

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Ivana R. Kurćubić

**MUKOADHEZIVNE BUKALNE  
TABLETE I FILMOVI SA  
PROPRANOLOL-HIDROHLORIDOM:  
FORMULACIJA, *IN VITRO*/*IN SILICO*  
KARAKTERIZACIJA I *IN VIVO* ISPITIVANJA U  
ANIMALNOM MODELU ESENCIJALNE  
HIPERTENZIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**FACULTY OF PHARMACY**

Ivana R. Kurćubić

**MUCOADHESIVE BUCCAL  
TABLETS AND FILMS WITH  
PROPRANOLOL HYDROCHLORIDE:  
FORMULATION, *IN VITRO/IN SILICO*  
CHARACTERIZATION AND *IN VIVO* STUDIES IN  
AN ANIMAL MODEL OF ESSENTIAL  
HYPERTENSION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

## **Mentori**

---

Dr sc. Jelena Đuriš, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Una-Jovana Vajić, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu - Institut za medicinska istraživanja,  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

## **Članovi komisije**

---

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

---

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

---

Dr sc. Nevena Mihailović-Stanojević, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu - Institut za medicinska istraživanja  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

**Datum odbrane** \_\_\_\_\_

# Zahvalnica

Posebnu zahvalnost dugujem mentorima prof. dr Jeleni Đuriš i dr sc. Uni-Jovani Vajić na nesebičnom angažovanju, pruženim korisnim savetima, celokupnoj pomoći i podršci, kako tokom objavljivanja publikacija, tako i tokom realizacije same disertacije. Zahvalna sam im na ljudskosti i profesionalnom pristupu. Želim da istaknem zahvalnost prof. dr Sandri Cvijić na pomoći oko realizacije *in silico* modelovanja i simulacija, kao i svim korisnim sugestijama i stručnim savetima u oblikovanju ove disertacije. Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Milkici Crevar u realizaciji određivanja lekovite supstance iz uzoraka plazme i prof. dr Nataši Bogavac-Stanojević na pomoći i korisnim savetima u oblasti statističke analize.

Zahvaljujem se mnogo i svim kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju na kolegijalnoj podršci i razumevanju. Grupi za kardiovaskularnu fiziologiju Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu želim da iskažem veliku zahvalnost za pomoć u realizaciji dela disertacije koji se odnosi na ispitivanja na laboratorijskim životinjama. To su dr sc. Zoran Miloradović, dr sc. Nevena Mihailović-Stanojević, dr sc. Danijela Karanović i dr sc. Milan Ivanov.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici za beskrajnu podršku, razumevanje i ljubav, bez kojih nikada ne bih bila ono što danas jesam. Srećna, zadovoljna i zahvalna što ste deo mog života.

*Ovu doktorsku disertaciju, sa blagodarnošću, posvećujem svojim roditeljima, Ljilji i Ratku.*

U Beogradu, 2024. godine

Ivana Kurćubić

## SAŽETAK

Jedan od ciljeva farmaceutsko-tehnološkog razvoja je pronalaženje postupka prevodenja dobro poznate lekovite supstance u farmaceutski oblik leka koji obezbeđuje poboljšanje biološke raspoloživosti i terapijske efikasnosti, kao i redukciju neželjenih efekata leka. Razvoj intraoralnih farmaceutskih oblika lekova, je atraktivna strategija za proizvođače lekova zbog nižih troškova, kraćeg trajanja razvoja i smanjene incidence neuspeha razvoja lekovitih preparata. Jedna od strategija je razvoj intraoralnih, konkretno mukoadhezivnih bukalnih farmaceutskih oblika lekova koji su pogodni za starije pacijente koji imaju poteškoća sa gutanjem, kao i za pedijatrijsku populaciju pacijenata, ostvarujući sistemski ili lokalni efekat. Ovakav put primene je pogodan za lekovite supstance koji podležu intenzivnom presistemskom metabolizmu. Iako propranolol-hidrohlorid postoji više od 50 godina na svetskom tržištu u formi različitih farmaceutskih oblika za peroralnu primenu, stalno istraživanje i razvoj novih farmaceutskih oblika je posledica nepovoljnog farmakokinetičkog profila (npr. niska biološka raspoloživost zbog obimnog presistemskog metabolizma, kratko poluvreme eliminacije).

Stoga je sveobuhvatni cilj ove doktorske disertacije bio razvoj mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova sa modifikovanim (produženim) oslobađanjem propranolol-hidrohlorida kroz opsežnu, farmaceutsko-tehnološku i biofarmaceutsku karakterizaciju, *in vivo* procenu obima i brzine apsorpcije propranolol-hidrohlorida i hemodinamskih efekata u modelu primarne (esencijalne) hipertenzije kod spontano hipertenzivnih pacova *Okamoto-Aoki* soja, do *in silico* predviđanja apsorpcije propranolol-hidrohlorida kod ljudi nakon primene mukoadhezivnih bukalnih farmaceutskih oblika lekova.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je metodom direktne kompresije moguće dobiti mukoadhezivne bukalne tablete, odnosno metodom izlivanja mukoadhezivne bukalne filmove koji poseduju odgovarajuća mehanička i mukoadhezivna svojstva, sa produženim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida. Obim apsorpcije propranolol-hidrohlorida, izraženo kao PIK vrednost, nakon intraoralne (bukalne) primene u formi mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova kod spontano hipertenzivnih pacova propranolol-hidrohlorida bio je 2,5 puta veći u odnosu na peroralnu primenu tableta sa trenutnim oslobađanjem u istoj dozi. Drugim rečima, primenom mukoadhezivnih bukalnih farmaceutskih oblika lekova ostvaruje se veća izloženost organizma leku. Takođe, mukoadhezivni bukalni farmaceutski oblici lekova pokazali su sporiju apsorpciju lekovite supstance, tj. duže vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije lekovite supstance u plazmi, bez statistički značajne razlike u maksimalnoj koncentraciji lekovite supstance u plazmi u odnosu na tablete sa trenutnim oslobađanjem za peroralnu primenu. Analiza hemodinamskih parametara je pokazala da je, u poređenju sa tabletom sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida, mukoadhezivni bukalni film postigao značajno niže vrednosti frekvence srčanih kontrakcija u 8-om i 12-om satu ispitivanja. Nije otkrivena statistički značajna razlika u vrednostima hemodinamskih parametara između tretmana mukoadhezivnim bukalnim filmom i tabletom. *In silico* rezultati simulacija apsorpcije propranolola iz pripremljenih mukoadhezivnih bukalnih farmaceutskih oblika ukazuju da se nakon primene ispitivanih formulacija može očekivati povećanje obima apsorpcije i biološke raspoloživosti propranolol-hidrohlorida kod ljudi u poređenju sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem za peroralnu primenu.

**Ključne reči:** mukoadhezivni bukalni farmaceutski oblici; modifikovano oslobađanje; esencijalna hipertenzija; spontano hipertenzivni pacovi; hemodinamski parametri; farmakokinetički parametri; *in silico* modelovanje apsorpcije lekova; *OCCAT<sup>TM</sup>*; propranolol-hidrohlorid

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija

## ABSTRACT

One of the goals of pharmaceutical-technological development is to find a procedure for translating a well-known drug substance into a drug dosage form that ensures the improvement of biological availability and therapeutic efficiency, as well as the reduction of drug side effects. Development of intraoral drug dosage forms is an attractive strategy for drug manufacturers due to lower costs, shorter development times, and a reduced incidence of drug development failures. One of the strategies is the development of intraoral, specifically mucoadhesive buccal pharmaceutical forms of drugs that are suitable for elderly patients who have difficulty swallowing, as well as for the pediatric patient population, achieving a systemic or local effect. This route of administration is suitable for drug substances that are subject to intensive presystemic metabolism. Although propranolol hydrochloride has been on the world market for more than 50 years in the various dosage forms for oral administration, the constant research and development of new pharmaceutical forms is a consequence of an unfavorable pharmacokinetic profile (eg low bioavailability due to extensive presystemic metabolism, short elimination half-life).

Therefore, the overarching goal of this doctoral dissertation was the development of mucoadhesive buccal tablets and films with modified (prolonged) propranolol hydrochloride release through extensive, pharmaceutical-technological and biopharmaceutical characterization, *in vivo* evaluation of the extent and rate of absorption of propranolol hydrochloride and hemodynamic effects in a model of primary (essential) hypertension in spontaneously hypertensive Okamoto-Aoki strain rats, to *in silico* prediction of propranolol-hydrochloride absorption in humans after administration of mucoadhesive buccal dosage forms.

The results of this doctoral dissertation indicate that it is possible to obtain mucoadhesive buccal tablets using the direct compression method, or mucoadhesive buccal films using the solvent casting method with the appropriate mechanical and mucoadhesive properties, with a prolonged propranolol hydrochloride release. The extent of propranolol hydrochloride absorption after intraoral (buccal) administration in the form of mucoadhesive buccal tablets and films in spontaneously hypertensive rats showed a 2.5 times higher degree of absorption of propranolol hydrochloride, expressed as a AUC value, compared to oral administration of immediate-release tablets in the same dose. In other words, by applying mucoadhesive buccal drug dosage forms, greater exposure of the organism to the drug is achieved. Also, mucoadhesive buccal drug dosage forms showed slower drug absorption, i.e. longer time needed to reach the maximum drug concentration in the plasma, without a statistically significant difference in the maximum drug concentration compared to the immediate-release tablets intended for peroral administration. Analysis of hemodynamic parameters showed that, compared to the propranolol hydrochloride immediate-release tablet, the mucoadhesive buccal film achieved significantly lower heart rate values at the 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> hours of the study. No statistically significant difference was observed in the values of hemodynamic parameters between treatment with mucoadhesive buccal film and tablet. *In silico* simulation results of the propranolol absorption from prepared mucoadhesive buccal dosage forms indicate that following administration of the tested formulations, an increase in the extent of absorption and bioavailability of propranolol hydrochloride in humans can be expected compared to immediate-release tablets for peroral administration.

**Keywords:** mucoadhesive buccal dosage forms; modified release; essential hypertension; spontaneously hypertensive rats; hemodynamic parameters; pharmacokinetic parameters; *in silico* modeling of drug absorption; OCCAT<sup>TM</sup>; propranolol hydrochloride

**Scientific field:** Pharmacy

**Specific scientific field:** Pharmaceutical technology

# SADRŽAJ

<b>1 Uvod</b>	1
1.1 Propranolol-hidrochlorid	2
1.1.1 Mehanizam delovanja	2
1.1.2 Biofarmaceutske osobine	4
1.1.3 Farmakokinetičke osobine	5
1.2 Preparati za oralnu sluzokožu	8
1.2.1 Klasifikacija preparata za oralnu sluzokožu	8
1.2.2 Mukoadhezivni bukalni filmovi i mukoadhezivne bukalne tablete	9
1.3 Mukoadhezija	10
1.4 Ekscipijensi za izradu mukoadhezivnih bukalnih filmova metodom izlivanja	11
1.5 Proizvodnja/izrada mukoadhezivnih bukalnih filmova	14
1.6 QbD pristup u razvoju mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova	16
1.7 Karakterizacija mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova	22
1.7.1 Brzina rastvaranja lekovite supstance iz mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova	22
1.7.2 Raspadljivost mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova	27
1.7.3 Određivanje sadržaja i ispitivanje ujednačenosti sadržaja propranolol-hidrochlorida	28
1.7.4 Mehanička svojstva mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova	28
1.7.5 Morfologija površine mukoadhezivnih bukalnih filmova i procena kompatibilnosti lekovite supstance i ekscipijenas	31
1.7.6 Sadržaj vode	31
1.7.6.1 Rezidualni sadržaj vode	31
1.7.6.1 Apsorpcija vode	31
1.7.7 Određivanje mukoadhezije	32
1.7.8 Permeabilnost lekovite supstance iz mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova	35
1.8 Hipertenzija i animalni modeli hipertenzije	39
1.8.1 Etiologija hipertenzije	39
1.8.2 Učestalost hipertenzije	40
1.8.3 Faktori rizika povezani sa hipertenzijom i njene komplikacije	40
1.8.4 Ciljevi lečenja hipertenzije	41
1.8.5 Mehanizam dejstva $\beta$ -blokatora	43
1.8.5.1 Uticaj $\beta$ -blokatora na srce	44
1.8.5.2 Uticaj $\beta$ -blokatora na krvne sudove	44
1.8.6 Terapijske indikacije $\beta$ -blokatora	45
1.8.6.1 Hipertenzija	45
1.8.6.2 Angina pectoris i infarkt miokarda	46
1.8.6.3 Aritmije	46
1.8.6.4 Srčana insuficijencija	46
1.8.7 Neželjeni efekti $\beta$ -blokatora i kontraindikacije	47
1.8.8 Animalni modeli hipertenzije	47

1.8.8.1	Merenje krvnog pritiska kod eksperimentalnih životinja	50
1.8.8.2	Patogeneza esencijalne hipertenzije kod SHR pacova	51
1.9	Fiziološki zasnovani farmakokinetički modeli	51
1.9.1	Prostorni model apsorpcije i transporta lekovite supstance kroz usnu duplju	52
1.9.2	Unapređen prostorni model apsorpcije i transporta lekovite supstance kroz GI trakt	52
<b>2</b>	<b>Cilj</b>	<b>53</b>
2.1.	Ciljevi istraživanja	54
<b>3</b>	<b>Eksperimentalni deo</b>	<b>55</b>
3.1.	Izrada i ispitivanje mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova	56
3.1.1	Materijali	56
3.1.2	<b>Metode prve faze eksperimentalnog rada</b>	<b>56</b>
3.1.2.1	Primena D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše	56
3.1.2.2	Izrada mukoadhezivnih bukalnih tableta	58
3.1.2.3	Izrada placebo formulacija mukoadhezivnih bukalnih filmova	58
3.1.2.4	Procena kompatibilnosti lekovite supstance i ekscipijenasasa	59
3.1.2.5	Ispitivanje variranja mase mukoadhezivnih bukalnih tableta	59
3.1.2.6	Ispitivanje ujednačenosti sadržaja lekovite supstance u mukoadhezivnim bukalnim tabletama	59
3.1.2.7	Ispitivanje friabilnosti mukoadhezivnih bukalnih tableta	60
3.1.2.8	Ispitivanje zatezne čvrstine i debljine tableta	60
3.1.2.9	Ispitivanje stepena apsorpcije medijuma	60
3.1.2.10	Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava tableta	61
3.1.2.11	Ispitivanje brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta	62
3.1.2.12	Poređenje profila brzine rastvaranje propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta model-nezavisnom i model-zavisnom analizom	63
3.1.2.13	Ispitivanje brzine permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta	65
3.1.2.14	Definisanje ciljanog profila kvaliteta proizvoda i identifikovanje kritičnih atributa kvaliteta mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova	66
3.2	<b>Metode druge faze eksperimentalnog rada</b>	<b>72</b>
3.2.1	Izrada mukoadhezivnih bukalnih tableta	72
3.2.2	Izrada mukoadhezivnih bukalnih filmova	72
3.2.3	Fizičko-hemijska i farmaceutsko-tehnološka karakterizacija mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova	73
3.2.3.1	Procena kompatibilnosti lekovite supstance i ekscipijenasasa	73
3.2.3.2	Ispitivanje variranja mase mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova	73
3.2.3.3	Ispitivanje ujednačenosti sadržaja lekovite supstance u mukoadhezivnim bukalnim tabletama i filmovima	73
3.2.3.4	Ispitivanje friabilnosti i zatezne čvrstine mukoadhezivnih bukalnih tableta	74
3.2.3.5	Ispitivanje mehaničkih svojstava mukoadhezivnih bukalnih filmova	74



3.2.3.6	Ispitivanje stepena apsorpcije medijuma mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova .....	75
3.2.3.7	Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava tableta i filmova .....	75
3.2.3.8	Ispitivanje brzine rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida .....	77
3.2.3.9	Morfologija površine mukoadhezivnih bukalnih filmova .....	77
<b>3.3</b>	<b>Metode treće faze eksperimentalnog rada .....</b>	<b>78</b>
3.3.1	<i>In vivo</i> ispitivanje hemodinamskih efekata na pacovima <i>Okamoto-Aoki</i> soja .....	78
3.3.1.1	Eksperimentalni protokol .....	78
3.3.1.2	Merenje hemodinamskih parametara.....	80
3.3.1.3	Statistička analiza .....	81
3.3.1.4	Određivanje sadržaja propranolol-hidrohlorida u uzorcima plazme primenom LC–MS/MS metode .....	82
3.3.1.5	<i>In vivo</i> ispitivanje farmakokinetike propranolol-hidrohlorida iz izrađenih mukoadhezivnih farmaceutskih oblika lekova na pacovima <i>Okamoto-Aoki</i> soja .....	82
<b>3.4</b>	<b>Metode četvrte faze eksperimentalnog rada .....</b>	<b>83</b>
3.4.1	Razvoj, validacija i primena <i>in silico</i> fiziološki zasnovanog modela za predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola iz mukoadhezivnih bukalnih farmaceutskih oblika.....	83
<b>4</b>	<b>Rezultati i diskusija .....</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Rezultati i diskusija prve faze istraživanja .....</b>	<b>88</b>
4.1.1	Fizičko-hemijska i farmaceutsko-tehnološka karakterizacija mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova .....	88
4.1.1.1	Procena kompatibilnosti lekovite supstance i ekscipijenas.....	88
4.1.1.2	Organoleptička ispitivanja polimernih disperzija i uzoraka pripremljenih mukoadhezivnih bukalnih filmova .....	92
4.1.1.3	Ispitivanje morfologije površine mukoadhezivnih bukalnih filmova .....	94
4.1.1.4	Ispitivanje variranja mase i debljine mukoadhezivnih bukalnih tableta .....	97
4.1.1.5	Ispitivanje ujednačenosti sadržaja propranolol-hidrohlorida u mukoadhezivnim bukalnim tabletama .....	97
4.1.1.6	Ispitivanje friabilnosti i zatezne čvrstine mukoadhezivnih bukalnih tableta .....	97
4.1.1.7	Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava mukoadhezivnih bukalnih tableta .....	99
4.1.1.8	Ispitivanje brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta .....	99
4.1.1.9	Poređenje profila brzine rastvaranje propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta model-zavisnom i model-nezavisnom analizom .....	102
4.1.1.10	Ispitivanje brzine permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta .....	108
<b>4.2</b>	<b>Rezultati i diskusija druge faze istraživanja .....</b>	<b>110</b>
4.2.1	Ispitivanje variranja mase mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova i ujednačenosti sadržaja propranolol-hidrohlorida u mukoadhezivnim bukalnim tabletama i filmovima .....	110
4.2.2	Ispitivanje friabilnosti i zetezne čvrstine mukoadhezivnih bukalnih tableta .....	110
4.2.3	Ispitivanje mehaničkih svojstava mukoadhezivnih bukalnih filmova .....	110
4.2.4	Ispitivanje stepena apsorpcije medijuma .....	112

4.2.5 Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova .....	113
4.2.6 Ispitivanje brzine rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta .....	114
4.2.7 Ispitivanje brzine rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih filmova .....	117
<b>4.3 Rezultati i diskusija treće faze istraživanja .....</b>	<b>121</b>
4.3.1 <i>In vivo</i> ispitivanje hemodinamskih parametara na spontano hipertenzivnim pacovima Okamoto-Aoki soja .....	121
4.3.2 <i>In vivo</i> ispitivanje farmakokinetike propranolol-hidrohlorida na spontano hipertenzivnim pacovima Okamoto-Aoki soja .....	130
<b>4.4 Rezultati i diskusija četvrte faze istraživanja .....</b>	<b>133</b>
4.4.1 Razvoj i validacija <i>in silico</i> fiziološki zasnovanog modela za predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola .....	134
4.4.2 Primena <i>in silico</i> fiziološki zasnovanog modela za predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola iz mukoadhezivnih bukalnih formulacija .....	136
4.4.2.1 Predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola iz dvoslojnih mukoadhezivnih bukalnih tableta .....	136
4.4.2.2 Predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola iz mukoadhezivnih bukalnih tableta .....	139
4.4.2.3 Predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola iz mukoadhezivnih bukalnih filmova .....	140
4.4.3 Analiza glavnih komponenata (PCA) karakteristika mukoadhezivnih bukalnih tableta .....	143
4.4.4 Analiza glavnih komponenata (PCA) karakteristika mukoadhezivnih bukalnih filmova .....	147
<b>5 Zaključak .....</b>	<b>151</b>
<b>6 Literatura .....</b>	<b>157</b>
<b>7 Prilozi .....</b>	<b>169</b>
7.1 Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije .....	170
7.2 Biografija autora .....	172

**1**

**UVOD**

# 1.1 Propranolol-hidrohlorid

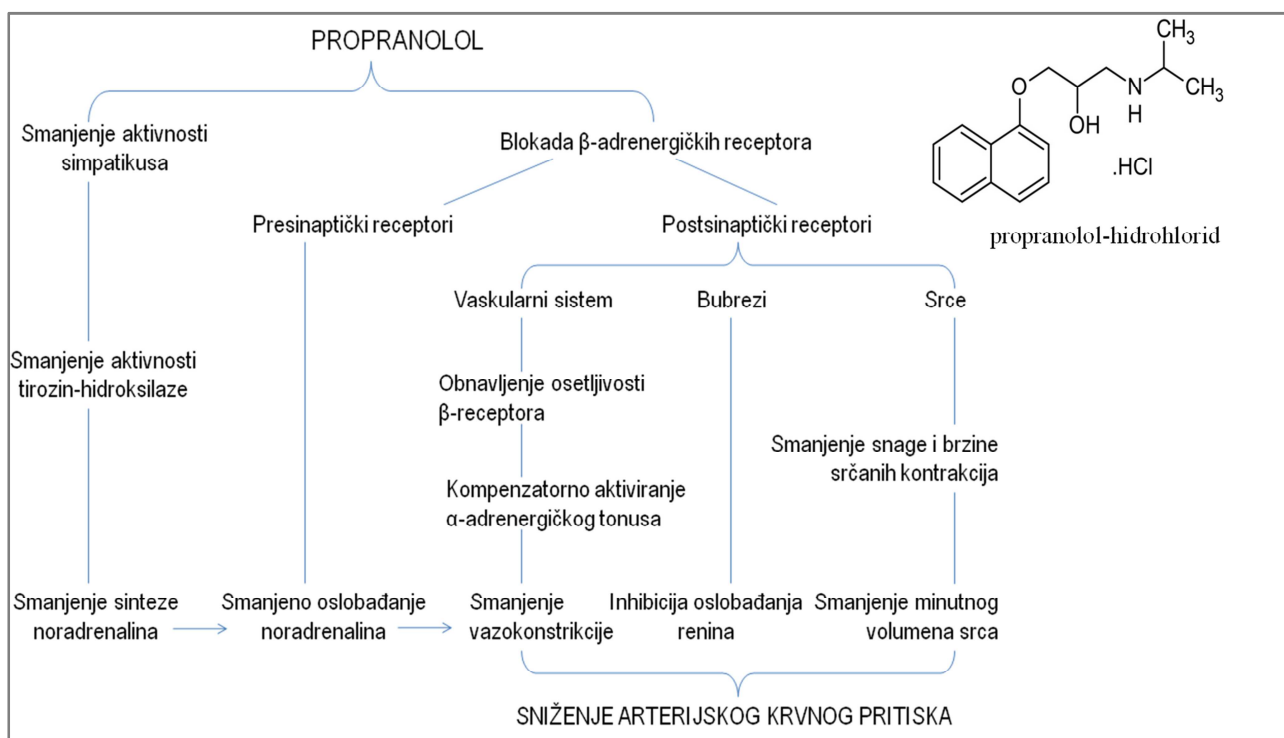
## 1.1.1 Mehanizam delovanja

Adrenergički  $\beta$ -blokatori, u koje spada i propranolol, su lekovi koji kompetitivnim mehanizmom blokiraju  $\beta_1$  i  $\beta_2$ -adrenergičke receptore, a time i sva dejstva koja se odigravaju preko ovih receptora [1]. Dobili su veliki klinički značaj zbog svoje efikasnosti u lečenju bolesti kardiovaskularnog sistema kao što su hipertenzija, angina pektoris, kongestivna srčana insuficijencija, infarkt miokarda i određene aritmije.

Svi adrenergički  $\beta$ -blokatori sadrže bočni izopropilni ili izobutilni lanac koji je bitan za prepoznavanje  $\beta$ -receptora, dok je vrsta hemijske supstitucije na aromatičnom prstenu ono što supstanci daje antagonističke karakteristike u odnosu na  $\beta$ -receptore [1]. Jedna od tih supstanci je propranolol-hidrohlorid (Slika 1.1), kao najznačajniji i referentni lek za celu grupu  $\beta$ -adrenergičkih blokatora. Otkriven je 1966. godine kao prvi efikasan komercijalno dostupan  $\beta$ -blokator za šta je škotskom naučniku i farmakologu Džejmsu Bleku dodeljena Nobelova nagrada za medicinu 1988. godine [2]. Propranolol se primenjuje u svom hidrohloridnom obliku kao so propranolol-hidrohlorid. Ostali  $\beta$ -blokatori se razlikuju po sledećim svojstvima: relativnom afinitetu prema  $\beta_1$  i  $\beta_2$ -receptorima, intrinzičnoj simpatomimetičkoj aktivnosti, blokadi  $\alpha$ -receptora, stabilizaciji ćelijske membrane, rastvorljivosti u lipidima, sposobnosti izazivanja vazodilatacije, kao i farmakokinetičkim svojstvima. Neke od ovih karakteristika imaju klinički značaj i pomažu u izboru odgovarajućeg  $\beta$ -blokatora zahtevima i potrebama individualnog pacijenta [1,3].

Propranolol-hidrohlorid ima podjednak afinitet prema  $\beta_1$  i  $\beta_2$ -receptorima, pa se stoga svrstava u grupu neselektivnih adrenergičkih  $\beta$ -blokatora (Slika 1.1) [3]. Drugi lekovi kao što su metoprolol, atenolol, acebutolol, bisoprolol i esmolol imaju nešto veći afinitet za  $\beta_1$  nego za  $\beta_2$ -receptore, te se svrstavaju u  $\beta_1$ -selektivne antagoniste, ali treba naglasiti da selektivnost nikad nije apsolutna [1]. Iako većina  $\beta$ -blokatora ne blokira  $\alpha$ -adrenergičke receptore, labetalol i karvedilol su primeri lekova koji blokiraju i  $\alpha_1$  i  $\beta$ -adrenergičke receptore [1].

Adrenergički  $\beta$ -blokatori generalno ne smanjuju krvni pritisak kod pacijenata sa normalnim krvnim pritiskom, ali snižavaju krvni pritisak kod pacijenata sa hipertenzijom. U mehanizmu nastajanja ovog važnog hipotenzivnog efekta verovatno učestvuje više faktora. Blokada presinaptičkih  $\beta$ -receptora, čime se smanjuje izlučivanje noradrenalina. Oslobođanje renina iz jukstaglomerularnog aparata je stimulirano od strane simpatičkog nervnog sistema preko  $\beta_1$ -receptora, a ovaj efekat se blokira antagonistima  $\beta$  receptora, čime se smanjuje proizvodnja angiotenzina i sprečava oslobađanje renina. Neki istraživači su otkrili da je antihipertenzivni efekat propranolola najizraženiji kod pacijenata sa povišenim koncentracijama renina u plazmi, u poređenju sa pacijentima sa niskim ili normalnim koncentracijama renina. Međutim, adrenergički  $\beta$ -blokatori su čak efikasni i kod pacijenata sa niskim nivoom renina u plazmi, a pindolol je efikasan antihipertenzivni lek koji ima mali ili nikakav efekat na aktivnost renina u plazmi. Iako se ne očekuje da adrenergički  $\beta$ -blokatori smanjuju kontraktilnost glatkih mišića krvnih sudova, dugotrajna primena ovih lekova ipak dovodi do pada perifernog vaskularnog otpora. Smatra se da ovaj odloženi pad perifernog vaskularnog otpora čini veći deo antihipertenzivnog efekta ovih lekova. Blokodom  $\beta_1$ -receptora u miokardu, ovi lekovi smanjuju minutni volumen srca, srčanu frekveneciju, a delimično i kontraktilnost miokarda. Pretpostavlja se da blokada  $\beta$ -blokatora u centralnom nervnom sistemu takođe doprinosi njihovim antihipertenzivnim efektima, ali postoji relativno malo dokaza koji podržavaju ovu mogućnost [1,3,4].



**Slika 1.1.** Struktura i mehanizmi antihipertenzivnog delovanja propranolol-hidrohlorida (prilagođeno prema [4]).

U nastavku je prikazan pregled registrovanih preparata propranolol-hidrohlorida na globalnom tržištu.

**Tablela 1.1.** Lista registrovanih preparata propranolol-hidrohlorida na globalnom tržištu

Naziv leka	Jačina	Farmaceutski oblik	Proizvođač
Bedranol <sup>®</sup>	80 mg, 160 mg	kapsula sa usporenim oslobađanjem	Sandoz Ltd, Velika Britanija
Inderal <sup>®</sup>	10 mg, 40 mg	tableta obložene filmom	AstraZeneca UK Ltd, Velika Britanija
Propranolol <sup>®</sup>	10 mg, 40 mg	tableta obložene filmom	Milpharm Ltd, Velika Britanija; Generis Farmacêutica, S.A., Portugal; APL Swift Services (Malta) Ltd, Malta
Propranolol <sup>®</sup>	80 mg, 160 mg	kapsula sa usporenim oslobađanjem	Tillomed Laboratories Ltd, Velika Britanija
Propranolol hydrochloride <sup>®</sup>	5 mg/5 mL, 40 mg/5 mL, 50 mg/5 mL	oralni rastvor	Conforma NV, Belgija
Propranolol Rosemont <sup>®</sup>	5 mg/5 mL, 10 mg/5 mL, 40 mg/5 mL, 50 mg/5 mL	oralni rastvor	Rosemont Pharmaceuticals Ltd, Velika Britanija

Hemangeol <sup>®</sup>	4,28 mg/mL	oralni rastvor	Pierre Fabre Pharmaceuticals, Inc., Francuska
Inderal <sup>®</sup>	10 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg, 80 mg	tableta	Akrimax Pharmaceuticals, LLC, SAD
Inderal <sup>®</sup> LA	60 mg, 80 mg, 120 mg, 160 mg	kapsula sa usporenim oslobađanjem	ANI Pharmaceuticals, Inc., SAD
InnoPran XL <sup>®</sup>	80 mg i 120 mg	kapsula sa usporenim oslobađanjem	ANI Pharmaceuticals, Inc., SAD
Propranolol hydrochloride <sup>®</sup>	1 mg/mL	rastvor za intravensku primenu	Baxter Healthcare Corporation, SAD
Propranolol hydrochloride Intensol <sup>®</sup>	80 mg/mL	koncentrovani oralni rastvor	Roxane Laboratories Inc., SAD
Propranolol <sup>®</sup>	40 mg	tableta	Galenika ad, Srbija

### 1.1.2 Biofarmaceutske osobine

Propranolol-hidrohlrid je beo ili skoro beo prašak molekulske mase 295,8 g/mol (259,3 g/mol propranolol baza) [5]. Prema biofarmaceutskom sistemu klasifikacije (BSK), propranolol-hidrohlrid pripada klasi I zbog visoke rastvorljivosti u fiziološkom rasponu pH vrednosti i visoke permeabilnosti [6]. Artursson i Karlsson su ispitujući *in vitro* permeabilnost većeg broja lekovitih supstanci došli do zaključka da lekovite supstance koje se potpuno apsorbuju iz gastrointestinalnog (GI) trakta imaju *Papp* vrednost veću od  $1 \times 10^{-6}$  cm/s određeno na Caco-2 ćelijama [7]. Permeabilnost propranolola određena *in vitro* na Caco-2 kulturama ćelija i na izolovanom crevu (*in vitro* i *in situ* metoda intestinalne perfuzije), prikazana u **Tabeli 1.2**, ukazuje da propranolol ima visoku permeabilnost [6], kao i da postoji dobra korelacija sa vrednostima humane intestinalne permeabilnosti [8].

**Tabela 1.2.** Permeabilnost propranolola određena *in vitro* i *in situ* metodama

Permeabilnost	Metoda	Referenca
$Papp = 43,00 \pm 3,60 \times 10^{-6}$ cm/s	Caco-2 kulture ćelija	[6]
$Papp = 41,90 \pm 4,30 \times 10^{-6}$ cm/s	Caco-2 kulture ćelija	
$Papp = 41,90 \times 10^{-6}$ cm/s	Caco-2 kulture ćelija	
$Papp = 11,20 \pm 0,50 \times 10^{-6}$ cm/s	Caco-2 kulture ćelija	
$Papp = 30,10 \pm 1,20 \times 10^{-6}$ cm/s	Caco-2 kulture ćelija	
$Papp = 5,45 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ cm/s	Caco-2 kulture ćelija	
$Papp = 34,40 \pm 2,30 \times 10^{-6}$ cm/s	Caco-2 kulture ćelija	
$Papp = 34,70 \pm 3,00 \times 10^{-6}$ cm/s	TC-7 kulture ćelija	
$Papp = 35,30 \pm 9,70 \times 10^{-6}$ cm/s	Caco-2 kulture ćelija	
$Pe_{eff} = 29,00 \pm 2,00 \times 10^{-6}$ cm/s	Perfuzija na izolovanom jejunumu pacova	
$Pe_{eff} = 359,00 \pm 160,00 \times 10^{-6}$ cm/s	Jejunalna perfuzija kod zdravih ljudi	

$P_{eff} = 33,16 \times 10^{-6}$ cm/s	Perfuzija na izolovanom duodenumu pacova	
$P_{eff} = 40,35 \times 10^{-6}$ cm/s	Perfuzija na izolovanom jejunumu pacova	[9]
$P_{eff} = 50,92 \times 10^{-6}$ cm/s	Perfuzija na izolovanom ileumu pacova	
$P_{eff} = 71,67 \times 10^{-6}$ cm/s	Perfuzija na izolovanom kolonu pacova	
$P_{eff} = 56,00 \pm 20,00 \times 10^{-6}$ cm/s	<i>In situ</i> jujunalna perfuzija pacova	[8]
$P_{app} = 18,00 \pm 6,72 \times 10^{-6}$ cm/s	<i>Ussing</i> komora koristeći humani duodenum	
$P_{app} = 31,90 \pm 17,00 \times 10^{-6}$ cm/s	<i>Ussing</i> komora koristeći humani jejunum	[10]
$P_{app} = 22,40 \pm 14,60 \times 10^{-6}$ cm/s	<i>Ussing</i> komora koristeći humani ileum	
$P_{app} = 35,40 \pm 14,20 \times 10^{-6}$ cm/s	<i>Ussing</i> komora koristeći humani kolon	

$P_{app}$  - prividni koeficijent permeabilnosti (engl. *apparent permeability coefficients*)

$P_{eff}$  - efektivni koeficijent permeabilnosti (engl. *effective permeability coefficients*)

Permeabilnost ( $P_{app}$ ) propranolola dobijena *in vitro* (*Ussing* komora) za različite segmente creva bila je veća od metoprolola kao referentnog standarda ( $P_{app}$  jejunum  $15,90 \pm 3,69 \times 10^{-6}$  cm/s;  $P_{app}$  kolon  $18,80 \pm 4,00 \times 10^{-6}$  cm/s), što ukazuje na visoku permeabilnost propranolola.

Rezultati *in vivo* ispitivanja permeabilnosti kroz humano tanko crevo pokazali da je  $P_{eff}$  propranolola  $2,91 \times 10^{-4}$  cm/s ( $P_{eff}$  jejunum) veća od  $P_{eff}$  vrednosti metoprolola ( $1,34 \times 10^{-4}$  cm/s), koji je korišćen kao referentni standard za permeabilnost, na osnovu čega je zaključeno da je propranolol lekovita supstanca visoke permeabilnosti [11]. Pored toga, rezultati druge publikacije su pokazali da je  $P_{eff}$  jejunum =  $2,88 \times 10^{-4}$  cm/s za propranolol veća od  $P_{eff}$  jejunum =  $1,21 \times 10^{-4}$  cm/s za metoprolol, određeno pod istim eksperimentalnim uslovima [12].  $P_{eff}$  propranolola se nalazi iznad granice za visoko permeabilne lekovite supstance prema BSK ( $2-4 \times 10^{-4}$  cm/s) [13]. Takođe, podaci iz kliničkih studija ukazuju na to da je apsorpcija propranolola u GI trakt nakon peroralne primene > 90% [14,15], što je prema BSK iznad granične vrednosti za visoko permeabilne lekovite supstance (85% od primenjene doze leka [16,17]).

Particioni koeficijent (log P) propranolola određen u sistemu n-oktanol/voda iznosi 2,65 [11], što pokazuje da propranolol ima skoro 450 puta veću rastvorljivost u organskom rastvaraču u odnosu na vodu pa se može smatrati lipofilnim. Njegova lipofilna priroda ukazuje da se kao takav lako transportuje kroz ćelijske membrane. Prema navodima Lipinskog i sar. [18], poželjne log P vrednosti za lekovite supstance su manje od 5, a najbolje je da log P vrednost bude između 1 i 3 jer se takve lekovite supstance dobro apsorbuju.

Propranolol-hidrohlorid ima pKa u opsegu od 9,03 do 9,09 [6], odnosno 9,45 - 9,50 [19], određeno u različitim studijama. Slabe kiseline i baze su 50% jonizovane i 50% nejonizovane kada je pH sredine jednak pKa vrednosti lekovite supstance. Na 2 pH jedinice iznad ili ispod pKa lekovite supstance, skoro 100% lekovite supstance je jonizovano ili nejonizovano [20]. Propranolol kao baza najviše jonizuje 2 pH jedinice ispod svoje pKa vrednosti, što ukazuje da se njegova rastvorljivost ne menja u fiziološkom opsegu pH vrednosti (1,2 - 7,4). Rastvorljivost propranolol-hidrohlorida je 1g u 10-30 mL vode, odnosno najmanja rastvoljivost je 33 mg/mL [6,11], što će kasnije biti iskorišćeno za izračunavanje doznog broja propranolol-hidrohlorida.

