

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
UNIVERZITETA U BEOGRADU - FARMACEUTSKOG FAKULTETA

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, održanoj 24.09.2015. godine imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata magistra farmacije Marka Krstića, pod naslovom:

Formulacija i karakterizacija čvrstih samo-dispergujućih nosača karbamazepina izrađenih sa poroznim adsorbensima

Komisija u sastavu:

1. Dr Svetlana Ibrić – mentor rada, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, predsednik komisije
2. Dr Marija Primorac, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
3. Dr Slavica Ražić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
4. Dr Dragana Vasiljević, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
5. Dr Nenad Lazarević, naučni saradnik, Centar za fiziku čvrstog stanja i nove materijale, Institut za fiziku, Beograd

je pregledala priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija magistra farmacije Marka Krstića, pod naslovom: „**Formulacija i karakterizacija čvrstih samo-dispergujućih nosača karbamazepina izrađenih sa poroznim adsorbensima**“, napisana je na 257 strana, u 8 celina koje obuhvataju: *Uvod, Opšti deo, Ciljeve istraživanja, Eksperimentalni deo, Zaključke, Literaturu, Biografiju autora i Prilog*. Na početku doktorske disertacije dat je sažetak na srpskom i engleskom jeziku, kao i spisak korišćenih skraćenica u doktorskoj disertaciji. Sam tekst disertacije pisan je jasnim, preglednim stilom i dokumentovan sa 53 tabele, 72 grafička prikaza, i sa 218 literaturnih navoda koji se tiču razmatrane problematike, kao i 6 elektronskih baza podataka.

Opšti deo opuhvata 5 poglavlja: Lipidne formulacije/nosači za peroralnu primenu lekovite supstance, Čvrsti samo-dispergujući terapijski sistemi, Adsorpcioni nosači, Procena permeabilnosti lekovite supstance iz čvrstih farmaceutskih oblika kroz membranu gastrointestinalnog trakta i Fizičko-hemijske osobine, stabilnost, delovanje i upotreba karbamazepina.

U poglavlju *Lipidne formulacije/nosači za peroralnu primenu lekovite supstance* opisane su osnovne karakteristike lipidnih formulacija/nosača za peroralnu primenu lekovite supstance, kao i prednosti njihove primene u poređenju sa konvencionalnim farmaceutskim oblicima u pogledu poboljšanja biološke raspoloživosti. Data je klasifikacija lipidnih formulacija i osnovne karakteristike svih tipova samo-dispergujućih nosača sa aspekta njihovog sastava, stepena disperziteta, kao i uticaja varenja nakon peroralne primene. Takođe, predstavljeni su i preparati sa tržišta, koji u svom sastavu sadrže lipidne nosače lekovite supstance. Detaljno su objašnjeni faktori koji utiču na izbor pomoćnih supstanci/ekscipijenasa u formulaciji lipidnih sistema. Dat je zbirni prikaz ekscipijenasa, koji se koriste u formulaciji lipidnih nosača. Sumirani su mehanizmi kojima lipidne formulacije potencijalno povećavaju biološku raspoloživost lekovite supstance. U delu *Studije faznog ponašanja* opisani su osnovni pristupi ispitivanja faznog ponašanja lipidnih formulacija, istaknute prednosti i nedostaci različitih pristupa u praćenju faznog ponašanja. Opisan je postupak konstruisanja ternernog i pseudo-ternernog faznog dijagrama, kao i primena tehnika eksperimentalnog dizajna i veštačkih neuronskih mreža u praćenju faznog ponašanja samo-dispergujućih nosača.

U poglavlju *Čvrsti samo-dispergujući terapijski sistemi* istaknute su prednosti ovih sistema u odnosu na tečne lipidne formulacije. Dat je prikaz postupaka koji se koriste za prevođenje tečnih samo-dispergujućih nosača u čvrste samo-dispergujuće sisteme.

U poglavlju *Adsorpcioni nosači* istaknut je njihov značaj i mogućnosti primene, kako u formulaciji preparata sa trenutnim, tako i preparata sa produženim/odloženim oslobađanjem lekovite supstance. Izvršena je klasifikacija prirodnih i sintetskih nosača, a poseban akcenat je stavljen na sintetske nosače na bazi magnezijum-alumunometasilikata (Neusilin[®], Fuji Chemical Industry Co., Ltd, Japan) i silicijum-dioksida (Sylysia[®], Fuji Sylysia Chemical, Japan) i na prirodne nosače - diatomite. Prikazani su osnovni mehanizmi adsorbovanja lekovite supstance na navedene nosače, kao i osnovni mehanizmi oslobađanja. U ovom poglavlju, dat je osvrt i na regulatorne aspekte primene ovih nosača, kao i tabelarni prikaz osnovnih karakteristika i mogućnosti primene različitih tipova nosača iz grupe Neusilin[®]-a i Sylysia[®]-a.

U poglavlju *Procena permeabilnosti lekovite supstance kroz membranu gastrointestinalnog trakta* opisani su osnovni mehanizmi resorpcije lekovite supstance iz gastrointesinalnog trakta nakon peroralne primene. Dat je literaturni pregled i kritički osvrt značaja ispitivanja permeabilnosti lekovite supstance prilikom formulisanja lipidnih formulacija/nosača. U ovom poglavlju navedeni su razlozi koji mogu dovesti do povećanja ili smanjenja permeabilnosti lekovite supstance prilikom primene lipidnih formulacija. Izvršena je podela metoda za procenu permeabilnosti lekovite supstance na *in vitro*, *in vivo* i *in silico* metode. U nastavku poglavlja opisan je značaj *in vitro* metoda za procenu permeabilnosti lekovite supstance i dat detaljan prikaz i poređenje ispitivanja na Caco-2 ćelijama i PAMPA testa (*eng.* Parallel Artificial Membrane Permeability Assay). Dat je i prikaz unaređenog PAMPA testa koji se prvi put navodi u literaturi 2014. godine pod nazivom DAMPA (*eng.* Double Artificial Membrane Permeability Assay). U nastavku ovog poglavlja navedene su *in silico* metode za procenu permeabilnosti lekovite supstance, dat je pregled kompjuterskog programa Simcyp[®] Population-Based Simulator (version 13.1; Certara[™], SAD), koji je u eksperimentalnom delu doktorske disertacije korišćen za *in silico* modelovanje resorpcije/koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon peroralne primene.

U poglavlju *Fizičko-hemijske osobine, stabilnost, delovanje i upotreba karbamazepina* istaknute su fizičko-hemijske osobine, stabilnost, delovanje i upotreba karbamazepina. Poseban akcenat je stavljen na polimorfne oblike karbamazepina, njihovu stabilnost, kao i uticaj farmaceutsko-tehnoloških operacija na moguću promenu polimornog oblika karbamazepina u toku izrade/proizvodnje, transporta i čuvanja farmaceutskog oblika sa ovom aktivnom supstancom. Na kraju ovog poglavlja navedeni su ključni razlozi za izbor karbamazepina, kao model supstance, u ovoj doktorskoj disertaciji.

Sveobuhvatni cilj doktorske disertacije jeste formulacija, izrada i karakterizacija čvrstih samo-dispergujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom, uz korišćenje prirodnih i sintetskih adsorpcionih nosača.

Cilj **prve faze** eksperimentalnog rada bio je ispitivanje uticaja fizičko-hemijskih osobina i koncentracija ulja, surfaktanata i kosurfaktanata (korastvarača), na mogućnost dobijanja samo-dispergujućih nosača lekovite supstance. Cilj je bio da se ispitivanjima faznog ponašanja i pseudo-ternernim faznim dijagrama, kao i primenom tehnika eksperimentalnog dizajna (dizajn smeše), odaberu tečni samo-mikroemulgujući, samo-nanoemulgujući i samo-emulgujući nosači, koji će u narednoj fazi istraživanja biti korišćeni za izradu čvrstih-samodispergujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom.

Cilj **druge faze** eksperimentalnog rada bio je formulacija, izrada i karakterizacija čvrstih samo-dispergujućih terapijskih sistema sa visokim udelom karbamazepina. Kao adsorpcioni nosači korišćeni su sintetski i prirodni nosači na bazi silicijum-dioksida, magnezijum-aluminometasilikata i diatomita. Cilj ovog dela istraživanja bila je procena uticaja vrste i udela adsorpcionog nosača, vrste tečnog samo-dispergujućeg nosača, kao i metode izrade (direktna adsorpcija ili evaporacija rastvarača) na brzinu rastvaranja i stabilnost karbamazepina.

