

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA VOUK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA VOUK

**VREDNOTENJE SPROŠČANJA UČINKOVIN IZ MEHANSKO
RAZLIČNO OBČUTLJIVIH FARMACEVTSKIH OBLIK NA NAPRAVI
ZA POSNEMANJE ČREVESNEGA GIBANJA**

**EVALUATION OF DRUG RELEASE FROM MECHANICALLY
VARIABLY SENSITIVE DOSAGE FORMS ON AN APPARATUS
SIMULATING THE MOVEMENT OF HUMAN INTESTINE**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala v podjetju Lek, d.d., Ljubljana, na oddelku In vitro - in vivo korelacij pod vodstvom mentorja doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. in somentorja dr. Igorja Legna, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Juriju Trontlju, mag. farm. in somentorju dr. Igorju Legnu, mag. farm. za vso pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Posebna zahvala Meliti Hribar za ves trud, prizadevnost, nesebično pomoč in strokovno vodenje pri izdelavi eksperimentalnega dela.

Hvala celotni skupini In vitro - in vivo korelacij za pomoč pri izvedbi raziskovalnega dela magistrske naloge.

Največja zahvala gre staršem, ki so mi omogočili študij in mi vedno stali ob strani. Hvala tudi ostalim družinskim članom za vso podporo. Iskrena hvala fantu Mateju, ki me je tekom celotnega študija spodbujal in verjel vame.

Izjava

Izjavam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. in somentorja dr. Igorja Legna, mag. farm.

Anja Vouk

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1. UVOD	1
1.1. Testi za sproščanje	1
1.1.1. Farmakopejske naprave za sproščanje	1
1.1.2. Alternativni testi sproščanja	2
1.1.2.1. Modifikacije obstoječih farmakopejskih testov.....	3
1.1.2.2. Dinamično sestavljeni sistemi	5
1.2. Tanko črevo.....	8
1.3. FO s prirejenim sproščanjem.....	10
1.3.1. Ogrodne tablete	10
1.3.2. Polimeri uporabljeni v ogrodnih tabletah.....	11
1.3.3. Osmotske črpalke	13
2. NAMEN DELA.....	14
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1. Materiali	16
3.1.1. FO.....	16
3.1.2. Naprave	16
3.1.3. Kemikalije	16
3.1.4. Ostalo	17
3.2. Metode.....	17
3.2.1. Priprava medijev	17
3.2.2. Priprava standardov.....	18
3.2.3. Izvedba testa namakanja.....	18
3.2.4. Analitika vzorcev	19
3.3. Naprava za posnemanje črevesnega gibanja	20
3.3.1. Opis naprave.....	20
3.3.2. Izvedba testa sproščanja na napravi za posnemanje črevesnega gibanja	23
3.3.3. Pregled opravljenih poskusov	24
3.4. Izračun faktorja podobnosti in faktorja različnosti.....	24

4.	REZULTATI.....	25
4.1.	FO 1: Ogrodne tablete iz PEO.....	25
4.2.	FO2: Ogrodne tablete iz HPMC-ja.....	27
4.2.1.	Različne nastavitve programov	27
4.2.2.	Primerjava dveh HPMC vzorcev.....	29
4.3.	FO3: Osmotske črpalke.....	30
4.3.1.	Poskusi izvedeni na napravi za posnemanje črevesnega gibanja	30
4.3.2.	Poskusi izvedeni na napravi USP II pri dveh različnih hitrostih vrtenja.....	30
4.4.	Ostali testi.....	31
5.	RAZPRAVA	32
5.1.	Rezultati glede na posamezno FO.....	32
5.1.1.	FO1: Ogrodne tablete iz PEO.....	32
5.1.2.	FO2: Ogrodne tablete iz HPMC-ja.....	34
5.1.3.	FO3: Osmotske črpalke.....	42
5.2.	Primerjava mehansko občutljivih in neobčutljivih FO.....	44
5.3.	Primerjava RSD-jev	45
6.	SKLEP.....	47
7.	LITERATURA.....	48

POVZETEK

Z *in vitro* testi se z vidika razvoja novega generičnega izdelka želimo čim bolj približati pogojem v prebavnem traktu in tako napovedati *in vivo* obnašanje zdravila. Za doseganje boljše *in vivo* napovedne vrednosti so v podjetju Lek d.d. v sodelovanju s Fakulteto za strojništvo v Ljubljani razvili napravo, ki posnema gibanje črevesa. Namen magistrske naloge je bil nadgraditi dosedanje študije in ovrednotiti primerjavo med mehansko različno občutljivimi farmacevtskimi oblikami (FO) na napravi za posnemanje črevesnega gibanja. Izhajali smo iz predhodnega raziskovalnega dela, kjer so na napravi za posnemanje črevesnega gibanja testirali ogrodne tablete iz polietilen oksida (PEO). Naprava je omogočila dobro ločevanje med različnimi vzorci. Nadaljevali smo s testiranjem ogrodnih tablet iz PEO z različnimi viskoznostmi. Naprava je dobro ločila med vzorci posameznih viskoznosti in jih smiselno razporedila glede na delež sproščene učinkovine. Zanimalo nas je, če bo naprava za posnemanje gibanja črevesa pokazala visoko diskriminatorno moč tudi pri ogrodnih tabletah drugega izbranega polimera. Ker je hidroksiporopilmetil celuloza (HPMC) najpogosteje uporabljen polimer pri tej vrsti FO, smo za izvedbo poskusov izbrali dva različna vzorca HPMC ogrodnih tablet. Spreminjali smo nastavitve programov in ovrednotili vpliv različno intenzivnega gibanja na kinetiko sproščanja učinkovine. Rezultati so bili pričakovani, saj je bil pri najbolj intenzivnem gibanju delež sproščene učinkovine največji. Na voljo so nam bili tudi rezultati *in vivo* farmakokinetične študije s preučevanimi vzorci, s katero smo primerjali naše *in vitro* dobljene rezultate. Razmerja med deležem sproščene učinkovine obeh vzorcev *in vitro* v vsaki časovni točki so bila primerljiva z razmerjem c_{max} vrednosti iz *in vivo* študije. Na podlagi teh rezultatov smo zaključili, da v primeru testiranih HPMC ogrodnih tablet naprava za posnemanje črevesnega gibanja omogoča dobro *in vivo* napovedno moč, saj se v primerjavi s konvencionalnimi *in vitro* testi bolje približa pogojem v prebavnem traktu, ki jim je FO izpostavljena. Kot zadnjo FO smo izbrali osmotske črpalke. Gre za mehansko neobčutljivo FO, zato bi pri različnih nastavitvah programov morali dobiti enak delež sproščene učinkovine. Ker dosedanja verzija naprave ne omogoča hitrejšega gibanja platforme, smo dodatne poskuse naredili še na napravi z vesli (USP II) pri dveh različnih hitrostih vrtenja. Potrdili smo, da so osmotske črpalke mehansko neobčutljive, zaradi česar jih lahko uporabimo kot negativno kontrolo za teste vpliva mehanskih obremenitev na profil sproščanja.

ABSTRACT

When developing a new generic product it is desirable for *in vitro* tests to approach the *in vivo* conditions in the gastrointestinal tract in order to predict the behavior of drug. To achieve better *in vivo* prediction Lek d.d., in collaboration with the Faculty of Mechanical Engineering in Ljubljana, developed a device that simulates the peristaltic movements of the human intestine. The purpose of the master's thesis was to upgrade the results from previous studies and to evaluate the comparison between mechanically variably sensitive dosage forms on an apparatus simulating the movement of human intestine. We proceeded from the previous research work in which polyethylene oxide (PEO) matrix tablets were tested. Apparatus simulating the movement of human intestine showed good discriminatory results between different samples. We continued with analyzing the PEO matrix tablets of different viscosities. Apparatus was able to make a good distinction between samples of different viscosities and distributed them logically according to the release rate of active substance. We wanted to find out if apparatus simulating the movement of human intestine would show a high discriminatory power with matrix tablets made from another polymer. Since the hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) is the most commonly used polymer in this type of dosage forms, we made further experiments with two different samples of HPMC matrix tablets. We were changing the program settings on apparatus and evaluated the influence of various motion intensities on drug release kinetics. The results were in accordance with our expectations as the most intensive movement showed the highest release rate. We compared our results with the results from *in vivo* pharmacokinetic study performed with the same formulations. The ratio between the release rates of two different formulation samples *in vitro* at each time point was comparable to the ratio of the c_{\max} values from the *in vivo* study for the same two formulations. Based on these results, we concluded that in the case of HPMC matrix tablets the apparatus simulating the peristaltic movement of human intestine provides a good *in vivo* prediction power. As compared with conventional *in vitro* tests apparatus enables a better approximation of the conditions in gastrointestinal tract. As the last dosage form we selected the osmotic pumps. Osmotic pumps are not mechanically sensitive; therefore the release rate of the active substance should stay the same even when changing the program settings. Since the current version of the apparatus does not allow faster movement of the

platform, additional experiments were performed on USP II at two different rotational speeds. We confirmed that osmotic pumps are not mechanically sensitive, that is why they can be used as a negative control for tests of the impact of mechanical stress on the release profiles.

SEZNAM OKRAJŠAV

ZU- zdravilna učinkovina

PEO- polietilen oksid

HPMC- hidroksipropilmetil celuloza

FO- farmacevtska oblika

GIT-gastrointestinalni trakt

USP I- naprava s košarico

USP II- naprava z vesli

USP III- naprava z recipročnimi cilindri

USP IV- naprava s pretočno celico

MMC- migracijski motorični kompleks

RPM- število obratov na minuto

SD- standardna deviacija

RSD- relativna standardna deviacija

c_{\max} - maksimalna koncentracija zdravilne učinkovine v plazmi

t_{\max} - čas, ko je dosežena maksimalna koncentracija v plazmi

f_1 -faktor različnosti

f_2 - faktor podobnosti

Ključne besede: *Naprava za posnemanje črevesnega gibanja, mehansko občutljive farmacevtske oblike, ogrodne tablete, osmotske črpalke*

Key words: *Apparatus simulating the movement of human intestine, mechanically sensitive dosage forms, matrix tablets, osmotic pumps*

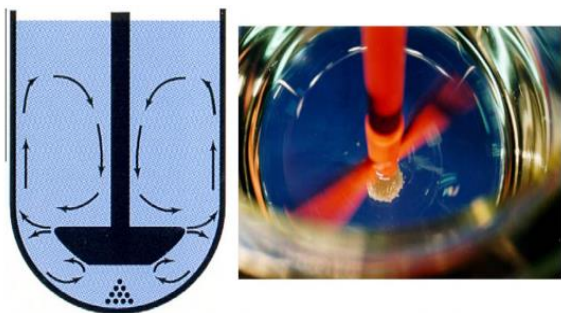
1. UVOD

1.1. Testi za sproščanje

1.1.1. Farmakopejske naprave za sproščanje

Naprava s košarico (USP I) in naprava z vesli (USP II)

Napravi USP I in II sta bili prvi farmakopejski napravi za testiranje sproščanja in sta še danes najpogosteje uporabljeni metodi sproščanja. V svoji sestavi se razlikujeta le v tem, da ima USP I v posodi za testiranje košarico, naprava USP II pa ima namesto košarice nameščeno veslo. Napravi sta v osnovi sestavljeni iz posode, ki ima natančno definirano obliko, dimenzije in material. Posoda je potopljena v vodno kopel, ki omogoča termostatiranje na 37°C in se tako glede temperature približa pogojem v prebavnem traktu. Volumen uporabljenega medija je lahko med 500- 1000 mL. Vendar ti volumni niso biorelevantni, saj so FO navadno zaužite na tešče, ko volumen tekočine v želodcu redko preseže 100 mL (tipičen razpon 50-200 mL),



volumni uporabljeni pri testiranju pa so posledično preveliki, da bi se približali fiziološkim pogojem v želodcu. Pri USP I edini mehanski vpliv povzroča vrtenje košarice, v katero damo FO, pri USP II pa nastanejo hidrodinamski tokovi kot posledica vrtenje vesla (1, 2).

Slika 1: Prikaz vzorca gibanja na napravi USP II.
Povzeto po (2).

Naprava z recipročnimi cilindri (USP III)

Naprava je sestavljena iz steklenih posod, v kateri se nahajajo cilindri z mrežastim dnom. Cilinder je postavljen v posodo z vzdrževano temperaturo 37°C, običajno v termostatirani vodni kopeli. V cilindre vstavimo FO. Cilinder se premika navzgor in navzdol v mediju, kar omogoča nastanek hidrodinamičnih pogojev. Uporabljen volumen medija je zgolj 250 mL, kar lahko predstavlja problem pri ustvarjanju „sink“ pogojev¹. S pravilno izbiro medijev, je z napravo USP III možno relativno dobro posnemati pogoje vzdolž celotnega GIT. Naprava je primerna za testiranje FO s prirejenim sproščanjem in pelet (2).

¹ Izraz sink pogoji se na nanaša na koncentracijo, ki je vsaj 3-10x nižja od nasičene koncentracije pri obravnavanih pogojih.

Naprava s pretočno celico (USP IV)

Naprava USP IV je sestavljena iz posode z izbranim medijem, vodne črpalke in vodne kopeli, ki vzdržuje temperaturo medija na $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Pomemben del naprave je črpalka, ki potiska medij navzgor proti celici s stalnim pretokom 4, 8 ali 16 mL/min. Celica je postavljena navpično in vsebuje filtrni sistem, ki preprečuje uhajanje neraztopljenih delcev iz zgornjega dela celice. Naprava lahko deluje kot odprt ali zaprt sistem. Kot odprt sistem omogoča konstantno dovajanje svežega medija za raztapljanje, v primeru zaprtega sistema pa določen volumen medija kroži skozi celico.

USP IV se najpogosteje uporablja za testiranje sproščanja iz FO s podaljšanim sproščanjem, saj je posamezna FO lahko izpostavljena različnim pogojem v prebavnem traktu. Uporabna je tudi za vrednotenje trdnih disperzij (1, 2).

1.1.2. Alternativni testi sproščanja

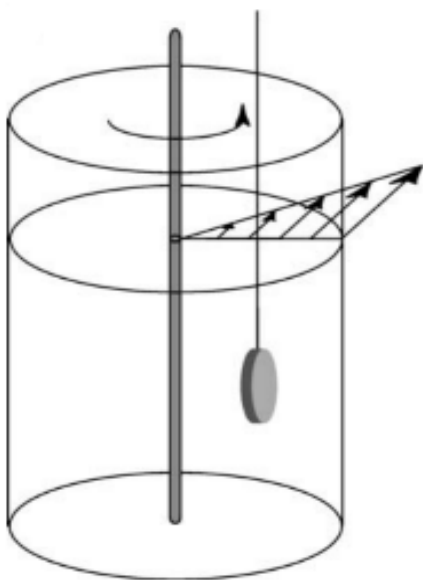
Pri prehodu skozi prebavni trakt so peroralne FO izpostavljene različnim fiziološkim pogojem, kot so spreminjajoč se pH, raznolika sestava gastrointestinalnih tekočin, čas prehoda preko črevesja, peristaltične kontrakcije in hidrodinamika tekočin. Študije so pokazale, da imajo parametri, povezani z motiliteto želodca in črevesja velik vpliv na kinetiko sproščanja učinkovine in na njeno absorpcijo. Razumevanje in poznavanje pogojev v človeškem telesu je ključno za predvidevanje *in vivo* obnašanja pri razvoju novega izdelka.

Klasični testi disolucije imajo pomanjkljivost pri testiranju kompleksnejših formulacij, saj ne dajejo relevantnih *in vivo* rezultatov. Eden glavnih razlogov je, da klasični testi sproščanja ne posnemajo dinamičnih sprememb, ki se dogajajo v človeškem prebavnem traktu. Večina FO s podaljšanim sproščanjem je še posebej občutljiva na mehanske dražljaje, saj skozi prebavni trakt prehajajo v nerazpadli obliki (3,4).

Z razvojem novih alternativnih metod za testiranje sproščanja FO, se želimo čim bolj približati dejanskim pogojem v prebavnem traktu. Pred samim razvojem novih metod se moramo zavedati *in vivo* parametrov, ki vplivajo na sproščanje FO, kot so različni vzorci gibanja (npr. migracijski motorični kompleks (MMC)), volumni želodčnih in črevesnih tekočin, hitrost praznjenja želodca in trajanje prehodov skozi različne dele prebavnega trakta (4).

1.1.2.1. Modifikacije obstoječih farmakopejskih testov

Naprava z vrtečo se posodo



Slika 2: Princip delovanja naprave z vrtečo se posodo.
Povzeto po (5).

Naprava z vrtečo se posodo je bila razvita z namenom, da bi se z ustvarjanjem površinskih strižnih sil *in vitro* bolje približali *in vivo* pogojem v želodcu. Naprava omogoča tudi oceno mehanskega vpliva hrane.

Računalniški model je nastal iz podatkov, pridobljenih z magnetno resonančnim slikanjem (MRI) polnega človeškega želodca, s katerim so ocenili strižne sile na površini FO. Glede na dobljene podatke so naredili novo napravo, ki bi s pomočjo računalniških simulacij *in vitro* ponazorila strižne sile, ki jim je FO izpostavljena pri prehodu skozi želodec.

V študiji so testirali hidrofilne ogrodne tablete, pri katerih je ključnega pomena razmerje med gibanjem želodčne vsebine in sproščanjem zdravilne učinkovine (ZU) iz FO.

Krčenje želodčnih mišic namreč ustvarja vzorec gibanja tekočine, ki povzroča nastanek strižnih sil, kar vpliva na hitrost erozije in posledično na hitrost sproščanja iz ogrodnih tablet.

Naprava je sestavljena iz čaše z drogom, ki je pritrjen na njeno dno. Vrtenje čaše omogoča kontroliran in predvidljiv tok tekočine okoli tablet. Čaša je postavljena v vodno kopel, kar omogoča vzdrževanje temperature v želenem območju. S povečanjem viskoznosti in hitrosti obratov na napravi se povečajo strižne sile in erozija.

