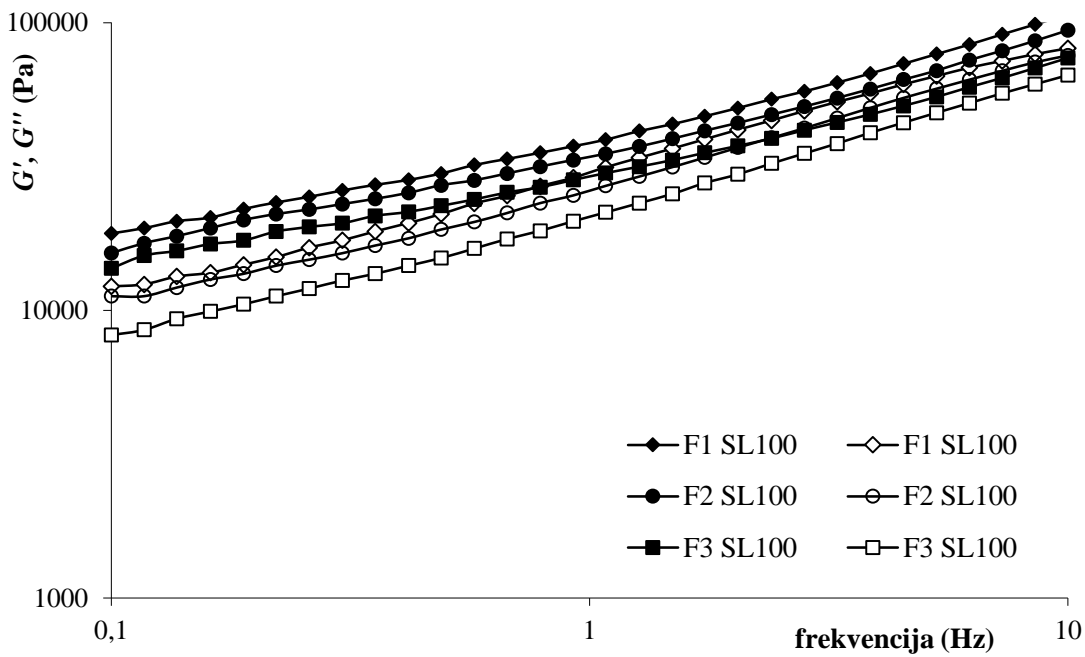
srednja vrednost ± SD



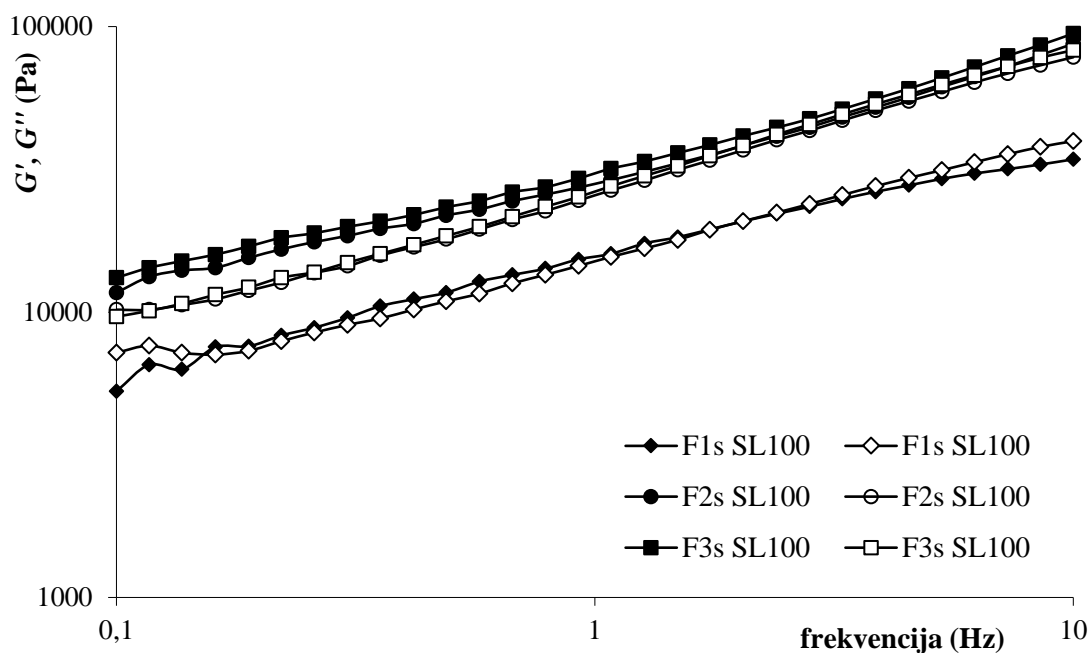
Slika 4.36. Promene elastičnog (puni simboli) i viskoznog modula (prazni simboli) u zavisnosti od frekvencije, uzoraka F1 S100-F3 S100



Slika 4.37. Promene elastičnog (puni simboli) i viskoznog modula (prazni simboli) u zavisnosti od frekvencije, uzoraka F1s S100-F3s S100



Slika 4.38. Promene elastičnog (puni simboli) i viskoznog modula (prazni simboli) u zavisnosti od frekvencije, uzoraka F1 SL100-F3 SL100



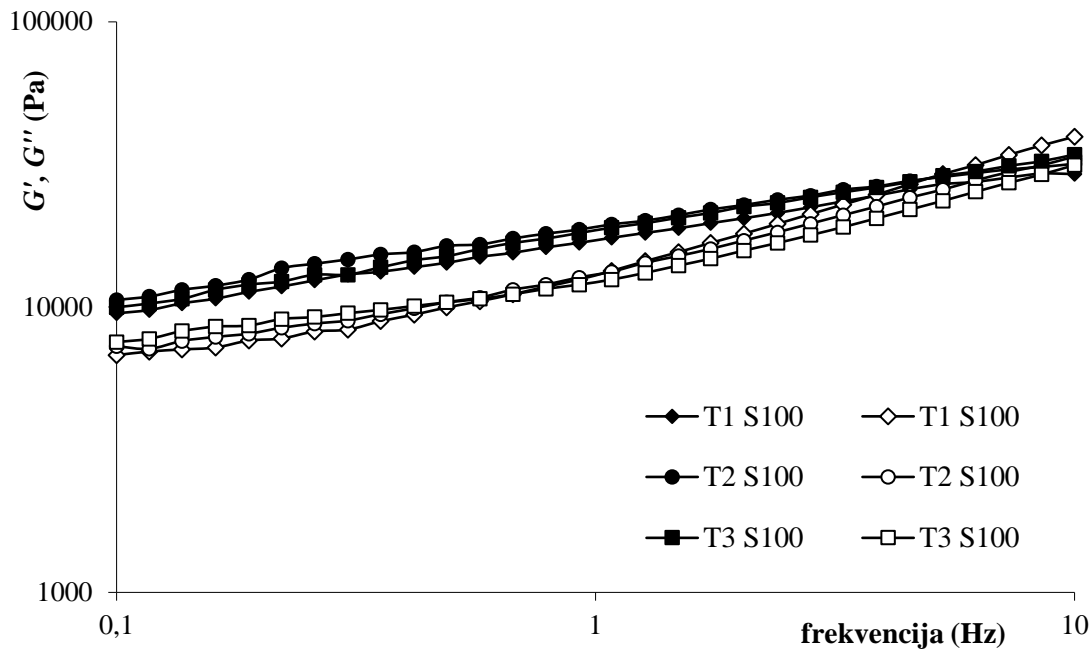
Slika 4.39. Promene elastičnog (puni simboli) i viskoznog modula (prazni simboli) u zavisnosti od frekvencije, uzoraka F1s SL100-F3s SL100

Sistemi izrađeni sa makrogol 15 hidroksistearatom kao kosurfaktantom i polimerom Eudragit® S100 imali su vrednosti $\tan \delta$ od 0,66 do 0,78, a uzorci sa kombinacijom polimera Eudragit® S100/Eudragit® L100 imali su vrednost $\tan \delta$ od 0,61 do 0,66 (tabela 4.19). Dodatak simvastatina i u ovom slučaju doveo je do određenog smanjenja elastičnih svojstava uzoraka izrađenih sa makrogol 15 hidroksistearatom, a ovo smanjenje je takođe bilo više izraženo kada je korišćena kombinacija polimera Eudragit® S100/Eudragit® L100 (tabela 4.19). Uticaj dodatka simvastatina se može objasniti na ranije opisan način (kod uzoraka sa polisorbatom 80), jer je makrogol 15 hidroksistearat PAM, koja takođe sadrži polioksietilenske lance u molekulu. I u slučaju čvrstih, rastegljivih sistema sa makrogol 15 hidroksistearatom, najmanju elastičnost je ispoljio uzorak izrađen sa simvastatinom, najnižom koncentracijom surfaktanta u SMEDDS (45%) i kombinacijom polimera Eudragit® S100/Eudragit® L100 (uzorak T1s SL100), čiji je $\tan \delta$ bio 0,85 (tabela 4.19.).

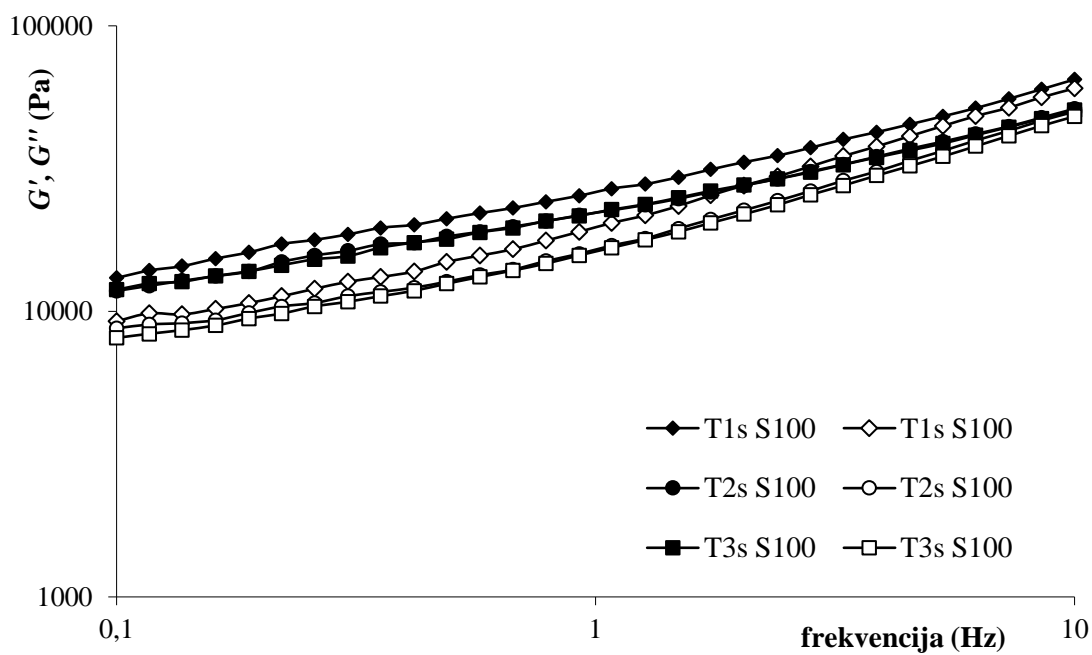
Tabela 4.19. Elastični modul (G'), viskozni modul (G'') i tangens faznog ugla ($\tan \delta$) ispitivanih uzoraka sa makrogol 15 hidroksistearatom (na frekvenciji od 1 Hz)

	G' (Pa)	G'' (Pa)	$\tan \delta$
T1 S100	17170 ± 1078,6	13000 ± 1124,0	0,76 ± 0,030
T2 S100	19070 ± 1011,6	13000 ± 1053,6	0,68 ± 0,065
T3 S100	18600 ± 700,0	12230 ± 763,8	0,66 ± 0,018
T1s S100	23830 ± 1159,5	18670 ± 795,4	0,78 ± 0,017
T2s S100	22130 ± 577,3	16400 ± 755,0	0,74 ± 0,018
T3s S100	22170 ± 1450,3	16200 ± 800,0	0,73 ± 0,012
T1 SL100	15970 ± 550,7	10630 ± 305,5	0,66 ± 0,002
T2 SL100	18100 ± 360,5	10900 ± 556,8	0,60 ± 0,018
T3 SL100	22030 ± 602,7	13430 ± 208,2	0,61 ± 0,007
T1s SL100	21600 ± 1249,0	18330 ± 1069,3	0,85 ± 0,053
T2s SL100	25270 ± 2060,0	18700 ± 2051,8	0,74 ± 0,043
T3s SL100	22700 ± 1833,0	17470 ± 1887,7	0,77 ± 0,037

