

17. Резюмета на рецензираните публикации на английски и български език

***автор за кореспонденция**

1. Supersaturation and Solubilization upon In Vitro Digestion of Fenofibrate Type I Lipid Formulations: Effect of Droplet Size, Surfactant Concentration and Lipid Type, V. Katev, S. Tsibranska-Gyoreva, Z. Vinarov*, S. Tcholakova, **Pharmaceutics** 13 (2021) 1287; doi: 10.3390/pharmaceutics13081287; **IF = 6.3 (Q1)**

Lipid-based formulations (LBF) enhance oral drug absorption by promoting drug solubilization and supersaturation. The aim of the study was to determine the effect of the lipid carrier type, drop size and surfactant concentration on the rate of fenofibrate release in a bicarbonate-based in vitro digestion model. The effect of the lipid carrier was studied by preparing type I LBF with drop size $\approx 2 \mu\text{m}$, based on medium-chain triglycerides (MCT), sunflower oil (SFO), coconut oil (CNO) and cocoa butter (CB). The drop size and surfactant concentration effects were assessed by studying MCT and SFO-based formulations with a drop size between 400 nm and 14 μm and surfactant concentrations of 1 or 10%. A filtration through a 200 nm filter followed by HPLC analysis was used to determine the aqueous fenofibrate, whereas lipid digestion was followed by gas chromatography. Shorter-chain triglycerides were key in promoting a faster drug release. The fenofibrate release from long-chain triglyceride formulations (SFO, CNO and CB) was governed by solubilization and was enhanced at a smaller droplet size and higher surfactant concentration. In contrast, supersaturation was observed after the digestion of MCT emulsions. In this case, a smaller drop size and higher surfactant had negative effects: lower peak fenofibrate concentrations and a faster onset of precipitation were observed. The study provides new mechanistic insights on drug solubilization and supersaturation after LBF digestion, and may support the development of new in silico prediction models.

Липидните лекарствни форми подобряват усвояването на пероралните лекарства, като подобряват солубилизацията на активното вещество и позволяват образуването на преситени разтвори. Целта на изследването е да се определи ефекта от типа на липидния носител, размера на капките и концентрацията на повърхностно-активно вещество върху скоростта на освобождаване на фенофибрат в in vitro модел на храносмилане, съдържащ бикарбонатен буфер. Ефектът на липидния носител е изследван чрез приготвяне на липидни форми от тип I с размер на капките $\approx 2 \mu\text{m}$, на базата на средноверижни триглицериди (MCT), слънчогледово масло (SFO), кокосово масло (CNO) и какаово масло (CB). Ефекта от размера на капките и концентрацията на повърхностно-активното вещество бяха изследвани чрез приготвяне на MCT и SFO-базирани форми с размер на капките между 400 nm и 14 μm и концентрации на повърхностно-активно вещество от 1 или 10%. За определяне на разтворимия фенофибрат беше използвано филтруване през 200 nm филтър, последвано от HPLC анализ, докато ензимната хидролиза на липидите беше изследвана с газова хроматография. Триглицеридите с по-къса верига бяха ключови за по-бързото освобождаване на лекарственото вещество. Освобождаването на фенофибрат от липидни форми на базата на дълговерижни триглицеридни (SFO, CNO и CB) се определя от степента на солубилизация и се подобрява с намаляване на размера на капките и с повишаване на концентрацията на повърхностно-активно вещество. За разлика от това, липолизата на фенофибрат-съдържащи емулсии на MCT води до образуването на преситени разтвори на активното вещество. В този случай, намаляването на размера на капките и повишаването на концентрацията на повърхностно-активно вещество имаха отрицателен ефект: измерени бяха по-ниски пикови концентрации на фенофибрат и беше наблюдавано по-бързо утаяване. Изследването допринася за по-доброто разбиране на процесите съпътстващи лекарственото освобождаване след ензимна хидролиза на липидни форми и може да се използва за разработването на нови in silico модели за предсказване на оралната бионаличност.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствените форми)

2. Impact of Gastrointestinal Tract Variability on Oral Drug Absorption and Pharmacokinetics: An UNGAP Review, Z. Vinarov, M. Abdallah, J. Agundez, K. Allegaert, A. Basit, M. Braeckmans, J. Ceulemans, M. Corsetti, B. Griffin, M. Grimm, D. Keszthelyi, M. Koziolk, C. Madla, C. Matthys, L. McCoubrey, A. Mitra, C. Reppas, J. Stappaerts, N. Steenackers, N. Trevaskis, T. Vanuytsel, M. Vertzoni, W. Weitschies, C. Wilson, P. Augustijns, **Eur. J. Pharm. Sci.** 162 (2021) 105812; doi: 10.1016/j.ejps.2021.105812

IF = 4.4 (Q2); 4 цитата

The absorption of oral drugs is frequently plagued by significant variability with potentially serious therapeutic consequences. The source of variability can be traced back to interindividual variability in physiology, differences in special populations (age- and disease-dependent), drug and formulation properties, or food-drug interactions. Clinical evidence for the impact of some of these factors on drug pharmacokinetic variability is mounting: e.g. gastric pH and emptying time, small intestinal fluid properties, differences in pediatrics and the elderly, and surgical changes in gastrointestinal anatomy. However, the link of colonic factors variability (transit time, fluid composition, microbiome), sex differences (male vs. female) and gut-related diseases (chronic constipation, anorexia and cachexia) to drug absorption variability has not been firmly established yet. At the same time, a way to decrease oral drug pharmacokinetic variability is provided by the pharmaceutical industry: clinical evidence suggests that formulation approaches employed during drug development can decrease the variability in oral exposure. This review outlines the main drivers of oral drug exposure variability and potential approaches to overcome them, while highlighting existing knowledge gaps and guiding future studies in this area.

Усвояването на перорални лекарства често е жертва на значителна вариация с потенциално сериозни терапевтични последици. Източникът на вариация може да бъде проследен до интер-индивидуалната вариация във физиологията, разликите в специалните популации (в зависимост от възрастта и заболяването), свойствата на лекарството и лекарствената форма или взаимодействията храна-лекарство. Клиничните доказателства за влиянието на някои от тези фактори върху варирането на фармакокинетиката на лекарството се увеличават: напр. стомашно рН и време за изпразване на стомаха, свойства на чревните течности, различия при педиатричните и гериатричните пациенти, както и промени в стомашно-чревната анатомия след хирургични интервенции. Все още обаче не е установена връзката между вариацията в абсорбцията на лекарствени вещества и вариацията на редица параметри в дебелото черво (транзитно време, състав на течности, микробиома), половите различия (мъже спрямо жени) и чревните заболявания (хроничен запек, анорексия и кахексия). В същото време, фармацевтичната индустрия осигурява начин за намаляване на фармакокинетичната вариабилност на пероралните лекарства: клиничните данни показват, че подходите за приготвяне на лекарствени форми, използвани по време на разработването на лекарството, могат да намалят варирането на оралната бионаличност. Този обзор очертава основните причини за варирането на абсорбцията на перорални лекарства и потенциалните подходи за тяхното преодоляване, като същевременно подчертава съществуващите пропуски в науката и предлага идеи за бъдещи проучвания в тази област.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствените форми)

3. Current challenges and future perspectives in oral absorption research: An opinion of the UNGAP network. Z. Vinarov, B. Abrahamsson, P. Artursson, H. Batchelor, P. Berben, A. Bernkop-Schnürch, J. Butler, J. Ceulemans, N. Davies, D. Dupont, G. Flaten, N. Fotaki, B. Griffinn, V. Jannin, J. Keeminki, F. Kesisoglou, M. Koziolok, M. Kuentz, A. Mackie, A. Meléndez-Martínez, M. McAllister, A. Müllertz, C. O'Driscoll, N. Parrott, J. Paszkowska, P. Pavek, C. Porter, C. Reppas, C. Stillhart, K. Sugano, E. Toader, K. Valentová, M. Vertzoni, S. De Wildt, C. Wilson, P. Augustijns. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** 171 (2021) 289-331.