Cilj **treće faze** eksperimentalnog rada bila je procena permeabilnosti karbamazepina iz odabranih čvrstih samo-dispergujućih terapijskih sistema, korišćenjem *in vitro* testa (PAMPA test) i *in silico* metode (Simcyp[®] kompjuterski program).

Cilj **četvrte faze** eksperimentalnog rada bila je procena mogućnosti primene dve različite metode (brzo hlađenje otopljene mase i granulacija topljenjem) za formulaciju čvrstih samo-dispergujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom. Cilj prvog dela ove faze bio je da se izvrši formulacija i karakterizacija surfaktantnih sistema dobijenih metodom brzog hlađenja otopljene mase. Cilj drugog dela ove faze bio je da se izvrši formulacija i karakterizacija tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem, dobijenih komprimovanjem granulata izrađenog metodom topljenja, koji u svom sastavu sadrži samo-dispergujući nosač. Cilj ove faze bio je i da se ispita mogućnost primene tehnika eksperimentalnog dizajna u formulaciji čvrstih samo-dispergujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom.

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je podeljen na 4 faze, koje su prikazane u poglavljima 8, 9, 10 i 11. Na početku svakog poglavlja dat je šematski prikaz eksperimenata izvedenih u datoj fazi.

U **prvoj fazi istraživanja** ispitana je mogućnost primene različitih kombinacija ulja/surfaktanata/kosurfaktanata (korastvarača) za formulaciju tečnih samo-mikroemulgujućih, samo-nanoemulgujućih i samo-emulgujućih nosača lekovite supstance. U ovoj fazi primenjene su tehnike konstituisanja pseudo-ternernih faznih dijagrama i eksperimentalnog dizajna (dizajna smeše) u određivanju mikroemulziona oblasti. Na osnovu rezultata ove faze rada odabrani su

tečni samo-dispergujući nosači, koji su u kasnijim fazama korišćeni za izradu čvrstih samo-dispergujućih sistema. Prvi deo istraživanja se odvijao kroz tri dela.

Za izradu tečnih samo-mikroemulgujućih nosača (faza 1.1.) korišćeni su trigliceridi srednje dužine lanaca kao uljana faza, polisorbat 80 ili makrogolglicerol ricinoleat (Cremophor[®] EL; BASF, Nemačka), kao surfaktant i makrogol 400 kao korastvarač. Procenjena je mogućnost primene dva navedena surfakranta, uz variranje odnosa surfaktant/korastvarač (3:1, 2:1 i 1:1). U cilju određivanja mikroemulziona oblasti, smešama surfaktantne faze (surfaktant i korastvarač) i ulja, u odnosima od 1:9 do 9:1, pažljivo je dodavana visoko prečišćena voda, na sobnoj temperaturi, uz mešanje na magnetnoj mešalici i uz vizuelno praćenje promena koje su se dešavale u sistemu. Jednofazni, transparentni, nisko viskozni sistemi su smatrani mikroemulzijama. Nakon konstruisanja pseudo-ternernih faznih dijagrama izvršeno je poređenje emulgujućih sposobnosti različitih kombinacija ulja/surfaktanata/korastvarača i procenjen uticaj vrste i udela samo-dispergujućeg nosača na širinu mikroemulziona oblasti. Odabrano je šest uzoraka samo-emulgujućih nosača (potencijalnih samo-mikroemulgujućih nosača), kojima je nakon razblaživanja visoko prečišćenom vodom (10:90), određena veličina kapi unutrašnje faze i indeks polidisperziteta (PdI), primenom metode fotonske korelacione spektroskopije. Na osnovu dobijenih rezultata, za dalja istraživanja odabran je jedan tečni samo-mikroemulgujući nosač (SMEDDS) željenih karakteristika, koji je u fazi 2.2. korišćen za formulaciju čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom.

Za izradu tečnih samo-emulgujućih nosača (faza 1.2) korišćeni su trigliceridi srednje dužine lanaca kao uljana komponenta, polisorbat 80, kao surfaktant i dietilen-glikolmonoetiletar (Transcutol[®] HP, Gattefosse, Francuska) kao kosurfaktant. Variran je odnos surfaktant/kosurfaktant 3:1, 2:1 i 1:1. U cilju određivanja mikroemulziona oblasti, smešama surfaktantne faze i ulja, u odnosima od 1:9 do 9:1, pažljivo je dodavana visoko prečišćena voda, na sobnoj temperaturi, uz mešanje na magnetnoj mešalici i uz vizuelno praćenje promena koje su se dešavale u sistemu. Jednofazni, transparentni, nisko viskozni sistemi su smatrani mikroemulzijama. Nakon konstruisanja pseudo-ternernih faznih dijagrama procenjen je uticaj odnosa surfaktant/kosurfaktant na širinu mikroemulziona oblasti. Odabranim uzorcima samo-emulgujućih sistema, nakon razblaživanja visoko prečišćenom vodom (10:90, m/m), određena je veličina kapi unutrašnje faze i indeks polidisperziteta (PdI), primenom metode fotonske korelacione spektroskopije. Na osnovu dobijenih rezultata, odabran je jedan tečni samo-emulgujući nosač (SEDSS) željenih karakteristika za formulisanje čvrstih samo-emulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom u fazi 2.4.

U fazi 1.3. eksperimentalnog rada izvršen je odabir tečnog samo-nanoemulgujućeg nosača, primenom metode eksperimentalnog dizajna (dizajn smeše). Kao uljana faza korišćeni su trigliceridi srednje dužine lanaca. Surfaktant je bio smeša polisorbata 80 i polietilenglikol-8 gliceril kaprilat/kaprata (Labrasol[®], Gattefosse, Francuska) u odnosu 1:1. Kao kosurfaktant korišćen je Transcutol[®] HP. Primenom dizajna smeše, uz korišćenje programa *Design Expert*[®] (version 8.0.7.1., Stat-Ease, Inc, SAD), definisan je D-optimalni eksperimentalni dizajn smeše komponenata samo-emulgujućeg nosača. Udeo ulja variran je u opsegu 10-30%, udeo smeše surfaktanata 30-50% i udeo kosurfaktanta 40-60%. Izrađeno je 16 samo-emulgujućih nosača. Nakon izrade, svaki sistem je razblažen visoko prečišćenom vodom u odnosu 10:90. Dobijenim emulzijama određena je veličina kapi unutrašnje faze i indeks polidisperziteta (PdI) primenom

fotonske korelacione spektroskopije. Veličina kapi i PdI praćeni su kao izlazni parametri u eksperimentalnom dizajnu.

Odabran je matematički model, koji opisuje uticaj udela komponenti samo-emulgujućeg nosača na veličinu kapi i PdI.

Nakon toga izvršena je optimizacija formulacije nosača, sa sledećim zahtevima za izlazne parametre: veličina kapi od 100 do 200nm, a PdI od 0,1 do 0,2. Iz različitih delova optimizacione oblasti odabrane su tri formulacije, kojima je, nakon razblaživanja vodom, određena veličina kapi i PdI, radi procene uspešnosti predviđanja.

Za dalja ispitivanja odabrana je jedna formulacija tečnog samo-nanoemulgujućeg nosača (SNEDDS) za formulaciju čvrstih samo-nanoemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom u fazi 2.3.

U okviru odeljka *Rezultati i diskusija* uporedo sa rezultatima prikazana je detaljna analiza i tumačenje dobijenih rezultata, po svim fazama eksperimentalnog rada.

U **drugoј fazi istraživanja** izvršena je formulacija, izrada i karakterizaciji čvrstih samo-dispergujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom. Za izradu čvrstih samo-dispergujućih nosača korišćene su metode direktne adsorpcije i evaporacije pomoću etanola (99,5% v/v) na porozne adsorbense sintetskog i prirodnog porekla. U fazi 2.1. pristupilo se izradi binarnih čvrstih disperzija karbamazepina i poroznih adsorbenasa, kako bi se ispitao potencijalni efekat ovih nosača na povećanje brzine rastvaranja karbamazepina. U fazama 2.2.; 2.3 i 2.4. pristupilo se izradi čvrstih samo-dispergujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom korišćenjem poroznih adsorbenasa i odabranih formulacija tečnih samo-dispergujućih nosača u fazi 1. Iz ove faze eksperimentalnog rada odabrane su formulacije čvrstih samo-dispergujućih nosača iz kojih je u narednoj fazi procenjena permeabilnost karbamazepina primenom *in vitro* i *in silico* metoda.