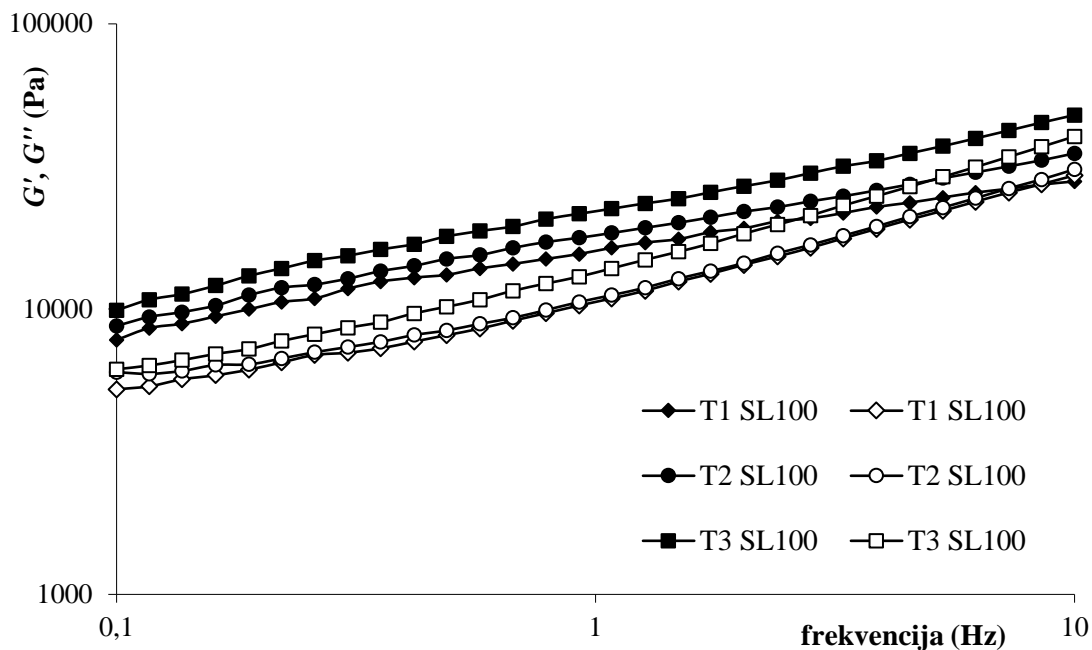
srednja vrednost ± SD



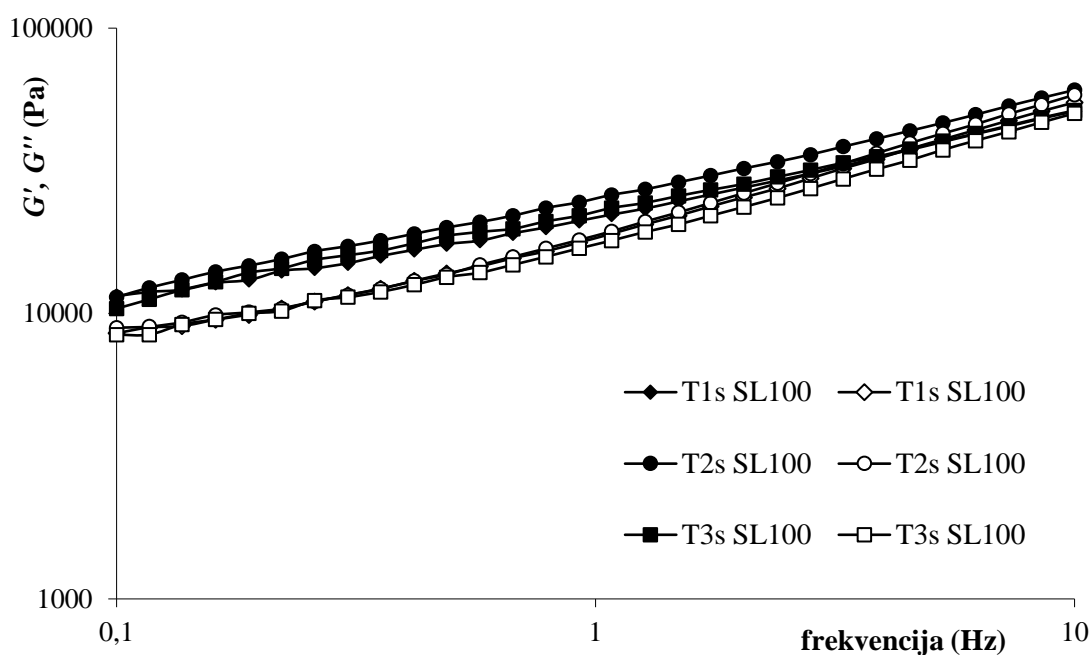
Slika 4.40. Promene elastičnog (puni simboli) i viskoznog modula (prazni simboli) u zavisnosti od frekvencije, uzoraka T1 S100-T3 S100



Slika 4.41. Promene elastičnog (puni simboli) i viskoznog modula (prazni simboli) u zavisnosti od frekvencije, uzoraka T1s S100-T3s S100



Slika 4.42. Promene elastičnog (puni simboli) i viskoznog modula (prazni simboli) u zavisnosti od frekvencije, uzoraka T1 SL100-T3 SL100

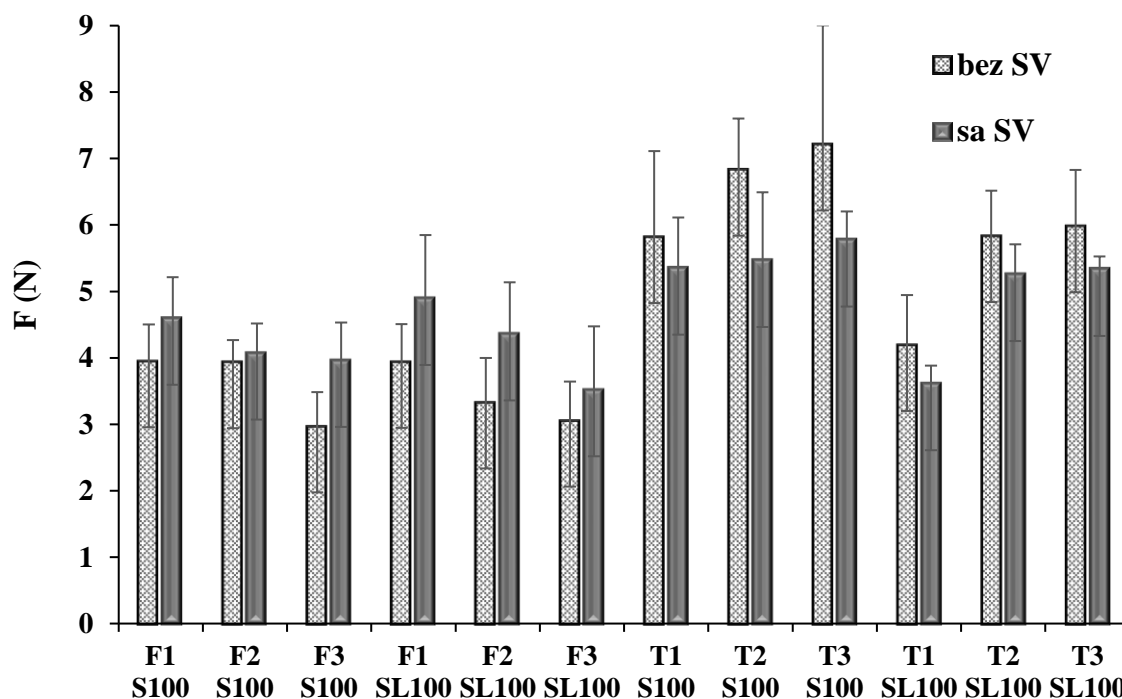


Slika 4.43. Promene elastičnog (puni simboli) i viskoznog modula (prazni simboli) u zavisnosti od frekvencije, uzoraka T1s SL100-T3s SL100

Oscilatorna reološka merenja su pokazala da svi čvrsti rastegljivi sistemi, nastali mešanjem tečnih SMEDDS sa Eudragit® polimerima imaju viskoelastična svojstva i slično ponašanje kao određeni organogelovi izrađeni sa Eudragit® polimerima, ali se ovim ispitivanjima ne može steći detaljniji uvid u njihovu strukturu.

4.3.4.2. Ispitivanje tvrdoće

Tvrdoća je fizičko svojstvo materijala, a predstavlja otpor kojim se suprotstavlja jedno telo ka prodiranju drugog tela u njegovu površinu. Ispitivanjem čvrstih lipidnih formulacija na uređaju Texture Analyzer EZ-LX, merile su se vrednosti sile otpora uzorka prema deformaciji, tj. utiskivanju cilindra. Kada na ispitivane uzorke deluje spoljašnja sila pod pravim uglom, dolazi do sabijanja, pri kojem se u poprečnim preseccima opterećenog dela uzorka javljaju samo aksijalne unutrašnje sile, odnosno unutrašnje sile su u pravcu uzdužne ose (Boresi i Schmidt, 2002). Uzorci se deformišu pod dejstvom sile opterećenja F . Vrednosti sile utiskivanja za sve ispitivane uzorke prikazane su histogramom (slika 4.44).



Slika 4.44. Uporedne vrednosti sile otpora ispitivanih uzoraka

Dobijeni rezultati su pokazali da u slučaju čvrstih lipidnih formulacija bez simvastatina koje sadrže polisorbitat 80 (F1 S100-F3 S100 i F1 SL100-F3 SL100), vrsta upotrebljenog Eudragit® polimera nema velikog uticaja na tvrdoću uzoraka. Vrednosti sile otpora F su bile u opsegu 2,98-3,96 N, za uzorke sa Eudragit® S100, odnosno 3,06- 3,95 N, za uzorke sa kombinacijom Eudragit® S100/L100 polimera. Sa porastom udela surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida (45%, 60% i 67,5% u SMEDDS; tabela 4.4) je došlo do određenog smanjenja vrednosti sile utiskivanja u uzorak, odnosno uzorci su pružali manji otpor pri primeni sile (mekši su). Na osnovu ovih rezultata se vidi da povećanje koncentracije surfaktanta dovodi do omekšavanja uzoraka, verovatno kao posledica manje rigidnosti gelske mreže. Odgovarajući uzorci sa simvastatinom (F1s S100-F3s S100 i F1s SL100-F3s SL100) su tvrdi, ali i kod njih sa porastom udela kaprilokaproil makrogol-8 glicerida dolazi do smanjenja vrednosti sile utiskivanja (slika 4.44).

Sa druge strane, kod čvrstih lipidnih formulacija bez simvastatina koje sadrže makrogol 15 hidoksistearat (T1 S100-T3 S100 i T1 SL100-T3 SL100), uticaj polimera na tvrdoću je nešto više izražen. U ovom slučaju, vrednosti sile otpora F su bile u opsegu 5,83-7,22 N, za uzorke sa Eudragit® S100, odnosno 4,20-5,99 N, za uzorke sa kombinacijom Eudragit® S100/Eudragit® L100 polimera. Sa porastom udela kaprilokaproil makrogol-8 glicerida je došlo do povećanja vrednosti sile utiskivanja, odnosno nastali uzorci su tvrdi. U ovom slučaju, dodatak simvastatina uzorcima

(T1s S100-T3s S100 i T1s SL100-T3s SL100), je doveo do njihovog omekšavanja, a trend povećanja tvrdoće ovih uzoraka, sa porastom koncentracije surfaktanta je ostao nepromenjen.

Na osnovu dobijenih rezultata se može pretpostaviti da na formiranje gelske mreže uzoraka ulogu ima i kosurfaktant, jer su uzorci sa polisorbatom 80 mekši, u poređenju sa odgovarajućim uzorcima sa makrogol 15 hidroksistearatom, koji su tvrdi. Ovi podaci ukazuju na različite interakcije komponenata u uzorcima, usled razlika u molekulskoj strukturi i polarnosti korišćenih kosurfaktanata. Može se pretpostaviti da makrogol 15 hidroksistearat, koji ima više hidroksilnih grupa i veću mogućnost formiranja vodoničnih veza, omogućava nastanak rigidnije strukture i dobijanje sistema veće tvrdoće. Slično su pokazali Gravelle i saradnici (2013) u istraživanjima oleogelova sa etilcelulozom. Autori su konstatovali da uzorci sa ricinusovim uljem (sadrži hidroksilne grupe) imaju veću tvrdoću u odnosu na uzorke sa mineralnim uljem (Gravelle i sar., 2013).

I dodatak simvastatina ima različit uticaj na ispitivane uzorke, jer u slučaju formulacija sa polisorbatom 80 dolazi do povećanja tvrdoće, dok u slučaju drugog kosurfaktanta dolazi do smanjenja tvrdoće kada se doda simvastatin, što takođe ukazuje na različite interakcije u sistemima.

Poređenjem dobijenih vrednosti za $\tan \delta$ (u oscilatornim reološkim merenjema) sa vrednostima sile otpora, može se zapaziti određena pravilnost u slučaju uzoraka sa polisorbatom 80, jer povećanje koncentracije surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida dovodi do povećanja elastičnosti i smanjenja njihove tvrdoće. Dodatak simvastatina dovodi do određenog smanjenja i elastičnosti i tvrdoće ovih uzoraka. S druge strane, za uzorke sa makrogol 15 hidroksistearatom, poređenjem dobijenih vrednosti za $\tan \delta$ sa vrednostima sile otpora, može se zapaziti određena pravilnost u slučaju uzoraka izrađenih sa Eudragit[®] S100 polimerom (sa lekovitom supstancom i bez nje), kao i kod uzoraka bez simvastatina, izrađenih sa kombinacijom Eudragit[®] polimera, kod kojih povećanje koncentracije surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida dovodi do povećanja i elastičnosti i tvrdoće. Neznatno odstupanje od ove pravilnosti u pogledu elastičnosti su pokazali uzorci T2s SL100 i T3s SL100 (tabela 4.19).

Bez obzira što koncentracija surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida (45%, 60% i 67,5% u SMEDDS), vrsta kosurfaktanta (polisorb 80 ili makrogol 15 hidroksistearat) i vrsta polimera (Eudragit[®] S100 ili kombinacija Eudragit[®] S100/Eudragit[®] L100) imaju određenog uticaja na elastičnost i tvrdoću uzoraka, važno je istaći da ove razlike nisu uticale na modifikovano oslobađanje simvastatina.

4.3.4.3. Ispitivanje stabilnosti

Procena stabilnosti lipidnih formulacija nastalih mešanjem tečnih SMEDDS i Eudragit[®] polimera punjenih u tvrde želatinske kapsule, sprovedena je vizuelnim posmatranjem izgleda kapsula (izgled, boja, tekstura), kao i određivanjem sadržaja simvastatina, u sveže pripremljenim uzorcima i u uzorcima nakon šest meseci čuvanja na sobnoj (22 ± 2 °C) i povišenoj (45 ± 2 °C) temperaturi.

Prosečna vrednost sadržaja simvastatina (računata u odnosu na teorijsku vrednost od 20 mg), u sveže pripremljenim uzorcima lipidnih formulacija sa polisorbatom 80 je bila između 99,53% i 100,26%, dok je kod uzoraka sa makrogol 15 hidroksistearatom prosečna vrednost sadržaja simvastatina bila u opsegu 99,42-100,65% (tabela 4.20). Dobijene vrednosti pokazuju da tokom mešanja tečnih SMEDDS sa izabranim Eudragit[®] polimerima ne dolazi do degradacije supstance.

Nakon šest meseci čuvanja uzoraka na sobnoj i povišenoj temperaturi nisu primećene promene u spoljašnjem izgledu, boji i teksturi kapsula.

Rezultati određivanja sadržaja nakon navedenog perioda su ukazali na neznatno smanjenja sadržaja simvastatina u uzorcima. Naime, sadržaj simvastatina u uzorcima čuvanim na sobnoj temperaturi je bio u opsegu 98,15-99,75%, u formulacijama sa polisorbatom 80, odnosno 98,56-99,89%, u formulacijama sa makrogol 15 hidroksistearatom (tabela 4.20). Čuvanje uzoraka na temperaturi od 45 °C, u toku šest meseci, je dovelo do nešto izraženijeg pada sadržaja simvastatina. Sadržaj simvastatina u uzorcima lipidnih formulacija sa polisorbatom 80 je bio između 96,05% i 97,15%, dok kod uzoraka sa makrogol 15 hidroksistearatom ova vrednost bila u opsegu 96,64-97,23%. Iako je smanjenje sadržaja simvastatina u uzorcima čuvanim šest meseci na povišenoj temperaturi izraženije, vrednosti se nalaze u granicama od 5% (EMA, 2003). Dobijeni rezultati se mogu objasniti stabilnošću simvastatina pod uslovima sprovedenog ispitivanja (simvastatin je stabilan na temperaturama do 170 °C (Souza i sar., 2007)). Takođe, stabilnost kopolimera metakrilne kiseline, Eudragit® S100 i L100 na temperaturama do 170 °C (Parikh i sar., 2014) obezbeđuje adekvatnu stabilnost izrađenih sistema sa simvastatinom.