IF = 15.5 (Q1); 4 цитата

Although oral drug delivery is the preferred administration route and has been used for centuries, modern drug discovery and development pipelines challenge conventional formulation approaches and highlight the insufficient mechanistic understanding of processes critical to oral drug absorption. This review presents the opinion of UNGAP scientists on four key themes across the oral absorption landscape: (1) specific patient populations, (2) regional differences in the gastrointestinal tract, (3) advanced formulations and (4) food-drug interactions. The differences of oral absorption in pediatric and geriatric populations, the specific issues in colonic absorption, the formulation approaches for poorly water-soluble (small molecules) and poorly permeable (peptides, RNA *etc.*) drugs, as well as the vast realm of food effects, are some of the topics discussed in detail. The identified controversies and gaps in the current understanding of gastrointestinal absorption-related processes are used to create a roadmap for the future of oral drug absorption research.

Въпреки че пероралното приемане на лекарства е предпочитаният начин за тяхното приложение и се използва от векове, съвременните подходи за откриване и разработване на лекарства затрудняват конвенционалните методи за приготвяне на лекарствени форми и подчертават недостатъчното разбиране на механизмите на процесите, които са критични за усвояването на перорални лекарства. Този преглед представя мнението на учените от UNGAP по четири ключови теми в рамките на оралната абсорбция: (1) специфични популации от пациенти, (2) регионални различия в стомашно-чревния тракт, (3) усъвършенствани лекарствени форми и (4) взаимодействия храна-лекарство. Разликите в пероралната абсорбция при педиатрични и гериатрични популации, специфичните проблеми при абсорбцията в дебелото черво, подходите за приготвяне на лекарствени форми на слабо разтворими във вода (малки молекули) и слабо пропускливи (пептиди, РНК и др.) лекарства, както и огромното разнообразие на взаимодействията храна-лекарство, са някои от темите, обсъждани подробно. Установените противоречия и пропуски в настоящото разбиране за процесите, свързани с абсорбцията в стомашно-чревния тракт, са използвани за създаването на пътна карта за бъдещето на изследванията в областта на усвояването на перорални лекарства.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствните форми)

4. Mechanisms of Drug Solubilization by Polar Lipids in Biorelevant Media, V. Katev, Z. Vinarov*, S. Tcholakova, **Eur. J. Pharm. Sci.** 159 (2021) 105733; doi: 10.1016/j.ejps.2021.105733

IF = 4.4 (Q2)

Despite the widespread use of lipid excipients in both academic research and oral formulation development, rational selection guidelines are still missing. In the current study, we aimed to establish a link between the molecular structure of commonly used polar lipids and drug solubilization in biorelevant media. The solubilization of fenofibrate by 13 phospholipids, 11 fatty acids and 2 monoglycerides was studied by an in vitro model of the upper GI tract. The main trends were verified with progesterone and danazol. It was revealed that to alter drug solubilization in biorelevant media, the polar lipids must form mixed colloidal aggregates with the bile. Such aggregates are formed when: (1) the polar lipid is used at a sufficiently high concentration (relative to its mixed critical micellar concentration) and (2) its hydrophobic chain has a melting temperature (T_m) < 37 °C. When these two conditions are met, the increased polar lipid chain length increases the drug solubilization capacity. Hence, long chain (C18) unsaturated polar lipids show best drug solubilization, due to the combination of long chain length and low T_m . Polar lipids with T_m significantly higher than 37 °C (e.g. C16 and C18 saturated compounds) do not impact drug solubilization in biorelevant media, due to limited association in mixed colloidal aggregates. The hydrophilic head group also has a dramatic impact on the drug solubilization enhancement, with polar lipids performance decreasing in the order [choline phospholipids] $>$ [monoglycerides] $>$ [fatty acids]. As both the acyl chain and head group types are structural features of the polar lipids, and not of the solubilized drugs, the described trends in drug solubilization should hold true for a variety of hydrophobic molecules.

Въпреки широкото използване на липиди за помощни вещества както във фундаментални изследвания, така и при разработването на перорални лекарствени форми, все още липсват рационалните насоки за техния подбор. В настоящото изследване ние имаме за цел да установим връзката между молекулната структура на често използвани полярни липиди и разтварянето на лекарства в стомашно-чревния тракт. Ефектът на 13 фосфолипиди, 11 мастни киселини и 2 моноглицериди върху разтварянето на фенофибрат беше изследван чрез in vitro модел на стомашно-чревния тракт. Основните тенденции бяха потвърдени с прогестерон и даназол. Беше разкрито, че за да се промени солубилизацията на лекарството при тези условия, полярните липиди трябва да образуват смесени колоидни агрегати с жлъчните соли. Такива агрегати се образуват, когато: (1) концентрацията на полярния липид е достатъчно висока (спрямо смесената му критична мицелна концентрация) и (2) хидрофобната му верига има температура на топене (T_m) < 37 °C. Когато тези две условия са изпълнени, увеличената дължина на хидрофобната опашка на липиди увеличава солубилизационния капацитет. Следователно, ненаситените полярни липиди с дълга верига (C18) показват най-висока солубилизация на лекарствени молекули, поради комбинацията от дълга дължина на веригата и ниска T_m . Полярните липиди с T_m значително по-високи от 37 °C (напр. C16 и C18 наситени съединения) не влияят върху солубилизацията на лекарства в присъствие на жлъчни соли, поради ограничената асоциация в смесени колоидни агрегати. Хидрофилната група на главата също има силно въздействие върху солубилизационния капацитет, като ефективността на полярните липиди намалява в реда [холинови фосфолипиди] $>$ [моноглицериди] $>$ [мастни киселини]. Тъй като хидрофобната опашка и хидрофилната глава са структурни характеристики на полярните липиди, а не на солубилизираните лекарствени вещества, описаните тенденции в солубилизацията се очаква да важат за хидрофобни лекарствени молекули с различен строеж.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствните форми)

5. Solubilization of Itraconazole by Surfactants and Phospholipid-Surfactant Mixtures: Interplay of Amphiphile Structure, pH and Electrostatic Interactions. Z. Vinarov*, G. Gancheva, N. Burdzhiev, S. Tcholakova, **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** 57 (2020) 101688; doi: 10.1016/j.jddst.2020.101688

IF = 4.0 (Q2); 1 цитат

Although surfactants are frequently used in enabling formulations of poorly water-soluble drugs, the link between their structure and drug solubilization capacity is still unclear. We studied the solubilization of the “brick-dust” molecule itraconazole by 16 surfactants and 3 phospholipid:surfactant mixtures. NMR spectroscopy was used to study in more details the drug-surfactant interactions. Very high solubility of itraconazole (up to 3.6 g/L) was measured in anionic surfactant micelles at pH = 3, due to electrostatic attraction between the oppositely charged (at this pH) drug and surfactant molecules. ¹H NMR spectroscopy showed that itraconazole is ionized at two sites (2+ charge) at these conditions: in the phenoxy-linked piperazine nitrogen and in the dioxolane-linked triazole ring. The increase of amphiphile hydrophobic chain length had a markedly different effect, depending on the amphiphile type: the solubilization capacity of single-chain surfactants increased, whereas a decrease was observed for double-chained surfactants (phosphatidylglycerols). The excellent correlation between the chain melting temperatures of phosphatidylglycerols and itraconazole solubilization illustrated the importance of hydrophobic chain mobility. This study provides rules for selection of itraconazole solubilizers among classical single-chain surfactants and phospholipids. The basic physics underpinning the described effects suggests that these rules should be transferrable to other “brick-dust” molecules.