V primerjavi z USP I se na napravi z vrtečo posodo ustvarijo večje strižne sile in posledično višja stopnja erozije, s čimer se bolj približamo *in vivo* pogojem v želodcu. Poskusov na napravi USP II niso izvedli, saj naprava zaradi velike verjetnosti adhezije FO na steno posode ni primerna za testiranje hidrofilnih ogrodnih tablet. Naprava z vrtečo se posodo ima tudi nekaj slabosti. Trenutno se lahko na njej izvajajo testiranja le z enoodmernimi FO, raztopljená učinkovina pa se ne porazdeljuje enakomerno po mediju. Koncentracije sproščene učinkovine zato ne moremo izmeriti z uporabo UV-VIS spektrometrije, ampak z določitvijo izgube mase (5).

Naprava z mrežico in balonom

Garbacz in sodelavci so oblikovali novo napravo, ki omogoča *in vitro* posnemanje parametrov, ki so pomembni za ustvarjanje hidrodinamskih pogojev in mehanskih obremenitev *in vivo*. Naprava se najpogosteje uporablja za testiranje FO s prirejenim sproščanjem.

Glavni del predstavlja osrednja os s šestimi komorami, kamor med poskusom vstavimo preiskovano FO. Znotraj posamezne komore se nahaja balon. Osrednja os je povezana z enoto za urejanje tlaka v balonu, na drugi strani pa z motorjem, ki omogoča vrtenje osi. Balon v komori se napihne zaradi dotoka zraka. S polnjenjem in praznjenjem balona je ponazorjeno gibanje v GIT. Naprava z izpostavitvijo FO različnemu zaporedju gibov, tlačnih valov in faz premora, posnema pogoje *in vivo* (6).

Pretočni sistem s steklenimi kroglicami

Pretočni sistem s steklenimi kroglicami je eden izmed novejših alternativnih testov sproščanja, ki so ga razvili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Z napravo so želeli ponazoriti način gibanja v GIT in prikazati kontakt FO s sluznico prebavnega trakta. Naprava je sestavljena iz steklene posode, v kateri se nahajajo steklene kroglice. Kroglice poganja magnetna mešalna palica. Trdna FO je stalno v stiku s površino plasti steklenih kroglic, ki ustvarjajo valovit vzorec gibanja. Gre za odprt pretočni sistem. Medij se dovaja v posodo in iz posode s peristaltično črpalko pri konstantnem pretoku. Na ta način se ohranita enak volumen medija in pretok med celotnim poskusom. Fizične vplive na FO se lahko preučuje s spreminjanjem količine steklenih kroglic in spremembo hitrosti mešanja. Njihov vpliv na profile raztapljanja je odvisen od lastnosti posamezne FO, zlasti njene mehanske občutljivosti (3,7).



Slika 3: Pretočni sistem s steklenimi kroglicami. Povzeto po (7).

Naprava, ki predstavlja kombinacijo USP III in plastičnih kroglic

Gre za kombinacijo naprave USP III in plastičnih kroglic. Z napravo so dosegli raven *A in vitro-in vivo* korelacije in ugotovili, da je za približanje *in vivo* rezultatom, potrebna zadostna mehanska obremenitev *in vitro*. Ključnega pomena so okrogle plastične kroglice. Gostota kroglic je podobna gostoti izbranega medija, kar omogoča ustrezno gibanje kroglic in pogostejše interakcije s tabletami. Kroglice imajo gostoto med 1,1 g/mL in 1,5 g/mL in predstavljajo mehansko obremenitev za FO, kar omogoča boljše posnemanje pogojev v prebavnem traktu (8). Naprava je primerna predvsem za testiranje ogrodnih tablet, saj je sproščanje učinkovine pri ogrodnih tabletah kombinacija erozije polimernega ogrodja in difuzije, na kar vplivajo hidrodinamski pogoji v GIT. Med testiranjem se lahko spreminjajo gostota in velikost kroglic, hitrost pomakanja FO in sestava medija (3, 8, 9).

1.1.2.2. Dinamično sestavljeni sistemi

Umetni model želodca in dvanajstnika

Gre za enega bolj enostavnih sistemov. Naprava je sestavljena iz dveh delov, ki predstavljata model želodca in dvanajstnika. Med seboj sta povezana s črpalko. Kot v *in vivo* okolju se tekočina iz želodca pretaka proti dvanajstniku in tako omogoča nastanek dinamičnih pogojev v sistemu. Delež sproščene učinkovine je enak njeni biološki uporabnosti in je sorazmeren količini učinkovine, ki se nahaja v tekočini modela dvanajstnika.

Model ima zaradi svoje enostavnosti veliko omejitev. Z vidika posnemanja hidrodinamskih pogojev se ne približa dovolj *in vivo* pogojem. Prav tako ne omogoča odstranjevanja učinkovine iz sistema in posledično ne zagotavlja sink pogojev. Za boljše posnemanje *in vitro* pogojev bi bilo potrebno zagotoviti tudi nadzor nad temperaturo, pH, peristaltičnim mešanjem in sekrecijo prebavnih sokov (pepsin, HCl, pankreatični sok...) (2, 10).

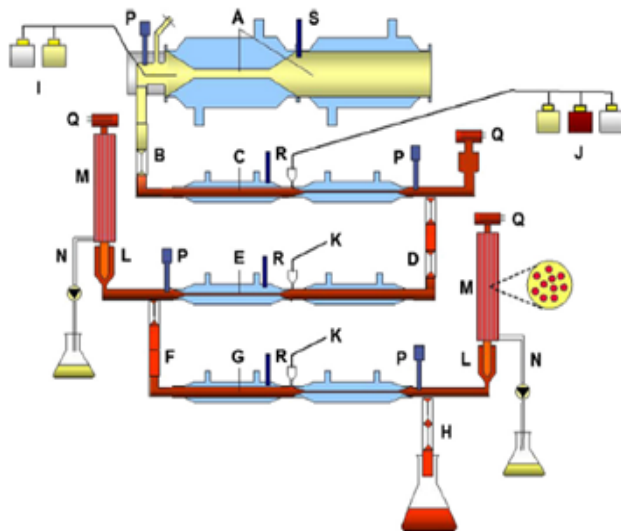
Dinamični model želodca

Model omogoča pridobitev podatkov o obnašanju hrane in peroralnih FO v želodcu in za ocenitev interakcij med hrano in učinkovino. Model želodca dobro posnema *in vivo* pogoje v želodcu- peristaltično gibanje, strižne sile, praznjenje želodca, pH in obnašanje encimov.

Osrednji del naprave predstavlja elastična membrana v obliki stožca, ki omogoča raztezanje ob dodatku hrane. Membrano obdaja vodna kopel, ki omogoča termostatiranje na 37°C. Pritok encimov in kisline se izvede preko zanke s šobami, ki se nahaja na vrhu stožca. pH je nadzoran z uporabo pH elektrod, ki omogočajo nadzor nad dodajanjem kisline. Pod membrano se nahaja antrum, ki je v obliki valja. V valju se nahajata bat, ki omogoča nadzor nad volumnom tekočine in del, na katerega je pritrjen elastičen obroč, ki se premika po anturmu in povzroča nastanek peristaltičnih kontrakcij. Pomemben del naprave je tudi zaslonka, ki se nahaja med glavnim delom želodca in antrumom in je med praznjenjem želodca zaprta. (11)

Gastrointestinalni model TIM

TIM-1 je dinamični, računalniško nadzorovan model človeškega zgornjega prebavnega trakta, ki je sestavljen iz različnih predelov. Dobro posnema fiziološke pogoje v želodcu in tankemu črevesu- dinamiko mešanja, praznjenje želodca, čase prehoda črevesa, pH prebavnih sokov, telesno temperaturo ter sestavo in dinamiko prebavnih sokov.



Slika 4: Sestavni deli naprave TIM-1: **A:** želodec, **B:** pilorični sfinkter, **C:** dvanajstnik, **D:** ventil, **E:** jejunu, **F:** ventil, **G:** ileum; **H:** ileocekalni sfinkter, **I:** želodčni sokovi **J:** sokovi dvanajstnika, **K:** sokovi jejunuma/ileuma **L:** predfilter **M:** semipermeabilna membrana **N:** črpalka za filtracijo **P:** pH elektrode **Q:** senzorji za višino, **R:** senzorji za temperaturo **S:** senzorji za pritisk. Povzeto po (2).

Sestavni deli modela TIM-1 so opisani na Sliki 4.

Hidrodinamski pogoji v napravi TIM-1 so nadzorovani s pritiskom vode na fleksibilno membrano, kar povzroči nastanek peristaltičnih kontrakcij. Prehod je reguliran z odpiranjem in zapiranjem zaklopk, ki povezujejo vsakega izmed glavnih predelov in omogočajo nadzorovan prehod tekočin, delcev hrane in peroralnih FO. TIM-1 torej omogoča pridobitev informacij o biološki razpoložljivosti učinkovin pri prehodu skozi zgornji del GIT.

Če povežemo TIM-1 s TIM-2, ki posnema pogoje v debelem črevesu, lahko preučujemo sproščanje učinkovine skozi celoten prebavni trakt.

Kljub temu, da model omogoča dobro posnemanje pogojev *in vivo*, ima tudi nekaj pomanjkljivosti. Iz predela dvanajstnika se sproščena učinkovina ne izloča s filtracijo ali dializo. Skupen volumen v tankem črevesu TIM-1 je 300 mL. Čeprav je volumen realen, model ne omogoča posnemanja *in vivo* porazdelitve tekočin po malih žepkih, ki lahko nastanejo v črevesu (2).

Inženirski model želodca in tankega črevesa

Nov model omogoča zelo dobro posnemanje *in vivo* pogojev: temperature telesa, želodca in črevesa; variacije v pH vrednostih, izločanje prebavnih sokov, čase prehodov, mešanje himusa, praznjenje tekočin in trdnih snovi ter pasivno absorpcijo.

Sistem je sestavljen iz 6 prostorov, ki so poimenovani: (R1) rezervoar za hrano, (R2) predel za mešanje hrane s slino, (R3) predel želodca in trije predeli tankega črevesa: (R4) dvanajstnik, (R5) jejunum, (R6) ileum. Vsak predel vsebuje pH senzor, ki omogoča uravnavanje pH vrednosti z dodajanjem klorovodikove kisline ali natrijevega hidrogenkarbonata.

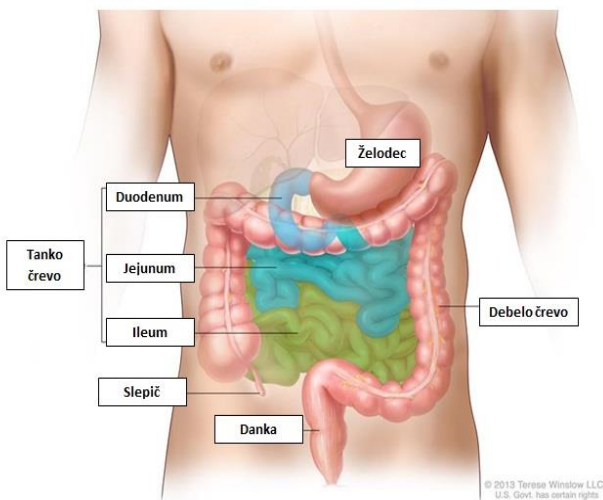
Računalniško upravljane peristaltične črpalke omogočajo prehod himusa iz enega predela v drugega ter dotok sline in različnih prebavnih sokov – pepsina, lipaz in HCl v želodcu, žolčnih in pankreatičnih sokov ter elektrolitov v dvanajstniku in natrijevega hidrogenkarbonata v tankem črevesu. Jejunum in ileum sta povezana z dializnim sistemom, ki omogoča pasivno absorpcijo vode in prebavnih produktov.

Želodec predstavlja komora z inovativnim dizajnom, ki ima na vsaki strani dva bata. Bata omogočata mehansko mešanje himusa. Pritisk v želodcu je uravnavan preko senzorja, ki uravnava razdaljo med batoma. Ta razdalja se lahko prilagodi glede na količino vstopnega obroka in himusa, ki zapušča želodec.

Naprava je povezana z računalnikom, ki omogoča spreminjanje različnih parametrov: temperature, pH vrednosti in pretoka črpalke v različnih predelih. Rezervoar za hrano posnema pravi obrok hrane in omogoča njen kontinuiran dotok v želodec z nadzorovano hitrostjo v časovnem obdobju 20 min. Delci hrane so lahko veliki od 1-8 mm, za izvedbo poskusa pa ni potrebna predhodna homogenizacija (12).

1.2. Tanko črevo

Tanko črevo je sestavljeno iz dvanajstnika (duodenum), zgornjega dela črevesa (jejunum) in spodnjega dela črevesa (ileum) (13).



Slika 5: Anatomijski deli prebavil.
Prirejeno po (14).

Dolžina tankega črevesa je med ljudmi različna, med 2 in 7 metrov, notranji premer pa med 2 in 4 cm (4). Zaradi svoje anatomske sestave, je tanko črevo primarno mesto za absorpcijo hranil in ZU. V želodcu namreč absorpcija ne poteče ali pa je minimalna. Učinkovine se v veliki večini sprostijo v želodcu in v raztopljeni obliki preidejo v tanko črevo, kjer poteče absorpcija.

Črevo je nagubano, kar poveča notranjo površino za 600-krat in posledično tudi površino namenjeno absorpciji učinkovin.

Prebavni sokovi so heterogena mešanica sline, želodčnih izločkov, izločkov pankreasa in žolča. Pomembne komponente prebavnih sokov predstavljajo žolčne soli, bilirubin, elektroliti (natrijevi, kloridni, bikarbonatni ioni), izločki pankreasa z bikarbonatnimi ioni ter prebavni encimi-lipaza, pepsin, amilaza, tripsin... (1,15).

Pogoji v prebavnem traktu vplivajo na hitrost raztapljanja in absorpcijo učinkovin. Volumen tankega črevesa je odvisen od količine tekočine, ki preide v črevo kot posledica praznjenja želodca, absorpcije tekočin skozi črevesno steno in časa prehoda skozi črevo (15). Volumen tekočine vsebine tankega črevesa v stanju na tešče je okoli 125 mL, vendar vrednosti variirajo glede na posameznika (od 30-420 mL) (4,15). V dvanajstniku prihaja do velikih nihanj pH vrednosti, saj se tu mešajo kislina želodčna vsebina ter izločki pankreasa in žolča (1). vzdolž tankega črevesa pH vrednosti naraščajo- od 6,5 v dvanajstniku do 6,6 v jejunumu in do 7,5 na koncu ileuma (1). Povprečna temperatura v tankem črevesu je 37°C, vrednosti pa se lahko povišajo po telesni aktivnosti. Čas prehoda hrane in učinkovin preko črevesa znaša 3-4 ure. Je neodvisen od zaužite hrane, nanj pa vplivata hitrost praznjenja črevesa in pretok (15).

Gibanje miškulature tankega črevesa

V tankem črevesu prihaja do nastanka dveh osnovnih vzorcev gibanja- peristaltičnega in segmentacijskega (16). Segmentacija nastane, ko se del tankega črevesa poveča in raztezanje črevesne stene izzove lokalizirane koncentrične kontrakcije vzdolž črevesa. Te kontrakcije povzročijo segmentacijo in razdelijo črevo v razmaknjene odseke. Ob koncu relaksacije enega niza kontrakcij, se navadno začnejo nove. Segmentacija omogoča mešanje humusa z izločki tankrega črevesa (17, 16).

Peristaltično gibanje omogoča premikanje vsebine proti debelemu črevesu. Peristaltična aktivnost se močno poveča po obroku. Nastane kot posledica povečane mišične kontrakcije v steni prebavil. Na povečano peristaltično gibanje vplivajo živčni signali in tudi hormoni, kot so gastrin, inzulin in serotonin (17).

Kljub razdelitvi, pa je razlika med peristaltičnim in segmentacijskim gibanjem simbolična, saj vsako gibanje črevesa povzroči do neke mere nastanek obeh opisanih vzorcev gibanja (17).

Migracijski motorični kompleks

V prebavilih se v stanju na tešče pojavi val kontrakcij, imenovan MMC. Začne se v želodcu in nadaljuje naprej proti tankemu črevesu. MMC je sestavljen iz štirih faz: prva faza predstavlja obdobje mirovanja, torej fazo, v kateri se kontrakcije ne pojavljajo. Traja približno 30-60 minut. V drugi fazi se začnejo neredne, srednje močne kontrakcije. Druga faza naj bi trajala 20-40 minut. Tretja faza je krajša, med 5-20 minut in predstavlja obdobje intenzivnih kontrakcij. V tretji fazi MMC se pilorus odpre in omogoča prehod večjih delcev v tanko črevo. Razen v tretji fazi, preko pilorusa prehajajo samo delci veliki med 1 in 2 milimetra (1, 18). Tretja faza omogoča, da želodec zapustijo večji delci in se vsebina želodca izprazni (19). Nekateri avtorji navajajo tudi četrto fazo, ki predstavlja prehod nazaj v prvo fazo in naj bi trajala med 0-5 minut (1,18).

Povprečen cikel MMC v prebavilih zdravega človeka naj bi potekal v obdobju 90- 120 minut, vendar so vrednosti lahko v razponu 15-180 min (15). Velik razpon je posledica inter-individualne variabilnosti jakosti kontrakcij v prebavnem traktu posameznika (19).

1.3. FO s prirejenim sproščanjem

Prednosti uporabe FO s prirejenim sproščanjem so zmanjšana pogostost odmerjanja, manjša nihanja plazemskih koncentracij, zmanjšanje neželenih učinkov kot posledica doseganja visokih plazemskih koncentracij v kratkem času, zmanjšana akumulacija učinkovine pri zdravljenju kroničnih boleznih in izboljšana complianca s pacienti. Vendar pa se pri uporabi FO s prirejenim sproščanjem pojavijo omejitve, kot so sprostitve celotnega odmerka naenkrat (ang. dose dumping), zamik v začetku delovanja, možnost povečanja predsistemskega metabolizma in manjša možnost prilagoditve odmerka ter s tem individualnega zdravljenja. Prav tako niso vse učinkovine primerne za vgradnjo v FO s prirejenim sproščanjem. Problematične so učinkovine s kratkim ali dolgim časom eliminacije, učinkovine ki se slabo absorbirajo, učinkovine z ozkim terapevtskim oknom in učinkovine, ki v veliki meri zapadejo predsistemskemu metabolizmu (20, 1).