Kada se govori o rastvorljivosti lekovite supstance u smislu BSK, ona može biti visoko i nisko rastvorljiva, a klasifikacija zavisi od vrednosti njenog *Doznog broja* ( $D_o$ ) [11]. Dozni broj se izračunava na osnovu maksimalne pojedinačne doze lekovite supstance ( $M_o$ ), minimalne rastvorljivosti lekovite supstance u fiziološkom opsegu pH vrednosti, na temperaturi od 37 °C ( $C_s$ ) i zapremine tečnosti uzete sa lekom od 250 mL ( $V_o$ ), prema sledećoj jednačini [11]:

$$D_o = (M_o/V_o)/C_s \quad 1.1$$

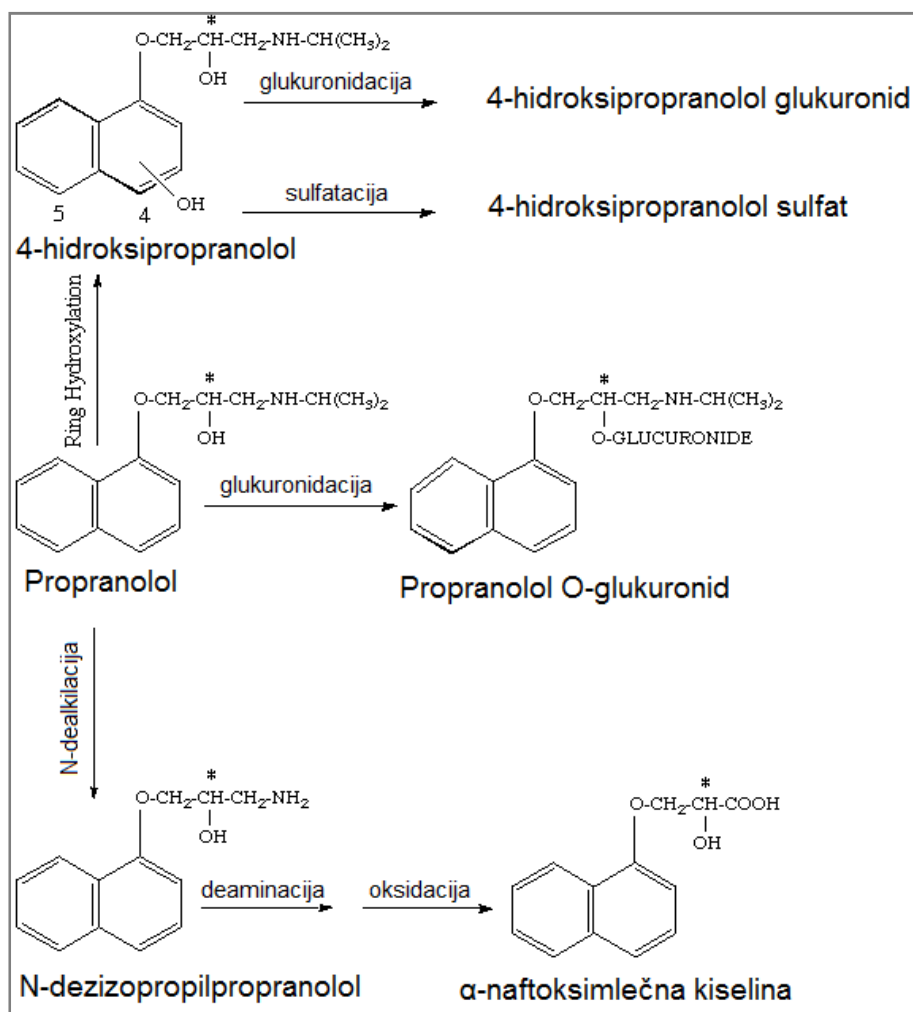
Vrednosti doznog broja manje ili jednake 1 pokazuju da je za rastvaranje propisane doze leka potrebno manje od 250 mL vodenog medijuma, pa se takve lekovite supstance označavaju kao visoko rastvorljive. Nasuprot tome, lekovite supstance čiji je dozni broj veći od 1 se označavaju kao nisko rastvorljive, odnosno, za rastvaranje propisane doze potrebno je više od 250 mL vodenog medijuma [21]. Maksimalna pojedinačna doza propranolol-hidrohlorida iznosi 160 mg (Tabela 1.1). Dozni broj propranolol-hidrohlorida izračunat na osnovu jednačine 1.1 iznosi 0,02 ( $D_o = (160 \text{ mg}/250 \text{ mL})/33 \text{ mg/mL} = 0,02$ ). Izračunata vrednost  $D_o < 1$  ukazuje na to da je propranolol-hidrohlrid visoko rastvorljiva supstanca.

### 1.1.3 Farmakokinetičke osobine

Nakon peroralne primene, propranolol se brzo i gotovo kompletno apsorbuje u gastrointestinalnom (GI) traktu, a maksimalne koncentracije u krvi dostižu se 1-2 sata posle peroralne primene [6]. Međutim, propranolol posle apsorpcije podleže intenzivnom efektu prvog prolaza u jetri, zbog čega mu je biološka raspoloživost niska (svega 30 - 40% oralno primenjene doze dospeva u sistemsku cirkulaciju) [15]. Zbog ovog efekta, dispozicija (raspoređivanje) propranolola zavisi od puta primene, pa bi se ovaj efekat mogao izbeći sublingvalnom i bukalnom primenom leka [22,23].

Propranolol se brzo raspodeljuje u organizmu i ima veliki volumen distribucije od oko 250 L i u visokom stepenu se vezuje za proteine plazme (85-96%) [14,23]. Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi nalazi se u opsegu od 0,71 do 0,78 [14,24]. Četiri glavne biološke determinante dispozicije propranolola su kapacitet metaboličkih enzima jetre, protok krvi kroz jetru, vezivanje lekovite supstance za proteine plazme i anatomija hepaticne cirkulacije [25]. Eliminacija propranolola se skoro potpuno odvija procesom metabolizma u jetri dejstvom enzima CYP1A2, CYP2D6 i CYP2C19, pri čemu biotransformacijom nastaju glavni metaboliti:  $\alpha$ -naftoksimlečna kiselina (42%), propranolol-glukuronid (17%), 4-hidroksipropranolol-glukuronida i 4-hidroksipropranolol-sulfat (41%) (Slika 1.2) [6,26,27]. Četiri osnovna metabolička puta propranolola (Slika 1.2) uključuju N-dealkilaciju, oksidaciju prstena, oksidaciju bočnog lanca, konjugaciju sa glukuronskom kiselinom (glukuronidacija) i konjugaciju sa sumpornom kiselinom (sulfokonjugacija) [28]. 4-hidroksipropranolol je farmakološki aktivan metabolit koji brzo podleže reakcijama konjugacije zbog čega je njegov doprinos farmakološkom efektu mali [6]. Ovako obiman metabolizam u jetri dovodi do relativno kratkog poluvremena eliminacije: 4-6 sati nakon peroralne primene, odnosno 2-3 sata nakon intravenske primene [15,23]. Upravo zbog njega, klirens propranolola je osetljiv na promene u protoku krvi kroz jetru [29]. Kod pacijenata sa oboljenjima jetre, poluvreme eliminacije propranolola može biti relativno normalno ili produženo čak do 35 sati kod pacijenata sa cirozom i sa hirurški izazvanim portokavalnim anastomozama [23]. Blokadom  $\beta_1$ -receptora smanjuje se minutni volumen srca, a time i protok krvi kroz jetru, što dovodi do smanjene eliminacije propranolola. Tako propranolol, ostvarujući farmakološko dejstvo, utiče na sopstveni klirens smanjenjem dopremanja leka do jetre [23].





**Slika 1.2.** Prikaz glavnih metaboličkih puteva propranolola kod ljudi (prilagođeno prema [27])

Propranolol pokazuje dozno-zavisnu eliminaciju. Povećanjem doze može se postići povećanje koncentracije leka u plazmi, što ukazuje na to da su procesi metabolizovanja propranolola podložni zasićenju i da hepaticna ekstrakcija leka opada obezbeđujući da veći deo peroralno primenjenog leka stigne do sistemske cirkulacije i produži poluvreme eliminacije [3,23]. Samo 1-4% primenjene doze se u nepromenjenom obliku izlučuje putem urina i fecesa [14].

Zbog navedenih biofarmaceutskih i farmakokinetičkih svojstava koja se odnose na nisku bioraspoloživost zbog obimnog presistenskog metabolizma u jetri, relativno kratko poluvreme eliminacije i malu molekulsku masu, propranolol-hidrohlorid je dobar kandidat za intraoralni put primene u formi bukalnih mukoadhezivnih farmaceutskih oblika.

## 1.2 Preparati za oralnu sluzokožu

### 1.2.1 Klasifikacija preparata za oralnu sluzokožu

Preparati za oralnu sluzokožu se razlikuju prema tome da li su mukoadhezivni ili ne (Slika 1.3). Mukoadhezivne formulacije su opisane u monografiji “*Oromukozalni preparati*” (engl. *Oromucosal preparations*) Evropske farmakopeje iz 2023. godine [5]. Definišu se kao mukoadhezivne bukalne tablete (MBT) i mukoadhezivni bukalni filmovi (MBF) pored drugih mukoadhezivnih čvrstih ili polučvrstih preparata. Evropska farmakopeja navodi da mukoadhezivni preparati obično sadrže hidrofilne polimere, koji u kontaktu sa salivom bubre stvarajući hidrogel koji pokazuje adheziju za sluzokožu usne duplje [5]. MBF je moguće primeniti na svim ciljnim mestima usne duplje koji uključuju bukalni, nepčani, sublingvalni, gingivalni region, ali region usana. Njihovom primenom moguće je ostvariti lokalni ili sistemski terapijski efekat. Dakle, lekovita supstanca se može osloboditi u usnoj duplji sa ciljem postizanja lokalnog terapijskog efekta, ili pak može proći kroz sluzokožu usne duplje i ostvariti sistemski terapijski efekat. Sistemska isporuka lekovite supstance kroz sluzokožu usne duplje je naročito korisna za lekovite supstance sa niskom biološkom raspoloživošću, koje se ne mogu primeniti peroralno, posebno kada se parenteralni invazivni put primene treba izbeći [30].

Važna karakteristika ovih farmaceutskih oblika nije samo njihovo mukoadhezivno svojstvo, već i njihovo vreme zadržavanja (engl. *residence time*) u usnoj duplji [30]. Postojanje razlike između permanentnih i disperzibilnih formulacija je dovelo do uvođenja novog farmaceutskog oblika. Ukoliko je polimerna formulacija permanentna i ostaje u usnoj duplji dok se ručno ne izvadi, takav farmaceutski oblik se označava kao oromukozalni ili oralni flaster (engl. *oromucosal/oral patch*, ORP). Nasuprot tome, ako postoji orodisperzibilna ili polako erodirajuća polimerna formulacija, takav farmaceutski oblik se u zavisnosti od mukoadhezivnih svojstava označava kao mukoadhezivni bukalni film ili orodisperzibilni film [30].

Od velike je važnosti prilikom razvoja mukoadhezivnih bukalnih formulacija postići odgovarajuća mehanička svojstva, praćeno optimalnom brzinom rastvaranja lekovite supstance iz preparata kako bi se obezbedila adekvatna manipulacija i primena proizvoda bez oštećenja (mrvljenja ili lomljenja) [2]. Veliki je izazov obezbediti ravnotežu između optimalne brzine rastvaranja lekovite supstance i prihvatljivih mehaničkih svojstava, a koji su prepoznati kao kritični atributi kvaliteta (engl. *Critical Quality Attributes – CQAs*) i koji moraju biti kontrolisani i optimizovani prilikom razvoja MBF i MBT. Očigledno je da bi ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance (*dissolution test*) iz MBF i MBT trebalo da bude obavezno u fazi razvoja i kontroli kvaliteta, ali i dalje ostaju pitanja kako sprovesti test i koja bi brzina rastvaranja bila odgovarajuća budući da MBF i MBT mogu obezbediti brzo ili sporo rastvaranje lekovite supstance u zavisnosti od namene.

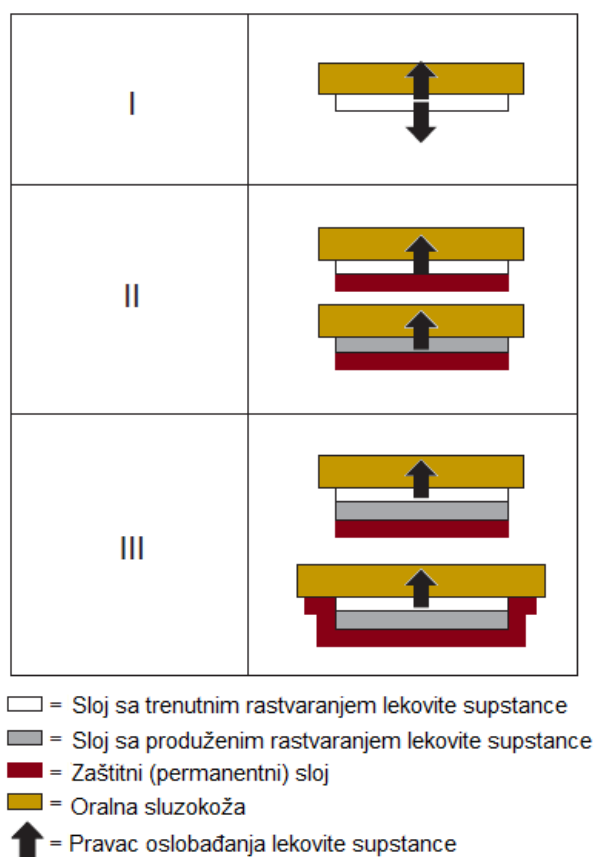


\* Nije navedeno u Evropskoj farmakopeji

**Slika 1.3.** Oromukozalni preparati prema Ph.Eur. 11.0 (prilagođeno prema [30])

### 1.2.2 Mukoadhezivni bukalni filmovi i mukoadezivne bukalne tablete

Mukoadezivni bukalni filmovi (MBF) mogu biti jednoslojni ili višeslojni filmovi izgrađeni od pogodnog materijala [5]. MBF koji se sastoje od dva ili više slojeva mogu obezbediti različitu brzinu oslobađanja lekovite supstance. Višeslojna izrada/proizvodnja može se izvršiti nanošenjem više jednoslojnih polimernih filmova. Višeslojni filmovi mogu biti dizajnirani tako da se sloj sa lekovitom supstancom pričvršćuje na oralnu sluzokožu, dok drugi sloj predstavlja zaštitini/potporni sloj (engl. *backing layer*) [30]. Svrha ovog drugog sloja je sporije raspadanje od prvog “aktivnog” sloja, ili čak ovaj sloj može biti permanentan, kako bi se obezbedilo rastvaranje lekovite supstance u pravcu oralne sluzokože. Na taj način, zaštitni sloj služi kao štit prema usnoj duplji (Slika 1.4, II). Ovaj model je primenjiv za lokalnu ili sistemsku isporuku lekovite supstance. I između pomenuta dva sloja može se dodati treći, redišnji sloj. Dakle, između mukoadezivnog sloja sa trenutnim rastvaranjem lekovite supstance i zaštitnog sloja, nalazi se srednji sloj leka koji funkcioniše kao depo sloj, koji obezbeđuje produženo ili usporeno oslobađanje (Slika 1.4, III). Ovaj model je takođe primenjiv za lokalnu ili sistemsku isporuku lekovite supstance [30].



**Slika 1.4.** Prikaz jednoslojnih (I), dvoslojnih (II) i troslojnih mukoadhezivnih bukalnih filmova (III) (prilagođeno prema [30]).

### 1.3 Mukoadhezija

Bioadhezija je je opšti pojam koji opisuje adheziju sa biološkom površinom, dok je mukoadhezija specifičan izraz koji opisuje posebnu interakciju sa mukozom (sluzokožom) [31]. U oblasti farmacije, pojam mukoadhezije se koristi kada se dve površine (mukozna membrana i površina farmaceutskog oblika) drže zajedno tokom produženog vremenskog perioda pomoću međufaznih sila [32]. Mukoadhezija kao fenomen je interesantan zbog mogućnosti zadržavanja farmaceutskog oblika na mestu delovanja (npr. površina oka) ili mestu apsorpcije (npr. unutar određenih regiona gastrointestinalnog trakta, oralne i vaginalne sluzokože) [32,33].

Sluzokoža je vlažna površina koja oblaže zidove različitih telesnih šupljina kao što su gastrointestinalni trakt, respiratorni trakt i usna duplja [34]. Sluzokože u svojoj strukturi sadrže epitelni sloj koji je obično vlažan zbog prisustva sluzi. Epitel može biti bilo jednoslojni (kod creva i bronhija) ili višeslojni (u usnoj duplji i oku). Jednoslojni epitel sadrži peharaste ćelije koje luče mukus (sluz) direktno na epitelne površine, dok višeslojni epitel sadrži, ili su u blizini tkiva peharaste ćelije (često unutar specijalizovanih žlezda) koje luče mukus, koji se potom taloži na epitelne površine [34]. Glavna komponenta mukusa je voda (više od 90%), u kojoj su rastvoreni glikoproteini, proteini, lipidi i neorganske soli [35,36].

Mucin je visoko glikozilovani glikoprotein sa velikom peptidnom glavom i oligosaharidima kao bočnim lancima i predstavlja najvažniju komponentu mukusa koja formira strukturu mukusa i odgovoran je njegova karakteristična gelasta, kohezivna i adhezivnim svojstva [35]. Mukus ima zaštitnu funkciju i funkciju lubrikansa. Debljina mukusnog sloja varira od 50 do 450  $\mu\text{m}$  u želucu, dok

sluzokoža usne duplje varira od 500 do 800  $\mu\text{m}$  kod bukalne sluzokože, i od 100 do 200  $\mu\text{m}$  kod sublingvalne i gingivalne sluzokože [34,36,37].

Postoji nekoliko teorija koje objašnjavaju mehanizme koji se nalaze u osnovi fenomena mukoadhezije. To su: elektronska teorija, adsorptivna teorija, mehanička teorija, teorija difuzije, teorija kvašenja i teorija lomljenja [33,36,38,39].

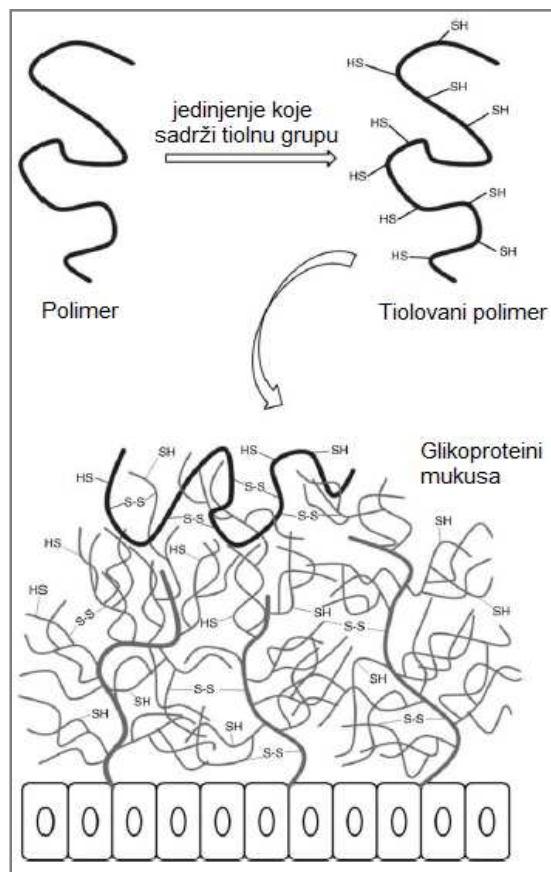
- *Teorija kvašenja* (engl. *wetting theory*) se prvenstveno primenjuje na tečne sisteme i uzima u obzir površinsku i međufaznu energiju. Uključuje sposobnost tečnosti da se spontano širi (rasprotire) po površini sluzokože kao preduslov za razvoj adhezije.
- *Elektronska teorija* (engl. *electronic theory*) se zasniva na transferu elektrona između glikoproteina mukusa i mukoadhezivnog polimera tako da se na kontaktnoj površini formira elektronski dvosloj, što dovodi do nastanka privlačnih sila i difuzije polimernih lanaca u mukus.
- Prema *adsorptivnoj teoriji* (engl. *adsorption theory*) adhezija nastaje kao rezultat formiranja primarnih i sekundarnih veza između mukoadhezivnih polimera i komponenti mukusa. Primarne veze su jonske, kovalentne i metalne veze, dok su sekundarne (nekovalentne) veze Van der Valsove sile, hidrofobne interakcije i vodonične veze, za koje se smatra da imaju glavni doprinos adhezivnoj interakciji.
- *Teorija difuzije* (engl. *diffusion theory*) podrazumeva da do mukoadhezije dolazi usled ukrštanja (prožimanja) (međudifuzije) polimernih lanaca i glikoproteina koji se nalaze u mukusu, pri čemu dolazi do difuzije lanaca mukoadhezivnog polimera u mukusnu mrežu i formiranja mreže sa glikoproteinima. Ovaj proces je vođen gradijentom koncentracije i na njega utiču dužina polimernog lanca, kompatibilnost dva polimera i njihova mobilnost. Dubina ukrštanja zavisi od koeficijenta difuzije i dužine kontakta. Dovoljna dubina ukrštanja stvara polutrajnu adhezivnu vezu.
- Prema *mehaničkoj teoriji* (engl. *mechanical theory*) adhezija proizilazi iz međusobnog spajanja tečnog adheziva i neravnina na hrapavoj površini. Tako hrapave (grube) površine takođe povećavaju površinu dostupnu za interakciju, za koje se smatra da su važniji u procesu adhezije od mehaničkog efekta.
- *Teorija lomljenja* (engl. *fracture theory*) ukazuje na to da postoji veza između adhezivne sile sa silom koja je potrebna da bi se površine koje su u kontaktu razdvojile. Sila koja je potrebna za razdvajanje je veća kada su polimerni lanci duži i kada je manji stepen unakrsnog vezivanja između lanaca.

## 1.4 Ekscipijensi za izradu mukoadhezivnih bukalnih filmova metodom izlivanja

Mukoadhezivni polimeri imaju sposobnost adhezije za biološke membrane i na taj način mogu da produže vreme kontakta farmaceutskog oblika sa sluzokožom. Upotreba ovih polimera može značajno poboljšati efikasnost mnogih farmaceutskih oblika, što se može odraziti kroz bolji tretman lokalnih oboljenja, poboljšanu biološku raspoloživost i kontrolisano oslobađanje lekovite supstance ukoliko se radi o sistemskoj isporuci lekovite supstance [40,41]. Svi polimeri koji se primenjuju u sklopu mukoadhezivnih farmaceutskih oblika, mogu da se podele u zavisnosti od kriterijuma na: prirodne i sintetske, hidrofilne i hidrofobne, katjonske, anjonske i nejonske, polimere prve i druge generacije [42,43].

Polimeri prve generacije se nespecifično vezuju za mukus i karakteriše ih relativno kratko vreme zadržavanja zbog obnavljanja mukusa [44]. Hemijska interakcija koja se stvara između polimera i mukusa je generalno nekovalentne prirode (vodonične veze, hidrofobne i elektrostatičke interakcije) [43,44]. Lektini, bakterijski adhezivi i tiolovani polimeri su klasifikovani kao mukoadhezivni polimeri druge generacije [43,45]. Za njih je karakteristično da se vezuju za mukus ili za površinu ćelije kovalentnim interakcijama ili specifičnim vezivanjem za receptore. Druga generacija mukoadhezivnih

polimera (izuzev tiolovanih polimera) se u većem stepenu vezuje za površinu ćelije pomoću specifičnih receptora ili kovalentnim vezama nego za mukus [43]. Do sada je potvrđeno da se mukoadhezivnost značajno poboljšava kovalentnim vezivanjem jedinjenja sa tiolnom funkcionalnom grupom za polimerne lance [46]. Tiolovani polimeri, ili takozvani tiomeri, evoluirali su kao potencijalni sistem za isporuku lekova što je zasnovano na njihovoj sposobnosti da formiraju kovalentne veze sa mukusnim slojem [46]. Na bazi tiol-disulfidne reakcije razmene i jednostavnog procesa oksidacije dolazi do formiranja disulfidnih mostova između polimera i cisteinom bogatih regiona mukusa (Slika 1.5). Smatra se da je formiranje difulfidne veze odgovorno za povećanje mukoadhezivnih svojstava tiolovanih polimera. Oni zapravo oponašaju prirodno ponašanje mucina koji se kovalentno učvršćuju unutar mukusa disulfidnim vezama. Kao rezultat poboljšane adhezivnosti, formulacije na bazi tiolovanih polimera ostaju duže na mestu apsorpcije i poboljšavaju ukupnu bioraspodivnost. Upotreba ovih polimera može dovesti do smanjene učestalosti primene lekovitog preparata, nižih koncentracija lekovite supstance, zaobilaznja metabolizma prvog prolaza i ciljanog vezivanja za određena tkiva [46]. Pored poželjne mukoadhezivnosti, tiolovani polimeri pokazuju i svojstva inhibicije određenih enzima i efluks pumpe, poboljšanja permeacije, kao i *in situ* gelirajuća svojstva. Našli su svoju primenu u razvoju sistema za oralnu, nazalnu, okularnu i bukalnu isporuku lekovite supstance [46].



**Slika 1.5.** Šematski prikaz tiolacije polimera i formiranja disulfidnih veza između tiolovanog polimera i vlakna glikoproteina mukusa (prilagođeno prema [46]).

Upravo su ovi hidrofilni polimeri najvažnija komponenta mukoadhezivnih bukalnih formulacija jer je polimer odgovoran za formiranje filma [47]. Udeo polimera u formulaciji MBF iznosi između 45 i 65% mase osušenog filma, stim što se najčešće biraju koncentracije od 60%-65% kako bi se postigla

željena svojstva filma [48]. Obično jedan polimer nema adekvatne karakteristike, pa se izborom odgovarajućih polimernih smeša postižu adekvatna fizička i mehaničko-funkcionalna svojstva [49]. Pogodnim odabirom polimera moguće je uticati na mukoadezivnost, dezintegraciju, mehanička svojstva, elastičnost i rukovanjem filmova, kao i na maksimalni udeo inkorporirane lekovite supstance [50]. Pokazano je da se kombinovanjem polimera različitih karakteristika mogu poboljšati mehanička svojstva filmova [51–53]. Polimeri veće molekulske mase utiču pozitivno na mehanička svojstva filmova, ali dovode i do sporije dezintegracije [52]. Pregled najčešće korišćenih prirodnih i sintetskih polimera dat je u [Tabeli 1.3](#).

**Tabela 1.3.** Pregled prirodnih i sintetskih hidrofilnih polimera namenjenih izradi/proizvodnji mukoadezivnih bukalnih preparata [36,43]

Vrsta polimera	Vrsta polimera
Prirodni polimeri	Hitozan, želatin, hijaluronska kiselina, guar guma, ksantan guma, gelan guma, karagenan, pektin, natrijum-alginat
Sintetski polimeri	<i>Derivati celuloze:</i> karboksimetilceluloza (CMC), natrijum-karboksimetilceluloza, hidroksietilceluloza (HEC), hidroksipropilceluloza (HPC), hidroksipropilmetilceluloza (HPMC), metilceluloza (MC), metilhidroksietilceluloza (MHEC)
	<i>Polimeri na bazi derivata poliakrilne kiseline:</i> Poliakrilna kiselina (PAA), polikarbofil (PC), poli(laktid-ko-glikolid), poliakrilati, poli(metilviniletar metakrilna kiselina), 2-hidroksietil metakrilat, poli(akrilna kiselina etilheksilakrilat), polimetakrilat, poli(alkilcijanoakrilat), poli(izoheksilcijanoakrilat), poli(izobutilcijanoakrilat), kopolimer akrilne kiseline i polietilenglikola
	<i>Ostali:</i> Polivinilalkohol, polivinilpirolidon, polietilenoksid, tiolovani polimeri (tiolovani hitozan, tiolovana poliakrilna kiselina, tiolovani polkarbofil, tiolovani alginat)

Mnogi od navedenih polimera formiraju krut i krt polimerni matriks koji zahteva dodavanje **plastifikatora** u formulaciju. Ovi ekscipijensi su neophodni za obezbeđivanje fleksibilnosti, odgovarajućih zateznih svojstava, a takođe i za obezbeđivanje prihvatljive teksture. Plastifikatori utiču na mehanička svojstva filmova smanjenjem temperature staklastog prelaza polimera korišćenog za formiranje filmova. MBF treba da budu dovoljno čvrsti da ne bi došlo do oštećenja prilikom proizvodnje, pakovanja, rukovanja i tokom transporta. Međutim, neodgovarajuća upotreba plastifikatora može dovesti do pucanja, cepanja i ljuštenja filma. Pored toga, važno je znati da vrsta plastifikatora može uticati na vreme dezintegracije, kapacitet apsorpcije vode i stabilnost finalnog proizvoda. Izbor plastifikatora zavisi od kompatibilnosti sa polimerom i vrstom rastvarača koji se koristi za izradu filmova metodom izlivanja. Najčešće korišćeni plastifikatori uključuju polialkilen okside, kao što su polietilenglikoli (PEG), polipropilenglikoli, polietilenpropilenglikoli, potom plastifikatori male molekulske mase, kao što su glicerol, glicerol-monoacetat, glicerol-diacetat ili glicerol-triacetat, triacetin, polisorbitat, cetilalkohol, propilenglikol, sorbitol, natrijum-dietilsulfosukcinat, trietilcitrat, tributilcitrat, ricinusovo ulje, obično u koncentraciji u rasponu od 0,5% do 30%, najčešće u rasponu od oko 0,5% do 20% masenog udela odabranog polimera [51,53,54].

Polietilen oksid je interesantan polimer jer kada se koristi sam ili u kombinaciji sa hidrofilnim celuloznim polimerom poput hidroksipropilceluloze (HPC) ili hidroksipropilmetilceluloze (HPMC), daje fleksibilne, jake filmove. U tom smislu, dodatni plastifikatori nisu potrebni za fleksibilnost [53].

**Ostali ekscipijensi** uključuju primenu *penetracionih inhensera*. Pošto je isporuka lekovite supstance u/kroz bukalnu sluzokožu ograničena barijernom prirodom epitela i površinom dostupnom za apsorpciju, istraživani su različiti načini poboljšanja isporuke lekovite supstance u/kroz bukalnu sluzokožu, od kojih su najznačajniji hemijski penetracioni inhenseri. Neki od ekscipijenasa koji su korišćeni u svrhu poboljšanja penetracije (ili permeacije) lekovitih supstanci kroz bukalnu sluzokožu su surfaktanti (poboljšavaju permeaciju molekula paracelularnim putem - natrijum-laurilsulfat, polisorbit, cetilpiridinium-hlorid, benzalkonijum-hlorid), žučne soli (natrijum-glikodeoksiholat, natrijum taurodihidrofuzidat, natrijum-tauroholat, natrijum-taurodeoksiholat, natrijum-deoksiholat), masne kiseline (oleinska kiselina, linoleinska kiselina, izopropil-miristat), etanol i hitozan. Njihov mehanizam delovanja nije u potpunosti jasan, ali dosadašnje saznanja ukazuju na mehanizam koji podrazumeva reorganizaciju intercelularnih lipida u bukalnom epitelu, modifikaciju i ekstrakciju međucelijskih lipida, povećanje fluidnosti fosfolipidnih domena što dovodi do prekida fosfolipidnog lanca, smanjenje lipida u membranama bukalnih epitelih ćelija, oštećenje membrane narušavanjem lipidnih domena, smanjenje nivoa intecelularnih i lipida ćelijske membrane solubilizacijom [55,56].

Potrebno je voditi računa o animalnim modelima koji se koriste za procenu potencijalnih permeacionih inhensera na bukalnoj sluzokoži. Neke keratinizovane bukalne sluzokože svinje je bolji model u odnosu na keratinizovanu bukalnu sluznicu pacova i hračaka [55]. Međutim, potencijalno oštećenje i iritacija bukalne sluzokože nekim penetracionim inhenserima je razlog sporijeg prihvatanja u formulaciji. Zbog toga je potrebno optimizovati koncentraciju penetracionih inhensera kako bi se postigao odgovarajući efekat poboljšanja penetracije uz smanjenu toksičnost. Među različitim vrstama penetracionih inhensera, hitozan i njegovi derivati imaju povoljna biološka svojstva u pogledu biokompatibilnosti, netoksičnosti i biorazgradivosti. Zbog manjih i reverzibilnih efekata na morfologiju epitela, hitozan i njegovi derivati su obećavajući i jedinstveni (bio)inhenseri za mukoznu isporuku različitih lekovitih supstanci [56]. *Sredstva za maskiranje uskusa i zaslađivači* se koriste kako bi se maskirao gorak ukus lekova i tako uticalo na poboljšanje komplijanse pacijenta. Mogu se koristiti prirodni zaslađivači poput saharoze, dekstroze, fruktoze, glukoze, tečne glukoze i maltoze, dok su saharin, aspartum, sukraloza, neotamecesulam-K primeri veštačkih zaslađivača koji se koriste u ovu svrhu. *Sredstva za stimulaciju salivacije* se koriste kako bi se povećao obim lučenja salive koja pomaže u dezintegraciji bukalnih preparata. Sredstva za stimulaciju pljuvačke uključuju kiseline kao što su limunska kiselina, vinska kiselina, askorbinska kiselina i jabučna kiselina. Ove kiseline mogu da se koriste pojedinačno ili u kombinaciji. Pored njih, u istu svrhu mogu da se koriste prirodni i veštački zaslađivači. Arome se takođe mogu primeniti sa ciljem poboljšanja palatabilnosti primenjenog preparata, a u tu svrhu se koriste ulje pepermint, ulje cimeta, ulje nane, ulje muškarnog oraščića, vanile, kaka, kafe, čokolade, citrusa, jabuke, maline, trešnje i ananasa. *Sredstva za bojenje* se koriste za poboljšanje izgleda bukalnog filma, a različita FD&C i D&C sredstva su odobrena od strane Američke uprave za hranu i lekove [57] čija se upotreba preporučuje u koncentraciji do 1% [54].

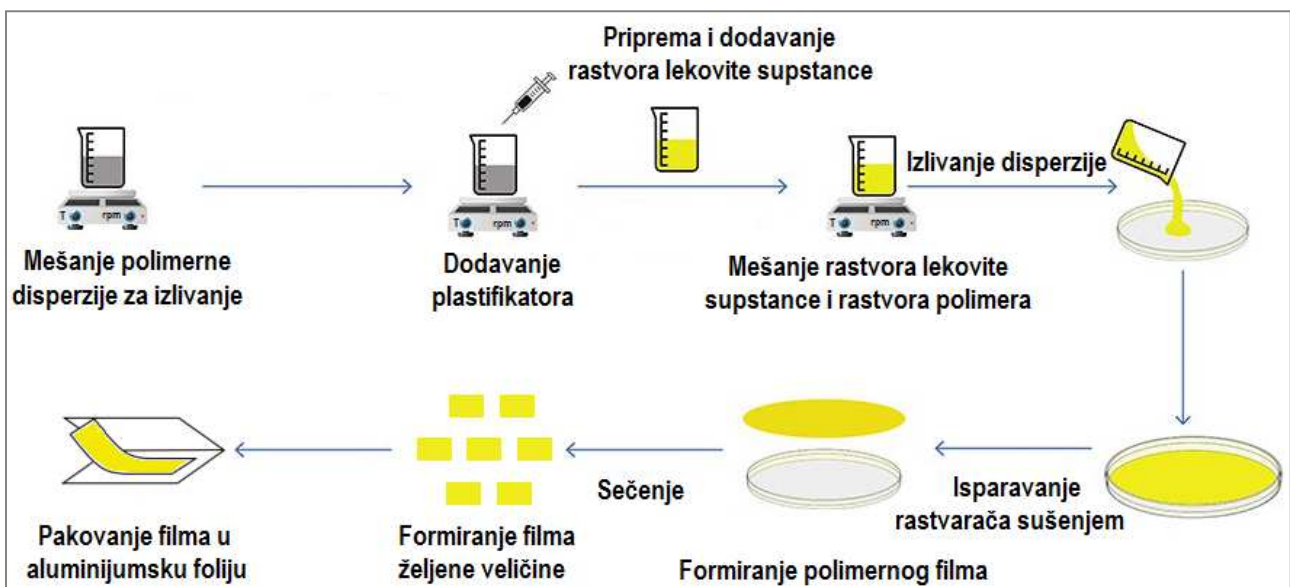
## 1.5 Proizvodnja/izrada mukoadhezivnih bukalnih filmova

U literaturi se uočava da je metoda izlivanja (engl. *solvent casting method*) nesumnjivo najčešće korišćena metoda u procesu proizvodnje/izrade filmova. Razlog za to je jednostavnost kao i niska cena procesa izrade [58]. Sam proces se sastoji od najmanje šest koraka: priprema polimerne disperzije za izlivanje; uklanjanje mehurića vazduha i disperzije (de-aeracija); prenošenje odgovarajuće zapremine disperzije u kalup; sušenje izlivena disperzije; sečenje do finalnog farmaceutskog oblika koji sadrži željenu količinu lekovite supstance i pakovanje (Slika 1.6) [59]. Prilikom izrade/proizvodnje filmova, poseban značaj daje se reološkim svojstvima disperzije, zarobljenim mehurićima vazduha, ujednačenosti sadržaja lekovite supstance i rezidualnim rastvaračima u finalnom farmaceutskom obliku. Reološka svojstva disperzije utiču na brzinu sušenja i ujednačenost sadržaja lekovite supstance



kao i fizički izgled filmova [59]. U toku faze mešanja može doći do uklapanja vazdušnih mehurića pa je njihovo uklanjanje iz disperzije kritičan korak u pogledu homogenosti preparata. Filmovi koji se dobijaju iz disperzija sa inkorporiranim mehurićima vazduha imaju neravnu površinu i heterogenu debljinu. Posebna pažnja se odnosi na upotrebu organskih rastvarača za rastvaranje polimera, ali i za zaštitu lekovite supstance od vlage i smanjenje degradacije lekovite supstance usled hidrolize. Organski rastvarači jesu dobro rešenje za lekovite supstance osetljive na vlagu, ali njihovo korišćenje nosi rizik potencijalnog zadržavanja u preparatu (rezidualni rastvarač) i štetne efekte po životnu sredinu i zdravlje ljudi [36]. Preporučuje se upotreba organskih rastvarača iz klase 3 prema smernicama za rezidualne rastvarače Internacionalne konferencije za harmonizaciji - ICH Q3(R3) [60].

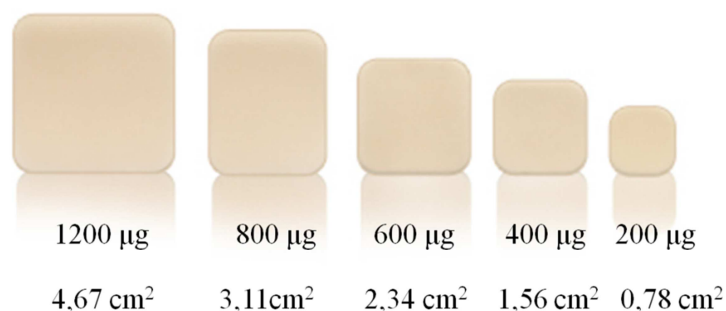
Ujednačenost sadržaja lekovite supstance je veliki izazov za farmaceutskog tehnologa u procesu izrade/proizvodnje lekovitih preparata tipa filmova. U cilju prevazilaženja neujednačenosti sadržaja lekovite supstance u filmovima, Schmidt je predložio razvoj višeslojnih preparata tipa filmova, navodeći da je neuniformnost filmova svojstvena njihovoj jednoslojnoj prirodi. Međutim, Yang et al. je opovrgao ovo tumačenje i prešao je na izradu oralno-disperzibilnih filmova čija se izrada lako može prilagoditi izradi mukoadhezivnih bukalnih filmova. Yang et al. je istakao da je samoagregacija bila jedan od glavnih razloga zašto su filmovi pokazivali lošu ujednačenost sadržaja lekovite supstance, a utvrđeno je da je proces sušenja ključan u sprečavanju agregacije ili konglomeracije sastojaka formulacije filma. Tokom dugog procesa sušenja dolazi do pojave intermolekularnih sila privlačenja i konvektivnih sila, što dovodi do problema samoagregacije. Dodavanje sredstava za povećanje viskoziteta i polihidroksilnih alkohola može smanjiti potencijal samoagregacije [73]. Najčešće korišćen pristup za procenu ujednačenosti sadržaja lekovite supstance je određivanje lekovite supstance po masi filma, a ne po površini izlivanja. Takođe, primena pojedinačnih silikonskih kalupa sa pojedinačnim šupljinama za izlivanje za svaki farmaceutski oblik značajno poboljšava ujednačenost sadržaja lekovite supstance u filmovima u odnosu na jednu veliku površinu kalupa za izlivanje, kao i uniformnost debljine filmova [36].



**Slika 1.6.** Šematski prikaz izrade mukoadhezivnih bukalnih filmova

Jačina doze filma može se menjati korišćenjem filmova različitih veličina. Ovaj pristup je povoljan u pogledu proizvodnje filmova, jer je potrebna samo jedna proizvodna linija, a različite doze se mogu obezbediti variranjem veličine rezanja filma [61]. Na *Slici 1.7* su predstavljeni Breakyil<sup>®</sup> filmovi

(MEDA Pharma GmbH, Nemačka) različitih veličina u zavisnosti od sadržaja lekovite supstance [62]. U pitanju su dvoslojni mukoadhezivni bukalni filmovi, kod kojih je lekovita supstanca, fentanil-citrat, inkorporirana u jedan mukoadhezivni sloj koji se pričvršćuje za bukalnu sluzokožu, dok drugi neaktivni sloj služi kao zaštitni sloj koji obezbeđuje da se lekovita supstanca oslobađa samo jednosmerno, prema sluzokožu, i samo neznatno proguta. Upravo je fleksibilnost u doziranju lekovite supstance još jedna prednost filmova.