Въпреки че повърхностно-активните вещества (ПАВ) често се използват за създаване на лекарство-доставящи системи за слабо разтворими във вода лекарствени вещества, връзката между тяхната структура и способността за разтваряне на лекарството все още е неясна. Изследвахме солубилизацията на амфифобното вещество итраконазол от 16 ПАВ и 3 смеси фосфолипид:ПАВ. ЯМР спектроскопия беше използвана за по-подробно изследване на взаимодействията лекарство-ПАВ. Измерена беше много висока разтворимост на итраконазол (до 3.6 g/L) в анионни мицели на ПАВ при pH = 3, поради електростатично привличане между противоположно заредените (при това pH) лекарство и молекули на ПАВ. ¹H ЯМР спектроскопията показва, че итраконазол е йонизиран на две позиции (2+ заряд) при тези условия: във фенокси-свързания пиперазинов азот и в диоксолан-свързания триазолов пръстен. Увеличаването на дължината на амфифилната хидрофобна верига имаше различен ефект, в зависимост от типа на ПАВ: солубилизационния капацитет на едноверижните ПАВ се увеличава, докато се наблюдава намаление при двуверижните ПАВ (фосфатидилглицероли). Отличната корелация между температурите на топене на веригата на фосфатидилглицеролите и солубилизацията на итраконазол показва колко е важно хидрофобната верига да бъде гъвкава. Това проучване предоставя правила за избор на класическите едноверижни ПАВ и фосфолипиди за солубилизация на итраконазол. Фундаменталните принципи, на които се дължат описаните ефекти, предполагат, че тези правила могат да важат и за други молекули амфифобни молекули.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствените форми)

6. Role of lysophospholipids on the interfacial and liquid film properties of enzymatically modified egg yolk solutions. D. Gazolu-Rusanova, F. Mustan, Z. Vinarov, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, J.W.J. de Folter. **Food Hydrocolloids**, 99 (2020), doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105319

IF = 9.2 (Q2); 3 цитата

This study aims to clarify and explain the similarities and differences in the behavior of adsorption layers of native egg yolk (EY) and enzymatically modified egg yolk (MEY) at a soybean oil-water interface. For this purpose, the interfacial tension and the surface dilatational modulus of EY and MEY solutions are measured and compared. The interactions between two adsorption layers, formed from these solutions on an oil-water or air-water interface, are also studied by optical observations of thin foam and emulsion films, formed in a capillary cell. The chemical composition, the electrophoretic mobility of the molecular aggregates, and the rheological properties of the egg yolk solutions are also characterized. Adsorption layers formed from MEY solutions display a faster rate of adsorption, lower dilatational surface moduli and higher equilibrium surface tension. The enzymatic modification of egg yolk also leads to formation of much thinner foam and emulsion films and to faster film thinning. The observed differences between EY and MEY are explained by assuming that the interfacial properties of MEY are governed mostly by the lysophospholipids and oleic acid, which appear as reaction products of the enzymatic modification of EY. The latter assumption is unambiguously proven by chemical analysis of the MEY solutions and by deliberate addition of lysophospholipids and oleic acid to the non-modified EY solutions. Even at relatively low concentrations, the lysophospholipids and oleic acid change the interfacial and film properties of the EY solutions, making them very similar to those of the enzymatically modified egg yolk.

Това проучване има за цел да изясни и обясни приликите и разликите в поведението на адсорбционните слоеве от яйчен жълтък (EY) и ензимно модифициран яйчен жълтък (MEY) на границата между соево масло и вода. За тази цел беше измерено и сравнено междуфазовото напрежение и повърхностния модул на разширение на разтворите на EY и MEY. Взаимодействията между адсорбционни слоеве образувани от тези разтвори на границите масло-вода и въздух-вода бяха изследвани чрез оптични наблюдения на пенни и емулсионни филми, образувани в капиларна клетка. Охарактеризиран беше и химичният състав, електрофоретичната подвижност на молекулните агрегати и реологичните свойства на разтворите от яйчен жълтък. Адсорбционните слоеве, образувани от разтвори на MEY показват по-висока скорост на адсорбция, по-ниски дилатационни повърхностни модули и по-високо равновесно повърхностно напрежение. Ензимното модифициране на жълтъка води до образуване на много по-тънки пенни и емулсионни филми и до по-бързо изтъняване на филма. Наблюдаваните разлики между EY и MEY се обясняват с доминирането на междуфазовите свойства на MEY от лизофосфолипидите и олеиновата киселина, които се получават в следствие на ензимната модификация на EY. Последното предположение е недвусмислено доказано чрез химичен анализ на разтворите на MEY и чрез умишлено добавяне на лизофосфолипиди и олеинова киселина към немодифицираните разтвори на EY. Дори при относително ниски концентрации, лизофосфолипидите и олеиновата киселина променят междуфазовите свойства и тънките течни филми на разтворите на EY, правейки ги много подобни на тези на ензимно модифицирания яйчен жълтък.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствните форми)

7. Successful Oral Delivery of Poorly Water-soluble Drugs Both Depends on The Intraluminal Behavior of Drugs and of Appropriate Advanced Drug Delivery Systems. B. J. Boyd, C. A.S. Bergström, Z. Vinarov, M. Kuentz, J. Brouwers, P. Augustijns, M. Brandl, A. Bernkop-Schnürch, N. Shrestha, V. Préat, A. Müllertz, A. Bauer-Brandl, V. Jannin, **Eur. J. Pharm. Sci.** 137 (2019); doi: 10.1016/j.ejps.2019.104967

IF = 4.4 (Q2); 77 цитата

Poorly water-soluble drugs continue to be a problematic, yet important class of pharmaceutical compounds for treatment of a wide range of diseases. Their prevalence in discovery is still high, and their development is usually limited by our lack of a complete understanding of how the complex chemical, physiological and biochemical processes that occur between administration and absorption individually and together impact on bioavailability. This review defines the challenge presented by these drugs, outlines contemporary strategies to solve this challenge, and consequent *in silico* and *in vitro* evaluation of the delivery technologies for poorly water-soluble drugs. The next steps and unmet needs are proposed to present a roadmap for future studies for the field to consider enabling progress in delivery of poorly water-soluble compounds.

Лекарствените вещества с много ниска разтворимост във вода продължават да бъдат проблемни, но същевременно важен клас фармацевтични съединения за лечение на широк спектър от заболявания. Разпространението им във фазата на откриване на нови лекарства все още е високо и тяхното разработване до краен лекарствен продукт обикновено е ограничено от липсата на пълно разбиране за това как сложните химични, физиологични и биохимични процеси, които протичат между прилагането и абсорбцията поотделно и заедно, влияят върху бионаличността. Този преглед охарактеризиране трудностите поставени от тези лекарства, очертава съвременните стратегии за решаване на тези проблеми и описва *in silico* и *in vitro* методите за изследване на технологиите за доставяне на слабо разтворими във вода лекарства. Открояването на потенциалните следващи стъпки и липсващото знание в областта позволяват очертаването на пътна карта за бъдещи проучвания в областта, които могат да донесат напредък при оралното доставяне на слабо разтворими във вода съединения.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствните форми)

- Effect of Surfactant–Bile Interactions on the Solubility of Hydrophobic Drugs in Biorelevant Dissolution Media. Z. Vinarov*, V. Katev, N. Burdzhiev, S. Tcholakova, N. Denkov, **Mol. Pharm.** 15 (2018) 5741–5753 doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00884

IF = 4.9 (Q2); 9 цитата

Biorelevant dissolution media (BDM) methods are commonly employed to investigate the oral absorption of poorly water-soluble drugs. Despite the significant progress in this area, the effect of commonly employed pharmaceutical excipients, such as surfactants, on the solubility of drugs in BDM has not been characterized in detail. The aim of this study is to clarify the impact of surfactant-bile interactions on drug solubility by using a set of 12 surfactants, 3 model hydrophobic drugs (fenofibrate, danazol, and progesterone) and two types of BDM (porcine bile extract and sodium taurodeoxycholate). Drug precipitation and sharp nonlinear decrease in the solubility of all studied drugs is observed when drug-loaded ionic surfactant micelles are introduced in solutions of both BDM, whereas the drugs remain solubilized in the mixtures of nonionic polysorbate surfactants + BDM. One-dimensional and diffusion-ordered ¹H NMR spectroscopy show that mixed bile salt + surfactant micelles with low drug solubilization capacity are formed for the ionic surfactants. On the other hand, separate surfactant-rich and bile salt-rich micelles coexist in the nonionic polysorbate surfactant + bile salt mixtures, explaining the better drug solubility in these systems. The nonionic alcohol ethoxylate surfactants show intermediate behavior. The large dependence of the drug solubility on surfactant-bile interactions (in which the drug molecules do not play a major role per se) highlights how the complex interplay between excipients and bile salts can significantly change one of the key parameters which governs the oral absorption of poorly water-soluble drugs, viz. the drug solubility in the intestinal fluids.