FO s prirejenim sproščanjem v večini spadajo v eno izmed klasifikacij:

1. Ogrodni sistemi (hidrofilni, hidrofobni)
2. Obloženi sistemi z rezervoarjem (ang. reservoir systems). Glede na uporabljene polimere, ločimo dve skupini:
 - a.) Enostavni difuzijsko/erozijski sistemi, pri katerih je jedro z ZU obdano s hidrofilno ali v vodi netopno oblogo. Sproščanje učinkovine je doseženo z difuzijo učinkovine skozi oblogo ali po eroziji polimerne obloge.
 - b.) Osmotski sistemi, pri katerih je jedro obdano s polprepustno polimerno membrano z lasersko ali mehansko ustvarjeno odprtino. Sproščanje učinkovine je doseženo preko osmotskega tlaka (20).

1.3.1. Ogrodne tablete

Pri izdelavi FO s prirejenim sproščanjem najpogosteje uporabljamo ogrodne tablete. Pri ogrodnih tabletah je ZU skupaj s pomožnimi snovmi homogeno razporejena v ogrodnem sistemu. Sproščanje učinkovine poteče po mehanizmu difuzije ali erozije. Glede na lastnosti materialov ogrodne sisteme razdelimo na hidrofilne, kjer so uporabljeni materiali v vodi topni

ali nabrekajo, in na hidrofobne sisteme, sestavljene iz v vodi netopnega inertnega matriksa z minimalnim nabrekanjem (20).

a.) Hidrofilne ogrodne tablete

Pri hidrofilnih ogrodnih tabletah je učinkovina dispergirana v topnem ogrodju polimera. Polimer tvori ogrodje, ki ob stiku z vodo hidratira, hitro nabrekne in tvori gelski plašč na površini sistema. Mehanizmi, ki vplivajo na sproščanje iz hidrofilnih ogrodnih tablet so raztapljanje, nabrekanje ogrodja, difuzija učinkovine preko gelskega plašča in erozija. Prispevek posamezne komponente k celotnemu sproščanju pa je odvisen od učinkovine in sestave ogrodja (21).

b.) Hidrofobne ogrodne tablete

V hidrofobnih ogrodnih sistemih je učinkovina zmešana z inertnim ali hidrofobnim polimerom in stisnjena v tableto. Podaljšano sproščanje je posledica difuzije raztapljajoče učinkovine skozi pore delcev polimera. Omejujoč dejavnik predstavlja penetracija medija v ogrodje tablete (22).

1.3.2. Polimeri uporabljeni v ogrodnih tabletah

V tabeli so prikazani najpogosteje uporabljeni polimeri v hidrofilnih in hidrofobnih ogrodnih tabletah (22).

Tabela 1: Pregled polimerov v hidrofilnih in hidrofobnih ogrodnih tabletah. Povzeto po (22).

Polimeri	
Hidrofilne ogrodne tablete	HPMC, Hidroksipropilceluloza (HPC), Hidroksietilceluloza (HEC), PEO, ksantan gumi, natrijev alginat, polisaharidi manoze in galaktoze, hitosan, prečno premreženi homopolimeri in kopolimeri akrilne kisline (22).
Hidrofobne ogrodne tablete	Polietilen, polivinil klorid (PVC), etil celuloza (EC), akrilatni polimeri in njihovi kopolimeri (22).

Polietilen oksid

PEO je neionski homopolimer etilen oksida. Je hidrofilen in ima veliko sposobnost nabrekanja in erozije po izpostavljenosti mediju raztapljanja. Nabrekanje je neodvisno od pH vrednosti. Topnost je pomemben dejavnik pri razvoju hidrofilnih ogrodnih sistemov, saj vpliva na lastnosti gelskega plašča in hitrost sproščanja iz FO. Kot polimer je varen in se ne absorbira preko GIT.

Na sproščanje učinkovine iz FO, ki vsebujejo PEO kot polimer, vplivajo topnost ZU, viskoznost PEO in koncentracija PEO v posamezni FO. Višje stopnje viskoznosti polimera bolj nabrekajo v primerjavi z nižjimi stopnjami. Večja kot je topnost učinkovine, večja je hitrost sproščanja iz FO. S povečanjem koncentracije PEO nad 40% w/w se hitrost sproščanja iz FO zmanjša (23).

Hidroksipropilmetil celuloza

HPMC je najpogosteje uporabljen polimer v ogrodnih tabletah, saj so njegove lastnosti dobro poznane, prav tako pa je varen za uporabo. Je neionski polimer, kar zmanjša možnost interakcij pri uporabi kislinskih ali bazičnih medijev. HPMC dobro nabreka in v ogrodnih tabletah omogoča nastanek močnejšega gelskega plašča in sproščanje skozi daljše časovno obdobje v primerjavi z drugimi celuloznimi polimeri.

Stopnja erozije je odvisna od molekulske mase, sestave in ionske moči elektrolitov v izbranem mediju ter lastnosti ZU in pomožnih snovi v ogrodju tablete. Z večanjem stopnje substitucije s hidroksi-propoksi skupinami HPMC ali molekulske mase polimera se zmanjšuje hitrost sproščanja iz FO (24).

Primerjava sproščanja iz ogrodnih tablet iz HPMC in PEO

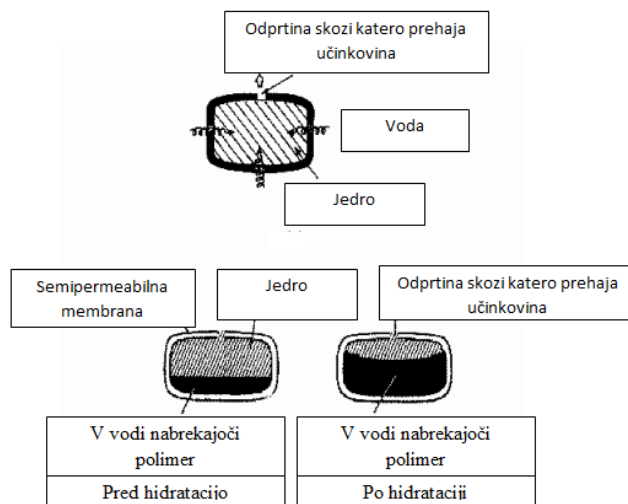
Stopnja sproščanja iz ogrodnih tablet, ki kot polimer vsebujejo HPMC ali PEO, je odvisna od viskoznosti obeh polimerov. Polimera se razlikujeta v hitrosti nabrekanja. Ogrodne tablete iz HPMC nabrekajo počasneje, volumen se povečuje kontinuirano. Pri PEO pa pride do hitrega nabrekanja. Nastane šibkejši gelski plašč, ki je bolj dovzeten za erozijo. Volumen tablete se zmanjšuje progresivno. Pri HPMC kot pri PEO se s povečevanjem viskoznosti polimera zmanjšuje stopnja hidratacije in povečuje odpornost na erozijo v primerjavi z polimeri nižje viskoznosti, zato se z večanjem viskoznosti zmanjšuje delež sproščene učinkovine (25).

1.3.3. Osmotske črpalke

Osmotske črpalke so eden izmed najbolj obetavnih sistemov za doseganje prirejenega sproščanja. Njihova prednost so izboljšana complianca s pacienti kot posledica zmanjšanja pogostosti odmerjanja in zadrževanje plazemskih koncentracij učinkovine znotraj terapevtskega okna. Na sproščanje učinkovine pH okolja in hidrodinamski pogoji nimajo vpliva, sproščanje je torej neodvisno od gastrointestinalne motitve. Testi opravljeni z uporabo osmotskih črpalk dajejo zelo dobro *in vitro*- *in vivo* korelacijo (26,27).

Osmotski dostavni sistemi za peroralno aplikacijo so sestavljeni iz tabletnega jedra, obloženega s semipermeabilno membrano. Jedro poleg učinkovine vsebuje tudi osmotsko sredstvo, ki povleče vodo iz okoliškega medija preko semipermeabilne membrane in v vodi nabrekajoči polimer. Obloga ima eno ali več odprtih, preko katerih se iz jedra sprošča raztopina ali suspenzija učinkovine skozi daljše časovno obdobje. Sproščanje učinkovine iz naprave je kontrolirano z dotokom vode preko membrane. Voda stalno doteka iz okolja v jedro, kjer raztaplja učinkovino in osmotsko sredstvo. Ko jedro hidratira, se mu poveča prostornina in nastala raztopina ali suspenzija učinkovine pronica skozi temu namenjeno odprtino kot posledica spremembe osmotskega tlaka. Odprtina skozi katero prehaja učinkovina je tako velika, da minimizira difuzijo in preprečuje nastanek hidrostatskega tlaka, ki bi lahko spremenil osmotski tlak in volumen osmotske črpalke(26,27).

Obstaja več vrst osmotskih črpalk: Rose-Nelsonova črpalka, Higuchi-Leeper osmotska črpalka, Higuchi-Theeuwes osmotska črpalka, elementarna osmotska črpalka (EOP), push-pull osmotska črpalka (PPOP), osmotska črpalka s kontrolirano poroznostjo (CPOP), tekoči oralni osmotski sistemi (L-OROS) in sendvič osmotske tablete (SOT) (28).



Slika 6: Prikaz delovanja osmotskih črpalk. Povzeto po (28).

2. NAMEN DELA

Z *in vitro* profili določamo sproščanje ZU iz FO za namene kontrole kakovosti izdelka ali za razvoj novih FO. Na področju razvoja so rezultati *in vitro* testiranj nadalje uporabni pri izgradnji modelov za napovedovanje sproščanja ZU *in vivo*. Napovedna vrednost je boljša, če se s pogoji v *in vitro* sistemu čim bolj približamo pogojem v prebavnem traktu, ki jim je učinkovina na svoji poti izpostavljena: pH, spremenljivi volumni želodčnih in črevesnih tekočin, dinamika gibanja, sile in tlaki ter trajanje prehodov skozi različne dele prebavnega trakta,... V ta namen so v podjetju Lek d.d. v sodelovanju s Fakulteto za strojništvo v Ljubljani razvili napravo, ki se s svojo obliko in delovanjem želi približati gibanju tankega črevesa. Z ostalimi izbranimi eksperimentalnimi parametri se lahko približamo tudi nekaterim drugim pogojem v človeškem telesu. V eksperimentalnem delu bomo z omenjeno napravo preučevali delež sproščene učinkovine iz treh različnih FO.

Prva FO bodo ogrodne tablete iz PEO, izdelane s polimeri različnih viskoznosti- visoke, srednje in nizke viskoznosti. Ker viskoznost polimera vpliva na hitrost sproščanja učinkovine, smo se odločili, da bomo preverili, kako izbrani pogoji testiranja na napravi za posnemanje črevesnega gibanja vplivajo na kinetiko sproščanja učinkovine. Pričakujemo, da bo naprava pri izbranih enakih pogojih dobro ločila med vzorci različnih viskoznosti.

Kot drugo FO smo izbrali ogrodne tablete iz HPMC-ja. Poskusi s tem polimerom na napravi za posnemanje črevesnega gibanja še niso bili izvedeni. Izbrali smo ga, ker je HPMC najpogosteje uporabljen polimer pri ogrodnih tabletah, želeli pa smo tudi narediti primerjavo z ogrodnimi tabletami iz PEO. Testirali bomo vzorca dveh različnih formulacij ogrodnih tablet iz HPMC. Vzorec 1 bomo testirali pri treh različno intenzivnih nastavitvah programov. Pričakujemo, da bodo med programi opazne razlike v deležu sproščene učinkovine. Vzorec 2 bomo testirali le pri Osnovnem programu. Dobljene rezultate bomo primerjali z rezultati pridobljenimi na različnih napravah za testiranje sproščanja in rezultati *in vivo* farmakokinetične študije, ki so bili predstavljeni predhodno v znanstvenem članku. Glede na že objavljene rezultate domnevamo, da bo pri ustrezni enaki nastavitvi programa opazna razlika med proučevanima vzorcema.

Tretja izbrana FO bodo osmotske črpalke. Test bomo opravili na napravi za posnemanje črevesnega gibanja pri Osnovni nastavitvi programa in na napravi USP II, pri dveh različnih

hitrostih vrtenja. Pričakujemo, da med rezultati ne bo opaznih razlik, saj mehanski dejavniki nimajo vpliva na hitrost sproščanja učinkovine iz osmotskih črpalk. Osmotske črpalke bomo uporabili kot negativno kontrolo, kot primerjavo s prvima dvema FO, ki sta občutljivi na mehanske vplive.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

3.1.1. FO

Tableta 2: Opis BCS razreda, Tipa FO in polimera v ogrodju proučevanih FO.

	BCS razred	Tip FO	Polimer v ogrodju
FO 1	Razred III	Ogrodna tableta	PEO
FO 2	Razred II	Ogrodna tableta	HPMC
FO 3	Razred II	Osmotska črpalka	PEO in HPMC

Vzorci, ki smo jih uporabili, so bili izdelani v podjetju Lek, d.d. Ljubljana v Razvojnem centru Slovenije.

3.1.2. Naprave

- Tehnica, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- Analitska tehnica, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- pH meter, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- Pipete Rainin, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- Termometer, Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, ZDA
- Magnetno mešalo z grelcem, IKA[®] - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
- UZ kadička, VWR, Radnor, Pensilvanija, ZDA
- HPLC sklopljen z UV detektorjem Alliance, Waters, Milford, Massachusetts, ZDA
- Naprava z vesli (USP II), sklopljena z avtomatskim vzorčevalnikom, Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA
- Razplinjevalec MediPrep, Erweka GmbH, Heusenstamm, Nemčija

3.1.3. Kemikalije

- KH_2PO_4 , Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- NaOH Titrisol 1 M, Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- NaCl, Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- HCl, Titrisol 1 M, Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- 85% H_3PO_4 , Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija

- MeOH, J.T.Baker[®], Center Valley, Pensilvanija, ZDA
- EtOH, J.T.Baker[®], Center Valley, Pensilvanija, ZDA
- CH₃CN, J.T.Baker[®], Center Valley, Pensilvanija, ZDA
- Pufri za kalibracijo pH metra, Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- deionizirana voda

3.1.4. Ostalo

- Steklovina: čaše, merilne bučke, merilni valji,
- Kovinske spatule, žlice
- Plastične kapalke, čolnički
- Magnetna mešala
- Membranski filter 0,45 µm

3.2. Metode

3.2.1. Priprava medijev

Fosfatni pufer pH 6,8 (0,05M)

Najprej smo pripravili 0,2M KH₂PO₄. V 5 L čašo smo nalili približno 4 L deionizirane vode. Natehtali smo 136,1 g KH₂PO₄, ga kvantitativno prenesli v čašo in mešali na magnetnem mešalu, dokler se vsi delci niso raztopili. Vsebino čaše smo prelili v 5,0 L bučko in dopolnili z deionizirano vodo do oznake. Iz tako pripravljene raztopine smo nato pripravili 0,05 M fosfatni pufer. V 5 L čašo smo z merilnim valjem smo odmerili 1250 mL 0,2 M KH₂PO₄, 560 mL 0,2 M NaOH in dodali 3000 mL deionizirane vode. pH smo uravnavali na 6,8±0,05 z 0,2 M NaOH. Nato smo raztopino kvantitativno prenesli v 5,0 L bučko, dopolnili do oznake z deionizirano vodo in premešali.

0,01 M HCl + NaCl (2g/L)

V 5 L čašo smo nalili približno 4,5 L deionizirane vode. Z merilnim valjem smo odmerili 50,0 mL 1M HCl in jo kvantitativno prelil v čašo z deionizirano vodo. Nato smo natehtali 10,0 g NaCl in vsebino kvantitativno prenesli v čašo. Ko so se vsi delci raztopili, smo vsebino čaše prelil v 5,0 L bučko, dopolnili do oznake z deionizirano vodo in premešali.

3.2.2. Priprava standardov

Standard 1

Natančno smo natehtali predpisano količino delovnega standarda, ga kvantitativno prenesli v 50,0 mL bučko in raztopili v 5,0 mL metanola. Do oznake smo dopolnili z medijem za raztapljanje (fosfatni pufer pH 6,8) in premešali. 5,0 mL raztopine smo odpipetirali v 50,0 mL bučko, dopolnili z medijem za raztapljanje in premešali. Standardne raztopine smo pripravljali v dveh paralelah.

Standard 2

Natančno smo natehtali predpisano količino delovnega standarda, ga kvantitativno prenesli v 250,0 mL bučko in raztopili v 10,0 mL 96% etanola. Do oznake smo dopolnili z medijem za raztapljanje (fosfatni pufer pH 6,8) in premešali. 1,0 mL raztopine smo odpipetirali v 50,0 mL bučko, dopolnili z medijem za raztapljanje in premešali. Standardne raztopine smo pripravljali v dveh paralelah.

Standard 3

Natančno smo natehtali predpisano količino delovnega standarda, ga kvantitativno prenesli v 200,0 mL bučko s pomočjo medija za raztapljanje (0,01 M HCl + NaCl (2g/L)) in dopolnili z medijem do 75 % volumna bučke. Bučko smo za 5 min postavili v ultrazvočno kadičko, da se je učinkovina v celoti raztopila. Bučko smo odstranili iz kadičke, počakali, da se je raztopina termostatirala do sobne temperature, nato pa dodali medij za raztapljanje do oznake. Standardne raztopine smo pripravljali v dveh paralelah.

3.2.3. Izvedba testa namakanja

Pred začetkom testiranja na FO 3, smo opravili test namakanja v dveh medijih - 0,01 M HCl + NaCl (2g/L) in 0,05 M fosfatnim pufrom pH 6,8. Vzeli smo dve 50,0 mL čaši in v vsako nalili 30,0 mL medija- v prvo 30 mL 0,01 M HCl + NaCl (2g/L) in v drugo 0,05 M fosfatni pufer pH 6,8. Nato smo v obe čaši dali osmotske črpalke in spremljali, kaj se dogaja s farmacevtsko obliko. Spremembo smo opazovali vsako uro, celoten test pa je trajal 24 ur. Potek testa smo fotografirali.