**Slika 1.7.** Različite veličine i jačine komercijalno dostupnog mukoadhezivnog bukalnog filma Breakyil®: 200 µg, 400 µg, 600 µg, 800 µg i 1200 µg cm<sup>2</sup> (prilagođeno prema [62])

Poželjno je da filmovi za humanu upotrebu imaju malu veličinu između 0,5-1 inča (1,3-2,5 cm) sa 0,5-1 inča (1,3- 2,5 cm), najpoželjnije je da budu oko 0,75 inča×0,5 inča (1,9 × 1,3 cm) s obzirom na ograničen prostor u usnoj duplji [51].

## 1.6 QbD pristup u razvoju mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova

Koncept eksperimentalnog dizajna potiče još od 1920-ih godina radom čuvenog engleskog statističara i matematičara Ronalda Fišera. Njegove knjige „Statističke metode za istraživače”, „Uređenje polja eksperimenata“ i „Dizajn eksperimenata“ predstavljaju stubove statističkog razmišljanja u nauci i industrijskim primenama. Njegov rad su nastavili i proširili Walter A. Shewhart, William E. Deming i Joseph M. Juran, koji su promovisali potrebu za kulturom usredsređenom na proces ugradnje kvaliteta u proizvode. Juran je i skovao termin „*Quality by Design* - dizajniranje kvaliteta, QbD“, čime je istaknuta važnost fokusiranja na proces u odnosu na ispitivanje proizvoda u obezbeđenju kvaliteta [63].

Farmaceutski sektor je zasnovan na procesima i orijentisan na kvalitet, ali je u ovoj oblasti QbD koncept usvojen zapravo tek posle predloga vodećih regulatornih agencija (FDA, EMA) početkom novog milenijuma, koje su prepoznale da se „*kvalitet ne može testirati u proizvodima, već bi kvalitet trebalo da bude ugrađen dizajnom*“. Ovo je direktno, ali kasno priznanje značaja teorije kvaliteta u farmaceutskom razvoju [63].

Globalni zahtevi kvaliteta novog proizvoda i dalje ostaju isti: obezbediti potrebni farmaceutski kvalitet, bezbednost i efikasnost farmaceutskog preparata. Farmaceutski kvalitet proizvoda, prema konceptu dizajna kvaliteta, identifikuje se kroz faktore definisane kao kritične za kvalitet ali iz perspektive pacijenta. Ovi faktori se povezuju sa atributima kvaliteta proizvoda i ekscipijensa i

utvrđuje se kako kritični procesni parametri mogu biti varirani a da se postigne dobijanje proizvoda konzistentnog kvaliteta. U nastavku je navedeno 5 ključnih elemenata QbD pristpa (Slika 1.8) [64]:

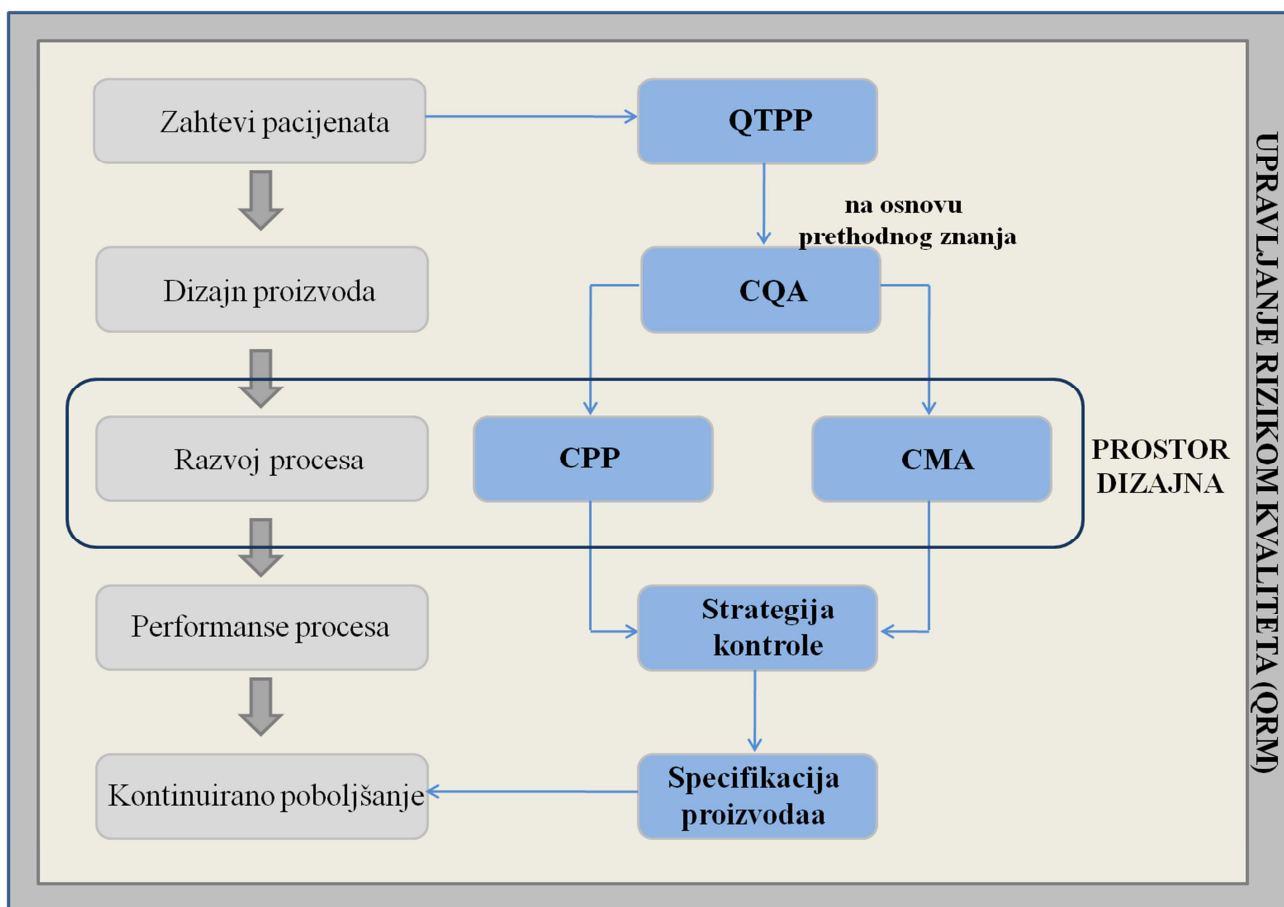
1. **Kvalitet (QTPP + CQA)** - Definisane ciljanog profila kvaliteta proizvoda (engl. quality target product profile, QTPP), koji je osnova razvoja formulacije i proizvodnog procesa predstavlja rezime željenog kvaliteta gotovog proizvoda, uzimajući u obzir bezbednost i efikasnost. QTPP sadrži listu kritičnih atributa kvaliteta (engl. critical quality attributes, CQA) finalnog proizvoda. CQA su fizička, hemijska, biološka ili mikrobiološka svojstva ili karakteristike koje se moraju kontrolisati kako bi se osiguralo da lek ispunjava svoj QTPP finalnog proizvoda, kao što su uniformnost, degradacija, veličina, oblik i boja, u okviru odgovarajuće granice, opsega ili distribucije.

2. **Proizvod (CMA)** - Dobro razumevanje proizvoda je neophodno da bi se utvrdilo da li proizvod može da zadovolji potrebe pacijenata i da održi performanse tokom svog roka trajanja. Temeljno razumevanje proizvoda mora uključiti sve kritične attribute materijala (engl. *critical material attributes*, CMA) bilo kog ulaznog materijala u okviru prihvatljivog ograničenja, opsega ili distribucije da bi se obezbedio željeni QTPP.

3. **Proces (CPP)** - Dobro razumevanje procesa mora uključiti identifikaciju kritičnih procesnih parametara (engl. *critical process parameters*, CPP), koji po definiciji imaju značajan uticaj na gotovi proizvod; zatim identifikacija veze između CMA, CPP i CQA; i temeljno razumevanje *scale-up* principa. CPP treba pratiti i kontrolisati tokom proizvodnje kako bi se osiguralo da proces daje željeni QTPP.

4. **Strategija kontrole** (engl. *control strategy*) - Utvrđivanje kontrole celog procesa ima prednost u odnosu na tradicionalno testiranje gotovog proizvoda. Proizvodno okruženje koje funkcioniše u okviru statističke kontrole i unutar opsega materijala i procesa kojima upravlja prostor dizajna (engl. *design space*) smanjuje potrebu za regulatornim nadzorom. Prostor dizajna je višedimenzionalna kombinacija i interakcija CPP-a za koje je pokazano da obezbeđuju osiguranje kvaliteta. Alati upravljanja kvalitetom mogu se koristiti za efikasnu implementaciju strategije kontrole.

5. **Kontinuirano poboljšanje** - Integrisanje kvaliteta kroz dizajn omogućava proizvođačima da izvrše prilagođavanje procesa i materijala unutar prostora dizajna, čak i nakon dobijanja dozvole za stavljanje leka u promet. Uspostavljanje neprekidnog praćenja procesa obezbeđuje stalan kvalitet što omogućava farmaceutskim kompanijama da u kraćem vremenu postignu ciljne rezultate navedene u QTPP-u, a time postignu i brži dolazak farmaceutskog preparata na tržište.



**Slika 1.8.** Koncept dizajna kvaliteta kao sistemskog pristupa koji obezbeđuje doslednu proizvodnju lekova koji ispunjavaju zahteve pacijenata kroz razumevanje proizvoda, procesa, kontrole i upravljanja rizikom

Eksperimentalni dizajn ili dizajn eksperimenata (engl. *Design of experiments*, DoE) je glavna komponenta statističkog alata za primenu QbD koncepta u istraživačkom i industrijskom okruženju. To je strukturirana, organizovana metoda za određivanje odnosa između faktora (promenljivih) koji utiču na proces i rezultata tog procesa. Drugim rečima, to je sredstvo za dobijanje znanja o procesu, kroz uspostavljanje matematičkih odnosa između ulaza i izlaza nekog procesa. Dizajniranje kvaliteta proizvoda (engl. *Quality by design*, QbD) je koncept koji se definiše kao sistematski pristup razvoju proizvoda koji počinje sa unapred definisanim ciljevima i naglašava razumevanje proizvoda i procesa, kao njegove kontrole, na osnovu zdrave nauke i upravljanja rizikom kvaliteta. DoE se može podeliti u tri glavne kategorije: *Screening* dizajn, dizajn površine odgovora (engl. *Response surface design*) i dizajn smeše (engl. *Mixture design*). Prva dva tipa se obično koriste uzastopno za proučavanje nezavisnih varijabli (koje karakteriše nulta ili minimalna kovarijansa među sobom), dok se poslednji tip koristi u slučaju promenljivih smeša (komponenti), odnosno promenljivih koje nisu nezavisne (zbir njihovih vrednosti mora biti 1 ili 100%) [63,65].

Treba napomenuti da postoje brojne tehnike matematičkog modelovanja, kao pomoć u farmaceutskom razvoju u okviru QbD koncepta i procesne analitičke tehnologije (engl. *Process Analytical Technology*, PAT). To su na primer tehnike multivarijantne analize podataka (engl. *Multivariate Data Analysis*, MVDA). Međutim, s obzirom na proaktivnu prirodu QbD, DoE se smatra glavnim sistematskim pristupom koji zahteva implementaciju statističkog razmišljanja u početnoj tački

farmaceutskog razvoja. Prednosti upotrebe DoE u poređenju sa tradicionalnim “jedan faktor u vremenu - OFAT eksperimentima” (engl. One-Factor-At-a-Time, OFAT) su [63]:

- Maksimiziranje znanja o procesu, uz minimalnu upotrebu resursa;
- Obezbeđenje tačnih informacija na najefikasniji mogući način;
- Identifikacija efekata interakcije promenljivih;
- Karakterizacija relativnog značaja svakog faktora;
- Predviđanje ponašanja procesa unutar prostora za dizajn;
- Uspostavljanje čvrstog uzročno-posledičnog odnosa između kritičnih procesnih parametara (engl. *Critical process parameters* - CPP) i kritičnih atributa kvaliteta (engl. *Critical quality attributes* - CQA);
- Omogućavanje optimizacije CQA odgovarajućim izborom CPP-a, čime se uspostavlja dokazano prihvatljiv opseg (engl. *Proven Acceptable Range*, PAR), tj. adabirom procesnih parametara iz ovog opsega, uz zadržavanje drugih parametara konstantnim, rezultiraće da proizvod ispunjava relevantne kriterijume kvaliteta;
- Omogućanje optimizacije višestrukih odgovora. Kako farmaceutski proizvodi pokazuju nekoliko CQA-a, potrebna je njihova optimizacija.
- Obezbeđenje robusnosti proizvoda ili procesa, drugim rečima, učiniti ih relativno neosetljivim na spoljašnje uticaje, , kao i na uticaje na koje nije moguće uticati;
- Osiguravanje zaštite od *outlier*-a kroz njihovu efikasnu identifikaciju u okviru strukturiranih eksperimentalnih matrica.

Specifična tehnika eksperimentalnog dizajna, D-optimalni dizajn smeše, korišćena je za razvoj formulacije, u cilju identifikacije i procene efekata odabranih hidrofilnih polimera na jačinu mukoadhezivne veze i brzinu rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta. Tablete su smeše aktivnih supstanci i ekscipijenasa. Smeše označavaju da je ukupan zbir svih sastojaka čini 100%.

Ova statistička tehnika je pogodna za optimizaciju procesa proizvodnje tableta. D-optimalni dizajn je osmišljen tako da minimizira ukupnu varijansu predviđenog koeficijenta regresije maksimiziranjem vrednosti determinante informacione matrice. U poređenju sa drugim dizajnom poput *simplex-lattice* i *simplex-centroid*, D-optimalni dizajn ima manji broj ciklusa i stoga omogućava uštedu u vremenu, novcu i količini lekovite supstance u fazi razvoja formulacije. Osim toga, ova tehnika omogućava da se komponente formulacije i procesne promenljive zajedno mogu koristiti u istom eksperimentalnom dizajnu [66].

Dizajn smeše se koristi za karakterizaciju formulacija i optimizaciju farmaceutskih preparata, a primenjuje se kada je definisana ukupna količina kompozicije (npr. kod tableta sa fiksnom masom). Ovom tehnikom se postiže racionalizacija upotrebe svakog sastojka i njegov udeo u formulaciji. Primena dizajna smeše podrazumeva da komponente u formulaciji nisu nezavisne jedna od druge, već da se sa povećanjem udela jedne komponente, udeo jedne ili više preostalih komponenti smanjuje [63]. Upotreba dizajna smeše, kao DoE pristupa, omogućava identifikaciju i kvantifikaciju potencijalnih interakcija između polimera, sa ciljem definisanja optimalnih parametara formulacije omogućavajući na taj način razvoj dvoslojnih bukalnih mukoadhezivnih tableta željenih karakteristika. Zapravo, ova DoE tehnika omogućava analizu efekata jednog polimera, kao i interakcije između polimera, na izlazne parametre (zavisne varijable), kada je ukupan sadržaj komponenata u formulaciji konstantan.

Prilikom odabira matematičkog modela procenjeni su sledeći statistički parametri: interval pouzdanosti ( $p < 0,05$ ), koeficijent determinacije ( $R^2$ ), prilagođen koeficijent determinacije ( $R^2$  adj - ukazuje na frakciju/procent varijabilnosti podataka koja se može objasniti modelom, pri čemu je prilagođen uzimajući u obzir broj članova u modelu, u odnosu na broj tačaka u dizajnu) i predviđeni

koeficijent determinacije ( $R^2$  pred - pokazuje koliko dobro model predviđa vrednost odgovora zavisno promenljivih) [65]. Prilikom odabira matematičkog modela, treba se rukovoditi sledećim pravilima:  $p$  vrednost značajnosti koeficijenata treba da bude manja od 0,05 (značajnost na nivou pouzdanosti od 95%) kako bi parametar imao statističku značajnost, a vrednosti prilagođenog i predviđenog koeficijenta determinacije treba da budu pozitivne, bliske i veće od 0,9 jer to ukazuje na dobro fitovanje [65]. I vrednosti do 0,6-0,7 mogu da obezbede zadovoljavajuće modele ukoliko nije potrebna visoka preciznost predviđanja modela [65].

Od uvođenja ICH Q8 smernica, koje su obezbedile adekvatno okruženje za korišćenje eksperimentalnog dizajna, primećen je dramatičan porast relevantnih naučnih radova i primene eksperimentalnog dizajna u farmaceutske industriji, što je dodatno podržano dostupnošću softverskih programa [63]. Ovo je potvrdilo Bhoteov<sup>1</sup> stav da je eksperimentalni dizajn “ključ za magično kraljevstvo kvaliteta”. Na taj način je omogućeno da se u razvoju lekovitih preparata iskoriste potencijalne prednosti eksperimentalnog dizajna, pa je on sada važna podrška prilikom primene koncepta dizajniranja kvaliteta proizvoda [63,67].

Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) je tehnika koja se koristi kako bi se redukovao broj podataka, obezbedila vizuelizacija i olakšala interpretacija istih, ali u isto vreme minimizirajući gubitak informacija [68]. To je jedna od najjednostavnijih multivarijantnih tehnika, kao korisnih alata QbD pristupa. Ovu tehniku je prvi put opisao Karl Pearson 1901.godine po analogiji sa glavnim osama u mehanici, ali je opis izracunavanja i naziv pod kojim je metod danas poznat dao Harold Hotteling 1933.godine. PCA je matematički postupak koji transformiše veliki skup varijabli u manji dimenzionalni skup novih varijabli, koje su označene kao glavne komponente (engl. *principal component*, PC) [68]. U literaturi se za nove varijable sreće i naziv latentne varijable (engl. *latent variables*, LV). Primena PCA omogućava upotrebu jednostavnijih grafičkih prikaza zahvaljujući redukciji originalnih varijabli na manji broj čime se poboljšava interpretacija informacija sadržanih u podacima. Zbog ovog smanjenja dimenzionalnosti skupa podataka, PCA obično se naziva i tehnika projektovanja podataka. Detaljna interpretacija algoritama PCA može se naći u preglednom radu [69]. Ovo je tehnika istraživačke analize koja se, zavisno od cilja analize, može samostalno koristiti za identifikaciju karakteristika, obrazaca ili klastera u podacima (npr. tokom ispitivanja ili tokom praćenja proizvoda i procesa) ili se jednostavno koristi kao polazna tačka za složenije analize sa ciljem da se pruži početni uvid u karakteristike skupa podataka.

Glavne komponente ( $Z$ ) zapravo predstavljaju linearne kombinacije originalnih varijabli ( $X_1, X_2, X_3, \dots, X_p$ ) i međusobno nisu u korelaciji. Nepostojanje korelacije znači da nove varijable obuhvataju međusobno različite “dimenzije” podataka i njihove varijanse su poređane opadajućim nizom ( $\text{Var}(Z_1) \geq \text{Var}(Z_2) \geq \dots \geq \text{Var}(Z_p)$ ). Ako postoji  $p$  varijabli u sistemu, onda će postojati i  $p$  glavnih komponenti.

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots + a_{1p}X_p$$

$$Z_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \dots + a_{2p}X_p$$

⋮

⋮

⋮

$$Z_p = a_{p1}X_1 + a_{p2}X_2 + a_{p3}X_3 + \dots + a_{p1p}X_p$$

---

<sup>1</sup> Keki R. Bhote - predsednik Keki R. Bhote udruženja, konsultantske grupe specijalizovane za poboljšanje kvaliteta i produktivnosti, autor knjige “World Class Quality: Using Design of Experiments to Make it Happen”

Prva glavna komponenta je ona koja obuhvata/objašnjava najveću varijabilnost u skupu podataka, a svaka naredna glavna komponenta je ta koja obuhvata najveći udeo preostale varijabilnosti. PCA se smatra uspešnom ukoliko prve dve glavne komponente objašnjavaju više od 50% ukupne varijabilnosti.

Analiza glavnih komponenti ne uspeva uvek u tome da veliki broj originalnih varijabli  $X$  smanji na mali broj izvedenih varijabli  $Z$ . Ako originalne varijable nisu u korelaciji, analiza neće postići nikakav rezultat. Najbolji rezultati se postižu kada su originalne varijable u visokoj korelaciji, bilo pozitivnoj ili negativnoj. Ako postoji takav slučaj, onda se može očekivati da će se skup od 20 originalnih varijabli redukovati na svega dve ili tri glavne komponente. Pored toga, korisna će biti i činjenica da je otkriven visok stepen redundantnosti kod originalnih varijabli.

Da bi se dobili i koristili rezultati analize glavnih komponenti, nije potrebno znati kako se jednačine za glavne komponente izračunavaju. Međutim, potrebno je poznavati prirodu jednačina. Analiza glavnih komponenti podrazumeva pronalaženje ajgen vrednosti (svojstvenih vrednosti) matrice kovarijansi uzorka. Matrica kovarijansi je simetrična i ima sledeći oblik:

$$C = \begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & \dots & \dots & c_{1p} \\ c_{21} & c_{22} & \dots & \dots & c_{2p} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ c_{p1} & c_{p2} & \dots & \dots & c_{pp} \end{pmatrix}$$

U matrici dijagonalni elementi  $C_{pp}$  su zapravo varijansa originalne promenljive  $X_p$ , dok su ostali elementi van dijagonale,  $C_{ij}$ , kovarijanse originalnih promenljivih  $X_1$  i  $X_p$ . Varijanse glavnih komponenti su ajgen vrednosti matrice  $C$ . Postoji  $p$  ajgen vrednosti, od kojih su neke nula. Negativne ajgen vrednosti ne mogu biti negativne u matrici kovarijansi. **Ajgen vrednost  $\lambda_p$  je zapravo varijansa glavne komponente  $Z_p$ , odnosno  $\lambda_p = \text{Var}(Z_{pp})$ .** Važna osobina ajgen vrednosti je da je njihov zbir jednak zbiru elemenata na dijagonali matrice  $C$ :

$$\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots + \lambda_p = C_{11} + C_{22} + C_{33} + \dots + C_{pp}$$

Iz ovoga proizilazi da je suma varijansi originalnih varijabli jednaka sumi varijansi izvedenih varijabli. To znači da glavne komponente obuhvataju sve varijacije originalnih podataka.

Hotellingov (Hotelling)  $T^2$  parametar je merilo koliko je daleko neka observacija od centra PCA modela. Obično se koristi interval pouzdanosti od 95% za identifikaciju podataka koji ne pripadaju grupi. Ovaj interval pouzdanosti se prikazuje elipsom u softverskom izlazu prilikom generisanja grafika skorova za PCA modele. Ako su podaci normalno raspodeljeni, onda 95% podataka spada u Hotellingovu  $T^2$  elipsu.

## 1.7 Karakterizacija mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova

### 1.7.1 Brzina rastvaranja lekovite supstance iz mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova

Uprkos velikom istraživačkom naporu i velikom broju objavljenih istraživanja iz oblasti bukalnih farmaceutskih oblika lekova, ipak je mali broj lekova došao na globalno tržište. Ovo bi moglo biti posledica nedostatka farmakopejskih metoda za *in vitro* ispitivanje pre svega bukalnih farmaceutskih oblika lekova, tipa filmova. Iako je Američka farmakopeja predložila aparaturu USP 5 (lopatica iznad diska), u literaturi se mogu videti različite eksperimentalne postavke bez konsenzusa oko zapremine i sastava medijuma za rastvaranje koje bi trebalo koristiti u takvim ispitivanjima [70]. Brzina rastvaranja lekovite supstance je kritičan atribut kvaliteta za sve farmaceutske oblike lekova tipa filmova za oralnu sluzokožu (oralni filmovi, bukalni filmovi i sublingvalni filmovi) [71]. Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance se može koristiti kao važno ispitivanje za usmeravanje dizajna formulacije i razvoja procesa, kao i za praćenje značajnih promena u farmaceutskom obliku leka tokom proizvodnje, što se obično smatra prvom ulogom ovakvog rastvaranja. Osim toga, dobijene *in vitro* profile brzine rastvaranja se nekad mogu povezati sa njihovim *in vivo* performansama (Cp-t profil leka). Prema tome, ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance igra važnu ulogu u kontroli kvaliteta farmaceutskih oblika lekova tipa filmova za oralnu sluzokožu [71].

Određivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskih oblika lekova se izvodi u odgovarajućem medijumu. Međutim, ni evropska ni američka farmakopeja ne definišu sastav veštačke salive (*simulated salivary fluids* - SSF). Pregledom literature može se videti da se fosfatni pufer pH vrednosti 4,5-7,4 koristi kao medijum za ispitivanje brzine rastvaranje lekovite supstance iz farmaceutskih preparata za oralnu sluzokožu [72]. U određenom broju radova korišćena je humana saliva kako bi se razvio biorelevantan medijum za ispitivanje preparata za oralnu sluzokožu. Guhmann i saradnici opisuju veštačku salivu kao vodeni puferovani rastvor natrijumovih, kalijumovih i kalcijumovih soli čija je pH podešena na 7,4 koji se može koristiti za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz orodisperzibilnih tableta i filmova [23]. Prečišćena voda zagrejana na sobnu temperaturu se takođe može koristiti kao medijum za ispitivanje brzine rastvaranje lekovite supstance i ispitivanje raspadljivosti, ali je prihvatljiva u preliminarnoj fazi razvoja preparata. U cilju postizanja biorelevantnih uslova, temperatura, sastav i zapremina medijuma postaju veoma važni parametri ispitivanja. Velike zapremine medijuma koje se obično primenjuju za ispitivanje brzine rastvaranja (npr. 900 ml) su ispravne sa aspekta kontrole kvaliteta, međutim, definitivno nisu biorelevantne. Naime, dostupna količina tečnosti u usnoj duplji je mnogo manja nego što se koristi u ovim ispitivanjima. Osim toga, farmaceutski oblik leka koji je pričvršćen za sluzokožu ima ograničen pristup tečnosti sa svoje pozicije na sluzokoži. Kada su u pitanju permanentne formulacije (bukalni flasteri) koje su namenjene za uklanjanje iz usne duplje nakon oslobađanja lekovite suspatnace, razvijenom metodom za ispitivanje brzine rastvaranja se mora dokazati otpornost lekovitog preparata na dezintegraciju [30].

Evropska farmakopeja navodi da bi *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja trebalo sprovesti kako bi se pokazalo odgovarajuće oslobađanje lekovite supstance, ali ne definiše detalje tog ispitivanja. Međutim, uslovi ispitivanja brzine rastvaranja *in vitro* iz konvencionalnih čvrstih farmaceutskih oblika nisu pogodni za formulacije filmova. Naime, postavljanje filma u cilindrične posude bez držača uzorka može dovesti do loše ponovljivosti rezultata jer se filmovi mogu zalepiti za unutrašnju površinu cilindrične posude, plutati, ili se zalepiti za lopaticu. Isti problemi se mogu javiti prilikom postavljanja korpice, sinkera i u ćeliji aparature sa protočnom ćelijom. Međutim, moguće je pričvrstiti film na definisanom mestu u cilindrične posude uz pomoć lepka kako bi se dobili ponovljivi rezultati [30].

Metode koje se koriste za transdermalne sisteme mogu se razmotriti za primenu za ispitivanje formulacija filmova. Evropska farmakopeja opisuje tri metode za ispitivanje oslobađanja lekovite



supstance iz transdermalnih flastera. Disk se može koristiti kako bi film bio pozicioniran na dnu cilindrične posude ispod lopatice. Držać uzorka može biti modifikovan ili prilagođen za manje uzorke. Lopatica može biti zamenjena korpicom, pri čemu se flaster pomoću lepka pričvršćuje na spoljašnjoj strani zida korpice. Površina za oslobađanje biva okrenuta ka medijumu za rastvaranje. Temperatura medijuma za rastvaranje treba da bude podešena sa  $32 \pm 0,5$  °C na  $37 \pm 0,5$  °C, kada se ova metoda koristi za filmove ili flastere za oralnu sluzokožu [30].

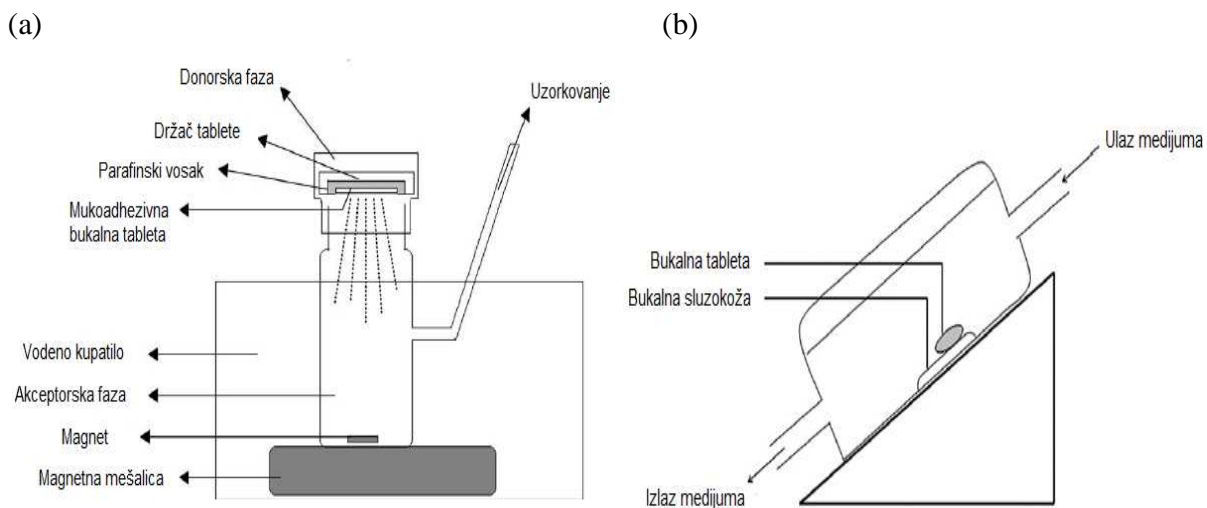
Pregledom literature uočeno je da se obično za ispitivanje brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz bukalnih preparata koriste najviše aparatura sa korpicom i aparatura sa lopaticom. Međutim, zbog ograničenja obe metode, mnogi istraživači su predložili upotrebu modifikovanih aparatura. Većina njihovih modifikacija sastojala se u smanjenju zapremine medijuma za rastvaranje, obično uključujući modifikacije vrste posude, modifikacije dodataka za mešanje i vrsta medijuma za rastvaranje, kao što je veštačka saliva (Tabela 1.4).

Jedno interesantno istraživanje iz 2019. godine koga su sprovedi Speer i sardanici daje pregled upotrebe četiri farmakopejskih i nefarmakopejskih aparatura za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz MBF i orodisperzibilnih filmova (ODF). To su bile aparatura sa korpicom, aparatura sa lopaticom iznad staklenog diska, aparatura tipa protočne ćelije sa modifikovanim držačima uzoraka, kao i probijanje i “Punch and Filter-PAF” aparatura. Ovim istraživanjem je utvrđeno da su sve metode adekvatne za ispitivanje brzine rastvaranja iz filmova za oralnu sluzokožu, ali uz napomenu da nisu sve metode pogodne za sve vrste filmova. Aparatura sa lopaticom iznad staklenog diska se pokazala kao pogodna za ispitivanje višeslojnih filmova, kao i za ispitivanje MBF [73].

Pregledom literature uočeno je da količina medijuma koja se koristi za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja dosta varira. Opisane metode koriste zapreminu medijuma između nekoliko mililitara i jednog litra, uglavnom puferske vodene rastvora. Film se postavlja na nerđajuću čeličnu mrežicu i biva vlažen medijumom za rastvaranje sa dna (akceptorsko mesto). Zapremina medijuma u ovom slučaju je 125 mL. Upotreba ovakvih manjih zapemina medijuma dovodi do realnijih *in vitro* profila brzine rastvaranja, pošto je mala zapremina salive dostupna u usnoj duplji [30].

U okviru FDA baze podataka mogu se pronaći preporučeni eksperimentalni uslovi za ispitivanje brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz bukalnih farmaceutskih oblika lekova (Tabela 1.5) [74]. Preporučuje se primena vodenih rastvora pH vrednosti koje odgovaraju fiziološkom rasponu pH vrednosti (voda, fosfatni pufer). U slučaju slabo rastvornih lekovitih supstanci (mikonazol, testosteron) preporučuje se primena površinski aktivnih materija (natrijum-laurilsulfat) u koncentraciji do 1%. Zapremina medijuma je u intervalu od 60 do 1000 mL. Što se tiče vremena trajanja testa, preporučeno ispitivanje bukalnih filmova je u intervalu od 45 do 60 minuta, dok je kod tableta sa produženim oslobađanjem brzinu rastvaranja lekovite supstance potrebno pratiti u toku 12 i 24 sata, odnosno 20 minuta u slučaju bukalnih tableta sa trenutnim rastvaranjem.

Nedavno je razvijen alternativni test za ispitivanje brzine rastvaranje lekovite supstance iz preparata za primenu u ustima (oralno-disperzibilne tablete, bukalne tablete, sublingvalne tablete), koji podrazumeva primenu humane salive kao medijuma za rastvaranje za biorelevantno ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance [75]. Eksperimentalna postavka se sastoji od 6 staklenih epruveta u kojima se nalazi po 1 mL sakupljene veštačke salive, koje se drže u vodenom kupatilu zagrejanom na 37 °C uz mešanje magnetnom mešalicom. Ikinci i saradnici su ispitivali mogućnost primene modifikovane Franc-ove difuzione ćelije u svrhu *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja [76]. Medijum za ispitivanje je bio fosfatni pufer pH 7,4 u zapremini od 22 mL. Uniformno mešanje medijuma obezbeđeno je mešanjem na magnetnoj mešalici pri brzini od 300 rpm. Da bi se obezbedilo jednosmerno oslobađanje, svaka mukoadhezivna bukalna tableta je ugrađena u parafinski vosak koji je stavljen na vrh goveđe bukalne sluzokože koja je služila kao membrana (Slika 1.9.a).



**Slika 1.9.** Sistem za procenu *in vitro* brzine rastvaranja lekovite supstance (prilagođeno prema [76,77]).

Mumtaz i Ch' ng [77] su razvili metod za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz bukalnih tableta koji je zasnovan na cirkulaciji prethodno zagrejanog medijuma kroz ćeliju, pri čemu je bukalna tableta pričvršćena za animalnu sluzokožu kao što je prikazano na [Slici 1.9b](#).

**Tabela 1.4.** Pregled eksperimentalnih uslova za izvođenje ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz mukoadhezivnih bukalnih filmova (MBF), mukoadhezivnih bukalnih tableta (MBT) i mukoadhezivnih bukalnih flastera (MBP)

Lekovita supstanca	Farmaceutski oblik	USP aparatura	Intenzitet mešanja (rpm)	Medijum	Zapremina medijuma (mL)	Referenca
Triamcinolon-acetonid	MBF	Aparatura sa lopaticom iznad diska	75	Fosfatni pufer pH 6,8	900	[78]
Risperidon	MBT	Aparatura sa lopaticom	50	0,5% natrijum-dodecilsulfat u fosfatnom puferu pH 6,6	500	[79]
Aceklofenak	MBT	Aparatura sa lopaticom	50	Fosfatni pufer pH 7,4	900	[80]
Diklofenak-natrijum	MBT	Aparatura sa lopaticom	50	Fosfatni pufer pH 6,8	900	[81]
		Aparatura sa protočnom ćelijom	2 mL/min	Fosfatni pufer pH 6,8	/	[82]
Indometacin	MBT	Aparatura sa lopaticom	50	Veštačka saliva	900	[82]
Lidokain-hidrohlrid*	MBF	Modifikovana aparatura sa lopaticom	50	Demineralizovana voda	100	[83]
Propranolol-hidrohlrid	MBT	Aparatura sa lopaticom	100	Fosfatni pufer pH 7,4	/	[84]
	MBF	Aparatura sa lopaticom iznad diska	50	Dejonizovana voda	200	[85]
Propranolol-hidrohlrid*	MBT	Modifikovana aparatura sa lopaticom	50	Fosfatni pufer pH 6,8	200	[86]
	MBT	Modifikovana aparatura sa	50	Fosfatni pufer pH 6,8	200	[87]

		lopaticom				
	MBF	Modifikovana aparatura sa lopaticom	/	Fosfatni pufer pH 6,8	40	[49]
	MBF	Čaša postavljena na magnetnu mešalicu	/	Fosfatni pufer pH 7,4	10	[88]
Furosemid*	MBF	Čaša postavljena na magnetnu mešalicu	150	Fosfatni pufer pH 7,4	50	[89]
Tramadol*	MBF	Modifikovana aparatura sa lopaticom	50	Fosfatni pufer pH 6,8	50	[90]

\* modifikovana aparatura

**Tabela 1.5.** Preporučeni eksperimentalni uslovi za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz bukalnih farmaceutskih oblika lekova [74]

Lekovita supstanca	Farmaceutski oblik	USP aparatura	Intenzitet mešanja (rpm)	Medijum	Zapremina medijuma (mL)	Vreme uzorkovanja
Aciklovir	Bukalna tableta	Aparatura sa korpicom	60	Fosfatni pufer pH 6,0	1000	1, 2, 3, 5, 7, 9 i 12 h
Buprenorfin-hidrochlorid	Bukalni film	Aparatura tipa mini korpice	100	Fosfatni pufer pH 4,5	60	10, 15, 20, 30, 45 i 60 minuta
Fentanil-citrat	Bukalna tableta	Aparatura tipa mini lopatice	100	Fosfatni pufer pH 7,0	100	3, 5, 7,5, 10, 15 i 20 minuta
	Bukalna tableta	Aparatura tipa mini lopatice	100	Fosfatni pufer pH 7,0	200	3, 5, 7,5, 10, 15 i 20 minuta
	Bukalni film	Aparatura tipa mini korpice	100	Fosfatni pufer pH 6,4	60	5, 10, 15, 20, 30 i 45 minuta
	Bukalni film	Aparatura tipa mini korpice	100	Fosfatni pufer pH 6,4	100	5, 10, 15, 20, 30 i 45 minuta
Mikonazol	Bukalna tableta	Aparatura sa korpicom	60	0,5% natrijum-dodecilsulfata u vodi	1000	1, 2, 4, 6, 8, 10 i 12 h

				pH 6,5 ± 0,5		
Testosteron	Bukalna tableta sa produženim rastvaranjem	Aparatura sa korpicom (uz upotrenu sinkera)	60	1% natrijum-dodecilsulfata u vodi	1000	1, 2, 4, 6, 10, 12 i 24 h
Aciklovir*	Bukalna tableta	Aparatura sa lopaticom	100	Fosfatni pufer 0,2 M, pH 6,0 0,1% rastvor NaCl, pH 4,0 Fosfatni pufer 0,05 M, pH 6,0 0,1% rastvor NaCl, pH 7,0 veštačka saliva pH 6,8 (fosfatni pufer)	1000	1, 2, 4, 6, 8 i 12 h

\* Draft Guidance on Acyclovir [91]

### 1.7.2 Raspadljivost mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova

Eksperimentalni uslovi za ispitivanje raspadljivosti mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova nisu definisani u Evropskoj farmakopeji. Nisu definisani ni uslovi za ispitivanje raspadljivosti flastera za oralnu sluzokožu koji bi trebalo da se ne raspadnu, ali se očuvanje njihovog integriteta mora potvrditi odgovarajućim ispitivanjem raspadljivosti [61]. Predloženi uslovi standardnog farmakopejskog testa [5] za procenu dezintegracije tableta i kapsula, koji podrazumevaju veliku zapreminu medijuma (800 mL prečišćene vode ili odgovarajućeg rastvora pufera) i mehaničku agitaciju od 29 do 32 uranjanja/min se ne mogu smatrati odgovarajućim [30]. Kako bi se prevazišli nedostaci koji se odnose na primenu standardne metode za ispitivanje raspadljivosti čvrstih farmaceutskih oblika lekova, mnogi istraživači su razvili modifikovane metode za karakterizaciju mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova koji bolje odslikavaju *in vivo* uslove, posebno u pogledu zapremine medijuma [30,92]. Predložena je metoda Petri šolje koja podrazumeva spuštavanje jednog filma u Petri šolju i dodavanje 2-3 mL vode ili odgovarajućeg rastvora pufera. Krajnja tačka ispitivanja je potpuna dezintegracija filma [30]. Preis i saradnici su primenili sličan princip za procenu raspadljivosti filmova s tim što su, nakon dodatka medijuma, vršili konstantno mešanje kako bi se olakšao proces raspadanja i simulirali pokreti usne duplje [92]. Druga predložena metoda se zasniva na postepenom dodavanju po jedne kapi (200  $\mu$ l) vode ili odgovarajućeg puferskog rastvora na površinu fiksiranog filma engl. *slide frame method*. Ova metoda predstavlja dobar način da se okarakteriše raspadljivost filmova, naročito kada se poredi filmovi različite debljine ili višeslojni filmovi [30]. Postepeno dodavanje tako male zapremine medijuma za ispitivanje raspadljivosti je odgovarajuće i pruža stvarnu zapreminu tečnosti za simulaciju vlaženja sluzokože prekrivene salivom. Na ovaj način se omogućava procena trajanja raspadljivosti filma kada se on nalazi na sluzokoži usne duplje [30]. Kako bi se oslikali *in vivo* uslovi u pogledu mehaničkog pritiska koji se vrši na preparat, razvijene su dimaničke metode ispitivanja raspadljivosti. Sakuda i saradnici su primenili modifikovanu aparaturu za ispitivanje raspadljivosti tableta i kapsula, koja podrazumeva pričvršćivanje filma za metalnu šipku koja je u stanju da se spušta i podiže ravnomerno, pri mehaničkoj agitaciji od 30 uranjanja po minuti [93]. Četvrta predložena metoda podrazumeva primenu konvencionalnog uređaja za ispitivanje raspadljivosti tableta i kapsula koji je opremljen sa držačem uzorka za filmove, na koji se šest filmova može istovremeno pričvrstiti pomoću integrisanog uređaja za stezanje. Osim toga, uređaj sadrži tegove mase 3 g koji su fiksirani na donji kraj svakog filma, sa ciljem simulacije mehaničke sile jezika. Ispitivanje se izvodi u 900 mL prečišćene vode zagrejane na  $37 \pm 0.5$  °C, pri mehaničkoj agitaciji od 30 uranjanja po minuti [94]. Speer i saradnici su zaključili da su prve dve predložene metode pogodne za primenu u istraživanju i razvoju farmaceutskih preparata, dok su druge dve predložene metode pogodne za ispitivanja u okviru kontrole kvaliteta [94].

