

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA OMERZU

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA OMERZU

**OPTIMIZACIJA POGOJEV V NOVEM MODELU ZA SPROŠČANJE V ŽELODCU
IN PRIMERJAVA REZULTATOV IZBRANIH OBLIK Z *IN VIVO* PODATKI TER
TESTOM Z NAPRAVO II PO AMERIŠKI FARMAKOPEJI**

**OPTIMIZATION OF CONDITIONS IN THE NEW STOMACH DISSOLUTION
MODEL AND COMPARISON OF THE RESULTS OF SELECTED
FORMULATIONS WITH *IN VIVO* DATA AND A TEST WITH THE DEVICE II
ACCORDING TO THE US PHARMACOPOEIA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala v podjetju Lek d.d., na oddelku *In vitro-In vivo* korelacije, pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. in somentorstvom dr. Igorja Legna, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Juriju Trontlju, mag. farm, somentorju dr. Igorju Legnu, mag. farm., in Meliti Hribar, mag. farm., za vse strokovne nasvete ter pomoč pri raziskovalnem delu in izdelavi magistrske naloge.

Še posebno pa se zahvaljujem moji družini in fantu Roku, ki so mi stali ob strani, me spodbujali in verjeli vame. Hvala prijateljem za nepozabna študijska leta.

Izjava

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

Petra Omerzu

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 Želodec	1
1.1.1 Značilnosti želodca	1
1.1.2 Motiliteta želodca	3
1.1.3 Praznjenje želodca	4
1.2 Sproščanje	5
1.3 Farmakopejske metode testov sproščanja	7
1.4 Alternativne metode testov sproščanja	8
1.4.1 Enostavni statični sistemi	9
1.4.2 Dinamični sestavljeni sistemi	11
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 Materiali	18
3.1.1 Farmacevtska oblika	18
3.1.2 Aparature	19
3.1.3 Kemikalije in standardi	19
3.1.4 Ostalo	19
3.2 Metode	20
3.2.1 Priprava medija za teste sproščanja	20
3.2.2 Analitika vzorcev	20
3.3 Naprava za posnemanje želodčnega gibanja	22
3.3.1 Opis naprave	22
3.3.2 Izvedba testov sproščanja na napravi za simuliranje želodčnega gibanja	24
3.3.3 Pregled testov sproščanja, opravljenih v okviru magistrske naloge	26
4 REZULTATI	28
4.1 Zmanjšanje variabilnosti rezultatov	28
4.1.1 Vpliv postavitve tablete	28
4.1.2 Vpliv nadomeščanja medija	28
4.1.3 Potrditev dobljenih ugotovitev	29

4.2	Optimizacija delovanja odprtega sistema	30
4.2.1	Vpliv spremembe pretoka na sproščanje.....	32
4.2.2	Vpliv spremembe programa na sproščanje	33
4.3	Testiranje vzorcev B, E in reference za preučevanje IVIVC.....	34
4.4	Testiranje na aparaturi USP II.....	35
5	RAZPRAVA.....	36
5.1	Zmanjšanje variabilnosti rezultatov	36
5.1.1	Vpliv postavitve tablete na variabilnost rezultatov.....	36
5.1.2	Vpliv nadomeščanja medija na variabilnost rezultatov	37
5.1.3	Potrditev zmanjšanja variabilnosti rezultatov	38
5.2	Optimizacija delovanja odprtega sistema	40
5.2.1	Vpliv spremembe pretoka na sproščanje.....	42
5.2.2	Vpliv hitrosti programa na sproščanje	43
5.3	In Vitro - In Vivo korelacija	44
5.4	Možnosti za dodatna testiranja.....	48
6	SKLEP.....	50
7	LITERATURA	52

POVZETEK

Zaradi kompleksnosti prebavnega trakta pogosto pride do razlik med profili sproščanja učinkovine *in vitro*, dobljenimi z uveljavljenimi farmakopejskimi metodami in sproščanjem *in vivo*. Z alternativnimi kompleksnimi napravami se lahko zapletenosti prebavnega trakta približamo v večji meri, vendar pa je priprava takšnih poskusov zamudna, ovrednotenje rezultatov pa težavno. Lažje je izvajanje poskusov na aparaturah, ki preučujejo le določen vidik kompleksnega prebavnega trakta. Ena takšnih je naprava za posnemanje želodčnega gibanja, ki je bila razvita v podjetju Lek d.d. Ljubljana v sodelovanju s Fakulteto za strojništvo. Njena glavna prednost je, da s krčenjem zaslonk, ki obdajajo silikonski želodec, simulira želodčno peristaltiko in posnema nekatere *in vivo* relevantne parametre, ki so podobni hidrodinamiki znotraj želodca. Prav tako lahko teste na napravi za posnemanje želodčnega gibanja izvajamo z volumni, ki so primerljivi z dejanskimi fiziološkimi pogoji. Glavni cilj magistrske naloge je bil zmanjšati variabilnost sproščanja, kar nam je uspelo s točno definiranim mestom postavitve FO v silikonsko vrečo. Prav tako smo ugotovili, da vsak poseg v vsebino vreče želodca, npr. nadomeščanje medija, zmanjša ponovljivost rezultatov. Ker se izbrana modelna učinkovina v največji meri absorbira v tankem črevesu, smo preučevali njen prehod iz silikonskega želodca skozi ventil, ki ponazarja pilorični sfinkter. Napisali smo natančen protokol testiranja in preučili vplive različnih pretokov in dveh hitrosti programov na sproščanje učinkovine. Ugotovili smo, da lahko tudi z odprtim sistemom uspešno ločimo med vzorci z različnimi lastnostmi. Pretok se je izkazal za pomemben parameter, ki vpliva predvsem na delež sproščene učinkovine v prvi časovni točki. Pri višjem pretoku (5 g/min) pa smo že zaznali izgubljanje učinkovine in posledično nižje koncentracije od pričakovanih. Hitrost programa oz. trajanje posameznega peristaltičnega vala je imela večji vpliv pri nižjem pretoku skozi želodec.

Iz razmerij sproščene učinkovine iz testne formulacije in reference ter razmerij med dvema izbranimi formulacijama v posamezni časovni točki smo izračunali korelacijo s pripadajočim razmerjem maksimalnih plazemskih koncentracij *in vivo*. Izkazalo se je, da naprava za posnemanje želodčnega gibanja tako pri nastavitvi hitrega programa (pretok 2 g/min), kot tudi pri nastavitvi počasnega programa (pretok 1 g/min) izkazuje boljšo korelacijo z *in vivo* podatki, kot naprava USP II.

Ključne besede: model za simulacijo gibanja želodca, USP II, *in vitro-in vivo* korelacija, pretok, alternativni testi sproščanja

ABSTRACT

Due to the complexity of gastrointestinal tract, there are often differences between the release profiles that are obtained with established pharmacopoeia methods and release profiles *in vivo*. With alternative, complex devices we can better simulate complicated gastrointestinal tract, but it takes more time to set up the experiment and the evaluation of the results is difficult. It is easier to perform experiments on devices that study only one of the aspects of complex gastrointestinal tract. One such device was developed by the company Lek (in collaboration with the Faculty of Mechanical Engineering, Ljubljana). The main advantage of this device is that it is capable of simulating the stomach movement by the contraction of apertures that surround the silicone stomach. It is aimed to imitate some of the *in vivo* relevant parameters and to be similar to the hydrodynamics within the stomach *in vivo*. With this model, it is possible to use small volumes of fluid, which are comparable to the physiological volumes encountered *in vivo*. The main aim of the master thesis was to reduce the variability of experimental results when studying the release of a model drug from a tablet formulation. This goal was achieved with the precisely defined site of application of the tablet within the silicone vessel. Every intervention to the content of the silicone stomach, such as the media replacement, reduced the repeatability of the results. Because our model drug active substance is mainly absorbed in the small intestine, we studied its passage from the silicone vessel through the valve, that simulates the pyloric sphincter. We set up the exact protocol for the operation and studied the impact of different flow rates and two different program speeds on the release of active substance. We found out that also with an open system, we can separate the formulation samples with different release properties. The flow rate has proved to be an important parameter that mainly influences the amount of the released substance in the first time point. At the higher flow rates (5 g/min), the loss of the substance and consequently, lower concentrations than expected were observed. Program speed or the duration of each peristaltic wave had a significant influence on the release rate at lower flow rates.

For each time point, a ratio between released drug from the test and reference formulation was calculated and correlated to the *in vivo* ratios of maximum plasma concentrations. The new model for stimulating the stomach motility in both cases (fast and slow program) provided a better correlation with the *in vivo* data compared to the USP II apparatus.

Key words: *model for simulating stomach movement, USP II, in vitro-in vivo correlation, flow, alternative dissolution tests.*

SEZNAM OKRAJŠAV

AUC – površina pod krivuljo (*Area Under the Curve*)

BCS – biofarmacevtska klasifikacija (*Biopharmaceutics Classification System*)

DGM – dinamični gastrični model (*Dynamic Gastric Model*)

FO – farmacevtska oblika

GIT – gastrointestinalni trakt

GLP-1 – glukagonu podoben peptid -1 (*Glucagon-like peptide-1*)

HGS – človeški želodčni simulator (*Human Gastric Simulator*)

HPMC - hidroksipropilmetilceluloza (*Hidroksipropil metil celuloza*)

IVIVC – In vitro-In vivo korelacija (*ang. In vitro-In vivo Correlation*)

Kcal – kilokalorije (*Kilocalorie*)

MMC – migracijski motorični kompleks (*Migrating Myoelectric Complex*)

Ph. Eur – Evropska farmakopeja (*European Pharmacopoeia*)

RPM – število obratov na minuto (*Revolutions Per Minute*)

RSD – relativna standardna deviacija

SD – standardna deviacija

UHPLC – tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (*Ultra High-Performance Liquid Chromatography*)

USP – Ameriška farmakopeja (*United States Pharmacopeia*)

USP I – naprava s košarico

USP II – naprava z vesli

USP III – naprava z recipročnimi valji

USP IV – naprava s pretočno celico

UV – ultravijolična svetloba

1 UVOD

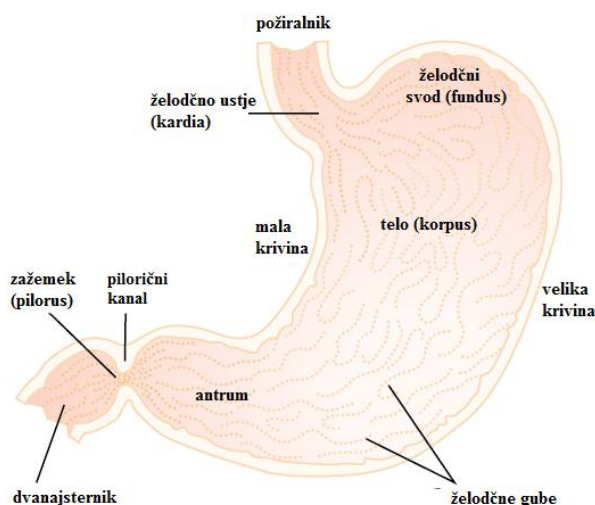
1.1 Želodec

1.1.1 Značilnosti želodca

Želodec leži med požiralnikom in dvanajstnikom in je najširši del prebavne cevi. Nahaja se v levem zgornjem delu trebušne votline, tik pod prepono. Njegove glavne funkcije so: začasno shranjevanje hrane, razgradnja proteinov, mešanje in mletje hrane in s tem povezana tvorba himusa, reguliranje prehoda himusa skozi pilorični sfinkter v tanko črevo, izločanje intrinzičnega faktorja, ki je pomemben za absorpcijo vitamina B12, ipd.

Želodec je dolg približno 25 cm in v pokončni drži spominja na črko J. Na njegovo obliko in velikost vplivata stopnja polnosti in tonus mišičja. Volumen želodčne vsebine na tešče znaša od 10 – 50 mL, po obroku pa doseže vrednosti od 1000 – 1500 mL (1–4).

Hrana v želodec vstopi skozi želodčno ustje (kardia). Kupolast del želodca nad kardio imenujemo želodčni svod (fundus). V njem je vedno nekaj zraka. Največji, osrednji del želodca predstavlja telo (korpus). To se nadaljuje v lijakasto oblikovan pilorični del, ki se začne s širšim antrumom in nadaljuje v ožji pilorični kanal. Konča se z gladkomišičnim zažemkom, imenovanem pilorus oz. vratar. Njegova glavna naloga je prepuščanje manjših količin delno prebavljene hrane (himusa) v dvanajstnik. V območju od požiralnika do dvanajstnika ločimo med malo želodčno krivino na desni in veliko želodčno krivino na levi. Želodec pokriva potrebšnica (peritonej) (1,2,5). Slika 1 prikazuje glavne anatomske dele želodca.



Slika 1: Prikaz anatomskih delov želodca. Prirejeno po (6).

Struktura gastrointestinalne stene

Notranja plast želodca se imenuje sluznica oz. mukoza. Sestavlja jo epitelij, pod njim ležeče vezivo lamina propria in krožno razporejeno gladko mišičje. Iz tega dela se v lumen želodca izločajo kislina, mukus, encimski prekursor pepsinogen, intrinzični faktor, hormon gastrin, idr. Pod mukozo se nahaja plast vezivnega tkiva, submukoza. V njej se nahajajo submukozni živčni pletež, krvne in limfne žile. Sledi gladkomišična plast, ki s svojimi kontrakcijami povzroča gibanje in mešanje želodčne vsebine. Ločimo med notranjo, relativno debelo krožno plastjo in zunanjo, tanjšo vzdolžno plastjo mišic. Krožno mišičje je odgovorno za ožetje lumna želodca in je ponekod odebeljeno v mišice zapiralke ali sfinktre. Kontrakcije vzdolžnega mišičja krajšajo prebavno cev. Med tema plastema mišic se nahaja mienterični živčni pletež, ki uravnava gastrointestinalno motiliteto. Od zunaj želodec obdaja seroza, ki ima vezivno in protektivno vlogo (2,7).

Nadzor delovanja želodca

Na gastrointestinalni trakt (GIT) vpliva tako simpatično kot parasimpatično živčevje. Simpatik povzroči kontrakcijo sfinktrov in zavira potovanje vsebine po GIT, parasimpatik pa na GIT deluje stimulatorno in pospeši pomikanje vsebine. Eno glavnih vlog v GIT ima tudi enterični živčni sistem, ki ga tvorita mienterični (Auerbachov) in submukozni (Meissnerjev) živčni pletež. Mienterični živčni pletež se nahaja med krožno in vzdolžno mišičnino, njegova stimulacija pa poveča intenziteto in hitrost ritmičnih kontrakcij. Submukozni pletež vpliva predvsem na sekrecijo in lokalno absorpcijo. Oba živčna pleteža dobivata informacije o dogajanju v prebavni cevi od receptorjev v sluznici. Mehanoreceptorji zaznavajo raztezanje želodčne stene med obrokom, kemoreceptorji pa prisotnost aminokislin, maščob, ogljikovih hidratov in vodikovih ionov v svetlini prebavne cevi (2,5,6). Na delovanje GIT imajo vpliv tudi gastrointestinalni peptidi. V želodcu so pomembni gastrin, ki pospeši izločanje kisline (7), motilin, katerega koncentracija sovpada s III fazo migracijskega motoričnega kompleksa (MMC) in ima posledično vpliv na želodčno praznjenje, grelin, ki povečuje apetit, GLP-1, ki povzroči občutek sitosti in zmanjša hitrost želodčnega praznjenja, ipd. (8).

Absorpcija

Učinkovine se zaradi majhne površine želodčne stene in kratkega zadrževanja v želodcu v največji meri absorbirajo v tankem črevesu (9). Etanol je ena redkih v vodi topnih substanc, ki se absorbirajo v želodcu. Njegova topnost v maščobah mu omogoča difuzijo

skozi membrane mukoznih celic v želodcu (1). Ker se večina učinkovin absorbira v tankem črevesu, ima želodec z nadzorovanjem prehoda snovi skozi pilorus velik vpliv na čas absorpcije določene učinkovine. Prisotnost hrane v želodcu lahko čas absorpcije podaljša tudi do 6 ur (10).

1.1.2 Motiliteta želodca

Motiliteta želodca po obroku

Prazen želodec ima volumen 50 mL, njegov premer pa ni veliko večji od premera tankega črevesa. Ko hrana vstopi v želodec, se gladke mišice fundusa in korpusa želodca relaksirajo in povzročijo povečanje volumna tudi do 1500 mL, brez bistvenega povečanja pritiska v želodcu. To je tako imenovana receptivna relaksacija, za katero sta odgovorna parasimpatični sistem in center za požiranje v možganih. Spodnji del želodca se na prihod hrane odzove s peristaltičnimi valovi. Vsak val se začne v telesu želodca, kjer ne povzroči pretiranih kontrakcij, zgolj nihanje. Ko se val pomika proti antrumu, kjer je mišična plast debelejša, se kontrakcije okrepijo in povzročijo mešanje vsebine ter zaprtje piloričnega sfinktra. Ta je običajno relaksiran in se zapre samo ob prihodu peristaltičnega vala. Ker se pilorus zapre, lahko skozenj v dvanajstnik prehajajo le majhne količine himusa, večina pa se pomakne nazaj v korpus želodca in še dodatno razmeša (7).

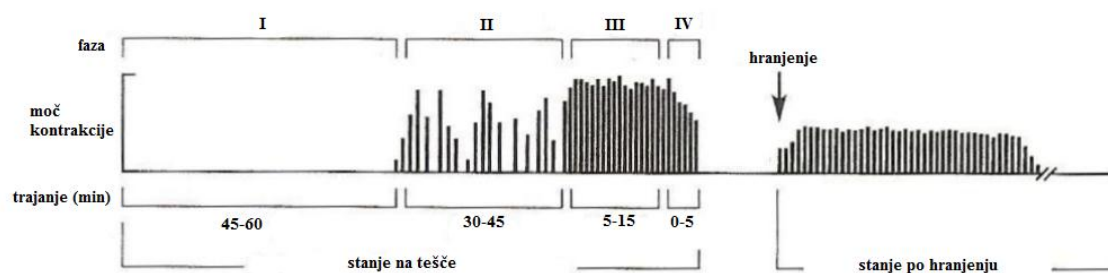
Gastrični peristaltični valovi imajo v prisotnosti hrane v želodcu stalni ritem 3 krčenja/minuto (11,12). Naenkrat so lahko v želodcu prisotne 2 do 3 peristaltične kontrakcije (13). Za njihovo ustvarjanje so pomembne »pacemaker« celice (Cajalove celice), ki se nahajajo v vzdolžni mišični plasti v območju velike krivine želodca (1,6). Podvržene so spontanim depolarizacijam-repolarizacijam in tvorijo osnovni električni ritem želodca. Mišične membrane lahko prag vzdraženosti dosežejo le ob prisotnosti zunanjih dražljajev (razteg stene želodca), hormonov in nevrotransmitorjev (7). Takšne kontrakcije so prisotne v želodcu približno 1 uro na vsakih 200 kcal oz. 837 kJ zaužitega obroka (14).

Motiliteta želodca na tešče

Za stanje na tešče je značilen vzorec peristaltičnih kontrakcij, imenovan migracijski motorični kompleks (MMC) (8). Za sproženje naj bi bil odgovoren intestinalni peptid

motilin, vzorce krčenja pa usklajuje enterični živčni sistem (7). Posamezen cikel se ponovi na vsake 90 – 120 min (15), določeni viri opisujejo razpon od 15 – 180 min (9).