3.2.4. Analitika vzorcev

Vzorci smo analizirali na HPLC-ju z UV detektorjem. Pred analizo smo vzorce ustrezno razredčili:

FO 1 in 2: 300 μ L vzorca in 1200 μ L medija (5- kratno redčenje)

FO 3: 1500 μ L vzorca (redčenje ni bilo potrebno)

Kromatografski pogoji analize 1

Mobilna faza: vodni del: fosfatni pufer pH 4,0
 organski modifikator: acetonitril

Kolona: nepolarna C18

Pretok: 1,5 mL/min

Volumen injiciranja: 10 μ L

Valovna dolžina: točna vrednost leži na intervalu med 240 in 260 nm

Kromatografski pogoji analize 2

Mobilna faza: acetonitril:metanol:NaEDTA:glacialna očetna kislina (V/V/V/V)= a:b:c:d

Kolona: nepolarna C18

Pretok: 2,0 mL/min

Volumen injiciranja: 10 μ L

Valovna dolžina: točna vrednost leži na intervalu med 240 in 260 nm

Kromatografski pogoji analize 3

Mobilna faza: vodni del: fosfatni pufer pH 2,0, organski modifikator: voda: acetonitril

Kolona: nepolarna C18

Pretok: 0,8 mL/min

Volumen injiciranja: 10 μ L

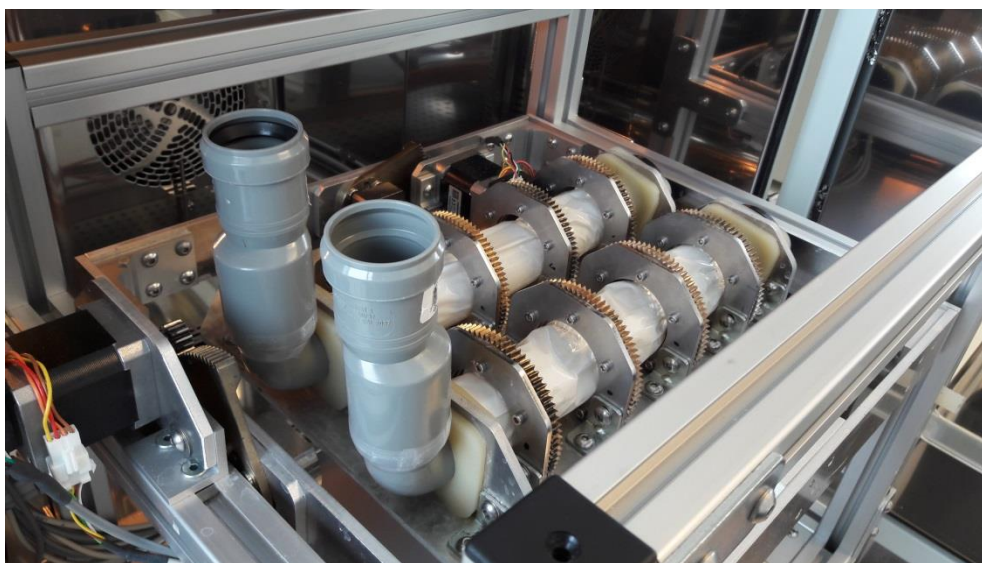
Valovna dolžina: točna vrednost leži na intervalu med 220 in 240 nm

3.3. Naprava za posnemanje črevesnega gibanja

Naprava je namenjena posnemanju gibanja človeškega tankega črevesa, predvsem v smislu gibanja stene vsebnika, ki ponazarja črevesno steno in posledično gibanja vsebine v njem.

3.3.1. Opis naprave

Naprava za posnemanje črevesnega gibanja je sestavljena iz platforme, ki je postavljena v komoro in omogoča termostatisiranje na 37 °C. Na platformi so nameščene zaslonke, ki jih poganjajo motorji preko polževega gonila. Omogočajo zvezno spreminjaje velikosti premera odprtine zaslonk, ki predstavljajo krožne kontrakcije. Sestavni del sta tudi dve silikonski vreči v obliki cevi, okoli vsake pa so nameščene po štiri zaslonke. Silikonski vreči posnemata lumen tankega črevesa. Volumen medija, ki ga uporabimo, je običajno med 150 in 200 mL. Cevi imata dve odprtini. Zgornja odprtina je namenjena vzorčenju in je med potekom eksperimenta delno odprta, spodnja odprtina pa je popolnoma zaprta s posebej oblikovanim zamaškom. Naprava je povezana z računalnikom. Preko programa lahko uravnavamo hitrost gibanja zaslonk, amplitudo in zakasnitev začetka gibanja med sosednjima zaslonkama.



Slika 7: Naprava za posnemanje gibanja črevesa. Slika je bila posneta z mobilno napravo.

Ogrodje umetnega črevesa in komora za termostatiranje

Na osnovno ogrodje je gibljivo vpet aktuacijski sklop. Ogrodje je postavljeno v komoro, ki omogoča termostatiranje z vročim zrakom. Z vzdrževanjem temperature na 37 °C, želimo posnemati pogoje v človeškem telesu. V vratih komore je stekleno okno, ki omogoča opazovanje delovanja naprave med eksperimentom.

Programska oprema

Programska oprema omogoča pravilno delovanje naprave. Nameščena je na osebni računalnik, ki omogoča upravljanje in nadzor naprave. Računalnik je povezan s krmilnikom preko USB-ja, krmilnik pa je povezan s stikali in motorji, ki se nahajajo znotraj komore. S spreminjanjem nastavitev v programu lahko ustvarimo pogoje, ki posnemajo gibanje prebavnega trakta. V programu lahko izberemo začetne odprtine zaslonk in njihovo amplitudo, periodo gibanja zaslonk, zakasnitev med sosednjima zaslonkama, trajanje izvajanja programa ter čas, po katerem se obnovijo nakopičene napake zakasnitev faz med zaslonkami. Napake namreč nastanejo zaradi zaostajanja ali prehitevanja izhodnega signala zaslonk in jih je po določenem časovnem obdobju potrebno obnoviti, da se ohrani enak vzorec gibanja.

Fleksibilna vreča

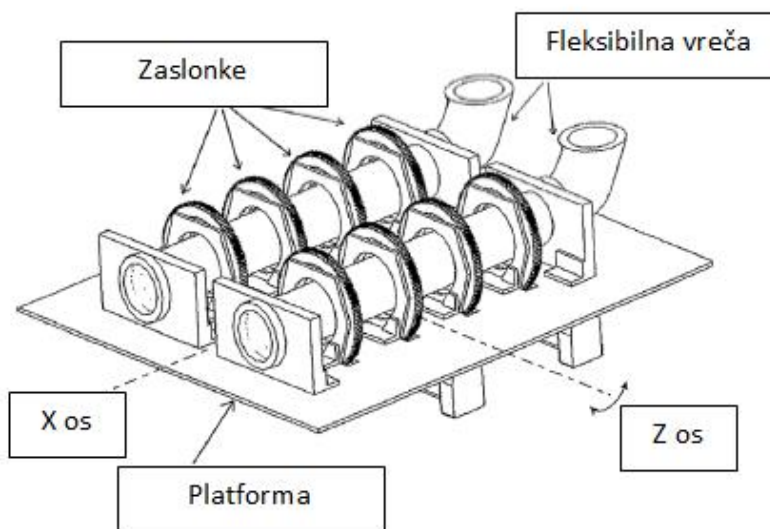
Fleksibilna vreča naprave za posnemanje črevesnega gibanja je silikonski vsebnik cevaste oblike z notranjim premerom 3-4 cm in dolžino 24 cm, ki ima na obeh koncih nameščena zapirala, ki se lahko med poskusom pritrdita ali odstranita. Med poskusom je na levi strani vsake cevi nameščeno plastično koleno s podaljškom, ki preprečuje iztekanje medija. Na desni strani cevi pa je nameščeno zapiralo, ki se ob koncu izvajanja poskusa odstrani in omogoča praznjenje medija. S pol odprtim sistemom, preprečujemo nastanek prevelikega tlaka, ki bi lahko povzročil poškodbo silikonske cevi, če bi bila cev zaprta na obeh straneh. Na platformi sta nameščeni 2 silikonski vreči, tako da je eksperiment mogoče izvajati hkrati v 2 paralelah. Fleksibilni vreči dopuščata volumen medija do 200 mL in se s tem približata in vivo pogojem v prebavnem traktu. V stanju na tešče je namreč povprečen volumen tekoče vsebine v tankem črevesu približno 125 mL (15). Vreči sta izdelani iz materiala, ki omogoča raztezanje in fleksibilnost med izvajanjem poskusa in hkrati povrnitev v prvotno obliko po končanem delovanju kontrakcij.

Zaslonke in platforma

Glavni del naprave predstavlja 8 zaslonk, ki so nameščene na zgornji stani platforme. Okoli vsake cevi se nahajajo po 4 zaslonke, ki jih poganja motor preko polževega gonila in omogoča zvezno spreminjanje velikosti krožnih kontrakcij. Tekom poskusa so nastavitve izbrane tako, da se vnaprej določi čas zakasnitve začetka gibanja vsake naslednje zaslonke, kar omogoča nastanek različnih vzorcev gibanja, ki se približajo vzorcem peristaltičnega gibanja v tankem črevesu. Zaslonke so vpete v platformo, ki jo poganjata dva elektromotorja in se vrti v smeri dveh osi (X in Z osi). Kot vrtenja okoli vsake osi je v območju $\pm 30^\circ$. Gibanje platforme omogoča nastanek hidrodinamičnih pogojev in mešanje tekočine znotraj cevi.

Amplituda kontrakcij zaslonk je razdalja od začetne do končne pozicije vsakega mehanizma in določa premer zoženja zaslonk. Višja amplituda kontrakcij zaslonk povzroči nastanek ožjega notranjega premera cevi in posledično večjega mehanskega pritiska. Perioda kontrakcij je čas, potreben, da se vsaka zaslonka skrči in ponovno vrne v začetni položaj.

Čas, ki je potreben, da platforma dokonča gibanje okoli ene osi, je opredeljen s periodo platforme. Kot vrtenja platforme okoli vsake osi pa lahko spremenimo z nastavitvijo amplitude. Amplituda in perioda platforme se lahko nastavita posamezno za vsako os.



Slika 8: Shema naprave za posnemanje gibanja črevesa. Sestavne dele predstavljajo platforma, dve fleksibilni vreči in zaslonke. Prirejeno po (9).

3.3.2. Izvedba testa sproščanja na napravi za posnemanje črevesnega gibanja

Prižgali smo komoro in nastavili temperaturo na 37 °C. Nato smo prižgali računalnik in vmesnik na napravi. Pripravili smo silikonsko cev, jo pravilno vstavili v komoro in na spodnji strani cevi pritrdili črn zamašek. Medtem smo medij segreli na temperaturo med 40,0-41,0 °C. Ko se je medij segrel na želeno temperaturo, smo z merilnim valjem odmerili ustrezno količino medija (1 cev = 170 mL). Medij smo kvantitativno prenesli v cev in namestili zamašek na levi strani cevi (plastično koleno s podaljškom). Program smo zagnali brez stiskanja zaslonk za 10-15 min, da sta se temperaturi medija in vreče izenačili. Po 10-15 min smo preverili temperaturo znotraj cevi, ki mora biti okoli 37 °C ($37,0 \pm 0,5$ °C). Nato smo istočasno namestili tableti v obe silikonski cevi in pričeli z eksperimentom. Test smo izvajali 6 ur (v nekaterih primerih tudi 8 ur), vzorčili pa vsako uro. Ob času vzorčenja smo iz cevi odvzeli 3,0 mL vzorca, ki smo jih nadomestili s 3,0 mL medija. Vzorce smo prefiltrirali skozi filter 0,45 µm v vialo in jih ustrezno redčili. Po zadnjem vzorčenju smo ustavili program in po odstranitvi zamaška na desni strani izpraznili vsebino posamezne cevi.

Pri izvajanju poskusov smo uporabili različne nastavitve programov, pri katerih smo spreminjali nastavitve platforme in tako dosegli različne hitrosti.

Tabela 3: Nastavitve programov, ki smo jih uporabili pri izvedbi poskusov.

Nastavitve	Kontrakcije zaslonk		Nagib platforme	
	Amplituda (°)	Perioda (s)	Amplituda (°)	Perioda (s)
Program A (Osnovni program)	21	10	23	10
Program B	21	10	11	10
Program C	21	10	11	20

Program A je poimenovan Osnovni program, saj smo ga uporabili pri testiranju vsake FO. Nastavitve programa A so bile uporabljene v predhodnih poskusih. Med razvojem metode na napravi za posnemanje črevesnega gibanja so namreč odkrili specifične nastavitve programa, ki so se izkazale kot najbolj optimalne (4).

3.3.3. Pregled opravljenih poskusov

Poskuse smo opravljali na treh različnih FO. Vse FO smo testirali na napravi za posnemanje črevesnega gibanja, dodatne teste za FO 3 pa smo izvedli še na napravi USP II.

FO1: Na napravi za posnemanje gibanja črevesa smo analizirali tri vzorce različnih viskoznosti- nizke, srednje in visoke viskoznosti. Poskuse za FO 1 smo izvedli v fosfatnem pufri pH 6,8 pri Osnovnem programu. Vsi testi so trajali 6 ur.

FO2: Poskuse na napravi za posnemanje črevesnega gibanja smo izvedli na dveh vzorcih. Najprej smo analizirali vzorec 1 pri treh različnih nastavitvah programov (Program A, B, C). Nato smo opravili še poskuse na vzorcu 2 pri Osnovnem programu. Po dva testa za primerjavo sproščanja učinkovine iz dveh različnih vzorcev smo izvajali 8 ur, preostale teste pa 6 ur. Kot medij smo uporabili deionizirano vodo.

FO3: Pred izvedbo testov na napravah smo opravili test namakanja, kjer smo se odločili za medij, v katerem smo potem izvedli nadaljnje poskuse na napravi za posnemanje črevesnega gibanja. Izbrali smo medij 0,01 M HCl + NaCl (2g/L). Teste smo izvajali 6 ur pri Osnovnem programu. Dodatne poskuse smo opravili še na napravi USP II pri dveh različnih hitrostih obratov: 50 obratov/min in 100 obratov/min, trajali pa so 24 ur.

3.4. Izračun faktorja podobnosti (f_2) in faktorja različnosti (f_1)

Za primerjavo dobljenih profilov sproščanja lahko uporabimo metodo izračuna f_1 in f_2 . Glede na napotke FDA, sta si profila, ki ju primerjamo, podobna, če je f_2 med 50-100 in vrednost f_1 med 0-15. Dva profila se med seboj razlikujeta, če je vrednost $f_2 < 50$ in $f_1 > 15$. S povečevanjem vrednosti f_1 se povečuje razlika med dvema profiloma (29, 30).

$$f_1 = \{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|] / [\sum_{t=1}^n R_t]\} \cdot 100$$

$$f_2 = 50 \cdot \log \{[1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \cdot 100\}$$

Slika 9: Formuli za izračun f_1 in f_2 . Vrednost n predstavlja število odvzemov vzorcev. R_t in T_t predstavljata delež sproščene učinkovine reference in testiranega vzorca v posamezni časovni točki. Povzeto po (30).

4. REZULTATI

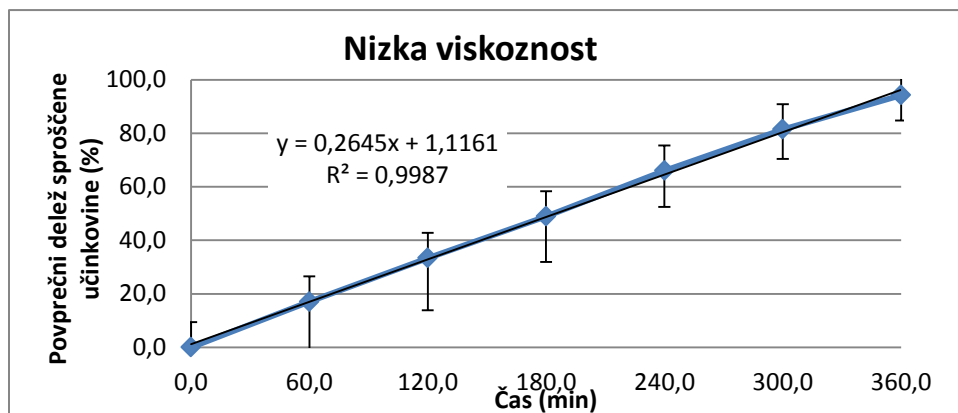
Testirali smo tri različne FO. V Tabelah 4-7 so predstavljeni rezultati, dobljeni na napravi za posnemanje črevesnega gibanja, v Tabeli 8 pa so predstavljeni rezultati sproščanja, ki smo jih izvedli na napravi USP II.

4.1. FO 1: Ogrodne tablete iz PEO

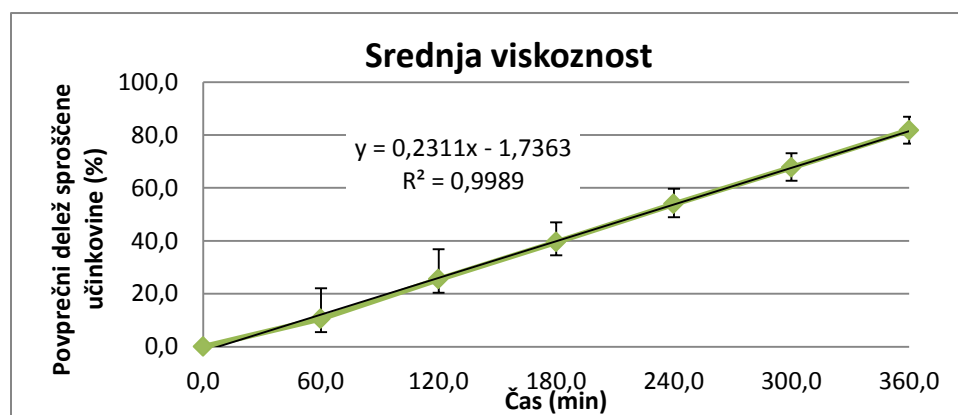
Prva FO, ki smo jo testirali, so bile ogrodne tablete iz PEO. Vzorci so bili treh različnih viskoznosti- nizke, srednje in visoke. Pri izvajanju testa na napravi za posnemanje črevesnega gibanja smo uporabili nastavitve za Program A, torej Osnovni program.