### 1.7.3 Određivanje sadržaja i ujednačenost sadržaja inkorporirane lekovite supstance

Cilj određivanja sadržaja je da se dokaže da je srednja vrednost sadržaja lekovite supstance bliska teorijskoj vrednosti koja je označena na pakovanju [95]. Maksimalno prihvatljivo odstupanje od teorijske vrednosti koja je označena na pakovanju ne sme da prelazi  $\pm 5\%$  sadržaja lekovite supstance [95]. Homogenu distribuciju lekovite supstance u polimernom matriksu treba postići tokom faze izrade/proizvodnje.

Ispitivanje ujednačenosti sadržaja lekovite supstance u MBT/MBF je najprikladnije sprovesti u skladu sa monografijom Evropske farmakopeje "Ujednačenost sadržaja lekovite supstance" (ispitivanje za čvrste farmaceutske oblike - tablete) [5]. Ispitivanje se izvodi tako što se pogodnom analitičkom metodom pojedinačno odredi sadržaj u 10 uzoraka MBT/MBF. Sadržaj lekovite supstance se izražava kao procenat (%) u odnosu na teorijsku vrednost, a potom se izračuna prihvatljiva vrednost (engl. *acceptance value*, AV) i poredi sa dozvoljenom graničnom vrednošću u skladu sa Evropskom

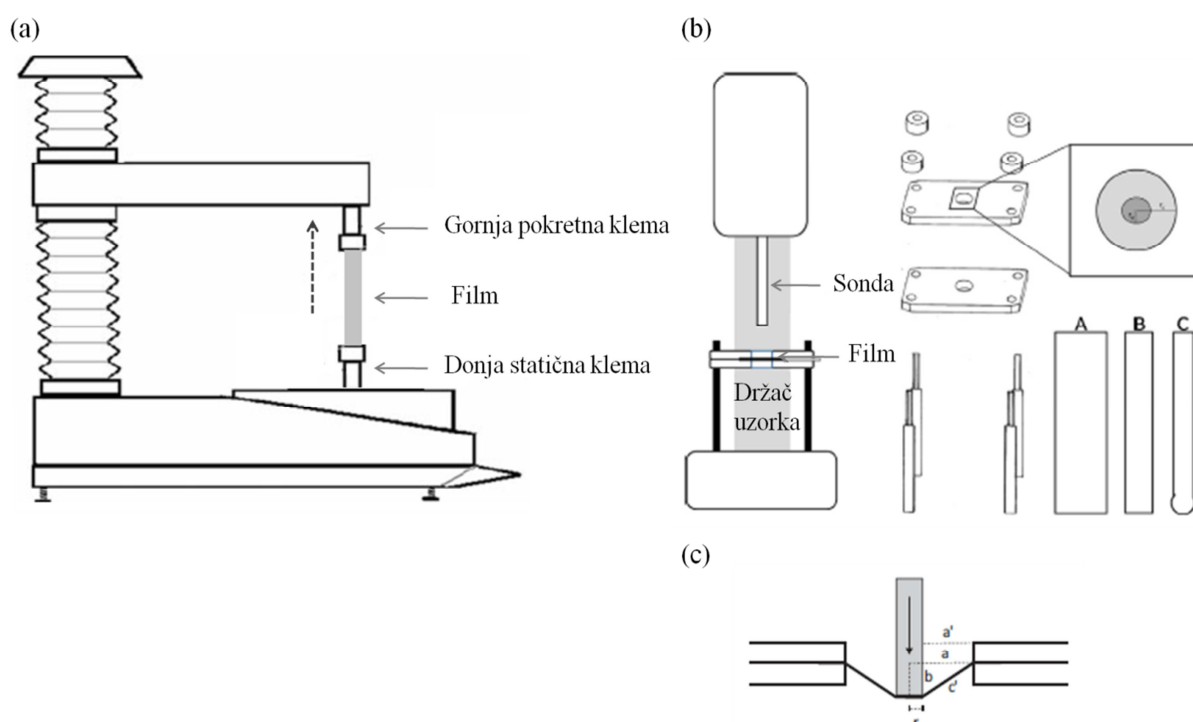
farmakopejom [5]:  $|M - X| + ks$ , gde je  $M$  referentna vrednost,  $X$  je srednja vrednost pojedinačno određenih sadržaja,  $k$  je konstanta prihvatljivosti koja varira u zavisnosti od broja uzoraka (2,4 za  $n = 10$ ; 2,0 za  $n = 30$ ), a  $s$  je standardna devijacija uzorka. Referentna vrednost  $M$  se razlikuje u zavisnosti od ciljanog sadržaja lekovite supstance [5]. Pojedinačni sadržaj lekovite supstance mora biti u opsegu  $(100 - L_2) \times M$  i  $(100 + L_2) \times M$ , pri čemu je  $L_2 = 25$  [5]. Farmakopejski zahtev za ujednačenost sadržaja je ispunjen ukoliko je prihvatljiva vrednost za 10 uzoraka MBT/MBF manja ili jednaka sa  $L_1$  ( $L_1 = 15$ ) [5,95].

#### 1.7.4 Mehanička svojstva mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova

Mehanička čvrstina MBF formulacija je ključni faktor ne samo tokom razvoja ili proizvodnje, već i u pogledu pravilnog rukovanja od strane pacijenta. Postoje različiti faktori koji utiču na mehanička svojstva filmova: film formirajuće sredstvo, vrsta i količina plastifikatora, vrsta i količina (rezidualnih) rastvarača, vrsta i količina lekovite supstance, debljina filma, vrsta proizvodnog procesa i uslovi čuvanja preparata [83]. MBF zahtevaju odgovarajuću robusnost koja se uglavnom opisuje elastičnim svojstvima i mehaničkom čvrstinom kako bi se dobio visokokvalitetni proizvod. Mehanička čvrstina je od posebnog značaja za *scale-up* proizvodnji u farmaceutskoj industriji. Naime, automatizovani procesi proizvodnje u farmaceutskoj industriji (npr. rolne/koturi za prenošenje filmova sa sušenja u skladištenje ili namotavanje proizvoda pre sečenja) zahtevaju robusnost proizvedenih filmova [30].

Najčešće se tenzioni testovi (testovi istezanja) koriste kako bi se utvrdila robusnost formulacija filmova [83,96]. Postoje standardni tenzioni testovi (DIN EN ISO 527-1 i 527-3) koji se najčešće primenjuju za procenu mehaničkih karakteristika filmova [97,98]. U toku izvođenja tenzionog testa (Slika 1.10a) uzorak filma se fiksira između dve kleme (stezaljke), a potom se pokretanjem jedne kleme isteže do momenta preloma ili kidanja filma. Ovo ispitivanje omogućava izračunavanje nekoliko parametara kojima se opisuju mehanička svojstva filmova (Tabela 1.6.). Oni uključuju maksimalnu silu primenjenu na uzorak filma (zatezna čvrstina pri kidanju), izduženje filma tokom procesa istezanja (izduženje pri kidanju) i *Young*-ov modul, poznat kao modul elastičnosti, koji opisuje uticaj istezanja i sile na deformaciju filmova [96,99]. Tenzioni test je opšti metod koji se može primeniti na sve vrste materijala. Međutim, postoje varijacije u eksperimentalnim postavkama (npr. oblik uzorka filma, brzina istezanja, ambijentalni uslovi) i nedostatak definisanih granica za minimalne ili maksimalne vrednosti [83].

Pored pomenute metode, u literaturi je opisana metoda koju su 1988. godine razvili Radebaugh i saradnici a koja se koristi za ispitivanje mehaničkih karakteristika polimernih filmova poznata, pod nazivom test punkcije (engl. *puncture test*) [100]. Ispitivanje se izvodi tako što se uzorak filma pričvrsti između dve ploče sa cilindričnom rupom u sredini (Slika 1.0b). Sonda za probadanje se pomera nadole ka površini filma definisanom brzinom. Meri se sila potrebna za pomeranje, i konačno, za probijanje filma. Rezultati dobijeni ovim merenjima mogu se koristiti za izračunavanje parametara kojim se opisuju mehanička svojstva filmova, prikazani u Tabeli 1.6. Normalizujući rezultate na površinu uzorka ili zapreminu filma, mogu se dobiti poredivi rezultati [83].



**Slika 1.10.** Eksperimentalne postavke za ispitivanje mehaničkih karakteristika filмова primenom testa istezanja (a) i testa punkcije koristeći sonde različite geometrije (cilindrična sonda A, cilindrična sonda B, sferična sonda C) (b); određivanje elongacije filma do trenutka pucanja: deformacija uzorka pre pucanja ( $a$  = poluprečnik filma u otvoru držača uzorka, početna dužina;  $a'$  = početna dužina – poluprečnik sonde;  $b$  = pomeraj sonde;  $c' + r$  = dužina nakon istezanja ;  $c'$  = dužina  $a'$  posle deformacije;  $r$  = poluprečnik sonde) (prilagođeno prema [83])

**Tabela 1.6.** Parametri za procenu mehaničkih svojstava filмова dobijeni primenom tenzionog testa i testa punkcije

<b>Tenzioni test</b>		
Zatezna čvrstina (engl. <i>tensile strength</i> )	$TS = \frac{\text{Sila koja dovodi do pucanja filma (Fmax)}}{\text{Površina poprečnog preseka filma (A)}}$	
Procenat elongacije (engl. <i>elongation at break</i> )	$\varepsilon (\%) = \frac{\text{Povećanje dužine uzorka filma pri istezanju (\Delta L)}}{\text{Početna dužina filma (L0)}} \times 100$	
Young-ov modul	$E = \frac{\text{Sila koja dovodi do istezanja filma (Fstrain)}}{\text{Površina filma}} \times \frac{1}{\text{odgovarajuće istezanje filma}}$	
<b>Test punkcije</b>		
Punkciona čvrstina (engl. <i>puncture strength</i> )	$PS = \frac{\text{Sila koja dovodi do probadanja filma (F)}}{\text{Kontaktna površina sonde i filma (A)}}$	$r$ - poluprečnik filma koji se nalazi u šupljini nosača filma
Procenat elongacije (engl. <i>elongation to puncture</i> ) Slika 1.6c	$\varepsilon_p (\%) = \left( \frac{\sqrt{a'^2 + b^2 + r^2}}{a} - 1 \right) \times 100$	$a'$ - početna dužina uzorka filma; $b$ -



		pomeraj sonde (dubina prodiranja sonde), r - poluprečnik sonde
Punkciona energija po jedinici zapremine	$\Delta E_p = \frac{\text{Površina ispod krive sila-deformacija (AUC)}}{\text{Zapremina filma koja se nalazi u šupljini držača filma (V)}}$	A - površina poprečnog preseka filma koji se nalazi u cilindričnoj šupljini nosača filma

Još jedna dodatna metoda koja se koristi za ispitivanje mehaničkih karakteristika filmova je metoda poznata kao određivanje izdržljivosti na preklapanje (engl. *folding endurance*) [96]. Rukovanje bez oštećenja je preduslov kako bi se obezbedilo da se filmom može rukovati i primeniti bez pucanja [96]. Izdržljivost na preklapanje se procenjuje višestrukim preklapanjem filma u središnjem delu do pucanja ili do unapred definisanog maksimalnog vremena savijanja. Koliko puta se film presavije bez pucanja ili drugih vidljivih promena predstavlja vrednost izdržljivosti na preklapanje [30,101]. U uobičajenim uslovima farmaceutski preparati u obliku filma se ne savijaju, već se primenjuju u svojoj ravnoj formi pa je ovo neuobičajeni stres test, ali ukazuje na krtoš oralnih filmova i/ili njihovu sklonost ka pucanju. Ne postoji preporučeno minimalno vreme preklapanja koje treba da se postigne kako bi se obezbedilo rukovanje preparata bez oštećenja. Literaturne vrednosti izdržljivosti na preklapanje su bile u opsegu od 100 do 500 uzastopnih preklapanja [101,102], pri čemu se vrednosti do 300 uzastopnih preklapanja smatraju zadovoljavajućim [90,96].

Najznačajnija mehanička svojstva MBT su zatezna čvrstina (engl. *tensile strength*), otpornost na lomljenje (čvrstina tableta) i otpornost na habanje (friabilnost). Zatezna čvrstina, odnosno mehanička otpornost tableta ( $\sigma$ ) se preračunava na osnovu jednačine 1.6 [103]:

$$\sigma = \frac{2 \times F}{R \times t \times \pi} \quad 1.6$$

gde je F sila koja dovodi do lomljenja tableta (N), R prečnik (mm) i t debljina tableta (mm).

Zatezna čvrstina ( $\sigma$ ), odnosno mehanička otpornost tableta je važna karakteristika tableta, jer tableta mora biti dovoljno mehanički čvrsta da izdrži dalja rukovanja poput oblganja filmom, pakovanja, transporta i krajnje upotrebe od strane pacijenta, ali i da bude dovoljno slaba kako bi se raspala nakon primene i tako oslobodila svoj sadržaj [104].

Farmakopeja navodi ispitivanje otpornosti tablete na lomljenje (čvrstina tableta), što se u farmaceutskoj industriji definiše kao *hardness test*, a predstavlja silu neophodnu da se tableta slomi preko njenog prečnika [5]. Međutim, otpornost tablete na lomljenje ne uzima u obzir ni dimenzije ni oblik tablete. Konverzija otpornosti tablete na lomljenje u zateznu čvrstinu, koja uzima u obzir prečnik i debljinu tablete, omogućava direktna poređenja između uzoraka tableta različitih veličina i oblika [104].

Friabilnost je odlika tableta koja pokazuje da li se kod neobloženih tableta izloženih mehaničkom stresu ili trenju površina oštećuje i pokazuje znake habanja [5]. Izražava se kao razlika u masi tableta, pre i posle 100 obrtaja za 4 minuta, izražena u procentima u odnosu na početnu masu tableta. Friabilnost ispod 1% ukazuje na dobru mehaničku otpornost tableta [5].

### **1.7.5 Morfologija površine mukoadhezivnih bukalnih filmova i procena kompatibilnosti lekovite supstance i ekscipijenas**

Skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) je korisna tehnika za proučavanje strukture farmaceutskih oblika lekova tipa filmova [101]. SEM mikrografije pružaju informacije o homogenosti strukture filma, glatkoće površine i debljine filma, prisustvo pora i pukotina u strukturi filma [105,106]. Primena liofilizacije i ekstruzije u procesu pripreme dovode do formiranja poroznijih filmova, dok filmovi dobijeni metodom izlivanja imaju neporoznu, gotovo glatku površinu. Stoga se SEM može koristiti za komplementarno ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance i raspadljivosti filmova, jer porozni sistemi mogu da ubrzaju oslobađanje lekovite supstance, ali i raspadljivost filmova. Osim toga, struktura i konekcija slojeva kod višeslojnih filmova može se vizuelizovati skeniranjem poprečnog preseka višeslojnih filmova, kao i vizuelizovanjem strukture gornje i donje površine filma. Ova vrsta mikroskopije se može koristiti u svrhu vizualizacije kristala lekovite supstance, kao i radi praćenja promena fizičkog stanja lekovite supstance tokom čuvanja [30].

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FT-IR spektroskopija) je jedna od važnih metoda u preformulacionim ispitivanjima lekovitih preparata kojom se ispituje prisustvo intermolekulskih interakcija između lekovite supstance i ostalih komponenata farmaceutskog oblika leka [101,107]. Osim u preformulacionim ispitivanjima, ova metoda nalazi primenu i u fazi razvoja i kontrole kvaliteta farmaceutskih oblika lekova. FT-IR spektroskopiju odlikuje visoka osetljivost i tačnost, ekološka prihvatljivost, nedestruktivnost uzorka i jednostavna primena [108].

### **1.7.6 Sadržaj vode**

#### **1.7.6.1 Rezidualni sadržaj vode**

Filmovi dobijeni metodom izlivanja često se prave od vodenog rastvora pri čemu određena količina vode zaostaje unutar finalnog proizvoda, što doprinosi fleksibilnosti filma i smanjenju krтости [50]. Poznato je da molekuli vode deluju kao plastifikatori koji promovšu elongaciju filma i smanjuju zateznu čvrstinu [50]. Rezidualna količina vode može se odrediti titracijom po Karl Fišeru ili gravimetrijski primenom infracrvenog analizatora vlage [30]. Prisustvo vode u formulaciji filmova olakšava mikrobiološku kontaminaciju, zbog čega treba razmotriti uključivanje konzervansa u formulaciju kako bi se obezbedila mikrobiološka stabilnost. Iz navedenog je jasno da je sadržaj vode bitan parametar koji je potrebno optimizovati kako bi se postigla odgovarajuća fleksibilnost filma sa jedne strane i fizička i hemijska stabilnost farmaceutskog preparata sa druge strane [30,83].

#### **1.7.6.2 Apsorpcija vode**

Kapacitet apsorpcije vode mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova je u korelaciji sa raspadljivošću, ali je takođe opisan i kao ključni faktor za svojstvo adhezije [30]. Za procenu kapaciteta upijanja vode ili bubrenja, uobičajeno se primenjuje gravimetrijsko merenje preparata pre i posle izlaganja definisanoj zapremini vode ili drugog pogodnog medijuma. Fosfatni pufer se može koristiti kao medijum za *in vitro* studije apsorpcije vode mukoadhezivnih bukalnih preparata. U svrhu simulacije fizioloških uslova, apsorpcija vode se može ispitivati na agar ploči u inkubatoru i pri čemu se masa nabubrelog filma, odnosno tablete određuje u odgovarajućim vremenskim intervalima [30]. Na osnovu rezultata dobijenog apsorpcionog profila može se doneti zaključak u vezi sa dezintegracijom ispitivanog farmaceutskog oblika, ali i neophodnošću posebnih uslova pakovanja i čuvanja preparata. S

obzirom da hidrofilni polimeri formiraju hidrofilni matriks, tako higroskopan film treba pakovati i čuvati pojedinačno u aluminijumskim kesicama jer kontakt film preparata sa vlagom može ugroziti njegovu fizičku, hemijsku i mikrobiološku stabilnost [30]. MBF i MBT se čuvaju na uobičajenoj temperaturi od 25 °C, eventualno na temperaturama između 15 i 30 °C [62,109].

### 1.7.7 Određivanje mukoadhezije

Uprkos velikom interesovanju za mukoadhezivne sisteme tokom proteklih nekoliko decenija i komercijalizaciji preparata ovog tipa, standardne metode ispitivanja mukoadhezije još uvek nisu razvijene. Ovo predstavlja ograničenje u pogledu direktnog poređenja podataka dobijenih različitim metodama i instrumentima iz različitih istraživačkih grupa. Uprkos tome, istraživači su nastavili da razvijaju nove načine kojima se mukoadhezivni potencijal polimernih sistema može ispitati. Većina metoda za ispitivanje mukoadhezivnosti koja se navodi u literaturi su *in vitro* i *ex vivo* metode [30]. Međutim, nije lako ekstrapolirati *in vitro* ponašanje mukoadhezivnog sistema na njegove *in vivo* performanse. Razlog za to je što se *in vitro/ex vivo* ispitivanja mukoadhezije vrše pod kontrolisanim uslovima, za razliku od dinamičkih uslova koji postoje *in vivo* [30]. Zbog toga je predloženo nekoliko *in vivo* metoda: gama scintigrafija [110], magnetna rezonanca [111], fluorescentna mikroskopija [112]. Metode za ispitivanje mukoadhezije se dele na direktne i indirektne. Metode koje procenjuju **silu odvajanja** farmaceutskog oblika i ekscipijensa od sluzokože, **rad adhezije** koji je jednak površini ispod krive sila-pomeraj ili **vreme zadržavanja** (engl. *residence time*) farmaceutskog oblika leka u kontaktu sa sluzokožom predstavljaju direktne metode [30,113,114]. Indirektne metode se zasnivaju na **proceni interakcija** ekscipijenasa i sluzokože [30].

U literaturi su predložene brojne metode i instrumenti za *in vitro/ex vivo* proučavanje mukoadhezivnih svojstava farmaceutskih oblika lekova i ekscipijenasa: analizator teksture, modifikovana vaga [115], površinski tenziometar [116], mikroskopija atomskih sila [117], reološke metode [118], elipsometrija [117], metoda merenja protoka u kanalu (engl. *flow channel method*) [117,119], Biacore<sup>®</sup> metoda, poznata i kao metoda površinske plazmonske rezonance [120], mucin-čestična metoda (engl. *mucin-particle method*) koja se još označava kao metoda merenja zeta potencijala [120], metode ćelijskih kultura [117] i metoda rotirajućeg cilindra [117,121].

Iako monografija Evropske farmakopeje za preparate za oralnu sluzokožu obuhvata poglavlje o mukoadhezivnim preparatima, standardna metoda za procenu mukoadhezije još uvek nije navedena. Treba istaći da je poređenje rezultata dobijenih primenom različitih metoda teško izvodljivo i neprecizno zbog varijacija u eksperimentalnim postavkama. U većini slučajeva korelacija rezultata sa realnim uslovima koristeći humanu sluzokožu ili *in vivo* podacima nedostaju [30]. Nekoliko studija je ispitivalo vreme zadržavanja *in vivo*, pri čemu je pokazano da je duže vremena zadržavanja u korelaciji sa većim silom odvajanja [30]. Poznato je da metode koje se izvode na izolovanom tkivu pokazuju veću standardnu devijaciju u poređenju sa *in vitro* metodama [36,122].

Najrasprostranjeniji uređaj za detekciju sile mukoadhezije, tj. sile odvajanja je analizator teksture (engl. *texture analyzer*), koji obezbeđuje merenja sile u opsegu od njutna do milinjutna [123]. Primena analizatora teksture omogućila je kontrolu sile kontakta i trajanje kontakta između farmaceutskog oblika leka i sluzokože, odnosno njenog supstrata. Prvi izveštaj o upotrebi analizatora teksture (TA.TX<sub>2</sub><sup>®</sup> texture analyzer, Stable Micro Systems, Velika Britanija [Slika 1.11](#)) objavljen je za merenje mukoadhezivnih svojstava bukalnih tableta na bazi različitih polimera, korišćenjem membrane izolovane iz pilića kao biološke membrane za koju su tablete bile adherirane [124]. Uređaj se sastoji od držača za tkivo na kome mukozno tkivo može biti pričvršćeno. Na vrhu držača tkiva ili odgovarajućeg surogata, postoji otvor. To omogućava da sonda može doći u kontakt sa tkivom. Delovi uređaja su smešteni u čašu sa medijumom za ispitivanje koji se može zagrejati na određenu temperaturu. Tokom merenja medijum se meša magnetnom mešalicom. Ispitivana formulacija se pričvršćuje na donju stranu

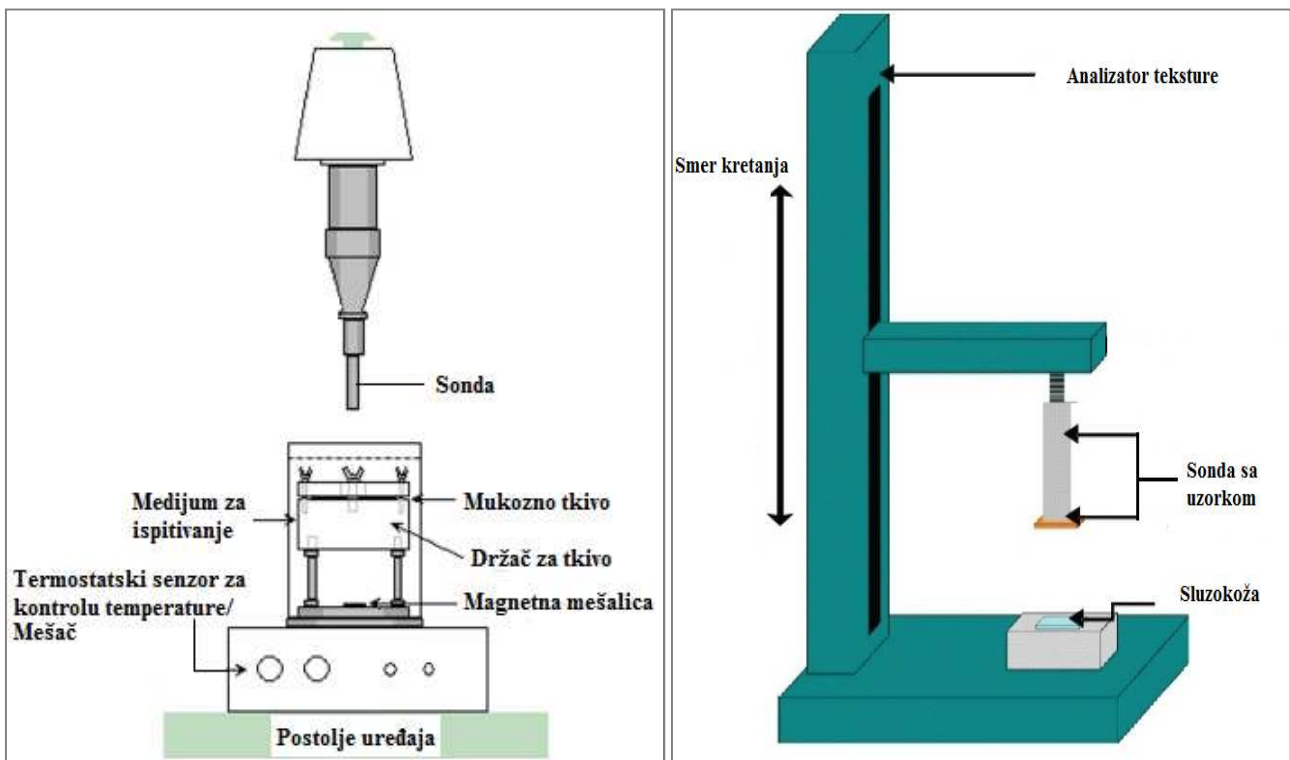
sonde, npr. sa dvostranom lepljivom trakom. Da bi započelo ispitivanje, sonda se spušta na sluzokožu definisanom brzinom. Nakon postizanja sile okidanja (engl. *trigger force*), sonda sa ispitivanom formulacijom pritiska sluzokožu određenom silom tokom određenog vremena. Nakon toga, sonda se pomera na gore sve dok se adezivna veza ne raskine. Dosadašnja upotreba analizatora teksture pokazala je da sila kontaktna, trajanje kontakta, i brzina podizanja/povlačenja sonde tokom ispitivanja utiču na rezultate ispitivanja [122,125]. Vreme kontakta i sila kontakta simuliraju napor koji pacijent treba da uloži kako bi se farmaceutski oblik leka doveo u kontakt sa sluzokožom i omogućila mukoadhezija u “fazi kontakta”. Utvrđeno je da je vreme kontakta više utiče na jačinu mukoadhezije nego sila kontakta [36]. U tom smlislu, primećeno je da povećanje vremena kontakta sa 10 sekundi na 30 sekundi dovodi do značajnog povećanja izmerene sile mukoadhezije, ali da povećanje sile kontakta sa 0,05 N na 0,1 N ili sa 0,5 N na 1,0 N ne utiče značajno na povećanje sile odvajanja [36]. Dosadašnja istraživanja su pokazala da bi brzina podizanja sonde trebalo da bude niska, tako da se obično bira brzina od 0,1 mm/s.

Sila potrebna za odvajanje farmaceutskog oblika leka od sluzokože ili supstrat sluzokože (engl. *maximum detachment force*,  $F_{max}$ ) predstavlja indikator mukoadhezivnih svojstava i dobija se iz krive zavisnosti sila-vreme (Slika 1.12). Na osnovu izmerene sile odvajanja izračunava se jačina vezivanja ( $N/cm^2$ ) na osnovu jednačine 1.7 [126]:

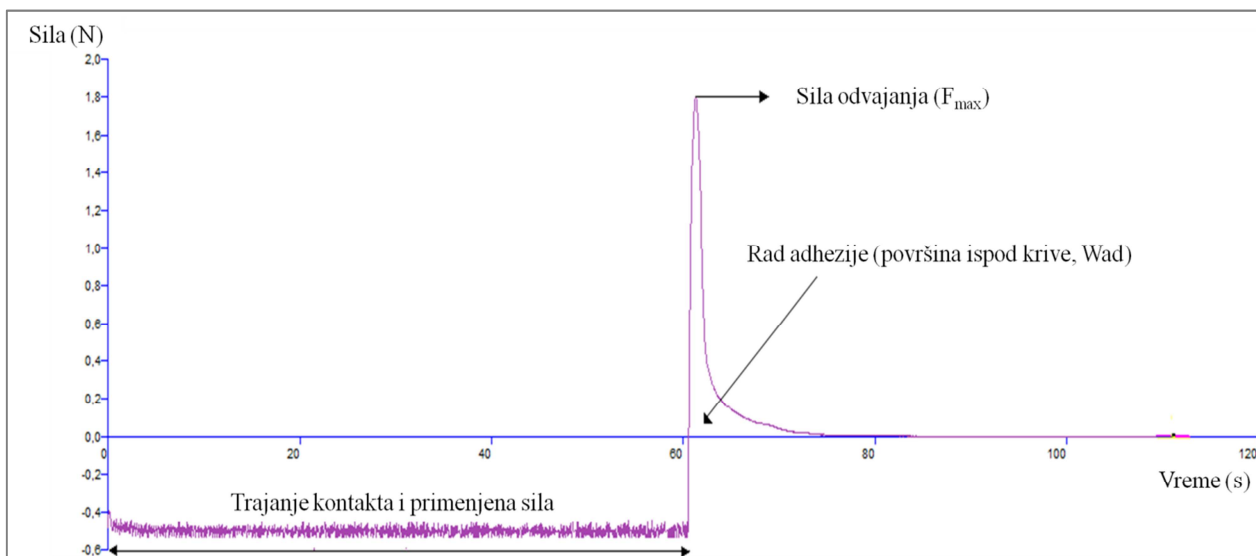
$$\text{Jačina vezivanja (N/cm}^2\text{)} = F_{max} \text{ (N)} / A \text{ (cm}^2\text{)} \quad 1.7$$

gde je  $F_{max}$  - maksimalna sila potrebna za odvajanje mukoadhezivne tablete od sluzokože ili supstrata sluzokože (engl. *maximum detachment force*),  $A$  - površina farmaceutskog oblika leka koja je uključena u adhezivnu interakciju.

Pored sile odvajanja, kao indikator mukoadhezivnih svojstava koristi se i parametar koji je označen kao rad adhezije (engl. *Work of adhesion*,  $Wad$ ), a koji predstavlja površinu ispod krive sila-pomeraj [30]. Ispitivanje uzoraka bi trebalo ponoviti najmanje 4 - 5 puta da bi se osigurala ponovljivost [122].



Slika 1.11. Šematski prikaz analizatora teksture (prilagođeno prema [127])



**Slika 1.12.** Tipičan grafik sila-vreme iz ispitivanja mukoadezivnosti dobijen pomoću analizatora teksture

Pregledom literature uočeni su različiti uslovi ispitivanja mukoadezije uz upotrebu analizatora teksture, a pregled uslova pod kojim su sprovedena ova ispitivanja su prikazana je u [Tabeli 1.7](#).

**Tabela 1.7.** Pregled eksperimentalnih uslova za izvođenje ispitivanja mukoadhezije bukalnih farmaceutskih oblika lekova upotrebom analizatora teksture

Sila kontakta (N)	Dužina kontakta (s)	Brzina podizanja sonde (mm/s)	Temperatura (°C)	Sluzokoža/surogat sluzokože	Sonda	Farmaceutski oblik	Referenca
1	180	0,5	37,0 ± 0,5	bukalna sluzokoža ovce	-	tableta	[79]
0,05	60	0,5	37,0 ± 0,5	bukalna sluzokoža svinje	cilindrična sonda, 10 mm	film	[128]
0,098	45, 90, 180	-	-	sluzokoža jednjaka svinje/disk mucina	cilindrična sonda, 10 mm	film	[102]
1	60	-	-	bukalna sluzokoža zeca	-	film	[129]
1	60	0,1	37,0	disk mucina (mucin svinjskog želuca, tip II)	cilindrična sonda, 10 mm	film	[85]
0,5	0,5; 2; 15; 30 minuta	0,5	37,0	sublingvalna goveđa sluzokoža	cilindrična sonda, 28 mm	film	[130]
0,3	60	0,1	-	Duoderm® membrana impregnirana sa 30 mg veštačkog rastvora mukusa	cilindrična sonda; 1,33 cm <sup>2</sup>	film	[131]
0,5	180	1	-	pileća membrana	cilindrična sonda, 20 mm	tableta	[124]

### 1.7.8 Permeabilnost lekovite supstance iz mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova (permeability test)

Za proučavanje kinetike apsorpcije i permeacionog profila lekovitih supstanci opisane su brojne *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro* metode određivanja permeabilnosti [132]. *In vivo* metode se obično sprovode kako bi se procenila bioraspoloživost lekova koji se primenjuju preko bukalne sluzokože, dok su *ex vivo* i *in vitro* metode pogodne za pretklinički skrining lekovitih supstanci, pružajući uvid u mehanizme transporta kroz bukalnu sluzokožu, kao i za procenu potencijalnih hemijskih penetracionih inženjera koji bi poboljšali bukalni transport lekovite supstance [132].

Metode difuzionih ćelija, kao *ex vivo* metode, široko se koriste za određivanje količine lekovite supstance koja permeira kroz bukalnu sluzokožu, kao i za određivanje brzine difuzije lekovite supstance [132]. U ovu svrhu, bukalna sluzokoža odgovarajućeg životinjskog modela se postavlja u različite vrste difuzionih ćelija: vertikalne difuzione ćelije (*Franz*-ove difuzione ćelije), protočne difuzione ćelije i bočne ili horizontalne difuzione ćelije (*Ussing* komora i *Sweetana-Grass* komora). Zajedničko za sve vrste difuzionih ćelija je da su sastavljene od donorske komore, akceptorske komore, otvora za uzorkovanje i grejača sa podešenom temperaturom od 37 °C [132]. Prednosti i nedostaci svake od metode difuzionih ćelija navedeni su u **Tabeli 1.8**.

Koeficijent permeabilnosti ispitivanih supstanci ( $P_{app}$ ) se izračunava na osnovu brzine transporta ( $dQ/dt$ ) molekula kroz segment sluzokože i zapremine akceptorske komore ( $V_a$ ) podeljene sa površinom segmenta sluzokože koja je dostupna za permeaciju ( $A$ ) i koncentracijom lekovite supstance u donorskoj komori ( $C_0$ ) u skladu sa **jednačinom 1.8** [132].

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{V_a}{A \times C_0} \quad 1.8$$

**Tabela 1.8.** Prednosti i nedostaci različitih tipova difuzionih ćelija [132]

Uređaj za ispitivanje permeabilnosti	Model sluzokože	Prednosti	Nedostaci
Franz-ova difuziona ćelija	bukalna sluzokoža svinje	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ jednostavna</li> <li>✓ jeftina</li> <li>✓ mogućnost održavanja eksperimentalnih uslova</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ statična</li> <li>✓ mogućnost sušenja i odumiranja tkiva</li> <li>✓ velika količina tkiva</li> <li>✓ moguće stvaranje mehurića vazduha</li> </ul>
Protočna difuziona ćelija	bukalna sluzokoža svinje	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ jeftina</li> <li>✓ zaštita lekovite supstance od isparavanja</li> <li>✓ smanjen rizik od sušenja i odumiranja tkiva</li> <li>✓ mogućnost održavanja eksperimentalnih uslova</li> <li>✓ mala količina tkiva</li> <li>✓ kontinuirani protok medijuma kroz akceptorsku komoru</li> <li>✓ bez formiranja mehurića vazduha</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ kompleksni sistem</li> </ul>

<i>Ussing</i> komora	bukalna sluzokoža svinje	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ mogućnost održavanja eksperimentalnih uslova</li> <li>✓ mala količina tkiva</li> <li>✓ održivost vitalnosti tkiva</li> <li>✓ dvosmerno proučavanje prolaska lekovite supstance kroz tkivo</li> <li>✓ čisti analitički uzorci</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ niska propusnost</li> <li>✓ tri vrste materijala u kontaktu sa medijumom koji sadrži lekovitu supstancu</li> </ul>
<i>Sweetana-Grass</i> komora	bukalna sluzokoža svinje	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ jednostavno čišćenje</li> <li>✓ jedna vrsta materijala u kontaktu sa medijumom koji sadrži lekovitu supstancu</li> <li>✓ smanjeno curenje lekovite supstance</li> <li>✓ protok medijuma paralelan površini tkiva</li> <li>✓ odustvo povezanosti odeljka za tkivo i rezervoara lekovite supstance</li> <li>✓ bez formiranja mehurića vazduha</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ zahteva odvajanje rezervoara od grejnog kupatila</li> </ul>

Kulture bukalnih epitelih ćelija se kao *in vitro* metode takođe koriste za proučavanje permeacije lekovitih supstanci, kao i za rasvetljavanje mehanizama delovanja penetracionih inhensera. Ćelije moraju biti kultivisane pod strogo kontrolisanim uslovima vlage i temperature, koristeći adekvatnu podlogu za rast [132]. Kao *in vitro* model humane bukalne sluzokože korišćene su TR146 kulture ćelija izolovane iz skvamoznih ćelija karcinoma bukalne sluzokože. TR146 višeslojne ćelije pokazuju barijernu funkciju sličnu humanim ćelijama bukane sluzokože u pogledu strukture (formiraju višeslojni nekeratinizovani skvamozni epitel), funkcije i enzimske aktivnosti (karboksipeptidaza, esteraza i aminopeptidaza). Ova ćelijska linija je korišćena za proučavanje dvosmernog transporta velikog broja lekovitih supstanci kroz bukalnu sluzokožu, kao i za procenu efekta penetracionih inhensera, kao što su hitozan i žučne soli [132]. Iako su TR146 kulture ćelija jedna od najčešće korišćenih ćelijskih modela u proceni permeabilnosti lekovite supstance, one takođe imaju i određene nedostatke: njihovo onkogeno svojstvo narušava barijernu permeabilnost, zbog čega je permeacija u ovom ćelijskom modelu oko 10 puta veća nego u slučaju humane bukalne sluzokože što je pokazano na primeru manitola, testosterona, dekstrana i nikotina [133]. Do sada je razvijen i model ćelijskih kultura izolovan iz normalnih humanih bukalnih keratinocita (EpiOral™ model bukalnog tkiva, MatTek Corporation, Ashland, SAD) koji se koriste za proučavanje bukalne permeabilnosti. EpiOral™ model bukalnog tkiva je jednostavan za izvođenje, relativno pristupačan i omogućava proučavanje transportnih mehanizama lekovite supstance na ćelijskom ili subćelijskom nivou [132].