U fazi 2.1. izrađene su binarne čvrste disperzije karbamazepina i adsorpcionih nosača. Kao adsorpcioni nosači sintetskog porekla korišćeni su nosači tipa magnezijum-aluminometasilikata (Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2) i tipa silicijum-dioksida (Sylysia[®] 320); kao prirodni nosači korišćeni su diatomiti. Variran je odnosi karbamazepin/nosač 1:1, 1:2 i 1:6. Za izradu čvrstih disperzija korišćena je metoda primene rasvarača, na sobnoj temperaturi (metoda A) i na povišenoj temperaturi (metoda B). Karbamazepin je rastvaran u određenoj zapremini etanola (99,5% v/v), a nakon toga dobijen rastvor nanesen na adsorpcioni nosač. Primenom metode A, nakon mešanja etanolnog rastvora karbamazepina i adsorpcionog nosača, dobijene smeše su čuvane 72 h na sobnoj temperaturi, kako bi etanol ispario. Metoda B podrazumevala je izradu disperzija evaporacijom, u vakuum evaporatoru (IKA RV 05, Nemačka) na temperaturi od 70°C, pri brzini rotacije od 70 obrtaja/minutu, tokom 40 minuta. Iz izrađenih čvrstih disperzija je izvršeno je ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina i karakterizacija primenom diferencijalna skenirajuće kalorimetrije (DSC) i difrakcije X-zraka na uzorcima u prahu (PXRD).

U fazi 2.2. izvršena je formulacija, izrada i karakterizacija čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom. Odabrani tečni samo-mikroemulgujući sistem (faza 1.1.) nanesen je na 4 adsorpciona nosača (Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2, Sylysia[®] 320 i diatomite). Udeo karbamazepina je bio stalan (20%), dok je odnos SMEDDS/nosač variran i iznosio je 1:1 ili 3:1. Formulacije su izrađene korišćenjem dve metode (direktnom adsorpcijom i metodom evaporacije pomoću etanola (99,5% v/v)). Iz izrađenih čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom izvršeno je ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina i

karakterizacija primenom termogravimetrijske analize (TGA), DSC, infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FT-IR), PXRD i skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM).

U fazi 2.3. izvršena je formulacija, izrada i karakterizacija čvrstih samo-nanoemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom. Tečni samo-nanoemulgujući sistem (odabran u fazi 1.3.) nanet je na 4 adsorpciona nosača (Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2, Sylsya[®] 320 i diatomite). Udeo karbamazepina je bio stalan (20%), a variran je odnos SNEDDS/nosač 1:1 ili 2:1. Formulacije su izrađene metodom direktne adsorpcije. Iz izrađenih čvrstih disperzija je izvršeno je ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina i karakterizacija primenom TGA, DSC, mikroskopije na vrućoj ploči (HSM), FT-IR, PXRD i SEM.

U fazi 2.4. izvršena je optimizacija formulacija čvrstih samo-emulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom, primenom optimizacione tehnike, dizajna smeše, uz pomoć kompjuterskog programa *Design Expert*[®]. Ulazni parametri su varirani na sledeći način: karbamazepin 30-50 %, tečni samo-emulgujući sistem (odabran u fazi 1.2) 10-30% i Neusilin[®] UFL2 40-60%. Kao izlazni parametar praćeni su procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45 i 60 min. Za izradu samo-emulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom korišćena je metoda direktne adsorpcije.

Nakon dobijanja matematičkih modela, koji opisuju uticaj ulaznih na izlazne parametre, uz korišćenje kompjuterskog programa *Design Expert*[®], izvršena je optimizacija formulacija čvrstih samo-emulgujućih terapijskih sistema. Prilikom optimizacije jedan od zahteva je bio da se za 30 min oslobodi 80 % karbamazepina iz formulacije. Radi validacije matematičkih modela i procene uspešnosti optimizacije izrađene su tri dodatne formulacije, iz kojih je ispitana brzina rastvaranja karbamazepina. Eksperimentalno dobijeni profili brzine oslobađanja karbamazepina upoređeni su predviđenim, računanjem faktora razlike i faktora sličnosti. Takođe, odabrane formulacije su okarakterisane i primenom TGA i DSC.

U okviru odeljka *Rezultati i diskusija* uporedo sa rezultatima prikazana je detaljna analiza i tumačenje dobijenih rezultata, po svim fazama eksperimentalnog rada.

U **trećoj fazi istraživanja** izvršena je procena permeabilnosti karbamazepina iz odabranih formulacija samo-dispergujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom (iz faze 2). Ova faza može se podeliti na dva dela (3.1. i 3.2.).

U fazi 3.1. primenom PAMPA testa procenjena je permeabilnost karbamazepina iz odabranih formulacija i upoređena sa permeabilnošću čistog karbamazepina. Ispitivanje je vršeno upotrebom PAMPA modela. Nakon inkubacije vršeno je uzorkovanje tečnosti iz akceptorske komore i koncentracija karbamazepina određivana primenom uređaja za HPLC analizu (Dionex Ultimate 3000 system, Thermo Fisher Scientific, Nemačka; opremljen sa Dionex Ultimate 3000 pumpom, autosamplerom i UV detektorom). Za analizu podataka korišćen je softver Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, Nemačka).

U fazi 3.2. vršena je procena resorpcije karbamazepina iz samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema primenom *in silico* metode, korišćenjem kompjuterskog programa Simcyp[®] Population-Based Simulator (version 13.2; Certara[™], SAD). Na osnovu podataka za fizičkohenijske, biofarmaceutske i farmakokinetičke parametre iz literature ili *in silico* procenjene, primenom Simcyp[®] kompjuterskog programa razvijen je model za procenu resorpcije i biološke

raspoloživosti karbamazepina. Validacija dobijenog PBPK specifičnog modela za karbamazepin izvršena je na osnovu rezultata, objavljenih u literaturi, dobijenih u *in vivo* studiji za srednju koncentraciju karbamazepina u plazmi nakon peroralne primene tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem. Na osnovu dobijenih rezultata za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz formuliranih čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema u fazi 2.2. i dobijenog modela, procenjena je *in silico* metodom resorpcija/koncentracija karbamazepina u plazmi nakon peroralne primene ispitivanih formulacija. Dobijene vrednosti farmakokinetičkih parametara (PIK, C_{max} i t_{max}) za ispitivane formulacije čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema, upoređene su sa vrednostima dobijenim za tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem.

U okviru odeljka *Rezultati i diskusija* uporedo sa rezultatima, prikazana je detaljna analiza i tumačenje dobijenih rezultata, po svim fazama eksperimentalnog rada.

U **četvrtoj fazi istraživanja** ispita je mogućnost primene dva nova postupka izrade (postupak brzog hlađenja otopljenog materijala i granulacija topljenjem) za dobijanje čvrstih samo-dispergujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom. Ova faza istraživanja može se podeliti u dva dela. U prvom delu (faza 4.1.), izvršena je izrada čvrstih surfaktantnih sistema primenom metode brzog hlađenja otopljenog materijala. U drugom delu ove faze (faza 4.2) izrađene su tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem, komprimovanjem granulata izrađenog granulacijom topljenjem, uz korišćenje lipidnih ekscipijensa.

U prvom delu faze 4.1. ispitivan je pojedinačni uticaj ekscipijensa Poloksamera 338 (kao surfaktanta) i polioksietilen(23)-lauriletar (Brij[®] 35) (kao kosurfaktanta) na brzinu oslobađanja karbamazepina, kao dodatka adsorpcionog nosača. Izrađene su sledeće smeše: Poloxamer 338 / karbamazepin (80:20); Poloxamer 338/ karbamazepin /Neusilin[®] UFL2 (40:10:50); Brij[®] 35/ karbamazepin (80:20); Brij[®] 35/ karbamazepin /Neusilin[®] UFL2 (40:10:50). U drugom delu ove faze primenjen je frakcioni faktorski eksperimentalni dizajn (2^{5-2}) za ispitivanje uticaja faktora formulacije na brzinu oslobađanja karbamazepina iz čvrstih surfaktantnih sistema. Varirani parametri bili su vrsta Poloksamera (Poloxamer 237 ili Poloxamer 338), udeo Brij[®] 35 (10 % ili 20 %), udeo karbamazepina (10 % ili 20 %), vrsta adsorpcionog nosača (Neusilin UFL2 ili dijatomiti) i udeo adsorpcionog nosača u formulaciji (33,33 % ili 66,66 %). Kao izlazni parametar praćen je procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 min. U nastavku je variran udeo karbamazepina, na tri nivoa (10, 15 i 20%), sa ciljem da se u finalnoj (optimalnoj) formuli poveća njegov udeo. Smeše izrađene u prvom delu ove faze i optimalna formulacija su okarakterisane primenom TGA, DSC, FT-IR i PXRD analize.