Tabela 4: Rezultati poskusov sproščanja izvedenih na FO1.

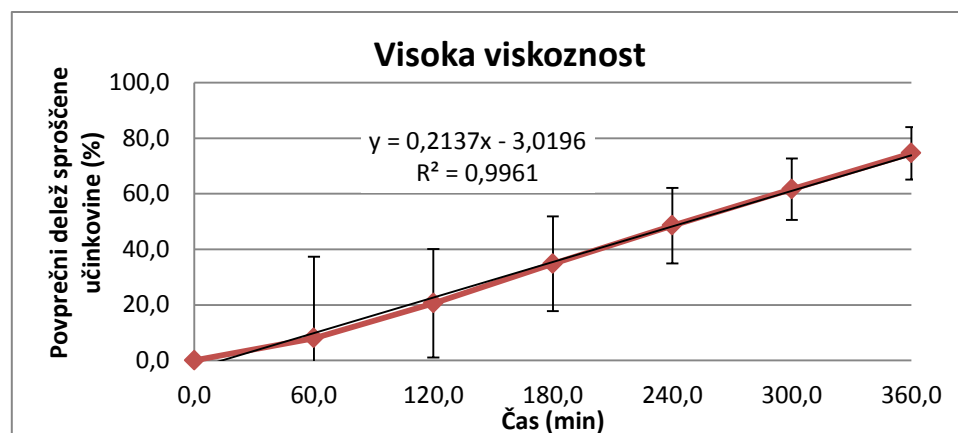
<i>Nizka viskoznost (n=6)</i>							
Čas (min)	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine (%)	0	17,0	33,4	48,9	66,0	81,5	94,3
SD	0	5,0	6,5	8,3	9,0	9,0	8,9
RSD (%)	0	29,3	19,5	17,1	13,6	11,1	9,5
<i>Srednja viskoznost (n=6)</i>							
Čas (min)	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine (%)	0	10,6	25,5	39,5	53,9	67,7	81,8
SD	0	1,2	2,9	2,9	3,1	3,6	4,1
RSD (%)	0	11,6	11,4	7,4	5,8	5,4	5,0
<i>Visoka viskoznost (n=6)</i>							
Čas (min)	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine (%)	0	8,0	20,6	34,8	48,6	61,7	74,6
SD	0	1,8	4,5	6,2	7,9	9,0	9,4
RSD (%)	0	22,8	21,8	17,8	16,2	14,6	12,6



Graf 1: Povprečni delež sproščene učinkovine pri nizki viskoznosti vzorca. Interval napake predstavlja vrednosti RSD. Na grafu je prikazana tudi enačba, ki predstavlja enačbo premice in R^2 , ki predstavlja Pearsonov koeficient korelacije.



Graf 2: Povprečni delež sproščene učinkovine pri srednji viskoznosti vzorca. Interval napake predstavlja vrednosti RSD. Na grafu je prikazana tudi enačba, ki predstavlja enačbo premice in R^2 , ki predstavlja Pearsonov koeficient korelacije.



Graf 3: Povprečni delež sproščene učinkovine pri visoki viskoznosti vzorca. Interval napake predstavlja vrednosti RSD. Na grafu je prikazana tudi enačba, ki predstavlja enačbo premice in R^2 , ki predstavlja Pearsonov koeficient korelacije.

4.2. FO2: Ogrodne tablete iz HPMC-ja

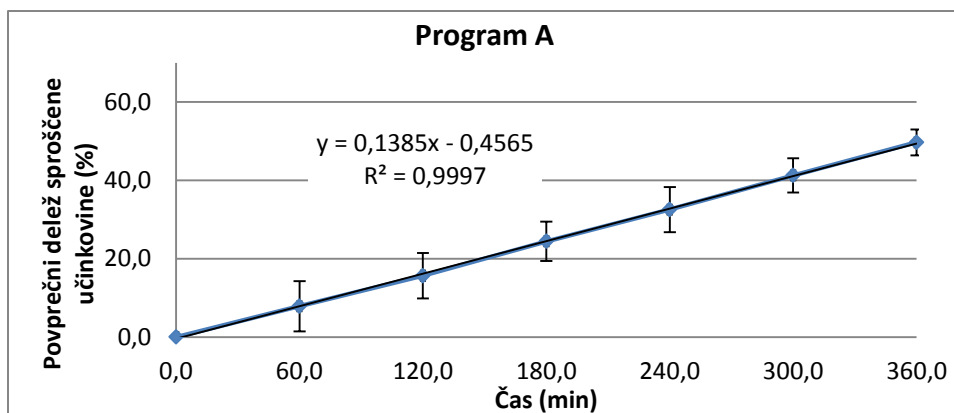
Pri ogrodnih tabletah iz HPMC-ja smo izvedli teste vzorcu dveh različnih formulacij. Formulaciji sta se razlikovali glede na delež in viskoznost polimera. Vzorec 1 je vseboval 20% HPMC viskoznosti 15,000 Pas, Vzorec 2 pa 35% HPMC z viskoznostjo 4,000 Pas (8). Najprej smo Vzorec 1 testirali pri različnih programih, nato pa smo testirali še Vzorec 2 pri Osnovnem programu.

4.2.1. Različne nastavitve programov

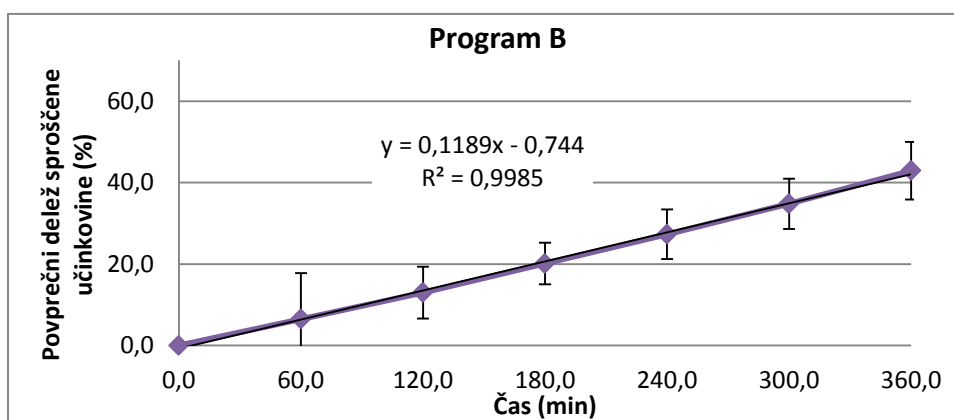
Ogrodne tablete iz HPMC-ja smo testirali pri treh različnih nastavitvah programov na Vzorc1. Spremembe nastavitvev programov so navedene v Tabeli 2.

Tabela 5: Rezultati poskusov sproščanja izvedenih na FO 2 na Vzorc1 pri različnih nastavitvah programov.

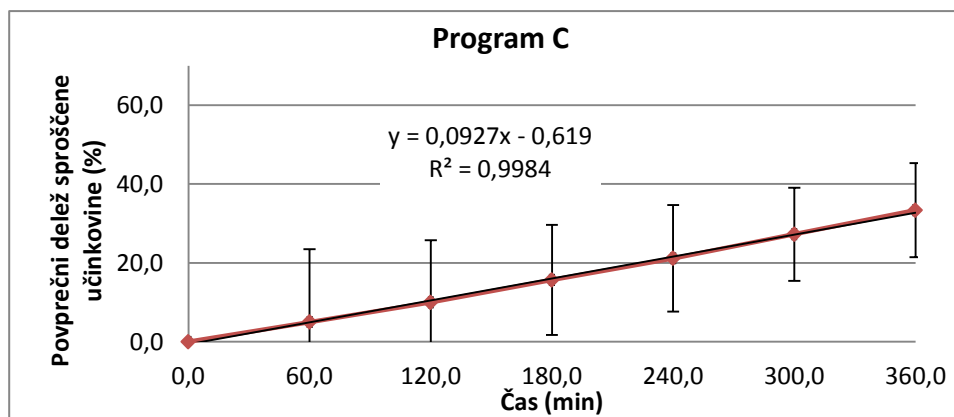
<i>Program A (n=6)</i>							
Čas (min)	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine (%)	0	7,9	15,6	24,4	32,5	41,3	49,7
SD	0	0,5	0,9	1,2	1,9	1,8	1,6
RSD (%)	0	6,4	5,8	5,0	5,7	4,4	3,3
<i>Program B (n=6)</i>							
Čas (min)	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine (%)	0	6,5	13,0	20,1	27,3	34,8	42,9
SD	0	0,7	0,8	1,0	1,7	2,1	3,0
RSD (%)	0	11,3	6,3	5,1	6,1	6,1	7,1
<i>Program C (n=6)</i>							
Čas (min)	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine (%)	0	5,0	10,0	15,7	21,2	27,3	33,4
SD	0	0,9	1,6	2,2	2,9	3,2	4,0
RSD (%)	0	18,5	15,8	14,0	13,5	11,8	11,9



Graf 4: Povprečni delež sproščene učinkovine Vzorca 1 pri Programu A. Interval napake predstavlja vrednosti RSD. Na grafu je prikazana tudi enačba, ki predstavlja enačbo premice in R^2 , ki predstavlja Pearsonov koeficient korelacije



Graf 5: Povprečni delež sproščene učinkovine Vzorca 1 pri Programu B. Interval napake predstavlja vrednosti RSD. Na grafu je prikazana tudi enačba, ki predstavlja enačbo premice in R^2 , ki predstavlja Pearsonov koeficient korelacije



Graf 6: Povprečni delež sproščene učinkovine Vzorca 1 pri Programu C. Interval napake predstavlja vrednosti RSD. Na grafu je prikazana tudi enačba, ki predstavlja enačbo premice in R^2 , ki predstavlja Pearsonov koeficient korelacije

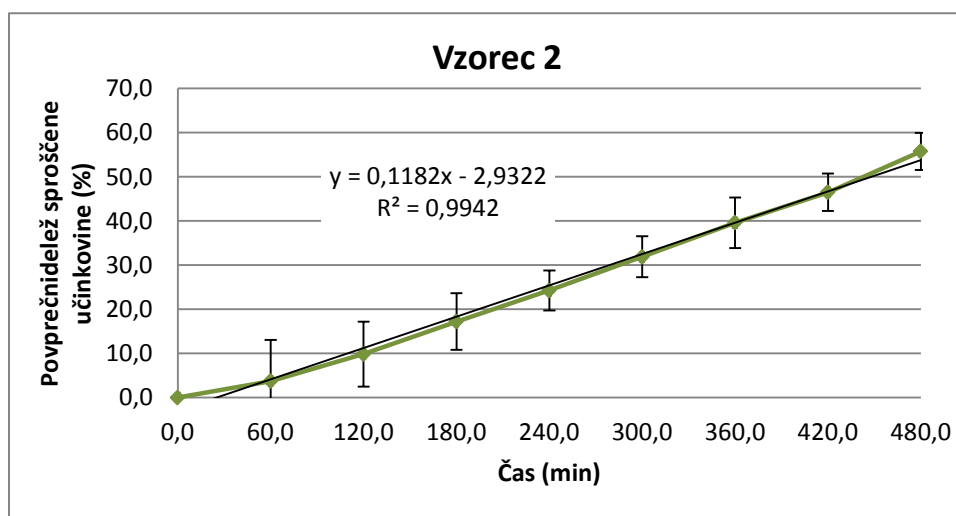
4.2.2. Primerjava dveh HPMC vzorcev

Pri ogrodnih tabletah iz HPMC-ja smo izvedli preizkus sproščanja še na dodatnem vzorcu. Testiranje smo izvedli pri nastavitvah za Program A. Po dva testa za primerjavo sproščanja učinkovine smo izvajali 8 ur (časovni točki 420 min in 480 min izvedeni v dveh paralelah), preostale teste pa 6 ur (6 paralel).

Tabela 6: Rezultati poskusov sproščanja izvedenih na FO 2 na Vzorcju 1 in Vzorcju 2 pri Programu A.

Vzorec 1 (n=6)									
Čas (min)	0	60	120	180	240	300	360	420	480
Povprečni delež sproščene učinkovine (%)	0	7,9	15,6	24,4	32,5	41,3	49,7	58,5	66,0
SD	0	0,5	0,9	1,2	1,9	1,8	1,6	3,0	3,7
RSD (%)	0	6,4	5,8	5,0	5,7	4,4	3,3	5,1	5,6
Vzorec 2 (n=6)									
Čas (min)	0	60	120	180	240	300	360	420	480
Povprečni delež sproščene učinkovine (%)	0	3,8	9,9	17,2	24,3	31,9	39,6	46,5	55,8
SD	0	0,4	0,7	1,1	1,1	1,5	2,3	2,0	2,3
RSD (%)	0	9,4	7,4	6,4	4,5	4,6	5,7	4,3	4,2

*420 in 480 min vzorčeni v dveh paralelah



Graf 7: Povprečni delež sproščene učinkovine pri analizi Vzorca 2 pri programu A. Interval napake predstavlja vrednosti RSD. Na grafu je prikazana tudi enačba, ki predstavlja enačbo premice in R^2 , ki predstavlja Pearsonov koeficient korelacije

4.3.FO3: Osmotske črpalke

Najprej smo opravili preizkuse na napravi za posnemanje črevesnega gibanja pri Osnovni nastavitvi programa, nato pa smo opravili dodatne teste še na napravi USP II pri dveh različnih hitrostih vrtenja.

4.3.1. Poskusi izvedeni na napravi za posnemanje črevesnega gibanja

Najprej smo testirali osmotske črpalke na napravi za posnemanje črevesnega gibanja pri Programu A.

Tabela 7: Rezultati poskusov sproščanja za FO 3 na napravi za posnemanje črevesnega gibanja.

Program A (n=4)							
Čas (min)	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine (%)	0	0	0,4	2,0	5,1	9,9	14,6
SD	0	0	0,2	1,8	3,1	4,1	5,1
RSD (%)	0	0	45,5	87,7	61,5	41,6	34,7

4.3.2. Poskusi izvedeni na napravi USP II pri dveh različnih hitrostih vrtenja

Opravili smo še dodatne preizkuse na napravi USP II pri dveh različnih nastavitvah hitrosti.

Tabela 8: Rezultati poskusov sproščanja za FO3 na napravi USP II pri dveh različnih nastavitvah obratov.

USP II, 50 obratov/min (n=4)											
Čas (min)	0	120	240	360	480	600	720	840	1080	1200	1440
Povprečni delež sproščene učinkovine (%)	0	0,0	2,6	11,6	19,6	30,2	42,1	54,3	78,8	84,8	85,9
SD	0	0,0	1,2	2,2	3,2	4,0	5,3	6,2	5,9	3,0	3,3
RSD (%)	0	0,0	46,7	19,4	16,4	13,1	12,5	11,5	7,4	3,5	3,9
USP II, 100 obratov/min (n=4)											
Čas (min)	0	120	240	360	480	600	720	840	1080	1200	1440
Povprečni delež sproščene učinkovine (%)	0	0,1	2,2	10,5	18,5	29,6	41,2	53,3	79,3	88,3	89,3
SD	0	0,2	2,7	6,0	8,2	8,7	9,4	11,2	5,9	5,1	6,0
RSD (%)	0	200,0	120,6	57,1	44,1	29,4	22,9	21,0	7,4	5,8	6,7

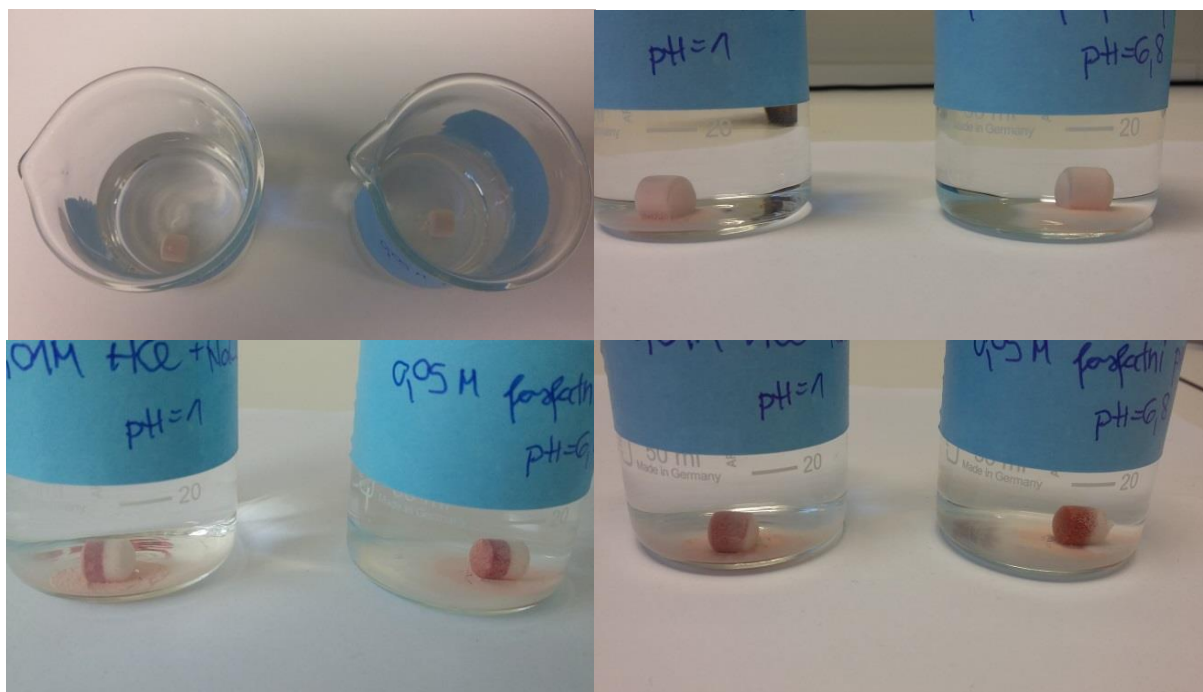
4.4. Ostali testi

Test namakanja za FO 3

Pred izvedbo poskusa z osmotskimi črpalkami, smo za izvedbo testa izbirali med dvema medijema- 0,01 M HCl + NaCl (2g/L) in 0,05 M fosfatnim pufrom pH 6,8. Zato smo najprej opravili test namakanja.