MMC razdelimo na tri oz. štiri faze. Faza I zavzema večino časa MMC, saj traja 45–60 min, zanjo pa je značilno obdobje mirovanja. Sledi ji faza II z občasnimi, neenakomernimi kontrakcijami in traja 30-45 min. Za III fazo so značilne redne, močne kontrakcije s frekvenco 3 krčenja/minuto. V tej fazi ostaja pilorični sfinkter odprt in lahko prepušča neprebavljene delce velikosti do 1,9 cm. To fazo zato imenujemo tudi čistilna (ang. housekeeper wave) in traja 5-15 min (15). Na ta način se želodec popolnoma očisti vsebine (16). V večini literature se omenja še faza IV, kjer gre za počasno umirjanje kontrakcij in traja največ 5 min (10,15). Slika 2 prikazuje moč kontrakcij v stanju na tešče (glede na fazo MMC cikla) in po hranjenju.



Slika 2: Prikaz želodčne motilitete v stanju na tešče in po hranjenju. Prirejeno po (10).

1.1.3 Praznjenje želodca

Na praznjenje želodca vpliva več faktorjev. Bolj je želodec raztegnjen (večji so zaužiti volumni), hitreje je praznjenje (15). Hitrost praznjenja je odvisna tudi od kemijske sestave in fizikalnih lastnosti hrane. Kislost vsebine, njena kaloričnost, viskoznost in hipertoničnost praznjenje želodca upočasnijo (1,13). Prav tako na praznjenje želodca vplivajo biološki faktorji posameznika, kot so indeks telesne mase, spol, stres, raven glukoze v krvi, lega telesa (13).

Preko enterogastričnega refleksa, ki zajema hormonalne in neuralne mehanizme, na praznjenje želodca vpliva tudi dvanajstnik. Prisotnost maščobnih kislin ali monogliceridov v dvanajstniku preko holecistokinina poveča krčenje piloričnega sfinktra in na ta način zmanjša hitrost praznjenja želodca. Ta mehanizem preprečuje nadaljnje prehajanje maščob, dokler žolčne kisline ne predelajo vsebine v dvanajstniku. Tudi prisotnost kisle vsebine v dvanajstniku vpliva na gibanje želodca. Takrat se iz tankega črevesa sprosti sekretin, ki inhibira krčenje antruma in poveča krčenje piloričnega sfinktra. V prisotnosti peptidov in

aminokislin se iz antruma in dvanajstnika začne sproščati hormon gastrin. Ta stimulira krčenje antruma in stopnjo kontrakcij piloričnega sfinktra, kar povzroči upočasnjeno praznjenje želodca (1,2).

Pretok skozi pilorični sfinkter

Schindlbeck je s sodelavci na 12-ih zdravih prostovoljcih preučeval vpliv pretoka skozi pilorični sfinkter v stanju na tešče. Ugotovili so, da se je pretok skozi pilorični sfinkter spreminjal v odvisnosti od faze cikla MMC. V fazi I MMC, za katero je značilno obdobje mirovanja, je bil pretok skozi pilorus 0,90 (0,0-2,4) mL/min. V fazi II, ko se že pojavijo naključne kontrakcije, je želodčno praznjenje znašalo 1,74 (1,2-4,2) mL/min, v fazi III, ki je najkrajša, pa 1,1 (0,64-1,9) mL/min (17). Če povzamemo, lahko rečemo, da pretok iz želodca v dvanajstnik v stanju na tešče v povprečju ne preseže 2 mL/min.

Po hranjenju je hitrost praznjenja želodca odvisna od kalorične vrednosti zaužitega obroka. Pretok skozi pilorus po hranjenju običajno znaša 2-4 mL/min, pri večjih zaužitih volumnih pa lahko hitrost praznjenja doseže vrednosti 10-40 mL/min. V odvisnosti od energijske vrednosti obroka je želodec sposoben nadzorovati praznjenje tako, da v dvanajstnik vsako minuto priteče vsebina s kalorično vrednostjo 2-4 kcal. Po zaužitju trdnega obroka je mogoče opaziti le majhno praznjenje v dvanajstnik. To fazo imenujemo »lag« faza oz. faza zakasnitve praznjenja, med katero se večji, trdni delci v želodcu zdrobijo in zmehčajo. Traja lahko tudi več kot eno uro (3,4,18). Po obroku lahko skozi pilorus prehajajo le delci velikosti do 2 mm (8). Večji, neprebavljeni delci, do velikosti 1,9 cm se iz želodca izpraznijo med III fazo MMC. Gonilna sila praznjenja je gastro-duodenalni tlačni gradient, ki potisne vsebino želodca skozi pilorus v dvanajstnik (1,2).

1.2 Sproščanje

Študije sproščanja imajo velik pomen v farmacevtski industriji. V začetnih fazah razvoja farmacevtske oblike (FO) so pomembne za izbiro ustreznih pomožnih snovi pri izdelavi FO. Različni profili sproščanja nam pokažejo razlike med formulacijami in nam na ta način omogočijo izbiro želene FO. Prav tako so študije sproščanja pomembne pri kontroli kakovosti in stabilnosti zdravil. V fazi razvoja FO se z *in vitro* testi sproščanja poskušamo čim bolj približati fiziološkim pogojem in na ta način predvideti obnašanje FO v telesu. Spreminjamo lahko pH in sestavo medija, volumne tekočine, posnemamo gibanje in pretoke v GIT, ipd. Z ustrezno načrtovanimi *in vitro* testi lahko pravočasno izločimo formulacije z neustreznimi profili sproščanja in se s tem izognemo nepotrebnim študijam

na ljudeh. Zato je razvoju novih, alternativnih testov sproščanja, ki bi bolje ovrednotili *in vivo* dogajanje, treba pripisati večji pomen (3).

Parametri, ki vplivajo na in vitro sproščanje

Poleg lastnosti učinkovine in FO, v katero je formulirana, na hitrost sproščanja *in vitro* vplivajo tudi pogoji testiranja. Pri izbiri medija je pomembna njegova sestava (pH, osmolalnost, ionska moč, prisotnost žolčnih soli, ipd.), temperatura, viskoznost in ne nazadnje volumen. Višja temperatura in manjša viskoznost medija povzročita boljšo difuzijo molekul in posledično hitrejše sproščanje učinkovine (19). Pri *in vitro* testih sproščanja običajno uporabljamo volumne medija, ki omogočajo »sink« pogoje (500-1000 mL). To pomeni, da je volumen medija vsaj 3-10x večji od volumna nasičenja. Ker so ti volumni mnogo višji od dejanskih *in vivo* pogojev (~250 mL), lahko to, predvsem pri slabo topnih učinkovinah, privede do velikih *in vitro-in vivo* razlik. Tudi hidrodinamika tekočin pri posameznem testu se precej razlikuje od dejanskih tokov, ki jim je FO izpostavljena v človeškem želodcu (20). Večja je hidrodinamika medija (mešanje), tanjša bo stacionarna difuzijska plast okoli FO in posledično bo sproščanje hitrejše (19).

In Vitro – In Vivo korelacija (IVIVC)

Pri IVIVC gre za vzpostavitev odnosa med *in vitro* sproščeno učinkovino in plazemsko koncentracijo oz. količino absorbirane učinkovine *in vivo*. Z dobro zasnovanimi *in vitro* testi lahko uspešno predvidimo dogajanje učinkovine v človeškem telesu in s tem zmanjšamo število študij na ljudeh. Da bi uspešno ponazorili *in vivo* dogajanje učinkovine, moramo pri testih sproščanja čim bolje ponazoriti kompleksnost GIT (21,22).

Kvaliteto IVIVC razdelimo na tri stopnje. Stopnja A je najvišja raven korelacije, kjer vsaka točka na *in vitro* profilu ustreza točki na *in vivo* profilu raztapljanja. Pri stopnji B primerjamo povprečen čas, ko je raztopljena vsa učinkovina *in vitro* s povprečnim časom zadrževanja učinkovine v telesu ali časom raztapljanja *in vivo*. Stopnja C opisuje IVIVC v eni točki, na primer odstotek raztopljene učinkovine ob določenem času z ustreznim parametrom, kot je AUC (površina pod krivuljo) ali C_{max} . Obstaja tudi večkratna stopnja korelacije C, kjer povežemo količino raztopljene učinkovine *in vitro* v različnih časovnih točkah z več farmakokinetičnimi parametri (na primer AUC v različnih časovnih točkah) (21). Tabela 1 prikazuje *in vitro* oz. *in vivo* parametre, pomembne pri doseganju določene stopnje IVIVC.

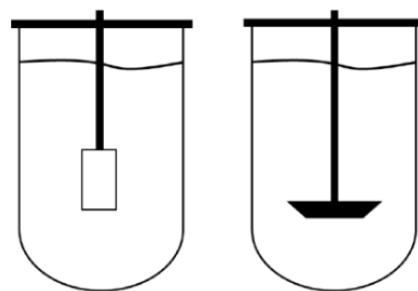
Tabela 1: Parametri, ki so ključni za doseganje posamezne stopnje IVIVC. Povzeto po (10).

Stopnja	<i>In Vitro</i>	<i>In Vivo</i>
A	krivulja raztapljanja	krivulja plazemske koncentracije učinkovine oz. njene absorpcije
B	povprečen čas raztapljanja učinkovine (MDT)	povprečen čas zadrževanja učinkovine v telesu (MRT) ali čas raztapljanja
C	hitrost raztapljanja, odstotek raztopljenе učinkovine ob izbranem času, čas, ko je raztopljenе 10, 20, 90% učinkovine	hitrost absorpcije, odstotek absorbirane učinkovine ob izbranem času, čas, ko je absorbirane 10, 20, 90% učinkovine

1.3 Farmakopejske metode testov sproščanja

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

Aparaturi USP I in USP II sta najpogostejše uporabljeni farmakopejski napravi za določanje sproščanja iz trdnih FO s takojšnjim sproščanjem. Njune glavne prednosti so robustnost, enostavnost in dobra standardizacija (19). Za napravo USP I je značilna košarica, ki se vrti okoli svoje osi, pri USP II pa je namesto košarice veslo, ki meša medij. FO umestimo v košarico oz. jo potopimo na dno posode z medijem. V kolikor FO ne potone (kapsule), jo lahko vstavimo v »sinker«, to je priprava, ki FO zadrži na dnu posode. Volumni, ki jih uporabljamo, so med 500-1000 mL in velikokrat omogočajo sink pogoje. Ti zagotavljajo, da na hitrost sproščanja ne vpliva topnost kot omejujoči dejavnik. Če je hitrost mešanja premajhna, se na dnu posode ustvari nepremičen stožec, kar zavira raztapljanje. Ta pojav lahko delno zmanjšamo s povečanjem obratov, vendar prehitro mešanje ne omogoča ločevanja med formulacijami oz. serijami. Običajna hitrost vrtenja pri USP I je 50-100 rpm (obratov na minuto), pri USP II pa 50-75 rpm. Steklene posode so potopljene v vodno kopel, ki omogoča temperaturo medija $37 \pm 0,5$ °C, kar je primerljivo s fiziološkimi pogoji (10,20). Slika 3 prikazuje napravo s košarico (levo) in napravo z vesli (desno).



Slika 3: Prikaz aparature USP I (levo) in USP II (desno). Povzeto po (23).

Naprava z recipročnimi valji (USP III)

Aparatura USP III vsebuje steklene posode z ravnim dnom, ki so potopljene v vodno kopel, termostatisirano na 37 °C. V stekleno posodo je vstavljen cilindar z mrežastim dnom, v katerega vstavimo FO. Cilinder se pomika vertikalno recipročno, tako da tekočina potuje skozenj. Prav tako nam aparatura omogoča premik cilindra v naslednjo stekleno posodo z drugačnim medijem. Posamezna steklena posoda ima volumen medija do 250 mL. Sink pogoje lahko dosežemo s premikanjem cilindra v steklene posode v naslednji vrsti. Hitrost pomakanja je običajno 5-25 dpm (potopov na minuto). Mrtva cona mešanja, ki se pri napravah USP I in USP II pojavi zaradi nepremičnega stožca na dnu posode, se pri napravi z recipročnimi valji lahko pojavi zaradi sipanja FO iz cilindra ali lepljenja na njega. Aparatura USP III je primerna predvsem za FO s prirejenim sproščanjem, saj nam omogoča simulacijo pogojev vzdolž celotnega GIT (10,20).

Naprava s pretočno celico (USP IV)

Aparatura USP IV vsebuje rezervoar z medijem in črpalko, ki črpa medij skozi celico s FO. Vodna kopel vzdržuje konstantno temperaturo $37 \pm 0,5$ °C. Skozi celice lahko ves čas doteka svež medij (odprt sistem) ali pa se določen volumen medija vrača v rezervoar (zaprt sistem). Pretočna celica je v sistem nameščena vertikalno, skozi njo pa teče medij s standardnimi pretoki 4, 8 ali 12 mL/min. Na vrhu celice je filter, ki preprečuje izgubo neraztopljenih delcev, v spodnjem delu pa so majhne steklene kroglice (premer ~1mm) in ena večja (premer ~5mm), ki varujejo cevko z vstopno tekočino. S spreminjanjem količine steklenih kroglic lahko vplivamo na hidrodinamiko tekočin v pretočni celici. Če odstranimo kroglice premera 1 mm, tudi pri najnižjem pretoku (4 mL/min) v celici povzročimo kaotično in asimetrično gibanje medija. Pomembna je tudi izbira filtra, saj se lahko nanj nalepijo netopni ali lepljivi delci in povzročijo zamašitev in posledično porast tlaka v celici. Aparat USP IV se najpogosteje uporablja za FO s prirejenim sproščanjem, kjer je FO izpostavljena različnim pogojem vzdolž GIT. Njena prednost je tudi pri vrednotenju sproščanja slabo topnih snovi, ker nismo omejeni z volumnom in lahko dosežemo »neskončne sink« pogoje (10,20).

1.4 Alternativne metode testov sproščanja

Na hitrost sproščanja iz FO vplivajo številni parametri. V fazi razvoja FO je glavni cilj testov sproščanja čim bolj posnemati *in vivo* pogoje in tako doseči dobro *in vitro-in vivo* korelacijo (IVIVC). Slaba IVIVC je lahko posledica neustrezne izbire medija, ki ne odraža

fizioloških pogojev, neupoštevanja sprememb pH vzdolž GIT in vpliva encimov, zanemarjanja različnih vzorcev gibanja GIT v stanju na tešče in po hranjenju, neustrezne hidrodinamike medija ipd. (10). Razlog za neuspeh so tudi enostavne naprave za sproščanje, ki ne omogočajo zadostnega posnemanja GIT. Zato je v takih primerih smiselno uporabiti tudi alternativne, fiziološko relevantne, dinamične metode, ki bolje odražajo kompleksne pogoje GIT (20). Enostavnejši modeli se osredotočajo le na določen parameter, npr. na sile pri prehodih skozi pilorus, dinamični sistemi pa lahko preučujejo več parametrov hkrati. Prav zaradi svoje kompleksnosti zahtevajo pazljivo načrtovanje poskusov, natančno vrednotenje rezultatov in jih je težje standardizirati (23).

1.4.1 Enostavni statični sistemi

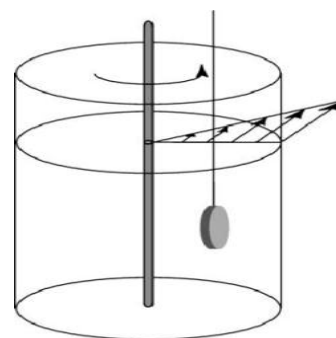
Uporaba steklenih kroglic

Metoda vključuje uporabo klasične aparature z vesli, ki jo kombiniramo z vmesnim stresanjem s steklenimi kroglicami. Te ponazarjajo mehanski stres v GIT. Sako je s sodelavci to metodo uspešno uporabil pri sproščanju učinkovine iz HPMC ogrodnih tablet. Uporaba zgolj USP II, tudi pri najvišjih obratih (200 rpm) ni pokazala signifikantne IVIVC. Zato so HPMC tableto po 1h vzeli iz posode, jo vstavili v 50 mL epruveto s 60 g steklenih kroglic in 2 g vode. Po 10 min stresanja so vsebino vrnili v posodo in nadaljevali s testom sproščanja. Tako so znatno izboljšali IVIVC (24).

Uporaba vrteče se posode

Abrahamson je s sodelavci zasnoval aparaturo z vrtečo se posodo z namenom, da bi se čim bolj približali površinskim strižnim silam, ki jim je FO izpostavljena v GIT po hranjenju. Izhajali so iz dejstva, da se z večanjem strižnih sil poveča erozija in posledično sproščanje učinkovine iz FO. V ta namen so uporabili hidrofilne ogrodne tablete s podaljšanim sproščanjem, ker je hitrost sproščanja učinkovine iz njih močno povezana z erozijo tablete oz. s hidrodinamskimi pogoji, ki jim je tableta izpostavljena. Z uporabo podatkov magnetno-resonančnega slikanja polnega želodca so z dobljenimi parametri sestavili računalniški model želodca. Računalniška simulacija je pokazala širok razpon med strižnimi silami, ki jim je tableta izpostavljena v želodcu. Strižne sile na tableto so največje v antrumu, kjer so kontrakcije najmočnejše in ob sunku tablete iz antruma nazaj proti proksimalnemu delu želodca.

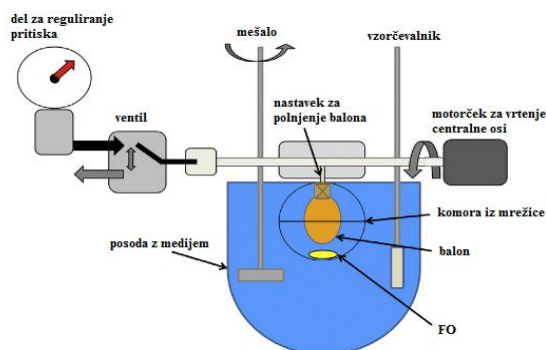
Glavni del *in vitro* preizkusa predstavlja posoda z drogom, ki je pritrjen na njeno dno in ji omogoča vrtenje. Tableta je fiksirana na togo jekleno žico in se ne premika. Vrtenje posode omogoča nadzorovan, predvidljiv, fiziološko relevanten tok tekočine okoli tablete. Erozijo tablet so določili z izgubo mase tablete v posameznih časovnih točkah. Aparatura USP I povzroči bistveno manjšo erozijo oz. strižne sile na FO, kot aparatura z vrtečo se posodo, ki povzroča strižne sile podobne *in vivo* pogojem. Slabost aparature z vrtečo se posodo je, da lahko testiramo samo enodmerne FO. Prav tako se sproščena učinkovina po posodi ne razporedi homogeno, kar nam onemogoča merjenje z UV-VIS spektrometrijo ampak zgolj spremembo mase FO (25). Slika 4 prikazuje napravo za simuliranje hidrodinamskih tokov v človeškem želodcu.



Slika 4: Prikaz metode z vrtečo se čašo. Povzeto po (26).

Naprava z mrežico in balonom

Aparatura je bila zasnovana z namenom posnemanja tlačnih in strižnih sil, ki se pojavijo med gibanjem stene GIT. Omogoča tudi simuliranje izgube kontakta s tekočino, ko se FO nahaja v črevesnih zračnih žepih. Primerna je predvsem za FO s prirejenim sproščanjem. Sestavljena je iz centralne osi, na kateri je šest komor. Vsaka komora se nahaja v svoji posodi z medijem in je sestavljena iz prepustne mrežice. Centralna os je na eni strani sklopljena z enoto za reguliranje pritiska balona, na drugi strani pa z motorjem, ki vrti os. Posnemanje gibanja GIT in s tem pritisk na FO je ustvarjen s polnjenjem oz. praznjenjem balona, ki se nahaja znotraj posamezne komore. Komora se zaradi vrtenja centralne osi pomika v in iz medija, ter tako oponaša nahajanje FO v črevesnih zračnih žepih. V posamezni posodi se poleg komore nahaja še mešalo in vzorčevalnik (26). Slika 5 prikazuje ključne dele naprave za posnemanje sil v človeškem želodcu.