U fazi 4.2. primenjen je frakcioni faktorski eksperimentalni dizajn (2^{6-2}) za ispitivanje uticaja faktora formulacije i procesnih parametara na brzinu oslobađanja karbamazepina iz tableta dobijenih kompresijom čvrstog samo-dispergujućeg terapijskog sistema izrađenog postupkom granulacije topljenjem. Varirani ulazni parametri bili su vrsta vezivnog sredstva lauroil makrogol-6 glicerid (Labrafil 2130CS, Gattefosse, Francuska) ili lauroil makrogol-32 glicerid (Gelucire 44/14, Gattefosse, Francuska), udeo vezivnog sredstva (20 % ili 30 %), udeo karbamazepina (20 % ili 30 %), udeo krospovidona NP, kao superdezintegratora (2% ili 5%), vrsta sredstva za dopunjavanje (Neusilin[®] UFL2 ili mikrokristalna celuloza) i sila kompresije (7 N ili 8 N). Kao izlazni parametri praćeni su procenti oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45, 60, i 120 minuta. Primenom *Design Expert*[®] određen je uticaj ulaznih parametara na izlazne parametre (tj. faktorski efekti), u skladu sa 2^{6-2} frakcionim faktorskim eksperimentalnim

dizajnom. Analizom faktorskih efekata određeni su ulazni parametri za nastavak istraživanja. U nastavku istraživanja primenom metodologije površine odgovora variran je udeo vezivnog sredstva u opsegu od 10-20%, dok je udeo surfaktanta makrogol-glicerolhidroksistarat (Cremophor RH 40, BASF, Nemačka) variran u opsegu od 10-20%. Kao izlazni parametri praćeni su procenti oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 minuta. Na osnovu eksperimentalnog plana izrađeno je 13 formulacija. Nakon obrade rezultata odabrana je optimalna formulacija, sa najvećom brzinom oslobađanja karbamazepina. Optimalna formulacija je okarakterisana primenom DSC, FT-IR i PXRD analize. Stabilnost formulacije u toku 2 meseca, na sobnim uslovima (25 °C i vlažnosti vazduha 40%), ispraćena je primenom Ramanske spektroskopije.

U okviru odeljka *Rezultati i diskusija* uporedo sa rezultatima prikazana je detaljna analiza i tumačenje dobijenih rezultata, po svim fazama eksperimentalnog rada.

B. Opis postignutih rezultata

U **prvoj fazi istraživanja**, studija faznog ponašanja pseudoternernih faznih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400/voda i trigliceridi srednje dužine lanaca/Cremophor[®] EL /Makrogol 400/voda pokazala je da maseni udeli komponenti imaju značajnu ulogu u solubilizaciji vodene faze. Tokom titracije, uočeno je da su sistemi, u kojima je odnos surfaktant/korastvarač 3:1, bez obzira na upotrebljeni surfaktant (Polisorbat 80 ili Cremophor[®] EL) pri odnosu uljana faza/surfaktantna faza 1:9 bili sve vreme transparentni, dok je sa povećanjem udela uljane faze tokom titracije dolazilo do pojave opalescencije i potom do potpunog zamućenja. Kod sistema sa odnosima surfaktant/korastvarač 2:1 i 1:1 formirana je značajno uža mikroemulziona oblast u poređenju sasisistemima surfaktant/korastvarač 3:1, pri čemu se pretpostavlja da je inicijalno dolazilo do formiranja V/U mikroemulzija, koje pri daljem dodatku vodene faze postaju opalescentni ili mlečno beli sistemi, koji gube termodinamičku stabilnost. Poređenjem širine mikroemulziona oblasti, pri upotrebi dva ispitivana surfaktanta, (Polisorbat 80 ili Cremophor[®] EL), uočeno je da sistemi sa Cremophor[®]-om EL daju nešto širu mikroemulzionu oblast. Merenjema veličine kapi unutrašnje faze emulzija dobijenih razblaživanjem samo-emulgujućih sistema vodom u odnosu 10:90, jedino je sistem sa odnosom surfaktanta faza:uljana faza 9:1, uz korišćenje Cremophor[®]-a EL kao surfaktanta, imao zadovoljavajuću vrednost indeksa polidisperziteteta (PdI $0,104 \pm 0,005$) i veličini kapi ($17,66 \pm 0,17$ nm), što ukazuje na potencijalnu visoku stabilnost. Ovaj sistem je okarakterisan kao samo-mikroemulgujući nosač i korišćen je za izradu čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom. Samo-emulgujući nosači sa višim udelima uljane faze, uz korišćenje Cremophor[®]-a EL kao surfaktanta, i sistemi sa odnosima surfaktantna faza: uljana faza 1:9, 2:8 i 3:7, uz korišćenje Polisorbat 80 kao surfaktanta, pokazali su se nakon razblaživanja vodom kao nestabilni i imali su vrednost PdI u rasponu od 0,410-0,752, pa se nisu mogli okarakterisati kao samo-mikroemulgujući nosači.

Studijama faznog ponašanja pseudo-ternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/ Transcutol[®] HP/voda, pri odnosu surfaktant/kosurfaktant 3:1 i 2:1 i pri odnosu uljana/surfaktantna faza 1:9, uočeno je da su ovi sistemi sve vreme bili bistri i stabilni, pa se može pretpostaviti da oni daju V/U mikroemulzije, koje dodatkom vodene faze prelaze u stabilne U/V mikroemulzije. Sistem sa odnosom surfaktant/kosurfaktant 1:1 ni pri jednom odnosu uljana/surfaktantna faza nije dao stabilan i transparentan sistem tokom titracije vodom. Takođe, pri ovom odnosu surfaktant/kosurfaktant se dobija značajno uža mikroemulziona oblast.

Kako se povećanjem udela Transcutol[®] HP ne dobija šira mikroemulziona, oblast u daljim ispitivanjima korišćen je odnos Polisorbat 80/Transcutol[®] HP 3:1. Merenje veličine kapi unutrašnje faze i indeksa polidisperznosti (PdI) emulzija nastalih razblaživanjem samo-emulgujućih sistema vodom, vršeno je za sistemi sa odnosom surfaktant/kosurfaktant (Polisorbat 80/Transcutol[®] HP) 3:1 i sa odnosom uljana/surfaktantna faza 1:9 i 2:8. Uočeno je da se pri nižim udelima uljane faze dobijaju emulzije izrazito male veličine kapi (9 nm) i da usled toga dolazi do koalescencije sitnih kapljica, pa se dobija nešto viša vrednost PdI (0,263). Pri odnosu uljana/surfaktantna faza 2:8 dobijaju se emulzije sa veličinom kapi unutrašnje faze od 332,7 nm, i relativno niskom vrednošću PdI od 0,210, pa je ovaj sistem zbog potencijalno veće stabilnosti i manjeg udela surkatanata, korišćen za formulaciju čvrstih samo-emulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom.

Poređenjem pseudo-ternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400/voda i trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Transcutol[®] HP/voda, utvrđeno je da se korišćenjem Transcutol[®]-a HP dobija značajno stabilniji sistem, sa uniformnijom raspodelom veličine kapi.

Primenom eksperimentalnog dizajna (dizajn smeše), u praćenju faznog ponašanja sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Labrasol[®]/Transcutol[®] HP, sa mnogo manje eksperimenata utvrđeno je fazno ponašanje sistema. Pokazano je da se najmanja veličina kapi emulzija dobijenih razblaživanjem samo-emulgujućeg sistema vodom, dobija pri srednjim vrednostima opsega udela ispitivanih komponenti, odnosno oko 15% uljane faze i oko 42,5% smeše surfaktanata i 42,5% kosurfaktanta. Takođe, utvrđeno je da se primenom dizajna smeše postiže dobra korelacija između predviđenih i stvarnih (eksperimentalno dobijenih) vrednosti. Na osnovu optimizacije odabran je sistem koji je sadržao 21,21% uljane faze, 42,24% surfaktantne smeše i 36,64% kosurfaktanta. Ovaj sistem je nakon razblaženja vodom imao veličinu kapi unutrašnje faze od 157 nm i PdI 0,184 i definisan je kao samo-nanoemulgujući nosač, koji je u drugoj fazi korišćen za izradu čvrstih samo-nanoemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom.