Ин витро изследванията на оралната абсорбция на слабо разтворими във вода лекарства най-често се провежда в среда със свойства близки то тези в стомашно-чревния тракт (BDM). Въпреки значителния напредък в тази област, ефектът на често използвани помощни вещества, като повърхностно-активните вещества (ПАВ), върху разтворимостта на лекарствата в BDM не е описан подробно. Целта на това изследване е да се изясни въздействието на взаимодействията на ПАВ с жлъчните соли върху солубилизацията на лекарства, като за целта се използва набор от 12 ПАВ, 3 моделни хидрофобни лекарства (фенофибрат, даназол и прогестерон) и два вида BDM (екстракт от свинска жлъчка и натриев тауродеоксихолат). Утаяване на лекарството и рязко нелинейно намаляване на солубилизацията на всички изследвани лекарства се наблюдава, когато натоварените с лекарство йонни мицели на ПАВ се смесят с BDM, докато лекарствата остават солубилизирани в случаите когато нейонни ПАВ от групата на полисорбатите се смесят с BDM. Резултатите от ЯМР спектроскопия показваха, че йонните ПАВ образуват с жлъчните соли смесени мицели с нисък солубилизационен капацитет. От друга страна, отделни мицели, богати на ПАВ или богати на жлъчни соли, съществуват едновременно в смеси от нейонни ПАВ и жлъчни соли, което обяснява по-добрата солубилизация на лекарството в тези системи. Нейонните ПАВ от групата на етоксиланите алкохоли показват междинно поведение. Голямата зависимост на солубилизацията на лекарството от взаимодействията ПАВ-жлъчни соли (при която молекулите на лекарството сами по себе си не играят основна роля) подчертава, че сложното взаимодействие между помощните вещества и жлъчните соли може значително да промени един от ключовите параметри, които определят пероралната бионаличност на слабо разтворими във вода лекарства, а именно: солубилизацията на лекарството в чревните течности.

9. Albendazole Solution Formulation via Vesicle-To-Micelle Transition of Phospholipid-Surfactant Aggregates. Z. Vinarov*, G. Gancheva, V. Katev, S. Tcholakova. **Drug. Dev. Ind. Pharm.** (2018) doi: 10.1080/03639045.2018.1438461

IF = 3.2 (Q3); 3 цитата

Objective: To reveal the physicochemical mechanisms governing the solubilization of albendazole in surfactant and phospholipid-surfactant solutions and, on this basis, to formulate clinically relevant dose of albendazole in solution suitable for parenteral delivery.

Significance: (1) A new drug delivery system for parenteral delivery of albendazole is proposed, offering high drug solubility and low toxicity of the materials used; (2) New insights on the role of surface curvature on albendazole solubilization in surfactant and surfactant-phospholipid aggregates are provided.

Methods: The effect of 17 surfactants and 6 surfactant-phospholipid mixtures on albendazole solubility was studied. The size of the colloidal aggregates was determined by light-scattering. The dilution stability of the proposed formulation was assessed by experiments with model human serum.

Results: Anionic surfactants increased very strongly drug solubility at pH = 3 (up to 4 mg/mL) due to strong electrostatic attraction between the oppositely charged (at this pH) drug and surfactant molecules. This effect was observed with all anionic surfactants studied, including sodium dodecyl sulfate, double chain sodium dioctylsulfosuccinate (AOT), and the bile salt sodium taurodeoxycholate. The phospholipid-surfactant mixture of 40% sodium dipalmitoyl-phosphatidylglycerol +60% AOT provided highest albendazole solubilization (4.4 mg/mL), smallest colloidal aggregate size (11 nm) and was stable to dilution with model human serum at (and above) 1:12 ratio.

Conclusions: A new albendazole delivery system with high drug load and low toxicity of the materials used was developed. The high solubility of albendazole was explained with vesicle-to-micelle transition due to the larger interfacial curvature preferred for albendazole solubilization locus.

Цел: Да се разкрият физико-химичните механизми, регулиращи солубилизацията на албендазол в разтвори на повърхностно-активни вещества (ПАВ) и фосфолипид-ПАВ и на тази основа да се приготвят лекарствени форми съдържащи клинично значими дози албендазол в разтвор, подходящ за парентерално доставяне.

Значение: (1) Предлага се нова система за парентерално доставяне на албендазол, предлагаща висока разтворимост на лекарството и ниска токсичност на използваните материали; (2) Разкрита е ролята на повърхностната кривина за солубилизацията на албендазол в ПАВ и ПАВ-фосфолипидни агрегати.

Методи: Изследван е ефектът на 17 ПАВ и 6 смеси ПАВ-фосфолипид върху разтворимостта на албендазол. Размерът на колоидните агрегати беше определен чрез светоразсейване. Стабилността на разреждане на предложената форма беше оценена чрез експерименти с моделен човешки серум.

Резултати: Анионните ПАВ увеличават много силно солубилизацията на лекарството при pH = 3 (до 4 mg/mL) поради силно електростатично привличане между противоположно зареденото (при това pH) лекарство и молекулите на ПАВ. Този ефект се наблюдава при всички изследвани анионни ПАВ, включително натриев додецил сулфат, двуверижен натриев диоктилсулфосукцинат (AOT) и жлъчната сол натриев тауродооксихолат. Сместа фосфолипид-ПАВ от 40% натриев дипалмитоил-фосфатидилглицерол + 60% AOT осигурява най-висока солубилизация на албендазол (4.4 mg/mL), най-малък размер на колоидните агрегати (11 nm) и е стабилна за разреждане с моделен човешки серум при (и над) съотношения от 1:12.

Заключения: Разработена е нова система за доставяне на албендазол с висока концентрация на лекарство и ниска токсичност на използваните материали. Високата солубилизация на албендазол се обяснява с прехода от везикули към мицели поради по-голямата кривина на повърхността, предпочитана от локуса на солубилизация на албендазол.

10. Effect of Surfactant Molecular Structure on Progesterone Solubilization. Z. Vinarov*, P. Dobрева, S. Tcholakova. **J. Drug. Deliv. Sci. Tec.**, 43 (2018) 44–49; doi: 10.1016/j.jddst.2017.09.014
IF = 4.0 (Q2); 13 цитата

Progesterone is a hydrophobic drug ($\text{LogP} = 3.9$) with solubility-limited oral bioavailability. One approach to improve its aqueous solubility is by solubilization in micellar surfactant solutions. We investigate systematically the effect of surfactant molecular structure on Progesterone solubility by using a set of 17 surfactants with different hydrophilic head group charge and variable hydrophobic chain length. Charged surfactants showed highest solubilization capacity, increasing Progesterone solubility from 0.01 mg/mL to above 3 mg/mL, whereas all nonionic surfactants had much smaller effect (0.5–1 mg/mL Progesterone solubility). The high solubilization of Progesterone in charged surfactant micelles was explained by ion-dipole interactions in the micelle palisade layer. The increase of hydrophobic chain length improved drug solubilization for all studied surfactants, regardless of the type and charge of the hydrophilic head. In respect to the effect of hydrophilic head group, the solubilization capacity of C-12 surfactants decreased in the order $\text{SO}_4^- > \text{E}_1\text{SO}_4^- > ^+\text{N}(\text{CH}_3)_3 > \text{E}_3\text{SO}_4^- > \text{SorbEO}_{20} = \text{E}_{10} = \text{E}_{23}$. Therefore, the best candidates to improve oral Progesterone absorption through solubility enhancement are surfactants with long hydrophobic chain and charged hydrophilic head group (*e.g.* alkylsulfates).