Slika 5: Shematski prikaz naprave z mrežico in balonom. Povzeto po (20).

Kombinacija aparature USP III in plastičnih kroglic

Plastične kroglice so v aparaturi USP III dodane z namenom posnemanja mehanskih sil, ki jim je FO izpostavljena v GIT. Njihova velikost je od 1-8 mm, v recipročni cilindru pa jih napolnimo do približno ene četrtine. Najpomembnejši faktor je gostota kroglic, ki mora biti enaka gostoti medija v cilindru, zato da kroglice ne potonejo na dno, ampak se prosto gibljejo v mediju. Na ta način se na FO ustvarja mehanske sile, kar izboljša posnemanje mehanskih obremenitev v prebavnem traktu, ki so bolj intenzivne predvsem ob prisotnosti hrane in med praznjenjem želodca (27).

Pretočni sistem s kroglicami

Sistem, ki ga je razvila prof. Bogatajeva s sodelavci na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, vključuje 150 mL čašo, ki se nahaja v vodni kopeli, pod njo pa je magnetno mešalo. S črpalko v čašo ves čas dovajamo svež medij, iz nje pa z enako hitrostjo črpamo raztopino in tako ohranjamo konstanten volumen v čaši. V njej se poleg medija nahaja še magnet, ki omogoča mešanje in majhne steklene kroglice (20-70 g). FO je položena na steklene kroglice. Njihovo premikanje posnema gibanje GIT, ko je FO v stiku z mukozo. Sistem je najprimernejši za tablete, ki ne razpadejo, saj bi njihov razpad povzročil prodor delcev v plast steklenih kroglic, kjer so sile precej večje kot v človeškem želodcu (28).

1.4.2 Dinamični sestavljeni sistemi

Gre za kompleksne sisteme, ki se skušajo približati dejanskim *in vivo* pogojem, v kolikor so ti znani. Bolj kot za identifikacijo kritičnih parametrov, ki jim je FO izpostavljena v GIT, so ti skrbno načrtovani sistemi primernejši za potrjevanje določenih vplivov na FO. Kljub svoji dodelanosti pa se dinamični sistemi še vedno le v grobem približajo kompleksnim, realnim pogojem v človeškem GIT (20).

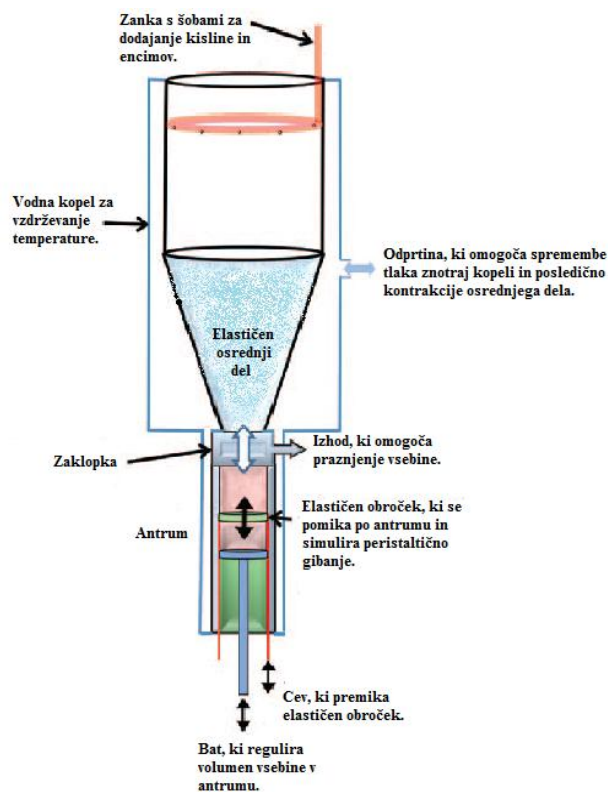
Model želodca in dvanajstnika

Gre za najpreprostejšo aparaturi med dinamičnimi sestavljenimi sistemi. Ločimo med modelom želodca in modelom dvanajstnika, ki sta med seboj povezana. Po razpadu FO v želodčnem predelu se vsebina z nadzorovano hitrostjo črpa v predel dvanajstnika. Izbira medija v posamezni komori posnema *in vivo* stanje. Medij v želodčnem predelu ima pH 2-2,5, v predelu dvanajstnika pa 6,5. Na ta način prenos raztopine iz kislega želodčnega pH v predel tankega črevesa povzroči dinamične procese raztapljanja, obarjanja, rekristalizacije in ponovnega raztapljanja učinkovine. Omogočeno je tudi dovajanje svežega

medija v posamezen predel. Koncentracijo učinkovine merimo z UV-VIS spektrometrom. Modelu manjka odstranjevanje učinkovine iz predela dvanajstnika in s tem omogočanje »sink« pogojev, kar je pomembno predvsem za slabo topne, dobro permeabilne učinkovine. Slabost sistema je tudi slabo oponašanje gibanja GIT in želodčnega ter črevesnega izločanja (lipaza, pepsin, HCl, žolčne soli, natrijev bikarbonat) (20,29).

Dinamični gastrični model (DGM)

DGM je aparatura, ki je z vidika strižnih sil, mešanja, pH in encimskega obnašanja ter tudi z dejanskimi časi zadrževanja sposobna učinkovito posnemati dogajanje v človeškem želodcu. Sestavljena je iz treh glavnih delov, to so osrednji elastičen del, ki lahko sprejme volumen do 800 mL, antrum in zaklopka. Sistem je z vodno kopeljo, ki obdaja DGM, termostatiran na 37 °C. Spremembe tlaka v vodni kopeli so računalniško nadzorovane in povzročijo nežne kontrakcije osrednjega dela. Dodajanje encimov in kisline z računalniško kontrolo izvaja zanka s šobami, ki se nahaja v proksimalnem delu DGM. Dodajanje encimov je odvisno od volumna vsebine želodca, medtem ko je dodatek kisline povezan s pH stanjem v želodcu. pH stanje spremljajo elektrode potopljene v osrednji del DGM. Antrum je sestavljen iz cevi, v kateri se nahaja bat, ki regulira volumen vsebine in elastičen obroček, pritrjen na cevko, ki mu omogoča premikanje po antrumu. Na ta način se v spodnjem delu DGM povzroči stiskanje, drobljenje, erozija, strižne sile, ipd. Vsebina DGM se lahko izloči skozi ventil, ki se nahaja med antrumom in osrednjim delom DGM. V raziskavi, kjer so spremljali vpliv mehanskih sil na kroglice iz agarja, so ugotovili, da so sile na kroglice pri DGM fiziološko relevantnejše kot pri aparaturi USP II (30,31). Slika 6 prikazuje ključne dele DGM.



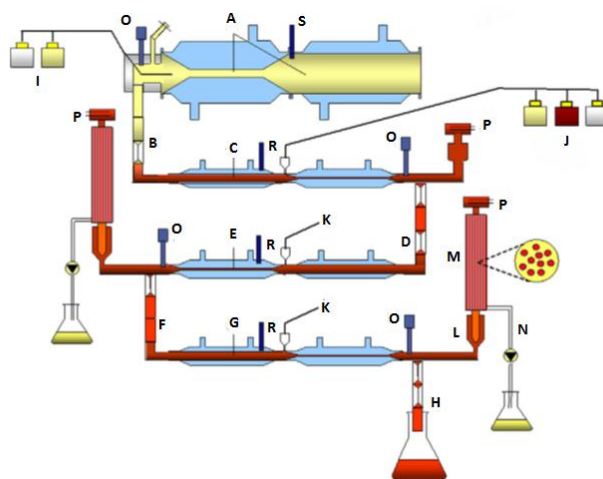
Slika 6: Shematični prikaz dinamičnega gastričnega modela (DGM). Prirejeno po (32).

Gastrointestinalni model TIM

TIM je dinamičen *in vitro* sistem, sestavljen iz več predelov, ki ponazarjajo človeški želodec, tanko in debelo črevo. Model TIM-1 je sestavljen iz predela želodca, dvanajstnika, jejunuma in ileuma ter računalniško vodeno oponaša fiziološki pH, encimsko aktivnost, koncentracijo žolčnih soli, peristaltiko in GIT prehode. Posamezen predel je sestavljen iz dveh steklenih enot s prilagodljivo silikonsko notranjo steno. Prostor med notranjo in zunanjo steno je napolnjen z vodo, ki omogoča termostatisiranje na 37 °C. Poleg posnemanja telesne temperature lahko s spreminjanjem pritiska vode vplivamo na notranjo membrano in tako povzročimo peristaltično gibanje in mešanje himusa. Z izločanjem kisline v želodčni predel in bikarbonata v predele tankega črevesa, ustvarjamo želeni pH. Prehajanje himusa nadzorujejo ventili, ki povezujejo posamezne predele. Substance z nizko molekulsko maso se z dializo oz. filtracijo skozi membranske filtre neprekinjeno izločajo iz predela jejunuma in ileuma, kar omogoča izračun biološke uporabnosti učinkovine. Sistem TIM-1 lahko povežemo s sistemom TIM-2, ki predstavlja fiziološke pogoje debelega črevesa (32).

S sistemom TIM se približamo *in vivo* pogojem vzdolž celotnega prebavnega trakta. Primerno bi bilo dodati še sistem za odstranjevanje učinkovine iz predela dvanajstnika. Večji

pomen bi bilo treba pripisati razporeditvi tekočine v tankem črevesu, ki se v fizioloških pogojih zadržuje v manjših žepkih. Pri sistemu TIM lahko zato kljub fiziološko relevantnem volumnu (300 mL) medija prikažemo boljšo topnost učinkovine od dejanske topnosti v človeškem GIT (20). Slika 7 prikazuje ključne dele gastrointestinalnega modela TIM.

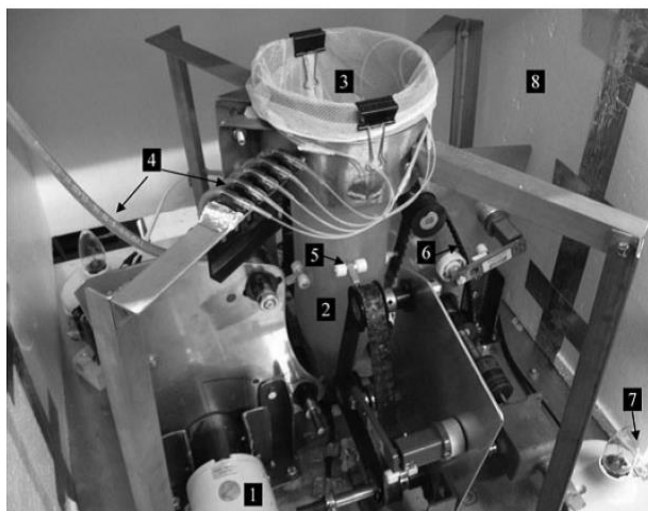


Slika 7: Shematični prikaz modela TIM-1. (A) Predel želodca; (B) pilorični sfinkter; (C) predel dvanajstnika; (D) ventil; (E) predel jejunuma; (F) ventil; (G) predel ileuma; (H) ileocekalni sfinkter; (I) dodatek želodčnih sokov; (J) dodatek sokov dvanajstnika; (K) dodatki v predel jejunuma/ileuma (L) predfilter; (M) semipermeabilna membrana; (N) črpalka za filtrat; (O) pH elektrode; (P) višinski senzorji; (R) senzorji za temperaturo; (S) senzorji za pritisk. Prirejeno po (33).

Človeški želodčni simulator (HGS)

Glavni del človeškega želodčnega simulatorja predstavlja vreča iz lateksa, ki simulira človeški želodec. Iz štirih strani na vrečo delujejo valji, pripeti na jermen, ki se pomikajo od proksimalnega dela silikonskega želodca, proti antrumu. Amplitudo krčenj lahko povečamo z manjšanjem razdalje med sosednjima valjema, frekvenco pa s povečanjem hitrosti vrtenja jermena. Postavitev jermenov in oblika vreče omogočata večje približanje valjev v distalnem kot v proksimalnem delu želodca in na ta način ponazarja močnejše kontrakcije v antrumu. Znotraj vreče iz lateksa je mrežica iz polietilena s porami velikosti 1,5 mm. Skozi pore prehajajo delci manjši od 1,5 mm, kar simulira fiziološki prehod majhnih delcev skozi pilorus. Med polietilensko mrežico in vrečo iz lateksa je na različnih višinah nameščenih 5 cevi, skozi katere se v notranjost HGS sprošča umetni želodčni sok. Aparatura se nahaja v izolirani plastični komori, ki omogoča temperaturo 37 °C.

Sistem bolje oponaša *in vivo* mehaniko gibanja kot prej omenjena dinamični model želodca in gastrointestinalni model TIM, še vedno pa je človeški želodčni simulator bolj raziskan na področju prebave hrane kot za uporabo v farmacevtski industriji (33). Slika 8 prikazuje ključne dele HGS.



Slika 8: Prikaz človeškega želodčnega simulatorja. 1) motor, 2) ovojnica iz lateksa, 3) mrežasta vreča, 4) cevke za sekrecijo, 5) valji, 6) jermen, 7) žarnica za nadzor temperature, 8) plastično ogrodje.

Inženirski model želodca in tankega črevesa

Gre za dinamičen, računalniško nadzorovan sistem, ki simulira kompleksno fiziologijo človeškega prebavnega sistema in vključuje postopen vnos hrane, ustrezno temperaturo, pH vrednosti, čase prehodov, mešanje himusa, izločanje različnih snovi vzdolž GIT (pepsin, lipaza, žolčne soli, elektrolite), različno praznjenje tekočin in trdnih delcev ter pasivno absorpcijo. Sistem je sestavljen iz šestih predelov: rezervoarja za hrano (R1), predela za mešanje hrane s slino (R2), želodca (R3) in treh delov tankega črevesa (dvanajstnik (R4), jejunum (R5), ileum (R6)). Posamezen predel je opremljen s pH

senzorji, ki regulirajo ustrezen pH z dodajanjem kisline oz. bikarbonata. Računalniško vodene črpalke nadzorujejo prehode himusa, izločanje posameznih snovi v različne predele sistema ter absorpcijo produktov presnove in vode. V želodec lahko uvajamo nehomogenizirano hrano z delci velikosti 1-8 mm (podobno velikosti delcev, ki jih pogoltnemo po žvečenju). Preden hrana vstopi želodec (R1), se v predelu R2 premeša z umetno slino. Želodec predstavlja komora z dvema batoma, ki sta ključna za mešanje in drobljenje vsebine. Med njima je ozka vdolbina, ki prepušča le delce manjše od 2 mm. Ena od prednosti sistema je različno praznjenje tekočin in trdnih delcev iz želodca. V ta namen sta v želodcu dve odprtini, povezani vsaka s svojo črpalko. Posamezna črpalka je računalniško krmiljena in sledi programu, ki je bil napisan na podlagi ustreznih *in vivo* parametrov. Sistemu je dodana tudi perforirana košarica, ki jo lahko poljubno prestavljamo med posameznimi predeli, primerna pa je predvsem za gastrozistentne oblike in oblike s podaljšanim sproščanjem (34).

2 NAMEN DELA

Glavni namen magistrske naloge bo optimizacija delovanja novo razvite naprave za posnemanje želodčnega gibanja (opisana v poglavje Metode). Najprej bomo z natančnim protokolom poskušali zmanjšati variabilnost rezultatov na zaprtem sistemu (brez pretoka skozi želodčno vrečo), nato pa bomo preučevali sproščanje iz FO na odprtem sistemu (pretok $\geq 1\text{g/min}$). Zanimal nas bo vpliv spreminjanja pretoka in hitrosti programa na sproščanje pri odprtem sistemu. Na koncu bomo poskušali najti korelacijo z *in vivo* podatki in razlike v sproščanju iz FO na naši aparaturi in farmakopejski napravi z vesli (USP II).

S ciljem zmanjšanja variabilnost rezultatov bomo ovrednotili vpliv mesta postavitve FO in načina nadomeščanja medija. Sklepamo, da bomo z usmerjeno postavitvijo tablete v silikonski želodec zmanjšali variabilnost rezultatov. Nadalje predvidevamo, da na ponovljivost rezultatov vpliva vsak poseg v vsebino vreče, ki predstavlja želodec. Zato bomo primerjali variabilnost rezultatov pri nadomeščanju in brez nadomeščanja medija. Zanimalo nas bo tudi, kako način vračanja medija vpliva na ponovljivost rezultatov. Predvidevamo, da manjši poseg v vsebino vreče, torej vračanje medija ob steni želodca povzroči manjše spremembe v sproščanju, kot nadomeščanje medija direktno v sredino vsebine vreče.

Sledila bo optimizacija delovanja odprtega sistema. S pripravo čaš enake mase in vračanjem tekočine v večjo čašo na tehtnici bomo skušali povzročiti čim manjša nihanja na tehtnici in čim natančnejši in enakomernejši pretok skozi ventil. Predvidevamo, da bomo lahko tudi pri odprtem sistemu uspešno ločevali med različnimi vzorci. Ko bomo imeli definiran protokol vzorčenja tudi na odprtem sistemu, bomo spremljali spremembe v sproščanju pri različnih nastavitvah pretokov. Izbrali bomo fiziološko relevantne pretoke 1, 2, 3 in 5 g/min. Sklepamo, da bo večji pretok povzročil izrazitejše mešanje vsebine vreče in posledično hitrejše sproščanje učinkovine. Na mešanje vsebine bomo vplivali tudi s spreminjanjem hitrosti programa. Z nastavitvijo večje periode in posledično podaljšanjem časa posameznega peristaltičnega vala bomo upočasnili dogajanje znotraj vreče in posledično zmanjšali hitrost sproščanja iz FO.

Rezultate sproščanja posamičnih vzorcev formulacij dobljene na naši napravi in na napravi USP II bomo primerjali z maksimalnimi plazemskimi koncentracijami, dobljenimi *in vivo*. Izračunali bomo determinacijske koeficiente R^2 in na ta način ovrednotili napovedno moč

posameznega modela. Dobro ujemanje oz. $R^2 \sim 1$, bi pomenil visoko napovedno moč *in vivo* sproščanja, kar bi pomenilo zmanjšanje števila analiz v prihodnosti med razvojem ustrezne formulacije in s tem zmanjšanje števila *in vivo* študij. Predvidevamo, da bo korelacija pri napravi za posnemanje želodčnega gibanja zaradi manjše hidrodinamike znotraj silikonskega želodca in zaradi pogojev, ki so bolj podobni dejanskemu stanju znotraj želodca, boljša kot pri napravi USP II.

Ker je naša naprava novejša, bomo med testiranjem uvajali izboljšave in napisali protokol izvajanja poskusov.

Povzetek namena je spodaj zapisan še v obliki osmih hipotez.