V prvi uri so bile opazne največje spremembe in najbolj se je povečal volumen same FO. Opazili smo, da je bila difuzija delcev pri FO v 0,05 M fosfatnem pufru pH 6,8 hitrejša. Test smo pustili tudi čez noč. Po 24 urah smo opazili, da se je površina FO v 0,01 M HCl + NaCl (2g/L) skoraj v celoti obarvala rdeče. V 0,05 M fosfatnem pufru pH 6,8 je bila še bolj opazna meja med belo in rdečo plastjo, iz bele plasti iz odprtine za iztis, je bilo vidno iztekanje učinkovine, kar je bilo tudi v skladu s predhodnimi literaturnimi ugotovitvami.

Na podlagi testa smo se odločili, da za izvedbo testa na napravi za posnemanje črevesnega gibanja uporabimo medij 0,01 M HCl + NaCl (2g/L).



Slika 10: Rezultati testa namakanja za FO 3. Slike so bile posnete z mobilno napravo. Levo zgoraj je bila posneta slika ob začetku izvajanja poskusa, desno zgoraj po eni uri, levo spodaj po šestih urah in desno spodaj po štiriindvajsetih urah.

5. RAZPRAVA

Naprava za posnemanje črevesnega gibanja je v predhodnih študijah že pokazala diskriminatorne rezultate med dvema različnima formulacijami iz PEO. Proučevali so dve različni formulaciji ogrodnih tablet iz PEO na napravi za posnemanje črevesnega gibanja pri različnih nastavitvah programov. Formulacija A je vsebovala učinkovino in kombinacijo PEO nizke in srednje viskoznosti, formulacija B pa učinkovino in PEO srednje viskoznosti (4). Poskuse smo nadgradili tako, da smo testirali ogrodne tablete iz PEO treh različnih viskoznosti. Raziskovalno delo smo nadaljevali z ogrodnimi tabletami iz HPMC-ja. Predvidevali smo, da bo naprava za posnemanje črevesnega gibanja dobro ločila med vzorci ogrodnih tablet z drugim polimerom. Nazadnje smo testirali še osmotske črpalke. Uporabili smo jih kot negativno kontrolo, saj gre za mehansko neobčutljive FO. Pričakovali smo, da različne intenzitete programov ne bodo imele bistvenega vpliva na kinetiko sproščanja ZU iz osmotskih črpalk.

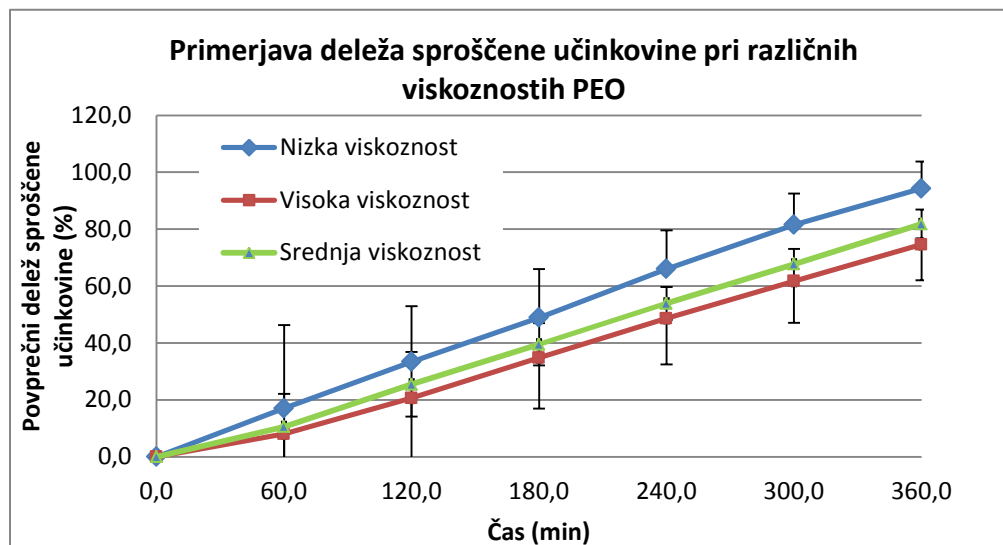
5.1. Rezultati glede na posamezno FO

5.1.1. FO1: Ogradne tablete iz PEO

Kot prvo FO smo izbrali ogrodne tablete iz PEO. Gre za mehansko občutljivo FO, saj so v literaturi že pokazali, da različne hitrosti vrtenja v USP II vplivajo na različno kinetiko sproščanja ZU iz ogrodnih PEO tablet (22). Predhodno so sodelavci prikazali, da tudi različne nastavitve v napravi za posnemanje črevesnega gibanja, vplivajo na delež sproščene učinkovine (4). Prav tako so v okviru raziskovanja in optimizacije naprave že izvedli teste več različnih vzorcev pri eni izbrani nastavitvi, za katero se je izkazalo, da uspešno in smiselno loči med vzorci različne sestave (4). Najboljše razlikovanje med vzorci je bilo doseženo pri Programu A, zato smo pri analizi vzorcev FO 1 uporabili enake nastavitve. Za izvedbo našega poskusa smo zato uporabili enake pogoje, kot so jih uporabili v predhodnih testiranjih. Poleg enakih nastavitvev smo uporabili enak medij, fosfatni pufer pH 6,8, ki se pogosto uporablja za disolucijske teste, saj je pH vrednost podobna tisti v tankem črevesu.

Pri izvedbi poskusa smo izbrali nastavitve Progama A (prikazano v Tabeli 3). Testirali smo ogrodne tablete iz PEO, ki se po sestavi razlikujejo glede na stopnjo viskoznosti polimera. Glede na pretekle obetavne rezultate, smo predvidevali, da bo naprava za posnemanje

črevesnega gibanja dobro ločila med vzorci različnih viskoznosti. Formulacije z nižjo stopnjo viskoznosti polimera so namreč bolj dovzetne za erozijo, zato se gelski plašč hitreje odstrani s površine tablete (4). Posledično se pri polimerih nižje stopnje viskoznosti, sprosti večji delež učinkovine.



Graf 8: Povprečni delež sproščene učinkovine pri treh različnih viskoznostih PEO. Interval napake predstavlja vrednosti RSD.

Na Grafu 8 so prikazani rezultati primerjave polimerov različnih viskoznosti. Iz grafa je razvidno, da je največji delež sproščene učinkovine dosežen pri polimeru nizke viskoznosti, najnižji delež sproščene učinkovine pa pri polimeru visoke viskoznosti. Polimer srednje viskoznosti se glede na delež sproščene učinkovine nahaja med polimeroma visoke in nizke viskoznosti.

Dokazali smo, da je pri polimeru nižje viskoznosti, kjer je sproščanje odvisno predvsem od erozije in so tablete zato bolj dovzetne za mehanske vplive, delež sproščene učinkovine večji kot pri polimeru višje viskoznosti. Profila sproščanja polimerov visoke in nizke viskoznosti smo namreč med seboj primerjali z izračunom f_1 . Dobili smo vrednosti $f_1=27$ in $f_2=40$ ($n=6$), s čemer smo potrdili, da se profila visoke in nizke viskoznosti med seboj razlikujeta. Pri polimeru srednje viskoznosti f_1 in f_2 nismo računali, saj je razpon stopnje viskoznosti velik- torej se lahko polimer srednje viskoznosti bolje približa ali zgornji ali spodnji meji viskoznosti (23). Z uporabo naprave za posnemanje črevesnega gibanja lahko torej uspešno ločimo med vzorci, ki vsebujejo različne viskoznosti PEO polimera.

5.1.2. FO2: Ogrodne tablete iz HPMC-ja

Poskuse smo nadaljevali na ogrodnih tabletah iz HPMC-ja, saj je to najpogosteje uporabljen polimer pri tej FO. Želeli smo razširiti uporabnost naprave za posnemanje gibanja črevesa in testirati, ali bomo tudi pri ogrodnih HPMC tabletah dosegli visoko diskriminatorno moč.

Za naše poskuse smo uporabili vzorec, ki so ga testirali na različnih napravah za preizkušanje sproščanja. Vzorec dveh različnih formulacij ogrodnih tablet s HPMC so najprej testirali na USP I in USP II. Metodi sta pokazali nizko diskriminatorno moč med formulacijama. Nato so izvedli farmakokinetično študijo, kjer so opazili, da je *in vivo* razlika med formulacijama (C_{max}) veliko večja, kot je bilo to predvideno iz *in vitro* testov (8).

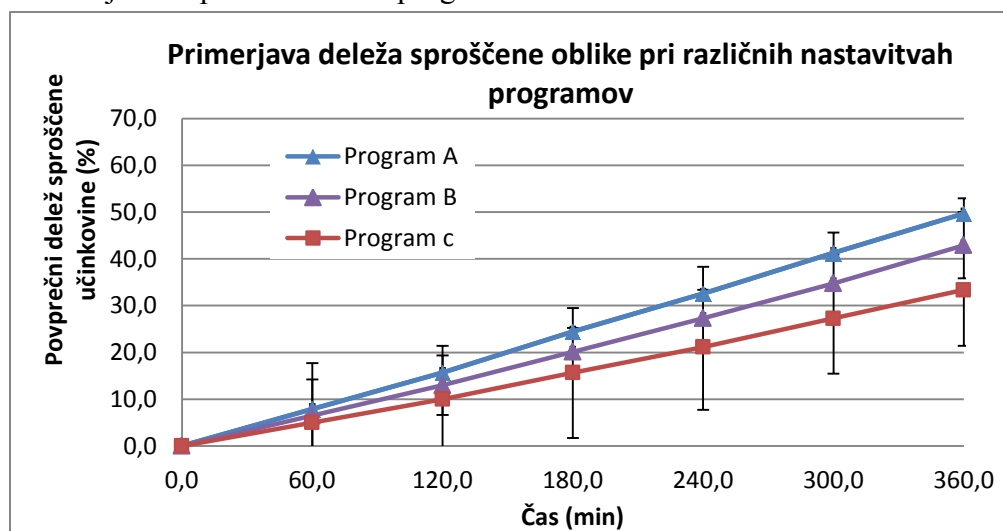
Na podlagi rezultatov farmakokinetične študije so začeli razvijati metodo, ki združuje napravo USP III in plastične kroglice in posnema pogoje v GIT traktu (9). Ker smo imeli na voljo rezultate deleža sproščene učinkovine na različnih napravah in rezultate študije *in vivo*, nas je zanimalo, kakšni bodo rezultati sproščanja, če enaka vzorca testiramo na napravi za posnemanje gibanja črevesa.

V predhodnih testiranjih na različnih farmakopejskih napravah za sproščanje, so kot medij uporabili vodo (8). Ker smo želeli posnemati enake pogoje, smo kljub temu, da to ni biorelevanten medij, za izvedbo poskusov kot medij uporabili vodo. Med izvajanjem testiranj so namreč ugotovili, da z uporabo vode kot medija dosežejo hitrejše profile sproščanja in boljšo diskriminatornost (8).

Poskuse smo izvajali 6 ur, po dva testa za primerjavo sproščanja učinkovine iz dveh različnih vzorcev pa smo izvajali 8 ur. Želeli smo, da bi imeli več časovnih točk, saj bi bila tako primerjava z rezultati predhodnih študij, kjer so teste izvajali v časovnem obdobju do 14 ur (odvisno od vrste naprave), čim boljša. Zaradi ročnega vzorčenja, pa je izvedba poskusa, časovno daljša več kot 8 ur, na napravi za posnemanje gibanje črevesa, težko izvedljiva.

Najprej smo na Vzorcju 1 opravili poskuse pri treh različnih nastavitvah programov, kjer smo med posameznimi programi spreminjali le nastavitve nagiba platforme, nastavitve kontrakcij zaslonk pa smo ohranili enake pri vseh programih. V računalniškem programu naprave je možno ločeno spreminjati nastavitve za kontrakcijo zaslonk in gibanje platforme. Čas potreben za dokončanje gibanja nagiba okoli osi, je opredeljen s periodo platforme. S spremembo amplitude platforme lahko prilagodimo rotacijski kot okoli vsake osi (4).

Posamezne nastavitve programov so prikazane v Tabeli 3. Kot prvi izbrani program smo uporabili Program A, kjer je amplituda platforme 23° in perioda 10 s. Nastavitve programa smo izbrali, ker je v dosedanjih raziskavah na napravi za posnemanje gibanja črevesa dobro ločil med posameznimi vzorci, uporabili pa smo ga tudi pri izvedbi poskusov na FO1. Sklenili smo, da Program C prav tako izberemo na podlagi že izvedenih poskusov na napravi za posnemanje črevesnega gibanja (4). Zmanjšali smo amplitudo na 11° in povečali periodo na 20 s, v primerjavi z Osnovnim Programom A. Pričakovali smo, da bomo z dvakratnim zmanjšanjem amplitude in dvakratnim povečanjem periode, dosegli najpočasnejše gibanje platforme in posledično najnižji delež sproščene učinkovine. Nato smo se odločili, da preizkusimo poiskati Program B, ki bi glede na nastavitve gibanja platforme, predstavljal srednjo vrednost. Amplitudo platforme smo glede na nastavitve Osnovnega programa A zmanjšali na 11° , periodo pa smo ohranili na vrednosti na 10 s, kot pri Programu A. Pričakovali smo, da bomo z dvakratnim zmanjšanjem amplitude in periodo enako kot pri Osnovnem programu, dosegli gibanje platforme, ki bo počasnejše kot pri Osnovnem programu A, vendar hitreje kot pri nastavitvah programa C.



Graf 9: Graf povprečnega deleža sproščene učinkovine pri različnih nastavitvah programov. Interval napake predstavlja vrednosti RSD.

Na Grafu 9 so prikazani rezultati povprečnega deleža sproščene učinkovine pri treh različnih nastavitvah programov. Največji delež sproščene učinkovine je bil dosežen pri Programu A, najnižji delež pa pri Programu C. S spreminjanjem hitrosti gibanja platforme se spreminja

delež sproščene učinkovine. Ker gre za ogrodne tablete, ki so občutljive na mehanske dražljaje, hitrost gibanja platforme, vpliva na hitrost sproščanja učinkovine.

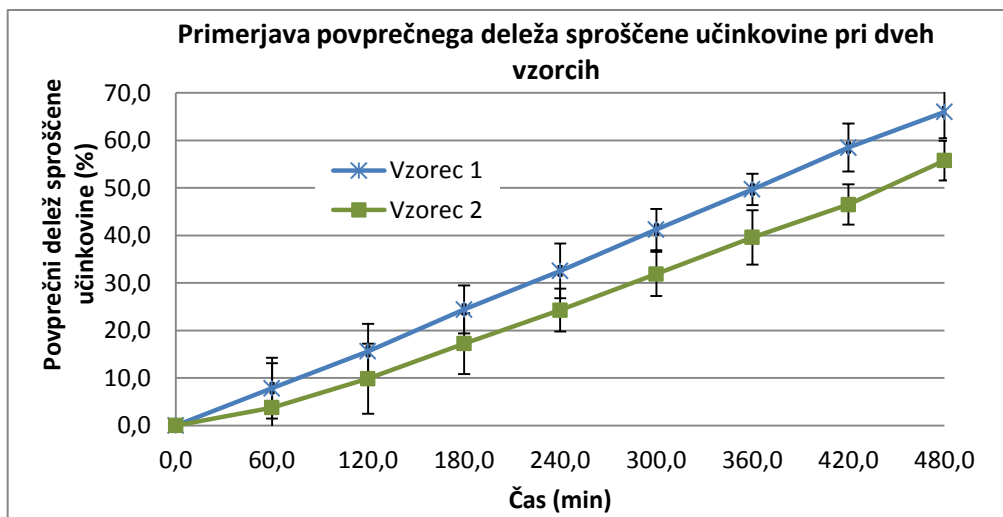
Pri nastavitvah Programa A je delež sproščene učinkovine največji. Z zmanjšanjem amplitude in povečanjem periode, kot smo naredili pri Programu C, smo dosegli najnižji delež sproščene učinkovine. Če zmanjšamo amplitudo, zmanjšamo rotacijski kot okoli osi, s povečanjem periode platforme pa podaljšamo čas, ki je potreben za dokončanje nagiba okoli osi. Tako dosežemo počasnejše gibanje platforme. Zaradi počasnejšega gibanja platforme sklepamo, da se tudi tekočina v notranjosti silikonske cevi pretaka počasneje in hkrati manj intenzivno ter s tem ustvarja manjšo hidrodinamsko obremenitev na površini ogrodne tablete. Predvidevamo, da je tudi tableta v notranjosti cevi v primerjavi s Programom A bolj statična in polimer na površini tablete zaradi manj intenzivnega premikanja ne erodira tako hitro. Program B se je glede na delež sproščene učinkovine uvrstil v sredino. Ker smo zmanjšali le amplitudo za polovično vrednost in ne tudi periode, smo dosegli manjši hidrodinamski stres v primerjavi s Programom A, saj se je tekočina v notranjosti gibala manj intenzivno zaradi manjšega naklona platforme.

Dokazali smo, da s spreminjanjem nastavitve periode in amplitude platforme na napravi za posnemanje gibanja črevesa dosežemo različne hitrosti gibanja in posledično različne deleže sproščene učinkovine iz HPMC ogrodnih tablet. Na intenzivnost programa tako vplivata amplituda in perioda gibanja platforme. Pri najbolj intenzivnem gibanju platforme dosežemo največji delež sproščene učinkovine, pri najpočasnejšem gibanju platforme pa je delež najnižji.

Nato smo poskuse izvedli še na drugem vzorcu. Glede na rezultate, ki so nam bili na voljo, smo sklepali, da je za dobro ločbo med vzorcem ključna visoka mehanska obremenitev tablet. Vzorca sta se namreč pri *in vitro* testiranjih dobro ločila pri tistih metodah, kjer je bila obremenitev večja (npr. USP III z dodatkom kroglic) ter v *in vivo* študiji, kjer je vpliv črevesnega gibanja zelo izrazit. Pričakovali smo, da bo zaradi specifičnega gibanja vsebine v silikonski cevi, tudi naprava za posnemanje črevesnega gibanja uspešno ločila med dvema testiranima vzorcema.