Rezultati druge faze istraživanja pokazali su da se primenom adsorbenasa Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2 i Sylysia[®] 320 u formulaciji čvrstih disperzija, pri odnosu nosač:karbamazepin 1:1, smanjenjuje brzina oslobađanja karbamazepina, u poređenju sa praškom karbamazepinom. Pri odnosima nosač:karbamazepin 1:2 i 1:6 dolazi do povećanja brzine rastvaranja karbamazepina, pri čemu se najbrže rastvaranje karbamazepina postiže iz formulacija čvrstih disperzija sa odnosom nosač:karbamazepin 1:6. Jasna korelacija između brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija i metode izrade kod ova tri nosača nije uočena. Formulacijom čvrstih disperzija sa dijatomitima kao nosačima, izrađenih metodom evaporacije pomoću etanola na 70°C nije došlo do značajne promene u brzini oslobađanja karbamazepina u odnosu na čistu supstancu, dok je kod formulacija izrađenih metodom evaporacije pomoću etanola na sobnoj temperaturi primećeno značajno smanjenje brzine oslobađanja karbamazepina, u odnosu na čistu supstancu. Takođe je uočeno da sa porastom udela dijatomita u čvrstoj disperziji dolazi do povećanja brzine oslobađanja karbamazepina, ali ne značajno. Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih čvrstih disperzija pokazuju da redosled brzine rastvaranja karbamazepina opada u zavisnosti od adsorbensa sledećim redom: Neusilin[®] UFL2 > Sylysia[®] 320 > Neusilin[®] FL2 > dijatomiti. Primenom DSC i PXRD analize kod čvrstih disperzija izrađenih sa Neusilin[®]-om UFL2, Neusilin[®]-om FL2, Sylysia[®]-om 320, pri odnosu karbamazepin:nosač 1:6, utvrđeno je da je u ovim formulacijama došlo do prelaska karbamazepina iz polimorfnog oblika III u amorfni oblik. Prelazak karbamazepina u amorfnu

formu je jedan od razloga zašto je iz ovih formulacija postignuto najbrže oslobađanje u odnosu na čvrste disperzije sa drugim odnosima karbamazepin:nosač. Kod ostalih odnosa za ova tri nosača je utvrđeno da je u ovim formulacijama deo karbamazepina prešao u amorfnu formu, a deo u polimorfni oblik II. DSC i PXRD analizom čvrstih disperzija sa dijatomitima se uočava da je deo karbamazepina prešao u polimorfni oblik II, a deo u amorfnu oblik.

Formulacijom čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom upotrebom poroznih adsorbentasa postiže se značajno povećanje brzine oslobađanja karbamazepina, u odnosu na čistu supstancu i tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem. Najveća brzina rastvaranja karbamazepina postignuta je iz formulacija izrađenih sa Neusilin[®]-om UFL2, izrađenih metodom direktne adsorpcije, iz kojih se za 30 min oslobodilo preko 90% karbamazepina. Analizom rezultata brzine rastvaranja karbamazepina utvrđeno je da formulacije izrađene metodom direktne adsorpcije pokazuju veću brzinu rastvaranja karbamazepina od formulacija identičnog sastava, izrađenih metodom evaporacije pomoću etanola. Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih čvrstih-samomikroemulgujućih terapijskih sistema pokazuju da se brzina oslobađanja karbamazepina smanjuje, u zavisnosti od upotrebljenog adsorbentasa, sledećim redom: Neusilin[®] UFL2 > Sylysia[®] 320 > Neusilin[®] FL2 > dijatomiti. Značajna razlika u brzini oslobađanja karbamazepina iz formulacija izrađenih sa različitim odnosima adsorpcioni nosač:SMEDDS nije uočena, pri čemu se nešto veća brzina rastvaranja postiže iz formulacija sa odnosom adsorpcioni nosač:SMEDDS 3:1, u poređenju sa odnosom 1:1. DSC, PXRD, FT-IR i SEM analizom utvrđeno je da u formulacijama čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom, izrađenih metodom evaporacije pomoću etanola, dolazi do prelaska karbamazepina iz polimorfnog oblika III u polimorfni oblik II. Kako je polimorfni oblik III karbamazepina jedini farmakološki aktivan oblik, ova metoda izrade se ne može smatrati pogodnom za izradu čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema sa navedenom lekovitom supstancom. DSC, PXRD, FT-IR i SEM analizom utvrđeno je da u formulacijama čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom izrađenih metodom direktne adsorpcije, karbamazepin ostaje u polimorfnom obliku III, uz značajno povećanje brzine oslobađanja karbamazepina, pa se ova metoda izrade može smatrati pogodnom.

Formulisanjem čvrstih samo-nanoemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom postiže se povećavanje brzine rastvaranja karbamazepina. Formulacija koja je pokazala najveći procenat oslobođenog karbamazepina jeste formulacija koja sadrži jednak udeo SNEDDS-a i adsorpcionog nosača (Sylysia[®] 320). Iz ove formulacije je za 30 minuta oslobođeno oko 90% karbamazepina. Jasna razlika u brzini oslobađanja karbamazepina između formulacija izrađenih sa različitim udelima adsorpcioni nosač:SNEDDS nije uočena. DSC, PXRD, FT-IR i SEM analizom utvrđeno je da je karbamazepin u formulaciji čvrstih samo-nanoemulgujućih terapijskih sistema izrađenih metodom direktne adsorpcije ostao u polimorfnom obliku III, bez obzira na upotrebljeni adsorpcioni nosač.

Metoda eksperimentalnog dizajna (dizajn smeše) može se koristiti kao pogodna tehnika prilikom formulacije čvrstih samo-emulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom. Korišćenjem dizajna smeše, formulisan je čvrst samo-emulgujući terapijski sistem sa karbamazepinom sa gotovo 40% karbamazepina. Iz izrađenog sistema je za 30 minuta oslobođeno preko 80% karbamazepina. Poređenjem eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja karbamazepina, sa predviđenim, postignuto je veliko slaganje (faktori sličnosti za tri ispitivane formulacije bili su od 77,17-81,78). Takođe, u ovim formulacijama je karbamazepin ostao u kristalnom polimorfnom obliku III.

Poređenjem brzine rastvaranja karbamazepina iz terapijskih sistema koji u svom sastavu sadrže samo-dispergujuće nosače različitog stepena disperziteta, nije uočena jasna korelacija.

Rezultati treće faze istraživanja, koji se odnose na procenu permeabilnosti karbamazepina iz formulacija primenom PAMPA testa, utvrđeno je da se iz odabrane formulacije čvrstih disperzija i odabranih formulacija čvrstih samo-dispergujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom značajno povećava permeabilnost karbamazepina (koeficijent prividne permeabilnosti) u odnosu na prašak karbamazepin. Najizraženije povećanje permeabilnosti se postiže primenom čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema (Papp $(21,42 \pm 1,67) \times 10^{-6}$ cm/s), u odnosu na čist karbamazepin (Papp $(11,77 \pm 0,34) \times 10^{-6}$ cm/s). Nije uočena jasna razlika između stepena disperziteta samo-dispergujućeg nosača i koeficijenta efektivne permeabilnosti. Poređenjem permeabilnosti karbamazepina iz formulacija čvrstih samo-nanoemulgujućih terapijskih sistema, sa različitim odnosima adsorpcioni nosač:karmamazepin:tečni SNEDDS, utvrđeno je da se veća permeabilnost karbamazepina postiže iz formulacija sa nižim udelom karbamazepina i tečnog SNEDDS, ali ova razlika nije statistički značajna. Generalno, iz odabranih formulacija sa većom brzinom rastvaranja karbamazepina postiže se veća permeabilnost karbamazepina, međutim ne može se postaviti direktna korelacija. Najveći stepen korelacije se postiže između koeficijenta efektivne permeabilnosti i procenta oslobođenog karbamazepina nakon 10 min (koeficijent korelacije 0,7764).