Прогестеронът е хидрофобно лекарство ($\text{LogP} = 3.9$), чиято перорална бионаличност е ограничена от ниската му разтворимост във вода. Един подход за подобряване на разтворимостта му във вода е чрез солубилизация в мицеларни разтвори на повърхностно активно вещество (ПАВ). Ние изследваме систематично ефекта на молекулярната структура на ПАВ върху солубилизацията на прогестерон, като използваме набор от 17 ПАВ с различен заряд на хидрофилната глава и различна дължина на хидрофобната верига. Заредените ПАВ показват най-висока солубилизация, увеличавайки разтворимостта на прогестерон от 0.01 mg/mL до над 3 mg/mL, докато всички нейонни ПАВ имат много по-малък ефект (0.5–1 mg/mL разтворимост на прогестерон). Значителната солубилизация на прогестерон в заредени мицели на ПАВ се обяснява с йон-диполни взаимодействия в палисидния слой на мицелите. Увеличаването на дължината на хидрофобната верига подобрява солубилизацията на лекарството за всички изследвани ПАВ, независимо от вида и заряда на хидрофилната глава. По отношение на ефекта от вида на хидрофилната глава, солубилизационният капацитет на ПАВ с дължина на опашката от C-12 намалява в реда $\text{SO}_4^- > \text{E}_1\text{SO}_4^- > \text{N}(\text{CH}_3)_3^+ > \text{E}_3\text{SO}_4^- > \text{SorbEO}_{20} = \text{E}_{10} = \text{E}_{23}$. Следователно, най-добрите кандидати за подобряване на пероралната бионаличност на прогестерон чрез повишаване на разтворимостта са ПАВ с дълга хидрофобна верига и заредена хидрофилна група на главата (например алкилсулфати).

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствените форми)

11. Micellar Solubilization of Poorly Water-soluble Drugs: Effect of Surfactant and Solubilizate Molecular Structure. Z. Vinarov*, V. Katev, D. Radeva, S. Tcholakova, N. Denkov. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, 44 (2018) 677–686 doi: 10.1080/03639045.2017.1408642

IF = 3.2 (Q3); 44 цитата

Objective: This study aims to clarify the role of surfactant and drug molecular structures on drug solubility in micellar surfactant solutions.

Significance: (1) Rationale for surfactant selection is provided; (2) the large data set can be used for validation of the drug solubility parameters used in oral absorption models.

Methods: Equilibrium solubility of two hydrophobic drugs and one model hydrophobic steroid in micellar solutions of 19 surfactants was measured by HPLC. The drug solubilization locus in the micelles was assessed by UV spectrometry.

Results: Danazol is solubilized much more efficiently than fenofibrate by ionic surfactants due to ion-dipole interactions between the charged surfactant head groups and the polar steroid backbone. Drug solubilization increases linearly with the increase of hydrophobic chain length for all studied surfactant types. Addition of 1-3 ethylene oxide (EO) units in the head group of dodecyl sulfate surfactants reduces significantly the solubilization of both studied drugs and decreases linearly the solubilization locus polarity of fenofibrate. The locus of fenofibrate solubilization is in the hydrophobic core of nonionic surfactant micelles and in the palisade layer of ionic surfactant micelles.

Conclusions: Highest drug solubility can be obtained by using surfactants molecules with long chain length coupled with hydrophilic head group that provides additional drug-surfactant interactions (i.e. ion-dipole) in the micelles.

Цел: Това изследване има за цел да изясни ролята на молекулните структури на повърхностно-активното вещество (ПАВ) и лекарственото вещество върху солюбилизацията в мицеларни разтвори на ПАВ.

Значение: (1) Представена е обосновка за подбора на ПАВ; (2) големият набор от данни може да се използва за валидиране на параметрите на разтворимостта на лекарството, използвани в оралните модели за резорбция.

Методи: Равновесната разтворимост на две хидрофобни лекарства и едно моделно хидрофобно стероидно вещество в мицеларни разтвори на 19 вида ПАВ беше измерена чрез HPLC. Локусът на солюбилизация на лекарството в мицелите беше изследван чрез UV спектрометрия.

Резултати: Даназол се солюбилизира много по-ефективно от фенофибрат в разтвори на йонни ПАВ поради йон-диполните взаимодействия между заредените хидрофилни глави на ПАВ и полярната стероидна структура на даназол. Солюбилизацията на лекарствата се увеличава линейно с увеличаването на дължината на хидрофобната верига за всички изследвани типове ПАВ. Добавянето на 1-3 етиленоксидни (ЕО) звена към хидрофилната глава на ПАВ от групата на додецил сулфатите намалява значително солюбилизацията на двете изследвани лекарства и намалява линейно полярността на локуса на солюбилизация на фенофибрат. Локусът на солюбилизация на фенофибрат е в хидрофобното ядро на нейонните мицели на ПАВ и в палисадния слой на йонните мицели на ПАВ.

Заклучения: Най-висока разтворимост на лекарствата може да се постигне чрез използване на молекули на ПАВ с дълга хидрофобна верига, съчетана с хидрофилна глава, която осигурява допълнителни взаимодействия лекарство-ПАВ (т.е. йон-дипол) в мицелите.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствените форми)

12. Solubilisation of Hydrophobic Drugs by Saponins. Z. Vinarov*, D. Radeva, V. Katev, S. Tcholakova, N. Denkov. **Ind. J. Pharm. Sci.** 80 (2018) 709–718

IF = 1.0 (Q4); 6 цитата

Poor aqueous solubility limits the bioavailability of hydrophobic drugs. Thus, there is an increasing interest in new micelle-forming, drug-solubilizing molecules that can offer improved effectiveness and safety. The effect of 13 saponin extracts on the solubility of fenofibrate and danazol was studied and the relationship between saponin molecular structure and drug solubilisation capacity was assessed. Drug solubility was measured by high-performance liquid chromatography and saponin solubilisation capacity was compared to the conventional surfactant Brij-35. Saponins from *Quillaja saponaria* and *Camellia oleifera* improved the aqueous solubility of danazol and fenofibrate by more than two orders of magnitude. For danazol, the solubilisation capacity of the best saponins was 2-3 times higher than Brij-35, whereas for fenofibrate it was slightly lower than the reference surfactant. Both drugs were solubilized very effectively by bidesmosidic oleanane saponins, whereas dammarane, mono- and tri-desmosidic oleanane saponins and steroid (furostanol and spirostanol) saponins had no effect on drug solubility. Exceptions were fenusterol, a furostanol saponin and escin, a monodesmosidic oleanane saponin, which solubilized danazol only.