Tabela 4.20. Sadržaj simvastatina (%) u lipidnim formulacijama sa modifikovanim oslobađanjem

	Nakon izrade	Nakon 6 meseci na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C)	Nakon 6 meseci na povišenoj temperaturi (45 ± 2 °C)
F1s S100	99,53 ± 0,32	98,15 ± 0,42	96,05 ± 0,14
F2s S100	99,87 ± 0,41	99,47 ± 0,13	96,72 ± 0,27
F3s S100	100,17 ± 0,25	99,75 ± 0,32	97,15 ± 0,16
F1s SL100	99,81 ± 0,21	99,25 ± 0,31	96,42 ± 0,35
F2s SL100	99,97 ± 0,35	99,68 ± 0,17	96,23 ± 0,44
F3s SL100	100,26 ± 0,17	99,72 ± 0,25	96,72 ± 0,29
T1s S100	100,05 ± 0,42	99,89 ± 0,22	97,23 ± 0,43
T2s S100	99,64 ± 0,26	99,33 ± 0,41	97,17 ± 0,38
T3s S100	99,42 ± 0,41	98,56 ± 0,38	96,85 ± 0,26
T1s SL100	100,51 ± 0,35	99,42 ± 0,12	96,64 ± 0,18
T2s SL100	100,03 ± 0,23	99,63 ± 0,21	97,05 ± 0,22
T3s SL100	100,65 ± 0,27	99,73 ± 0,23	96,95 ± 0,34

srednja vrednost ± SD

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove disertacije sprovedena su istraživanja sa ciljem razvoja lipidnih formulacija nove generacije za peroralnu primenu simvastatina, kao i njihova fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija. Na osnovu rezultata sprovedenih istraživanja doneto je više zaključaka, iznetih prema postavljenim ciljevima istraživanja.

5.1. Zaključak prve faze eksperimentalnog rada

Optimalan izbor vrste i udela ekscipijenasa (ulja: oleoil makrogol-6 gliceridi, propilenglikol monokaprilat, propilenglikol monolaurat; surfaktant: kaprilokaproil makrogol-8 gliceridi; kosurfaktanti: polisorbit 80 ili makrogol 15 hidrosistearat) za formulaciju SMEDDS je izvršen na osnovu analize mikroemulziona oblasti na pseudoternarnim faznim dijagramima. Dobijeni podaci za rastvorljivost simvastatina u izabranim ekscipijensima (u opsegu 43,14 mg/ml do 115,18 mg/ml) su pokazali su da oni imaju visok kapacitet za rastvaranje lekovite supstance.

Na veličinu mikroemulziona oblasti su uticali vrsta ulja i kosurfaktanta (Cs), udeo surfaktanta (S) u S/Cs smeši, kao i prisustvo simvastatina. Sistemi sa uljem propilenglikol monolaurat, koji ima najmanju sposobnost solubilizacije (HLB = 3) su imali manju mikroemulzionu oblast, u poređenju sa propilenglikol monokaprilatom (HLB = 6) i oleoil makrogol-6 gliceridima (HLB = 9). Sa povećanjem udela surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida u S/Cs smeši, mikroemulziona oblast se smanjuje, s obzirom na njegovu manju sposobnost solubilizacije (HLB = 12), u poređenju sa kosurfaktantima (HLB = 15 za oba kosurfaktanta). Polisorbit 80, sa većom hidrofilnom glavom i dužim hidrofobnim lancem, kao i nižom CMC u poređenju sa makrogol 15 hidrosistearatom je omogućio formiranje sistema sa većom mikroemulzionom oblašću. Generalno, inkorporiranje simvastatina u uzorke dovodi do smanjenja mikroemulziona oblasti.

Uzorci tečnih SMEDDS, u kojima je odnos ulje:S/CS smeša bio 1:9, a koji sadrže:

- oleoil makrogol-6 gliceride kao uljanu fazu, polisorbit 80 ili makrogol 15 hidrosistearat kao kosurfaktant, pri S/Cs odnosu 1:1, 2:1 i 3:1, za oba kosurfaktanta i
- propilenglikol monokaprilat kao uljanu fazu, polisorbit 80 kao kosurfaktant, pri S/Cs odnosu 2:1 i 3:1, odnosno makrogol 15 hidrosistearat kao kosurfaktant, pri S/Cs odnosu 1:1, 2:1 i 3:1

su tokom titracije vodom ostali bistri i homogeni, smatraju se mikroemulzijama i korišćeni su za dalja istraživanja.

Dobijeni rezultati za vreme samoemulgovanja (< 60 s) i robustnost prema razblaživanju (transparencija > 98%, bez obzira na stepen razblaženja) su potvrdili da su ispitivani uzorci mikroemulzije. Takođe, rezultati fotonske korelacione spektroskopije su pokazali da svi uzorci bez simvastatina imaju veličinu kapi u opsegu koji odgovara mikroemulzijama (između 10,25 i 18,58 nm za uzorke sa polisorbitom 80 i između 10,54 i 12,12 nm za uzorke sa makrogol 15 hidrosistearatom) i vrlo homogenu raspodelu veličine kapi (PDI ≤ 0,20), bez obzira na vrstu uljane faze. Inkorporiranje simvastatina u SMEDDS sa propilenglikol monokaprilatom je dovelo do primetnog povećanje veličine kapi i PDI, dok je uticaj dodatka simvastatina na sisteme sa oleoil makrogol-6 gliceridima bio neznatan.

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

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

5.2. Zaključak druge faze eksperimentalnog rada

U drugoj fazi eksperimentalnog rada je izgrađen simvastatin-specifični PBPK model, koji opisuje ključne farmakokinetičke procese simvastatina i njegovog aktivnog metabolita, simvastatin-kiseline. Poređenjem predviđenih i *in vivo* određenih vrednosti farmakokinetičkih parametara za simvastatin i simvastatin-kiselinu nakon peroralne primene 20 mg simvastatina u obliku tableta sa trenutnim oslobađanjem, procenjeno je da se biološka raspoloživost simvastatina, kao i maksimalna koncentracija u plazmi (C_{max}) i $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ za simvastatin i simvastatin-kiselinu uklapaju u opseg vrednosti iz referentne *in vivo* studije, što ukazuje da je simvastatin-specifični model uspešno razvijen i validiran.

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

Takođe, analizom rezultata simulacija je identifikovano da su distalni delovi GI trakta optimalno mesto za apsorpciju simvastatina, te da se razvojem odgovarajućih formulacija sa modifikovanim (ciljnim) oslobađanjem može postići smanjenje uticaja presistemskog metabolizma, a samim tim i poboljšanje biološke raspoloživosti simvastatina.

5.3. Zaključak treće faze eksperimentalnog rada

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

Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja simvastatina iz uzoraka dobijenih mešanjem tečnih SMEDDS sa polimerima Eudragit® L100, Eudragit® S100 ili njihovom kombinacijom (u odnosu SMEDDS:polimer 2:1), punjenih u tvrde kapsule, pokazali su da dužina odlaganja oslobađanja simvastatina zavisi od vrste polimera, bez obzira na vrstu kosurfaktanta koji je korišćen u izradi SMEDDS. Simvastatin se potpuno oslobodio iz formulacija sa Eudragit® L100 nakon 180 min, u medijumu pH 6,9, koji odgovara distalnom jejunumu, dok se korišćenjem Eudragit® S100, kao pojedinačnog ekscipijensa ili u kombinaciji sa Eudragit® L100 omogućilo dodatno odlaganje oslobađanja simvastatina (nakon 240, odnosno 300 min, u medijumu pH 7,4, što odgovara distalnom ileumu, odnosno kolonu).

Rezultati *in silico* modelovanja su pokazali da se primenom formulacija na bazi Eudragit® S100 polimera može očekivati povećanje biološke raspoloživosti simvastatina za više od 100%, a primenom formulacija sa kombinacijom polimera Eudragit® S100/Eudragit® L100 (u odnosu 1:1) za više od 80%, u odnosu na biološku raspoloživost simvastatina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. Dobijeni rezultati su ukazali da odloženo/usporeno oslobađanje simvastatina iz navedenih

formulacija dovodi do povećanja apsorpcije simvastatina iz distalnih delova GI trakta, što rezultuje povećanom ukupnom biološkom raspoloživošću.

U slučaju lipidnih formulacija sa polimerima, koje sadrže polisorbit 80 kao kosurfaktant u SMEDDS, matematičko modelovanje kinetike oslobađanja simvastatina je pokazalo da uzorci sa Eudragit® L100 polimerom imaju visoke vrednosti r^2 za *Hixson-Crowell*-ov model oslobađanja i kinetiku prvog reda, na osnovu čega se zaključuje da je erozija matriksa osnovni mehanizam oslobađanja simvastatina iz ovih formulacija. Kinetika oslobađanja simvastatina iz uzoraka sa Eudragit® S100 polimerom se najbolje uklapa u *Korsmeyer-Peppas*-ov model ($r^2 \geq 0,92$), sa visokom vrednošću eksponenta ($n > 0,89$) koji odgovara „super slučaju II transporta“, dok se kinetika oslobađanja simvastatina iz formulacija sa kombinacijom Eudragit® S100/Eudragit® L100 polimera najbolje uklapa u matematički model nultog reda. S druge strane, primenom matematičkih modela za procenu brzine oslobađanja simvastatina iz formulacija sa makrogol 15 hidrosistearatom, zaključeno je da *Korsmeyer-Peppas*-ov model najbolje opisuje oslobađanje simvastatina iz svih uzoraka (za sve formulacije $r^2 \geq 0,89$), bez obzira na vrstu polimera. Vrednosti *Korsmeyer-Peppas*-ovog eksponenta se nalaze u opsegu od 0,9620 do 2,0210, što ukazuje da mehanizam oslobađanja odgovara „super slučaju II transporta“, odnosno da se oslobađanje simvastatina odvija kontrolisanim rastvaranjem/erozijom nosača na bazi kopolimera metakrilne kiseline.

Mešanjem tečnih SMEDDS sa Eudragit® polimerima, nakon 1 h, dolazilo je do nastanka čvrstih, rastegljivih, transparentnih sistema, verovatno kao posledica građenja intermolekulskih veza između polimera i surfaktanta i obrazovanja gelske mreže.

Reološka ispitivanja čvrstih lipidnih formulacija su pokazala da svi uzorci ispoljavaju viskoelastična svojstva ($G' > G''$ i $\tan \delta < 1$). Sa povećanjem udela surfaktanta kaprilokaproil makrogol-8 glicerida u uzorcima elastičnost sistema se povećavala, verovatno kao posledica formiranja rigidnije gelske mreže. Dodatak simvastatina (3,33%, m/m) je dovodio do izvesnog smanjenja elastičnih svojstava sistema, a smanjenje elastičnosti je bilo više izraženo u uzorcima sa kombinacijom polimera Eudragit® S100/Eudragit® L100.

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

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

Na osnovu sprovedenih istraživanja, kao generalni zaključak ove doktorske disertacije može se navesti da lipidne formulacije, dobijene mešanjem tečnih SMEDDS sa simvastatinom, koje sadrže optimalan izbor vrste i udela komponenti, sa kopolimerima metakrilne kiseline (Eudragit® S100 ili kombinacija Eudragit® S100/Eudragit® L100), punjene u tvrde kapsule kao finalni farmaceutski oblik, omogućavaju modifikovano oslobađanje simvastatina. Rezultati *in silico* modelovanja su pokazali da se upotrebom Eudragit® S100 polimera u ovim lipidnim formulacijama očekuje povećanje biološke raspoloživosti simvastatina za više od 100%, u odnosu na biološku raspoloživost iz tableta sa trenutnim oslobađanjem.

6. LITERATURA

2-[2-[3,5-Bis(2-hydroxyethoxy)oxolan-2-yl]-2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethyl (E)-octadec-9-enoate. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polysorbate-80>. (datum poslednjeg pristupa 06.04.2021.)

2-Hydroxyethyl 12-hydroxyoctadecanoate. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Hydroxyethyl-12-hydroxyoctadecanoate>. (datum poslednjeg pristupa 06.04.2021.)

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

Abuhelwa, A.Y., Foster, D.J.R., Upton, R.N., 2016. A quantitative review and meta-models of the variability and factors affecting oral drug absorption-Part I: Gastrointestinal pH. AAPS J. 18, 1309-1321.

Agoram, B., Woltosz, W.S., Bolger, M.B., 2001. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. Adv. Drug Deliv. Rev. 50 Suppl 1, S41-67.

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

Ahmed, T.A., Badr-Eldin, S.M., Ahmed, O.A.A., Aldawsari, H., 2018. Intranasal optimized solid lipid nanoparticles loaded *in situ* gel for enhancing trans-mucosal delivery of simvastatin. J. Drug Deliv. Sci. Technol. 48, 499-508.

Akula, S., Gurram, A.K., Devireddy, S.R., 2014. Self-microemulsifying drug delivery systems: An attractive strategy for enhanced therapeutic profile. Int. Sch. Res. Notices. 2014, 964051.

Akula, S., Gurram, A.K., Devireddy, S.R., Deshpande, B.P., 2015. Evaluation of surfactant effect on self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of lercanidipine hydrochloride: Formulation and evaluation. J. Pharm. Innov. 10, 374-387.

Aleksić, I., Đuriš, J., Cvijić, S., Ibrić, S., Parojčić, J., 2015. Granulacija topljenjem – alternativni postupak u izradi čvrstih farmaceutskih oblika. Arh. farm. 65, 159-177.

Alshehri, S., Imam, S.S., Hussain, A., Altamimi, M.A., Alruwaili, N.K., Alotaibi, F., Alanazi, A., Shakeel, F., 2020. Potential of solid dispersions to enhance solubility, bioavailability, and therapeutic efficacy of poorly water-soluble drugs: newer formulation techniques, current marketed scenario and patents. Drug Deliv. 27, 1625-1643.

Amidon, G.L., Lennernas, H., Shah, V.P., Crison, J.R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. Pharm. Res. 12, 413-420.

Ashrafizadeh, M., Ahmadi, Z. 2019. Effects of statins on gut microbiota (microbiome). Rev. Clin. Med. 6, 55-59.

Assi, R.A., Abdulbaqi, I.M., Ming, T.S., Yee, C.S., Wahab, H.A., Asif, S.M., Darwis, Y., 2020. Liquid and solid self-emulsifying drug delivery systems (SEDDs) as carriers for the oral delivery of azithromycin: Optimization, *in vitro* characterization and stability assessment. Pharmaceutics. 12, 1052.