Primenom kompjuterskog programa Simcyp[®] Population-Based Simulator (version 13.2; Certara[™], SAD), uspešno je razvijen karbamazepin specifični PBPK model, sa niskom vrednošću procenta greške u predviđanju (%PE) za farmakokinetičke parametre C_{max} , t_{max} i PIK_{0-t} , od 7,92%, 6,32%, i 5,66%, redom. Na osnovu *in silico* profila resorpcije/koncentracije karbamazepina u plazmi nakon peroralne primene čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema, može se zaključiti da su formulacije izrađene metodom direktne adsorpcije sa Neusilin[®]-om UFL2, Sylysia[®]-om 320 Neusilin[®]-om FL2 optimalne zbog značajno bržeg postizanja maksimalne koncentracije karbamazepina u plazmi (t_{max} 2,52-3,36 h), uz očuvanje optimalnih vrednosti C_{max} i PIK, u poređenju sa referentim preparatom, tabletama karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem za koga je vrednost t_{max} 7,2h. Takođe, zaključeno je na osnovu vrednosti farmakokinetičkih parametara da je metoda direktne adsorpcije pogodnija za izradu čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom, u odnosu na metodu evaporacije pomoću etanola (99,5%, v/v).

Rezultati četvrte faze ukazuju na to da se tehnika brzog hlađenja otopljenog materijala može koristiti u izradi čvrstih surfaktantnih sistema. Izradom dvokomponentnih i trokomponentnih smeša u prvom delu ove faze pokazano je da dodatak poloksamera 338, Brij[®] 35 i Neusilin[®] UFL2 dolazi do povećanja brzine oslobađanja karbamazepina. Najveći pozitivan uticaj na brzinu oslobađanja ima poloksamer 338. Dodatak Neusilin[®]-a UFL2 još više povećava brzinu oslobađanja karbamazepina. Najveća brzina oslobađanja karbamazepina se postiže iz optimalne formulacije, čija surfaktantna smeša sadrži: 75% poloksamer-a 338, 10% Brij[®]-a 35, 15% karbamazepina. Ova formulacija sadrži surfaktantnu smešu i Neusilin[®] UFL2, kao nosač, u odnosu 2:1. Iz optimalne formulacije se za 30 minuta oslobađa 95,66% karbamazepina. Primenom TGA, DSC, FT-IR i PXRD analize je pokazano da je u formulaciji čvrstih surfaktantnih sistema karbamazepin prešao u amorfnu formu i da je formulacija stabilna u toku 3 meseca čuvanja na sobnim uslovima.

Na osnovu rezultata četvrte faze može se zaključiti da se metoda granulacije topljenjem može sa velikim uspehom koristiti u izradi tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem, koje u svom

sastavu sadrže čvrstih samo-dispergujućih sistema. Primenom Labrafil[®]-a 2130CS, kao vezivnog sredstva, se postiže veća brzina rastvaranja karbamazepina iz tableta, u odnosu Gelucire[®] 44/14, kao vezivno sredstvo. Poređenjem Neusilin[®]-a UFL2 i mikrokristalne celuloze, kao sredstava za dopunjavanje, pokazano je da se veća čvrstina tableta i veća brzina rastvaranja karbamazepina iz tableta postiže primenom Neusilin[®]-a UFL2. U drugom delu ove faze dobijeni su matematički modeli, koji opisuju zavisnost procenta oslobođenog karbamazepina (nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 minuta) od udela Labrafil[®]-a 2130CS i Cremophor[®]-a RH40. Vrednost koeficijenata korelacije za dobijene modele je izrazito visoka (0,9220 do 0,9863). Utvrđeno je i da se najveća brzina oslobađanja karbamazepina postiže pri višim udelima Labrafil[®]-a 2130CS (20%) i nižim udelima Cremophor[®]-a RH40 (10%). Takođe, u ovoj fazi je pokazano da se eksperimentalni dizajn može sa velikim uspehom koristiti u formulaciji tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem. Iz optimalne formulacije tableta postignuto je oslobađanje od oko 88% karbamazepina za 30 minuta. Primenom DSC, FT-IR i PXRD analize potvrđeno je da je karbamazepin u formulaciji tableta prisutan u polimorfnom obliku III. Ramanskom spektroskopijom je potvrđeno da je odabrana optimalna formulacija tableta stabilna 2 meseca, uz čuvanje na sobnim uslovima.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa podacima iz literature

Karbamazepin prema kriterijumima BSK-a (Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije) pripada klasi II, koja se odlikuje niskom rastvorljivošću i visokom permeabilnošću (Amidon i sar., 1995). Eksperimentalni podaci za rastvorljivost karbamazepina u vodi na 25°C kreću se u opsegu od 0,113 mg/ml (Sethia i Squillante, 2002) do 0,26 mg/ml (Loftsson i Hreinsdottir, 2006). Gastrointestinalna resorpcija karbamazepina, nakon peroralne primene, često je nepotpuna i varijabilna, pre svega kao posledica niske rastvorljivosti u vodi (Gavini i sar., 2006; Kobayashi i sar., 2000). Jedan od postupaka za povećanje rastvorljivosti/brzine rastvaranja karbamazepina jeste izrada lipidnih formulacija. Klasifikacija lipidnih formulacija započeta je 2000. godine, a završena 2006 (Pouton 2000, 2006). Na osnovu svojih karakteristika, pre svega vrednosti log P, karbamazepin predstavlja pogodnu supstancu za razvoj samo-dispergujućih nosača tip II, IIIa, IIIb i IV (Pouton 2000, 2006; Kohli i sar., 2010). U ovoj doktorskoj disertaciji su uspešno razvijeni svi navedeni tipovi nosača sa karbamazepinom, iz kojih je postignuto značajno povećanje brzine rastvaranja. U prvoj fazi je uspešno ispitano fazno ponašanje kombinacija pseudoternernih faznih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400/voda; trigliceridi srednje dužine lanaca/ Cremophor[®] EL /Makrogol 400/voda; trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Transcutol[®] HP/voda, metodom konstituisanja pseudoternernih faznih dijagrama; pri čemu ispitivane kombinacije udela i vrste surfaktanata u literaturi još nisu opisane. Takođe, primenom dizajna smeše uspešno je izvršeno praćenje faznog ponašanja sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Labrasol[®]/Transcutol[®] HP i odabran samo-nanoemulgujući sistem sa visokim udelom uljane faze (40%). Ova kombinacija pomoćnih supstanci takođe nije opisana u literaturi. Pokazano je da se dizajn smeše, kao tehnika eksperimentalnog dizajna (Jeirani i sar., 2012) sa velikim uspehom može koristiti u praćenju faznog ponašanja samo-dispergujućih nosača.

U drugoj fazi eksperimentalnog rada je izvršena formulacija binarnih čvrstih disperzija karbamazepina i adsorpcionih nosača (Neusilin[®] FL2, Neusilin[®] UFL2, Sylysia[®] 320 i dijamomiti). Izrada čvrstih disperzija karbamazepina sa navedenim adsorbensima nije opisana u literaturi. Dobijeni rezultati ukazuju da se izradom čvrstih disperzija može značajno povećati brzina rastvaranja karbamazepina, pri čemu dolazi do prelaska karbamazepina delom u kristalni