HIPOTEZE

1. Usmerjena postavitev tablete v silikonsko vrečo pomeni boljšo ponovljivost rezultatov
2. Posegi v vsebino vreče (nadomeščanje medija) med eksperimentom povečajo variabilnost rezultatov
3. Način vračanja medija vpliva na ponovljivost rezultatov
4. Tudi pri odprtem sistemu lahko uspešno ločimo med različnimi vzorci
5. Večji pretok pri odprtem sistemu vodi v hitrejše sproščanje
6. Večja perioda med posamičnimi peristaltičnim valovi bo vodila v počasnejše sproščanje
7. Sproščanje na napravi za posnemanje želodčnega gibanja bo počasnejše kot pri USP II
8. Z napravo za posnemanje želodčnega gibanja bomo uspeli doseči boljšo *in vitro-in vivo* korelacijo kot pri napravi USP II

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Farmacevtska oblika

Testirali smo vzorce s takojšnjim sproščanjem. Vzorci A-E in referenca vsebujejo učinkovino X, vzorci F, G in H pa učinkovino Y. Obe učinkovini uvrščamo v III. razred BCS klasifikacije, kar pomeni, da sta učinkovini dobro topni pri pH-jih vzdolž GIT in slabo permeabilni. Tabela 2 prikazuje lastnosti vzorcev A-E.

Tabela 2: Lastnosti vzorcev A-E.

	OBLIKA	TRDNOST (N) (jedra)	OSTALO
Vzorec A	Tableta	125	Učinkovina je intragranularno
Vzorec B	Minitablete	20,1	Učinkovina je intragranularno
Vzorec C	Tableta	130,1	Učinkovina je intragranularno
Vzorec D	Tableta	235,4	Učinkovina je ekstragranularno
Vzorec E	Minitablete	17,3	Učinkovina je intragranularno

Razvrstitev vzorcev A-E glede na količino razgrajevala, veziva in obloge:

RAZGRAJEVALO:

Vzorec A = vzorec B = vzorec C = vzorec D > vzorec E

VEZIVO:

Vzorec E > vzorec A = vzorec C = vzorec D > vzorec B

OBLOGA:

Vzorec E = vzorec B > vzorec A = vzorec C = vzorec D

3.1.2 Aparature

- Tehnica, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- Analitska tehnica, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- Štoparica, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Nemčija
- Naprava z vesli (USP II), Pharma Test Apparatebau AG, Hainburg, Nemčija
- Polavtomatske Pipete, Sartorius (Biohit), Göttingen, Nemčija
- Multikanalna pipeta, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- UHPLC z UV detektorjem, Waters Acquity, Milford, Massachusetts, USA
- Magnetno mešalo z grelcem, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
- Termometer, Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, ZDA
- Črpalka ISMATEC IP65, Wertheim, Germany

3.1.3 Kemikalije in standardi

- NaCl, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- HCl Titrisol 1 M, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- MeOH, J. T. Baker (Avantor Performance Materials), Center Valley, Pensilvanija, ZDA
- TEA, Merck, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Delovni standard učinkovine (p = 100,7 %)
- Deionizirana voda

3.1.4 Ostalo

- Steklovina: čase, merilni valji, merilne bučke, stekleni čolnički, steklene palčke
- Plastične brizge, kapalke, čolnički
- Kovinske spatule, žličke
- Magnetna mešala
- Membranski filtri 0,22 µm
- Podaljšana pinceta
- Plastičen tulec za umestitev večodmernih FO

3.2 Metode

3.2.1 Priprava medija za teste sproščanja

Vsi testi na napravi za posnemanje želodčnega gibanja so bili opravljeni v istem mediju, 0,01M HCl z 2 g NaCl/L medija. Volumen medija v vreči je bil odmerjen z merilnim valjem in je znašal 250 mL.

0,01M HCl z 2g NaCl/L medija

V 5 L čašo smo nalili približno 4500 mL deionizirane vode, vanjo vstavili magnet in postavili na magnetno mešalo. Z merilnim valjem smo odmerili 50 mL 1M HCl in jih kvantitativno prelili v čašo z deionizirano vodo. Na plastičen čolniček smo natehtali 10 g NaCl in vsebino kvantitativno prenesli v čašo. Počakali smo, da se je NaCl raztopil, nato pa smo vsebino čaše kvantitativno prelili v 5 L bučo in dopolnili do oznake z deionizirano vodo.

3.2.2 Analitika vzorcev

Vzorci A-E in referenca: Filtrirane vzorce smo redčili s testnim medijem. 100 μ L vzorca smo dodali 900 μ L medija (redčitev1). Nato smo pipetirali 100 μ L redčitve1 in ji dodali 900 μ L medija. Na ta način smo dobili 100-kratno redčenje. Vsebnost učinkovine smo določili s tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti (UHPLC) sklopljeno z UV spektrofotometrom. Enačba za izračun sproščene učinkovine je že vnaprej vnešena v program na računalniku, spreminjali smo le pogoje testa in odmere učinkovine. Na ta način smo dobili delež sproščene učinkovine v posamezni časovni točki.

Vzorci F, G in H: Filtrirane vzorce smo redčili s testnim medijem. 100 μ L vzorca smo dodali 900 μ L medija. Na ta način smo dobili 10-kratno redčenje. Vsebnost učinkovine smo določili s tekočinsko kromatografijo (HPLC) sklopljeno z UV spektrofotometrom.

Kromatografski pogoji analize za vzorce A-E in referenco

Mobilna faza:	vodni del: pufer pH 2,5 organski modifikator: metanol
Kolona:	nepolarna C8
Pretok:	0,3 mL/min (gradientna metoda)
Volumen injiciranja:	2 μ L
Valovna dolžina:	med 250 in 280 nm

Kromatografski pogoji analize za vzorce F-H

Mobilna faza: vodni del: pufer pH 6,7
 organski modifikator: metanol
Kolona: nepolarna C18
Pretok: 0,8 mL/min (gradientna metoda)
Volumen injiciranja: 5 µL

Enačba za izračun odstotka sproščene učinkovine v N-ti časovni točki

$$(Area_{vn}/Area_{st}) \times m_{st} \times P_{uč} \times V \times R_{vn}/(R_{st} \times D) = \text{procent raztopljene učinkovine}$$

Area_{vn} = površina kromatografskega vrha učinkovine vzorčne raztopine
Area_{st} = površina kromatografskega vrha učinkovine standardne raztopine
m_{st} = natehta delovnega standarda v mg
P_{uč} = čistota standarda v % učinkovine, na snov kot je
V = volumen medija za raztapljanje
R_{st} = redčenje standardne raztopine
R_{vn} = redčenje vzorčne raztopine
D = deklarirana količina učinkovine v mg

Priprava standardov za vzorce A-E

Zatehtali smo predpisano količino delovnega standarda in ga kvantitativno prenesli v 50 mL bučko ter do oznake dopolnili z medijem za raztapljanje. 5 mL te raztopine smo pipetirali v 100 mL bučko ter dopolnili do oznake z medijem za raztapljanje. Redčenje tako pripravljenega standarda je 1000-kratno. Da preverimo natančnost priprave standarda, naredimo dve paraleli, njuno odstopanje površin pa, preračunano na zatehtano maso, ne sme biti večje od 2,0 %.

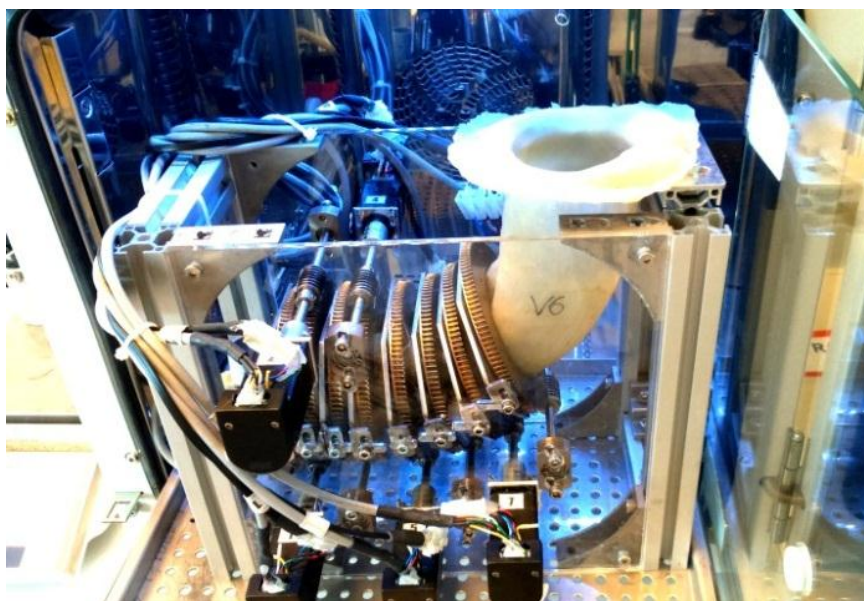
Priprava standardov za vzorce F-H

Zatehtali smo predpisano količino delovnega standarda in ga z 2,5 mL metanola kvantitativno prenesli v 25 mL bučko ter do oznake dopolnili z demineralizirano vodo. Redčenje tako pripravljenega standarda je 25-kratno. Da preverimo natančnost priprave standarda, naredimo dve paraleli, njuno odstopanje površin pa, preračunano na zatehtano maso, ne sme biti večje od 2,0 %.

3.3 Naprava za posnemanje želodčnega gibanja

3.3.1 Opis naprave

Aparatura za posnemanje želodčnega gibanja je bila razvita v podjetju Lek, d.d., v sodelovanju s Fakulteto za strojništvo v Ljubljani (35). Njena glavna prednost je programirano gibanje, ki se s svojim delovanjem približa želodčnemu gibanju. Na ta način lažje predvidimo vpliv sil in hidrodinamike tekočin na FO in s tem lahko izboljšamo *in vitro* – *in vivo* korelacijo. Želodec predstavlja silikonska vreča, ki je vpeta med osem zaslonk, ki omogočajo krčenje in s tem ustvarjanje specifičnega gibanja v želodcu. Zaslonke so računalniško krmiljene in izvajajo različne vzorce gibanja. Vreča je na spodnjem delu vpeta med ventil, ki omogoča preučevanje vpliva različnih pretokov in predstavlja pilorični sfinker. Končni del vreče lahko skozi odprtino v komori usmerimo v čašo na tehtnici, ki je povezana z računalnikom. Spreminjanje mase v čaši se računalniško beleži in vpliva na krčenje ventila in posledično na pretok skozi želodec. Poglavitni del (želodec z zaslonkami) se nahaja v komori, ki vzdržuje temperaturo primerljivo fiziološkim pogojem, 37 °C.



Slika 9: Fotografija naprave za posnemanje želodčnega gibanja.

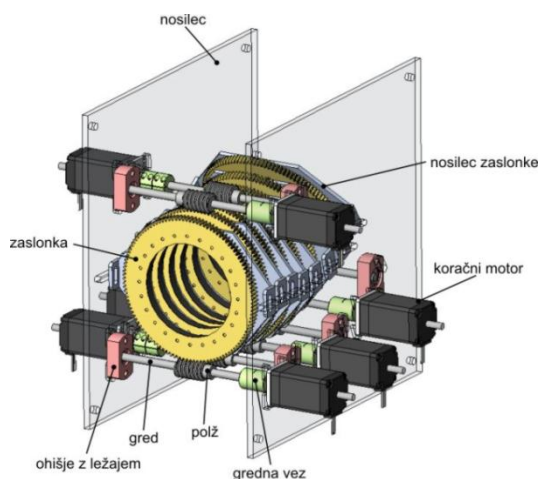
Fleksibilna vreča

Vreča je narejena iz inertne silikonske gume, ki je dovolj mehka, da se pri krčenju zaslonk upogne in dovolj toga, da se po relaksaciji zaslonk vrne v prvotno obliko. Material je odporen na 1M HCl in ima sprejemljivo odpornost na obrabo pri kontrakcijah (36). Po

obliki in velikosti je vreča podobna človeškemu želodcu, sprejme lahko volumen do 800 mL. Dolžina vreče znaša približno 250 mm, notranji premer pa se giba od 65 do 25 mm (35). Vz dolžno so po notranji strani vreče iz istega materiala (silikonska guma) narejene gube, ki so značilne tudi za človeški želodec. Zgornji del vreče je odprt in omogoča enostavno vzorčenje s kanilo in brizgo oz. nadomeščanje medija s črpalko. Spodnji del vreče se konča z ozko cevjo, ki jo vpnemo med ventil, ki preprečuje nenadzorovano iztekanje medija iz vreče in omogoča preučevanje različnih pretokov skozi želodec. Vsi poskusi so bili opravljeni na vreči oznake V6, za katero je značilen širši antralni del, kar omogoča boljše mešanje vsebine vreče.

Mehanske zaslonke

Fleksibilno vrečo vstavimo med osem zaslonk, ki so fiksno pritrjene na nosilno ogrodje. Gibanje zaslonk omogoča polževo gonilo, ki je preko gredi povezano z računalniško vodenim koračnim motorjem. Posamezna zaslonka je nameščena na nosilec zaslonke, ki je pritrjen na akrilno steklo. Za doseganje želenih vzorcev gibanja lahko na računalniškem programu spreminjamo začetni položaj posamezne zaslonke, amplitudo zaprtja, zakasnitev krčenja med sosednjimi zaslonkami in trajanje posameznega cikla (36). Slika 10 prikazuje zaslonke in mehanske dele, potrebne za delovanje naprave za posnemanje želodčnega gibanja.



Slika 10: Prikaz zaslonk naprave za posnemanje želodčnega gibanja in mehanskih delov, potrebnih za ustvarjanje vzorcev gibanja (36).

Delovanje ventila, ki ponazarja pilorični sfinkter

Končni del silikonske vreče je zožen, da ga lahko vpnemo med ventil, ki je računalniško voden. Ventil se premika vertikalno, z različno hitrostjo in na ta način odpira končni del vreče. V programu hitrost odpiranja ventila nastavimo z izbiro želenega pretoka,

izraženega v g/min. Vsebina vreče se zbira v čašo na tehtnici, kar daje podatek o masi prepuščene tekočine. V kolikor je masa na tehtnici za predhodno nastavljen pretok prevelika, bo ventil dlje časa ostal zaprt in obratno. Čašo na tehtnici v želenih časovnih intervalih odstranimo in jo nadomestimo z novo. Tako dobimo profil sproščanja v različnih časovnih točkah. Običajno pri odprtem sistemu s črpalko skozi zgornjo odprtino vreče nadomeščamo svež medij. Na črpalki za nadomeščanje nastavimo enak pretok, kot je izbran na programu v računalniku. Tako nimamo sprememb volumna vsebine v vreči. Zaprt sistem lahko ustvarimo z nastavitvijo pretoka na vrednost nič (0 g/min), ob tem črpalke za nadomeščanje medija nimamo vključene.

Ogrodje in komora

Nosilno ogrodje je narejeno iz aluminijastih profilov, ob straneh pa sta dva nosilca iz akrilnega stekla. Na aluminijast profil so nameščene štiri noge, cel sklop pa se nahaja v komori. V kolikor poskusa ne izvajamo v termostatisiranih pogojih, lahko ogrodje odstranimo iz komore in na ta način lažje vizualno spremljamo dogajanje v lumnu želodca. Komora je proizvod podjetja Kambič laboratorijska oprema d.o.o. in omogoča termostatisiranje z zrakom na 37 °C, z natančnostjo $\pm 0,1$ °C. Na zgornjem delu ima komora tipkovnico za vnos nastavitvev temperature in prikazovalnik trenutne temperature v notranjosti komore.

Programska oprema

Celoten sklop zaslonk, elektromotorjev, tehtnica ter ventil so povezani z vmesnikom, ta pa preko USB povezave s programsko opremo na računalniku. Z izbiro ustreznih parametrov na računalniškem programu lahko oblikujemo zelene vzorce gibanja želodca. Program nam omogoča nastavitvev začetnega odprtja zaslonk, njihovo amplitudo zaprtja, čas trajanja posameznega peristaltičnega vala, zakasnitev med sosednjimi zaslonkami, trajanje posameznega cikla, čas odprtja posamezne zaslonke in tudi reset faznih razlik, ki ob nastavljenem času odpravi manjša odstopanja pri gibanju zaslonk. Omogočeno je tudi spreminjanje pretoka skozi ventil.

3.3.2 Izvedba testov sproščanja na napravi za simuliranje želodčnega gibanja

Najprej smo vklopili komoro, da se je pričela greti na 37 °C. Nato smo prižgali program na računalniku in zatem vmesnik ter tehtnico. Pred začetkom testa smo na računalniškem programu s klikom na gumb »inicializacija« povezali programsko opremo z vmesnikom in

tega z elektromotorji ter ostalimi ključnimi deli naprave za posnemanje želodčnega gibanja. Med zaslonke in ventil smo vstavili silikonsko vrečo in vanjo natočili 250 mL medija, ki smo ga predhodno segreli na 38-39 °C, za kar smo uporabili magnetno mešalo z grelcem. Pri vnosu medija v vrečo njegova temperatura rahlo pade, zato je predhodno ogret na več kot 37 °C. Pred začetkom testa smo počakali vsaj 5 min, da se je temperatura medija ustalila, kar smo preverili s termometrom. V tem času smo nastavili želeni program izvajanja kontrakcij. Teste smo izvajali z dvema programoma. Program V_002_hitra se od programa V_002_počasna razlikuje le v dolžini periode. Pri nastavitvi hitrejšega programa en peristaltični val potuje 16 sekund, pri počasnejšem programu pa 26 sekund. Ko je bila temperatura na komori ustaljena na 37 °C, smo postavili tableto v silikonsko vrečo. Naključna postavitev je potekala tako, da smo tableto nastavili nad zgornjo odprtino vreče, v bližino male krivine želodca in jo spustili. Večina testov je bila izpeljana z usmerjeno postavitvijo tablete, ki smo jo izvedli s podaljšano pinceto, tako da smo tableto previdno položili med 6. in 7. zaslonko. V primeru testiranja minitabiet, smo za postavitev uporabili plastičen tulec z lijakastim vrhom. Spodnji konec tulca smo namestili na 7. zaslonko in skozi zgornji, lijakast del, stresli minitabiete. Te so se razporedile med 6. in 7. zaslonko. Vzorčili smo v različnih časovnih točkah, odvisno od posamezne formulacije. Običajno na 5, 10, 15, 20, 25, 30 in 40 min. Na brizgo z vsebino smo namestili filter z velikostjo por 0,22 µm in pred polnjenjem v vialo zavrgli približno 1,5 mL vsebine, da smo nasitili filter. Po končanem testu smo vrečo previdno odstranili iz ogrodja in jo prelili v večjo čašo. Vsebinsko smo premešali do homogene raztopine in vzorčili. Na ta način smo dobili točko neskončno, kjer smo pričakovali 100 % delež sproščene učinkovine. V kolikor je bila vrednost sproščene učinkovine nižja, je to pomenilo, bodisi da dolžina testa ni ustrezna, da se učinkovina adsorbira na steno silikonskega želodca, ali da se kako drugače izgublja iz sistema.

Zaprt sistem

Zaprt sistem smo dosegli z nastavitvijo pretoka na 0 g/min. Uporaba tehnice pri tem sistemu zato ni bila potrebna. Vzorce smo jemali skozi zgornjo odprtino komore, z dolgo kanilo, na kateri je brizga. Vzorčili smo ob steni, in sicer 5 mL, na mestu male krivine želodca. V primeru nadomeščanja medija, smo po vsakem vzorčenju z brizgo skozi kanilo vračali segret medij ob steni želodca ali direktno v vsebino želodca.