Ниската разтворимост във вода ограничава бионаличността на хидрофобните лекарства. Поради това има нарастващ интерес към нови мицелообразуващи молекули, които могат да солубилизират лекарствата и така подобряват тяхната ефективност и безопасност. Изследван е ефектът на 13 екстракта от сапонини върху солубилизацията на фенофибрат и даназол и е оценена връзката между молекулната структура на сапонина и солубилизационния капацитет. Разтворимостта на лекарствата беше измерена чрез високоефективна течна хроматография, а солубилизационния капацитет беше сравнен с този на конвенционалното повърхностно-активно вещество Brij-35. Сапонините от *Quillaja saponaria* и *Camellia oleifera* подобряват разтворимостта във вода на даназол и фенофибрат с повече от два порядъка. За даназол солубилизационният капацитет на най-добрите сапонини е 2-3 пъти по-висок от Brij-35, докато за фенофибрат е малко по-нисък от този на референтното повърхностно-активно вещество. И двете лекарства се солубилизират много ефективно от бидесмозидни олеананови сапонини, докато дамарановите, моно- и три-десмозидните олеананови сапонини, както и стероидните (фуростанол и спиростанол) сапонини нямат ефект върху разтворимостта на лекарствата. Изключение правят фенустерол (фуростанолов сапонин) и есцин – монодесмозиден олеананов сапонин – които солубилизират само даназол.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствните форми)

13. Efficient Self-Emulsification via Cooling-Heating Cycles. S. Tcholakova, Z. Valkova, D. Cholakova, Z. Vinarov, I. Lesov, N. D. Denkov, K. Smoukov. **Nature Comm.**, 8 (2017) 15012; doi: 10.1038/ncomms15012

IF = 14.9 (Q1); 10 цитата

In self-emulsification higher-energy micrometre and sub-micrometre oil droplets are spontaneously produced from larger ones and only a few such methods are known. They usually involve a one-time reduction in oil solubility in the continuous medium via changing temperature or solvents or a phase inversion in which the preferred curvature of the interfacial surfactant layer changes its sign. Here we harness narrow-range temperature cycling to cause repeated breakup of droplets to higher-energy states. We describe three drop breakup mechanisms that lead the drops to burst spontaneously into thousands of smaller droplets. One of these mechanisms includes the remarkable phenomenon of lipid crystal dewetting from its own melt. The method works with various oil–surfactant combinations and has several important advantages. It enables low surfactant emulsion formulations with temperature-sensitive compounds, is scalable to industrial emulsification and applicable to fabricating particulate drug carriers with desired size and shape.

При самоемулгиране, микрометрови и субмикрометрови маслени капки с по-висока енергия се получават спонтанно от по-големи капки, като са известни само няколко такива метода за получаване. Обикновено те включват еднократно намаляване на разтворимостта на маслото в непрекъснатата среда чрез промяна на температурата или разтворители или фазова инверсия, при която предпочитаната кривина на адсорбиционния слой на повърхностно-активното вещество (ПАВ) променя своя знак. Ние варираме циклично температурата в тесен диапазон, за да причиним многократно разпадане на капчиците до състояния с по-висока енергия. Предлагаме три механизма за обяснение на наблюдавания процес на емулгиране, при който капките спонтанно се пръсват на хиляди по-малки капчици. Един от тези механизми включва забележителното явление на отмокрянето на липидните кристали от собствената им стопилка. Методът работи с различни комбинации масло-ПАВ и има няколко важни предимства. Той позволява получаването на емулсии с ниска концентрация на ПАВ и чувствителни към температурата съединения, приложим е в промишлени условия и може да се използва за получаване на частичкови лекарствено-доставящи системи с контролиран размер и форма.

14. Mechanism of Lowering Cholesterol Absorption by Calcium Studied by In Vitro Digestion Model. L. Vinarova, Z. Vinarov, S. Tcholakova, N. D. Denkov, S. Stoyanov, A. Lips. **Food & Function** 7 (2016) 151–163.

IF = 5.4 (Q1); 18 цитата

Studies in humans show that a calcium-enriched diet leads to lower cholesterol in blood serum. This phenomenon is usually explained in the literature with a reduced cholesterol absorption in the small intestine. Our study aims to clarify the effect of calcium on the solubilisation of cholesterol and fatty acid in the dietary mixed micelles (DMM), *viz.* on the bioaccessibility of these lipophilic substances in the gut. We use an *in vitro* digestion model which mimics very closely the intestinal pH-profile and the composition of the intestinal fluids. We quantified the effects of Ca^{2+} concentration on the lipid solubilization for fats and oils with different saturated/unsaturated fatty acid (FA) contents. We found that the increase of calcium significantly decreases the solubilization of cholesterol, FA and MG. Most importantly, we observe a clear positive correlation between the amounts of solubilized cholesterol, on one side, and solubilized free fatty acids and monoglycerides, on the other side. The main conclusion is that Ca^{2+} ions strongly affect the bioaccessibility of both cholesterol and saturated FA. Therefore, calcium may decrease the serum cholesterol *via* two complementary mechanisms: (1) fatty acid precipitation by calcium ions reduces the solubilisation capacity of the DMM, thus decreasing the levels of solubilised (bioaccessible) cholesterol; (2) the observed strong decrease of the bioaccessible saturated FA, in its own turn, may suppress the cholesterol synthesis in the liver.

Проучванията при хора показват, че богатата на калций диета води до понижаване на холестерола в кръвния серум. Това явление обикновено се обяснява с намалена резорбция на холестерол в тънките черва. Нашето проучване има за цел да изясни ефекта на калция върху солубилизацията на холестерола и мастните киселини в смесените мицели (DMM), т.е. върху биодостъпността на тези липофилни вещества в червата. За целта използваме *ин витро* модел на храносмилане, който наподобява чревния pH-профил и състава на чревните течности. Определихме количествено ефекта на концентрацията на Ca^{2+} върху солубилизацията на липиди, използвайки мазнини и масла с различно съдържание на наситени/ненаситени мастни киселини (FA). Открихме, че увеличаването на калция значително намалява солубилизацията на холестерол, FA и моноглицериди (MG). Важно е да се отбележи, че се наблюдава ясна положителна корелация между количествата солубилизиран холестерол, от една страна, и солубилизираните свободни мастни киселини и моноглицериди, от друга страна. Основният извод е, че Ca^{2+} йоните влияят силно върху биодостъпността както на холестерола, така и на наситените мастни киселини. Следователно, калцият може да намали серумния холестерол чрез два допълващи се механизма: (1) утаяването на мастни киселини от калциеви йони намалява солубилизационния капацитет на DMM, като по този начин намалява нивата на солубилизиран (биодостъпен) холестерол; (2) наблюдаваното силно намаляване на биодостъпността на наситените мастни киселини, от своя страна, може да потисне синтеза на холестерол в черния дроб.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствените форми)

15. Improving Ibuprofen Solubility by Surfactant-Facilitated Self-Assembly into Mixed Micelles. K. Stoyanova, Z. Vinarov*, S. Tcholakova. **J. Drug. Deliv. Sci. Tec.** 36 (2016) 208–215.

IF = 4.0 (Q2); 28 цитата

Ibuprofen is a poorly water-soluble drug, characterized by dissolution-limited oral bioavailability. One approach to improve its water solubility and bioavailability is by solubilizing it in micellar surfactant solutions. Here we investigate the effect of the surfactant type and the mechanism of solubility enhancement of Ibuprofen in surfactant solutions. The equilibrium Ibuprofen solubility in solutions of six surfactants was determined by HPLC. The nonionic surfactant polysorbate 80 (Tween 80), and the anionic surfactants sodium dodecyl sulfate (SDS) and sodium lauryl ethoxy (3) sulfate (SLES-3EO) improve the Ibuprofen solubility by a factor of 200, as compared to the solubility in water. The highest Ibuprofen solubility is observed in SDS and SLES-3EO solutions, containing 0.6 M NaCl. The mole fraction of Ibuprofen in the micelles and the transfer energy of Ibuprofen molecules from the aqueous phase into the micelle environment were determined by thermodynamic analysis of the solubility data. The maximum Ibuprofen mole fraction in the micelles of all studied surfactants is exceptionally high (between 0.4 and 0.6). Thus we can conclude that the main mechanism of Ibuprofen solubility enhancement is self-assembly within mixed micelles with the main surfactant. The energy of co-micellization is estimated to be around 14 kT per Ibuprofen molecule.