polimorfni oblik II, a delom u amorfnu formu, kao posledica upotrebe etanola prilikom izrade. Dobijeni rezultati za brzinu rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija sa različitim udelima adsorbensa su u saglasnosti sa rezultatima objavljenim u literaturi, gde je pokazano je da se sa povećanjem udela kristalne supstance (karvedilola) u čvrstim disperzijama, smanjuje njegova brzina rastvaranja (Planinšek i sar., 2011; Kovačić i sar., 2011). U fazi 2.2. je utvrđeno da metoda izrade čvrstih samo-dispergujućih sistema uz evaporaciju etanola nije pogodna, jer dolazi do prelaska karbamazepina u amorfnu formu. Ovo je verovatno posledica toga što je jedan od ključnih faktora prilikom stabilizacije polimornog oblika III karbamazepina stvaranje vodoničnih veza, a u literaturi se navodi da rastvarači koji su akseptori vodoničnih veza prvenstveno dovode do rekristalizacije u polimorni oblik II karbamazepina, dok rastvarači koji su donori u nastanku vodoničnih veza dominantno dovode do kristalizacije karbamazepina u polimornom obliku III (Grzesiak i sar., 2003; Kelly i Rodriguez-Hornedo, 2009; Gua i sar., 2004; Milović i sar., 2014). U fazi 2.2. i 2.3. je pokazano da se sa povećanjem udela tečnog SNEDDS u sastavu SSNEDDS, smanjuje brzina rastvaranja karbamazepina, što je u suprotnosti sa rezultatima koje su dobili Milović i saradnici (Milović i sar., 2012). Ovi rezultati, koji su u suprotnosti sa literaturnim podacima, mogu se objasniti tako što se sa povećanjem udela SNEDDS-a zatvara određeni broj pora na samom nosaču, pa se time „zarobljava” određena količina karbamazepina i na taj način usporava njegovo oslobađanje. Takođe, drugoj fazi eksperimentalnog rada su formulisani čvrsti samo-dispergujući terapijski sistemi sa visokim udelom karbamazepina (od 20 - 40%), što je daleko više u odnosu na slične formulacije Milovića i sar. (manje od 2%) (Milović i sar., 2012), odnosno manje od 10% (Milović i sar., 2014), a iz kojih je takođe postignuto značajno povećanje brzine rastvaranja (preko 80% karbamazepina za 30 minuta). Takođe, u literaturi se za metodu direktne adsorpcije na čvrst nosač u izradi čvrstih samo-dispergujućih sistema navodi je da maksimalna količina lekovite supstance u formulaciji oko 20% (Katteboinaa i sar., 2009), što je istraživanjima u ovoj doktorskoj disertaciji opovrgnuto. U trećoj fazi je ispitana permeabilnost karbamazepina iz čvrstih disperzija i samo-dispergujućih nosača različitog stepena disperziteta, primenom PAMPA testa. PAMPA test je do sada korišćen za procenu permeabilnosti nosača različitog stepena disperziteta, primenom PAMPA testa. PAMPA test je do sada korišćen za procenu permeabilnosti novosintetisanih lekovitih supstanci, a tek poslednjih godina počinje da se koristi za ispitivanje permeabilnosti lekovite supstance iz različitih formulacija (Dahan i Miller, 2012; Miller i sar., 2012; Alqahtani i sar., 2014). Sveobuhvatno ispitivanje permeabilnosti lekovite supstance iz samo-dispergujućih sistema različitog stepena disperziteta još nije opisano u literaturi. Uočeno je da se formulacijom samo-dispergujućih sistema povećava permeabilnost karbamazepina kroz veštačku membranu, što je u saglasnosti sa rezultatima sličnih istraživanja iz literature, gde je ovo povećanje objašnjeno povećanjem propustljivosti membrane, usled interakcije sa surfaktantima (Alqahtani i sar., 2014). Procena koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon peroralne primene formulacije, primenom *in silico* metoda poslednjih godina dobija na značaju. U literaturi postoje istraživanja u kojima se vrši *in silico* procena koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon peroralne primene samo-dispergujućih terapijskih sistema primenom STELLA[®] softvera (Fei i sar., 2013), međutim ispitivanja primenom Simcyp[®] softvera u literaturi još nisu opisana. Dobijeni rezultati za osnovne farmakokinetičke parametre ukazuju da se peroralnom primenom izrađenih čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema značajno smanjuje vrednost t_{max} , (2,52h) u odnosu na literaturne podatke za tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem (7,9h) (Gérardin i sar., 1976).

U četvrtoj fazi je pokazano da se metoda brzog očvršćavanja otopljene mase sa velikim uspehom može koristiti u izradi čvrstih surfaktantnih sistema sa karbamazepinom. Tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem su uspešno izrađene koprivanjem granulata, koji u sebi sadrži samo-dispergujući sistem i koje je dobijen metodom granulacije topljenjem. Ispitivana

kombinacija pomoćnih supstanci, njihovi udeli i uticaj na brzinu rastvaranja i stabilnost karbamazepina u literaturi još nisu opisani.

Literatura

- Alqahtani S, Alayoubi A, Nazzal S, Sylvester P.W, Kaddoumi A. Enhanced solubility and oral bioavailability of γ -tocotrienol using a self-emulsifying drug delivery system (SEEDS). *Lipids*. 2014; 49: 819–829.
- Amidon G. L, Lennernas H, Shah V. P, Crison J. R. A Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification - the correlation of in-vitro drug product dissolution and in-vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 1995; 12: 413 - 420.
- Dahan A, Miller J.M. The solubility-permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs. *AAPS J.* 2012; 14: 244–251.
- Fei Y, Kostewicz E, Sheu M-T, Dressman J. 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.* 2013; 85: 1274–1284.
- Gérardin A.P, Abadie F.V, Campestrini J.A, Theobald W. Pharmacokinetics of carbamazepine in normal humans after single and repeated oral doses. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1976; 4 (6):521-535.
- Grzesiak A, Lang M, Kim K, Matzger A. Comparison of the four anhydrous polymorphs of carbamazepine and the crystal structure of form I. *J. Pharm. Sci.* 2003; 92: 2261–2271.
- Gua C, Lib H, Gandhia R, Raghavana K. Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: implication to polymorph screening. *Int. J. Pharm.* 2004; 283: 117–125.
- Jeirani Z, Jan B.M, Ali B.S, Noor I.M, Hwa S.C, Saphanuchart W. The optimal mixture design of experiments: Alternative method in optimizing the aqueous phase composition of a microemulsion. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2012; 112: 1-7.
- Katteboina S, VSR Chandrasekhar P, Balaji S.. Approaches for the development of solid self-emulsifying drug delivery systems and dosage forms. *AJPS.* 2009; 4(4): 240-253.
- Kelly C.R, Rodriguez-Hornedo N. Solvent effects on the crystallization and preferential nucleation of carbamazepine anhydrous polymorphs: a molecular recognition perspective. *Org. Process Res. Dev.* 2009; 13: 1291–1300.
- Kohli K, Chopra S, Dhar D, Arora S, Khar RK. Self-emulsifying drug delivery system: An approach to enhance the oral bioavailability. *Drug Discovery Today.* 2010; 15: 958-965.
- Kovačić B, Vrečer F, Planinšek O. Solid Dispersions of Carvedilol with Porous Silica. *Chem. Pharm. Bull.* 2011; 59(4): 427-433 .
- Loftsson T, Hreinsdottir D. Determination of aqueous solubility by heating and equilibration: a technical note. *AAPS Pharma. Sci. Tech.* 2006; 7(1): 29-32.
- Miller J.M, Beig A, Carr R.A, Spence J.K, Dahan A. A win-win solution in oral delivery of lipophilic drugs: Supersaturation via amorphous solid dispersions increases apparent solubility without sacrifice of intestinal membrane permeability. *Mol. Pharm.* 2012; 9: 2009–2016.
- Milović M, Simović S, Lošić D, Dashevskiy A, Ibrić S. Solid self-emulsifying phospholipid suspension (SSEPS) with diatom as a drug carrier. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014; 63: 226-232.

- Milović M, Đuriš J, Đekić Lj, Vasiljević D, Ibrić S. Characterization and evaluation of solid self-microemulsifying drug delivery systems with porous carriers as systems for improved carbamazepine release. *Int. J. Pharm.* 2012; 436: 58-65.
- Planinsek O, Kovacic B, Vrecer F. Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. *Int. J. Pharm.* 2011; 406: 41-48.
- Pouton C. W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006; 29(3-4): 278-287.
- Pouton C. W. Lipid formulations for oral administration of drugs: nonemulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000; 11(Supplement 2): 93-98.
- Sethia S, Squillante E. Physicochemical characterization of solid dispersions of carbamazepine formulated by supercritical carbon dioxide and conventional solvent evaporation method. *J. Pharm. Sci.* 2002; 91:1948-1957.

D. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. **Krstić M**, Popović M, Dobričić V, Ibrić S. Influence of Solid Drug Delivery System Formulation on Poorly Water-Soluble Drug Dissolution and Permeability. *Molecules.* 2015; 20: 14684-14698.