Atef, E., Belmonte, A.A., 2008. Formulation and *in vitro* and *in vivo* characterization of a phenytoin self-emulsifying drug delivery system (SEDDs). Eur. J. Pharm. Sci. 35, 257-263.

Attwood, D., Florence, A.T., 1983. Surfactant systems: their chemistry, pharmacy and biology. Chapman and Hall, London.

- Back, H.M., Yun, H.Y., Kim, S.K., Kim, J.K., 2020. Beyond the Michaelis-Menten: Accurate prediction of *in vivo* hepatic clearance for drugs with low K_M . *Clin. Transl. Sci.* 13, 1199-1207.
- Badary, O.A., Al-Shabanah, O.A., Al-Gharably, N.M., Elmazar, M.M.A., 1998. Effect of Cremophor® EL and the pharmacokinetics, antitumor activity and toxicity of doxorubicin in mice. *Anti-Cancer Drugs.* 9, 809-815.
- Badée, J., Achour, B., Rostami-Hodjegan, A., Galetin, A., 2015. Meta-analysis of expression of hepatic organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporters in cellular systems relative to human liver tissue. *Drug Metab. Dispos.* 43, 424-432.
- Baek, M.K., Lee, J.H., Cho, Y.H., Kim, H.H., Lee, G.W., 2013. Self-microemulsifying drug-delivery system for improved oral bioavailability of pranlukast hemihydrate: preparation and evaluation. *Int. J. Nanom.* 8, 167-176.
- Bagwe, R.P., Kanicky, J.R., Palla, B.J., Patanjali, P.K., Shah, D.O., 2001. Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 18, 77-140.
- Bakhle, S.S., Avari, J.G., 2015. Development and characterization of solid self-emulsifying drug delivery system of cilnidipine. *Chem. Pharm. Bull.* 63, 408-417.
- Balakrishnan, P., Lee, B.J., Oh, D.H., Kim, J.O., Lee, Y.I., Kim, D.D., Jee, J.P., Lee, Y.B., Woo, J.S., Yong, C.S., Choi, H.G., 2009. Enhanced oral bioavailability of coenzyme Q10 by self-emulsifying drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 374, 66-72.
- Bali, B., Ali, M., Ali, J., 2011. Nanocarrier for the enhanced bioavailability of a cardiovascular agent: *in vitro*, pharmacodynamic, pharmacokinetic and stability assessment. *Int. J. Pharm.* 403, 45-56.
- Bandivadeka, M.M., Pancholi, S.S., Kaul-Ghanekar, R., Choudhari, A., Koppikar, S., 2012. Self-microemulsifying smaller molecular volume oil (Capmul MCM) using non-ionic surfactants: a delivery system for poorly water-soluble drug. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 38, 883-892.
- Barbosa, J.A.C., Abdelsadig, M.S.E., Conway, B.R., Merchant, H.A., 2019. Using zeta potential to study the ionisation behaviour of polymers employed in modified-release dosage forms and estimating their pK_a. *Int. J. Pharm.* X, 1, 100024.
- Beauchesne, P.R., Chung, N.S., Wasan, K.M., 2007. Cyclosporine A: A review of current oral and intravenous delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33, 211-220.
- Bhairi, S., Mohan, C., Ibryamova, S., LaFavor, T., 2017. Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. Merck KGaA, Darmstadt. Dostupno na: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/1/content/commerce/pdfs/detergents/detergents-guide-mk.pdf>. (datum poslednjeg pristupa: 28.02.2021)
- Bhilegaonkar, S., Parvatkar, A., 2020. Eudragit: A versatile and robust platform. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 11, 2626-2635.
- Bi, Y., Deng, J., Murry, D.J., An, G., 2016. A whole-body physiologically based pharmacokinetic model of gefitinib in mice and scale-up to humans. *AAPS J.* 18, 228-238.
- Birmingham, B.K., Bujac, S.R., Elsby, R., Azumaya, C.T., Wei, C., Chen, Y., Mosqueda-Garcia, R., Ambrose, H.J., 2015. Impact of ABCG2 and SLCO1B1 polymorphisms on pharmacokinetics of rosuvastatin, atorvastatin and simvastatin acid in Caucasian and Asian subjects: a class effect? *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 71, 341-355.
- Boresi, A.P., Schmidt, R.J., 2002. *Advanced mechanics of materials*. John Wiley and Sons, New York.
- Borhade, V., Nair, H., Hegde, D., 2008. Design and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of tacrolimus. *AAPS PharmSciTech.* 9, 13-21.
- Bou-Chacra, N., Curo Melo, K.J., Cordova Morlaes, I.A., Stippler, E.S., Kesisouglu, F., Yazdanian, M., Löbenberg, R., 2017. Evolution of choice of solubility and dissolution media after two decades of Biopharmaceutical Classification System. *AAPS J.* 19, 989-1001.

- Brito Raj, S., Chandrasekhar, K.B., Reddy, K.B., 2019. Formulation, *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic evaluation of simvastatin nanostructured lipid carrier loaded transdermal drug delivery system. *Future J. Pharm. Sci.* 5, 9.
- Byrn, S.R., Henck, J.O., 2012. Optimizing the physical form - opportunities and limitations. *Drug Discov. Today Technol.* 9, e71-e174.
- Cao, Y., Marra, M., Anderson, B.D., 2004. 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.* 93, 2768-2779.
- Capsugel, 2014. DRcaps® Capsugel achieve delayed release properties for nutritional ingredients in human clinical studies. Dostupno na: <https://www.pharmaexcipients.com/wp-content/uploads/2021/01/DRcaps%C2%AE-Capsules-Achieve-Delayed-Release-Properties-for-Nutritional-Ingredients-in-Human-Clinical-Study.pdf> (datum poslednjeg pristupa: 25.04.2021.)
- Carrigan, P.J., Bates, T.R., 1973. 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.* 62, 1476-1479.
- Chakrabarti, S., Belpaire, F.M., 1978. Bioavailability of phenytoin in lipid containing dosage forms in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 30, 330-331.
- Chakraborty, S., Shukla, D., Mishra, B., Singh, S., 2009. Lipid-an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73, 1-15.
- Chao, T.C., Chu, Z., Tseng, L.M., Chiou, T.J., Hsieh, R.K., Wang, W.S., Yen, C.C., Yang, M.H., Hsiao, L.T., Liu, J.H., Chen, P.M., 2005. Paclitaxel in a novel formulation containing less Cremophor EL as first-line therapy for advanced breast cancer: a phase II trial. *Invest New Drugs.* 23, 171-177.
- Charman, S.A., Charman, W.N., 2003. Oral Modified-Release Systems. In: Rathbone, M.J., Hadgraft, J., Roberts, M.S. (eds.) *Modified-Release Drug Delivery Technology*, Marcel Dekker Inc. New York, pp.1-10.
- Charman, S.A., Charman, W.N., Rogge, M.C., Wilson, T.D., Dutko, F.J., Pouton, C.W., 1992. Self-emulsifying drug delivery systems: formulation and biopharmaceutic evaluation of an investigational lipophilic compound. *Pharm Res.* 9, 82-93.
- Charman, W.N., Rogger, M.C., Boddy, A.W., Berger B.M., 1993. Effect of food and a monoglyceride emulsion formulation on danazol bioavailability. *J. Clin. Pharmacol.* 33, 381-386.
- Chavan, V., Reddy, K., Ahhirao, K., 2014. Development of UV spectrophotometric methods and validation for estimation of simvastatin in bulk and tablet dosage form by absorbance maxima and area under the curve method. *J. App. Pharm.* 6, 55-64.
- Chen, S., Guo, F., Deng, T., Zhu, S., Liu, W., Zhong, H., Yu, H., Luo, R., Deng, Z., 2017. Eudragit S100-coated chitosan nanoparticles co-loading tat for enhanced oral colon absorption of insulin. *AAPS PharmSciTech.* 18, 1277-1287.
- Chen, X.Q., Cho, S.J., Li, Y., Venkatesh, S., 2002. Prediction of aqueous solubility of organic compounds using a quantitative structure-property relationship. *J. Pharm. Sci.* 91, 1838-1852.
- Chen, Y., Ke, M., Xu, J., Lin, C., 2020. Simulation of the pharmacokinetics of oseltamivir and its active metabolite in normal populations and patients with hepatic cirrhosis using physiologically based pharmacokinetic modeling. *AAPS PharmSciTech.* 21, 98.
- Cheng, G., An, F., Zou, M.J., Sun, J., Hao, X.H., He, Y.X., 2004. Time- and pH-dependent colon-specific drug delivery for orally administered diclofenac sodium and 5-aminosalicylic acid. *World J. Gastroenterol.* 10, 1769-1774.
- Cheng, H., Rogers, J.D., Sweany, A.E., Dobrinska, M.R., Stein, E.A., Tate, A.C., Amin, R.D., Quan, H., 1992. Influence of age and gender on the plasma profiles of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitory activity following multiple doses of lovastatin and simvastatin. *Pharm. Res.* 9, 1629-1633.

- Chiu, Y.Y., Higaki, K., Neudeck, B.L., Barnett, J.L., Welage, L.S., Amidon, G.L., 2003. Human jejunal permeability of cyclosporin A: influence of surfactants on P-glycoprotein efflux in Caco-2 cells. *Pharm. Res.* 20, 749-756.
- Chong, R.H., Jones, B.E., Díez, F., Birchall, J.C., Coulman, S.A., 2016. Evaluating the sensitivity, reproducibility and flexibility of a method to test hard shell capsules intended for use in dry powder inhalers. *Int. J. Pharm.* 500, 316-325.
- Chudasama, A., Shah, B., Patel, V., Nivsarkar, M., Vasu, K., Shishoo, C., 2015. Development of self emulsifying drug delivery system of itraconazole for oral delivery: Formulation and pharmacokinetic consideration. *J. Pharm. Invest.* 45, 273-283.
- Cole, E.T., Cadé, D., Benameur, H., 2008. Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 747-756.
- Cole, E.T., Scott, R.A., Connor, A.L., Wilding, I.R., Petereit, H.U., Schminke, C., Beckert, T., Cadé, D., 2002. Enteric coated HPMC capsules designed to achieve intestinal targeting. *Int. J. Pharm.* 231, 83-95.
- Constantinides, P.P., Scalart, J.P., Lancaster, C., Marcello, J., Marks, G., Ellens, H., Smith, P.L., 1994. Formulation and intestinal absorption enhancement evaluation of water-in-oil microemulsions incorporating medium-chain glycerides. *Pharm. Res.* 11, 1385-1390.
- Corsini, A., Bellosta, S., Baetta, R., Fumagalli, R., Paoletti, R., Bernini, F., 1999. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol. Ther.* 84, 413-428.
- Costa, P., Sousa Lobo, J.M., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 123-133.
- Crouse, R.G., 1961. Human pharmacology of griseofulvin: the effect of fat intake on gastrointestinal absorption. *J. Invest. Dermatol.* 37, 529-533.
- Cui, S.X., Nie, S.F., Wang, C.G., Pan, W.S., Sun, J.P., 2009. Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system containing vinpocetine. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 35, 603-611.
- Cuiné, J.F., McEvoy, C.L., Charman, W.N., Pouton, C.W., Edwards, G.A., Benameur, H., Porter, C.J.H., 2008. 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.* 97, 995-1012.
- Cvijić, S., Ibrić, S., Parojić, J., 2020. Integrated biopharmaceutical approach in pharmaceutical development and drug characterization: General concept and application. *Hem. Ind.* 74, 6, 389-397.
- Daeschner, C.W., Bell, W.R., Stivrins, P.C., Yow, E.M., Townsend, E., 1958. Oral sulfonamides in lipid emulsion: A comparative study of free sulfonamide levels in blood following oral administration of sulfonamides in aqueous suspension and in lipid emulsions to infants and children. *A.M.A. J. Dis. Child.* 93, 370-374.
- Dai, L., Li, W., Hou, X., 1997. Effect of the molecular structure of mixed nonionic surfactants on the temperature of miniemulsion formation. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 125, 27-32.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., Mozafari, M.R., 2018. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics.* 10, 57.
- Das Neves, J., Sarmiento, B., 2014. *Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals: Biology, Challenges and Strategies*, Springer, New York.
- Date, A.A., Jain, A., Khachane, P., Nagarsenker, M.S., 2010. Organic solvent-free approach to single step fabrication of Eudragit nanoparticles using Labrasol. *Pharmazie.* 65, 733-736.
- Date, A.A., Nagarsenker, M.S., 2007. Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for cefpodoxime proxetil. *Int. J. Pharm.* 329, 166-172.

- Đekić, Lj., Primorac, M., 2008. The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. *Int. J. Pharm.* 352, 231-239.
- Đekić, Lj., Primorac, M., Jocković, J., 2011. Phase behaviour, microstructure and ibuprofen solubilization capacity of pseudo-ternary nonionic microemulsions. *J. Mol. Liq.* 160, 81-87.
- Dening, T.J., Rao, S., Thomas, N., Prestidge, C.A., 2016. Novel nanostructured solid materials for modulating oral drug delivery from solid-state lipid-based drug delivery systems. *AAPS J.* 18, 23-40.
- Desai, N., Momin, M., 2020. Colon targeted bioadhesive pellets of curcumin and cyclosporine for improved management of inflammatory bowel disease. *Drug Deliv. Transl. Res.* 1, 1288-1301.
- Devadasu, V.R., Deb, P.K., Maheshwari, R., Sharma, P., Tekade, R.K., 2018. Physicochemical, pharmaceutical, and biological considerations in GIT absorption of drugs. In: Tekade, R.K. (ed.) *Dosage Form Design Considerations*, Elsevier, London, pp.149-178.
- Dew, M.J., Hughes, P.J., Lee, M.G., Evans, B.K., Rhodes, J., 1982. An oral preparation to release drugs in the human colon. *Br J Clin Pharmacol.* 14, 405-408.
- Dew, M.J., Ryder, R.E.J., Evans, N., Rhodes, J., 1983. Colonic release of 5-aminosalicylic acid from oral preparation in active ulcerative colitis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 16, 185-187.
- Di Bello, E., Zwergel, C., Mai, A., Valente, S., 2020. The innovative potential of statins in cancer: New targets for new therapies. *Front. Chem.* 8, 516.
- Dixit, A.R., Rajput, S.J., Patel, S.G., 2010. Preparation and bioavailability assessment of SMEDDS containing valsartan. *AAPS PharmSciTech.* 11, 314-321.
- DrugBank: Simvastatin. Dostupno na <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00641> (datum poslednjeg pristupa: 24.04.2021.)
- Edgington, A.N., Joshi, G., 2011. Have physiologically-based pharmacokinetic models delivered? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7, 929-934.
- El Maghraby, G.M., 2008. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants. *Int. J. Pharm.* 355, 285-292.
- EMA, 2003. Stability Testing of new Drug Substances and Products. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf. (datum poslednjeg pristupa: 04.05.2021.)
- EMA, 2014. Guideline on quality of oral modified release products. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-oral-modified-release-products_en.pdf (datum poslednjeg pristupa: 03.05.2021.)
- EMA, 2020. ICH M9 guideline on biopharmaceutics classification system-based biowaivers. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers-step-5_en.pdf (datum poslednjeg pristupa: 20.03.2021.)
- European Pharmacopoeia, 10th ed, 2019. Council of Europe, Strasbourg.
- Evonik: Eudragit Application Guidelines. 13th edition, 2017. Dostupno na: <http://www.pharmapolymers.com/pharmapolymers/en/downloads>. (datum poslednjeg pristupa: 25.04.2021)
- Fatima, S., Gauhar, S., Yusuf, R.S., Muhammad, I.N., 2013. Biorelevant dissolution media: a predictive means for *in vivo* performance of simvastatin tablets. *Int. J. Biopharm.* 4, 214-218.
- FDA, 2017. Guidance for industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. Dostupno na: <https://www.fda.gov/media/70963/download>. (datum poslednjeg pristupa: 04.05.2021.)
- FDA, Generally Recognized as Safe (GRAS). Dostupno na: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>. (datum poslednjeg pristupa: 21.03.2021.)