Za procenu permeabilnosti lekovitih supstanci kroz bukalnu sluzokožu koriste se i biomimetički barijerni modeli koji se prema sastavu veštačke membrane i lipida mogu podeliti na PAMPA model (engl. *Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*), PVPA model (engl. *Phospholipid Vesicle-based Permeation Assay*), AMI sistem (engl. *Artificial Membrane Insert System*) i Permeapad® [133]. Ovi modeli se još i označavaju kao *non-cell based* modeli [133]. Zasnovani su na primeni donorske i akceptorske ploče sa većim brojem bazena. Navedni modeli su jednostavni za rukovanje, efikasni i



reproducibilni, laki za transport i pogodni su za ispitivanje permeabilnosti lekovitih supstanci pasivnom difuzijom transcelularno [133]. Veruje se da je PVPA model zasnovan na lipozomima (zatvorene vezikule fosfolipidnih dvoslojeva), bolji u predviđanju pasivnog transporta lekovitih supstanci [133]. AMI sistem je osmišljen 2017. godine i zasniva se na primeni veštačke membrane bez lipida (fosfolipida). Naime, ovaj sistem se sastoji od celulozne membrane koja se postavlja između između dva plastična prstena koji predstavljaju donorski i akceptorski odeljak. Smatra se da je model više primenjiv za predviđanje gastrointestinalne apsorpcije, a manje za bukalnu apsorpciju lekovite supstance [133]. Permeapad<sup>®</sup> je sistem za procenu permeabilnosti lekovitih supstanci pasivnom difuzijom zasnovan na primeni višeslojne veštačke membrane fosfolipida (fosfatidilholin S-100 iz soje) koji je razvijen 2015. godine. Naime, grupa naučnika iz Danske, Bibi i saradnici je ispitivala korisnost Permeapad<sup>®</sup> u predviđanju bukalne apsorpcije metoprolola kao model supstance [134]. Rezultati ove studije pokazali su da postoji dobra korelacija sa *in vitro* (TR146 kulture ćelija), *ex vivo* (bukalna sluzokoža svinje) i *in vivo* metodom (Göttingen mini svinje).

*In vivo* metode permeabilnosti obuhvataju ispitivanje biološke raspoloživosti kod ljudi i na različitim eksperimentalnim životinjama, kao i intestinalnu perfuziju kod ljudi.

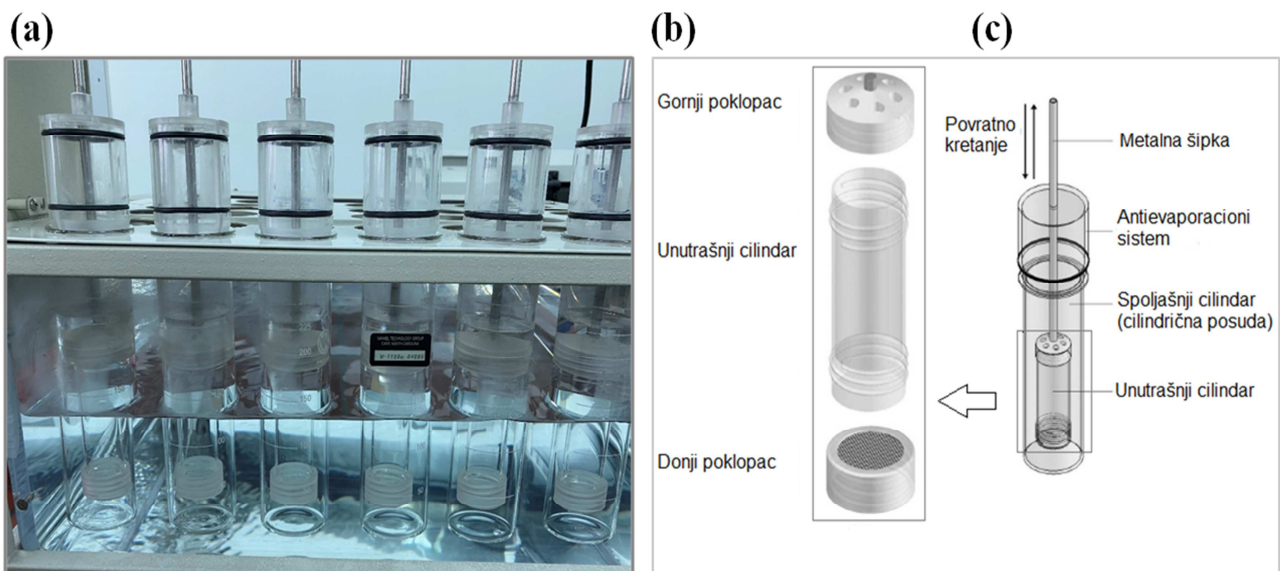
Test bukalne apsorpcije koji su opisali Beckett i Triggs koristi se za proučavanje brzine i obima penetracije/permeacije lekovite supstance u/kroz usnu duplju [135]. Ispitivanje se zasniva na mešanju puferskog rastvora lekovite supstance poznate koncentracije u ustima zdravih dobrovoljaca i to oko 60 puta/minuti [135]. Nakon određenog vremenskog perioda, rastvor lekovite supstance se izbacuje i volonteri ispiraju usta poznatom zapreminom puferskog rastvora ili destilovane vode. Sakupljaju se sve frakcije rastvora za ispiranje usta zajedno sa izbačenim rastvorom lekovite supstance kako bi se odredila količina lekovite supstance koja je zaostala u usnoj duplji [132,135]. Iako je ovaj test neinvazivan, jednostavan sa malim inter- i intarindividualnim varijacijama, osnovna ograničenja su apsorpcija lekovite supstance na nivou svih površina oralne sluzokože i gubitak dela lekovite supstance slučajnim gutanjem [132,135].

Još jedna metoda koja je opisana u literaturi za procenu apsorpcije iz usne duplje (bukalne sluzokože) je metoda diska koji je razvio Kaaber [136]. Ova metoda koristi diskove kao nosače farmaceutskog oblika leka i komoru nepropustljivu za vazduh za uzorkovanje koja se sastoji od standardizovanog diska sa poroznim membranskim materijalom. Sistem se stavlja u kontakt sa bukalnom sluzokožom i uklanja se nakon 30 minuta. Zatim se uzimaju uzorci krvi da bi se odredila količina apsorbovane lekovite supstance. Za razliku od testa bukalne apsorpcije ovde se uzorci krvi prikupljaju tokom samog ispitivanja, pri čemu metoda pruža informacije o apsorbovanom delu lekovite supstance u određenom segmentu usne duplje [136]. Međutim, zbog smetnje protoka salive u apsorpciji lekovite supstance, poteškoća adhezije diska za membranu, ova metoda se ipak manje koristi [132].

Metoda perfuzionih ćelija je razvijena kako bi se prevazišla ograničenja ispitivanja bukalne apsorpcije, posebno nespecifične apsorpcije lekovite supstance preko površine oralne sluzokože [132]. Perfuzione ćelije se obično povezuju sa bukalnom sluzokožom anesteziiranog humanog dobrovoljca ili nekog životinjskog modela. Rastvor lekovite supstance cirkuliše pomoću peristaltičke pumpe, a potom se u različitim vremenskim tačkama rastvor lekovite supstance sakuplja da bi se odredila količina lekovite supstance izgubljena kroz bukalnu sluzokožu. Tokom ispitivanja održava se temperatura, kao i zapremina i pH rastvora. Sakupljaju se uzorci krvi, a moguće je i odrediti količinu lekovite supstance u salivi kako bi se izvršila ekstrapolacija na koncentraciju lekovite supstance u plazmi. Na taj način, količina lekovite supstance izgubljena u usnoj duplji i koncentracija lekovite supstance u plazmi se može odrediti istovremeno, za razliku od testa bukalne apsorpcije [132].

Ispitivana je i korisnost aparature sa cilindrom sa povratnim kretanjem - USP aparatura 3, (Bio-Dis Extended Release Tester, VanKel Technology Group, SAD), prikazana na [Slici 1.9a](#), za procenu permeacije lekovite supstance. Ovaj uređaj je razvijen za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz čvrstih formulacija sa kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance jer uzima u obzir

neophodnost izlaganja farmaceutskog oblika leka mehaničkim stresu kao i raznim fizičko-hemijskim uslovima koji mogu uticati na oslobađanje lekovite supstance u GI traktu [137]. Farmaceutski oblik leka se lako može transportovati iz jednog reda medijuma u drugi, čime se omogućava simulirana promena pH vrednosti medijuma uz biorelevantnu brzinu mešanja i vreme zadržavanja [137]. Sam dizajn uređaja je zasnovan na radu uređaja za ispitivanje raspadljivosti tableta i kapsula. Glavni delovi aparature sa cilindrom sa povratnim kretanjem su (Slika 1.9b): unutrašnji cilindri, spoljašnji cilindri, metalne šipke za agitaciju i vodeno kupatilo. Farmaceutski oblik se pojedinačno ubacuje u unutrašnji cilindar, koji se sastoji od staklene cevi zatvorene na oba kraja plastičnim poklopcem koji sadrži sito, napravljeno od najlona ili nerđajućeg čelika. Unutrašnji cilindar je povezan sa metalnom šipkom koja obezbeđuje pokrete uranjanja i izranjanja (povratni pokreti) definisanim intenzitetom (*dips per minute*, dpm) unutar posude za rastvaranje koja se naziva spoljašnji cilindar. Posuda za rastvaranje se razlikuje od posuda koje se koriste kod aparature sa lopaticom i korpicom jer pored svog karakterističnog cilindričnog oblika i ravnog dna, ima kapacitet od samo 300 mL. Pored ove standardne posude u zapremini od 300 mL, postoje i posude za specifične namene koje su dostupne u zapremini od 100 mL i 1000 mL. Na otvor posude je postavljen sistem protiv isparavanja kako bi se izbegle promene u zapremini medijuma za rastvaranje tokom ispitivanja, kao što je ilustrovano na Slici 1.9c. Vodeno kupatilo sadrži cilindrične posude koje se raspoređuju u redove, dok se temperatura medijuma održava na 37 °C [137–139].



**Slika 1.9.** Aparatura sa cilindrom sa povratnim kretanjem (a): Unutrašnji cilindar sa donjim i gornjim poklopcem (b); Unutrašnji cilindar povezan sa metalnom šipkom unutar spoljašnjeg cilindra (c) (prilagođeno prema [137]).

## 1.8 Hipertenzija i animalni modeli hipertenzije

### 1.8.1 Etiologija hipertenzije

Prema preporukama Evropskog udruženja za hipertenziju (*European Society of Hypertension, ESH*) i Evropskog kardiološkog društva (*European Society of Cardiology, ESC*) iz 2018. godine izvršena je klasifikacija stadijuma hipertenzije na osnovu prosečne vrednosti krvnog pritiska merenog u ordinaciji u dve ili više poseta lekaru [Tabeli 1.9](#) [140]:

**Tabela 1.9.** Klasifikacija krvnog pritiska merenog u ordinaciji i definicija stepena hipertenzije

Kategorija	Sistolni krvni pritisak (mmHg)		Dijastolni krvni pritisak (mmHg)
Optimalan krvni pritisak	< 120	i	< 80
Normalan krvni pritisak	120 - 129	i/ili	80 - 84
Visok normalan krvni pritisak	130 - 139	i/ili	85 - 89
Hipertenzija 1. stepena	140 - 159	i/ili	90 - 99
Hipertenzija 2. stepena	160 - 179	i/ili	100 - 109
Hipertenzija 3. stepena	≥ 180	i/ili	≥ 110
Izolovana sistolna hipertenzija	≥ 140	i	< 90

Navedena klasifikacija krvnog pritiska i definicija hipertenzije su nepromenjene u odnosu na prethodne ESH/ESC preporuke iz 2013. godine [140]. Hipertenzija se definiše kao vrednosti sistolnog krvnog pritiska  $\geq 140$  mmHg i/ili vrednosti dijastolnog krvnog pritiska  $\geq 90$  mmHg, na osnovu dokaza iz randomizovanih kliničkih studija po kojima prednosti lečenja pacijenata sa ovim vrednostima krvnog pritiska (bilo uz intervencije promene načina života i primene lekova) nedvosmisleno nadmašuju rizike lečenja [140]. Ukoliko na osnovu vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska postoji razlika u kategoriji, težinu hipertenzije određuje ona koja je viša. Ova klasifikacija se primenjuje kod ispitanika svih životnih doba [140].

Arterijska hipertenzija se prema etiologiji klasifikuje na [141]:

- **Esencijalnu (primarnu, idiopatsku) hipertenziju** koja se odnosi na hipertenziju čiji je uzrok nepoznat, odnosno ne može se povezati sa oboljenjem/stanjem za koje je poznato da uzrokuje hipertenziju.
- **Sekundarnu hipertenziju** pod kojim se podrazumeva hipertenzija koja je udružena sa oboljenjem/poremećajem za koje je poznato da uzrokuje hipertenziju.

Većina hipertenzija, između 90% i 95% su nepoznatog uzroka pa pripadaju grupi esencijalnih hipertenzija [141,142]. Naziv esencijalna hipertenzija je danas primenjiv delimično, jer su poznati mnogi faktori koji doprinose nastanku hipertenzije koja zbog toga predstavlja heterogeni poremećaj [141]. Smatra se da u patogenezi esencijalne hipertenzije učestvuju različiti faktori poput: pojačane aktivnosti simpatikusa, sa izraženom beta-adrenergičkom osetljivošću; pojačana aktivnost sistema renin-angiotenzin-aldosteron i porast cirkulišućih mineralokortikoida; retencija soli i vode koje mogu biti posledica rezistencije na so, što može biti povezano sa redukovanom masom nefrona uzrokovanom genetskim faktorima, poremećajem intrauterinog razvoja (hipoksija, lekovi, nepravilna ishrana) ili postnatalnim okolnostima (malnutricija, infekcije); nasleđe jer je poznato da je hipertenzija dvostruko češća kod osoba koji imaju jednog ili oba roditelja sa dijagnostikovanom hipertenzijom [141].

Sa druge strane, sekundarna hipertenzija je posledica postojanja određene, primarne bolesti kada se javlja kao simptom izazvan hemodinamskim poremećajima i ovaj oblik hipertenzije obuhvata samo od 5% do 10% slučajeva [141]. Najčešći uzroci sekundarne hipertenzije su: bubrežna oboljenja (parenhimske bolesti bubrega - renalna hipertenzija, vaskularne bolesti bubrega - stenoza renalne/ih arterije/a); tumori (feohromocitom; primarni aldosteronizam - Konov sindrom, karcinom korteksa nadbubrega), endokrina oboljenja (Kušingov sindrom; hiper- ili hipotiroidizam; hiperparatiroidizam, dijabetes), *sleep apnea* sindrom; koarktacija aorte; primena određenih lekova - jatrogena hipertenzija (oralni kontraceptivi, nesteroidni antireumatici, antidepresivi, kortikosteroidi). Poseban oblik sekundarne hipertenzije je gestaciona hipertenzija koja se sreće tokom trudnoće i javlja se u 6 do 8% svih trudnoća, češće u višeplođnim trudnoćama značajno doprinoseći mrtvorodenosti i neonatalnom morbiditetu i mortalitetu [143].

### 1.8.2 Prevalenca hipertenzije

Na osnovu vrednosti krvnog pritiska merenog u ordinaciji, u 2015. godini globalna prevalenca hipertenzije procenjena je na 1,13 milijardi, dok je prevalenca u centralnoj i istočnoj Evropi oko 150 miliona [140]. Prema podacima iz iste godine, procenat obolelih od hipertenzije u odrasloj populaciji je 30-45% sa globalnom starosnom standardizovanom prevalencom od 24% kod muškaraca i 20% kod žena [140]. Ova visoka prevalenca hipertenzije je konzistentna širom sveta, odnosno nema razlike između zemalja sa nižim, srednjim i višim stepenom razvoja. Prevalenca hipertenzije se povećava sa starenjem i iznosi preko 60% kod ljudi starijih od 60 godina [140]. Starenjem, ljudi usvajaju sedentarni način života koji pogoduje razvoju hipertenzije, čime i njena prevalenca širom sveta nastavlja da raste, pa se procenjuje da će se broj ljudi sa hipertenzijom povećati za 15–20% do 2025. godine i dostići blizu 1,5 milijardi [140].

Prema istraživanju prevalencije i faktora rizika od prehipertenzije i hipertenzije kod odrasle populacije u Republici Srbiji iz 2013. godine, koja je obuhvatila reprezentativni uzorak od 14 422 ispitanika, 17,7% odraslih osoba uzrasta preko 15 godina bilo je normotenzivno, svaka treća (33,1%) osoba imala je prehipertenziju, a svaka druga (49,3%) hipertenziju [144]. Standardizovana prevalencija prehipertenzije bila je 40,6%, hipertenzije 34,5%, a 57,8% hipertenzivnih osoba bilo je na antihipertenzivnoj terapiji [144]. Među ispitanicima koji su bili na antihipertenzivnoj terapiji, 35,2% (36,4% muškaraca i 33,2% žena) održavalo je krvni pritisak unutar normalnih vrednosti. Osim toga, analiza je pokazala da najznačajnije faktore rizika za nastanak hipertenzije predstavljaju životno doba (starost preko 50 godina), prekomerna telesna težina, gojaznost, umereno veliki i veliki obim struka [144].

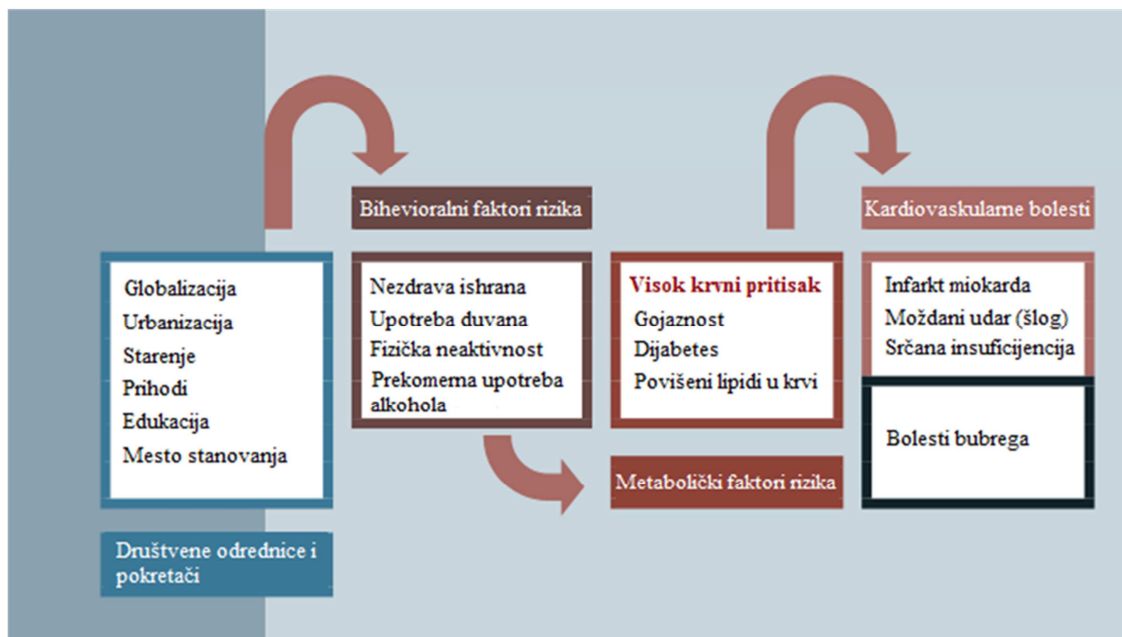
### 1.8.3 Faktori rizika povezani sa hipertenzijom i njene komplikacije

Mnogobrojni faktori rizika utiču na vrednost krvnog pritiska. Istraživanja su pokazala da je vrednost krvnog pritiska povezana sa različitim personalnim, društvenim i sredinskim faktorima [145]. To su pre svega genetski faktori, uzrast, pol, rasna i etnička pripadnost, socijalno-ekonomski status, obrazovaje i zanimanje, telesna masa i telesna visina, nepravilna ishrana (ishrana bogata nezasićenim masnim kiselinama i solju, konzumacija duvana, prekomerna upotreba alkohola, fizička aktivnost, druga oboljenja, stres itd.). Pored toga, postoji nekoliko metaboličkih faktora koji povećavaju rizik od srčanih oboljenja, moždanog udara, bolesti bubrega i drugih komplikacija hipertenzije i oni uključuju dijabetes, visok nivo holesterola u krvi i gojaznost [145].

Postoji jasna povezanost između hipertenzije, dijabetesa, gojaznosti i dislipidemija [146]. Dislipidemija je česta kod pacijenata sa hipertenzijom, dijabetesom i metaboličkim sindromom [146]. Epidemiološke studije su pokazale jaku korelaciju između nivoa lipida u serumu i rizika od

aterosklerotičnih kardiovaskularnih bolesti ref. Multifaktorske strategije koje imaju za cilj kontrolu krvnog pritiska, lipidnog statusa i glukoze u krvi istovremeno postižu maksimalno smanjenje kardiovaskularnog rizika [146]. Pokazano je da hipertenzija, dijabetes i dislipidemija imaju aditivan efekat kada su u pitanju infarkt miokarda i moždani udar [147].

Svetska zdravstvena organizacija je u svom dokumentu "A global brief on hypertension" iz 2013. godine slikovito prikazala faktore koji utiču na nastanak hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti (Slika 1.13) [145].



**Slika 1.13.** Glavni faktori koji doprinose razvoju hipertenzije i njegovih komplikacija (prilagođeno prema [145])

#### 1.8.4 Ciljevi lečenja hipertenzije

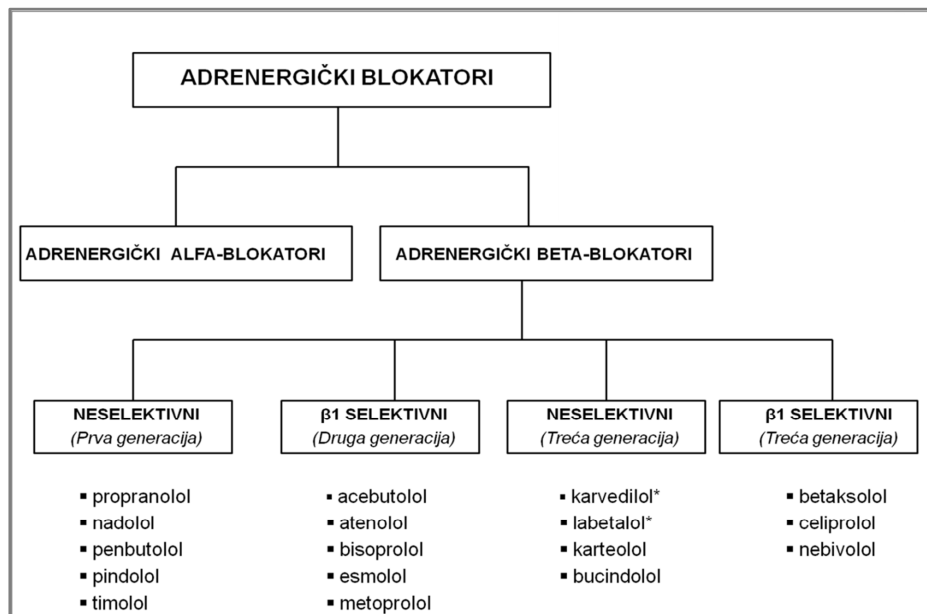
Osnovni cilj lečenja arterijske hipertenzije je maksimalno dugoročno smanjenje ukupnog kardiovaskularnog rizika, što podrazumeva smanjenje vrednosti krvnog pritiska, ali i kontrolu svih pridruženih promenljivih faktora rizika [140]. Prema revidiranim preporukama Evropskog kardiološkog društva i Evropskog udruženja za hipertenziju iz 2018. godine, prva ciljna vrednost kojoj se teži za krvni pritisak je <140/90 mmHg kod svih pacijenata, a ukoliko dobro podnose lečenje, ciljne vrednosti krvnog pritiska treba da budu do 130/80 mmHg ili niže kod većine pacijenata [140]. Slična je i preporuka svetske zdravstvene organizacije iz 2021. godine koja kaže da ciljna vrednost krvnog pritiska kod svih osoba sa hipertenzijom bez komorbiditeta treba da bude <140/90 mmHg. Kod pacijenata mlađih od 65 godina preporučuje se da SKP bude snižen na vrednost od 120 do 129 mmHg kod većine pacijenata [140]. Kod starijih pacijenata (65-80 godina), preporučuje se da ciljni SKP bude u opsegu 130-139 mmHg ref. Isti opseg ciljnih vrednosti SKP (130-139 mmHg) se preporučuje i za osobe starije od 80 godina, ukoliko njihov organizam dobro podnosi lečenje [140]. Ciljna vrednost DKP (<80 mmHg) treba da se razmotri za sve hipertenzivne pacijente, nezavisno od stepena rizika i komorbiditeta [140]. Kod osoba sa hipertenzijom i poznatom kardiovaskularnom bolešću ciljna vrednost sistolnog krvnog pritiska je <130; kao i kod osoba sa hipertenzijom i visokim kardiovaskularnim rizikom, dijabetes melitusom i hroničnom bubrežnom bolešću [148].

Za postizanje navedenih ciljnih vrednosti krvnog pritiska preporučuje se antihipertenzivna terapija sa dve ili tri lekovite supstance (fiksne kombinacije lekovitih supstanci). Izuzeci su krhke starije osobe i one sa niskim rizikom i hipertenzijom I stepena (pogotovo ako je SKP <150 mmHg). U **Tabeli 1.10** dat je prikaz ciljnih vrednosti krvnog pritiska kod osoba obolelih od hipertenzije sa/bez pridruženim komorbiditetima [148].

### 1.8.5 $\beta$ -blokatori i njihov mehanizam dejstva

$\beta$ -blokatori smanjuju aktivnost simpatičkog nervnog sistema kroz blokadu  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$ -adrenergičkih receptora. Klasifikacija  $\beta$ -blokatora prikazana je na Slici 1.14.  $\beta_1$ -adrenergički receptori se nalaze prvenstveno u srcu i bubrežnom jukstaglomerularnom aparatu i imaju manji uticaj na vaskularne mišiće. Blokada ovog podtipa  $\beta$ -receptora dovodi do bradikardije i povećanog vremena dijastolnog koronarnog punjenja, što smanjuje potrebu srca za kiseonikom. Ovi efekti su naročito korisni u slučajevima srčane insuficijencije i ishemije miokarda.  $\beta_2$ -adrenergički receptori se nalaze u glatkim mišićima krvnih sudova, čija stimulacija dovodi do vazodilatacije. Međutim, blokada ovih receptora  $\beta$ -blokatorima dovodi do blage vazokonstrikcije.  $\beta_3$ -adrenergički receptori su lokalizovani u srcu i adipocitima, njihova blokada neselektivnim  $\beta$ -blokatorom dovodi do povećanja telesne težine i drugih metaboličkih efekata, kao što je hiperglikemija. Neki  $\beta$ -blokatori, kada se vežu za beta-adrenergički receptor, delimično aktiviraju receptor dok sprečavaju vezivanje noradrenalina za receptor. Ovi delimični agonisti stoga obezbeđuju neku „pozadinu“ simpatičke aktivnosti dok sprečavaju normalnu i pojačanu aktivnost simpatikusa. Parcijalna agonistička aktivnost nekih  $\beta$ -blokatora naziva se još intrinzična simpatomimetička aktivnost. Neki  $\beta$ -blokatori takođe poseduju aktivnost stabilizacije membrane, koja je slična aktivnosti stabilizacije membrane blokatora natrijumovih kanala, koji pripadaju antiaritmiciima klase I [1].

Prva generacija  $\beta$ -blokatora je neselektivna, što znači da blokiraju i  $\beta_1$  i  $\beta_2$ -adrenergičke receptore.  $\beta$ -blokatori druge generacije su kardioselektivniji po tome što su relativno selektivni za  $\beta_1$ -adrenoreceptore. Ipak, ova relativna selektivnost može se izgubiti pri većim dozama leka. Bisoprolol i nebivolol su lekovite supstance koje poseduju najveći stepen  $\beta_1$ -selektivnosti.  $\beta$ -blokatori treće generacije su lekovi koji poseduju i vazodilatatorno dejstvo blokiranjem vaskularnih  $\alpha$ -adrenergičkih receptora [1].



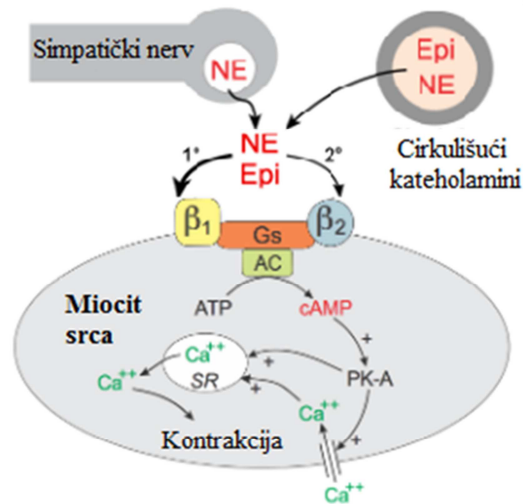
**Slika 1.14.** Klasifikacija adrenergičkih blokatora (\*blokatori i  $\alpha_1$ -receptora) [1]

**Table 1.10.** Ciljne vrednosti krvnog pritiska merenog u ordinaciji [140]

Uzrast pacijenta (godina)	Ciljna vrednost SKP (mmHg)					Ciljna vrednost DKP (mmHg)
	Hipertenzija	+ Dijabetes	+ Hronična bolest bubrega	+ Koronarna arterijska bolest	+ Moždani udar/Tranzitorni ishemijski udar	
18 - 65	Do 130 ili manje ukoliko se toleriše ne manje od 120	Do 130 ili manje ukoliko se toleriše ne manje od 120	130 - 140 ukoliko se toleriše	Do 130 ili manje ukoliko se toleriše ne manje od 120	Do 130 ili manje ukoliko se toleriše ne manje od 120	70 - 79
65 - 79	130 - 140 ukoliko se toleriše	130 - 140 ukoliko se toleriše	130 - 140 ukoliko se toleriše	130 - 140 ukoliko se toleriše	130 - 140 ukoliko se toleriše	70 - 79
≥ 80	130 - 140 ukoliko se toleriše	130 - 140 ukoliko se toleriše	130 - 140 ukoliko se toleriše	130 - 140 ukoliko se toleriše	130 - 140 ukoliko se toleriše	70 - 79

### 1.8.5.1 Uticaj $\beta$ -bloikatora na srce

$\beta$ -bloktori se vezuju za  $\beta$ -adrenergičke receptore u srčanom tkivu čvorova, provodnom sistemu i kontrakcijskim miocitima. Srce poseduje i  $\beta_1$  i  $\beta_2$  adrenergičke receptore, iako je preovlađujući tip receptora  $\beta_1$  (Slika 1.15). Ovi receptori prvenstveno vezuju noradrenalin koji se oslobađa iz simpatičkih adrenergičkih nerava. Pored toga, oni vezuju noradrenalin i adrenalin koji cirkulišu u krvi.  $\beta$ -bloktori sprečavaju da se normalni ligand (noradrenalin ili adrenalin) veže za  $\beta$ -adrenergičke receptore takmičući se na isto mesto vezivanja [149].



Skraćenice: SR - sarkoplazmatični retikulum;  
NE - norepinefrin;  
Epi - epinefrin;  
Gs - G stimulativni protein;  
AC - adenilil ciklaza;  
PK-A - cAMP-zavisna protein kinaza

**Slika 1.15.** Aktivacija ćelije miocita srca (prilagođeno prema [149])

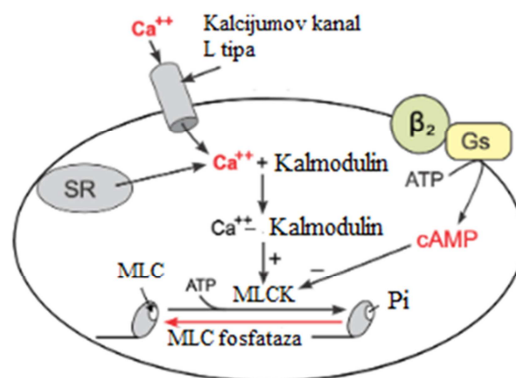
$\beta$ -adrenergički receptori su vezani za Gs-proteine (Slika 1.15), koji aktiviraju adenilil ciklazu da formira cAMP iz ATP-a. Povećan cAMP aktivira cAMP-zavisnu protein kinazu (PK-A) koja fosforiliše kalijumove kanale L-tipa, što uzrokuje povećan ulazak kalijuma u ćeliju. Povećan unos kalcijuma tokom akcionih potencijala i dalje pojačano oslobađanje kalcijuma iz sarkoplazmatičnog retikuluma u ćeliju; ove akcije povećavaju inotropiju (kontraktilnost). Aktivacija G-proteina takođe povećava broj otkucaja srca (hronotropiju) povećanjem strujanja pejsmejkera faze 4 u sinoatrijalnom čvoru. PK-A fosforiliše mesta na sarkoplazmatskom retikulumu, što dovodi do pojačanog oslobađanja kalcijuma kroz rijanodinske receptore (kanale za oslobađanje kalcijuma osetljive na rijanodin) povezane sa sarkoplazmatskim retikulumom. Ovo obezbeđuje više kalijuma na veživanje troponina-C, što povećava inotropiju. Konačno, PK-A može fosforilizovati lake lance miozina, što može doprineti pozitivnom inotropnom efektu stimulacije  $\beta$ -adrenergičkih receptora.

### 1.8.5.2 Uticaj $\beta$ -bloikatora na krvne sudove

Glatki mišići krvnih sudova imaju  $\beta_2$  adrenergičke receptore koji se normalno aktiviraju noradrenalin koji oslobađaju simpatički adrenergični nervi ili cirkulišući adrenalin (Slika 1.16). Ovi receptori, poput onih u ćeliji, povezani su sa G-proteinom koji stimuliše formiranje cAMP. Iako



povećan cAMP pojačava kontrakciju srčanih miofibrila, u glatkim mišićima krvnih sudova povećanje cAMP dovodi do opuštanja glatkih mišića. Razlog za to je taj što cAMP inhibira kinazu lakog lanca miofibrila koja fosforiliše miofin glatkih mišića. Stoga, povećanje intracelularnog cAMP izazvano  $\beta_2$ -agonistima inhibira kinazu lakog lanca miofibrila, dovodeći manju kontraktilnu silu (tj. podstičući relaksaciju). U poređenju sa njihovim efektima na srce,  $\beta$ -blokatori imaju relativno mali direktan vaskularni efekat jer  $\beta_2$  adrenergički receptori imaju samo malu modulacionu ulogu na bazalni vaskularni tonus. Blokada  $\beta_2$  adrenergičkih receptora je povezana sa malom količinom vazokonstrikcije u mnogim vaskularnim sistemima. Ovo se dešava zato što  $\beta$ -blokatori uklanjaju mali vazodilatatorni uticaj  $\beta_2$  adrenergičkih receptora (npr. koji potiče od cirkulišućeg adrenalina) koji se normalno suprotstavlja dominantnijem vazokonstriktorskom uticaju posredovanom  $\alpha$ -adrenergičkog receptora koji potiče od simpatičkog tonusa [149].



Skraćenice: SR - sarkoplazmatični retikulum;  
 Gs - Gs-protein;  
 MLC - Miozin lakog lanca  
 MLCK - Miozin kinala lakih lanaca  
 Pi - fosforilisani miozin

**Slika 1.16.** Aktiviranje gatkog mišića krvnog suda (prilagođeno prema [149])

## 1.8.6 Terapijske indikacije $\beta$ -blokatora

Beta-blokatori se koriste za lečenje hipertenzije, angine pektoris, infarkta miokarda, aritmija i srčane insuficijencije, glaukoma, hipertireoze i migrene [141].

### 1.8.6.1 Hipertenzija

$\beta$ -blokatori smanjuju arterijski krvni pritisak smanjenjem minutnog volumena srca. Mnogi urođeni hipertenzije povećani su zbog povećanjem zapremine krvi i minutnog volumena srca. Stoga, smanjenje minutnog volumena srca  $\beta$ -blokadom može biti efikasan tretman za hipertenziju, posebno kada se koristi sa diuretikom. Akutni tretman  $\beta$ -blokatorom nije veoma efikasan u smanjenju arterijskog pritiska zbog kompenzatornog povećanja sistemskog vaskularnog otpora izazvanog baroreceptorim refleksom. Baroreceptori detektuju visinu krvnog pritiska i nalaze se u luku aorte i u račvi karotidnih arterija. Informacije o promeni arterijskog pritiska iz baroreceptora putuju aferentnim vlaknima vagusa do produžene moždine. Eferentna vlakna simpatikusa i vagusa iz produžene moždine inervišu srce i regulišu brzinu srčanog rada i snagu srčane kontrakcije. Baroreceptorski refleks (BRR) radi na principu negativne povratne sprege. Pad arterijskog krvnog pritiska izazvaće povećanje tonusa simpatikusa i/ili inhibiciju vagusa i posledično vazokonstrikciju i tahikardiju. Kada krvni pritisak raste, tada barorefleks

smanjuje tonus simpatikusa i/ili porast tonusa vagusa. Hronični tretman  $\beta$ -blokatorima snižava arterijski pritisak više od akutnog lečenja, verovatno zbog smanjenog oslobađanja renina u bubrežima (čije je oslobađanje delimično regulisano  $\beta_1$ -adrenoreceptorima u bubrežima). Smanjenje koncentracije renina u plazmi dovodi do smanjenja angiotenzina II i aldosterona, što dovodi do povećanja gubitka natrijuma i vode preko bubrega i posledičnog smanjenja arterijskog krvnog pritiska. Hipertenzija je kod nekih pacijenata uzrokovana emocionalnim stresom, koji izaziva pojačanu aktivnost simpatikusa.  $\beta$ -blokatori su takođe veoma efikasni kod ovih pacijenata.  $\beta$ -blokatori se koriste u preoperativnom lečenju hipertenzije uzrokovane feohromocitomom, što rezultira povišenim cirkulišućim kateholaminima. Kada se koristi za ovo stanje, krvni pritisak se prvo kontroliše korišćenjem  $\alpha$ -blokatora kao što je fenoksibenzamin, a zatim se može pažljivo primeniti  $\beta$ -blokator da bi se smanjila prekomerna srčana stimulacija kateholaminima. Važno je da se  $\beta$ -blokator primenjuje tek nakon blokade vaskularnih  $\alpha$ -adrenergičkih receptora kako ne bi došlo do hipertenzivne krize zbog neometane stimulacije  $\alpha$ -adrenoceptora [149].

Prema preporukama Svetske zdravstvene organizacije iz 2021. godine  $\beta$ -blokatori su lekovi prve linije kod odraslih osoba sa hipertenzijom, pored blokatora kalcijumovih kanala, diuretika, ACEI i ARB [148].