Radovi u međunarodnim časopisima (M23)

1. **Krstić M**, Ražić S, Vasiljević D, Spasojević Đ, Ibrić S. Application of experimental design in the examination of the dissolution rate of carbamazepine from formulations. Characterization of the optimal formulation by DSC, TGA, FT-IR and PXRD analysis. *Journal of the Serbian Chemical Society.* 2015; 80 (2): 209-222.
2. **Krstić M**, Ražić S, Đekić Lj, Dobričić V, Momčilović M, Vasiljević D, Ibrić S. Application of a mixture experimental design in the optimization of the formulation of solid self-emulsifying drug delivery systems containing carbamazepine. *Latin American Journal of Pharmacy.* 2015; 34 (5): 885-894.
3. **Krstić M**, Ibrić S. Primena dizajna smeše u formulaciji i karakterizaciji čvrstih samo-nanoemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom. *Hemijska industrija. Rad u štampi.*

Radovi saopšteni na međunarodnim skupovima štampani u celini (M33)

1. Vukosavljević B, **Krstić M**, Đuriš J, Đurić Z, Ibrić S. Evaluation of magnesium-aluminum metasilicate and silica carriers for improving oral bioavailability of poorly

soluble drug. International porous and Powder Materials Symposium and Exhibition. Izmir, Turkey, September 3-6, 2013. p. 545-549.

2. **Krstić M**, Momčilović M, Ražić S, Vasiljević D, Ibrić S. Optimization of drug release from solid self-emulsifying drug delivery systems by means of mixture experimental design. 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisbon/Portugal, March 31-April 3, 2014.
3. **Krstić M**, Stanković S, Parojčić J, Đurić Z, Ibrić S. Evaluating potential for enhanced oral bioavailability of carbamazepine SMEDDS formulations using PBKP modelling. 10th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Portorož/Slovenia, September 18 – 20, 2014. Farmaceutski vestnik 2014; 65:151-153.
4. **Krstić M**, Spasojević Đ, Ražić S, Vasiljević D, Ibrić S. Influence of surfactants and adsorption carriers on drug release rate from solid drug delivery systems. 10th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Portorož/Slovenia, September 18 – 20, 2014. Farmaceutski vestnik 2014; 65: 154-156.
5. **Krstić M**, Ibrić S, Vujić Z, Đurić Z. Formulation of solid self-microemulsifying drug delivery system with porous carriers using mixture experimental design. International porous and Powder Materials Symposium and Exhibition. Izmir, Turkey, September 15-18, 2015. p. 308-312.

Radovi saopšteni na međunarodnim skupovima štampani u izvodu (M34)

1. **Krstić M**, Petrović O, Potpara J, Đurić Z, Đuriš J, Ibrić S. Primena frakcionog eksperimentalnog dizajna u formulaciji tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem. Drugi kongres farmaceuta Crne Gore sa međunarodnim učešćem, 28-31. maj 2015, Budva. Knjiga sažetaka 229-231.

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

1. **Krstić M**, Popović M, Pešić A, Pavlović N, Dobričić V, Ibrić S. Uticaj formulacije čvrstog terapijskog sistema na brzinu oslobađanja i permeabilnost karbamazepina. VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem. Beograd, 15-19. oktobar 2014. Zbornik sažetaka, p 388-389.

E. Zaključak - obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

U priloženoj doktorskoj disertaciji su uspešno formulisani, izrađeni i okarakterisani čvrsti samo-dispergujući terapijski sistema sa karbamazepinom, što i jeste bio sveobuhvatni cilj ove doktorske disertacije.

U prvom delu istraživanja je izvršen odabir tečnih samo-dispergujućih noača, za različite kombinacije ulje/surfaktant/kosurfaktant (korastvarač), koji još nisu ispitani u literaturi. Pokazano je da stabilnost sistema zavisi od vrste i udela komponenti i da se njihovim pravilnim odabirom mogu dobiti stabilni samo-dispergujući nosači lekovite supstance. Na osnovu dobijenih modela,

uz primenom dizajna smeše za samo-emulgujući sistem trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Labrasol[®]/Transcutol[®] HP, moguće je za bilo koju kombinaciju udela komponenti samo-emulgujućeg sistema, u ispitivanom opsegu, predvideti veličinu kapi i PdI. U drugoj fazi istraživanja formulisani su čvrsti samo-dispergujući terapijski sistemi sa visokim udelom karbamazepina (od 20-40%), pri čemu je postignuto značajno povećanje brzine oslobađanja karbamazepina (preko 80% za 30 minuta). Uočena je jasna razlika u brzini oslobađanja karbamazepina iz čvrstih samo-dispergujućih terapijskih sistema, u zavisnosti od vrste i udela adsorpcionog nosača i da se redosled brzine oslobađanja karbamazepina, u zavisnosti od upotrebljenog adsorpcionog nosača, smanjuje sledećim redom: Neusilin[®] UFL2 > Sylysia[®] 320 > Neusilin[®] FL2 > diatomiti. Utvrđeno je da metoda izrade formulacija uz korišćenje etanola (99,5%, v/v), nije odgovarajuća jer dolazi do prelaska karbamazepina u amorfni ili u kristalni polimorfni oblik II. Uočeno je da stepen disperziteta na utiče na brzinu rastvaranja karbamazepina.

U trećoj fazi je izvršeno jedno od prvih *in vitro* ispitivanja permeabilnosti lekovite supstance iz formulacije, pri čemu je uočeno značajno povećanje permeabilnosti karbamazepina iz formulacije samo-dispergujućih terapijskih sistema, u odnosu na čist karbamazepin. Najizraženije povećanje permeabilnosti karbamazepina postignuto je iz formulacije čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema. Ova faza istraživanja je istakla značaj ispitivanja permeabilnosti lekovite supstance iz formulacije, uporedo sa ispitivanjem brzine rastvaranja lekovite supstance iz formulacije.

Prva *in silico* procena resorpcije/koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon peroralne primene čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema, korišćenjem kompjuterskog programa Simcyp[®] izvršena je u ovoj doktorskoj disertaciji. Pokazano je da se primenom formulacije čvrstih samo-mikroemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom, značajno brže postiže maksimalna koncentracija leka u plazmi, u odnosu na tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem.

U četvrtoj fazi je pokazano da se metoda brzog hlađanja otopljenog metarijala, uz kombinaciju Poloksamer-a, Brij[®]-a 35, karbamazepina i adsorpcionog nosača (Neusilin[®] UFL2 ili diatomiti), može koristiti u formulaciji čvrstih surfaktantnih sistema, pri čemu dolazi do povećanja brzine rastvaranja karbamazepina i njegovog prelaska u amorfnu formu. U završnom delu doktorske disertacije pokazano je da je metoda granulacije topljenjem pogodna za izradu tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem, koje u svom sastavu sadrže samo-emulgujući sistema. Formulisane su tablete karbamazepina, komprimovanjem granulata, sa visokim udelom lekovite supstance (20%) iz kojih je postignuto značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina. Fizičko-hemijskom karakterizacijom je potvrđeno da je karbamazepin u izrađenim tabletama ostao u kristalnom polimorfnom obliku III, jedinom farmakološki aktivnom obliku navedene lekovite supstance. Ramanskom spektroskopijom je utvrđeno da su tablete stabilne 2 meseca, kada se čuvaju pod sobnim uslovima.

U više faza doktorske disertacije je pokazano da su tehnike eksperimentalnog dizajna vrlo koriste u optimizaciji formulacija farmaceutskih oblika i proceni uticaja vrste i udela komponenti, kao i procesnih parametara, na karakteristike finalnog proizvoda.

Uvidom u rezultate završene disertacije, može se konstatovati da je kandidat uspešno ostvario postavljene ciljeve, što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u međunarodnim časopisima sa SCI liste M21 i M23 kategorije (Molecules, Journal of the Serbian Chemical Society, Latin American Journal of Pharmacy, Hemijska Industrija), kao i većem broju saopštenja u celosti i izvodu na međunarodnim skupovima i jednim saopštenjem na domaćem skupu.

Na osnovu svega izloženog, može se zaključiti da je kandidat ispunio postavljene ciljeve u doktorskoj disertaciji pod nazivom:

„Formulacija i karakterizacija čvrstih samo-dispergujućih nosača karbamazepina izrađenih sa poroznim adsorbensima“,

pa predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati Izveštaj i uputi Veću medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu na usvajanje, kako bi se stekli uslovi da kandidat mag. farm. Marko Krstić odbrani doktorsku disertaciju.

Beograd, 15.10.2015.

ČLANOVI KOMISIJE

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

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

Dr sc. Slavica Ražić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

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

Dr Nenad Lazarević, naučni saradnik,
Centar za fiziku čvrstog stanja i nove materijale, Institut za fiziku, Beograd