Odprt sistem

Za delovanje odprtega sistema je potrebna povezava programske opreme s tehtnico. Ta je nameščena ob komori, ki ima na strani odprtino za podaljšani del silikonskega želodca, skozi katerega izteka vsebina. Pred začetkom testa smo si pripravili čaše s podobno maso in napolnili epruvete z vodo. Volumen vode v posamezni epruveti je bil enak volumnu vsebine, ki je pritekel skozi ventil v določenem intervalu vzorčenja. Pred začetkom testa smo tehtnico vedno nastavili na vrednost 0. Pred začetkom testa je bila na tehtnici čaša za zbiranje iztečene vsebine iz želodca in čaša za reguliranje mase, v katero smo nadomeščali ustrezen volumen vode, ki smo si ga predhodno odmerili v epruvete. Ob želenem času vzorčenja (na primer po 5 min) smo čašo z vsebino odstranili iz tehtnice in nadomestili z novo. Prav tako smo v prazno čašo za reguliranje mase prelili vsebino ene epruvete. Na ta način tehtnica zaradi vzorčenja ni zaznala izgube mase, ventil pa je s pravilnim pretokom deloval naprej. Vsebino čaše smo posrkali v brizgo, jo dvakrat vertikalno obrnili, da se je vsebina premešala in prefiltrirali. Medij smo s črpalko nadomeščali skozi zgornjo odprtino komore.

3.3.3 Pregled testov sproščanja, opravljenih v okviru magistrske naloge

Prvi zadani cilj v okviru magistrske naloge je bilo zmanjšanje variabilnosti rezultatov. To nalogo smo nadaljevali na točki, ki je bila najbolj optimizirana in se je nadaljevala od opravljenih testov v okviru prejšnje magistrske naloge na naši napravi. Testiranja smo začeli na zaprtem sistemu (pretok 0 g/min), z uporabo vreče V6 in programom V_002_hitra. Predvidevali smo, da lahko s preučevanjem načina postavitve tablete in vplivom nadomeščanja medija zmanjšamo variabilnost rezultatov, zato smo na vzorcu A opravili po 6 paralel istih testov, enkrat z naključno in drugič z usmerjeno postavitvijo. Nadaljevali smo s preučevanjem vpliva nadomeščanja medija in v sklopu tega opravili 3 serije po 6 paralel, enkrat brez nadomeščanja, drugič z nadomeščanjem ob steni želodca in direktno v medij. Vsi testi so bili opravljeni na vzorcu A. Za potrditev dobljenih ugotovitev smo opravili še 3 serije poskusov po 3 paralele na vzorcih z drugačno učinkovino (vzorci F, G in H).

Drug zadani cilj je bila optimizacija delovanja naprave pri odprtem sistemu (pretok ≥ 1 g/min). Odprt sistem je bil do izvedbe poskusov naše magistrske naloge uporabljen le v majhni meri, zato smo za začetek s hitrim programom in fiziološko relevantnim pretokom 2 g/min opravili preizkuse na šestih različnih FO po 5 paralel. Ker so bili rezultati

obetavni, smo nadaljevali s preučevanjem vpliva različnega pretoka in nato še hitrosti programa na sproščanje iz tablet. V okviru preučevanja vpliva pretoka na sproščanje smo ponovno uporabili vzorec A in hiter program. Naredili smo štiri serije testov po 5 paralel. Testirali smo pretoke 1, 2, 3 in 5 g/min. Za preučevanje vpliva programa oz. števila peristaltičnih valov v eni minuti smo na vzorcu A opravili 2 seriji preizkusov po 5 paralel in sicer prvo serijo s počasnim programom in pretokom 1 g/min in drugo serijo s počasnim programom in pretokom 2 g/min.

Tretji del naloge obsega primerjavo *in vitro* rezultatov dobljenih na dva različna načina z *in vivo* podatki. Podatke o maksimalnih plazemskih koncentracijah iz farmakokinetične študije smo dobili za vzorca B in E ter za referenco. Na teh vzorcih smo že opravili teste s hitrim programom in pretokom 2 g/min, kar nam je omogočilo primerjavo razmerij sproščanja iz posamezne FO *in vitro* z *in vivo* podatki. Nadalje nas je zanimala tudi korelacija med sproščanjem iz vzorcev B, E ter reference pri uporabi počasnega programa in pretoka 1 g/min z *in vivo* razmerji. V ta namen smo na vseh treh vzorcih opravili po 5 paralel testov in izračunali razmerja sproščanja v posamezni časovni točki.

Za konec smo opravili še dva testa na farmakopejski napravi z vesli (USP II), in sicer po tri paralele za posamezen vzorec. Testirali smo vzorce B, E in referenco, da smo lahko tudi rezultate dobljene na napravi USP II primerjali z *in vivo* sproščanjem.

V sklopu magistrske naloge je bilo opravljenih približno 40 testov na račun zmanjšanja variabilnosti rezultatov, 60 testov za optimizacijo odprtega sistema, 15 testov za preučevanje IVIVC in dva testa na napravi USP II (skupno 9 posod). Zraven niso šteti testi, opravljeni v sklopu optimizacije naprave, ki zaradi še ne dodelanih postopkov niso dali pomembnih rezultatov.

4 REZULTATI

4.1 Zmanjšanje variabilnosti rezultatov

4.1.1 Vpliv postavitve tablete

Na vzorcu A smo na zaprtem sistemu (pretok 0 g/min) preučevali variabilnost rezultatov glede na način postavitve tablete v silikonski želodec. Uporabili smo program V_002_hitra. Pri naključni postavitvi smo tableto nastavili v višino silikonskega želodca in jo spustili v bližini male krivine želodca, pri usmerjeni postavitvi pa smo jo s podaljšano pinceto previdno položili med 6. in 7. zaslonko, ki se vidita tudi v notranjosti silikonskega želodca. Tabela 3 prikazuje delež sproščene učinkovine v posamezni časovni točki, standardne deviacije (SD) in relativne standardne deviacije (RSD), dobljene na dva različna načina postavitve tablete v silikonski želodec.

Tabela 3: Delež sproščene učinkovine iz vzorca A, SD in RSD pri dveh različnih načinih postavitve tablete v silikonski želodec.

naključno postavljena tableta (n=6)									
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	40	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	74,4	92,7	97,8	100,4	101,6	102,2	102,8	103,6
SD	0	28,9	15,1	8,5	6,5	4,3	3,5	2,9	1,7
RSD [%]	0	38,9	16,3	8,7	6,5	4,2	3,4	2,8	1,6
usmerjeno postavljena tableta (n=6)									
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	40	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	69,3	94,1	99,6	102,9	103,8	103,9	104,7	105,4
SD	0	9,8	6,2	4,3	2,8	2,0	1,5	1,0	0,8
RSD [%]	0	14,2	6,6	4,3	2,7	2,0	1,5	0,9	0,7

4.1.2 Vpliv nadomeščanja medija

Spremljali smo vpliv nadomeščanja medija oz. posega v vsebino želodca na variabilnost rezultatov. Poskusi so bili opravljeni z usmerjeno postavitvijo vzorca A v silikonski želodec, na zaprtem sistemu (pretok 0 g/min) s programom V_002_hitra. V prvi seriji poskusov smo po vsakem vzorčenju medij vedno nadomeščali ob steni želodca brez kontakta z medijem za raztapljanje. V drugi seriji poskusov smo medij nadomeščali

direktno v vsebino silikonskega želodca. V tem primeru smo pričakovali večji vpliv na hidrodinamiko tekočin znotraj želodca. Za kontrolo smo izvedli še poskuse brez nadomeščanja medija. V tabeli 4 so prikazani deleži sproščene učinkovine v posamezni časovni točki, SD in RSD glede na način vračanja medija.

Tabela 4: Prikaz deleža sproščene učinkovine iz vzorca A, SD in RSD pri nadomeščanju medija ob steni želodca, vračanju medija direktno v vsebino želodca in pri poskusih opravljenih brez nadomeščanja medija.

nadomeščanje medija ob steni želodca (n=6)									
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	40	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	71,3	94,1	97,1	97,3	97,7	100,1	98,7	95,4
SD	0	14,8	3,7	1,3	5,5	4,6	2,3	4,2	7,6
RSD [%]	0	20,7	4,0	1,3	5,6	4,7	2,3	4,2	7,9
nadomeščanje medija direktno v vrečo (n=6)									
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	40	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	72,9	91,0	96,1	99,2	101,5	98,4	99,6	99,0
SD	0	15,9	12,5	7,9	4,5	1,2	3,9	5,2	5,1
RSD [%]	0	21,8	13,7	8,2	4,6	1,2	4,0	5,3	5,2
brez nadomeščanja medija (n=6)									
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	40	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	69,3	94,1	99,6	102,9	103,8	103,9	104,7	105,4
SD	0	9,8	6,2	4,3	2,8	2,0	1,5	1,0	0,8
RSD [%]	0	14,2	6,6	4,3	2,7	2,0	1,5	0,9	0,7

4.1.3 Potrditev dobljenih ugotovitev

Z usmerjeno postavitvijo tablete v silikonski želodec in brez nadomeščanja medija smo na zaprtem sistemu izvedli še tri paralele poskusov na vzorcih F, G in H, ki vsebujejo drugačno učinkovino od vzorcev A-E in reference. Na ta način smo testirali, ali dobljene ugotovitve glede zmanjšanja variabilnosti sproščanja prinašajo obetavne rezultate in ali lahko tudi posamezna formulacija oz. učinkovina vpliva na variabilnost sproščanja. Uporabili smo program V_002_hitra. V tabeli 5 so prikazani deleži sproščene učinkovine v posamezni časovni točki, SD in RSD.

Tabela 5: Prikaz deleža sproščene učinkovin iz vzorcev F, G in H, SD in RSD pri usmerjeni postavitvi tablete, brez nadomeščanja medija.

vzorec F (n=3)									
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	40	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	44,1	59,6	70,2	73,9	79,2	83,3	88,1	89,1
SD	0	3,0	3,1	3,3	2,9	3,0	2,6	1,2	2,0
RSD [%]	0	6,7	5,2	4,7	3,9	3,7	3,1	1,4	2,3
vzorec G (n=3)									
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	40	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	79,5	81,7	84,2	86,0	85,3	86,3	87,0	87,1
SD	0	3,6	2,8	2,0	2,6	3,7	2,4	1,3	0,4
RSD [%]	0	4,6	3,5	2,4	3,0	4,3	2,7	1,5	0,5
vzorec H (n=3)									
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	40	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	43,5	66,2	75,4	78,6	84,5	88,2	91,5	95,3
SD	0	2,2	1,7	2,3	0,8	0,5	1,1	1,5	0,8
RSD [%]	0	5,1	2,6	3,1	1,0	0,5	1,2	1,7	0,8

4.2 Optimizacija delovanja odprtega sistema

V sklopu optimizacije delovanja odprtega sistema (pretok $\geq 1\text{ g/min}$) smo testirali več vzorcev z različnimi lastnostmi in preučevali delež sproščene učinkovine, ki priteče skozi ventil ob izbranih časovnih točkah. Glavni namen je bilo ugotoviti, ali lahko naprava za posnemanje želodčnega gibanja tudi na tak način ustrezno loči med vzorci z različnimi hitrostmi sproščanja. Testi so bili opravljeni s programom V_002_hitra in pretokom 2 g/min. Medij smo zaradi večjih volumnov vzorčenja po kapljicah nadomeščali s črpalko skozi zgornjo odprtino želodca z enako hitrostjo, kot je bil pretok iz vreče. Deleži sproščene učinkovine v posamezni časovni točki, SD in RSD so podani v tabeli 6.

Tabela 6: Deleži sproščene učinkovine, SD in RSD pri testiranju različnih vzorcev na odprtem sistemu, pri pretoku 2 g/min.

vzorec A (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	16,6	72,4	92,6	97,8	98,7	99,9	99,2
SD	0	2,7	10,5	6,2	4,6	2,2	2,2	2,4
RSD [%]	0	16,4	14,5	6,7	4,7	2,3	2,2	2,4
vzorec B (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	4,8	37,4	65,5	81,0	90,8	96,0	103,6
SD	0	1,8	11,6	12,3	7,2	2,0	2,1	1,4
RSD [%]	0	37,3	30,9	18,8	8,8	2,2	2,1	1,4
vzorec C (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	16,6	67,0	88,4	96,4	99,8	102,1	102,8
SD	0	3,3	4,6	2,5	1,7	0,9	0,9	1,7
RSD [%]	0	19,6	6,9	2,8	1,7	0,9	0,9	1,6
vzorec D (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	31,0	91,9	102,7	104,4	106,2	107,1	107,4
SD	0	8,4	7,1	2,2	2,0	1,6	1,4	1,7
RSD [%]	0	27,2	7,7	2,1	1,9	1,5	1,3	1,5
vzorec E (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	2,8	26,0	51,2	68,3	78,3	84,7	97,8
SD	0	0,7	3,4	7,4	10,1	9,3	7,6	3,5
RSD [%]	0	23,3	13,1	14,4	14,7	11,9	9,0	3,6
referenca (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	7,4	77,8	97,3	99,7	100,4	101,5	99,0
SD	0	1,4	5,8	3,5	2,1	2,0	3,0	1,5
RSD [%]	0	19,4	7,5	3,6	2,1	2,0	3,0	1,5

4.2.1 Vpliv spremembe pretoka na sproščanje

Tabela 7 prikazuje deleže sproščene učinkovine v posamezni časovni točki, SD in RSD glede na različno nastavljen pretok (1, 2, 3 in 5 g/min) skozi ventil želodca. Testi so bili opravljeni na vzorcu A, s programom V_002_hitra.

Tabela 7: Delež sproščene učinkovine, SD in RSD pri nastavljenih različnih pretokih (1, 2, 3 in 5 g/min) skozi ventil želodca. Vzorec A.

pretok 1 g/min (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	6,5	49,5	89,9	100,9	102,2	102,7	102,7
SD	0	1,6	6,5	3,8	2,0	1,2	0,6	0,8
RSD [%]	0	25,0	13,0	4,2	2,0	1,1	0,6	0,8
pretok 2 g/min (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	16,6	72,4	92,6	97,8	98,7	99,9	99,2
SD	0	3,0	10,7	6,6	5,2	2,6	2,2	2,8
RSD [%]	0	18,1	14,8	7,1	5,3	2,6	2,3	2,8
pretok 3 g/min (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	23,6	76,2	97,4	100,7	101,0	101,3	100,1
SD	0	3,8	9,7	2,7	3,0	3,8	3,3	3,4
RSD [%]	0	16,3	12,7	2,8	2,9	3,8	3,2	3,4
pretok 5 g/min (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	neskončno	
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	24,6	65,5	81,1	87,0	90,0	91,9	
SD	0	3,4	5,1	5,4	2,9	2,6	1,8	
RSD [%]	0	14,0	7,8	6,6	3,3	2,9	2,0	

4.2.2 Vpliv spremembe programa na sproščanje

Pri fiziološko najbolj relevantnih pretokih, 1 in 2 g/min smo preučevali vpliv hitrosti posameznega peristaltičnega vala oz. dveh različnih nastavitvev periode na sproščanje iz vzorca A. Počasen program v minuti opravi 2,3 peristaltična vala, hiter program pa 3,7. V tabeli 8 so podani deleži sproščene učinkovine v posamezni časovni točki, SD in RSD pri nastavljenih dveh različnih programih, pri pretoku 1 in 2 g/min.

Tabela 8: Deleži sproščene učinkovine, SD in RSD pri dveh nastavitvah hitrosti programa, pri pretoku 1 in 2 g/min. Vzorec A.

PRETOK 1 g/min								
počasen program (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	2,5	25,8	47,4	60,6	68,9	76,1	97,7
SD	0	0,6	3,0	7,4	10,4	9,2	7,2	10,2
RSD [%]	0	24,5	11,7	15,6	17,2	13,4	9,4	10,5
hiter program (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	6,5	49,5	97,6	104,7	104,5	104,8	104,3
SD	0	1,6	6,5	3,8	2,0	1,2	0,6	0,8
RSD [%]	0	25,0	13,0	3,8	1,9	1,1	0,6	0,8
PRETOK 2 g/min								
počasen program (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	8,7	53,7	89,9	98,2	99,9	101,1	103,3
SD	0	1,2	4,7	4,6	4,2	3,6	3,3	3,6
RSD [%]	0	13,5	8,8	5,1	4,3	3,6	3,2	3,5
hiter program (n=5)								
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	16,6	72,4	92,6	97,8	98,7	99,9	99,2
SD	0	3,0	10,7	6,6	5,2	2,6	2,2	2,8
RSD [%]	0	18,1	14,8	7,1	5,3	2,6	2,3	2,8

4.3 Testiranje vzorcev B, E in reference za preučevanje IVIVC

Na vzorcih B, E in referenci je bila opravljena tudi farmakokinetična študija. Na napravi za posnemanje želodčnega gibanja smo na teh vzorcih že naredili poskuse s hitrim programom in pretokom 2 g/min. Za primerjavo IVIVC smo jih testirali še s počasnim programom in pretokom 1 g/min. Deleži sproščene učinkovine v posamezni časovni točki, SD in RSD so podani v tabeli 9.

Tabela 9: Deleži sproščene učinkovine, SD in RSD pri testiranju s počasnim programom in pretokom 1 g/min na vzorcih B, E ter na referenci.

POČASEN PROGRAM, PRETOK 1g/min							
vzorec B (n=5)							
čas (min)	0	10	20	30	40	50	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	7,2	50,0	85,4	93,8	95,6	97,8
SD	0	4,3	8,9	2,2	0,9	0,8	1,8
RSD [%]	0	58,9	17,7	2,5	1,0	0,9	1,9
vzorec E (n=5)							
čas (min)	0	10	20	30	40	50	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	6,6	34,5	61,0	77,1	82,8	93,2
SD	0	2,9	11,4	13,9	10,4	6,6	2,1
RSD [%]	0	43,9	33,0	22,7	13,6	8,0	2,3
referenca (n=5)							
čas (min)	0	10	20	30	40	50	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	17,8	83,6	96,4	98,3	98,7	98,5
SD	0	8,9	14,6	5,0	1,7	1,6	3,5
RSD [%]	0	49,9	17,5	5,2	1,7	1,6	3,5

4.4 Testiranje na aparaturi USP II

Na vzorcih iz farmakokinetične študije smo za primerjavo sproščanja med aparaturami naredili še poskuse s farmakopejsko napravo z vesli (USP II). Poskusi so bili opravljeni v 900 mL 0,01M HCl z 2 g NaCl/L medija, pri 50 obratih/minuto. Deleži sproščene učinkovine v posamezni časovni točki, SD in RSD so prikazani v tabeli 10.

Tabela 10: Deleži sproščene učinkovine, SD in RSD na vzorcih B, E in referenci na napravi USP II.

vzorec B (n=3)									
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	40	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	36,6	62,0	81,4	91,5	93,9	94,8	97,1	104,4
SD	0	1,6	4,3	4,1	2,9	2,3	2,1	1,8	1,7
RSD [%]	0	4,4	7,0	5,0	3,2	2,5	2,2	1,9	1,7
vzorec E (n=3)									
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	40	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	18,1	37,9	52,9	66,1	77,3	86,0	93,4	101,8
SD	0	0,8	1,3	1,1	0,9	1,9	1,0	1,2	1,5
RSD [%]	0	4,6	3,3	2,0	1,3	2,5	1,2	1,3	1,5
referenca (n=3)									
čas (min)	0	5	10	15	20	25	30	40	neskončno
povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	80,0	98,3	100,1	101,9	101,4	101,5	102,2	104,8
SD	0	8,6	1,3	0,4	0,3	0,6	0,8	0,6	0,5
RSD [%]	0	10,7	1,3	0,4	0,3	0,6	0,8	0,5	0,4

5 RAZPRAVA

Testiranje sproščanja na napravi za simuliranje želodčnega gibanja (med razpravo jo imenujemo naša naprava) smo začeli z uporabo zaprtega sistema. Z namenom zmanjšanja variabilnosti rezultatov smo preučevali vpliv postavitve tablete v silikonski želodec in nadomeščanja medija na ponovljivost sproščanja. Z dobljenimi zaključki smo nadaljevali testiranja na odprtem sistemu. Ker z uporabo odprtega sistema še ni bilo opravljenih veliko testov, smo za začetek naključno testirali vzorce z različnimi lastnostmi in vzporedno optimizirali delovanje odprtega sistema. Večina testov je bila opravljena s fiziološko relevantnim pretokom 2 g/min. Na odprtem sistemu smo preučevali tudi vplive različnih pretokov in programov na sproščanje iz tablet. Osredotočili smo se predvsem na sproščanje iz dveh formulacij (vzorcev B in E), na katerih sta bili že opravljeni *in vivo* študiji, in na referenco. Tako smo lahko spremljali korelacijo med sproščanjem tablete *in vivo* in sproščanjem na naši aparaturi. Za primerjavo smo vzorce B in E ter referenco testirali še na farmakopejski napravi z vesli (USP II), s čimer smo želeli ugotoviti razlike v hitrosti sproščanja med napravama.