Ибупрофен е слабо разтворимо във вода лекарство вещество (ЛВ), характеризиращо се с ограничена перорална бионаличност. Един подход за подобряване на неговата разтворимост във вода и бионаличността е чрез солюбилизацията му в мицеларни разтвори на повърхностно-активни вещества (ПАВ). Тук изследваме ефекта от типа на ПАВ и механизма на повишаване на разтворимостта на ибупрофен в разтвори на ПАВ. Равновесната разтворимост на ибупрофен в разтвори на шест вида ПАВ беше определен чрез HPLC. Нейногенното ПАВ полисорбат 80 (Tween 80) и анионните ПАВ натриев додецил сулфат (SDS) и натриев лаурил етоксид (3) сулфат (SLES-3EO) подобряват разтворимостта на ибупрофен 200 пъти, в сравнение с разтворимостта във вода. Най-висока разтворимост на ибупрофен се наблюдава в разтвори на SDS и SLES-3EO, съдържащи 0.6 M NaCl. Молната част на ибупрофен в мицелите и енергия за пренос на молекулите на ибупрофен от водната фаза в мицеларната псевдофаза бяха определени чрез термодинамичен анализ на данните за разтворимостта. Максималната молна част на ибупрофен в мицелите на всички изследвани ПАВ е изключително висока (между 0.4 и 0.6). Следователно може да се направи заключението, че основният механизъм за повишаване на разтворимостта на ибупрофен е неговото самоасоцииране в смесени мицели с основния ПАВ. Енергията на ко-мицелизацията беше оценена на около 14 kT на молекула ибупрофен.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствените форми)

16. Lowering of Cholesterol Bioaccessibility and Serum Concentrations by Saponins: in Vitro and in Vivo Studies. L. Vinarova, Z. Vinarov, V. Atanasov, I. Pantcheva, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov. **Food & Function** 6 (2015) 501–512.

IF = 5.4 (Q1); 31 цитата

Using an in vitro digestion model, we studied the effect of six saponin extracts on the bioaccessibility of cholesterol and saturated fatty acids (SFAs). In the absence of saponins, around 78% of the available cholesterol was solubilized in the simulated intestinal fluids. The addition of two extracts, Quillaja Dry (QD) and Sapindin (SAP), was found to decrease cholesterol bioaccessibility to 19% and 44%, respectively. For both extracts, the main mechanism of this effect is the displacement of cholesterol molecules from the bile salt micelles, leading to formation of cholesterol precipitates that cannot pass through the mucus layer of the intestine. QD decreased strongly the SFA bioaccessibility as well, from 69 to 9%, due to formation of calcium-SFA precipitates, while SAP had no effect on SFA. We studied the in vivo activity of QD and SAP extracts by measuring serum cholesterol in mice fed with experimental diets within a 7-day period. Both extracts were found to prevent dietary hypercholesterolemia in mice fed on a cholesterol-rich diet. The other saponin extracts did not show any significant effect in vitro and, therefore, were not studied in vivo. The cholesterol lowering ability of Sapindin extract is reported for the first time in the current study.

Използвайки in vitro модел на храносмилане, ние изследвахме ефекта на шест сапонинови екстракта върху биодостъпността на холестерол и наситени мастни киселини (SFAs). В отсъствие на сапоници, около 78% от наличния холестерол се солубилизира в симулираните чревни течности. Установено е, че добавянето на два екстракта, Quillaja Dry (QD) и Sapindin (SAP) намалява биодостъпността на холестерола съответно до 19% и 44%. Основният механизъм на този ефект за двата екстракта е изместването на молекулите на холестерол от мицелите на жлъчните соли, което води до утаяването на холестерол и пречи на неговото преминаване през мукусния слой в червата. QD намалява силно и биодостъпността на SFA, от 69 на 9%, поради образуването на преципитати от калциеви йони и SFA, докато SAP няма ефект върху SFA. Изследвахме in vivo активността на QD и SAP екстракти чрез измерване на серумния холестерол при мишки, хранени с експериментални диети в рамките на 7-дневен период. Установено е, че и двата екстракта предотвратяват хиперхолестеролемията при мишки, хранени с диета, богата на холестерол. Другите екстракти от сапонин не показват значителен ефект in vitro и следователно не са изследвани in vivo. Способността за понижаване на холестерола на екстракт от сапиндин беше установена за първи път в настоящото проучване.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствните форми)

17. Mechanisms of Cholesterol and Saturated Fatty Acid Lowering by Quillaja saponaria Extract, Studied by in vitro Digestion Model. L. Vinarova, Z. Vinarov, B. Damyanova, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov. **Food & Function** 6 (2015) 1319–1330.

IF = 5.4 (Q1); 11 цитата

Quillaja saponin extracts are known to reduce plasma cholesterol levels in humans. Here we study the mechanism of this effect with Quillaja Dry saponin extract (QD). In vitro model of triglyceride lipolysis is used to quantify the effect of QD on the solubilization of cholesterol and of the lipolysis products (fatty acids and monoglycerides) in the dietary mixed micelles (DMM). We found that QD extract decreases significantly both the cholesterol (from 80% to 20%) and saturated fatty acids (SFA, from 70% to 10%) solubilised in DMM. Series of dedicated experiments prove that QD may act by two mechanisms: (1) direct precipitation of cholesterol and (2) displacement of cholesterol from the DMM. Both mechanisms lead to increased cholesterol precipitation and, thus, render cholesterol bio-inaccessible. We prove also that the saponin molecules are not the active component of QD, because highly purified Quillaja extract with very similar saponin composition does not exhibit cholesterol-lowering or SFA-lowering effect. The effect of QD extract on cholesterol solubilisation is most probably caused by the high-molecular weight polyphenol molecules, present in this extract. The reduced SFA solubilisation is caused by Ca(2+) ions of relatively high concentration (1.25 wt%), also present in QD extract, which precipitate the fatty acids into calcium soaps.

Известно е, че екстрактите от Quillaja сапонин намаляват плазмените нива на холестерол при хората. Тук изучаваме механизма на този ефект с Quillaja Dry сапонинов екстракт (QD). In vitro модел на триглицеридна липолиза беше използван за количествено определяне на ефекта на QD върху солюбилизацията на холестерол и на продуктите на липолизата (мастни киселини и моноглицериди) в смесените мицели (DMM). Открихме, че екстрактът от QD намалява значително както холестерола (от 80% до 20%), така и наситените мастни киселини (SFA, от 70% до 10%), солюбилизирани в DMM. Чрез комбинация от експерименти беше доказано, че QD може да действа по два механизма: (1) директно утаяване на холестерола и (2) изместване на холестерола от DMM. И двата механизма водят до повишено утаяване на холестерола и по този начин правят холестерола био-недостъпен. Доказваме също, че молекулите на сапонина не са активният компонент на QD, тъй като силно пречистеният екстракт от Quillaja не проявява понижаващ холестерола или SFA-понижаващ ефект. Ефектът на екстракта QD върху солюбилизацията на холестерол най-вероятно се дължи на полифенолните молекули с високо молекулно тегло, присъстващи в този екстракт. Намалената солюбилизация на SFA се дължи на йони на Ca(2+) със сравнително висока концентрация (1.25 тегл.%), присъстващи в екстракта на QD, които утаяват мастните киселини под формата на калциеви сапуни.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствните форми)

18. Effects of Emulsifier Charge and Concentration on Pancreatic Lipolysis. 1. In the Absence of Bile Salts. Z. Vinarov, Y. Petkova, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, E. Pelan, A Lips, **Langmuir** 28 (2012) 8127-8139.

IF = 3.9 (Q2); 16 цитата

An in vitro study is performed with sunflower oil-in-water emulsions to clarify the effects of type of used emulsifier, its concentration, and reaction time on the degree of oil lipolysis, α . Anionic, nonionic, and cationic surfactants are studied as emulsifiers. For all systems, three regions are observed when surfactant concentration is scaled with the critical micelle concentration, C_s/cmc : (1) At $C_s < cmc$, $\alpha \approx 0.5$ after 30 min and increases up to 0.9 after 4 h. (2) At $C_s \approx 3 \times cmc$, $\alpha \approx 0.15$ after 30 min and increases steeply up to 0.9 after 2 h for the cationic and nonionic surfactants, whereas it remains around 0.2 for the anionic surfactants. (3) At C_s above certain threshold value, $\alpha = 0$ for all studied surfactants, for reaction time up to 8 h. Additional experiments show that the lipase hydrolyzes molecularly soluble substrate (tributirin) at $C_s \gg cmc$, which is a proof that these surfactants do not denature or block the enzyme active center. Thus, we conclude that the mechanism of enzyme inhibition by these surfactants is the formation of a dense adsorption layer on an oil drop surface, which displaces the lipase from direct contact with the triglycerides.