Poskuse smo izvedli pri Programu A. Za ta program smo se odločili, saj se je že na primeru ogrodnih tablet iz PEO izkazalo, da z izbranim programom dosežemo profile sproščanja z visoko stopnjo diskriminatornosti. Kot medij smo uporabili vodo.

Na Grafu 10 je prikazan povprečni delež sproščene učinkovine dveh različnih vzorcev ogrodnih tablet iz HPMC v časovnem obdobju 8-ih ur.



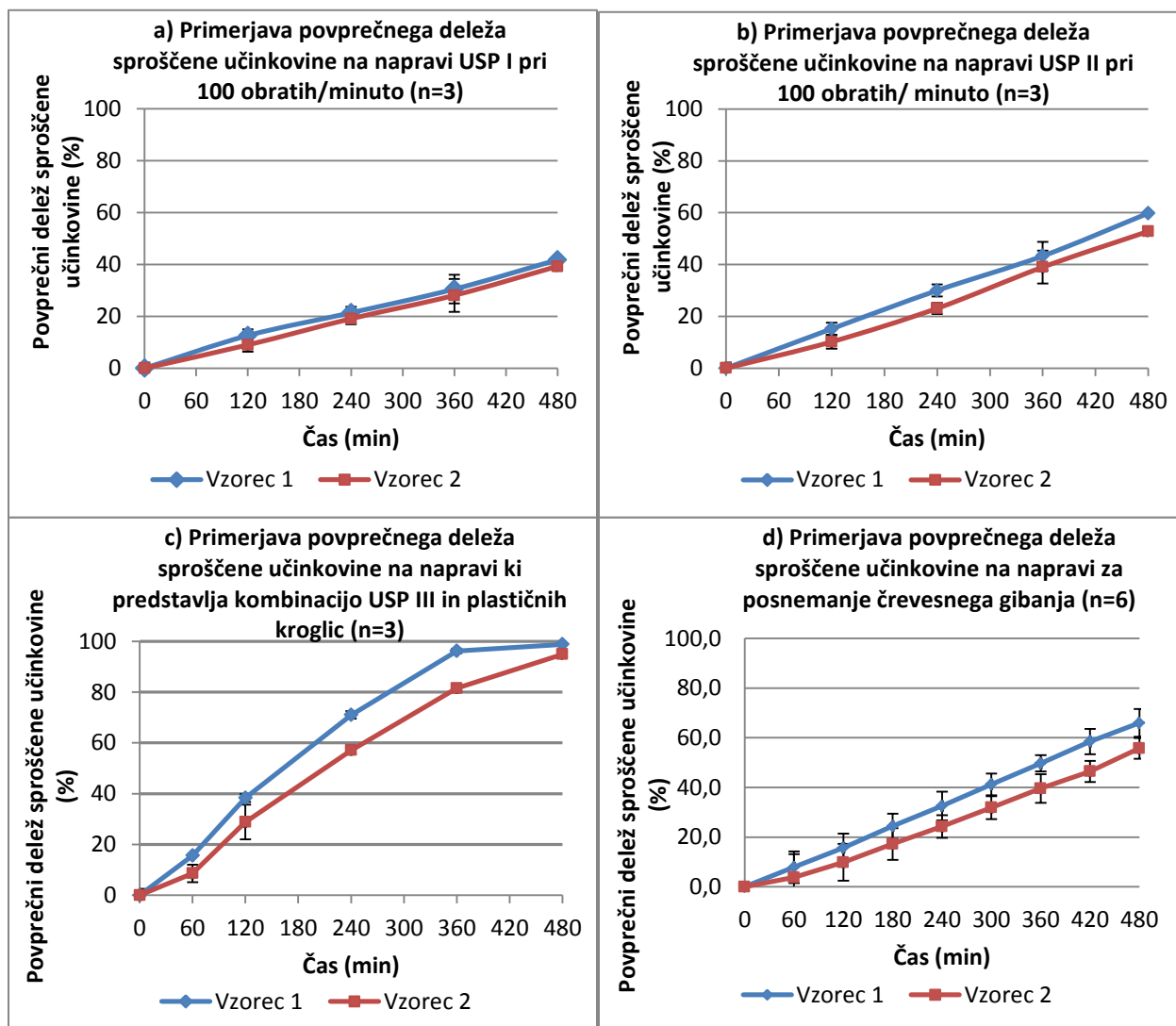
Graf 10: Primerjava povprečnega deleža sproščene učinkovine pri dveh vzorcih. Interval napake predstavlja vrednosti RSD.

V rezultatih predhodno opravljene študije je profil sproščanja Vzorca 1 hitrejši v primerjavi s profilom sproščanja Vzorca 2 (8). Grafično je torej Vzorec 1 zgoraj, Vzorec 2 pa pod njim. Naprava za posnemanje črevesnega gibanja torej razporedi vzorce v enakem vrstnem redu v primerjavi z drugimi *in vitro* metodami (8).

V članku so primerjali profile sproščanja dveh vzorcev na napravah USP I, USP II in napravi ki predstavlja kombinacijo USP III in plastičnih kroglic. Ugotovili so, da napravi USP I in USP II ne zagotavljata dobrih diskriminatornih rezultatov. Rezultati *in vivo* namreč dokazujejo, da sta vzorca različna, vendar napravi USP I in USP II tega ne pokažeta *in vitro*. Naprava, ki predstavlja kombinacijo USP III in plastičnih kroglic, pa je med vzorcema dobro ločila (8).

Na Grafu 11 so prikazani povprečni deleži sproščene učinkovine na različnih napravah za testiranje sproščanja. Grafi a), b) in c) so povzeti po že objavljeni raziskavi (5). Na grafu d) so predstavljeni rezultati povprečnega deleža sproščene učinkovine na napravi za posnemanje črevesnega gibanja. Vzorcev na napravi smo izvajali 8 ur, zato so zaradi boljše primerjave grafi prikazani v enakem časovnem obdobju, kljub temu, da so bila testiranja na ostalih napravah izvedena v obdobju do 14 ur.

Iz grafov je razvidno, da je najmanjša razlika med vzorcema opazna na napravah USP I in USP II. Naprava, ki predstavlja kombinacijo USP III in plastičnih kroglic ter naprava za posnemanje črevesnega gibanja, dobro ločita med testiranima vzorcema. Naprava za posnemanje črevesnega gibanja pokaže večjo razliko med vzorcema v primerjavi z USP I in USP II. Metoda je torej bolj diskriminatorna. Dokazali smo, da naprava za posnemanje črevesnega gibanja dobro loči med dvema različnima formulacijama ogrodnih tablet iz HPMC. Dokazali smo tudi, da metoda zagotavlja dobre diskriminatorne rezultate, saj pri dveh vzorcih, ki se razlikujeta *in vivo*, razliko med vzorcema pokaže tudi *in vitro*.



Graf 11: Primerjava povprečnega deleža sproščene učinkovine dveh vzorcev na različnih napravah za testiranje sproščanja. Grafi a), b) in c) so povzeti po (8). Graf d) predstavlja rezultate pridobljene na napravi za posnemanje črevesnega gibanja. Interval napake predstavlja vrednosti RSD.

Profile sproščanja dobljene na različnih napravah smo ovrednotili tudi s primerjavo f_1 . Faktorje smo izračunali iz rezultatov predhodne študije (8) in rezultatov dobljenih na napravi za posnemanje črevesnega gibanja. Zanimalo nas je, kako se profila sproščanja na napravi za posnemanje črevesnega gibanja med seboj razlikujeta v primerjavi z ostalimi metodami.

Tableta 9: f_1 na različnih napravah za testiranje sproščanja iz FO. f_1 so za naprave USP I, USP II in napravo ki predstavlja kombinacijo USP III in plastičnih kroglic povzeti po (8). Vrednost na napravi za posnemanje črevesnega gibanja je bila izračunana glede na eksperimentalne podatke.

Naprava	f_1
USP I (n=6)	11
USP II (n=6)	13
Kombinacija USP III in plastičnih kroglic (n=5)	15
Naprava za posnemanje črevesnega gibanja (n=6)	35

n= število točk za izračun f_1

V Tabeli 9 so prikazani f_1 na različnih napravah za testiranje sproščanja iz FO. Za izračun f_1 na napravi za posnemanje črevesnega gibanja smo uporabili šest časovnih točk, saj se število paralelk v posameznih časovnih točkah razlikuje. Iz rezultatov je razvidno, da ima najmanjši f_1 naprava USP I, sledi USP II in nato naprava, ki predstavlja kombinacijo USP III in plastičnih kroglic. Z napravo za posnemanje črevesnega gibanja smo dosegli visok f_1 - višji v primerjavi z ostalimi metodami. Po napotkih FDA profila, ki ju primerjamo, nista različna, če je vrednost f_1 med 0 in 15 (30). Profila sproščanja dveh različnih vzorcev, dobljena na napravi za posnemanje črevesnega gibanja, se razlikujeta bolj v primerjavi z ostalimi metodami. S primerjavo f_1 smo še dodatno potrdili domnevo o dobri diskriminatorski moči rezultatov, dobljenih na napravi za posnemanje črevesnega gibanja.

V članku so predstavili tudi rezultate farmakokinetične študije. Iz dobljenih plazemskih profilov so določili povprečno maksimalno plazemsko koncentracijo in AUC. Pri podajanju rezultatov farmakokinetične študije so izračunali razmerje med obema vzorcema tako, da so vrednosti maksimalne plazemske koncentracije (c_{max}) delili. Razmerja so podana v odstotkih (8).

Tableta 10: Razmerje maksimalnih plazemskih koncentracij (c_{max}) formulacije A in formulacije B. Povzeto po (8).

Vzorec	C max
Formulacija A	20,7
Formulacija B	15,6
Razmerje c_{max} (%)	132,7

Glede na povprečne deleže sproščene učinkovine dobljene na napravi za posnemanje črevesnega gibanja smo izračunali razmerje med vzorcema v posameznih časovnih točkah. Iz podatkov predhodne študije smo izračunali tudi razmerja med vzorcema v posameznih časovnih točkah na ostalih predhodno proučevanih napravah za posnemanje sproščanja iz FO (8). Rezultati so prikazani v Tabeli 11. Zaradi primerjave z napravo za posnemanje črevesnega gibanja so razmerja na vseh napravah prikazana v časovnih točkah do 8 ur. Po internih podatkih za t_{max} učinkovine smo sklepali, da so za primerjavo z *in vivo* podatki najbolj relevantna disolucijska razmerja v drugi polovici profila sproščanja.

Tabela 11: Razmerje med povprečnimi deleži sproščene učinkovine dveh vzorcev v posameznih časovnih točkah na različnih napravah za posnemanje sproščanja iz FO. Podatki za naprave USP I, USP II in napravo, ki predstavlja kombinacijo USP III in plastičnih kroglic so povzeti po (8). Podatki na napravi za posnemanje črevesnega gibanja so bili določeni eksperimentalno.

Čas (min)	240	300	360	420	480
Vzorec1/Vzorec2 na napravi USPI (%)	125,1	/	117,4	/	111,1
Vzorec1/Vzorec2 na napravi USP II (%)	129,9	/	111,0	/	113,3
Vzorec1/Vzorec2 na napravi, ki predstavlja kombinacijo USP III in plastičnih kroglic (%)	124,3	/	118,0	/	104,1
Vzorec1/Vzorec2 na napravi za posnemanje črevesnega gibanja (%)	134,0	129,4	125,5	125,8	118,4

Razmerje c_{max} iz farmakokinetične študije je 132,7 %. Če razmerje primerjamo z rezultati v Tabeli 11, vidimo, da se rezultati, pridobljeni na napravi za posnemanje črevesnega gibanja, približajo rezultatom farmakokinetične študije.

Naprava za posnemanje črevesnega gibanja se v primerjavi z drugimi *in vitro* sistemi najbolj približa *in vivo* rezultatom vzdolž celotnega profila sproščanja. Sklepamo, da se naprava dobro približa *in vivo* razmerju zaradi specifičnega vzorca gibanja, ki ga ustvarjajo zaslonke in premikanje platforme. Zaslonke namreč stisnejo silikonsko cev in tako vplivajo na fizični kontakta tablete s steno, platforma pa omogoča nastanek hidrodinamskih pogojev in mešanje tekočine znotraj cevi. Nastavitve na napravi za posnemanje črevesnega gibanja prav tako omogočajo, da s spreminjanjem časa zakasnitve začetka gibanja vsake zaslonke, pride do nastanka gibanja, ki se približa vzorcu peristaltičnega gibanja v tankem črevesu.

Iz dobljenih rezultatov predvidevamo, da lahko z novo napravo za posnemanje črevesnega gibanja ustvarimo pogoje, ki pri mehansko občutljivih formulacijah omogočajo podobne profile sproščanja, kot potekajo *in vivo*. Uspešno doseženo ujemanje med *in vitro* in *in vivo* rezultati na izbranem primeru formulacije s HPMC nam kaže, da smo na dobri poti za ustvarjanje hidrodinamskih pogojev, kot so tisti *in vivo*. Seveda bo potrebno za potrditev te hipoteze napraviti še več poskusov z različnimi formulacijami in opraviti več meritev vzorcev gibanja tekočin in farmacevtske oblike. Poleg podobnih hidrodinamskih pogojev pa ne smemo zanemariti tudi direktnega vpliva pritiskov in sil stene prebavnega trakta na FO, kar pa je tudi predmet tekočih raziskav.

5.1.3. FO3: Osmotske črpalke

Kot zadnjo FO smo izbrali osmotske črpalke. Za to FO je značilno, da pH okolja in hidrodinamski pogoji nimajo vpliva na hitrost sproščanja učinkovine. Ker je sproščanje neodvisno od gastrointestinalne motitve, smo predvidevali, da različne nastavitve programov na napravi za posnemanje gibanja črevesa, ne bodo imele vpliva na delež sproščene učinkovine.

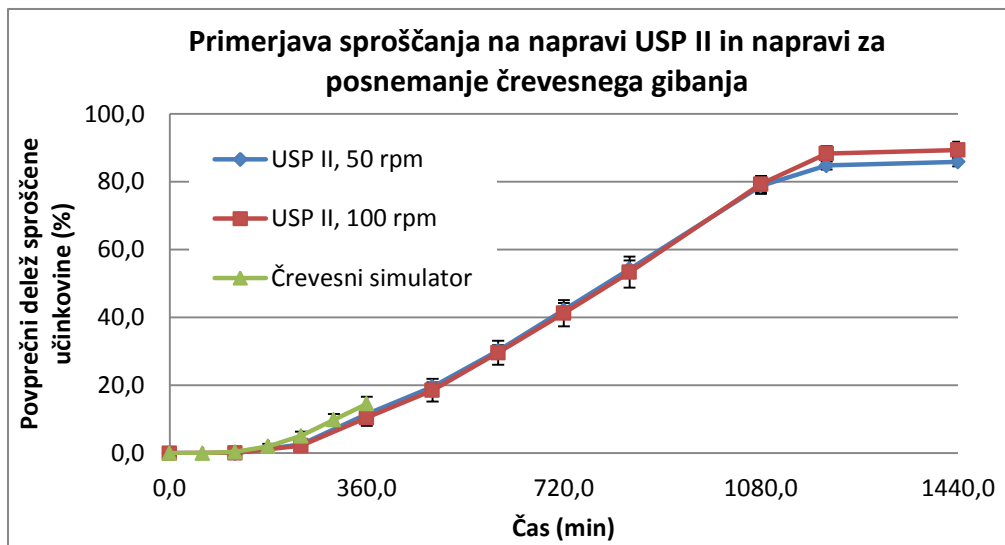
Pred samo izvedbo testov na napravi smo najprej izbrali ustrezen medij. Na podlagi znanstvenih člankov in splošnih postopkov za FO 3, smo se odločali med dvema medijema - med 0,01 M HCl + NaCl (2g/L) in 0,05 M fosfatnim pufrom pH 6,8. Opravili smo test namakanja in se na podlagi vizualnih rezultatov odločili, da prve poskuse izvedemo v 0,01 M HCl + NaCl (2g/L). Po prvih testiranjih smo ugotovili, da je po šestih urah delež sproščene učinkovine relativno nizek, zato smo poskus izvedli še v 0,05 M fosfatnem pufru pH 6,8. Vendar pa je bil delež sproščene učinkovine še nižji, zato smo poskuse nadaljevali v prvotno izbranem mediju. Za izvedbo poskusov na napravi za posnemanje črevesnega gibanja smo izbrali 0,01 M HCl + NaCl (2g/L). Kljub dejstvu, da to ni medij, kateremu bi bila učinkovina izpostavljena skozi daljše časovno obdobje, je sproščanje v tem mediju hitrejše zaradi samih kemijskih lastnosti učinkovine.

Na napravi za posnemanje črevesnega gibanja smo izvedli štiri poskuse pri Programu A. Prvotno smo nameravali opraviti testiranja pri različnih nastavitvah programov, vendar je bil delež sproščene učinkovine po šestih urah zelo nizek, zato se nam ni zdelo smiselno, da bi uporabili še počasnejši program. Prav tako s trenutno napravo zaradi njene zmogljivosti ni mogoče izbrati nastavitve, ki bi omogočale še hitrejše premikanje platforme.

Odločili smo se, da bomo dodatne poskuse opravili še na napravi USP II, pri dveh različnih nastavitvah hitrosti - 50 obratov/minuto in 100 obratov/minuto. Osmotske črpalke so mehansko neobčutljive, zato smo predvidevali, da bo delež sproščene oblike pri obeh nastavitvah hitrosti primerljiv.

Graf prikazuje primerjavo deleža sproščene učinkovine na napravi za posnemanje črevesnega gibanja in USP II pri dveh različnih nastavitvah hitrosti. Iz grafa je razvidno, da je delež sproščene učinkovine na napravi USP II pri dveh različnih nastavitvah hitrosti primerljiv, kar smo potrdili tudi z izračunom f_1 in f_2 . Izračunan vrednost $f_1=1$ in $f_2=95$ ($n=10$). Glede na

smernice FDA, smo dokazali, da sta profila med seboj podobna. Prav tako je rezultat primerljiv z napravo za posnemanje črevesnega gibanja, vendar f_1 in f_2 zaradi nizkega deleža sproščene učinkovine in visokih RSD vrednosti, nismo računali.