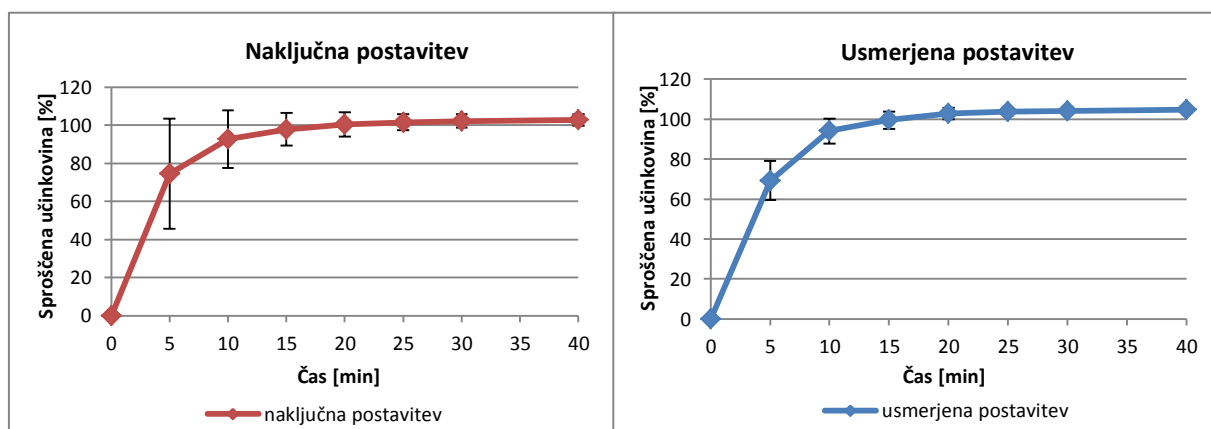
5.1 Zmanjšanje variabilnosti rezultatov

5.1.1 Vpliv postavitve tablete na variabilnost rezultatov

Na zaprtem sistemu smo z uporabo hitrega programa na vzorcu A preučevali vpliv postavitve tablete v silikonski želodec na variabilnost rezultatov. Pri naključni postavitvi smo tableto spustili v vrečo v bližini male krivine želodca, pri usmerjeni postavitvi tablete pa smo jo s podaljšano pinceto položili med 6. in 7. zaslonko. Iz rezultatov je razvidno, da se variabilnost bistveno zmanjša, ko tableto usmerjeno položimo v vrečo. Ti rezultati so bili pričakovani, saj lahko pri naključni postavitvi tableta nekontrolirano pade v katerokoli pozicijo znotraj želodčne vreče. Lahko se ujame v katero izmed želodčnih gub ali pristane na višji poziciji oz. globlje v želodcu, kar povzroči koncentriranje učinkovine na različnih mestih želodca. Ker je bila točka vzorčenja že določena in konstantna (ob mali krivini želodca), je bila ustrezna postavitev in posledično lega tablete ključna za dobro ponovljivost rezultatov. Tabela 11 prikazuje razliko v RSD med naključno in usmerjeno postavitvijo tablete v silikonski želodec. Na grafu 1 vidimo, da sta krivulji sproščanja pri različnih postavitvi tablete podobni, bistveno pa je zmanjšanje SD pri usmerjeni postavitvi tablete v silikonski želodec.

Tabela 11: Primerjava RSD sproščanja pri naključni in usmerjeni postavitvi tablete v posamezni časovni točki.

ČAS[min]	%RSD	
	naključno	usmerjeno
5	38,9	14,2
10	16,3	6,6
15	8,7	4,3
20	6,5	2,7
25	4,2	2,0
30	3,4	1,5
40	2,8	0,9
neskončno	1,6	0,7



Graf 1: Primerjava SD glede na način postavitve tablete v silikonski želodec.

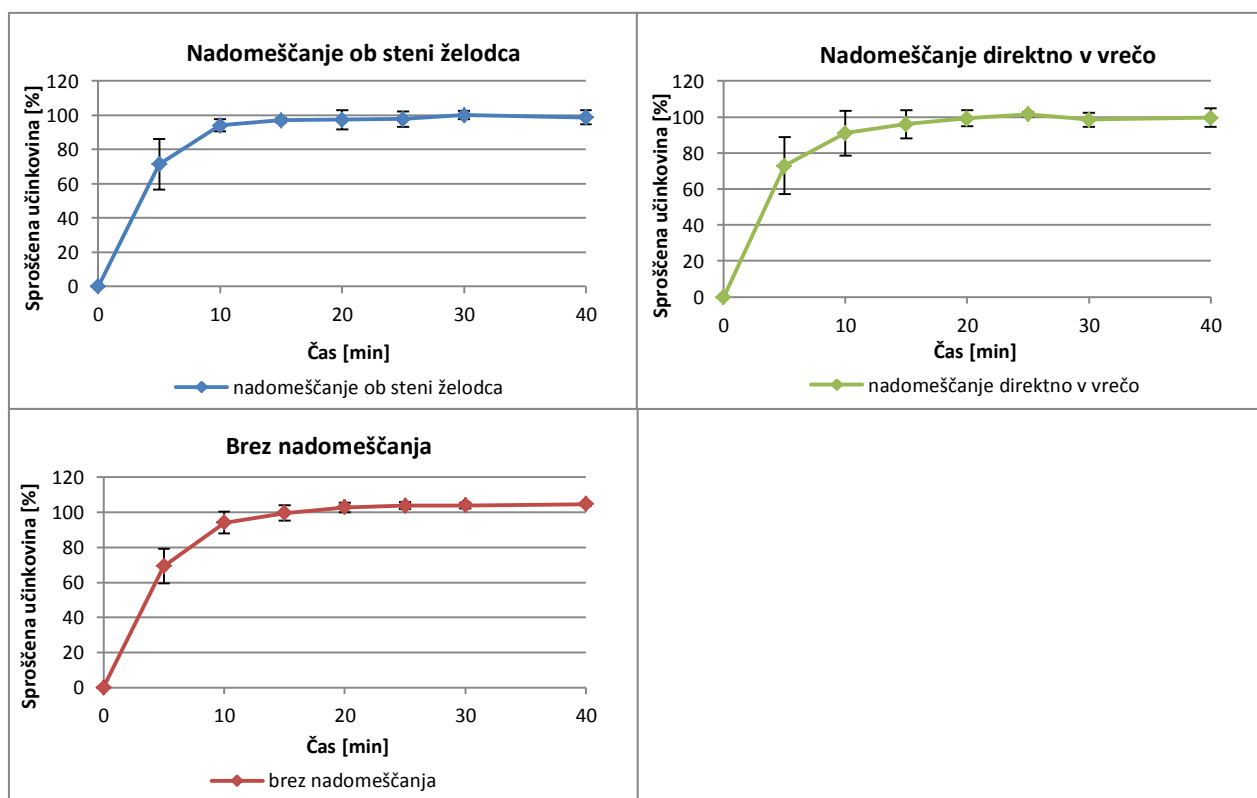
5.1.2 Vpliv nadomeščanja medija na variabilnost rezultatov

Nadomeščanje medija smo testirali enako kot vpliv postavitve tablete, in sicer s hitrim programom na zaprtem sistemu z vzorcem A. Iz rezultatov je razvidno, da z nadomeščanjem medija povečamo variabilnost rezultatov. Običajno medij nadomeščamo, ko nimamo zadoščenih »sink« pogojev in izguba medija zaradi volumna vzorčenja vpliva na sproščanje učinkovine. Naša učinkovina spada v razred BCS III, kar pomeni, da je dobro topna, volumen medija 250 mL pa zadošča sink pogojem. Nadaljnje analize na zaprtem sistemu je zato v našem primeru bolj smiselno izvajati brez nadomeščanja medija. V kolikor bi bilo za zadostitev pogojev topnosti treba medij nadomeščati, je iz vidika variabilnosti rezultatov primernejše vračanje medija skozi kanilo ob steni želodca v primerjavi z nadomeščanjem medija direktno v vsebino vreče. Izkazalo se je, da vsak dodaten poseg v hidrodinamiko vsebine v vreči povzroči spremembo v toku raztopine in posledično različno koncentracijo odvzete učinkovine pri vzorčenju. V tabeli 12 so prikazane razlike v RSD glede na način vračanja medija. Iz grafa 2 je razvidno, da se

učinkovina kljub različnemu nadomeščanju medija sprošča podobno, razlike pa so vidne v SD.

Tabela 12: Primerjava RSD glede na način nadomeščanja medija.

ČAS [min]	%RSD		
	NADOMEŠČANJE		BREZ NADOMEŠČANJA
	ob steni	v medij	
5	20,7	21,8	14,2
10	4,0	13,7	6,6
15	1,3	8,2	4,3
20	5,6	4,6	2,7
25	4,7	1,2	2,0
30	2,3	4,0	1,5
40	4,2	5,3	0,9
neskončno	7,9	5,2	0,7

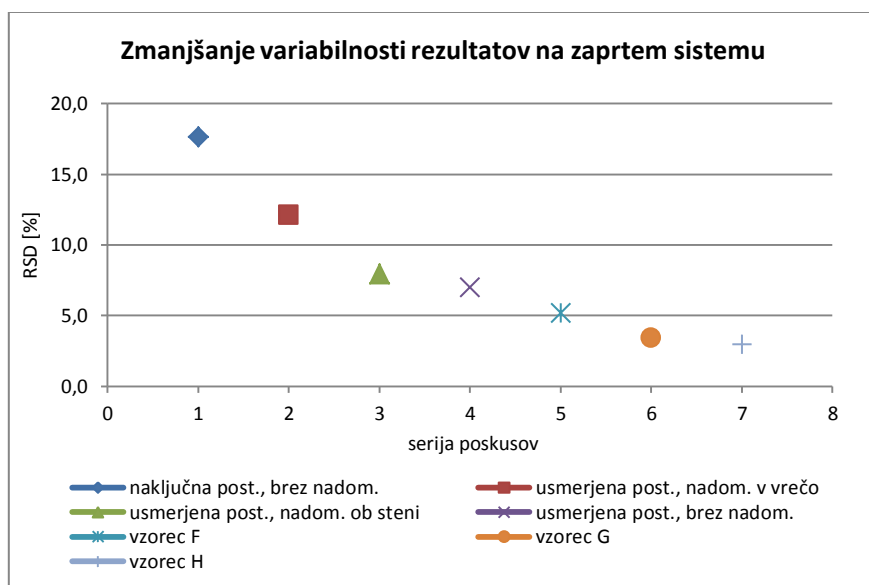


Graf 2: Primerjava SD glede na način nadomeščanja medija.

5.1.3 Potrditev zmanjšanja variabilnosti rezultatov

Na vzorcih F, G in H (v tem odstavku tudi »novi vzorci«) smo z usmerjeno postavitvijo tablete in brez nadomeščanja medija opravili po 3 ponovitve poskusov na zaprtem sistemu. Pri sproščanju iz novih vzorcev smo dobili še nižje RSD vrednosti kot pri poskusih

opravljenih pri istih pogojih na vzorcu A. Dokazali smo, da lahko z natančno postavitvijo tablet v silikonski želodec, čim manjšim posegom v vsebino vreče in dodelanim protokolom testiranja bistveno zmanjšamo variabilnost rezultatov. Na ponovljivost zagotovo vplivajo tudi kvaliteta vzorca, učinkovina in ne nazadnje človeški faktor, ki je najverjetneje eden od razlogov za nižje RSD vrednosti pri vzorcih F, G in H. Ti so bili testirani proti koncu poskusov, v sklopu variabilnosti sproščanja na zaprtem sistemu (serija 5, 6 in 7 na grafu 3), ko je bil celoten protokol že dodelan, vzorčenje in redčenje filtrata pa že bolj vpeljeni. Iz grafa 3 je razvidno zmanjšanje variabilnosti rezultatov glede na način postavitve in nadomeščanja medija na vzorcu A, kar prikazujejo serije 1 – 4, serije 5, 6 in 7 pa prikazujejo variabilnost sproščanja na vzorcih F, G in H, ki so bili testirani z usmerjeno postavitvijo in brez nadomeščanja medija. Na grafu smo na y-os nanašali povprečje RSD prvih štirih časovnih točk posameznega sklopa (5, 10, 15 in 20 min), na x-os pa serijo poskusov.



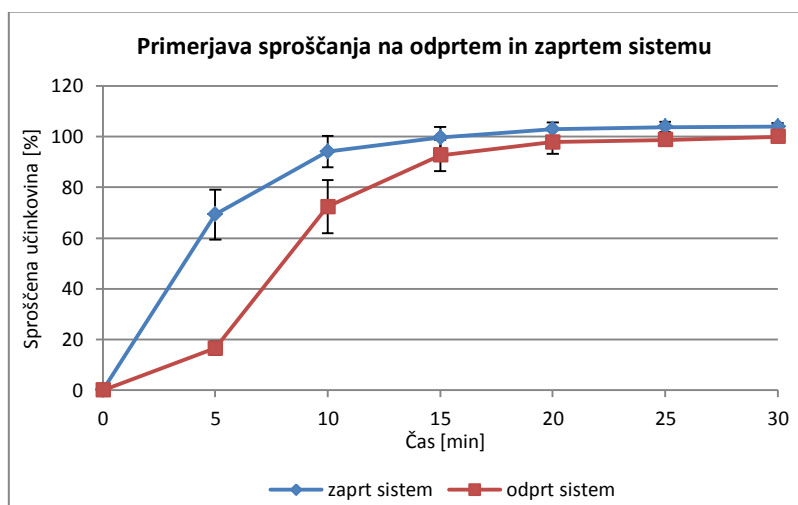
Graf 3: RSD vrednosti posamezne serije poskusov. Serije 1-4 so testirane na vzorcu A, med seboj se razlikujejo glede načina postavitve tablete in nadomeščanja medija. Serije 5, 6 in 7 so opravljene na drugi učinkovini (vzorci F, G in H), postavitvev tablete je bila usmerjena, medija nismo nadomeščali.

Za primerjavo smo izračunali tudi RSD vrednosti, dobljene pri ročnih testih sproščanja na aparaturi USP II. Za vzorec B znaša povprečje RSD vrednosti prvih štirih časovnih točk 4,9%, za vzorec E 2,8% in za referenco 3,2%. Glede na to, da dobljeni odstotki niso bistveno nižji od rezultatov, dobljenih na naši aparaturi, lahko trdimo, da tudi sproščanje na naši aparaturi pri uporabi zaprtega sistema daje zanesljive in ponovljive rezultate.

5.2 Optimizacija delovanja odprtega sistema

Z namenom primerjave zaprtega in odprtega sistema smo na odprtem sistemu s programom V_002_hitra (med razpravo uporabljamo tudi izraz hitrejši program), najprej analizirali sproščanje učinkovine iz vzorca A. Tablete smo v silikonsko vrečo vedno postavili usmerjeno. Tako smo lahko primerjali sproščanje učinkovine iz istega vzorca, kjer je bil edini spremenjen parameter uporaba sistema (zaprto/odprto). Za začetek smo si pri odprtem sistemu izbrali fiziološko relevanten pretok 2 g/min. Iz grafa 4 je razvidno, da se sproščanje iz vzorca bistveno razlikuje glede na uporabo sistema odprto/zaprto. Najverjetneje sta glavna razloga v spremenjenem vzorčenju in različni hidrodinamiki tekočin znotraj želodca.

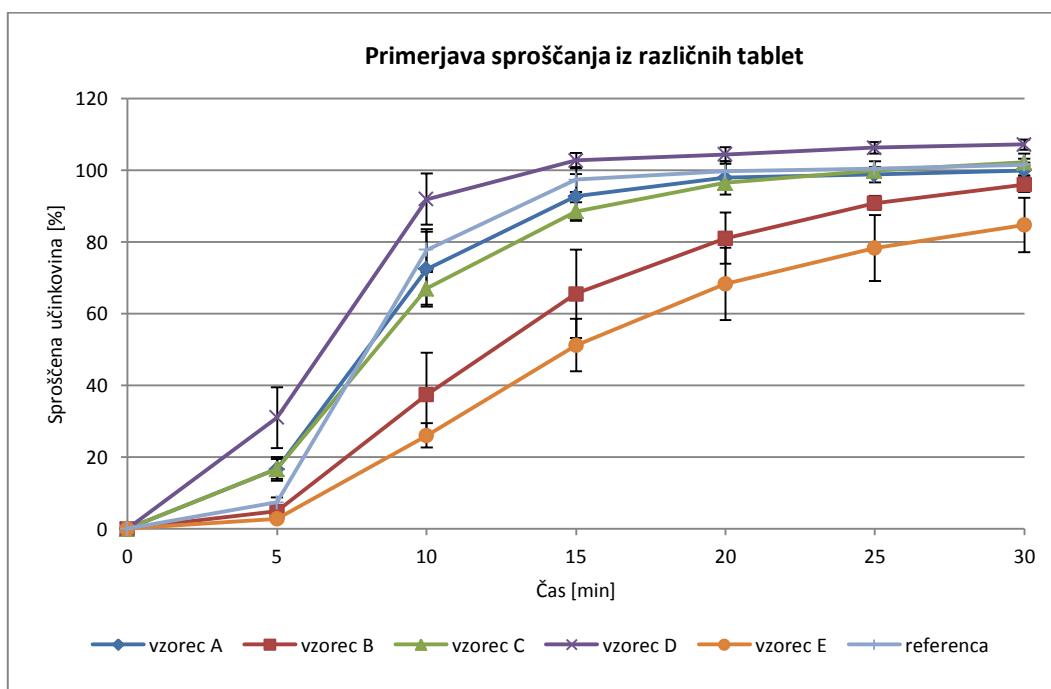
Pri zaprtem sistemu smo vzorčili s podaljšano kanilo v bližini male krivine želodca. Pri odprtem sistemu pa je vzorec skozi ventil, ki ponazarja pilorični sfinkter, iztekal na tehniko v čašo, iz katere smo posrkali vsebino preko kanile v brizgo. Pri odprtem sistemu je morala sproščena učinkovina preteči daljšo pot do mesta vzorčenja, kot pri zaprtem sistemu in to je bil najverjetneje razlog za navidezno počasnejše sproščanje učinkovine pri odprtem sistemu. Možna je tudi razlika v hidrodinamiki tekočin znotraj vreče. Odprtje ventila pri odprtem sistemu je potisnilo tekočino skozi simulirani pilorus in ustvarilo tok tekočine, medtem ko je bila pri zaprtem sistemu tekočina v večji meri potisnjena nazaj proti proksimalnemu delu želodca. To bi lahko bil razlog za boljše mešanje vsebine pri zaprtem sistemu in posledično hitrejšo sproščanje. Iz grafa 4 je razvidna razlika v hitrosti sproščanja pri uporabi zaprtega in odprtega sistema.