Проведено беше in vitro изследване с емулсии от слънчогледово масло във вода, за да се изяснят ефектите от вида на използвания емулгатор, неговата концентрация и времето за реакция върху степента на липолиза на маслото, α . Като емулгатори бяха използвани анионни, нейонни и катионни повърхностно-активни вещества (ПАВ). За всички системи се наблюдават три области, когато концентрацията на ПАВ се скалира с критичната мицелна концентрация, C_s/cmc : (1) При C_s/cmc , $\alpha \approx 0.5$ след 30 минути и се увеличава до 0.9 след 4 часа. (2) При $C_s \approx 3 \times cmc$, $\alpha \approx 0.15$ след 30 минути и нараства рязко до 0.9 след 2 часа за катионните и нейонните ПАВ, докато остава около 0.2 за анионните ПАВ. (3) Над определена прагова стойност на C_s , $\alpha = 0$ за всички изследвани ПАВ, за време на реакция до 8 часа. Допълнителни експерименти показват, че липазата хидролизира молекулно разтворимия субстрат (трибутирин) при $C_s \gg cmc$, което е доказателство, че тези ПАВ не денатурират или блокират активния център на ензима. По този начин може да се направи заключението, че механизмът на инхибиране на ензима от ПАВ е образуването на плътен адсорбционен слой върху повърхността на маслените капки, който не позволява директния контакт на липазата с триглицеридите.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствните форми)

19. Effects of Emulsifier Charge and Concentration on Pancreatic Lipolysis: 2. Interplay of Emulsifiers and Biles. Z. Vinarov, S. Tcholakova, B. Damyanova, Y. Atanasov, N. Denkov, S. Stoyanov, E. Pelan, A. Lips, **Langmuir** 28 (2012) 12140-12150. ***Journal Cover**

IF = 3.9 (Q2); 35 цитата

As a direct continuation of the first part of our in vitro study (Vinarov et al., Langmuir 2012, 28, 8127), here we investigate the effects of emulsifier type and concentration on the degree of triglyceride lipolysis, in the presence of bile salts. Three types of surfactants are tested as emulsifiers: anionic, nonionic, and cationic. For all systems, we observe three regions in the dependence degree of fat lipolysis, α , versus emulsifier-to-bile ratio, $f(s)$: α is around 0.5 in Region 1 ($f(s) < 0.02$); α passes through a maximum close to 1 in Region 2 ($0.02 < f(s) < f(TR)$); α is around zero in Region 3 ($f(s) > f(TR)$). The threshold ratio for complete inhibition of lipolysis, $f(TR)$, is around 0.4 for the nonionic, 1.5 for the cationic, and 7.5 for the anionic surfactants. Measurements of interfacial tensions and optical observations revealed the following: In Region 1, the emulsifier molecules are solubilized in the bile micelles, and the adsorption layer is dominated by bile molecules. In Region 2, mixed surfactant-bile micelles are formed, with high solubilization capacity for the products of triglyceride lipolysis; rapid solubilization of these products leads to complete lipolysis. In Region 3, the emulsifier molecules prevail in the adsorption layer and completely block the lipolysis.

Като пряко продължение на първата част от нашето in vitro проучване (Vinarov et al., Langmuir 2012, 28, 8127), тук изследваме ефектите на вида и концентрацията на емулгатора върху степента на триглицеридна липолиза, в присъствието на жлъчни соли. Три вида повърхностно-активни вещества (ПАВ) са тествани като емулгатори: анионни, нейонни и катионни. За всички системи наблюдаваме три области в зависимостта на триглицеридната липолиза, α , от съотношението емулгатор/жлъчни соли, $f(s)$: α е около 0.5 в Регион 1 ($f(s) < 0.02$); α преминава през максимум близо 1 в регион 2 ($0.02 < f(s) < f(TR)$); α е около нула в регион 3 ($f(s) > f(TR)$). Критичното съотношение за пълно инхибиране на липолизата, $f(TR)$, е около 0.4 за нейонните, 1.5 за катионните и 7.5 за анионните ПАВ. Измерените междуфазови напрежения и оптичните наблюдения разкриват следното: в регион 1 молекулите на емулгатора се солубилизират в жлъчните мицели, а адсорбционният слой е доминиран от молекулите на жлъчните соли. В регион 2 се образуват смесени мицели от ПАВ и жлъчни соли, които имат висок солубилизационен капацитет за продуктите на триглицеридната липолиза; бързата солубилизация на тези продукти води до пълна липолиза. В регион 3 молекулите на емулгатора преобладават в адсорбционния слой и напълно блокират липолизата.

Захари Пенков Винаров

документи за конкурс за „доцент“ по ПН 7.3 Фармация (Технология на лекарствните форми)

20. In vitro study of triglyceride lipolysis and phase distribution of the reaction products and cholesterol: effects of calcium and bicarbonate. Z. Vinarov, L. Petrova, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, A. Lips, **Food & Function** 3 (2012) 1206-1220.

IF = 5.4 (Q1); 6 цитата

We describe a relatively simple in vitro model for triglyceride (TG) lipolysis which mimics closely the conditions in the human stomach and small intestine. The main model advantages are: (1) as in vivo, sodium bicarbonate is used for buffering; (2) the pH-profile in the small intestine is closely matched; (3) the experimental procedure does not include complex equipment. To test its performance, the proposed in vitro model is applied to quantify the effects of Ca(2+), pH, and bicarbonate on the degree of TG lipolysis and on the solubilization of the lipolysis products and cholesterol in the aqueous phase. We found that TG lipolysis passes through a shallow minimum at 3.5 mM Ca(2+) when varying the calcium concentration between 1 and 11 mM, while the presence of bicarbonate and the increase of pH led to a higher degree of lipolysis. Centrifugation and filtration were used to separate the aqueous phase and to study the solubilisation of the lipophilic components in the aqueous phase. We found that the solubilized cholesterol increases linearly with the concentration of free fatty acids (FFA) which is evidence for co-solubilization of these two components in the bile micelles. At high Ca(2+) concentrations, aggregates larger than 300 nm were observed by cryo-microscopy and light scattering, which solubilize well cholesterol and saturated FFA. In contrast, the monoglycerides were always predominantly solubilized in the small bile micelles with diameters around 4 nm.

Ние описваме сравнително прост in vitro модел за триглицеридна (TG) липолиза, който имитира условията в човешкия стомах и тънките черва. Основните предимства на модела са: (1) както in vivo, натриевият бикарбонат се използва за буферизиране; (2) pH-профилът в тънките черва е добре описан; (3) експерименталната процедура не включва сложно оборудване. За да проверим качествата на предложения in vitro модел, той беше използван за количествено определяне на ефектите на Ca(2+), pH и бикарбонатните йони върху степента на TG липолиза и върху солубилизацията на продуктите на липолизата и холестерола във водната фаза. Открихме, че TG липолизата преминава през плитък минимум при 3.5 mM Ca (2+) при промяна на концентрацията на калций между 1 и 11 mM, докато наличието на бикарбонат и повишаването на pH води до по-висока степен на липолиза. Центрофугиране и филтруване бяха използвани за отделяне на водна фаза с цел изследване на солубилизацията на липофилните компоненти в нея. Открихме, че солубилизираният холестерол се увеличава линейно с концентрацията на свободни мастни киселини (FFA), което е доказателство за ко-солубилизацията на тези два компонента в мицелите на жлъчни соли. При високи концентрации на Ca(2+) се наблюдават агрегати по-големи от 300 nm чрез криомикроскопия и лазерно светоразсейване, които солубилизират добре холестерол и наситени FFA. Обратно, моноглицеридите винаги се солубилизират в малките мицели на жлъчните соли с диаметър около 4 nm.