- FDA, Inactive Ingredients Database. Dostupno na: www.fda.gov/cder. (datum poslednjeg pristupa: 21.03.2021).
- Feeney, O.M., Crum, M.F., McEvoy, C.L., Trevaskis, N.L., Williams, H.D., Pouton, C.W., Charman, W.N., Bergström, C.A., Porter, C.J.H., 2016. 50 years of oral lipid-based formulations: Provenance, progress and future perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 101, 167-194.
- Fei, Y., Kostewicz, E.S., Sheu, M.T., Dressman, J.B., 2013. Analysis of the enhanced oral bioavailability of fenofibrate lipid formulations in fasted humans using an *in vitro-in silico-in vivo* approach. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 1274-1284.
- Fonseca-Santos, B., Silva, P.B., Rigon, R.B., Sato, M.R., Chorilli, M., 2020. Formulating SLN and NLC as innovative drug delivery systems for non-invasive routes of drug administration. *Curr. Med. Chem.* 27, 3623-3656.
- Fukui, S., Yano, H., Yada, S., Mikkaichi, T., Minami, H., 2017. Design and evaluation of an extended-release matrix tablet formulation; the combination of hypromellose acetate succinate and hydroxypropylcellulose. *Asian J. Pharm.* 12, 149-156.
- Gattefossé. Pharmaceuticals. Products. Dostupno na: <https://www.gattefosse.com/pharmaceuticals-product-finder/product-finder-pharmaceutical> (datum poslednjeg pristupa: 16.02.2021.)
- Gautam, P., Shastri, D., 2018. Self-microemulsifying drug delivery system to enhance the solubility of the hydrophobic drugs. *Curr. Trends Biomedical. Eng. Biosci.* 13, 555867.
- Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., Sparreboom, A., 2001. Cremophor® EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur. J. Cancer.* 37, 1590-1598.
- Gelissen, I.C., Andrew, J., McLachlan, A.J., 2014. The pharmacogenomics of statins. *Pharmacol. Res.* 88, 99-106.
- Gershanik, T., Benita, S., 2000. Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 179-188.
- Gertz, M., Houston, J.B., Galetin, A., 2011. Physiologically based pharmacokinetic modeling of intestinal first-pass metabolism of CYP3A substrates with high intestinal extraction. *Drug Metab. Dispos.* 39, 1633-1642.
- Ghosh-Choudhury, N., Mandal, C.C., Ghosh-Choudhury, N., Ghosh-Choudhury, G., 2010. Simvastatin induces derepression of PTEN expression via NFκB to inhibit breast cancer cell growth. *Cell Signal.* 22, 749-758.
- Gigovska, M.H., Petkovska, A., Acevska, J., Nakov, N., Antovska, P., Ugarković, S., Dimitrovska, A., 2018. Comprehensive assessment of degradation behavior of simvastatin by UHPLC/MS method, employing experimental design methodology. *Int. J. Anal. Chem.* 2018, 17.
- Goto, S., Kawata, M., Suzuki, T., Kim, N.S., Ito, C., 1991. Preparation and evaluation of eudragit gels. I: Eudragit organogels containing drugs as rectal sustained-release preparations. *J. Pharm. Sci.* 20, 555-566.
- Graesar, K.A., Strachan, C.J., Patterson, J.E., Gordon, K.C., Rades, T., 2008. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin. *Cryst. Growth Des.* 8, 128-135.
- Gravelle, A.J., Barbut, S., Marangoni, A.G., 2013. Fractionation of ethylcellulose oleogels during setting. *Food Funct.* 4, 153-161.
- Grbić, S., Parojčić, J., Đurić, Z., 2013. Computer aided biopharmaceutical characterization: Gastrointestinal absorption simulation. In: Đurić, J. (ed.) *Computer-Aided Applications in Pharmaceutical Technology*, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp.177-232.
- Groves, M.J., de Galindez, D.A., 1976. The self-emulsifying action of mixed surfactants in oil. *Acta Pharm. Suec.* 134, 361-372.
- Gu, H., Dutreix, C., Rebello, S., Ouatas, T., Wang, L., Chun, D.Y., Einolf, H.J., He, H., 2018. Simultaneous physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of parent and active

- metabolites to investigate complex CYP3A4 drug-drug interaction potential: A case example of midostaurin. *Drug Metab. Dispos.* 46, 109-121.
- Gupta, P., Kumar, M., Sachan, N., 2015. An overview on polymethacrylate polymers ingastroretentive dosage forms, *Open Pharm. Sci. J.* 9, 31-42.
- Gurjar, R., Chan, C.Y.S., Curley, P., Sharp, J., Chiong, J., Rannard, S., Siccardi, M., Owen, A., 2018. Inhibitory effects of commonly used excipients on P-glycoprotein *in vitro*. *Mol. Pharm.* 15, 4835-4842.
- Gurram, A.K., Deshpande, P.B., Kar, S.S., Nayak, U.Y., Udupa, N., Reddy, M.S., 2015. Role of components in the formation of self-microemulsifying drug delivery systems. *Indian J. Pharm. Sci.* 77, 249-257.
- Gursoy, R.N., Benita, S., 2004. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed. Pharmacother.* 58, 173-182.
- Hanke, N., Frechen, S., Moj, D., Britz, H., Eissing, T., Wendl, T., Lehr, T., 2018. PBPK models for CYP3A4 and P-gp DDI prediction: A modeling network of rifampicin, itraconazole, clarithromycin, midazolam, alfentanil, and digoxin. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 7, 647-659.
- Hanke, U., May, K., Rozehnal, V., Nagel, S., Siegmund, W., Weitschies, W., 2010. Commonly used nonionic surfactants interact differently with the human efflux transporters ABCB1 (p-glycoprotein) and ABCC2 (MRP2). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76, 260-268.
- Hardy, J.G., Evans, D.F., Zaki, I., Clark, A.G., Toennesen, H.H., 1987. Evaluation of an enteric coated naproxen tablet using gamma scintigraphy and pH monitoring. *Int. J. Pharm.* 37, 245-250.
- Hare, L.G., Jones, D.S., Woolfson, A.D., 1998. Viscoelastic characterization of drug-loaded Eudragit E 100 films for transdermal drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 165.
- Haus, D.J., 2007. Oral lipid-based formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 667-676.
- Heikkinen, A.T., Baneyx, G., Caruso, A., Parrott, N., 2012. Application of PBPK modeling to predict human intestinal metabolism of CYP3A substrates - an evaluation and case study using GastroPlus. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 375-386.
- Higuchi, T., 1963. Mechanism of sustained-action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J. Pharm. Sci.* 52, 1145-1148.
- Higuchi, T., Connors, K.A., 1965. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4, 117-212.
- Hîrjău, M., Miron, D.S., Anuta, V., Lupuliasa, D., Ghica, M.V., Jinga, V., Dinu-Pirvu, C.E., 2020. Evaluation of experimental multi-particulate polymer-coated drug delivery systems with meloxicam. *Coatings.* 10, 490.
- Hixson, A.W., Crowell, J.H., 1931. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation: I-Theoretical consideration. *Ind. Eng. Chem.* 23, 1160-1168.
- Hochman, J.H., Pudvah, N., Qiu, J., Yamazaki, M., Tang, C., Lin, J.H., Prueksaritanont, T., 2004. Interactions of human P-glycoprotein with simvastatin, simvastatin acid, and atorvastatin. *Pharm. Res.* 21, 1686-1691.
- Hong, E.P., Kim, J.Y., Kim, S.H., Hwang, K.M., Park, C.W., Lee, H.J., Kim, D.W., Weon, K.Y., Jeong, S.Y., Park, E.S., 2016. Formulation and evaluation of a self-microemulsifying drug delivery system containing bortezomib. *Chem. Pharm. Bull.* 64, 1108-1117.
- Hu, Z., Tawa, R., Konishi, T., Shibata, N., Tajada, K., 2001. A novel emulsifier, Labrasol, enhances gastrointestinal absorption of gentamicin. *Life Sci.* 69, 2899-2910.
- Huang, H., 2010. Characterization of *in vitro* systems for transporter studies. [Master's thesis]. Biology Education Centre and Department of Pharmacy, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Huang, Y., Yu, Q., Chen, Z., Wu, W., Zhu, Q., Lu, Y., 2021. *In vitro* and *in vivo* correlation for lipid-based formulations: Current status and future perspectives. *Acta Pharm. Sin. B.* [In press]. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.025>.

- Hugger, E.D., Novak, B.L., Burton, P.S., Audus, K.L., Borchardt, R.T., 2002. A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity *in vitro*. *J. Pharm. Sci.* 91, 1991-2002.
- Humberstone, A.J., Charman, W.N., 1997. Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25, 103-128.
- Humberstone, A.J., Porter, C.J.H., Charman, W.N., 1996. A physicochemical basis for the effect of food on the absolute oral bioavailability of halofantrine. *J. Pharm. Sci.* 85, 525-529.
- Ibekwe, V.C., Liu, F., Fadda, H.M., Khela, M.K., Evans, D.F., Parsons, G.E., Basit, A.W., 2006. An investigation into the *in vivo* performance variability of pH responsive polymers for ileo-colonic drug delivery using gamma scintigraphy in humans. *J. Pharm. Sci.* 95, 2760-2766.
- Ikeuchi, Y.S., Kambayashi, A., Kojima, H., Oku, N., Asai, T., 2018. Prediction of the oral pharmacokinetics and food effects of gabapentin enacarbil extended-release tablets using biorelevant dissolution tests. *Biol. Pharm. Bull.* 41, 1708-1715.
- Imai, N., Ohtawa, M., Ring-opening hydrolases for simvastatin in plasma, liver and intestinal microsomes of rats. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 7, 599-608.
- Ishigam, M., Uchiyama, M., Kondo, T., Iwabuchi, H., Inoue, S., Takasaki, W., Ikeda, T., Komai, T., Ito, K., Sugiyama, Y., 2001. Inhibition of *in vitro* metabolism of simvastatin by itraconazole in humans and prediction of *in vivo* drug-drug interactions. *Pharm. Res.* 18, 622-631.
- Ishigami, M., Honda, T., Takasaki, W., Ikeda, T., Komai, T., Ito, K., Sugiyama, Y., 2001. A comparison of the effect of 3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors on the CYP3A4-dependent oxidation of mexazolam *in vitro*. *Drug Metab. Dispos.* 29, 282-288.
- Jain, D., Panda, A.K., Majumdar, D.K., 2005. Eudragit S 100 entrapped insulin microspheres for oral delivery. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 6, E100-107 .
- Jaiswal, P., Aggarwal, G., Harikumar, S.L., Singh, K., 2014. Development of self-microemulsifying drug delivery system and solid-self-microemulsifying drug delivery system of telmisartan. *Int. J. Pharm. Investig.* 4, 195-206.
- Jannin, V., Musakhanian, J., Marchaud, D., 2008. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 734-746.
- Janssens, S., van den Mooter, G., 2009. Review: Physical chemistry of solid dispersions. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 1571-1586.
- Jin, S.J., Bae, K.S., Cho, S.H., Jung, J.A., Kim, U., Choe, S., Ghim, J.L., Noh, Y.H., Park, H.J., Kim, H.S., Lim, H.S., 2014. Population pharmacokinetic analysis of simvastatin and its active metabolite with characterization of atypical complex absorption kinetics. *Pharm. Res.* 31, 1801-1812.
- Jing-ling, T., Jin, S., Zhong-Gui, H., 2007. Self-emulsifying drug delivery systems: strategy for improving oral delivery of poorly soluble drugs. *Curr. Drug Ther.* 2, 85-93.
- Jones, H.M., Chen, Y., Gibson, C., Heimbach, T., Parrott, N., Peters, S.A., Snoeys, J., Upreti, V.V., Zheng, M., Hall, S.D., 2015. Physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development: a pharmaceutical industry perspective. *Clin. Pharmacol. Ther.* 97, 247-262.
- Jones, H.M., Rowland-Yeo, K., 2013. Basic concepts in physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development. *CPT Pharmacometrics SystPharmacol.* 14, 2, e63.
- Jornada, D.H., Fernandes, G.F.S., Chiba, D.E., de Melo, T.R.F., dos Santos, J.L., Chung, M.C., 2016. The prodrug approach: A successful tool for improving drug solubility. *Molecules.* 21, 42.
- Joyce, P., Dening, T.J., Meola, T.R., Schultz, H.B., Holm, R., Thomas, N., Prestidge, C.A., 2019. Solidification to improve the biopharmaceutical performance of SEDDS: Opportunities and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 142, 102-117.
- Kahlweit, M., 1999. Microemulsions. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect C:Phys Chem.* 95, 89-115.