Graf 4: Razlika v hitrostih sproščanja iz vzorca A pri zaprtem sistemu (pretok 0 g/min) in odprtem sistemu (pretok 2g/min).

V sklopu optimizacije delovanja odprtega sistema smo analizirali tudi sproščanje iz vzorcev z različnimi lastnostmi in učinkovino X. Med seboj so se razlikovali po sili stiskanja oz. trdnosti, sestavi pomožnih snovi in tudi v formulaciji.

Najpočasnejše sproščanje imata vzorca B in E. Iz tabele 2 je razvidno, da je njuna trdnost podobna. Glede na to, da ima vzorec B v svoji sestavi večjo količino razgrajevala in manj veziva, je po pričakovanjih, da bo sproščanje zaradi hitrejšega razpada FO hitrejše kot pri vzorcu E. Sledi jima vzorec C, pri katerem je količina obloge manjša, kar je razlog za hitrejši vdor medija skozi oblogo in posledično za hitrejše sproščanje. Precej podoben profil vzorcu C ima vzorec A. Tudi po sestavi sta si vzorca zelo podobna. Majhna razlika je le v sili stiskanja. Po pričakovanjih ima vzorec A hitrejše sproščanje, saj je njegova trdnost manjša od vzorca C, kar mediju omogoči lažji vdor v notranjost FO in posledično hitrejši razpad. Najhitrejše sproščanje ima vzorec D. Poglavitna razlika pri vzorcu D, ki je najverjetneje odgovorna za najhitrejši profil, je ekstra-granularno razporejena učinkovina. Medij je s tako formulirano učinkovino prej v stiku kot pri intra-granularni formulaciji (vzorci A, B, C in E). Zaključimo lahko, da naša naprava z uporabo odprtega sistema smiselno razporedi vzorce z različnimi lastnostmi glede hitrosti sproščanja.

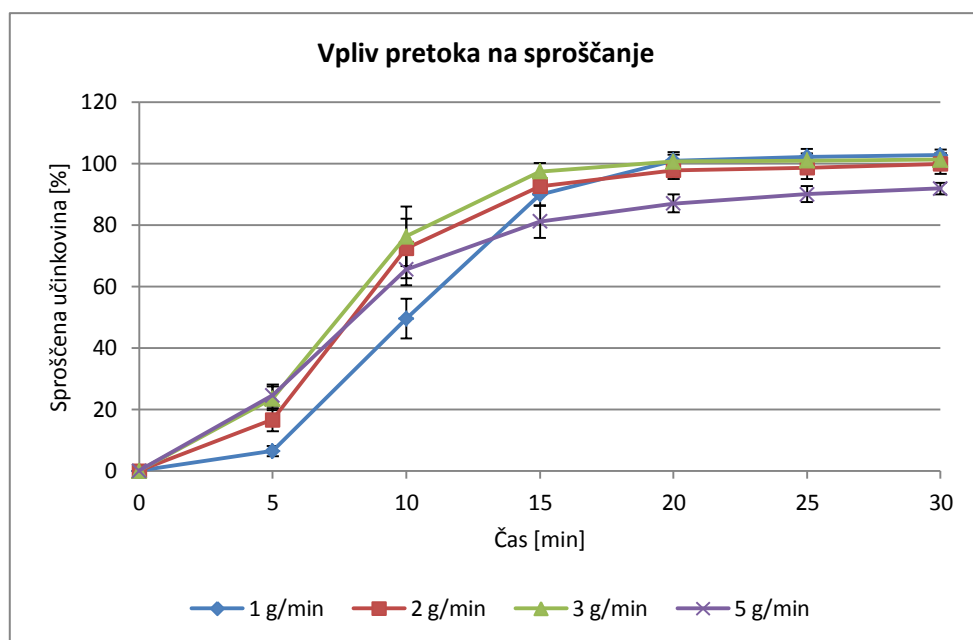


Graf 5: Sproščanje učinkovine iz vzorcev z različnimi lastnostmi na odprtem sistemu pri pretoku 2 g/min.

5.2.1 Vpliv spremembe pretoka na sproščanje

Aparatura za simuliranje želodčnega gibanja omogoča nastavitve različnih pretokov skozi ventil. Testiranje različnih pretokov je smiselno, saj tok vsebine skozi pilorični sfinkter *in vivo* ni konstanten. Pretok na tešče je odvisen od faze cikla MMC, v kateri je FO zaužita. Običajno pretok skozi pilorični sfinkter ne preseže vrednosti 2 mL/min, je pa Schindlbeck s sodelavci v fazi II MMC zaznal tudi vrednosti do 4 mL/min(17). Tudi pretok po hranjenju se običajno giblje nekje od 2-4 mL/min (4).

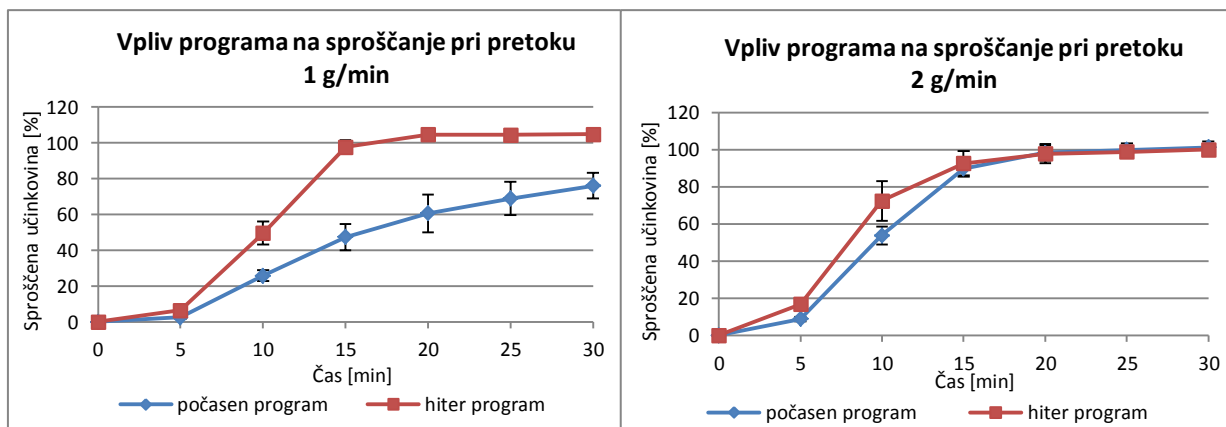
Za testiranje pretokov smo si zato izbrali fiziološko relevantne vrednosti 1, 2, 3 in skrajno vrednost 5 g/min. Vsi testi v sklopu preučevanja pretoka so bili opravljeni na vzorcu A. Bistvene razlike v sproščanju pri različnih pretokih so vidne predvsem v prvi časovni točki (5 min), ko se začne učinkovina sproščati iz tablete. Takrat mora prepotovati pot od mesta postavitve tablete do ventila oz. čaše. Večji kot je nastavljeni pretok, hitreje bo učinkovina difundirala do ventila in večji bo njen delež v prvi časovni točki (5 min). Trend krivulj za 1, 2 in 3 g/min je pričakovan. V prvi časovni točki je vidna razlika v hitrosti difundiranja do ventila, nadalje pa so krivulje razporejene po pričakovanju – najnižji pretok predstavlja spodnjo krivuljo in obratno. Pri pretoku 5 g/min smo pričakovali najhitrejše sproščanje. Do prve časovne točke je krivulja še po pričakovanjih, nadalje pa njena rast upada. Ker pri točki neskončno nismo dosegli 100 % deleža sproščene učinkovine, smo domnevali, da pretok 5 g/min že pomeni pomembno izgubljanje delcev neraztopljene učinkovine iz sistema. Pri vzorčenju smo namreč v čaši opazili večje neraztopljene delce, ki jih je bilo zaradi večjega volumna vzorčenja več kot pri nižjih pretokih. Da smo potrdili to domnevo, smo na enak način izvedli še en test, le da smo čaše s posameznimi frakcijami shranjevali, in jih na koncu prelili v čašo z vsebino vreče. Tako smo med seboj primerjali točko ∞ , ki je predstavljala vsebino vreče, in točko ∞' , ki je predstavljala vsebino vreče skupaj s posameznimi zbranimi frakcijami. Ker smo pri točki ∞' dosegli delež sproščene učinkovine blizu 100%, smo potrdili domnevo, da pretok 5 g/min že pomeni pomembno izgubljanje učinkovine iz sistema. Na grafu 6 so prikazane razlike v hitrostih sproščanja glede na nastavljeni pretok.



Graf 6: Sproščanje učinkovine iz vzorca A pri pretokih 1, 2, 3 in 5 g/min.

5.2.2 Vpliv hitrosti programa na sproščanje

Na vzorcu A smo preučevali vpliv hitrosti programa na sproščanje. Hitrost potovanja posameznega peristaltičnega vala in posledično število kontrakcij na minuto smo spreminjali z nastavitvijo periode na računalniškem programu. Pri nastavitvi hitrega programa (V_002_hitra) posamezen peristaltični val potuje 16 s, kar pomeni 3,8 kontrakcije/min. Počasen program (V_002_počasna) ima nastavev periode 26 s, kar pomeni 2,3 kontrakcije/min. V povprečju pa sta obe nastavitvi primerljivi s fiziološko frekvenco kontrakcij, ki znaša 2,4-3,6 kontrakcij/min (12). O amplitudi ter o silah kontrakcij zaenkrat še nimamo podatka, ali so v okviru fizioloških vrednosti. Vpliv hitrosti programa smo vrednotili pri dveh nastavitvah pretoka, 1 in 2 g/min, ki najbolje izkazuje fiziološke pogoje v stanju na tešče. Prišli smo do zaključkov, da ima hitrost programa pomembnejši vpliv pri manjšem pretoku skozi ventil. Manjši pretok pomeni počasnejše dogajanje znotraj vreče in s tem večji vpliv posameznih parametrov, v našem primeru števila kontrakcij, na sproščanje. Zaključimo lahko, da sproščanje znotraj naprave za posnemanje želodčnega gibanja najbolj upočasnimo s pretokom 1 g/min in počasnim programom, kar je pomembno pri izražanju razlik med vzorci s podobnimi lastnostmi. Na ta način bi lahko z našo aparaturo uspešneje ločili med vzorci, če bi bile prisotne le minimalne spremembe v sestavi oz. kvaliteti vzorca. Razlika v sproščanju pri nastavljenih različnih pretokih je vidna na grafu 7.



Graf 7: Razlika v sproščanju vzorca A pri pretoku 1 in 2 g/min pri nastavljenem počasnem in hitrem programu.

5.3 In Vitro - In Vivo korelacija

Za iskanje *in vitro-in vivo* korelacije bi bilo smiselno vzeti kinetično čim bolj različne formulacije, vendar smo imeli na voljo le podatke za vzorca B in E ter referenco. V farmakokinetični študiji je sodelovalo 13 ljudi, ki so na tešče izmenično prejeli vzorec B oz. E in referenco. Iz podatkov o maksimalni plazemski koncentraciji učinkovine (C_{max}) po zaužitju testne formulacije oz. reference lahko izračunamo razmerje v hitrosti sproščanja med izbrano tableto in referenco. Razmerja maksimalnih plazemskih koncentracij med vzorcem B oz. E in referenco ter razmerje med vzorcema E in B so podana v tabeli 13.

Tabela 13: Razmerje maksimalnih plazemskih koncentracij (C_{max}) med vzorcem B oz. E in referenco ter razmerje vzorca E in vzorca B.

Vzorec	Razmerje C_{max}
vzorec B / referenca	77,5 %
vzorec E / referenca	67,2 %
vzorec E / vzorec B	86,8 %

Iz dobljenih rezultatov vidimo, da se testna formulacija najverjetneje ne raztopi pravočasno, saj ima za približno 30 % nižjo doseženo maksimalno koncentracijo v primerjavi z referenco.

S testi sproščanja na naši napravi smo želeli dobiti čim boljše korelacijo z *in vivo* podatki. V ta namen smo testirali sproščanje iz vzorcev B, E in reference pri dveh različnih pogojih. Najprej smo testirali sproščanje s hitrim programom in pretokom 2 g/min, nato pa še s počasnim programom pri pretoku 1 g/min. Delež sproščene učinkovine v posamezni časovni točki za vzorca B in E smo delili z deležem sproščene učinkovine iz reference. Izračuni za sproščanje pri nastavljenem hitrem programu in pretoku 2 g/min so podani v

tabeli 14, za sproščanje pri počasnem programu in pretoku 1 g/min v tabeli 15 in za sproščanje pri napravi USP II pri tabeli 16.

Tabela 14: Razmerja med deležem sproščene učinkovine iz vzorcev B in E ter referenco in razmerje med vzorcema E in B pri nastavitvi **hitrega programa** in pretoka 2 g/min.

čas [min]	5	10	15	20	25	30	neskončno
vzorec B / referenca [%]	65,0	48,1	67,3	81,2	90,5	94,6	104,6
vzorec E / referenca [%]	38,2	33,4	52,6	68,5	77,9	83,5	88,9
vzorec E / vzorec B [%]	50,8	59,9	70,4	79,1	82,5	86,4	85,3

Tabela 15: Razmerja med deležem sproščene učinkovine iz vzorcev B in E ter reference in razmerje med vzorcema E in B pri nastavitvi **počasnega programa** in pretoka 1 g/min.

čas [min]	10	20	30	40	50	neskončno
vzorec B / referenca [%]	40,6	59,7	88,6	95,5	96,8	99,4
vzorec E / referenca [%]	37,2	41,3	63,3	78,5	83,9	94,6
vzorec E / vzorec B [%]	91,7	69,1	71,4	82,2	86,6	95,2

Tabela 16: Razmerja med deležem sproščene učinkovine iz vzorcev B in E ter referenco pri sproščanju na aparaturi **USP II**.

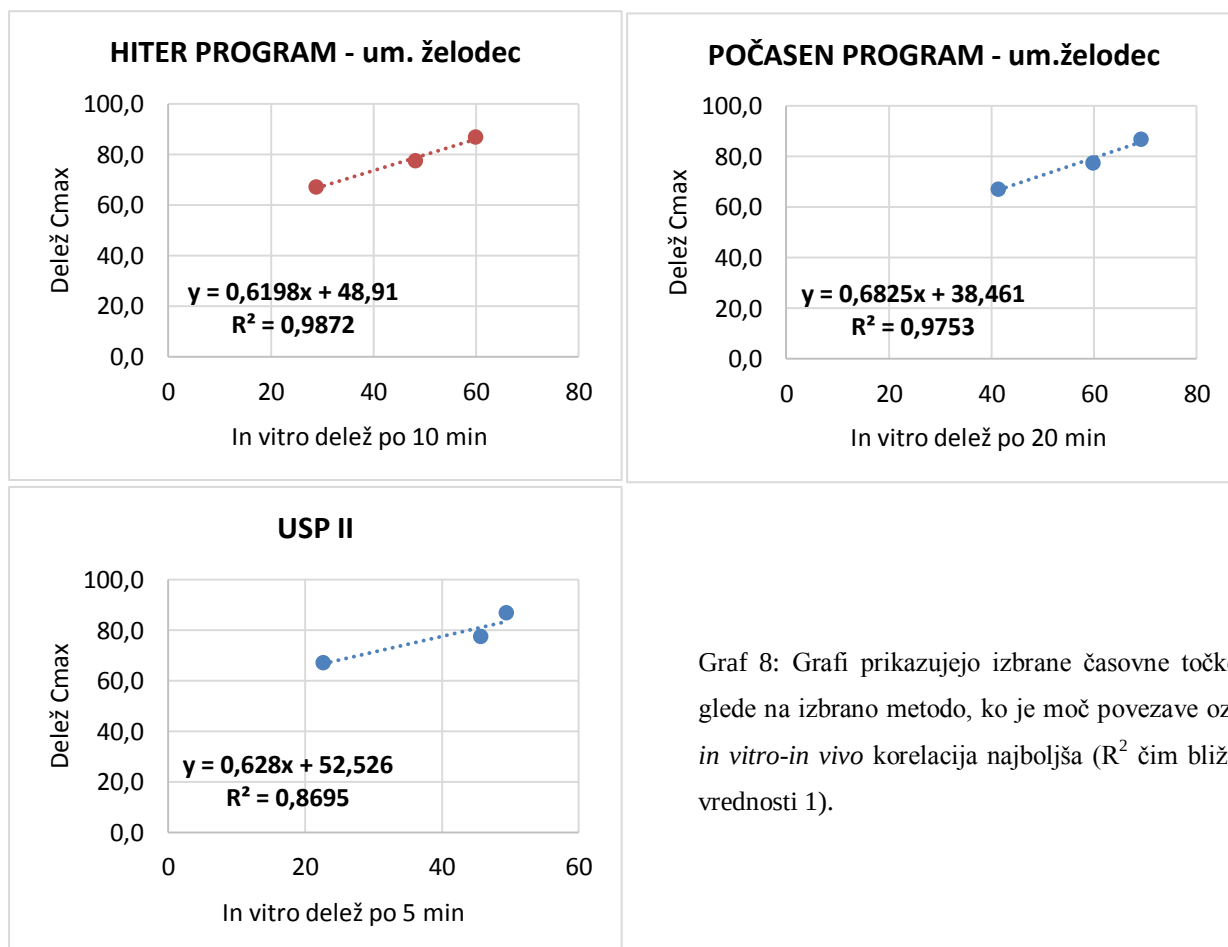
RAZMERJA	5	10	15	20	25	30	40	neskončno
vzorec B / referenca [%]	45,7	63,1	81,3	89,8	92,6	93,4	95,0	99,6
vzorec E / referenca [%]	22,6	38,5	52,8	64,8	76,3	84,8	91,3	97,1
vzorec E / vzorec B [%]	49,4	61,1	65,0	72,2	82,4	90,7	96,2	97,5

Z namenom iskanja korelacije med našim modelom in farmakopejsko napravo USP II z *in vivo* vrednostmi smo narisali več grafov. Na y-os smo nanašali *in vivo* vrednosti (77.5%, 67.2% in 86.8%, glej tabelo 13), na x-os pa *in vitro* vrednosti oz. razmerja in sicer za vsak model (hiter program, počasen program in USP II) za vsako časovno točko posebej. Na ta način smo dobili več premic s pripadajočimi vrednostmi R^2 . Bolj se vrednost determinacijskega koeficienta R^2 približa vrednosti 1, večja je moč povezave med vnešenimi x in y vrednostmi. Ko je vrednost R^2 enaka 1, to pomeni najboljšo napovedno moč oz. v tem primeru model izkazuje najboljšo korelacijo z *in vivo* podatki. Tabela 17 prikazuje vrednosti R^2 v različnih časovnih točkah pri uporabi hitrega in počasnega programa ter pri napravi USP II. Razvidno je, da je korelacija z *in vivo* podatki najboljša pri uporabi hitrega programa (pretok 2 g/min) in sicer v 10 min, kjer znaša 0,99. Hitremu programu sledi počasen program (pretok 1 g/min) pri 20 min, kjer je R^2 0,98. Najslabšo

korelacijo z *in vivo* podatki dobimo pri napravi USP II, kjer najboljša vrednost R^2 znaša 0,87. Vrednosti pri USP II v 30 in 40 min so označene z *, saj iskanje korelacije, ko je sproščene že 100% učinkovine ni smiselno. Časi, ko je dosežena najboljša korelacija z *in vivo* podatki so relativno kratki, kar lahko razložimo z dejstvom, da se čas, ko je dosežena maksimalna plazemska koncentracija (t_{max}) giba tudi v območju pod eno uro.