Graf 12: Primerjava povprečnega deleža sproščene učinkovine na napravi USP II pri dveh različnih nastavitvah hitrosti in napravi za posnemanje črevesnega gibanja. Interval napake predstavlja vrednosti SERM.

Delež sproščene učinkovine na napravi za posnemanje črevesnega gibanja je po 6 urah zelo nizek, saj gre za osmotske črpalke, ki omogočajo sproščanje učinkovine skozi daljše časovno obdobje. Za doseganje rezultatov, ki bi omogočali najboljšo primerjavo, bi teste na napravi za posnemanje črevesnega gibanja morali izvajati 24 ali vsaj 12 ur. Vendar naprava ne omogoča avtomatskega vzorčenja, zato je ročno vzorčenje v obdobju 24 ur težko izvedljivo.

Sodelavci iz Leka, kjer je bilo opravljeno raziskovalno delo v okviru te magistrske naloge trenutno v sodelovanju s Fakulteto za strojništvo izdelujejo novo napravo za posnemanje črevesnega gibanja, ki bo poleg drugih manjših sprememb omogočila tudi hitrejše gibanje platforme. Testiranje osmotskih črpalk bi lahko nadaljevali na novi napravi, saj bi tako ustvarili še bolj intenzivne in dinamične pogoje v notranjosti silikonskih vreč in bi ovrednotili, če so osmotske črpalke mehansko neobčutljive tudi pri še večjih mehanskih obremenitvah.

5.2. Primerjava mehansko občutljivih in neobčutljivih FO

Na napravi za posnemanje črevesnega gibanja smo testirali mehansko občutljive tablete z različnima polimeroma- PEO in HPMC. Predvidevali smo, da bomo s spreminjanjem nastavitvev amplitude in periode platforme vplivali na hitrost sproščanja iz FO. Kot negativno kontrolo smo izbrali osmotske črpalke. Gre za mehansko neobčutljive FO, zato spreminjanje nastavitvev na napravi za posnemanje črevesnega gibanja ne bi smelo imeti vpliva na hitrost sproščanja iz FO.

Sproščanje učinkovine iz ogrodnih tablet je najpogosteje kombinacija difuzije ZU preko gelskega plašča in erozije. Na proučevanje sproščanja učinkovine *in vitro* imajo velik vpliv hidrodinamski pogoji v okolici (31). S povečevanjem mehanske obremenitve na tableto se povečuje dovzetnost gelskega plašča na erozijo in posledično hitrost sproščanja iz FO. Sproščanje učinkovine iz osmotskih črpalk je nadzorovano preko semipermeabilne membrane, zato je neodvisno od vplivov okolja kot so pH, zunanji dražljaji in vrsta aparature, na kateri izvajamo test sproščanja.

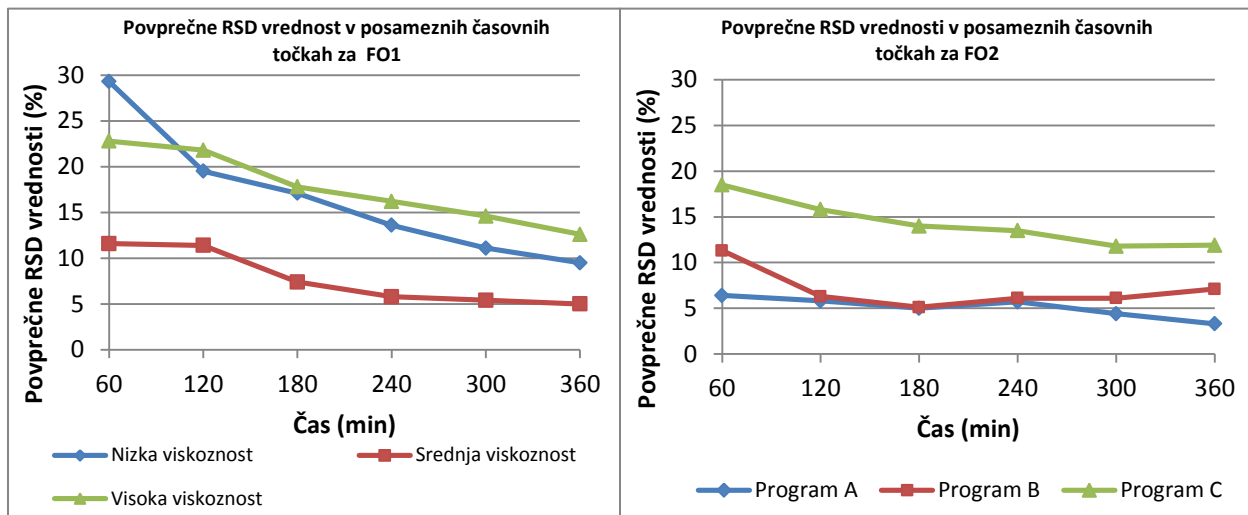
Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da so ogrodne tablete iz PEO in HPMC dovzetne za vplive okolice, saj smo dokazali, da s spreminjanjem nastavitvev periode in amplitude platforme na napravi za posnemanje gibanja črevesa dosežemo različne hitrosti gibanja in posledično različne deleže sproščene učinkovine.

Ker je za osmotske črpalke značilno, da se sproščajo skozi daljše časovno obdobje, trenutna naprava pa ne omogoča še hitrejšega gibanja platforme, bi poskuse lahko nadgradili na novi napravi za posnemanje črevesnega gibanja. Dokazali smo, da je začetni del profila sproščanja na napravi USP II in napravi za posnemanje črevesnega gibanja podoben, vendar bi za boljšo primerjavo z ogrodnimi tabletami morali opraviti še dodatne poskuse na novi napravi pri hitrejšemu gibanju platforme. S hitrejšim gibanjem platforme bi povečali vpliv hidrodinamskih pogojev v okolju in tako ovrednotili, če se s povečevanjem mehanske obremenitve ohranja delež sproščene učinkovine.

Dokazali smo, da s spreminjanjem nastavitvev na napravi za posnemanje črevesnega gibanja vplivamo na hitrost sproščanja učinkovine iz ogrodnih tablet. Za ovrednotenje vpliva naprave na mehansko neobčutljive osmotske črpalke pa bi poskuse morali še nadgraditi.

5.3. Primerjava RSD-jev

Iz dobljenih eksperimentalnih rezultatov smo izračunali povprečne vrednosti RSD. Na Grafu 13 so predstavljene RSD vrednosti za FO1 in FO2.



Graf 13: Levo je prikazan graf povprečnih vrednosti RSD za tri različne vzorce FO1 pri programu A, desno pa graf, ki prikazuje povprečne RSD vrednosti za Vzorec 1 FO2 pri treh različnih programih.

Iz grafov je razvidno, da so RSD vrednosti v povprečju večje pri FO1, torej ogrodnih tabletah iz PEO, kar nakazuje, da PEO nabreka manj enakomerno, kar je tudi splošno znano dejstvo, potrjeno iz literature predhodnih poskusov. Ogrodne tablete iz PEO namreč tvorijo bolj šibek gelski plašč, ki je bolj dovzeten za erozijo. Ogrodne tablete iz HPMC pa nabrekajo počasneje in tvorijo bolj čvrst gelski plašč, ki omogoča konstantno sproščanje skozi daljše časovne obdobje. Ker ogrodne tablete iz HPMC tvorijo močnejši gelski plašč (25), so manj dovzete za mehanske vplive v primerjavi z ogrodnimi tabletami iz PEO in delež sproščene učinkovine variira v manjši meri.

Možen vzrok za večje RSD vrednosti pri ogrodnih tabletah iz PEO je tudi dodatek polietilenglikola v granulatu. Ker gre za hidrofilen polimer, še dodatno veže vodo in lahko bistveno vpliva na tvorbo gelskega plašča. Njegova porazdelitev po ogrodju vpliva na hitrost nastanka gelskega plašča, zato nabrekanje ni vedno enakomerno in vrednosti RSD so posledično večje.

Pri FO2 so opazne razlike v RSD vrednostih med različnimi nastavitvami programov. Pri Programu A, za katerega smo dokazali, da omogoča najhitrejša gibanja platforme, so povprečne RSD vrednosti najnižje. Pri programu C, za katerega smo potrdili, da omogoča

najpočasnejše gibanje platforme in posledično najnižji delež sproščene učinkovine, pa so povprečne RSD vrednosti največje.

Pri FO3 so RSD vrednosti pri testiranju na napravi za posnemanje črevesnega gibanja v časovnem obdobju 360 min velike. Poskus smo namreč izvajali le 360 min in v tem časovnem obdobju se je sprostil majhen delež učinkovine (približno 10 % učinkovine). V začetni fazi sproščanja so tudi pri ostalih FO razlike v RSD vrednostih največje, saj je delež sproščene učinkovine nizek. Za osmotske črpalke pa je značilno, da poteka sproščanje skozi daljše časovno obdobje (približno 24 ur), zato je posledično po 6 urah delež sproščene učinkovine še nižji v primerjavi z drugimi testiranimi FO. Na napravi USP II so bile pri obeh nastavitvah hitrosti v začetni fazi sproščanja vrednosti RSD višje, nato pa so se s časom zmanjševale. S povečevanjem deleža sproščene učinkovine se torej zmanjšujejo povprečne RSD vrednosti. RSD vrednosti na napravi za posnemanje črevesnega gibanja, v časovnem obdobju 360 min, ne odstopajo bistveno od povprečnih RSD vrednosti na napravi USP II. Kljub temu, da je naprava USP II najpogosteje uporabljena konvencionalna *in vitro* metoda sproščanja in da je naprava za posnemanje črevesnega gibanja veliko bolj kompleksna, so rezultati dobljeni na obeh napravah (kar se tiče RSD vrednosti) primerljivi.

6. SKLEP

Naprava za posnemanje črevesnega gibanja je ena izmed novejših alternativnih metod za testiranje sproščanja, ki s svojo obliko in gibanjem posnema gibanje tankega črevesa in omogoča ponazoritev nekaterih *in vivo* pogojev v človeškem telesu. V magistrski nalogi smo nadgradili raziskovalno delo na napravi in ovrednotili sproščanje iz treh različnih FO.

- Z izvedbo poskusov na ogrodnih tabletah iz PEO smo pokazali, da naprava za posnemanje črevesnega gibanja uspešno in nazorno loči med vzorci različnih viskoznosti PEO polimera in jih smiselno razporedi glede na delež sproščene učinkovine.

- Do podobnega zaključka smo prišli tudi pri ogrodnih tabletah iz HPMC. Dokazali smo, da s spreminjanjem nastavitve amplitude in periode gibanja spreminjamo hidrodinamske pogoje in s tem vplivamo na kinetiko sproščanja.

- Ugotovili smo, da lahko z napravo za posnemanje črevesnega gibanja dosežemo bolj diskriminatorne rezultate na izbrani FO v primerjavi z ostalimi do sedaj opisanimi *in vitro* metodami (USP I, USP II in napravo, ki predstavlja kombinacijo USP III in plastičnih kroglic).

- Preko razmerij c_{max} za dve različni formulaciji smo dokazali, da naprava za posnemanje črevesnega gibanja v primeru izbranih HPMC ogrodnih tablet omogoča dobro korelacijo z *in vivo* sproščanjem.

- Iz rezultatov testiranja osmotskih črpalk smo ugotovili, da se pri FO, ki so mehansko neobčutljive in pri katerih sproščanje ni odvisno od hidrodinamskih vplivov, na napravi za posnemanje črevesnega gibanja dobimo praktično identične profile kot s konvencionalnimi USP disolucijskimi testi, zaradi česar lahko osmotske črpalke uporabimo kot dobro negativno kontrolo za mehansko posredovanih vplivov na sproščanje.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko predvidevamo, da se naprava za posnemanje črevesnega gibanja s svojo obliko in specifičnim vzorcem gibanja dobro približa nekaterim pogojem, ki *in vivo* vplivajo na kinetiko sproščanja ZU iz mehansko občutljivih FO. Delovanje zaslonk in premikanje platforme namreč ustvarita določene hidrodinamske pogoje in nastanek gibanja, ki skuša posnemati vzorec peristaltičnega gibanja v tankem črevesu. Pri mehansko občutljivih FO, kjer je to še posebej pomembno, lahko dobimo dobro ujemanje med *in vitro* vrednostmi ter rezultati, dobljenimi *in vivo*.

7. LITERATURA

1. Bogataj M, Mrhar A, Kerec Kos M, Trontelj J, Vovk T, Pišlar. Biofarmacija s farmakokinetiko (Elketronski Vir): Učbenik za študente 4. letnika Enovitega magistrskega študija farmacije in študenke 1. letnika Magistrskega študija industrijske farmacije. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2013. 22-39 str.
2. Kostewicz ES, Abrahamsson B, Brewster M, Brouwers J, Butler J, Carlert S, idr. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci Off Eur Fed Pharm Sci.* 2014; 57: 342-667
3. Hribar M, Bogataj M, Klančar U. Pomen razvoja alternativnih metod za testiranje sproščanja zdravilnih učinkovin iz farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem. *Farm Vestn.* 2016; 67: 235-41
4. Hribar M, Trontelj, Klančar U, Markun B, Čeligoj Dujc T, Legen I. A novel intestine model apparatus for drug dissolution capable of simulating peristaltic action. *AAPS PharmSciTech.* 2016; 18(5): 1646-1656
5. Abrahamsson B, Pal A, Sjöberg M, Carlsson M, Laurell E, Brasseur JG. A novel in vitro and numerical analysis of shear-induced drug release from extended-release tablets in the fed stomach. *Pharm Res.* 2005; 22(8): 1215-26.
6. Garbacz G, Wedemeyer R-S, Nagel S, Giessmann T, Mönnikes H, Wilson CG, idr. Irregular absorption profiles observed from diclofenac extended release tablets can be predicted using a dissolution test apparatus that mimics in vivo physical stresses. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV.* 2008; 70(2): 421-8

7. Bogataj M, Cof G, Mrhar A. Development of a glass-bead device for dissolution testing. *Dissolution Technol.* 2015; (3): 18
8. Klančar U, Markun B, Baumgartner S, Legen I. A novel beads-based dissolution method for the in vitro evaluation of extended release HPMC matrix tablets and the correlation with the in vivo data. *AAPS J.* 2013; 15(1): 267-77
9. Klančar U, Legen I. Dissolution apparatus comprising beads and process. Patent EP 2320227 B1. 2013.
10. Carino SR, Sperry DC, Hawley M. Relative bioavailability estimation of carbamazepine crystal forms using an artificial stomach-duodenum model. *J. Pharm Sci.* 2006; 95(1): 116-25
11. Wickham M, Faulks R, Mandalari G, Mann J. The design, operation and application of a dynamic gastric model. *Dissolution Technol.* 2012; 19(3): 15.22
12. Guerra A, Denis S, le Goff O, Sicardi V, Francois O, Yao A-F, idr. Development and validation of a new dynamic computer- controlled model of the human stomach and small intestine. *Biotechnol Bioeng.* 2016; 113(6): 1325-35
13. Zorc-Pleskovič R, Petrovič D, Milutinović-Živin A. *Histologija:učbenik in navodila za vaje.* Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta; 2010. 67-75 str.
14. Small intestine cancer treatment:
<https://www.cancer.gov/types/small-intestine/patient/small-intestine-treatment-pdq>
(dostopano dne 07.06.2017)
15. Mudie DM, Amidon GL, Amidon GE. Physiological parameters for oral delivery and in vitro testing. *Mol Pharm.* 2010; 7(5): 1388-405

16. Huizinga JD, Chen JH, Zhu YF, Pawelka A, idr. The origin of segmentation motor activity in the intestine. *Nat Commun.* 2014; 5: 3326
17. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology.* 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. 771- 780 str.
18. Krese A, Mrhar A, Bogataj M. Vpliv molitete želodca na prehod farmacevtskih oblik. *Farm Vestn.* 2016; 67: 242-47
19. Van Den Abeele J, Rubens J, Brouwers J, Augustins P. The dynamic gastric environment and its impact on drug and formulation behavior. *Eur J Pharm Sci.* 2017; 96: 207-231
20. Bhowmik D, Gopinath H, Pragati KB, Duraivel S, Sampath KP. Controlled release drug delivery systems. *Pharma Inovation.* 2012; 1: 24-32
21. Yihong Q, Deliang Z. Understanding design and development of modified release solid oral dosage forms. *Journal of Validation Tech.* 2001; 17: 23-32
22. Patel H, Panchal DR, Patel U, Bragmbhatt T, Suthar M: Matrix type drug delivery system: A review. *JPSBR.* 2011; 1(3): 143-51
23. Rane M, Pharmar J, Tiwari S, Rajabi-Siahboomi A. Application of polyethylene oxide in hydrophilic matrix tablets. *Pharma Times.* 2013; 45(3): 41-48
24. Li CL, Martini LG, Ford JL, Roberts M. The use of hypromellose in oral drug delivery. *J Pharm Pharmacol.* 2005; 57: 533-546
25. Maggi L, Bruni R, Conte U. High molecular weight polyethylene oxides (PEOs) as an alternative to HPMC in controlled release dosage forms. *Int J Pharm.* 2000; 195(1-2): 229-38

26. Ghosh T, Ghosh A. Drug delivery through osmotic systems- an overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2011; 2: 38-49
27. Keraliya RA, Patel C, Patel P, Keraliya V, Soni TG, idr. Osmotic drug delivery systems as part of modified release dosage form. *ISRN Pharm.* 2012; 2012: 1-9
28. Verma RK, Krishna DM, Garg S. Formulation aspects in the development of osmotically controlled oral drug delivery systems. *J. Control.* 2002; 79:7-27
29. Yuksel N, Kanik AE, Baykara T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and independent methods. *Int J Pharm.* 2000; 209:57-67
30. Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Food and Drug Administration; 1997
31. Colorcon Application Data Sheet. Dissolution Testing for POLYOXTM Extended Release Matrices. 2009