- Kalarani, D.H., Venkatesh, P., Reddy, K.R., Dinakar, A., 2009. Simple and precise method for the estimation of simvastatin in formulations by UV-visible spectrophotometer. *Res. J. Pharm. Technol.* 2, 878-879.
- Kalepu, S., Manthina, M., Padavala, V., 2013. Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. *Acta Pharm. Sin.* 3, 361-372.
- Kang, B.K., Lee, J.S., Chon, S.K., Jeong, S.Y., Yuk, S.H., Khang, G., Lee, H.B., Cho, S.H., 2004. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *Int. J. Pharm.* 274, 65-73.
- Kang, J.H., Oh, D.H., Oh, Y.K., Yong, C.S., Choi, H.G., 2012. Effects of solid carriers on the crystalline properties, dissolution and bioavailability of flurbiprofen in solid self-nanoemulsifying drug delivery system (solid SNEDDS). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80, 289-297.
- Karim, F.T., Kalam, A., Anwar, R., Miah, M.M., Rahman, M.S., Islam, S.M., 2015. Preparation and evaluation of SEDDS of simvastatin by *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo* technique. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41, 1338-1342.
- Kato, T., Mikkaichi, T., Yoshigae, Y., Okudaira, N., Shimizu, T., Izumi, T., Ando, S., Matsumoto, Y., 2021. Quantitative analysis of an impact of P-glycoprotein on edoxaban's disposition using a human physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model. *Int. J. Pharm.* 597, 120349.
- Kaukonen, A.M., Boyd, B.J., Porter, C.J.H., Charman, W.N., 2004. Drug solubilization behavior during *in vitro* digestion of simple triglyceride lipid solution formulations. *Pharm. Res.* 21, 245-253.
- Kawata, M., Suzuki, T., Kim, N.S., Io, T., Kurita, A., Miyagoe, Y., Goto, S., 1991. Preparation and evaluation of eudragit gels. II: *In vitro* release of salicylic acid, sodium salicylate, and ketoprofen from Eudragit L and S organogels. *J. Pharm. Sci.* 80, 1072-1074.
- Kesisoglou, F., Panmai, S., Wu, Y., 2007. Nanosizing-oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 631-644.
- Khadka, P., Ro, J., Kim, H., Kim, I., Kim, J.T., Kim, H., Cho, J.M., Yun, G., Lee, J., 2014. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian J. Pharm. Sci.* 9, 304-316.
- Khan, M.Z., Prebeg, Z., Kurjaković, N., 1999. A pH dependent colon targeted oral drug delivery system using methacrylic acid copolymers. I. manipulation of drug release using Eudragit L 100-55 and Eudragit S100 combinations. *J. Control. Release.* 58, 215-222.
- Kishore, R.N., Yalavarthi, P.R., Vadlamudi, H.C., Vandana, K.R., Rasheed, A., Sushma, M., 2015. Solid self microemulsification of atorvastatin using hydrophilic carriers: A design. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41, 1213-1222.
- Klyashchitsky, B.A., Owen, A.J., 1998. Drug delivery systems for cyclosporine: Achievements and complications. *J. Drug Target.* 5, 443-458.
- Kochuparambil, S.T., Al-Husein, B., Goc, A., Soliman, S., Somanath, P.R., 2011. Anticancer efficacy of simvastatin on prostate cancer cells and tumor xenografts is associated with inhibition of Akt and reduced prostate-specific antigen expression. *J. Pharmacol. Exp Ther.* 336, 496-505.
- Koga, K., Kusawake, Y., Ito, Y., Sugioka, N., Shibata, N., Takada, K., 2006. Enhancing mechanism of Labrasol on intestinal membrane permeability of the hydrophilic drug gentamicin sulfate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 64, 82-91.
- Kohli, K., Chopra, S., Dhar, D., Arora, S., Khar, R.K., 2010. Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Discov. Today.* 15, 958-965.
- Kollipara, S., Gandhi, R.K., 2014. Pharmacokinetic aspects and *in vitro-in vivo* correlation potential for lipid-based formulations. *Acta Pharm. Sin. B.* 4, 333-349.
- Korn, C., Balbach, S., 2014. Compound selection for development – Is salt formation the ultimate answer? Experiences with an extended concept of the “100 mg approach”. *Eur. J. Pharm. Sci.* 57, 257-263.

- Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A., 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 15, 25-35.
- Koziolok, M., Grimm, M., Becker, D., Iordanov, V., Zou, H., Shimizu, J., Wanke, C., Garbacz, G., Weitschies, W., 2015. Investigation of pH and temperature Profiles in the GI Tract of Fasted Human Subjects Using the Intellicap[®] System. *J. Pharm. Sci.* 104, 2855-2863.
- Kuentz, M., 2012. Lipid-based formulations for oral delivery of lipophilic drugs. *Drug Discov. Today Technol.* 9, e97-e104.
- Kumar, V.S., Rijo, J., Sabitha, M., 2018. Guar gum and Eudragit[®] coated curcumin liquid solid tablets for colon specific drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 110, 318-327.
- Lardizabal, J.A., Deedwania, P.C., 2011. The anti-ischemic and antianginal properties of statins. *Curr. Atheroscler. Rep.* 13, 43-50.
- Larsen, A.T., Sassene, P., Mullertz, A., 2011. *In vitro* lipolysis models as a tool for the characterization of oral lipid and surfactant based drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 417, 245-255.
- Lawrence, M.J., Rees, G.D., 2012. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 175-193.
- Lee, K.S., Chung, H.C., Im, S.A., Park, Y.H., Kim, C.S., Kim, S.B., Rha, S.Y., Lee, M.Y., Ro, J., 2008. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 108, 241-250.
- Lee, Y.C., Dalton, C., Regler, B., Harris, D., 2018. Drug solubility in fatty acids as a formulation design approach for lipid-based formulations: a technical note. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44, 1551-1556.
- Li, G.F., Wang, K., Chen, R., Yang, J., Zheng, Q.S., 2012. Simulation of the pharmacokinetics of bisoprolol in healthy adults and patients with impaired renal function using whole-body physiologically based pharmacokinetic modeling. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 1359-1371.
- Li, L., Yi, T., Lam, C.W., 2013. Effects of spray-drying and choice of solid carriers on concentrations of Labrasol[®] and Transcutol[®] in solid self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS). *Molecules.* 18, 545-560.
- Li, P., Ghosh, A., Wagner, R.F., Krill, S., Joshi, Y.M., Serajuddin, A.T.M., 2005. Effect of combined use of nonionic surfactant on formation of oil-in-water microemulsions. *Int. J. Pharm.* 288, 27-34.
- Lin, L., Wong, H., 2017. Predicting oral drug absorption: Mini review on physiologically-based pharmacokinetic models. *Pharmaceutics.* 9, 41.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3-26.
- Lippert, J., Brosch, M., von Kampen, O., Meyer, M., Siegmund, H.U., Schafmayer, C., Becker, T., Laffert, B., Goerlitz, L., Schreiber, S., Neuvonen, P.J., Niemi, P.J., Niemi, M., Hampe, J., Kuepfer, L., 2012. A mechanistic, model-based approach to safety assessment in clinical development. *CPT: Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* 1, e13.
- Liu, Y., Zhang, P., Feng, N., Zhang, X., Wu, S., Zhao, J., 2009. Optimization and *in situ* intestinal absorption of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. *Int. J. Pharm.* 365, 136-142.
- Lu, A.T., Frisella, M.E., Johnson, K.C., 1993. Dissolution modeling: factors affecting the dissolution rates of polydisperse powders. *Pharm. Res.* 10, 1308-1314.
- Lu, Y., Yue, Z., Xie, J., Wang, W., Zhu, H., Zhang, E., Cao, Z., 2018. Micelles with ultralow critical micelle concentration as carriers for drug delivery. *Nat. Biomed. Eng.* 2, 318-325.
- Lukacova, V., Parrott, N., Lave, T., Fraczkiewicz, G., Bolger, M.B., 2008. General approach to calculation of tissue: plasma partition coefficients for physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling. AAPS National Meeting, Nov 15-20, Atlanta, GA.

- Madan, J.R., Patil, K., Awasthi, R., Dua, K., 2019. Formulation and evaluation of solid self-microemulsifying drug delivery system for azilsartan medoxomil. *Int. J. Polym. Mater.* 70, 100-116.
- Mahmoud, H., Al-Suwayeh, S., Elkadi, S., 2013. Design and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery systems of simvastatin aiming dissolution enhancement. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 7, 1482-1500.
- Margulis-Goshen, K., Magdassi, S., 2009. Formation of simvastatin nanoparticles from microemulsion. *Nanomedicine.* 5, 274-281.
- Matuszewicz, L., Czogalla, A., Sikorski, A.F., 2020. Attempts to use statins in cancertherapy: An update. *Tumor Biol.* 42, 1-9.
- Maurer, J.M., Schellekens, R.C., van Rieke, H.M., Wanke, C., Iordanov, V., Stellaard, F., Wutzke, K.D., Dijkstra, G., van der Zee, M., Woerdenbag, H.J., Frijlink, H.W., Kosterink, J.G., 2015. Gastrointestinal pH and transit time profiling in healthy volunteers using the IntelliCap system confirms ileo-colonic release of ColoPulse tablets. *PLoS One.* 10, e0129076.
- Mauro, V.F., 1993. Clinical pharmacokinetics and practical applications of simvastatin. *Clin. Pharmacokinet.* 24, 195-202.
- McCartney, F., Jannin, V., Chevrier, S., Boulghobra, H., Hristov, D.R., Ritter, N., Miolane, C., Chevant, Y., Demarne, F., Brayden, D.J., 2019. Labrasol® is an efficacious intestinal permeation enhancer across rat intestine: *Ex vivo* and *in vivo* rat studies. *J. Control. Release.* 310, 15-26.
- Mehta, R., Chawla, A., Sharma, P., Pawar, P., 2013. Formulation and *in vitro* evaluation of Eudragit S-100 coated naproxen matrix tablets for colon-targeted drug delivery system. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 4, 31-41.
- Meola, T.R., Schutz, H.B., Peressin, K.F., Prestidge, C.A., 2020. Enhancing the oral bioavailability of simvastatin with silica-lipid hybrid particles: The effect of supersaturation and silica geometry. *Eur. J. Pharm. Sci.* 150, 105357.
- Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G., 2011. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 427-440.
- Meyer, T., Waidelich, D., Frahm, A.W., 2002. Separation and first structure elucidation of Cremophor EL-components by hyphenated capillary electrophoresis and delayed extraction-matrix assisted laser desorption/ionization time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis.* 23, 1053-1062.
- Mezger, T.G., 2015. *Applied Rheology*, Anton Paar GmbH, Graz.
- Midha, K., Nagpal, M., Singh, G., Aggarwal, G., 2017. Prospectives of solid self-microemulsifying systems in novel drug delivery. *Curr. Drug Deliv.* 14, 1078-1096.
- Moj, D., Hanke, N., Britz, H., Frechen, S., Kanacher, T., Wendl, T., Haefeli, W.E., Lehr, T., 2017. Clarithromycin, midazolam, and digoxin: Application of PBPK modeling to gain new insights into drug-drug interactions and co-medication regimens. *AAPS J.* 19, 298-312.
- More, A.S., Firake, B.M., Firke, S.D., 2016. Spectrophotometric methods for estimation of simvastatin in bulk drug and its dosage form. *Anal. Chem. Ind. J.* 16, 258-264.
- Mueller, E.A., Kovarik, J.M., van Bree, J.B., Tetzloff, W., Grevel, J., Kutz, K., 1994. Improved dose linearity of cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *Pharm. Res.* 11, 301-304.
- Mukherjee, T., Plakogiannis, F.M., 2010. Development and oral bioavailability assessment of a supersaturated self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of albendazole. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 1112-1120.
- Müllertz, A., Ogbonna, A., Ren, S., Rades, T., 2010. New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 62:1622-1636.

- Mundargi, R.C., Patil, S.A., Agnihotri, S.A., Aminabhavi, T.M., 2007. Development of polysaccharide-based colon targeted drug delivery systems for the treatment of amoebiasis. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33, 255-264.
- Mura, P., Maestrelli, F., Cirri, M., González Rodríguez, M.L., Rabasco Alvarez, A.M., 2003. Development of enteric-coated pectin-based matrix tablets for colonic delivery of theophylline. *J. Drug Target.* 11, 365-371.
- Nan, Z., Lijun, G., Dongqin, Q., 2012. Evaluation of carbamazepine (CBZ) supersaturable self-microemulsifying (S-SMEDDS) formulation *in vitro* and *in vivo*. *Iran J. Pharm. Res.* 11, 257-264.
- Nardin, I., Köllner, S., 2019. Successful development of oral SEDDS: Screening of excipients from the industrial point of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 142, 128-140.
- Neuhoff, S., Yeo, K.R., Barter, Z., Jamei, M., Turner, D.B., Rostami-Hodjegan, A., 2013. Application of permeability-limited physiologically-based pharmacokinetic models: part II - prediction of P-glycoprotein mediated drug-drug interactions with digoxin. *J. Pharm. Sci.* 102, 3161-3173.
- Nguyen, H.Q., Callegari, E., Obach, R.S., 2016. The use of *in vitro* data and physiologically-based pharmacokinetic modeling to predict drug metabolite exposure: Desipramine exposure in cytochrome P4502D6 extensive and poor metabolizers following administration of imipramine. *Drug Metab. Dispos.* 44, 1569-1578.
- Nguyen, H.Q., Lin, J., Kimoto, E., Callegari, E., Tse, S., Obach, R.S., 2017. Prediction of losartan-active carboxylic acid metabolite exposure following losartan administration using static and physiologically based pharmacokinetic models. *J. Pharm. Sci.* 106, 2758-2770.
- Nicolaides, E., Symillides, M., Dressman, J.B., Reppas, C., 2001. Biorelevant dissolution testing to predict the plasma profile of lipophilic drugs after oral administration. *Pharm. Res.* 18, 380-388.
- Noyes, A., Whitney, W.R., 1987. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 19, 930-934.
- Nugent, S.G., Kumar, D., Rampton, D.S., Evans, D.F., 2001. Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosaliculates and other drugs. *Gut.* 48, 571-577.
- O'Neil, M.J., 2006. *The Merck index - An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals.* 14th ed. Merck & Co. Inc, Whitehouse Station, New Jersey, pp. 1471-1472.
- Padhye, S.G., Nagarsenker, M.S., 2013. Simvastatin solid lipid nanoparticles for oral delivery: Formulation development and *in vivo* evaluation. *Indian J. Pharm Sci.* 75, 591-598.
- Padia, N., Shukla, A., Shelat, P., 2015. Development and characterization of telmisartan self-microemulsifying drug delivery system for bioavailability enhancement. *J. Sc. Innov. Res.* 4, 153-164.
- Paine, M.F., Khalighi, M., Fisher, J.M., Shen, D.D., Kunze, K.L., Marsh, C.L., Perkins, J.D., Thummel, K.E., 1997. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 1552-1562.
- Parakh, D.R., Patil, M.P., Dashputre, N.L., Kshirsagar, S.J., 2015. Development of self-microemulsifying drug delivery system of mebendazol by spray drying technology: Characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Drying Techn.* 34, 1023-1042.
- Parikh, T., Gupta, S.S., Meena, A., Serajuddin, A.T.M., 2014. Investigation of thermal and viscoelastic properties of polymers relevant to hot melt extrusion - III: Polymethacrylates and polymethacrylic acid based polymers. *J. Excip. Food Chem.* 5, 56-64.
- Parrott, N., Stillhart, C., Lindenberg, M., Wagner, B., Kowalski, K., Guerini, E., Djebli, N., Meneses-Lorente, G., 2020. Physiologically based absorption modelling to explore the impact of food and gastric pH changes on the pharmacokinetics of entrectinib. *AAPS J.* 22, 78.
- Pasanen, M.K., Neuvonen, M., Neuvonen, P., Niemi, M., 2006. SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet. Genom.* 16, 873-879.