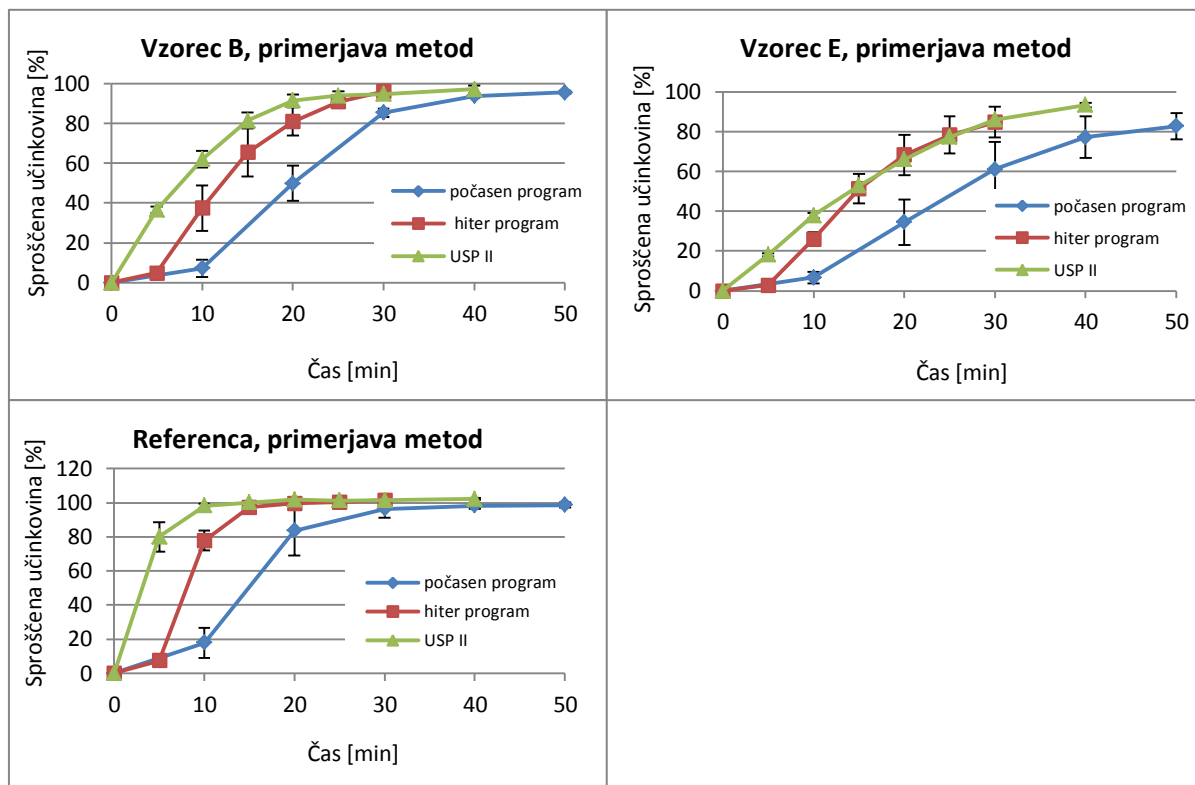
Tabela 17: Vrednosti koeficienta R^2 pri nastavitvi hitrega in počasnega programa na napravi za posnemanje želodčnega gibanja in pri napravi USP II.

čas (min)	R^2		
	hiter prog.	počasen prog.	USP II
5	0,33	/	0,87
10	0,99	0,78	0,71
15	0,87	/	0,20
20	0,67	0,98	0,10
25	0,27	/	0,15
30	0,15	0,11	0,48*
40	/	0,05	0,93*



Graf 8: Grafi prikazujejo izbrane časovne točke glede na izbrano metodo, ko je moč povezave oz. *in vitro-in vivo* korelacija najboljša (R^2 čim bliže vrednosti 1).

Dodan je graf 9, ki prikazuje razliko v hitrosti sproščanja pri uporabi hitrega in počasnega programa ter pri napravi USP II. Iz grafov je razvidno, da je sproščanje pri napravi USP II precej hitrejše kot pri napravi za posnemanje želodčnega gibanja.



Graf 10: Primerjava hitrosti sproščanja pri nastavitvi počasnega programa (pretok 1 g/min), hitrega programa (pretok 2 g/min) in sproščanja na aparaturi USP II (50 rpm) na vzorcih B, E in referenci.

Zaključimo lahko, da za izbrano farmacevtsko obliko tako v primeru hitrega kot počasnega programa z napravo za posnemanje želodčnega gibanja dobimo boljšo korelacijo z *in vivo* podatki kot z napravo USP II.

Glavne prednosti naprave za posnemanje želodčnega gibanja so povezane z obliko in velikostjo silikonske vreče. Ta s stiskanjem zaslonk povzroča peristaltične kontrakcije, za katere predvidevamo, da v notranjosti pozročijo *in vivo* relevantejšo hidrodinamiko kot vesla pri napravi USP II. Nadalje se z volumnom medija 250 mL, ki smo ga uporabili pri poskusih na naši napravi, bolj približamo dejanskemu fiziološkemu volumnu, ki na tešče znaša približno 50 mL, kot pri napravi USP II, kjer se večinoma uporabljajo volumni 900 mL. Glede na to, da se učinkovina v človeškem telesu absorbira šele v tankem črevesu, torej po prehodu skozi pilorični sfinkter, ima tudi v tem primeru uporaba odprtega sistema pri napravi za posnemanje želodčnega gibanja prednost pred običajnim vzorčenjem s

kanilo pri napravi USP II. Tako lahko z nastavitvijo ustreznega, *in vivo* relevantnega pretoka v izbrani časovni točki dobimo delež učinkovine, ki priteče skozi ventil, ki ponazarja pilorični sfinkter in ne zgolj delež raztopljene učinkovine znotraj posode. Pomembno je poudariti tudi, da test USP II še ni bil do konca optimiziran, in je tudi to razlog za prehitro sproščanje učinkovine.

Iz primerjave determinacijskih koeficientov R^2 vidimo, da ima najboljšo korelacijo z *in vivo* podatki uporaba hitrega programa in pretoka 2 g/min. Hiter program v povprečju na minuto naredi 3,7 kontrakcije, počasen program pa 2,3 kontrakcije na minuto. Običajno so za človeški želodec v stanju na tešče značilne 3 kontrakcije na minuto, njihova intenziteta pa se spreminja glede na stanje želodca. Pri hitrem programu smo uporabili pretok 2 g/min, ki predstavlja zgornjo mejo pretoka v stanju na tešče, pri počasnem programu pa 1 g/min, kakršen je povprečni pretok v stanju na tešče. Med poskusom nismo ponazarjali različnih faz cikla MMC. To pomeni, da intenzitete kontrakcij tretje faze cikla MMC nismo zajeli, in lahko da je to razlog, da je hiter program, z več krčenji na minuto in hitrejšim pretokom ustrežnejši, saj znotraj silikonskega želodca povzroči večje mešanje tekočin kot počasen program. K temu pripomore tudi dodajanje medija s črpalko, ki ponazarja izločanje želodčne kisline in pri hitrem programu znaša 2 mL/min, pri počasnem programu pa 1 mL/min. Tudi tu dodajanje medija s hitrostjo 2 mL/min predstavlja zgornjo mejo izločanja želodčne kisline v stanju na tešče.

Za nadaljnje raziskave z našo učinkovino je smiselno uporabiti hiter program s pretokom 2 g/min, podatke z maksimalnimi plazemskimi koncentracijami pa primerjati v 10 min testiranja.

5.4 Možnosti za dodatna testiranja

- Na odprtem sistemu smo preizkušali sproščanje pri dveh različnih nastavitvah hitrosti programa. Smiselno bi bilo tudi preučevanje sproščanja pri nastavitvi programa, ki posnema cikle MMC. Celoten sklop naprave za posnemanje želodčnega gibanja namreč omogoča kombiniranje različnih programov znotraj enega testa.
- Pri nastavitvi pretoka 1 g/min in počasnega programa se sproščanje iz vzorcev izrazito upočasni v primerjavi s sproščanjem na napravi USP II. Smiselno bi bilo najti vzorce, ki jih na napravi USP II med seboj ne moremo ločiti, kljub temu, da

imajo različne lastnosti. Te bi se lahko pri upočasnjem mešanju vsebine bolje izrazile in tako bi lahko potrdili eno od prednosti naše naprave pred drugimi.

- Gastrozistentne (GR) tablete ali tablete s podaljšanim sproščanjem (SR) se lahko v človeškem želodcu pod vplivom mehanskih sil že predhodno poškodujejo. Smiselno bi bilo preučevanje poškodbe GR in SR tablet v fiziološko relevantem mediju pri večjih nastavitvah amplitude in hitrostih krčenja silikonskega želodca.
- Na odprtem sistemu bi lahko preučevali prehod GR pelet skozi ventil. V kombinaciji s sestavljenim programom, ki posnema cikle MMC, bi lahko bolje pojasnili praznjenje pelet v bolusih.

6 SKLEP

H1: Usmerjena postavitev tablete pomeni boljšo ponovljivost rezultatov ✓

Ker so prvi poskusi na napravi za posnemanje želodčnega gibanja pokazali slabo ponovljivost eksperimentov, je bil poglobitni cilj zmanjšanje variabilnosti rezultatov. V sklopu tega smo na zaprtem sistemu (pretok 0 g/min) opravili teste z naključno in usmerjeno postavitvijo tablete. Prišli smo do zaključkov, da je variabilnost najmanjša, če tableto položimo usmerjeno med 6. in 7. zaslonko, ki ju vidimo iz notranjosti vreče in če za postavitev v vrečo uporabimo podaljšano pinceto. Med potekom testiranja smo preučevali tudi sproščanje iz minitabiet, ki smo jih prav tako usmerjeno s posebnim tulcem umestili v vrečo med 6. in 7. zaslonko.

H2: Posegi v vsebino vreče (nadomeščanje medija) med eksperimentom povečajo variabilnost rezultatov ✓

Pri preučevanju vpliva nadomeščanja medija smo prišli do zaključkov, da nadomeščanje medija poveča variabilnost rezultatov in zato je natančnejše testiranje brez nadomeščanja.

H3: Način vračanja medija vpliva na ponovljivost rezultatov ✓

V kolikor je po protokolu vračanje medija predpisano, priporočamo da se dodaja skozi kanilo počasi in sicer ob steni silikonskega želodca.

H4: Tudi pri odprtem sistemu lahko uspešno ločimo med različnimi vzorci ✓

Pri testih opravljenih na odprtem sistemu (pretok ≥ 1 g/min) smo dokazali, da lahko tudi pri pretoku skozi ventil uspešno ločimo med različnimi vzorci. Ko smo naredili primerjavo sproščanja iz istega vzorca pri uporabi zaprtega in odprtega sistema, smo ugotovili, da z odprtim sistemom upočasnimo sproščanje. Iz tega sledi, da bi lahko vzorce, ki med seboj izkazujejo minimalne razlike, uspešneje ločili z uporabo odprtega sistema.

H5: Večji pretok pri odprtem sistemu vodi v hitrejšo sproščanje ✓

Pri spreminjanju pretokov skozi želodec smo prišli do zaključkov, da je najbolj smiselna uporaba pretokov 1, 2 in 3 g/min, ki so tudi najbolj fiziološko relevantni. Pri pretoku 5 g/min v točki neskončno nismo dosegli 100% sproščene učinkovine. S poskusnim testom, pri katerem smo v končno raztopino (točka neskončno) prelili posamezne frakcije, ki smo jih zbirali med vzorčenji, smo se prepričali, da se pri pretoku 5 g/min že pozna izgubljanje neraztopljenih učinkovine iz želodca, kar je razlog za nižji delež sproščene učinkovine.

Sprememba pretoka (1, 2 in 3 g/min) ni signifikantno vplivala na hitrost sproščanja učinkovine med testom, je pa pomembna razlika v prvi časovni točki. Tako smo zaključili, da s spreminjanjem pretoka vplivamo predvsem na hitrost potovanja učinkovine od mesta postavitve FO do ventila, ko učinkovina še ni porazdeljena po vreči želodca.

H6: Večja perioda med posamičnimi peristaltičnim valovi bo vodila v počasnejše sproščanje ✓

Pri spreminjanju hitrosti programa oz. periode lahko zaključimo, da je vpliv hitrosti programa pomembnejši pri pretoku 1 g/min, kot pri pretoku 2 g/min. Sproščanje iz vzorca lahko najbolj upočasnimo s počasnim programom in pretokom 1 g/min, in s tem dosežemo največjo ločbo med vzorci.

H7: Sproščanje na napravi za posnemanje želodčnega gibanja bo počasnejše kot pri USP II ✓

Tako počasen kot hiter program na napravi za posnemanje želodčnega gibanja sta pri testiranih vzorcih povzročila počasnejše sproščanje kot na napravi USP II, pri 50 rpm.

H8: Z napravo za posnemanje želodčnega gibanja bomo uspeli doseči boljšo in vitro-in vivo korelacijo kot pri napravi USP II ✓

Pri preučevanju *in vitro-in vivo* korelacije smo prišli do zaključkov, da naprava za posnemanje želodčnega gibanja daje boljšo korelacijo z *in vivo* podatki kot naprava USP II. Koeficientu $R^2=1$ smo se najbolj približali z vrednostjo 0,99, in sicer pri uporabi hitrega programa, kjer je pretok skozi ventil znašal 2 g/min. Pri teh nastavitvah bi bila napovedna moč *in vivo* podatkov najboljša v 10 min testiranja. Temu sledi počasen program s pretokom 1 g/min, in sicer ima najvišjo vrednost R^2 (0,98) v 20 min. Najslabšo korelacijo smo dobili pri testiranju na napravi USP II, in sicer je vrednost R^2 v 5 min testiranja znašala 0,87. Razlogi za boljšo korelacijo pri napravi za posnemanje želodčnega gibanja z *in vivo* podatki so povezani z obliko vreče, ki je bolj podobna človeškemu želodcu kot steklena posoda farmakopejskih naprav za sproščanje. Pomembna parametra sta še manjši volumen medija in fiziološko relevantejša hidrodinamika znotraj silikonske vreče. Tudi nastavitev pretoka skozi silikonski želodec, ki omogoči detekcijo učinkovine, ki priteče skozi ventil oz. simulirani pilorični sfinkter in ne zgolj učinkovine znotraj lumna, je pomembna prednost naprave za posnemanje želodčnega gibanja.

7 LITERATURA

1. Pocock G, Richards CD. Human physiology: the basis of medicine. Oxford ; New York: Oxford University Press; 1999. 393-409 str. (Oxford medical publications).
2. Štiblar-Martinčič D, Cvetko E, Cör A, Marš T, Finderle Ž. Anatomija, histologija, fiziologija. Ljubljana: Medicinska fakulteta; 2012. 150-168 str.
3. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. Pharm Res. januar 1998.;15(1):11–22.
4. Koziolk M, Garbacz G, Neumann M, Weitschies W. Simulating the postprandial stomach: physiological considerations for dissolution and release testing. Mol Pharm. 6. maj 2013.;10(5):1610–22.
5. Dajčman D. Osnove fiziologije želodca. Med Meseč. 2005(5):21–8.
6. Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. 771-825 str.
7. Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS. Human physiology: the mechanism of body function. Boston, Mass.: WCB McGraw-Hill; 1998. 557-582 str.
8. Hellström PM, Grybäck P, Jacobsson H. The physiology of gastric emptying. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. september 2006.;20(3):397–407.
9. Mudie DM, Amidon GL, Amidon GE. Physiological parameters for oral delivery and in vitro testing. Mol Pharm. 4. oktober 2010.;7(5):1388–405.
10. Shargel L, Yu ABC, Wu-Pong S. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2012. 364-377 str.
11. Marciani L, Young P, Wright J, Moore R, Coleman N, Gowland PA, idr. Antral motility measurements by magnetic resonance imaging. Neurogastroenterol Motil. oktober 2001.;13(5):511.

12. Collard JM, Romagnoli R. Human stomach has a recordable mechanical activity at a rate of about three cycles/minute. *Eur J Surg Acta Chir.* 2001.;167(3):188–94.
13. Krese A, Mrhar A, Bogataj M. Vpliv motilitete želodca na prehod farmacevtskih oblik. *Farm Vestn.* 2016(67):242–7.
14. Camilleri M. Integrated Upper Gastrointestinal Response to Food Intake. *Gastroenterology.* 2006.;131(2):640–58.
15. Baumgartner S. Vpliv gibanja prebavnega trakta na potovanje farmacevtske oblike in absorpcijo učinkovine. *Farm Vestn.* 2003(54):537–81.
16. Gastrointestinal Motility, Ehrlein HJ and Schemann M [Internet]. [citirano 20. junij 2016.]. Dostopno: <http://humanbiology.wzw.tum.de/motvid01/tutorial.pdf>
17. Schindlbeck NE, Heinrich C, Müller-Lissner SA. Relation between fasting antroduodenal motility and transpyloric fluid movements. *Am J Physiol.* avgust 1989.;257(2 Pt 1):G198-201.
18. Kong F, Singh RP. Disintegration of solid foods in human stomach. *J Food Sci.* junij 2008.;73(5):R67-80.
19. Krishna R, Yu L. Biopharmaceutics applications in drug development. New York: Springer; 2008. 396 str.
20. 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 J Eur Fed Pharm Sci.* 2014.;57:342–66.
21. Klančar U, Legen I, Kristl A, Mrhar A. „In vitro-in vivo“ korelacija (IVIVC) za učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem, ki se intenzivno metabolizirajo ali absorbirajo s prenašalci v prebavilih. *Farm Vestn.* 2010(61):162–70.
22. Cardot JM, Beyssac E, Alric M. In Vitro-In Vivo Correlation: Importance of Dissolution in IVIVC. *Dissolution Technol.* Februar 2007:15–9.

23. 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.
24. Sako K, Sawada T, Nakashima H, Yokohama S, Sonobe T. Influence of water soluble fillers in hydroxypropylmethylcellulose matrices on in vitro and in vivo drug release. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2002.;81(1–2):165–72.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Bogataj M, Cof G, Mrhar A. Development of a glass-bead device for dissolution testing. *Dissolution Technol.* 2015.;(3):18.
29. 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.
30. Vardakou M, Mercuri A, Barker SA, Craig DQM, Faulks RM, Wickham MSJ. Achieving antral grinding forces in biorelevant in vitro models: comparing the USP dissolution apparatus II and the dynamic gastric model with human in vivo data. *AAPS PharmSciTech.* 2011.;12(2):620–6.
31. 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.

32. Brouwers J, Anneveld B, Goudappel G-J, Duchateau G, Annaert P, Augustijns P, idr. Food-dependent disintegration of immediate release fosamprenavir tablets: in vitro evaluation using magnetic resonance imaging and a dynamic gastrointestinal system. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2011.;77(2):313–9.
33. Kong F, Singh RP. A human gastric simulator (HGS) to study food digestion in human stomach. *J Food Sci*. 2010.;75(9):E627-635.
34. Guerra A, Denis S, le Goff O, Sicardi V, François O, Yao A-F, idr. Development and validation of a new dynamic computer-controlled model of the human stomach and small intestine. *Biotechnol Bioeng*. junij 2016.;113(6):1325–35.
35. Legen I, Bevc A, Berglez S et al. Apparatus for simulating the function of human stomach and/or human intestine. Patent WO 2015086769 A1, 2015.
36. Diaci J, Kuščer L, Pavlovič U, Jenko M, Finkšt T, Klep D, idr. Umetni želodec, razvoj in realizacija prototipa (interno gradivo). Ljubljana: Fakulteta za strojništvo; 2011.