### **1.8.6.2 Angina pektoris i infarkt miokard**

Antianginalni efekti  $\beta$ -blokatora se pripisuju njihovom kardio-depresivnom i hipotenzivnom delovanju. Smanjenjem otkucaja srca, kontraktilnosti i arterijskog pritiska,  $\beta$ -blokatori smanjuju rad srca i potrebu srca za kiseonikom. Smanjenje potrebe za kiseonikom poboljšava odnos snabdevanja i potrošnje kiseonika, što može osloboditi pacijenta od anginoznog bola koji je uzrokovan bolešću koronarne arterije. Osim toga,  $\beta$ -blokatori su veoma važni u lečenju infarkta miokarda jer se pokazalo da smanjuju smrtnost. Njihova korist proizilazi ne samo iz poboljšanja odnosa snabdevanja i potrošnje kiseonika i smanjenja aritmija, već i iz njihove sposobnosti da inhibiraju naknadno remodelovanje srca [149].

### **1.8.6.3 Aritmije**

Antiaritmička svojstva  $\beta$ -blokatora (antiaritmika II klase) povezana su sa njihovom sposobnošću da inhibiraju simpatičke uticaje na električnu aktivnost srca. Simpatički nervi povećavaju automatizam sinoatrijalnog čvora povećanjem struje pejsmejke, što povećava brzinu sinusa. Aktivacija simpatikusa takođe povećava brzinu provodljivosti (naročito u atrioventrikularnom čvoru) i stimuliše aberantnu aktivnost pejsmejke (ektopična žarišta). Ovi simpatički uticaji su posredovani prvenstveno preko  $\beta_1$  adrenergičkih receptora. Zbog toga  $\beta$ -blokatori mogu umanjiti ove simpatičke efekte i smanjiti brzinu sinusa, smanjiti brzinu provođenja (što može blokirati mehanizme ponovnog ulaska) i inhibirati aberantnu aktivnost pejsmejke.  $\beta$ -blokatori takođe utiču na akcione potencijale bez pejsmejke tako što povećavaju trajanje akcionog potencijala i efektivni refraktorni period. Ovaj efekat može igrati glavnu ulogu u blokiranju aritmija izazvanih kružnim mehanizmom (engl. *reentry*) [149].

### **1.8.6.4 Srčana insuficijencija**

Srčana insuficijencija je bolest koja je povezana sa dugotrajnom hipertenzijom. Studije su pokazale da čak u 75-90% slučajeva srčanoj insuficijenciji prethodi hipertenzija. Kod pacijenata sa dugotrajnom hipertenzijom, strukturne i funkcionalne promene u srcu mogu dovesti do razvoja srčane insuficijencije, pa je stoga, kontrola krvnog pritiska veoma važna. Većina pacijenata sa srčanom insuficijencijom ima oblik koji se zove sistolna disfunkcija, kod koje su smanjena kontraktilna funkcija

srca (gubitak inotropije) i e젝ciona frakcija. Iako se čini kontraindikovanim da se kardioinhibitorni lekovi kao što su  $\beta$ -blokatori koriste u slučajevima sistolne disfunkcije, kliničke studije su pokazale da neki specifični  $\beta$ -blokatori poboljšavaju srčanu funkciju i smanjuju smrtnost. Pored toga, oni smanjuju štetno remodelovanje srca koje se javlja kod hronične srčane insuficijencije. Iako tačan mehanizam po kome  $\beta$ -blokatori ostvaruju ovu korist kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom nije poznat, smatra se da je povezan sa blokadom prekomerne, hronične simpatičke stimulacije srca, za koju se zna da je štetna za oslabljeno srce. Kliničkim studijama je pokazano da primena  $\beta$ -blokatora kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom smanjuje stopu mortaliteta i morbiditeta. Do sada su samo tri  $\beta$ -blokatora odobrena od strane FDA za terapiju srčane insuficijencije: karvedilol, metoprolol i bisoprolol [149–151].

### 1.8.7 Neželjeni efekti $\beta$ -blokatora i kontraindikacije

Mnogi neželjeni efekti  $\beta$ -blokatora su povezani sa njihovim srčanim mehanizmima i uključuju bradikardiju, smanjen kapacitet vežbanja, srčanu insuficijenciju, hipotenziju i blok u atrioventrikularnoj (AV) provodljivosti [140].  $\beta$ -blokatori su stoga kontraindikovani kod pacijenata sa sinusnom bradikardijom (srčana frekvencija < 60 otkucaja u minuti) i delimičnim AV blokom. Gore navedeni neželjeni efekti su rezultat prekomerne blokade normalne simpatičke regulacije srca. Potreban je veliki oprez ako se  $\beta$ -blokator daje sa selektivnim blokatorom kalcijumovih kanala (npr. verapamil) zbog njihovog aditivnog efekta u stvaranju električne i mehaničke depresije [140].

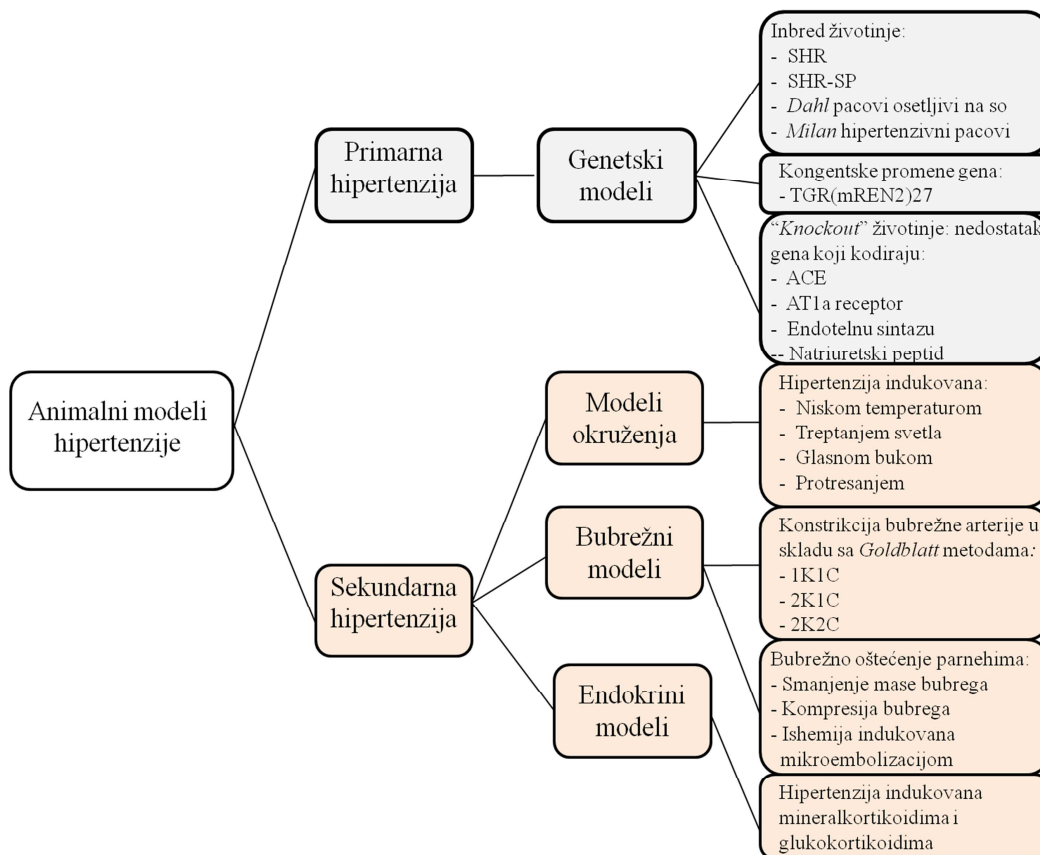
Kod terapije sa  $\beta$ -blokatorima može doći i do bronhokonstrikcije, posebno kada se pacijentima sa astmom daju neselektivni  $\beta$ -blokatori [149]. Zbog toga su neselektivni  $\beta$ -blokatori kontraindikovani kod pacijenata sa astmom ili hroničnom opstruktivnom bolešću pluća. Bronhokonstrikcija se javlja zbog toga što simpatički nervi koji inervišu bronhiolu aktiviraju  $\beta_2$  adrenergičke receptore i tako dovode do bronhodilatacije [149]. Terapija  $\beta$ -blokatorima takođe može maskirati tahikardiju koja predstavlja znak upozorenja za postojanje insulinom-indukovane hipoglikemije kod pacijenata sa dijabetesom. Međutim,  $\beta$ -blokatori se posebno preporučuju kod dijabetičara sa akutnim ili preležanim infarktom miokarda jer je pokazano da smanjuju stopu hospitalizacije i mortalitet. U tim okolnostima pokazalo se da je korist od upotrebe  $\beta$ -blokatora kod dijabetičara veća od štetnih metaboličkih efekata. Takođe, potreban je oprez kod sportista i fizički aktivnih osoba [140,149,151].

### 1.8.8 Animalni modeli hipertenzije

U velikom broju bolesti kod ljudi, uključujući i hipertenziju, životinjski modeli su korisni za razumevanje patogeneze ovih bolesti, pre svega omogućavajući sprovođenje adekvatnih eksperimentalnih strategija koje nije moguće sprovesti u studijama na ljudima [152]. Kod hipertenzije, korišćenje životinjskih modela za razumevanje patogeneze, prevencije i lečenja hipertenzije i njenih komorbiditeta zavisi od njihove validnosti kao modela hipertenzije kod ljudi [152]. Na Slici 1.17 prikazani su različiti animalni modeli primarne i sekundarne hipertenzije koji se sreću u eksperimentalnim istraživanjima [152].

Male životinje, kao što je pacov, imaju nekoliko prednosti u odnosu na veće poput zeca, psa, mačke, svinje i ovce jer su lakše za rukovanje i za obezbeđenje smeštaja, imaju kraće vreme gestacije i manje troškove održavanja [153]. Pored toga, dostupnost transgenih i *knockout* sojeva i male poteškoće u stvaranju novih genetskih modifikacija čine male animalne modele atraktivnim za istraživanje [153]. Međutim, pouzdano merenje krvnog pritiska je izazovno kod malih životinja, hirurške procedure su tehnički teže, a količina raspoloživog biološkog uzorka, posebno plazme i urina, može biti ograničavajuća, ali nedavni napredak u imidžingu i hirurškim intervencijama rešio je neka od ovih

pitanja. Ipak treba napomenuti da veće životinje imaju sličniji kardiovaskularni sistem ljudskom u poređenju sa pacovima [154].



**Slika 1.17.** Animalni modeli primarne i sekundarne hipertenzije u eksperimentalnim istraživanjima. (1K1C – jedan bubreg jedan klip, 2K1C – dva bubrega jedan klip, 2K2C – dva bubrega dva klipa, AT1a receptor – receptor angiotenzina II tipa 1a, ACE – angiotenzin konvertujući enzim, SHR – spontano hipertenzivni pacov, SHR-SP – spontano hipertenzivni pacov sklon moždanom udaru, TGR(mREN2)27 – pacovi koji prekomerno ekspimiraju mišji Ren2 gen) (prilagođeno prema [152]).

Prvobitni životinjski modeli hipertenzije koji su razvijeni 1934. godine uključivali su sužavanje bubrežnih arterija kod pasa (*Goldblatt* bubreg, po istraživaču Harry Goldblatt-u) ili bubrežnog parenhima (*Page* bubreg), čije su patofiziologije blisko oponašale analogne humane oblike hipertenzije [154]. Međutim, oboleli od renovaskularne hipertenzije ili hipertenzije izazvane kompresijom bubrežnog parenhima predstavljaju mali procenat obolelih od sekundarne hipertenzije, a poznato je da se sekundarna hipertenzija kod ljudi javlja kod 10 do 15% obolelih od hipertenzije, dok preostali procenat čine oboleli od esencijalne hipertenzije [154]. Stoga, postojala je velika potreba za životinjskim modelima esencijalne hipertenzije, u kojoj su genetski elementi prvenstveno odgovorni za njen nastanak [154].

Prema konvencionalnoj definiciji, svaki životinjski model hipertenzije validan je donekle jer pokazuje primarnu dijagnostičku odliku, tj. povećanje krvnog pritiska (>150 mmHg) [155]. Međutim, neki modeli su validniji u odnosu na druge sa stanovišta fenotipskih aspekata hipertenzije, kao što su starost, vremenski tok bolesti i povezani komorbiditeti [154]. Imajući u vidu klinički značaj oštećenja ciljnog organa kao posledice hipertenzije, treba napomenuti da su dostupni i modeli koji pokazuju validno u pogledu rizika od poremećaja povezanih sa hipertenzijom, kao što su hipertrofija leve

komore, metaboličke abnormalnosti, srčana insuficijencija, oštećenje bubrega i moždani udar (spontano hipertenzivni pacovi, *Dahl* pacovi osetljivi na so). Iako svi standardni životinjski modeli hipertenzije pokazuju povećan krvni pritisak, oni se značajno razlikuju po tome koliko verno oslikavaju ključne karakteristike humane hipertenzije kao što su genetski faktori, faktori sredine ili patofiziološki mehanizmi [154]. Ne postoji idealan životinjski model humane hipertenzije jer svi imaju inherentna ograničenja u pogledu validnosti jer postoje velike razlike između ljudi i životinja u pogledu faktora koji utiču na krvni pritisak, kao što su genetika, fiziologija, anatomija, ponašanje, uslovi životne sredine [154].

Složena priroda hipertenzivnih fenotipova u kombinaciji sa poligeniskim načinom nasleđivanja zahteva odgovarajuće animalne modele hipertenzije [154]. Sojevi pacova koji ispoljavaju genetsku hipertenziju uključuju: spontano hipertenzivne pacove (engl. *Spontaneously hypertensive rats*, SHR), *Dahl* pacove osetljivi na so (engl. *Dahl salt-sensitive rats*, DSS), *fawn-hooded* hipertenzivne pacove (engl. *Fawn-hooded hypertensive rats*- FHH), *Milan* hipertenzivne (MH) pacove, *Lyon* hipertenzivne (LH) pacove, *Sabra* hipertenzivne pacove, genetski hipertenzivne pacove i nasledni model arterijske hipertenzije pacova izazvane stresom. Od navedenih, najčešći korišćeni soj pacova je SHR, potom DSS pacovi, dok su ostali sojevi ređe korišćeni [154].

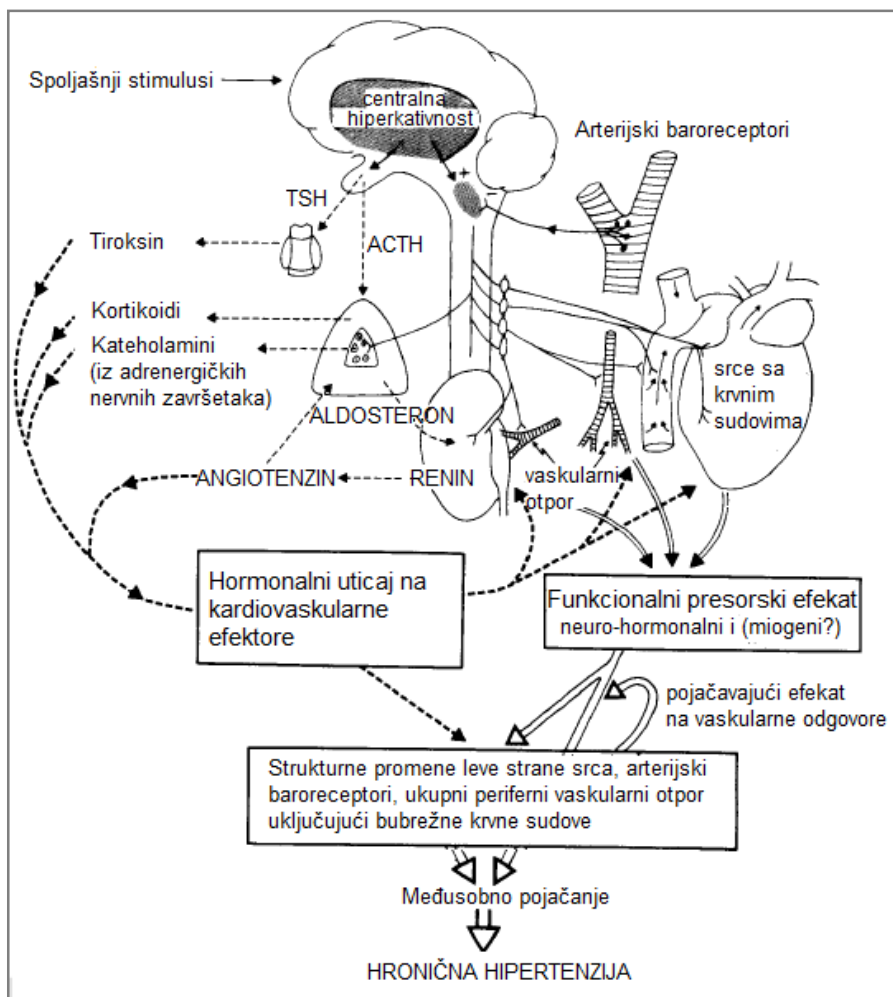
### 1.8.8.1 Spontano hipertenzivni pacovi

SHR soj potiče iz Kjota (Japan), ukrštanjem nesrodničkog para koji se sastoji od mužjaka pacova soja Wistar, koji je pokazivao spontano povišen krvni pritisak, i ženke istog soja sa blago povišenim krvnim pritiskom [154]. Naknadno uparivanje braće i sestara vršeno je selekcijom životinja iz okota koje su imale sistolni krvni pritisak viši od 150 mmHg [154]. Potomci ovakvih pacova su imali značajno više vrednosti krvnog pritiska od svojih roditelja, a sa povećanjem broja generacija vrednost krvnog pritiska je rasla. Razvoj hipertenzije kod SHR se može podeliti u četiri glavne faze: prehipertenzivna faza (0-4 nedelja starosti), zatim sledi labilna faza (5-10 nedelja starosti) u kojoj dolazi do brzog porasta krvnog pritiska kada se dostižu vrednosti od 180-200 mmHg, faza utvrđenja (preko 3-4 meseca starosti) praćena daljim sporim porastom pritiska, koji se često završava malignom fazom u podmaklom uzrastu (10 - 21 mesec života) [156]. SHR razvijaju mnoge karakteristike hipertenzivnog oštećenja krajnjeg organa: srčana hipertrofija, srčana insuficijencija (najčešće u periodu od 18-24 meseca) i bubrežna disfunkcija (proteinurija, smanjenje klirensa kreatinina). Međutim, oni ne pokazuju ozbiljne vaskularne probleme i nemaju tendenciju razvoja moždanog udara, a takođe ne razvijaju ni makroskopsku aterosklerozu ili vaskularnu trombozu. SHR se široko koriste u različitim studijama kao modeli pacova esencijalne hipertenzije. Efekti sledećih  $\beta$ -blokatora ispitivani su do sad na SHR: propranolol, pindolol, oksprenolol, atenolol i labetalol [157]; bisoprolol [158]; metoprolol [159]; tertatol i propranolol [160]; atenolol, metoprolol, nadolol [161]; propranolol [162-165]; karvedilol, nebivolol i atenolol [166]; nebivolol [167]. Krvni pritisak kod SHR se efikasno snižava inhibicijom renin-angiotenzin-aldosteron sistema, antagonistima kalcijuma i direktnim vazodilatatorima (hidralazin), dok su diuretici i antagonisti endotelina manje efikasni. Ovaj soj, ili podsojevi kao što su SHR skloni moždanom udaru, pokazali su se korisnim u studijama moždanog udara, vaskularne funkcije, autonomne regulacije, funkcije bubrega, terapijskih intervencija i esencijalne hipertenzije. SHR kao animalni model jako je zastupljen u studijama esencijalne hipertenzije i skriningu antihipertenzivnih lekova [154,156,168,169].

### 1.8.8.2 Patogeneza esencijalne hipertenzije kod SHR pacova

Patogeneza esencijalne hipertenzije nije u potpunosti razjašnjena ali se smatra da u njoj učestvuju različiti faktori ([Slika 1.18](#)) [156]. Nema sumnje da neurogeni uticaji doprinose hipertenziji kod SHR

bar u početnim fazama. Ova neurogena, simpatoadrenalna abnormalnost izgleda da je centralnog, a ne perifernog porekla [156]. Međutim, postoje dokazi koji ukazuju da neurohormonski mehanizam doprinosi razvoju hipertenzije kod SHR. Zapremina krvi i plazme je normalna kod mladih SHR, kao i sadržaj natrijuma, iako postoji tendencija ka smanjenju kalijuma u plazmi. Kod mladih SHR uočeno je umereno povećanje aktivnosti sistema renin-angiotenzin-aldosteron, što je posledica pojačane aktivnosti simpatikusa koji dovodi do povećanog oslobađanja renina, dok je kod odraslih uočena normalna aktivnost renina u plazmi [156]. Sekundarne promene na nivou bubrega i vaskularnog sistema SHR razvijaju se postepeno i verovatno doprinose kasnijim fazama hipertenzije. Drugi mogući uzročnik hipertenzije kod SHR može biti promena glatkih mišića krvnih sudova kardiovaskularnog sistema, posebno onih prekapilarnih sudova. Ova strukturna adaptacija može se smatrati normalnim adaptivnim odgovorom na povećano opterećenje izazvano visokim krvnim pritiskom. Povećanje ukupnog perifernog vaskularnog otpora je primećeno čak i tokom kompletne relaksacije glatkih mišića kod SHR u poređenju sa normotenzivnim pacovima što ukazuje na smanjen unutrašnji prečnik prekapilarnih sudova, koji su najodgovorniji na promenu perifernog vaskularnog otpora [156]. Ove hemodinamske karakteristike ukazuju na povećanje debljine zida, uglavnom zbog medijalne hipertrofije (povećana glatko-mišićna komponenta doprinosi većoj maksimalnoj kontraktilnoj jačini) koja ulazi u vaskularni lumen tokom maksimalne vazodilatacije (povećan vaskularni otpor) krvnih sudova kod SHR [156].



**Slika 1.18.** Interakcija između nervnih, hormonalnih i strukturnih uticaja koji postepeno dovode do hronične hipertenzije kod spontano hipertenzivnih pacova (prilagođeno prema [156])

### 1.8.8.3 Merenje krvnog pritiska kod eksperimentalnih životinja

Prilikom izvođenja ispitivanja antihipertenzivnih lekova na životinjama, moguće je dobiti podatke o hemodinamskim i farmakokinetičkim parametrima lekovite supstance [170]. Većina fizioloških i farmakoloških saznanja o krvnom pritisku, njegovoj regulaciji i uticaju lekova na kardiovaskularni sistem izvedena je iz eksperimenata sa akutno pripremljenim, anestetiziranim ili imobilisanim laboratorijskim životinjama [170]. Najčešće korišćena mesta merenja krvnog pritiska su karotidna arterija ili femoralna arterija [170]. Iako je korisna ova informacija o vrednostima krvnog pritiska, ona može biti prikrivena direktnim efektima anestezije i hirurške intervencije. Opšta anestezija, na primer, može imati značajan uticaj na osnovni protok krvi i funkciju miokarda, pa je u ovakvim studijama neophodno obezbediti odgovarajuću koncentraciju anestetika koja neće uticati na hemodinamske parametre. Hirurška intervencija može, između ostalog, da uvede lokalnu vazomociju, spontano vremenski zavisnu kontrakciju i relaksaciju mikro-arterija, čime se mogu poremetiti normalni hemodinamski parametri [170,171].

Dve najčešće korišćene metode za merenje krvnog pritiska kod malih laboratorijskih životinja kao što su miševi i pacovi su indirektna merenje repnom manžetnom i direktno merenje kateterima povezanim sa transdjuserom [170]. Osnovni nedostatak indirektnog merenja krvnog pritiska ogleda se u tome što vrednosti izmerenih hemodinamskih parametara mogu biti nepouzdana i netačne ukoliko se životinja se kreće ili je izložena glasnoj buci ili drugim stresorima [171]. Sa druge strane, prednost ove tehnike je to što je neinvazivna i što omogućava merenje krvnog pritiska kod svesnih laboratorijskih životinja. Direktno merenje krvnog pritiska kateterom uključuje postavljanje katetera koji je ispunjen fiziološkim rastvorom sa heparinom u arteriju i njegovo povezivanje preko elektromehaničkog pretvarača (engl. *transducer*) sa uređajem koji registruje dobijene vrednosti hemodinamskih parametara [171]. Najznačajniji ograničavajući faktor ove metode je prohodnost (sposobnost unošenja tečnosti i uzimanja uzorci krvi) vaskularnih katetera, posebno onih koji se koriste za vađenje krvi ili merenje pritiska. Pored ove dve najčešće korišćene metode za merenje krvnog pritiska, u literaturi se sreće upotreba novih radiotelemetrijskih sistema za merenje krvnog pritiska zasnovanih na korišćenju implantabilnih uređaja [171]. Prednost ovakve metode je direktno merenje krvnog pritiska tokom dužeg perioda kod svesnih laboratorijskih životinja. Navedenim metodama moguće je dobiti vrednosti sistolnog krvnog pritiska, dijastolnog krvnog pritiska, srednjeg arterijskog pritiska i frekvence srčanih kontrakcija [170,171].

Bez obzira na metod koji se koristi za merenje krvnog pritiska, važno je da se ima na umu da mnoštvo faktora sredine može uticati na vrednosti krvnog pritiska: temperatura sredine, ciklus svetlosti i tame, nivoi buke, trajanje ljudskog kontakta, broj životinja po jedinici kaveza, blizina drugih životinja koje su podvrgnute eksperimentalnoj proceduri, veličina i dizajn kaveza kao i pristup dodatnim predmetima kao što su igračke, trake za trčanje i skrovišta unutar kaveza [171].

## 1.9 Fiziološki zasnovani farmakokinetički modeli

Primena fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih (PBPK) modela apsorpcije kao *in silico* alata za predviđanje apsorpcije lekovitih supstanci, privlači veliko interesovanje farmaceutskih kompanija i brojnih istraživačkih grupa u akademskim institucijama. *In silico* PBPK modelovanje pokazalo se posebno korisnim u razvoju farmaceutskih oblika lekova za različite puteve primene (peroralni, (intra)oralni, parenteralni, inhalacioni, okularni, dermalni itd), mada se najveći broj primera iz literature odnosi na modelovanje bioperformansi peroralno primenjenih lekova. Apсорpcija lekovite supstance je veoma složen proces, koji zavisi od biofarmaceutskih karakteristika lekovite supstance, karakteristika formulacije i specifičnih fizioloških faktora organizma. Sve to zajedno određuje brzinu i stepen apсорpcije lekovite supstance. Razvijeni mehanistički modeli uzimaju u obzir sve navedene faktore prilikom modelovanja apсорpcije lekovite supstance. Pod uslovom da se koriste dobro definisani ulazni podaci, fiziološki zasnovani modeli apсорpcije imaju potencijal za interpretaciju faktora koji ograničavaju apсорpciju lekovite supstance i da omoguće tačna predviđanja brzine i obima apсорpcije lekovite supstance kod ljudi. Do danas je objavljeno nekoliko softver-specifičnih modela za predviđanje intestinalne apсорpcije i trenutno je dostupno nekoliko komercijalnih softverskih paketa. Dva najčešće korišćena komercijalna softverska paketa su GastroPlus<sup>TM</sup>, koji se zasniva na unapređenom prostornom modelu apсорpcije i tranzita (ACAT<sup>TM</sup>) i Simcyp<sup>TM</sup>, koji je zasnovan na unapređenom modelu rastvaranja, apсорpcije i metabolizma lekovite supstance kroz GI trakt (ADAM<sup>TM</sup>) [172,173].

Vodeća regulatorna agencija FDA je prepoznala mogućnosti i perspektivu *in silico* modelovanja i simulacija (engl. *modeling and simulation* - M&S) pa je 2016. godine odobrila formiranje radne grupe za modelovanje i simulaciju (engl. *Modeling and Simulation Working Group* - ModSimWG) čiji je primarni cilj podizanje svesti o koristima i mogućnostima upotrebe M&S prilikom procesa dobijanja dozvole za stavljanje leka u promet. U novembru 2022. godine radna grupa za modelovanje i simulaciju je objavila novi izveštaj “*Successes and Opportunities in Modeling & Simulation for FDA*”, u kom se, između ostalog, objašnjava kako i gde se M&S može koristiti, kao i vrstu i svrhu korišćenja M&S [174]. Takođe, radna grupa za alternativne metode (engl. *Alternative Methods Working Group*) je u junu 2023. godine objavila izveštaj “*Advancing Alternative Methods at FDA*”, koji postavlja temelj za integraciju alternativnih pristupa u regulatorne programe FDA sa ciljem zamene, smanjenja i poboljšanja ispitivanja na životinjama - 3R princip (engl. *Replace, Reduce, and Refine animal testing*) i implementiranja novih tehnologija za poboljšanje prediktivnosti predkliničkih studija. Vodeći regulatorni organi su prepoznali vrednost *in silico* M&S, pa su tokom proteklih godina uložili veliki napor da pripreme relevantne smernice kako bi se olakšalo korišćenje *in silico* M&S u regulatornim podnescima [173]:

1. “*The use of physiologically based pharmacokinetic analyses - biopharmaceutics applications for oral drug product development, manufacturing changes and controls*”, radna verzija izdata u oktobru 2020. godine od strane FDA.
2. “*Guideline on the reporting of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation*”, izdato u decembru 2018. godine od strane EMA, na snazi od jula 2019. godine.
3. “*Physiologically based pharmacokinetic analyses - format and content guidance for industry*”, izdato u avgustu 2018. godine od strane FDA.

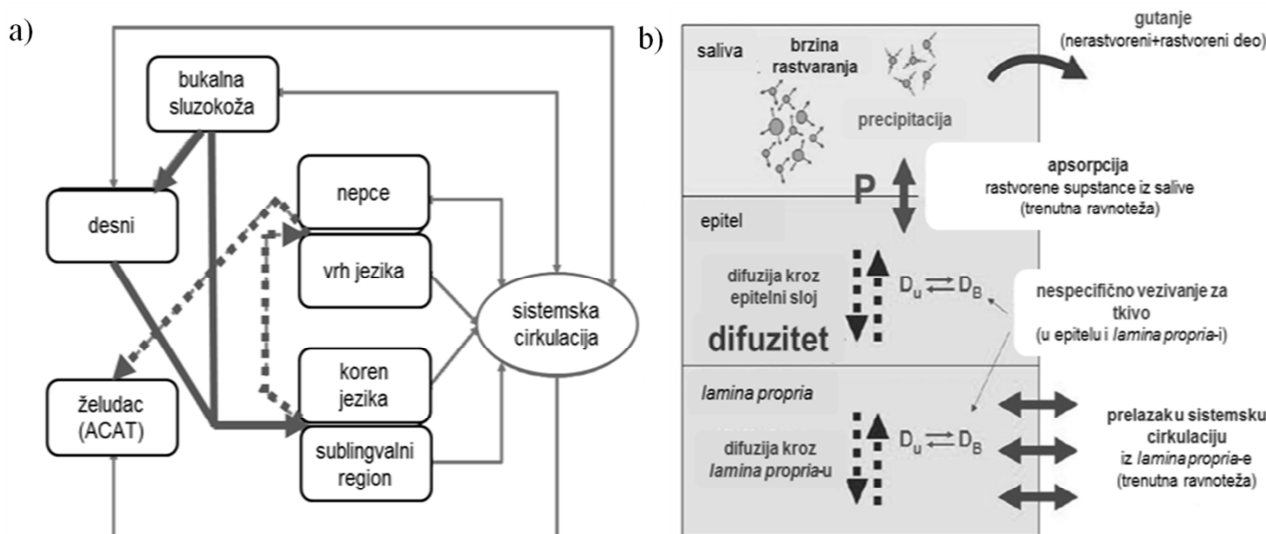
Nedostatak smernica “Dobre simulacione prakse” (engl. *Good Simulation Practices*) može biti jedan od ograničavajućih faktora za širu upotrebu i prihvatanje M&S u regulatornim podnescima. [174].



### 1.9.1 Prostorni model apsorpcije i transporta lekovite supstance kroz usnu duplju

Prostorni model apsorpcije i transporta kroz usnu duplju (engl. *Oral Cavity Compartmental Absorption and Transit Model*, OCCAT<sup>TM</sup>) je forma fiziološki zasnovanog farmakokinetičkog modela koji je dizajniran da simulira apsorpciju lekovite supstance preko sluzokože usne duplje. Ovaj model karakteriše usnu duplju kroz 6 fizioloških odeljaka: bukalna sluzokoža, nepce, vrh jezika, koren jezika, desni i dno usne duplje (sublingvalni odeljak) koji su povezani protokom krvi i salive. Model uzima u obzir fiziološke karakteristike svih 6 fizioloških odeljaka: protok krvi, površina, debljina epitela, debljina *lamine propriae* i pH vrednost [175]. Zbog pretpostavke da se tokom bukalne/sublingvalne primene lekova, neki deo primenjene doze lekovite supstance proguta, OCCAT<sup>TM</sup> je model povezan sa unapređenim prostornim modelom apsorpcije i transporta kroz GI trakt (engl. *Advanced Compartmental Absorption and Transit*, ACAT<sup>TM</sup>) kako bi se predvidela apsorpcija dela lekovite supstance koja se proguta. OCCAT<sup>TM</sup> model ima mogućnost simulacije rastvaranja i precipitacije lekovite supstance u salivi, apsorpcije i difuzije kroz oralnu sluzokožu, količine lekovite supstance koja se vezuje za tkivo, kao i gutanje neapsorbovanog dela lekovite supstance (rastvorenog ili nerastvorenog) (Slika 1.19b). Model uzima u obzir stvaranje salive u bukalnom regionu (brzinom od 0,04 mL/min koja prolazi kroz region obraza i desni, sve do dna usne duplje) i sublingvalne regije gde se iz sublingvalnih pljuvačnih žlezdi stvara saliva brzinom protoka od 0,32 mL/min (Slika 1.19a) [175]. Saliva se nakuplja na dnu usne duplje i sublingvalnog regiona dok se bazalni volumen ne udvostruči da bi se aktivirao proces gutanja. Brzina protoka salive može se podesiti kako bi se ispravno simulirao proces apsorpcije lekovite supstance preko sluzokože usne duplje. Određeno je da bazalna zapremina salive kod ljudi iznosi 0,9 mL [175].

Apsorpcija lekovite supstance preko sluzokože usne duplje obuhvata konstantnu preraspodelu između salive i gornjih slojeva epitela. Nakon što lekovita supstanca uđe u prvi podslaj epitela, nastavlja da difunduje kroz ostale slojeve epitelnog tkiva sve do *lamine propriae*. Brzina difuzije kroz epitelne subslojeve i *lamine propriae* zavisi od difuziteta lekovite supstance, površine određenog odeljka usne duplje i debljine epitelnog sloja. Oralna sluzokoža se sastoji od višestrukih slojeva ćelija, ali kako bi se što bolje simulirali fiziološki uslovi i način apsorpcije lekovite supstance, OCCAT<sup>TM</sup> model je epitel i *lamina propria* podelio na 6 hipotetičkih slojeva [175]. Struktura OCCAT<sup>TM</sup> model prikazana je na Slici 1.19a.



**Slika 1.19.** Šematski prikaz dizajna fiziološki zasnovanog modela usne duplje (OCCAT<sup>TM</sup> model). Pravougaonici predstavljaju pojedinačne odeljke usne duplje, sive strelice simbolizuju razmenu

lekovite supstance između permeabilnih slojeva pojedinačnih odeljaka i sistemske cirkulacije, crne strelice označavaju protok salive u usnoj duplji, a crne isprekidane strelice predstavljaju prenos lekovite supstance pri gutanju (a); Šematski prikaz procesa koji definišu preraspodelu lekovite supstance između salive i slojeva sluzokože usne duplje (b) [176].

U fazi razvoja modela koji simulira apsorpciju lekovite supstance preko sluzokože usne duplje, neophodno je definisati model oralnog prolaska (engl. *oral transit model*) koji najbolje opisuje način primene farmaceutskog oblika leka. U tom smislu, OCCAT™ model nudi 5 modela oralnog prolaska: model normalnog gutanja (engl. *normal swallowing model*), model zadržavanja i gutanja (engl. *hold and swallow model*), model zadržavanja, ispiranja i gutanja (engl. *hold, rinse and swallow model*), model zadržavanja i ispljuvavanja (engl. *hold and expectorate model*) i model zadržavanja, ispiranja i ispljuvavanja (engl. *hold, rinse and expectorate model*). Model normalnog gutanja podrazumeva da je subjektima dozvoljeno normalno gutanje, pri čemu sa svakim gutanjem jedan deo lekovite supstance (nerastvorna ili rastvorena) prelazi iz usne duplje u želudac. Model zadržavanja i gutanja podrazumeva da se subjektima daju uputstva da drže lekoviti preparat u usnoj duplji određeno vreme bez gutanja. Nakon određenog vremena zadržavanja, subjektima je dozvoljeno da progutaju, ali se ne daje dodatna voda da se ne bi količina lekovite supstance koja je zaostala u salivi "isprala" do želuca. Model zadržavanja, ispiranja i gutanja označava da se subjektima daju uputstva da drže lekoviti preparat u usnoj duplji određeno vreme bez gutanja. Nakon određenog vremena zadržavanja, subjektima je dozvoljeno da progutaju, pri čemu se daje dodatna voda kako bi se lekovita supstanca „isprala“ do želuca tako da nema rastvorenog dela lekovite supstance u preostaloj salivi. Model zadržavanja i ispljuvavanja označava da se subjektima daju uputstva da drže lekoviti preparat u usnoj duplji određeno vreme bez gutanja, a zatim ispljuvavaju preostali neapsorbovani deo lekovite supstance bez dodatnog ispiranja usta. Deo lekovite supstance koji je rastvoren u preostaloj zapremini salive dalje može biti apsorbovan ili progutan. Model zadržavanja, ispiranja i ispljuvavanja označava da se subjektima daju uputstva da drže lekoviti preparat u usnoj duplji tokom određenog vremenskog perioda bez gutanja, a zatim ispljuvavaju preostali neapsorbovani deo lekovite supstance uz dodatno ispiranje usta tako da nema ostatka rastvorene lekovite supstance u zaostaloj salivi [177].

OCCAT™ model može da simulira apsorpciju lekovite supstance preko sluzokože usne duplje za različite farmaceutske oblike koji se primenjuju u usnoj duplji. U poslednjoj verziji OCCAT™ (verzija 9.7, 2019. godina) modela, na raspolaganju su farmaceutski oblici sa trenutnim oslobađanjem (sublingvalni rastvor, sublingvalne tablete, lingvalni sprej, lingvalne tablete, intraoralni rastvor, intraoralne tablete) ili farmaceutski oblici sa kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance (bukalni filmovi). Bukalni film predstavlja farmaceutski oblik sa kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance u usnoj duplji kod kog se neoslobođeni deo lekovite supstance zadržava u usnoj duplji, dok se oslobođena lekovita supstanca može apsorbovati direktno iz usne duplje ili progutati sa salivom i polako preći u želudac odakle nastavlja svoj prolaz duž intestinalnog trkta [177].

S obzirom na sve veći značaj primene fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela koji povezuju *in vitro* karakteristike farmaceutskog oblika leka sa performansama u organizmu, ovo polje predstavlja veliki interes za istraživače. Do sada je OCCAT™ model korišćen za procenu apsorpcije lekovite supstance na nivou oralne sluzokože iz sublingvalnih tableta, bukalnih tableta i orodisperzibilnih tableta i filmova [175,178,179].