- Patel, A.R., Vavia, P.R., 2007. Preparation and *in vivo* evaluation of SMEDDS (self-microemulsifying drug delivery system) containing fenofibrate. *AAPS J.* 9, E344-E352.
- Patel, D., Sawant, K.K., 2009. Self micro-emulsifying drug delivery system: formulation development and biopharmaceutical evaluation of lipophilic drugs. *Curr. Drug Deliv.* 6, 419-424.
- Patil, P., Patil, V., Paradkar, A., 2007. Formulation of a self-emulsifying system for oral delivery of simvastatin: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Acta Pharm.* 57, 111-122.
- Pezzini, B.R., Ferraz, H.G., 2009. Bio-Dis and the paddle dissolution apparatuses applied to the release characterization of ketoprofen from hypromellose matrices. *AAPS PharmSciTech.* 10, 763-771.
- Piñero, J., Furlong, L.I., Sanz, F., 2018. *In silico* models in drug development: where we are. *Curr. Opin. Pharmacol.* 42, 111-121.
- Plaza-Oliver, M., Santander-Ortega, M.J., Lozano, M.V., 2021. Current approaches in lipid-based nanocarriers for oral drug delivery. *Drug Deliv. Transl. Res.* 11, 471-497.
- Porter, C.J.H., Charman, W.N., 2001. *In vitro* assessment of oral lipid based formulations. *Adv. Drug Del. Rev.* 50, S127-S147.
- Porter, C.J.H., Pouton, C.W., Cuiñé, J.F., Charman, W.N., 2008. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 673-691.
- Pouton, C.W., 2000. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (Suppl 2), S93-S98.
- Pouton, C.W., 2006. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 29, 278-287.
- Pouton, C.W., Porter, C.J.H., 2008. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials methods and strategies. *Adv. Drug Del. Rev.* 60, 625-637.
- Prajapati, H.N., Delrymple, D.M., Serajuddin, A.T.M., 2012. A comparative evaluation of mono-, di- and triglyceride of medium chain fatty acids by lipid/surfactant/water phase diagram, solubility determination and dispersion testing for application in pharmaceutical dosage form development. *Pharm Res.* 29, 285-305.
- Prasad, Y.V.R., Puthli, S.P., Eaimtrakarn, S., Ishida, M., Yoshikawa, Y., Shibata, N., Takada, K., 2003. Enhanced intestinal absorption of vancomycin with Labrasol and D-alpha-tocopheryl PEG 1000 succinate in rats. *Int. J. Pharm.* 250, 181-190.
- Priyanka, G., Divyesh, S., 2018. Self-micro-emulsifying drug delivery system to enhance the solubility of the hydrophobic drugs. *Curr. Trends Biomedical. Eng. Biosci.* 13, 555867.
- Prueksaritanont, T., Gorham, L.M., Ma, B., Liu, L., Yu, X., Zhao, J.J., Slaughter, D.E., Arison, B.H., Vyas, K.P., 1997. *In vitro* metabolism of simvastatin in humans [SBT]identification of metabolizing enzymes and effect of the drug on hepatic P450s. *Drug Metab. Dispos.* 25, 1191-1199.
- Prueksaritanont, T., Ma, B., Yu, N. 2003. The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56, 120-124.
- PubChem: Simvastatin. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Simvastatin> (datum poslednjeg pristupa: 21.03.2021.)
- Puttrevu, S.K., Arora, S., Polak, S., Patel, N.K., 2020. Physiologically based pharmacokinetic modeling of transdermal selegiline and its metabolites for the evaluation of disposition differences between healthy and special populations. *Pharmaceutics.* 12, 942.
- Qureshi, M.J., Mallikarjuna, C., Kian, W.G., 2015. Enhancement of solubility and therapeutic potential of poorly soluble lovastatin by SMEDDS formulation adsorbed on directly compressed spray dried magnesium aluminometasilicate liquid loadable tablets: a study in diet induced hyperlipidemic rabbits. *Asian J. Pharm. Sci.* 10, 40-56.

- Rahman, A., Hussain, A., Hussain, S., Mirza, A., Iqbal, Z., 2013. Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS). *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39:1-19.
- Rai, G., Yadav, A.K., Jain, N.K., Agrawal, G.P., 2016. Eudragit-coated dextran microspheres of 5-fluorouracil for site-specific delivery to colon. *Drug Deliv.* 23, 328-337.
- Rajpoot, K., Tekade, M., Pandey, V., Nagaraja, S., Youngren-Ortiz, S.R., Tekade, R.K., 2020. Self-microemulsifying drug-delivery system: Ongoing challenges and future ahead. In: Tekade, R.K. (ed.) *Drug Delivery Systems*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 393-454.
- Raju, K.K., Sudhakar, B., Venkata, K., Murthy, V.R., 2014. Factorial design studies and biopharmaceutical evaluation of simvastatin loaded solid lipid nanoparticles for improving the oral bioavailability. *ISRN Nanotechnol.* 2014, 1-8.
- Ramsey, L.B., Johnson, S.G., Caudle, K.E., Haidar, C.E., Voora, D., Wilke, R.A., Maxwell, W.D., McLeod, H.L., Krauss, R.M., Roden, D.M., Feng, Q., Cooper-DeHoff, R.M., Gong, L., Klein, T.E., Wadelius, M., Niemi, M., 2014. The clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy: 2014 update. *Clin. Pharmacol. Ther.* 96, 423-428.
- Ramya, K.A., Srinivasan, R., Deshpande, A.P., 2020. Time dependent response of thixotropic systems: Insights from small amplitude oscillatory shear. *Phys. Fluids.* 32, 013109.
- Ranade, A.A., Bapsy, P.P., Nag, S., Raghunadharao, D., Raina, V., Advani, S.H., Patil, S., Maru, A., Gangadharan, V.P., Goswami, C., Sekhon, J.S., Sambasivaiah, K., Parikh, P., Bakshi, A., Mohapatra, R., 2013. A multicenter phase II randomized study of Cremophor-free polymeric nanoparticle formulation of paclitaxel in women with locally advanced and/or metastatic breast cancer after failure of anthracycline. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* 9, 176-181.
- Rao, B.P., Baby, B., Durgaprasad, Y., Ramesh, K., Rajarajan, S., Keerthi, B., Sreedhar, C., 2013. Formulation and evaluation of SMEDDS with Capmul MCM for enhanced dissolution rate of valsartan. *RGUHS J. Pharm. Sci.* 3, 33-40.
- Relja, B., Meder, F., Wilhelm, K., Henrich, D., Marzi, I., Lehnert, M., 2010. Simvastatin inhibits cell growth and induces apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest in hepatic cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 26, 735-741.
- Rizvi, S.Z.H., Shah, F.A., Khan, N., Muhammad, I., Ali, K.H., Ansari, M.M., Din, F.U., Qureshi, O.S., Kim, K.W., Choe, Y.H., Kim, J.K., Zeb, A., 2019. Simvastatin-loaded solid lipid nanoparticles for enhanced anti-hyperlipidemic activity in hyperlipidemia animal model. *Int. J. Pharm.* 560, 136-143.
- Ross, M.K., Borazjani, A., Wang, R., Crow, J.A., Xie, S., 2012. Examination of the carboxylesterase phenotype in human liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 522, 44-56.
- Sadiq, M.W., Nielsen, E.I., Khachman, D., Conil, J.M., Georges, B., Houin, G., Laffont, C.M., Karlsson, M.O., Friberg, L.E., 2017. A whole-body physiologically based pharmacokinetic (WB-PBPK) model of ciprofloxacin: a step towards predicting bacterial killing at sites of infection. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 44, 69-79.
- Safwat, S., Ishak, R.A.H., Hathout, R.M., Mortada, N.D., 2017. Nanostructured lipid carriers loaded with simvastatin: Effect of PEG/glycerides on characterization, stability, cellular uptake efficiency and *in vitro* cytotoxicity. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43, 1112-1125.
- Sager, J.E., Yu, J., Ragueneau-Majlessi, I., Isoherranen, N., 2015. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation approaches: A systematic review of published models, applications, and model verification. *Drug Metab. Dispos.* 43, 1823-1837.
- Samant, T.S., Lukacova, V., Schmidt, S., 2017. Development and qualification of physiologically based pharmacokinetic models for drugs with atypical distribution behavior: a desipramine case study. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 6, 315-321.

- Sandborn, W.J., Hanauer, S.B., 2003. Systematic review: the pharmacokinetic profiles of oral mesalazine formulations and mesalazine pro-drugs used in the management of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 17, 29-42.
- Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P., Loftsson, T., 2018. Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. *Molecules.* 23, 1161.
- Sareen, R., Jain, N., Rajkumari, A., Dhar, K.L., 2016. pH triggered delivery of curcumin from Eudragit-coated chitosan microspheres for inflammatory bowel disease: characterization and pharmacodynamic evaluation. *Drug Deliv.* 23, 55-62.
- Savla, R., Browne, J., Plassat, V., Wasan, K.M., Wasan, E.K., 2017. Review and analysis of FDA approved drugs using lipid-based formulations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43, 1743-1758.
- Schachter, M., 2005. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamics properties of statins: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19, 117-125.
- Serajuddin, A.T.M., 2007. Salt formation to improve drug solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 603-616.
- Serajuddin, A.T.M., Ranadive, S.A., Mahoney, E.M., 1991. Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-COA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. *J. Pharm. Sci.* 80, 830-834.
- Shah, A., Thool, P., Sorathiya, K., Prajapat, H., Dalrymple, D., Serajuddin, A.T.M., 2018. Effect of different polysorbates on development of self-microemulsifying drug delivery systems using medium chain lipids. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44, 215-223.
- Shah, M., Pathak, K., 2010. Development and statistical optimization of solid lipid nanoparticles of simvastatin by using 2³ full-factorial design. *AAPS PharmSciTech.* 11, 489-496.
- Sharma, R.P., Kumar, V., Schuhmacher, M., Kolodkin, A., Westerhoff, H.V., 2020. Development and evaluation of a harmonized whole body physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for flutamide in rats and its extrapolation to humans. *Environ. Res.* 182, 108948.
- Sharma, V.K., Koka, A., Yadav, J., Sharma, A.K., Keservani R.K., 2016. Self-micro emulsifying drug delivery systems: A strategy to improve oral bioavailability. *Ars. Pharm.* 57, 97-109.
- Shen, H., Zhong, M., 2006. Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) containing atorvastatin. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 1183-1191.
- Sheskey, P.J., Hancock, B.C., Moss, G.P., Goldfarb, D.J., 2020. Handbook of pharmaceutical excipients, 6th ed., The Pharmaceutical Press, American Pharmaceutical Association, London, Washington DC.
- Shobhit, K., Satish, K.G., Pramod, K.S., 2012. Self-emulsifying drug delivery systems for oral delivery of lipid based formulations - a review. *Afr. J. Basic Appl. Sci.* 4, 7-11.
- Shono, Y., Nishihara, H., Matsuda, Y., Furukawa, S., Okada, N., Fujita, T., Yamamoto, A., 2004. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by Cremophor EL and other surfactants by an *in vitro* diffusion chamber method using the isolated rat intestinal membranes. *J. Pharm. Sci.* 93, 877-885.
- Shubber, S., Vllasaliu, D., Rauch, C., Jordan, F., Illum, L., Stolnik, S., 2015. Mechanism of mucosal permeability enhancement of CriticalSorb[®] (Solutol[®] HS15) investigated *in vitro* in cell cultures. *Pharm. Res.* 32, 516-527.
- SimulationPlus, Inc., 2019, GastroPlus[™] Manual, May 2019 – Version 9.7.
- Singh, A.K., Chaurasiya, A., Awasthi, A., Mishra, G., Asati, D., Khar, R.K., Mukherjee, R., 2009. Oral bioavailability enhancement of exemestane from self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS). *AAPS PharmSciTech.* 10, 906-916.
- Singh, A.K., Chaurasiya, A., Singh, M., Upadhyay, S.C., Mukherjee, R., Khar, R.K., 2008. Exemestane loaded self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS): development and optimization. *AAPS PharmSciTech.* 9, 628-634.

- Singh, D., Singh, A.P., Singh, D., Kesavan, A.K., Arora, S., Tiwary, A.K., Bedi, N., 2020. Enhanced oral bioavailability and anti-diabetic activity of canagliflozin through a spray dried lipid based oral delivery: a novel paradigm. *DARU*. 28, 191-208.
- Singh, D., Tiwary, A.K., Bedi, N., 2019. Canagliflozin loaded SMEDDS: formulation optimization for improved solubility, permeability and pharmacokinetic performance. *J. Pharm. Investig.* 49, 67-85.
- Singh, S.K., Vuddanda, P.R., Singh, S., Srivastava, A.K., 2013. A comparison between use of spray and freeze drying techniques for preparation of solid self-microemulsifying formulation of valsartan and *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Biomed. Res. Int.* 2013, 909045.
- Sinha, V.R., Kumria, R., 2003. Coating polymers for colon specific drug delivery: A comprehensive *in vitro* evaluation. *Acta Pharm.* 53, 41-47.
- Sjöblom, J., Lindbergh, R., Friberg, S.E., 1996. Microemulsions – phase equilibria characterization, structures, application and chemical reactions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 65, 125-287.
- Sjögren, E., Thörn, H., Tannergren, C., 2016. *In silico* modeling of gastrointestinal drug absorption: Predictive performance of three physiologically based absorption models. *Mol. Pharm.* 13, 1763-1778.
- Sjöstedt, N., Kortejärvi, H., Kidron, H., Vellonen, K.S., Urtti, A., Yliperttula, M., 2014. Challenges of using *in vitro* data for modeling P-glycoprotein efflux in the blood-brain barrier. *Pharm. Res.* 31, 1-19.
- Smidt, L.E., Dalhoff, K., 2002. Food-drug interactions. *Drugs*. 62, 1481-1502.
- Song, L., 2011. 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.
- Song, W.H., Yeom, D.W., Lee, D.H., Lee, K.M., Yoo, H.J., Chae, B.R., Song, S.H., Choi, Y.W., 2014. *In situ* intestinal permeability and *in vivo* oral bioavailability of celecoxib in supersaturating self-emulsifying drug delivery system. *Arch. Pharm. Res.* 37, 626-635.
- Souza, M.A.F., Conceição, M.M., Silva, M.C.D., Soledade, L.E.B., Souza, A.G., 2007. Thermal and kinetic study of statins. *J. Therm. Anal. Calorim.* 87, 859-863.
- Sriamornsak, P., Limmatvapirat, S., Piriyaprasarth, S., 2015. Mansukmanee, P., Huang, Z., A new self-emulsifying formulation of mefenamic acid with enhanced drug dissolution. *Asian J. Pharm. Sci.* 10, 121-127.
- Stella, J., Nti-Addae, K.W., 2007. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 677-694.
- Strickley, R., 2004. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm. Res.* 21, 201-230.
- Strickley, R.G., 2007. Currently marketed oral lipid-based dosage forms: drugs products and excipients. In: Hauss, D.J. (ed.), *Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly water soluble drugs*, Informa Healthcare Inc., New York, pp. 1-31.
- Subudhi, M.B., Jain, A., Jain, A., Hurkat, P., Shilpi, S., Gulbake, A., Jain, S.K., 2015. Eudragit® S100 coated citrus pectin nanoparticles for colon targeting of 5-fluorouracil, *Materials*. 8, 832-849.
- Sun, M., Zhai, X., Xue, K., Hu, L., Yang, X., Li, G., Si, L., 2011. Intestinal absorption and intestinal lymphatic transport of sirolimus from self-microemulsifying drug delivery systems assessed using the single-pass intestinal perfusion (SPIP) technique and a chylomicron flow blocking approach: linear correlation with oral bioavailabilities in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 43, 132-140.
- Sunesen, V.H., Vedelsdal, R., Kristensen, H.G., Mullert, A., 2005. Effect of liquid volume and food intake on the absolute bioavailability of danazol, a poorly soluble drug. *Eur. J. Pharm. Sci.* 24, 297-303.