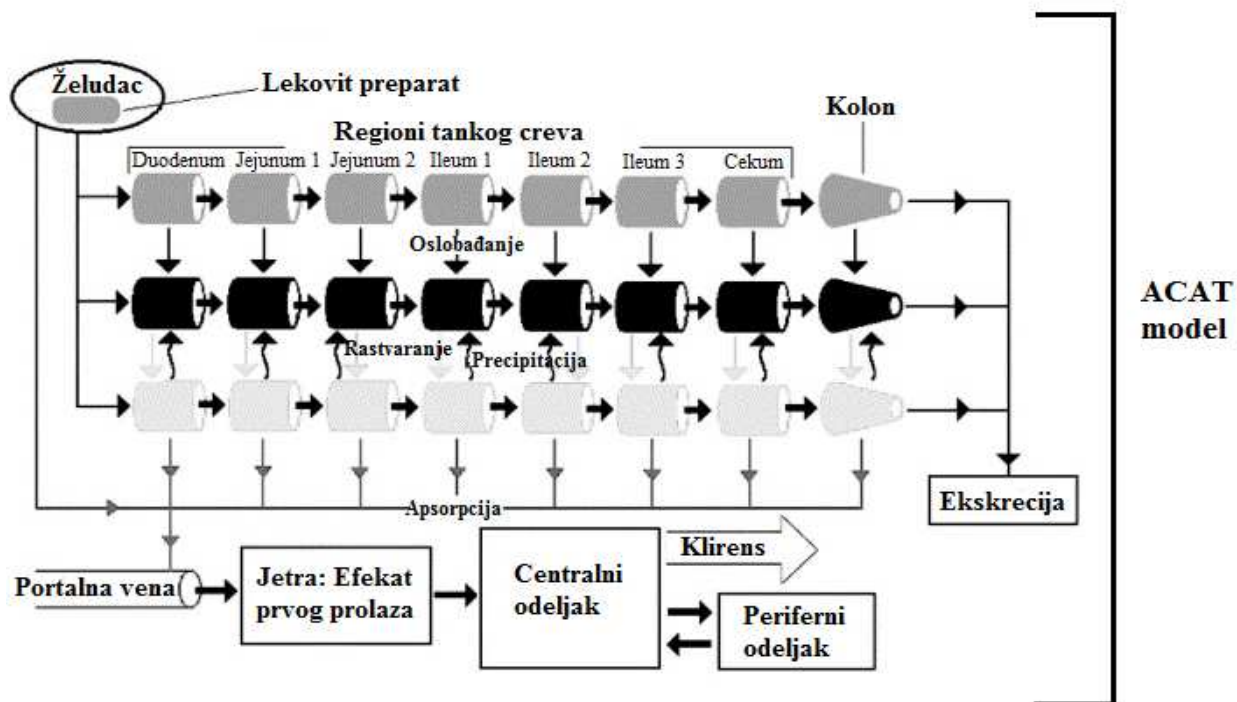
## **1.9.2 Unapređen prostorni model apsorpcije i transporta lekovite supstance kroz gastrointestinalni trakt**

Peroralna apsorpcija lekovite supstance je složen proces koji se sastoji od više koraka koji uključuju: dezintegraciju farmaceutskog oblika leka i rastvaranje lekovite supstance, pražnjenje želuca,

transport lekovite supstance kroz intestinum, intestinalnu permeaciju i transport, metabolizam u crevima i jetri. Faktori koji mogu uticati na brzinu i obim apsorpcije lekovite supstance su farmaceutski oblik, fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakteristike lekovite supstance i fiziološke karakteristike GI trakta. Znanje o tome kako navedeni koraci i faktori utiču na apsorpciju lekovite supstance podstakli su razvoj *in silico* modela oralne apsorpcije lekovite supstance. Trenutno su modelovanja i simulacije oralne apsorpcije lekovitih supstanci jako zastupljene u njihovom otkrivanju, razvoju farmaceutskih preparata, a koriste se i u regulatorne svrhe. Ovakva vrsta modelovanja omogućava da se predvide brzina i obim oralne apsorpcije lekovite supstance *in vivo*, olakša izbor glavnog kandidata za lek, uspostavi strategija razvoja formulacije i podrži razvoj regulatorne politike [180,181].

Primeri prostornih modela GI apsorpcije su: prostorni model apsorpcije i transporta lekovite supstance kroz GI trakt (engl. *Compartmental Absorption and Transit model*, CAT); *Grass* model; model apsorpcije i transporta lekovite supstance kroz GI trakt (engl. *Gastrointestinal Transit Absorption model*, GITA); unapređen prostorni model apsorpcije i transporta lekovite supstance kroz GI trakt (engl. *Advanced Compartmental Absorption and Transit model*, ACAT) i unapređen model rastvaranja, apsorpcije i metabolizma lekovite supstance kroz GI trakt (engl. *Advanced Dissolution, Absorption, and Metabolism model*, ADAM) [180].

ACAT<sup>TM</sup> model je razvijen na osnovu CAT modela i uključuje metabolizam prvog prolaza i apsorpciju na nivou kolona. Ovaj model uključuje linearnu kinetiku prolaska, nelinearni metabolizam/kinetiku transporta, šest stanja lekovite supstance u svakom odeljku (neoslobođena, nerastvorena, rastvorena, degradirana, metabolisana i apsorbovana), devet odeljaka koji odgovaraju različitim segmentima GI trakta (želudac, sedam prostora tankog creva i kolon) uključujući i 9 odeljaka enterocita i tri stanja izlučene lekovite supstance (neoslobođena, nerastvorena i rastvorena). Šematski prikaz ACAT<sup>TM</sup> modela dat je na [Slici 1.20](#). Simulacija GI apsorpcije pomoću ACAT<sup>TM</sup> modela uzima u obzir i fizičko-hemijske (pKa, rastvorljivost, veličina čestica, gustina čestica i permeabilnost), fiziološke (pražnjenje želuca, brzina prolaska kroz različite segmente GI trakta, metabolizam prvog prolaza i luminalni transport) i faktore formulacije (farmaceutski oblik i doza) [180].



**Slika 1.20.** Šematski prikaz unapređenog prostornog model apsorpcije i tranzita lekovite supstance kroz GI trakt (ACAT<sup>TM</sup> model) (prilagođeno prema [181])

Na biološku raspoloživost lekova, primarno na obim apsorpcije, u najvećoj meri utiče fenomen poznat kao *efekat prvog prolaza* i *presistemski metabolizam*. Zbog njihovog doprinosa smanjenju biološke raspoloživosti lekovite supstance, poznavanje efekta prvog prolaza i presistemskog metabolizma je od suštinskog značaja za procenu terapijske efikasnosti režima doziranja. Metabolizam lekovitih supstanci pre stizanja u sistemsku cirkulaciju može da se odigra u lumenu creva, u zidu creva i/ili u jetri. U enterocitima su prisutni brojni enzimi koji učestvuju u metabolizmu određene lekovite supstance i transporteri koji zajedno imaju kompleksan uticaj na apsorpciju peroralno primenjenih lekovitih supstanci. Peroralno primenjena lekovita supstanca ulazi u portalnu venu iz GI trakta i transportuje se do jetre koja predstavlja najvažniji organ za metabolizam lekovitih supstanci. Metabolizam se odvija u hepatocitima i obično je posledica enzimskih reakcija gde familija enzima citohroma P-450 čini najvažniju porodicu enzima koji vrše oksidaciju lekovitih supstanci u jetri. Brzina eliminacije lekovite supstance u jetri zavisi od brzine protoka krvi kroz jetru, metaboličkog kapaciteta enzima i vezivanja lekovite supstance za proteine plazme [22,180,181].

Dobra strana ACAT<sup>TM</sup> modela je što omogućava simulaciju kinetike zasićenja, odnosno *Michaelis-Menten*-ove kinetike metabolizma i aktivnog transporta lekovite supstance kroz membranu enterocita, korišćenjem podataka o *in vitro* aktivnosti (maksimalna brzina metabolizma lekovite supstance -  $V_{max}$ , i *Michaelis-Menten*-ova konstanta -  $k_m$ ) enzima i transportera. Ovaj model apsorpcije omogućava predviđanje apsorpcije peroralno primenjenih lekova koji podležu efektu prvog prolaza kroz jetru, efektu presistemskog metabolizma kroz GI trakt i jetru, efluks transporteru i efektu prvog prolaza plus efluks transporteru. Osim toga, ovaj model omogućava predviđanje interakcije leka i hrane, kao i lek-lek interakcije tokom procesa apsorpcije. U kombinaciji sa podacima o biorelevantnoj rastvorljivosti, može se predvideti stepen efekta hrane na gastrointestinalnu apsorpciju lekovite supstance u uslovima uzimanja farmaceutskog preparata na prazan stomak, kao i nakon obroka. Takođe, na osnovu eksperimentalnih *in vitro* podataka o brzini rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog preparata, omogućava se simulacija apsorpcije lekovite supstance *in vivo*, kao i uspostavljanje *in vitro* - *in vivo* korelacije. Ovaj model je korišćen kao alat za izostavljanje studija biološke ekvivalentnosti na osnovu koncepta biofarmaceutskog sistema klasifikacije (engl. *BCS biowaiver*) za određene lekovite supstance druge grupe BSK. Pokazalo se da su *in silico* modeli korisni za identifikaciju lekova kandidata druge grupe BSK za "*biowaiver*". Zaključeno je da se za lekovite preparate sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance druge grupe BSK tipa slabih baza i slabih kiselina mogu izostaviti studije biološke ekvivalencije pod uslovom da se supstanca potpuno rastvori pre nego što stigne do srednjeg jejunuma uz postojanje diskriminatorne i *in vivo* prediktivne metode za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja [182].

Tokom protekle dve decenije naučnici su razvili i unapredili mehanističke apsorpcione modele koji simuliraju brzinu i obim apsorpcije peroralno primenjenih lekova. U poređenju sa ranijim *in silico* modelima, nedavno razvijeni ili unapređeni modeli imaju bolju predvidivost uzimajući u obzir više faktora kao što su rastvaranje, degradacija, gastrično pražnjenje, crevni tranzit, efekat prvog prolaza i crevni transport. Međutim, treba znati da ne postoji "savršen" model koji u potpunosti obuhvata složenost procesa apsorpcije peroralno primenjenih lekovitih supstanci. Generalno, većina *in silico* modela apsorpcije uspešno predviđa pasivnu apsorpciju peroralno primenjenih lekovitih supstanci. Međutim, kod lekovitih supstanci koje podležu aktivnom transportu posredovanom influksu ili efluksu i presistemskom metabolizmu, mogu se javiti neprecizna predviđanja. Naučnici su se bavili razvojem novih pristupa kao što su model crevne epitelne ćelije (engl. *intestinal epithelial cell model*), model odvojenog prolaska (engl. *segregated-flow model*) i segmentni model odvojenog prolaska (engl. *segmental segregated-flow model*), kako bi se upotpunila i poboljšala predvidivost *in silico* modela apsorpcije [180].

2

**CILJ**

## 2.1 Cilj istraživanja

Osnovni cilj istraživanja ove disertacije obuhvata razvoj mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova sa modifikovanim (produženim) oslobađanjem propranolol-hidrohlorida primenom QbD pristupa kroz sveobuhvatnu farmaceutsko-tehnološku, kao i biofarmaceutsku karakterizaciju na bazi *in vivo* ispitivanja obima i brzine apsorpcije propranolola i hemodinamskih efekata kod spontano hipertenzivnih pacova i *in silico* predviđanja profila koncentracije propranolola u funkciji vremena u plazmi kod ljudi nakon primene mukoadhezivnih bukalnih farmaceutskih oblika lekova.

Specifični ciljevi disertacije su realizovani kroz četiri faze istraživanja koji obuhvataju:

- Odabir odgovarajućih mukoadhezivnih polimera i procena mogućnosti razvoja formulacija i postupaka izrade bukalnih tableta i filmova;
- Farmaceutsko-tehnološka i funkcionalna ispitivanja izrađenih mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova uz procenu uticaja faktora formulacije na mukoadhezivnost, brzinu rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida iz bukalnih formulacija;
- Ispitivanje hemodinamskih efekata (sistolni krvni pritisak, dijastolni krvni pritisak, frekvencija srčanih kontrakcija) i farmakokinetike propranolola iz odabranih formulacija mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova u modelu esencijalne hipertenzije na spontano hipertenzivnim pacovima, kao i uporedna analiza podataka sa peroranom primenom tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida u istoj dozi.
- Razvoj, validacija i primena *in silico* modela za procenu/predviđanje apsorpcije i biološke raspoloživosti propranolola kod ljudi nakon intraoralne (bukalne) primene mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova primenom fiziološki zasnovanog farmakokinetičkog modela apsorpcije i transporta lekovite supstance kroz usnu duplju (OCCAT™) i unapređenog prostornog modela apsorpcije i transporta kroz GI trakt (ACAT™), kao i uporedna analiza podataka sa peroranom primenom tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida.

3

## **EKSPERIMENTALNI DEO**

## 3.1 Materijali

Za izradu dvoslojnih mukoadhezivnih bukalnih tableta korišćeni su sledeći hidrofilni polimeri: polietilenoksidni polimer - PEO (Polyox<sup>®</sup> WSR 301 Leo NF, molekulska masa  $4 \times 10^6$  g/mol, Colorcon Ltd., Velika Britanija), karbomer - CB (Carbopol<sup>®</sup> 934P, BF Goodrich, SAD), polivinilalkohol - PVA (Polyvinyl alcohol<sup>®</sup>, molekulska masa  $67 \times 10^3$  g/mol, stepen polimerizacije ~ 1400, estarski broj 130-150, Reanal, Mađarska). Etilceluloza (Ethocel<sup>®</sup>, Fluka Chemie AG, Nemačka) je korišćena za izradu barijernog sloja nerastvornog u vodi. Kvalitet svih ekscipijenasa odgovara zahtevima Ph. Eur. 11.0. Lekovita supstanca iz grupe  $\beta$ -blokatora je propranolol-hidrohlorid (doniran od Galenika a.d., Srbija).

Za izradu mukoadhezivnih bukalnih filmova korišćeni su sledeći hidrofilni polimeri: hidroksipropilmetilceluloza - HPMC (Metolose<sup>®</sup> 60SH-4000, Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japan), polietilen oksidni polimer - PEO (Polyox<sup>®</sup> WSR 205, molekulska masa  $6 \times 10^5$  g/mol, Dow Chemical Company, SAD) i polivinilalkohol - PVA (Mowiol<sup>®</sup> 18-88, molekulska masa  $13 \times 10^4$  g/mol, Sigma-Aldrich Chemistry, Nemačka). Propilenglikol (Propylene glycol<sup>®</sup>, Fagron Hellas, Grčka) je korišćen kao plastifikator. Prečišćena voda je korišćena kao rastvarač. Kvalitet svih ekscipijenasa odgovara zahtevima Ph. Eur. 11.0. Lekovita supstanca iz grupe  $\beta$ -blokatora je propranolol-hidrohlorid (doniran od Galenika a.d., Srbija).

Komercijalno dostupan mucin iz svinjskog želuca, tip II (*Mucin from porcine stomach, type II<sup>®</sup>*, Sigma-Aldrich Co., Misuri) je korišćen za pripremu diskova mucina i disperzije mucina prilikom ispitivanja mukoadhezivnih svojstava bukalnih farmaceutskih oblika lekova, kao i za ispitivanje permeacije lekovite supstance.

Ispitivanje brzine rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida vršeno je u veštačkoj salivi. Kalijum-dihidrogenfosfat (1 g), dikalijum-hidrogenfosfat (2 g), natrijum-hlorid (8,5 g) i prečišćena voda (do 1000 mL) su korišćeni za pripremu veštačke salive [183]. pH vrednost je podešena na pH 6,8 dodavanjem 0,1 M hlorovodonične kiseline.

## 3.2 Metode prve faze eksperimentalnog rada

### 3.2.1 Primena D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše za generisanje eksperimentalnog plana

Tehnika eksperimentalnog dizajna - dizajn smeše, korišćena je za razvoj formulacije kako bi se identifikovao i procenio efekat odabranih hidrofilnih polimera na jačinu mukoadhezije, kao i brzinu rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta. Primena dizajna smeše omogućava interpretaciju potencijalnih interakcija između polimera, kako bi se definisali optimalni parametri formulacije obezbeđujući dvoslojne bukalne mukoadhezivne tablete sa željenim svojstvima [63]. Dizajn smeše omogućava ispitivanje efekta jednog polimera, kao i interakcije polimera, sa konstantnim ukupnim zbirom njihovog sadržaja u formulaciji [63].

Generisanje eksperimentalnog plana i obrada dobijenih rezultata primenom analize varijanse (ANOVA) sprovedeno je pomoću kompjuterskog programa *Design Expert<sup>®</sup>* (verzija 7.0.0; Stat-Ease Inc., Mineapolis, SAD). Primenom D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše, ispitivan je efekat koncentracije polimera: PEO (A), PVA (B) i CB (C), kao i efekat njihovih interakcija, na svojstva dvoslojnih mukoadhezivnih bukalnih tableta. Linearni matematički model je korišćen za objašnjenje odnosa između zavisnih promenljivih (tabletnih svojstava) i nezavisnih promenljivih (A, B i C) kao što je naznačeno u jednačini 3.1 [63,66]:

$$Y_i = \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_4 AB + \beta_5 AC + \beta_6 BC \quad 3.1$$



gde je  $Y_i$  ispitivana zavisna varijabla (količina rastvorene i permeirane lekovite supstance ili jačina mukoadhezije);  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$  linearni koeficijenti koji pokazuju uticaj odgovarajućih nezavisno promenljivih (A, B, C);  $\beta_4$ ,  $\beta_5$  i  $\beta_6$  koeficijenti interakcije koji pokazuju uticaj odgovarajućih interakcija ispitivanih faktora (AB, AC, BC).

Značajnost svakog ispitivanog faktora u modelu procenjavana je ANOVA statističkim testom, pri čemu su iz modela isključeni parametri koji nisu imali statističku značajnost. Faktori i interakcije su smatrani statistički značajnim ukoliko je  $p$  vrednost manja od 0,05. Prilikom odabira pogodnog matematičkog modela koji najbolje opisuje vezu između zavisnih i nezavisnih varijabli, razmatrani su sledeći parametri:  $p$  vrednost, koeficijent determinacije ( $R^2$ ), prilagođen koeficijent determinacije (prilagođeni  $R^2$ ) i predviđeni koeficijent determinacije (pred  $R^2$ , kao mera koliko dobro model predviđa vrednost odgovora. Primenom eksperimentalnog dizajna smeše, izrađen je eksperimentalni plan (Tabela 3.1), koji se sastoji od 14 formulacija MBT. Takođe, u Tabeli 3.2 prikazan je eksperimentalni plan za izradu 21 formulacije MBF.

**Tabela 3.1.** Sastav mukoadhezivnih bukalnih tableta dobijen primenom dizajna smeše

Formulacija	Sastav (mg)				
	PROP	PEO	PVA	CB	EC
F1	30	/	42	28	100
F2	30	26	23	21	100
F3	30	22	42	6	100
F4	30	13	15	42	100
F5	30	42	/	28	100
F6	30	42	28	/	100
F7	30	42	14	14	100
F8	30	28	/	42	100
F9	30	11	29	30	100
F10	30	12	40	18	100
F11	30	/	28	42	100
F12	30	70	/	/	100
F13	30	/	70	/	100
F14	30	/	/	70	100

PROP - propranolol-hidrohlrid; PEO - polietilenoksid;  
PVA - polivinilalkohol; CB - karbomer; EC - etilceluloza

**Tabela 3.2.** Sastav pripremljenih vodenih disperzija za izradu mukoadhezivnih bukalnih filmova

Formulacija	Sastav (%)			
	HPMC	PEO	PVA	PG
F1	1,5	0,5	0,5	2
F2	0,5	1,5	0,5	2
F3	0,5	0,5	1,5	2
F4	1	1	0,5	2

F5	1	0,5	1	2
F6	0,5	1	1	2
F7	0,83	0,83	0,83	2
F8	1,2	0,65	0,65	2
F9	0,65	1,2	0,65	2
F10	0,65	0,65	1,2	2
F11	1,5	0,5	1	2
F12	0,5	1,5	1,5	2
F13	0,5	2	1,5	2
F14	0,5	2	2	2
F15	0,5	3	1,5	2
F16	0,5	3,5	1,5	2
F17	1,5	0,5	1,5	2
F18	2	0,5	1,5	2
F19	1,5	1	1,5	2
F20	1	2	1,5	2
F21	1,5	2	1,5	2

HPMC - hidroksipropilmetilceluloza; PEO - polietilenoksid; PVA - polivinilalkohol

### 3.2.2 *Izrada mukoadhezivnih bukalnih tableta*

Tablete su izrađene metodom direktne kompresije u dve faze na ekscenter tablet mašini (*Korsch EKO*, Korsch, Nemačka) koristeći klipove ravne površine prečnika 10 mm. U cilju sprečavanja oslobađanja propranolol-hidroklorida u usnu šupljinu i njegovo naknadno gutanje, izrađene su dvoslojne tablete sa barijernim slojem koji je sastavljen od etilceluloze, inertnog hidrofobnog polimera nerastvorljivog u vodi [184,185]. Mešanje polimera i propranolol-hidroklorida je izvršeno na uređaju za mešanje praškova (*Powder mixer*, Farmalabor Tech, Italija) u trajanju od 15 minuta. Masa praška koja odgovara jediničnoj dozi odgovarajuće formulacije je odmeravana na analitičkoj vagi i ručno postavljena u matricu tablet mašine. Hidrofobni barijerni sloj je bio izrađen odmeravanjem 100 mg praška etilceluloze koji je zatim blago komprimovan. Nakon toga, matrica je napunjena sa 100 mg smeše praškova, koja je sadržala odabrane polimere i propranolol-hidroklorid u dozi od 30 mg, tako da je ukupna masa MBT iznosila 200 mg.

### 3.2.3 *Izrada placebo formulacija mukoadhezivnih bukalnih filmova*

U ovoj preliminarnoj fazi su pripremljeni placebo MBF metodom izlivanja iz rastvora i uparavanjem rastvarača (engl. *solvent casting method*). Prvo je u hemijskoj čaši dispergovan PVA u prečišćenoj vodi zagrejanom na 90 °C uz konstatno mešanje na 400 rpm (IKA® RCT standard, Staufen, Nemačka), a potom je dobijena disperzija ohlađena na sobnu temperaturu. Potom je usledilo dispergovanje HPMC i PEO polimera na sobnoj temperaturi i na kraju je dispergovan propilenglikol kao plastifikator. Disperzija je ostavljena da se konstatno meša tokom 24 h. Nakon dodatka ovih hidrohilnih polimera uzorci su mešani pri manjoj brzini kako bi se sprečilo inkorporiranje vazduha. Disperzije kod kojih je nakon jednodnevnog mešanja uočeno prisustvo mehurića, homogenizovane su na ultrazvučnom kupatilu Bandelin Sonoex RK 102H (Sonoex-Bandelin, Nemačka) tokom 15 minuta.

Pripremljene disperzije su izlivanе u Petri šolje i ostavljene da se suše oko 48 h pri ambijentalnim uslovima. Nakon sušenja, filmovi su sečeni na odgovarajuću veličinu (1×1 cm), pakovani u aluminijumsku foliju i čuvani u eksikatoru. Pre pakovanja je vizuelno okarakterisan izgled izrađenih filmova.

### **3.2.4 Procena organoleptičkih svojstava vodenih disperzija i placebo formulacija mukoadhezivnih bukalnih filmova**

Organoleptička svojstva vodenih disperzija i placebo formulacija mukoadhezivnih bukalnih filmova procenjena su vizuelno. Vizuelna svojstva vodenih disperzija, deskriptivno su procenjena kao transparentna (gotovo bezbojna disperzija), disperzija koji nija potpuno transparentna ili je pak beličaste boje. Vizuelna svojstva izrađenih filmova nakon sušenja na sobnoj temperaturi, deskriptivno su procenjena kao transparentni (gotovo nevidljivi film), film koji nije potpuno transparentan, kao i netransparentan film beličaste boje. Homogenost vodenih disperzija i izrađenih filmova procenjena su kao dobra (nije uočeno prisustvo mehurića i nerastvornih čestica) i loša (uočeno prisustvo mehurića i nerastvornih čestica). Vađenje filma iz Petri šolje, kao i sečenje filma makazama procenjena su kao laka (nije uočeno lepljenje za Petri šolju i vidljiva oštećenja prilikom vađenja) i teška (uočena vidljiva oštećenja usled lepljenja za Petri šolju). Fleksibilnost i krtošć izrađenih filmova procenjena su tehnikom izdržljivosti na preklapanje (engl. *folding endurance*) na gumenom podlozi u obliku trake kao dobra (broj preklapanja veći od 100 bez vidljivih promena filma na gumenom podlozi) i loša (broj preklapanja manji od 100 sa vidljivim promenama filma na gumenom podlozi).

### **3.2.5 Procena kompatibilnosti lekovite supstance i ekscipijenasа kod mukoadhezivnih bukalnih tableta**

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) je korišćena kako bi se procenila kompatibilnost, odnosno prisustvo hemijskih interakcija između propranolol-hidrohlorida i ekscipijenasа. FT-IR spektroskopska analiza sprovedena je na *Nicolet iS10* spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD). FT-IR spektri pojedinačnih komponenti, kao i uzorkа mukoadhezivnih bukalnih tableta snimani su u intervalu talasnih dužina između 4000 i 400  $\text{cm}^{-1}$ , sa rezolucijom od 2  $\text{cm}^{-1}$  [101].

### **3.2.6 Ispitivanje variranja mase mukoadhezivnih bukalnih tableta**

Ispitivanje je sprovedeno merenjem pojedinačnih masa 20 slučajno odabranih MBT na analitičkoj vagi BP201 D (Sartorius AG, Nemačka). Nakon merenja izračunate su srednje vrednosti i standardne devijacije za svaku tabletnu formulaciju. Ispitivanje je vršeno prema propisu Ph. Eur. 11.0 za neobložene tablete prosečne mase između 80 i 250 mg, gde se kao zahtev navodi da najviše dve tablete smeju da odstupaju više od 7,5% srednje vrednosti mase, a nijedna tableta ne sme da odstupа više od 15% srednje vrednosti mase [5].

### **3.2.7 Ispitivanje ujednačenosti sadržaja lekovite supstance u mukoadhezivnim bukalnim tabletama**

Ispitivanje je sprovedeno tako što je određen sadržaj propranolol-hidrohlorida kod 5 slučajno odabranih tableta. Nakon određenog sadržaja izračunate su srednje vrednosti i standardne devijacije za svaku tabletnu formulaciju. Ispitivanje je vršeno prema propisu Ph. Eur. 11.0 za tablete, gde se kao

zahtev navodi da svaki pojedinačni sadržaj mora biti između 85% i 115% od izračunatog prosečnog sadržaja [5].

Sadržaj propranolol-hidrohlorida u izrađenim mukoadhezivnim bukalnim tabletama je određen tako što se tableta smrvu u tarioniku pomoću pistila, a potom prenese u normalni sud od 50 mL. Potom se doda 1 mL 0,1M hlorovodonične kiseline, normalni sud dopuni metanolom do 2/3 zapremine i postavi u ultrazvučno kupatilo (Bandelin Sonorex RK102H, Bandelin, Nemačka) kako bi došlo do kompletnog rastvaranja propranolol-hidrohlorida tokom 15 minuta. Nakon toga, normalni sud se dopuni do 50 mL metanolom. Uzorci su filtrirani kroz filter veličine pora 0,45 µm, razblaženi i apsorbancija propranolol-hidrohlorida određena UV spektrofotometrijski spektrofotometru Evolution 300 (*Thermo Fisher Scientific*, Velika Britanija). Sadržaj oslobođenog propranolol-hidrohlorida (mg/mL) je određen na osnovu [jednačine 3.2](#):

$$A = C \times 19,289 + 0,0293 \quad 3.2$$

gde je  $A$  izmerena apsorbancija (meri se na radnoj talasnoj dužini 290 nm), a  $C$  koncentracija rastvorenog propranolol-hidrohlorida (mg/mL).

### 3.2.8 *Ispitivanje friabilnosti mukoadhezivnih bukalnih tableta*

Ispitivanje friabilnosti (F) je sprovedeno na aparaturi za ispitivanje friabilnosti AR 400 (Erweka GmbH, Nemačka) tako što je u bubanj aparata stavljeno 20 izrađenih MBT. Rotor se okretao brzinom od 25 obrtaja/minuti tokom 4 minuta. Nakon toga, tablete su izvađene iz bubnja, otprašene i izmerena im je ukupna masa. Potom je izračunata vrednost F, izražena u procentima, prema [jednačini 3.3](#):

$$F (\%) = ((M_1 - M_2) / M_1) \times 100 \quad 3.3$$

gde je  $M_1$  ukupna masa tableta pre, a  $M_2$  ukupna masa tableta posle rotiranja u bubnju.

Tendencija dvoslojnih tableta ka raslojavanju (delaminaciji) je takođe praćena prilikom ovog ispitivanja, budući da je kod višeslojnih tableta veoma važno očuvati slojevitu strukturu [186].

### 3.2.9 *Ispitivanje zatezne čvrstine i debljine tableta*

Zatezna čvrstina, dijametar i debljina tableta određeni/mereni su 24 h nakon izrade. Otpornost tableta na lomljenje (čvrstina tableta) i dijametar tableta mereni su na aparaturi za merenje čvrstine tableta *Tablet Hardness Taster TBH 125* (Erweka GmbH, Nemačka), dok je debljina tableta merena digitalnim nonijusom. Na osnovu izmerenih vrednosti i primenom [jednačine 3.4](#) [99], određena je zatezna čvrstina pripremljenih tableta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom za deset uzoraka tableta.

$$\sigma = \frac{2 \times F}{\pi \times R \times t} \quad 3.4$$

gde je  $F$  sila koja dovodi do lomljenja tablete,  $R$  prečnik, a  $t$  debljina tablete.

### 3.2.10 *Ispitivanje stepena apsorpcije medijuma mukoadhezivnih bukalnih tableta*

Ispitivanje stepena apsorpcije medijuma sprovedeno je u *Orbital* šejker-inkubatoru ES-20 (Biosan, Letonija) na  $37 \pm 1$  °C (Slika 3.1). Kao medijum korišćena je veštačka saliva. Na početku ispitivanja svaka tableta je pojedinačno izmerena ( $M_1$ ). Potom su tablete odvojeno postavljene u prethodno izmerenu koricu od nerđajućeg čelika, koja je zatim stavljena u Petrijevu šolju sa 25 mL veštačke salive. Posle 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minuta ispitivanja višak površinskog vode je uklonjen pomoću filtera papira. Ispitivanje je izvedeno u triplikatu. Nabubrele bukalne tablete su ponovo izmerene ( $M_2$ ), a stepen apsorpcije medijuma je izračunat na osnovu jednačine 3.5 [82]:

$$\text{Stepen apsorpcije medijuma (\%)} = ((M_2 - M_1) / M_1) \times 100 \quad 3.5$$

gde je  $M_1$  početna masa tablete, a  $M_2$  masa tablete nakon bubrenja.

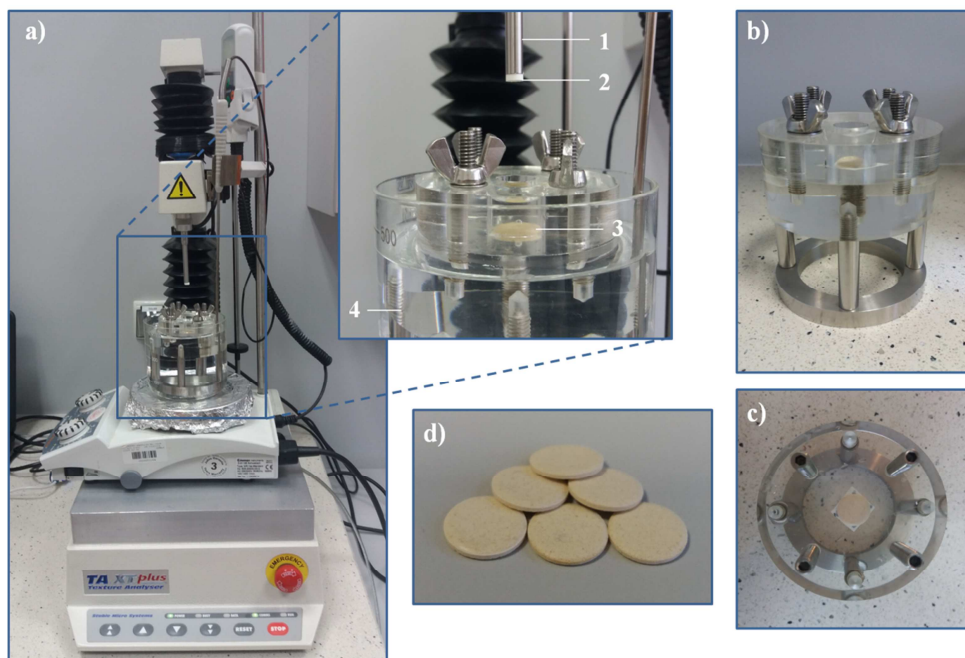


Slika 3.1. Aparatura za ispitivanje stepena apsorpcije medijuma

### 3.2.11 Ispitivanje mukoadhezivnih svojstva tableta

Određivanje sile potrebne za razdvajanje farmaceutskog oblika leka od sluzokože ili supstrata sluzokože smatra se korisnim za predviđanje mukoadhezivnih svojstava farmaceutskog oblika leka. TA.XTplus analizator teksture (Stable Micro Systems, Velika Britanija), sa ćelijom opterećenja od 5 kg i cilindričnom aluminijumskom sondom od 10 mm (Slika 3.2a), korišćen je za merenje maksimalne sile odvajanja [122]. Svaka tableta, svojim barijernim slojem, zalepljena je na fondu pomoću dvostrane lepljive trake. Disk mucina je korišćen kao supstrat sluzokože prilikom procene mukoadhezivnih svojstava, a pripremljen je kompresijom komercijalno dostupnog sirovog svinjskog mucina na ekscenter tablet mašini koristeći klipove ravne površine, prečnika 13 mm (Slika 3.2d) [187]. Masa izrađenog diska mucina je iznosila oko 250 mg, a čvrstina dobijenog diska bila je u opsegu 12-16 N [188]. Pripremljeni disk mucina je pričvršćen na površinu platforme pomoću epoksidnog lepka. U šupljinu platforme je zatim izliveno 3 mL veštačke salive zagrejane na 37 °C tokom 30 s kako bi se standardizovala hidratacija pre testiranja (Slika 3.2b,c). Na tabletu je potom primenjena sila od 0,5 N u trajanju od 60 s kako bi se obezbedio blizak kontakt između tablete i diska mucina. Opšta podešavanja ovog testa su uključivala rad u režimu istezanja, brzina kretanja sonde pre kontakta 1 mm/s, brzina kretanja sonde u toku kontakta 0,5 mm/s i brzina kretanja sonde nakon kontakta 0,5 mm/s. Navedeni uslovi ispitivanja izabrani su nakon pregleda i analize literaturnih podataka [125,130,189,190]. Ekstrakcija podataka vršena je pomoću inkorporiranog softvera *Exponent* verzija 6.1.6.0. Iz dobijene

krive sila-vreme, određena je maksimalna sila potrebna za odvajanje mukoadhezivne tablete od diska mucina (engl. *maximum detachment force*;  $F_{max}$ ), kao indikator mukoadhezivnih svojstava. Jačina vezivanja ( $N/cm^2$ ) je izračunata na osnovu [jednačine 1.7](#) [126]. Ispitivanje je izvedeno u 5 ponavljanja za svaku formulaciju MBT. Za statističku obradu podataka korišćen je ANOVA test praćen Bonferroni post hoc testom. Vrednost  $p < 0,05$  ukazuje na statističku značajnost dobijenih rezultata.



**Slika 3.2.** Fotografija aparature korišćene za ispitivanje mukoadhezivnih bukalnih tableta - TA.XTplus analizator teksture (a) 1-cilindrična aluminijska sonda, 2-mukoadhezivna bukalna tableta, 3-disk mucina; nosač diska, 4-časa sa vodom zagrejanom na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; nosač diska mucina bočni prikaz (b) i prikaz odozgo (c) i izrađeni diskovi mucina (d)

### 3.2.12 Ispitivanje brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta

*In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBT izvršeno je u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem (Bio-Dis Extended Release Tester, VanKel Technology Group, SAD) uz korišćenje 200 mL veštačke salive pH vrednosti 6,8 zagrejane do  $37 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pri brzini uranjanja cilindra od 5 dpm, jer je utvrđeno da se u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem pri 5 dpm postižu hidrodinamički uslovi ekvivalentni aparaturi sa rotirajućom loptaicom pri 50 rpm [191]. U definisanim vremenskim intervalima (15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 i 360 minuta) uzorkovano je 4 mL medijuma, koji je zatim filtriran (membranski filter dijametra pora  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ , MF-Millipore<sup>®</sup>, Millipore Corporation, Bedford, SAD) i ukoliko je bilo potrebno razblažen. Nakon svakog uzorkovanja je vršena nadoknada zagrejanim medijumom kako bi se održala konstantna zapremina medijuma i „*sink uslovi*”, što predstavlja prvi faktor korekcije. Koncentracija rastvorenog propranolol-hidrohlorida merena je UV spektrofotometrijskom metodom na spektrofotometru *Evolution 300* (Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija). Zbog male zapremine medijuma i razvaranje i većeg broja vremenskih tačaka za uzorkovanje, primenjen je i drugi faktor korekcije [192]. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost i standardna devijacija za tri merenja za svaku formulaciju MBT. Količina oslobođenog propranolol-hidrohlorida (mg/mL) je određena na osnovu [jednačine 3.6](#):

$$A = C \times 20,078 + 0,0068 \quad 3.6$$

gde je  $A$  izmerena apsorbanacija (meri se na radnoj talasnoj dužini od 289 nm), a  $C$  koncentracija rastvorenog propranolol-hidrohlorida (mg/mL).

### 3.2.13 Poređenje profila brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih hbukalnih tableta model - nezavisnom i model - zavisnom analizom

Dobijeni profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBT su međusobno poređeni primenom model-nezavisnog matematičkog pristupa koristeći faktor sličnosti ( $f_2$ ), koji se izračinava prema jednačini 3.7 [193]:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad 3.7$$

gde je  $n$  broj uzorkovanja,  $R_t$  procenat lekovite supstance oslobođene nakon vremena  $t$  u referentnom preparatu,  $T_t$  procenat lekovite supstance oslobođene nakon vremena  $t$  u ispitivanom preparatu.

Vrednost  $f_2$  između 50 i 100 ukazuje da su dva profila brzine rastvaranja međusobno slična [193]. Izračunavanje faktora sličnosti  $f_2$  predstavlja jednostavan i često korišćen pristup za poređenje *in vitro* profila brzine rastvaranja. Upotreba ovog pristupa ne zahteva duboko znanje iz oblasti statistike niti poseban softver. Izračunavanje faktora izvršeno je pomoću DDSolver dodatnog programa za modelovanje i poređenje profila brzine rastvaranja lekovite supstance u okviru Microsoft Excel-a [194].