- Tan, A., Rao, S., Prestidge, C.A., 2013. Transforming lipid-based oral drug delivery systems into solid dosage forms: an overview of solid carriers, physicochemical properties, and biopharmaceutical performance. *Pharm. Res.* 30, 2993-3017.
- Thakral, N.K., Ray, A.R., Bar-Shalom, D., Eriksson, A.H., Majumdar, D.K., 2012. Soluplus-solubilized citrated camptothecin-a potential drug delivery strategy in colon cancer. *AAPS PharmSciTech.* 13, 59-66.
- Thakral, N.K., Ray, A.R., Majumdar, D.K., 2010. Eudragit S-100 Entrapped chitosan microspheres of valdecoxib for colon cancer. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21, 2691-2699.
- Thakral, S., Thakral, N.K., Majumdar, D.K., 2013. Eudragit: A technology evaluation. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10:131-149.
- The United States Pharmacopeia 41, The National Formulary 36, 2018. United States Pharmacopoeia Convention Inc., Rockville MD.
- Thi, T.D., Van Speybroeck, M., Barillaro, V., Martens, J., Annaert, P., Augustijns, P., Humbeeck, J.V., Vermant, J., Van der Mooter, G., 2009. Formulate-ability of ten compounds with different physicochemical profiles in SMEDDS. *Eur. J. Pharm. Sci.* 38, 479-488.
- Thomas, N., Holm, R., Garmer, M., Karlsson, J.J., Muellertz, A., Rades, T., 2013. Supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery systems (super-SNEDDS) enhance the bioavailability of the poorly water-soluble drug simvastatin in dogs. *AAPS J.* 15, 219-227.
- Thomas, N., Mullertz, A., Graf, A., Rades, T., 2012. Influence of lipid composition and drug load on the *in vitro* performance of self-nanoemulsifying drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.* 101, 1721-1731.
- Thomas, P., Richards, D., Richards, A., 1985. Absorption of delayed release prednisolone in ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 757-758.
- Tiwari, R., Pathak, K., 2011a. Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. *Int. J. Pharm.* 415, 232-243.
- Tiwari, R., Pathak, K., 2011b. Statins therapy: a review on conventional and novel formulation approaches. *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 983-998.
- Tran, P.H., Tran, T.T., Piao, Z.Z., Vo, T.V., Park, J.B., Lim, J., Oh, K.T., Rhee, Y.S., Lee, B.J., 2013. Physical properties and *in vivo* bioavailability in human volunteers of isradipine using controlled release matrix tablet containing self-emulsifying solid dispersion. *Int. J. Pharm.* 450, 79-86.
- Trevaskis, N.L., Charman, W.N., Porter, C.J.H., 2008. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: a mechanistic update. *Adv. Drug Del. Rev.* 60, 702-716.
- Truong, D.H., Tran, T.H., Ramasamy, T., Choi, J.Y., Lee, H.H., Moon, C., Choi, H.G., Yong, C.S., Kim, J.O., 2016. Development of solid self-emulsifying formulation for improving the oral bioavailability of erlotinib. *AAPS PharmSciTech.* 17, 466-473.
- Tsamandouras, N., Dickinson, G., Guo, Y., Hall, S., Rostami-Hodjegan, A., Galetin, A., Aarons, L., 2015. Development and application of a mechanistic pharmacokinetic model for simvastatin and its active metabolite simvastatin acid using an integrated population PBPK approach. *Pharm. Res.* 32, 1864-1883.
- Tsamandouras, N., Dickinson, G., Guo, Y., Hall, S., Rostami-Hodjegan, A., Galetin, A., Aarons, L., 2014. Identification of the effect of multiple polymorphisms on the pharmacokinetics of simvastatin and simvastatin acid using a population-modeling approach. *Clin. Pharmacol. Ther.* 96, 90-100.
- Tscharnutter, W., 2006. Photon correlation spectroscopy in particle sizing. In: Meyers, R.A. (ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, John Wiley & Sons, Ltd., New York, pp. 1-15.
- Tubić-Grozdanis, M., Hilfinger, J.M., Amidon, G.L., Kim, J.S., Kijek, P., Staubach, P., Langguth, P., 2008. Pharmacokinetics of the CYP3A substrate simvastatin following administration of delayed versus immediate release oral dosage forms. *Pharm. Res.* 25, 1591-1600.

- Tung, N.T., Tran, C.S., Pham, T.M., Nguyen, H.A., Nguyen, T.L., Chi, S.C., Nguyen, D.D., Bui, T.B., 2018. Development of solidified self-microemulsifying drug delivery systems containing 1-tetrahydropalmatine: Design of experiment approach and bioavailability comparison. *Int. J. Pharm.* 537, 9-21.
- Ukai, H., Imanishi, A., Kaneda, A., Kimura, E., Koyama, M., Morishita, M., Katsumi, H., Yamamoto, A., 2020. Absorption-enhancing mechanisms of Capryol 90, a novel absorption enhancer, for improving the intestinal absorption of poorly absorbed drugs: Contributions to trans- or para-cellular pathways. *Pharm. Res.* 37, 248.
- Ukai, H., Iwasa, K., Degichi, T., Morishita, M., Katsumi, H., Yamamoto, A., 2020. Enhanced intestinal absorption of insulin by Capryol 90, a novel absorption enhancer in rats: Implications in oral insulin delivery. *Pharmaceutics.* 12, 462.
- Umadevi, S.K., Thiruganesh, R., Suresh, S., Reddy, K.B., 2010. Formulation and evaluation of chitosan microspheres of aceclofenac for colon-targeted drug delivery. *Biopharm. Drug Dispos.* 31, 407-427.
- Vilas, S., Thilagar, S., 2021. Formulation and optimisation of lamivudine-loaded Eudragit® S 100 polymer-coated pectin microspheres for colon-specific delivery. *IET Nanobiotechnol.* 15, 90-99.
- Wagner, C., Thelen, K., Willmann, S., Selen, A., Dressman, J.B., 2013. Utilizing *in vitro* and PBPK tools to link ADME characteristics to plasma profiles: case example nifedipine immediate release formulation. *J. Pharm. Sci.* 102, 3205-3219.
- Wang, E., Casciano, C., Clement, R.P., Johnson, W.W., 2001. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) characterized as direct inhibitors of P-glycoprotein. *Pharm. Res.* 18, 800-806.
- Wang, L., Dong, J., Chen, J., Eastoe, J., Li, X., 2009. Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. *J. Colloid Interface Sci.* 330, 443-448.
- Watts, P.J., Illum, L., 1997. Colonic drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23, 893-913.
- Weiss, B.R.B., Donehower, R.C., Wiernik, P.H., Ohnunam, T., Gralla, R.J., Trump, D.L., Baker, J.R., Van Echo, D.A., Von Hoff, D.D., Leyard-Jones, B., 1990. Hypersensitivity reactions from Taxol. *J. Clin. Oncol.* 8, 1263-1268.
- Williams, H.D., Trevaskis, N.L., Charman, S.A., Shanker, R.M., Charman, W.N., Pouton, C.W., Porter, C.J.H., 2013. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol. Rev.* 65, 315-499.
- Wu, F., Zhou, Y., Li, L., Shen, X., Chen, G., Wang, X., Liang, X., Tan, M., Huang, Z., 2020. Computational approaches in preclinical studies on drug discovery and development. *Front. Chem.* 8, 726.
- Wu, L., Qiao, Y., Wang, L., Guo, J., Wang, G., He, W., Yin, L., Zhao, J., 2015. A self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for a novel medicative compound against depression: A preparation and bioavailability study in rats. *AAPS PharmSciTech.* 16, 1051-1058.
- Yáñez, J.A., Wang, S.W., Knemeyer, I.W., Wirth, M.A., Alton, K.B., 2011. Intestinal lymphatic transport for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 923-42.
- Yeom, D.W., Son, H.Y., Kim, J.H., Kim, S.R., Lee, S.G., Song, S.H., Chae, B.R., Choi, Y.W., 2016. Development of a solidified self-microemulsifying drug delivery system (S-SMEDDS) for atorvastatin calcium with improved dissolution and bioavailability. *Int. J. Pharm.* 506, 302-311.
- Yi, T., Wan, J., Xu, H., Yang, X., 2008. Controlled poorly soluble drug release from solid self-microemulsifying formulations with high viscosity hydroxypropylmethylcellulose. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34, 274-280.
- Yu, L.X., 1999. An integrated model for determining causes of poor oral drug absorption. *Pharm. Res.* 16, 1883-1887.
- Yu, L.X., Amidon, G.L., 1999. A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption. *Int. J. Pharm.* 186, 119-125.

- Yu, L.X., Crison, J.R., Amidon, G.L., 1996. Compartmental transit and dispersion model analysis of small intestinal transit flow in humans. *Int. J. Pharm.* 140, 111-118.
- Zaborenko, N., Shi, Z., Corredor, C.C., Smith-Goettler, B.M., Zhang, L., Hermans, L., Neu, C.M., Alam, A., Cohen, M., Lu, X., Xiong, L., Zacour, B.M., 2019. First-principles and empirical approaches to predicting *in vitro* dissolution for pharmaceutical formulation and process development and for product release testing. *AAPS J.* 21, 32.
- Zhang, L., Cao, F., Ding, B., Li, Q., Xi, Y., Zhai, G., 2011. Eudragit[®] S100 coated calcium pectinate microspheres of curcumin for colon targeting. *J. Microencapsul.* 28, 659-667.
- Zhang, P., Liu, Y., Feng, N., Xu, J., 2008. Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. *Int. J. Pharm.* 355, 269-276.
- Zhang, Q., Fan, X., Ye, R., Hu, Y., Zheng, T., Shi, R., Cheng, W., Lv, X., Chen, L., Liang, P., 2020. The effect of simvastatin on gut microbiota and lipid metabolism in hyperlipidemic rats induced by a high-fat diet. *Front. Pharmacol.* 11, 522.

7. PRILOZI

7.1. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo disertacije

Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo disertacije Zore Četković

Radovi u međunarodnim časopisima:

1. Četković, Z., Cvijić, S., Vasiljević, D., 2018. *In vitro/in silico* approach in the development of simvastatin-loaded self-microemulsifying drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44, 849-860. (IF₂₀₁₈ 2,367; 152/267) (M22)
2. Četković, Z., Cvijić, S., Vasiljević, D., 2019. Formulation and characterization of novel lipid-based drug delivery systems containing polymethacrylate polymers as solid carriers for sustained release of simvastatin. *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 53, 1-9. (IF₂₀₁₉ 2,734; 135/271) (M22)

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34):

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

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

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

7.2. Biografija

Biografija Zore Četković

Zora Četković je osnovne akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu – obrazovni profil diplomirani farmaceut, upisala školske 2004/2005. godine, a diplomirala 1.02.2010. godine, sa opštim uspehom 9,81 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Za uspeh u toku studija dobila je nagradu „Profesor Ivan Berkeš“, koju dodeljuje Društvo medicinskih biohemičara Srbije i Farmaceutski fakultet u Beogradu. Pripravnički staž obavila je u Apoteci „Beograd” u toku 2010/2011. godine, a stručni ispit za diplomiranog farmaceuta položila je 2011. godine. Doktorske akademske studije iz farmaceutske tehnologije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2012/2013.

Od marta 2012. do aprila 2014. godine radila je u Institutu za virusologiju, vakcine, serume „Torlak“. Od aprila 2014. godine radi u Službi za apotekarsku delatnost-bolnička apoteka, Univerzitetski klinički centar Srbije. Specijalizaciju za zdravstvene radnike i zdravstvene saradnike iz Socijalne farmacije upisala je 2019. godine, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od marta 2020. godine je rukovodilac evropskog projekta *Implementation of Antibiotic Reconstitution/Dilution Database in Serbia, Croatia, Slovenia, Bosnia and Herzegovina, North Macedonia and Montenegro in Co-Operation with Spain*, finansiranog od strane Evropske asocijacija bolničkih farmaceuta (*European Association of Hospital Pharmacists*).

7.3. Izjava o autorstvu

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Зора Ћетковић

Број индекса 11/12

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Развој и *in vitro/in silico* карактеризација липидних формулација са симвастатином
као модел супстанцом

- 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, 08.06.2021.

Зора Ћетковић

7.4. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Зора Ћетковић

Број индекса 11/12

Студијски програм Докторске академске студије, модул: Фармацеутска технологија

Наслов рада Развој и *in vitro/in silico* карактеризација липидних формулација са симвастатином као модел супстанцом

Ментор Dr sc. Драгана Васиљевић, ванредни професор

Dr sc. Сандра Цвијић, 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, 08.06.2021.

Зора Ћетковић

7.5. Izjava o korišćenju

Изјава о коришћењу

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

Развој и *in vitro/in silico* карактеризација липидних формулација са симвастатином као модел супстанцом

која је моје ауторско дело.

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

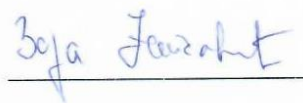
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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, 08.06.2021.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.