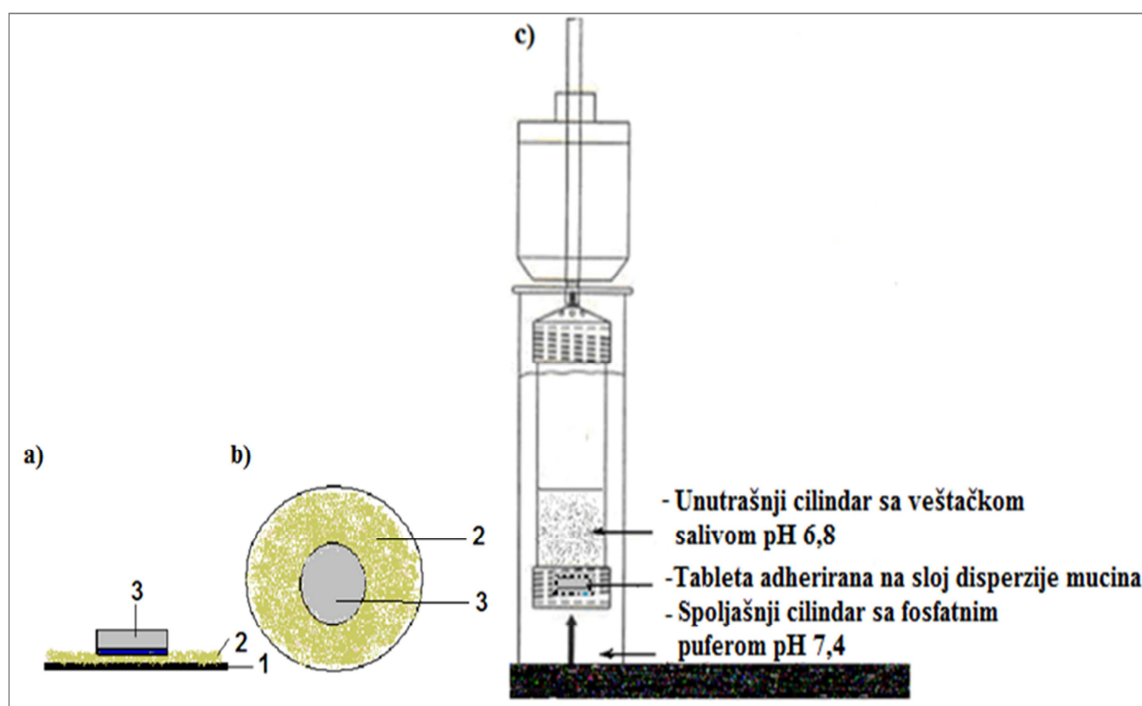
Profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida analizirani su i model-zavisnim pristupom. Dobijeni profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida su modelovani pomoću različitih matematičkih modela (Tabela 3.3) u cilju boljeg razumevanja mehanizama oslobađanja ove lekovite supstance [195]. Pri odabiru pogodnog matematičkog modela koji najbolje objašnjava mehanizam oslobađanja lekovite supstance, razmatrani su vrednosti koeficijenta korelacije ( $R^2$ ) i Akaikeovog informacionog kriterijuma (AIC). Izabraćemo onaj model za koji statistička analiza pokaže najveću  $R^2$  vrednost i najmanju AIC vrednost [196,197].

**Tabela 3.3.** Primenjeni matematički modeli za opisivanje kinetike oslobađanja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta [195]

Model	Jednačina	Parametri
<i>Higuchi</i>	$Q = k_H \times \sqrt{t}$	Q-količina (%) oslobođene lekovite supstance nakon vremena $t$ ; $k_H$ -konstanta brzine oslobađanja <i>Higuchi</i> kinetikom
<i>Korsmeyer-Peppas</i>	$Q = k_{KP} \times t^n$	Q-količina (%) oslobođene lekovite supstance nakon vremena $t$ ; $k_{KP}$ -konstanta brzine oslobađanja <i>Korsmeyer-Peppas</i> kinetikom koja uzima u obzir strukturalna i geometrijska svojstva farmaceutskog oblika; $n$ -difuzioni eksponent oslobađanja koji ukazuje na mehanizam oslobađanja lekovite supstance u vremenu $t$
<i>Peppas-Sahlin</i>	$Q = k_F \times t^m + k_R \times t^{2m}$	Q-količina (%) oslobođene lekovite supstance nakon vremena $t$ ; $k_F$ i $k_R$ - konstante brzine oslobađanja za proces <i>Fick</i> -ove difuzije i tip II transporta, respektivno; $m$ -difuzioni eksponent za farmaceutski oblik bilo koje geometrije koji pokazuje kontrolisano oslobađanje lekovite supstance

### 3.2.14 Ispitivanje brzine permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivni bukalnih tableta

*In vitro* ispitivanje brzine permeacije propranolol-hidrohlorida iz MBT sprovedeno je u modifikovanoj aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem (Bio-Dis Extended Release Tester, VanKel Technology Group, SAD) (Slika 3.3). Hidrofobna membrana veličine pora  $0,1 \mu\text{m}$  (Whatman<sup>®</sup> Nuclepore membrane track-etched membranes, Cytiva, SAD), koja se ranije pokazala kao dostupna, stabilna i jednostavna za upotrebu [198], korišćena je za simulaciju barijerne funkcije bukalne sluzokože, kao i pasivnog transporta visoko lipofilne lekovite supstance poput propranolola kroz biološke membrane [6]. Ispitivanje je sprovedeno tako što je membrana postavljena na donjem kraju unutrašnjeg cilindra tako što je pričvršćena donjim poklopcem. Membrana je prvo impregnirana 10% disperzijom mucina, a potom je uzorak tablete postavljen na disperziju mucina. Kako bi se obezbedio odgovarajući uniforman kontakt između tablete i disperzije mucina, na tabletu je postavljen teg mase 10 g težine tokom 60 sekundi. Unutrašnji cilindar (donorski odeljak) je sadržao 20 mL veštačke salive pH 6,8; dok je spoljašnji cilindar (akceptorski odeljak) sadržao 100 mL fosfatnog pufera pH 7,4. Najveća promena u rastvorljivost se javlja pri pH u opsegu  $\pm 2$  pH jedinice pKa lekovite supstance. Stoga se u slučaju propranolol-hidrohlorida očekuje najveća rastvorljivost u oblasti između dve pH jedinice ispod svoje pKa i pKa vrednosti propranolol-hidrohlorida. Temperatura medijuma u oba cilindra je održavana na  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po 3 mL medijuma je uzorkovano iz spoljašnjeg cilindra u određenim vremenskim intervalima: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 i 360 minuta, uz nadoknadu medijuma nakon svakog uzorkovanja. Koncentracija permeiranog propranolol-hidrohlorida određivana je UV spektrofotometrijskom metodom na spektrofotometru *Evolution 300* (Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija) na 289 nm prema jednačini 3.6. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost i standardna devijacija za tri ponovljena ispitivanja za svaku formulaciju tableta.



**Slika 3.3.** Šematski prikaz modifikovane aparature sa cilindrom sa povratnim kretanjem: (a) pogled sa strane; (b) pogled odozgo na dvoslojnu tabletu adheriranu na disperziju mucina (1 – hidrofobna membrana, 2 – disperzija mucina, 3 – dvoslojna mukadhezivna bukalna tableta); (c) prikaz postavki uređaja za ispitivanje brzine permeacije lekovite supstance



### **3.2.15 *Definisanje ciljanog profila kvaliteta proizvoda i identifikovanje kritičnih atributa kvaliteta mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova***

U [Tabeli 3.4](#) predstavljen je ciljani profil kvaliteta MBT sa produženim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida. U cilju postizanja ciljanog profila kvaliteta izvršena je identifikacija kritičnih atributa kvaliteta mukoadhezivnih bukalnih tableta sa produženim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida. [Tabela 3.5](#) daje prikaz kritičnih atributa materijala i kritičnih procesnih parametara u izradi/proizvodnji MBT.

U [Tabeli 3.6](#) predstavljen je ciljani profil kvaliteta mukoadhezivnih bukalnih filmova sa produženim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida, dok [Tabela 3.7](#) daje prikaz kritičnih atributima materijala i kritičnih procesnih parametara izradi/proizvodnji MBF.



**Tabela 3.4.** Ciljani profil kvaliteta (engl. *Quality Target Product Profile*, QTPP) i kritični atributi kvaliteta (engl. *Critical Quality Attributes*, CQA) mukoadhezivnih bukalnih tableta sa produženim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida

<b>Ciljani profil kvaliteta (QTPP)</b>	
<b>Farmaceutski oblik</b>	Mukoadhezivne bukalne tablete sa produženim oslobađanjem
<b>Put primene</b>	Intraoralni - bukalni
<b>Učestalost doziranja</b>	Jednom dnevnom
<b>Lokalno/sistemske dejstvo</b>	Sistemske dejstvo
<b>Doza(e)</b>	30 mg
	10 mg
<b>Brzina rastvaranja lekovite supstance</b>	Produženo rastvaranje lekovite supstance
<b>Sadržaj lekovite supstance</b>	85-115% od deklarisanog
<b>Mikrobiološki kvalitet</b>	U skladu sa zahtevima Ph.Eur. 11.0 - 5.1.4
<b>Stabilnost</b>	4 godine na temperaturi do 25 °C
<b>Pakovanje</b>	Unutrašnje pakovanje je blister od PVC/PVDC//Al folije, spoljašnje pakovanje je složiva kartonska kutija
<b>Kritični atributi kvaliteta (CQA) / opis uticaja</b>	
<b>Fizičke karakteristike</b>	<b>Izgled</b>
	<b>Oblik i boja</b>
	<b>Veličina</b>
	<b>Uniformnost mase</b>
	<b>Friabilnost</b>
	<b>Čvrstina</b>
<b>Sadržaj lekovite supstance</b>	

	doza lekovite supstance može dovesti do neželjenih efekata, a niska može dovesti do izostanka terapijskog dejstva.
<b>Brzina rastvaranja lekovite supstance</b>	Neispunjavanje specifikacije kada je rastvaranje lekovite supstance u pitanju može uticati na biološku raspoloživost lekovite supstance, jer neadekvatna brzina rastvaranja lekovite supstance može imati uticaj i na bezbednost i na efikasnost.
<b>Mukoadhezivna svojstava - jačina adhezije</b>	Neadekvatna mukoadhezija tablete može dovesti do kratkog vremena zadržavanja farmaceutskog preparata na bukalnoj sluzokoži što može uticati na efikasnost farmaceutskog preparata.
<b>Kompatibilnost lekovite supstance i ekscipijensa</b>	Prisustvo inkompatibilije (hemijske interakcije) između lekovite supstance i ekscipijensa može dovesti do degradacije lekovite supstance, čime se smanjuje količina raspoloživa za terapijski efekat; a proizvodi reakcije takođe mogu ugroziti bezbednost pacijenta.
<b>Mikrobiološki kvalitet</b>	Može imati uticaj na bezbednost pacijenta. Kod čvrstih lekovitih oblika nizak je rizik za mikrobiološku kontaminaciju uz primenu GMP.

**Tabela 3.5.** Kritični atributi materijala (engl. *Critical Material Attributes*, CMA) i kritični procesni parametri (engl. *Critical Process Parameters*, CPP) u izradi/proizvodnji mukoadhezivnih bukalnih tableta

<b>Kritični atributi materijala (CMA) lekovita supstanca i pomoćne supstance</b>		<b>Kritični procesni parametri (CPP)</b>	
Identifikacija		Mešanje	Vrsta uređaja za mešanje
Sadržaj			Redosled dodavanja supstanci
Čistoća			Kapacitet punjenja uređaja za mešanje
Količina i vrsta pomoćnih supstanci (sredstva za dopunjavanje, sredstva koja obezbeđuju kontrolisano oslobađanje i mukoadheziju, korigenski ukusa)			Brzina mešanja (broj obrtaja u minuti)
	Distribucija veličine čestica i oblik	Komprimovanje	Vreme mešanja
Fizičke osobine	Površina čestica		Sila kompresije
	Tapkana/nasipna gustina		Brzina kompresije
	Sadržaj vlage		Podšavanje težine i debljine tablete
	Kristalno ili amorfno stanje		Dubina punjenja
	Mehaničke osobine	Vrsta i oblik klipova	

**Tabela 3.6.** Ciljani profil kvaliteta (engl. *Quality Target Product Profile*, QTPP) i kritični atributi kvaliteta (engl. *Critical Quality Attributes*, CQA) mukoadhezivnih bukalnih filmova sa produženim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida

<b>Ciljani profil kvaliteta (QTPP)</b>		
<b>Farmaceutski oblik</b>	Mukoadhezivni bukalni filmovi sa produženim oslobađanjem	
<b>Put primene</b>	Intraoralni - bukalni	
<b>Učestalost doziranja</b>	Jednom dnevnom	
<b>Lokalno/sistemske dejstvo</b>	Sistemske dejstvo	
<b>Doza(e)</b>	10 mg	
<b>Brzina rastvaranja lekovite supstance</b>	Produženo rastvaranje lekovite supstance	
<b>Sadržaj lekovite supstance</b>	85-115% od deklarisanog	
<b>Mikrobiološki kvalitet</b>	U skladu sa zahtevima Ph.Eur. 11.0 - 5.1.4	
<b>Stabilnost</b>	3 godine na temperaturi do 25 °C	
<b>Pakovanje</b>	Unutrašnje pakovanje je Al folija, spoljašnje pakovanje je složiva kartonska kutija	
<b>Kritični atributi kvaliteta (CQA) / opis uticaja</b>		
<b>Fizičke karakteristike</b>	<b>Izgled</b> <b>Oblik i boja</b> <b>Veličina</b>	Neadekvatan izgled, oblik i veličina filma mogu biti neprihvatljivi za pacijenta što može dovesti do loše komplijanse.
	<b>Uniformnost mase</b>	Varijabilna masa filma može dovesti do varijacija u sadržaju lekovite supstance što se može odraziti na efekat leka.
	<b>Zatezna čvrstina</b> <b>Izduženje pri kidanju</b> <b>Young-ov modul</b>	Neadekvatna mehanička svojstva mogu uticati na raspadljivost filmova što indirektno utiče na brzinu oslobađanja lekovite supstance. Takođe, može doći do pucanja i lomljenja filmova što onemogućava rukovanje i primenu preparata.
	<b>Sadržaj lekovite supstance</b>	Uticaj na efikasnost i bezbednost filma jer se odgovarajućom dozom lekovite supstance postiže odgovarajući terapijski efekat sa prihvatljivim neželjenim efektima. Visoka doza lekovite supstance može dovesti do neželjenih efekata, a niska može dovesti do izostanka terapijskog dejstva.

<b>Brzina rastvaranja lekovite supstance</b>	Neispunjavanje specifikacije kada je rastvaranje lekovite supstance u pitanju može uticati na njenu biološku raspoloživost. Neadekvatna brzina rastvaranja lekovite supstance može imati uticaj i na bezbednost i na efikasnost.
<b>Mukoadhezivna svojstava - jačina adhezije</b>	Neadekvatna mukoadhezija filma može dovesti do kratkog vremena zadržavanja farmaceutskog preparata na bukalnoj sluzokoži što može uticati na efikasnost farmaceutskog preparata.
<b>Sadržaj vlage</b>	Utiče na mehanička i mukoadhezivna svojstva filmova, kao i na njihovu stabilnost.
<b>Kompatibilnost lekovite supstance i ekscipijensa</b>	Prisustvo inkompatibilije (hemijske interakcije) između lekovite supstance i ekscipijensa može dovesti do degradacije lekovite supstance, čime se smanjuje količina raspoloživa za terapijski efekat; a proizvodi reakcije takođe mogu ugroziti bezbednost pacijenta.
<b>Mikrobiološki kvalitet</b>	Može imati uticaj na bezbednost pacijenta. Zbog prisustva određene količine vlage imaju veći rizik za mikrobiološku kontaminaciju od mukoadhezivnih bukalnih tableta.

**Tabela 3.7.** Kritični atributi materijala (engl. *Critical Material Attributes*, CMA) i kritični procesni parametri (engl. *Critical Process Parameters*, CPP) u izradi/proizvodnji mukoadhezivnih bukalnih filmova

<b>Kritični atributi materijala (CMA) lekovita supstanca i pomoćne supstance</b>		<b>Kritični procesni parametri (CPP)</b>	
Identifikacija	Mešanje	Vrsta i veličina posude za mešanje	
Sadržaj		Redosled dodavanja supstanci	
Čistoća		Temperatura mešanja	
Količina i vrsta pomoćnih supstanci (film formirajući polimeri, plastifikatori, korigensi ukusa, permeacioni inženjering)		Brzina mešanja (broj obrtaja u minuti) Vreme mešanja	
Fizičko-hemijske osobine	Rastvorljivost	Izlivanje	Količina disperzije za izlivanje
	Molekulska masa		Veličina kalupa za izlivanje
	pH		Materijal kalupa za izlivanje
	Sadržaj vlage	Sušenje	Način sušenja: ambijentalno sušenje ili u sušnici
	Kristalno ili amorfnost stanje		Vreme sušenja
Termostabilnost/Termolabilnost		Temperatura sušenja	

### 3.3 Metode druge faze eksperimentalnog rada

#### 3.3.1 Izrada mukoadhezivnih bukalnih tableta

Prilikom izrade MBT potrebne količine propranolol-hidrohlorida, polietilenoksida i manitola su izmešani u uređaju za mešanje praškova (Farmalabor Tech, Italija) tokom 10 min, a zatim su dodati magnezijum-stearat i koloidni silicijum-dioksid, nakon čega se nastavilo sa mešanjem još 2 minuta. MBT su pripremljene direktnom kompresijom izrađene smeše praškova koristeći simulator kompresije Gamlen D-serije (Gamlen Tableting Ltd., Notingham, Velika Britanija). Kompresija tableta je izvedena pri pritisku kompresije od 100 kg, koristeći ravan okrugli klip prečnika 3 mm kako bi se formirale tablete mase 25 mg. Sastav izrađivanih MBT prikazan je u [Tabeli 3.8](#). Udeo propranolol-hidrohlوريا, koloidnog silicijum-dioksida i magnezijum-stearata je konstantan u sve tri formulacije, dok je udeo PEO polimera variran na tri nivoa.

**Tabela 3.8.** Sastav ispitivanih mukoadhezivnih bukalnih tableta

Sastav formulacije (mg/tableta)	F1	F2	F3
Propranolol-hidrohlوريد	10,00	10,00	10,00
Polietilenoksidni polimer	3,75	6,25	8,75
Manitol	10,50	8,00	5,50
Koloidni silicijum-dioksid	0,25	0,25	0,25
Magnezijum-stearat	0,50	0,50	0,50
Ukupno	25,00	25,00	25,00

#### 3.3.2 Izrada mukoadhezivnih bukalnih filmova

MBF su pripremljeni metodom izlivanja iz rastvora i uparavanjem rastvarača (engl. *solvent casting method*). Prvo je u hemijskoj čaši dispergovan PVA u prečišćenoj vodi zagrejanom na 90 °C uz konstantno mešanje na 400 rpm (IKA® RCT standard, Staufen, Nemačka), a potom je dobijena disperzija ohlađena na sobnu temperaturu. Potom je usledilo dispergovanje HPMC i PEO polimera na sobnoj temperaturi i na kraju je dispergovan propilenglikol kao plastifikator. Disperzija je ostavljena da se konstantno meša tokom 24 h. Nakon dodatka ovih hidrohilnih polimera uzori su mešani pri manjoj brzini (300 rpm) kako bi se sprečilo inkorporiranje vazduha. U drugoj hemijskoj čaši pripremljena je disperzija propranolol-hidrohlوريا u smeši prečišćene vode i propilenglikola uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici (300 rpm) na sobnoj temperaturi. Pripremljena disperzija propranolol-hidrohlوريا je potom dodata u polimernu disperziju i ostavljena da se homogeno izmeša tokom 24 h. Disperzije kod kojih je nakon jednodnevnog mešanja uočeno prisustvo mehurića, homogenizovane su na ultrazvučnom kupatilu Bandelin Sonoex RK 102H (Sonorex-Bandelin, Nemačka) tokom 15 minuta. Pripremljene disperzije su izlivanе u Petri šolje i ostavljene da se osuše u ambijentalnim uslovima (oko 48 h). Filmovi su dobijeni razlivanjem iste mase polimerne (filmogene) smeše u Petri šolje. Nakon sušenja, filmovi su sečeni na odgovarajuću veličinu (1×1 cm), pakovani u aluminijumsku foliju i čuvani u eksikatoru do ispitivanja. Sastav pripremljenih vodenih disperzija za izlivanje prikazan je u [Tabeli 3.9](#) sa napomenom da

formulacije F1, F2 i F3 odgovaraju sastavu formulacija filmova F15, F16 i F21 iz [Tabele 3.2.](#) Pored formulacija sa propranolol-hidrohloridom, pripremljene su i placebo formulacije.

**Tabela 3.9.** Sastav pripremljenih vodenih disperzija za izlivanje

Sastav formulacije (%)	F1	F2	F3
Hidroksipropilmetilceluloza	0,5	0,5	1,5
Polietilenoksid	3,0	3,5	2,0
Polivinilalkohol	1,5	1,5	1,5
Propilenglikol	3,0	3,0	3,0
Propranolol-hidrohlorid	2,0	2,0	2,0
Prečišćena voda	do 100,0		

### 3.3.3 Fizičko-hemijska i farmaceutsko-tehnološka karakterizacija mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova

#### 3.3.3.1 *Procena kompatibilnosti lekovite supstance i ekscipijenasa kod mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova*

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) je korišćena kako bi se procenila kompatibilnost, odnosno prisustvo hemijskih interakcija između propranolol-hidrohlorida i ostalih komponenata formulacije mukoadhezivnih bukalnih farmaceutskih oblika lekova. Ispitivanje je sprovedeno na način koji je opisan u poglavlju 3.2.4.

#### 3.3.3.2 *Morfologija površine mukoadhezivnih bukalnih filmova*

Morfologija površine i poprečnog preseka MBF ispitana je primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) na uređaju *JOEL JSM-6390LV* (Joel Ltd., Japan) pri radnom naponu od 20 kV. Secirani uzorci filmova su pre mikroskopiranja fiksirani na nosač pomoću dvostrano lepljive adhezivne trake, a potom podvrgnuti procesu napanavanja zlatom u uređaju za napanavanje *Bal-Tec SCD-005* (BalTec AG, Švajcarska), pri struji napanavanja od 30 mA na 100 s, kako bi se formirao ultratanak premaz elektro-provodnog materijala. Mikrografije su snimane pri uvećanjima od 1000 i 3000x.

Izvršena su i optička ispitivanja pomoću polarizacionog mikroskopa *Olympus BX53* (Olympus, Japan). Mikrografije su snimane pri uvećanjima od 4x i 10x. Pomoću polarizacionog mikroskopa moguće je ispitati fizičko stanje (kristalno ili amorfno) propranolol-hidrohlorida u disperziji, kao i u izrađenim MBF.

#### 3.3.3.3 *Ispitivanje variranja mase mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova*



Ispitivanje ujednačenosti mase MBT i MBF sprovedeno je prema zahtevu Evropske farmakopeje, poglavlje 2.9.5, za tablete (neobložene i obložene filmom) prosečne mase 80 mg ili manje, gde se kao zahtev navodi da najviše dve tablete, odnosno filma, smeju da odstupaju više od 10% srednje vrednosti mase, a nijedna tableta/film ne sme da odstupa više od 20% srednje vrednosti mase [5]. Ispitivanje variranja mase MBF je sprovedeno na način koji je opisan u poglavlju 3.2.5. [5] pošto ne postoji posebna oficinalna monografija namenjena za ispitivanje variranja mase oralnih filmova.

#### **3.3.3.4 Ispitivanje ujednačenosti sadržaja lekovite supstance u mukoadhezivnim bukalnim tabletama i filmovima**

Ispitivanje ujednačenosti sadržaja propranolol-hidrohlorida je sprovedeno u skladu sa postupkom koji je opisan u poglavlju 3.2.6 Evropske farmakopeje [5] Ispitivanje je vršeno prema propisu za tablete, gde se kao zahtev navodi da svaki pojedinačni sadržaj mora biti između 85% i 115% od izračunatog prosečnog sadržaja [5].

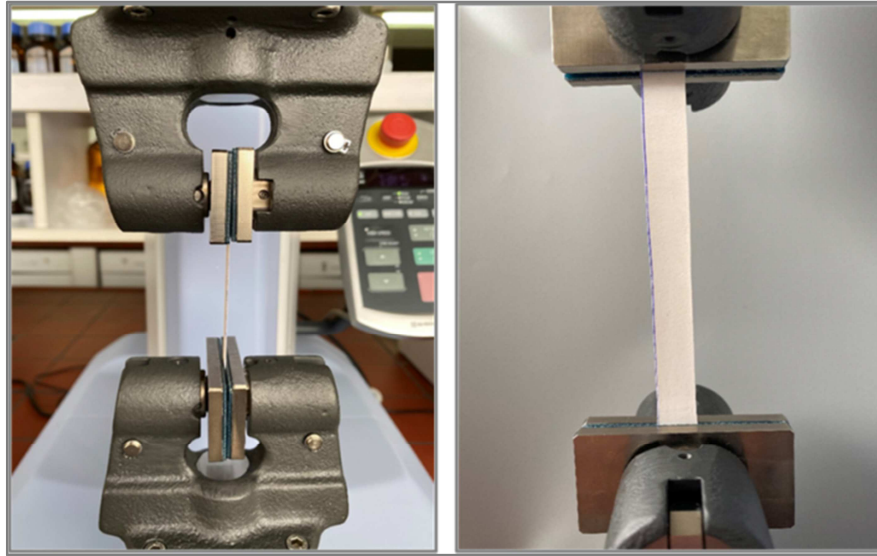
#### **3.3.3.5 Ispitivanje friabilnosti i zatezne čvrstine mukoadhezivnih bukalnih tableta**

Ispitivanje friabilnosti i otpornosti tableta na lomljenje (čvrstina tableta) MBT je izvedeno u skladu sa farmakopejskim postupkom koji je opisan u poglavlju 3.2.7 [5]. Na osnovu izmerene vrednosti sile potrebne da se polomi tableta i debljine tablete izračunata je zatezna čvrstina prema jednačini 3.4 [99].

#### **3.3.3.6 Ispitivanje mehaničkih svojstava mukoadhezivnih bukalnih filmova**

Mehanička svojstva MBF (zatezna čvrstina, izduženje pri kidanju i *Young*-ov modul elastičnosti) određena su na analizatoru tekture *Shimadzu EZ-LX* (Shimadzu Corporation, Japan) sa mernom ćelijom od 5 kg. Tom prilikom je korišćen test istezanja uzorka kako bi se procenila mehanička svojstva mukoadhezivnih bukalnih filmova. Izlaganje filmova istezanju se široko koristi kao brz i precizan metod za određivanje mehaničkih svojstava filmova. Uzorci filma sečeni su u pravougaone trake dužine 70 mm i širine 10 mm. Početni razmak između klema podešen je na 50 mm. Tokom ispitivanja, mukoadhezivni bukalni film je bio fiksiran na oba kraja sa dve kleme, pri čemu je donja klema statična, a gornja klema se kretala brzinom od 0,1 mm/s; odnosno 6 mm/min; sve do momenta pucanja filma ([Slika 3.4](#)).

Mehanička otpornost filmova je procenjena određivanjem tri parametra: zatezna čvrstina, procenat izduženja pri kidanju i *Young*-ov modul [99]. Ovi parametri su izračunati na osnovu krive odnosa napon-deformacija (engl. *stress-strain*) direktno dobijeni korišćenjem softvera *Trapezium X* (Shimadzu Corporation, Japan). Mehanička svojstva filmova su ispitivana za mukoadhezivne bukalne filmove sa propranolol-hidrohloridom i placebo formulacije filmova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost i standardna devijacija za tri ponovljena ispitivanja.



**Slika 3.4.** Uzorci filma isečeni na pravougaone trake postavljeni između klema (levo) i izgled filma tokom testa istežanja (desno)

### 3.3.3.7 Ispitivanje stepena apsorpcije medijuma

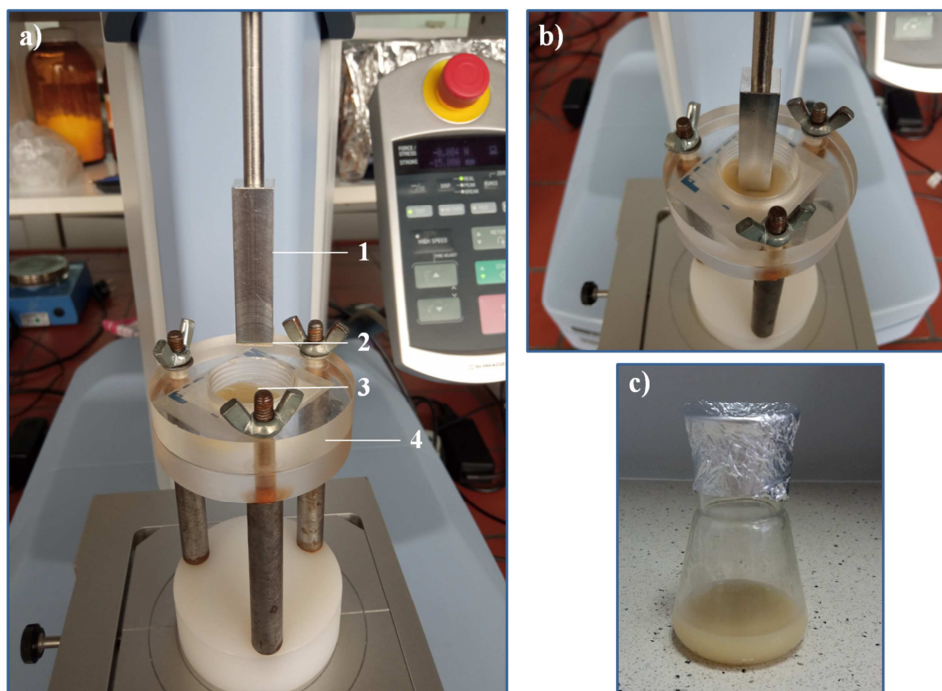
Ispitivanje stepena apsorpcije medijuma sprovedeno je u *Orbital* šejker-inkubatoru ES-20 (Biosan, Letonija) na  $37 \pm 1$  °C prema metodi koja je opisana u poglavlju 3.2.8 [82]. Na početku ispitivanja svaka MBT/MBF je pojedinačno izmerena. Potom su MBT/MBF odvojeno postavljene u prethodno izmerenu korpicu od nerđajućeg čelika, koja je zatim stavljena u Petri šolju sa 25 mL veštačke salive. Posle 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minuta ispitivanja višak površinske vode je uklonjen pomoću filtera papira. Ispitivanje je izvedeno u triplikatu. Nabubrele tablete, odnosno filmovi su ponovo izmerene, a stepen apsorpcije medijuma se računa na osnovu [jednačine 3.5](#) [82].

### 3.3.3.8 Ispitivanje mukoadhezivnog svojstva tableta i filmova

Mukoadhezivna svojstva bukalnih tableta su određena korišćenjem analizatora teksture *Shimadzu EZ-LX* (Shimadzu Corporation, Japan) sa mernom ćelijom od 5 kg, koristeći aluminijumsku cilindričnu sondu od 6 mm. Tom prilikom je korišćen test ciklične kompresije (engl. *single compression cycle test*) uzorka kako bi se procenila mukoadhezivna svojstava izrađenih mukoadhezivnih bukalnih tableta. Korišćena je termostirana ( $37 \pm 1$  °C) mukoadhezivna oprema i disk mucina kao supstrat mukoze ([Slika 3.5a](#)) [187]. Diskovi mucina su pripremljeni prema postupku koji je opisan u poglavlju 3.2.10.

Mukoadhezivna svojstva bukalnih filmova su određena korišćenjem analizatora teksture *Shimadzu EZ-LX* (Shimadzu Corporation, Japan) sa mernom ćelijom od 5 kg, koristeći aluminijumsku sondu oblika kvadra čija je osnova oblika kvadrata dužine stranica 1 cm. Korišćen test ciklične kompresije (engl. *single compression cycle test*) uzorka kako bi se procenila mukoadhezivna svojstva izrađenih mukoadhezivnih bukalnih filmova. Mukoadhezivna svojstva filmova su procenjena određivanjem  $F_{max}$ . Ispitivani uzorci filmova dimenzija  $1 \times 1$  cm su postavljeni na ravnu površinu aluminijumske sonde pomoću dvostrane samolepljive trake ([Slika 3.5](#)). Kao supstrat sluzokože, odnosno “sloj mucina”, korišćena je 10% disperzija mucina pripremljena dispergovanjem komercijalno dostupnog praška svinjskog mucina želu u

prečišćenju vodi (Slika 3.5c) [122]. Nakon 90 s kontakta uzorka filma i disperzije mucina pri primenjenoj sili od 2 N (kako bi se obezbedio bliski kontakt između uzorka filma i disperzije mucina, Slika 3.5b), sonda se podizala brzinom od 1 mm/s do potpunog odvajanja uzorka filma od disperzije mucina i tom prilikom merena je maksimalna sila odvajanja ( $F_{max}$ ) koja je potrebna za odvajanje uzorka filma od disperzije mucina korišćenjem softvera *Trapezium X* (Shimadzu Corporation, Japan). Na osnovu izmerene sile adhezije i površine farmaceutskog oblika leka izračunata je jačina vezivanja koristeći jednačinu 1.7. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost i standardna devijacija za pet ponovljenih ispitivanja.



**Slika 3.5.** Fotografija aparature korišćene za ispitivanje mukoadhezivnih bukalnih filmova- Shimadzu EZ-LX analizator teksture, 1-aluminijumska sonda oblika kvadra, 2-mukoadhezivni bukalni film, 3-disperzija mucina; 4- nosač diska (a) i kontakt mukoadhezivnog bukalnog filma i disperzije mucina (b) i pripremljena 10% disperzija mucina (c)

### 3.3.3.9 Ispitivanje brzine rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova

*In vitro* ispitivanja brzine rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida iz MBT i MBF sprovedena su postupcima koji su detaljno opisani u odeljcima 3.2.11. i 3.2.13.

## 3.4 Metode treće faze eksperimentalnog rada

### 3.4.1 Farmakokinetička i farmakodinamska studija primene MBT i MBF sa propranolol-hidrohloridom na soju pacova sa urođenom hipertenzijom

### 3.4.1.1 *Eksperimentalni protokol*

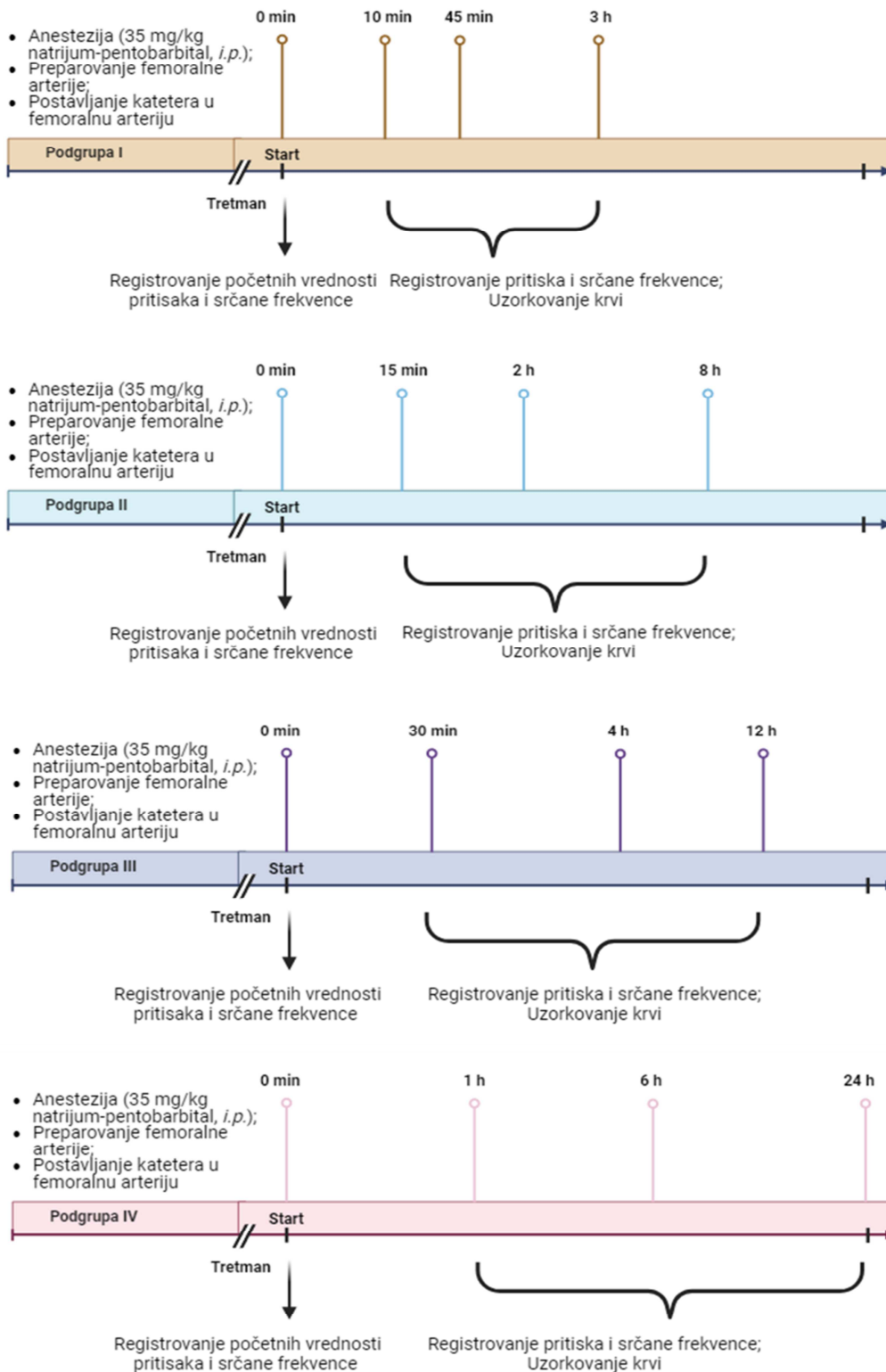
Ispitivanje efekata primene propranolol-hidrohlorida u različitim farmaceutskim oblicima lekova sprovedeno je na pacovima u skladu sa eksperimentalnim protokolom koji je odobren od strane Etičkog komiteta Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, kao i Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (rešenje o odobrenju sprovođenja oglada na životinjama broj 323-07-02324/2020-05 i 323-07-13051/2020-05). Protokol navedenog ispitivanja je u skladu sa sa Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe (Direktiva Evropskog parlamenta i Saveta, 2010.).

Ova studija je izvedena na 96 mužjaka spontano hipertenzivnih pacova (engl. *spontaneously hypertensive rats*, SHR) *Okamoto-Aoki* soja, telesne mase oko 300 g. Životinje su odgajane u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu, u grupama od četiri pacova po kavezu na sobnoj temperaturi od  $22 \pm 2$  °C, dnevno/noćnom ciklusu od 12 h sa pristupom vodi i hrani *ad libitum*.

Za potrebe eksperimenta, pacovi su bili podeljeni u četiri eksperimentalne grupe:

- **Grupa 1 - kontrolna grupa** pacova koja je primala vodu (0,5 mL; intragastričnom sondom; n = 24),
- **Grupa 2** - grupa pacova koja je primila **komercijalno dostupne tablete** propranolol-hidrohlorida (10 mg) sa trenutnim oslobađanjem ( $\frac{1}{4}$  Propranolol<sup>®</sup> tablete od 40 mg dispergovane u 0,5 mL vode; intragastričnom sondom; n = 24),
- **Grupa 3** - grupa pacova koja je primila 0,5 mL vode intragastričnom sondom, a odmah zatim je u donji džep usne bila postavljena **mukoadhezivna bukalna tableta** sa produženim oslobađanjem 10 mg propranolol-hidrohlord (n = 24),
- **Grupa 4** - grupa pacova koja je primila 0,5 mL vode intragastričnom sondom, a odmah zatim je na obe strane buklane sluznice bio postavljen **mukoadhezivni bukalni film** sa 10 mg propranolol-hidrohlorida - jedan film podeljen na dva dela (n =24).

Kako bi se obezbedila normalna vlažna sredina usne duplje i simulirala vlažna površine oralne sluzokože, životinje su dobile 0,15 mL rastvora veštačke salive svakih 30 min na mestu primene mukadhezivne bukalne tablete što odgovara brzini protoka salive od 5  $\mu$ L/min. Da se ne bi prekoračio preporučeni maksimalni volumen krvi prilikom višestrukog uzorkovanje kod pacova [199], svaka eksperimentalna grupa je podeljena u 4 podgrupe (6 životinja po podgrupi) u zavisnosti od vremenske tačke žrtvovanja, tako da je u okviru svake podrupe svaki pacov prošao kroz četiri registracije hemodinamskih parametara (sistolnog, dijastolnog krvnog pritiska i frekvence srčanih kontrakcija) i tri uzorkovanja krvi kao što je predstavljeno na [Slici 3.6](#).



**Slika 3.6.** Šematski prikaz eksperimentalne studije na spontano hipertenzivnim pacovima (kreirano pomoću BioRender.com)

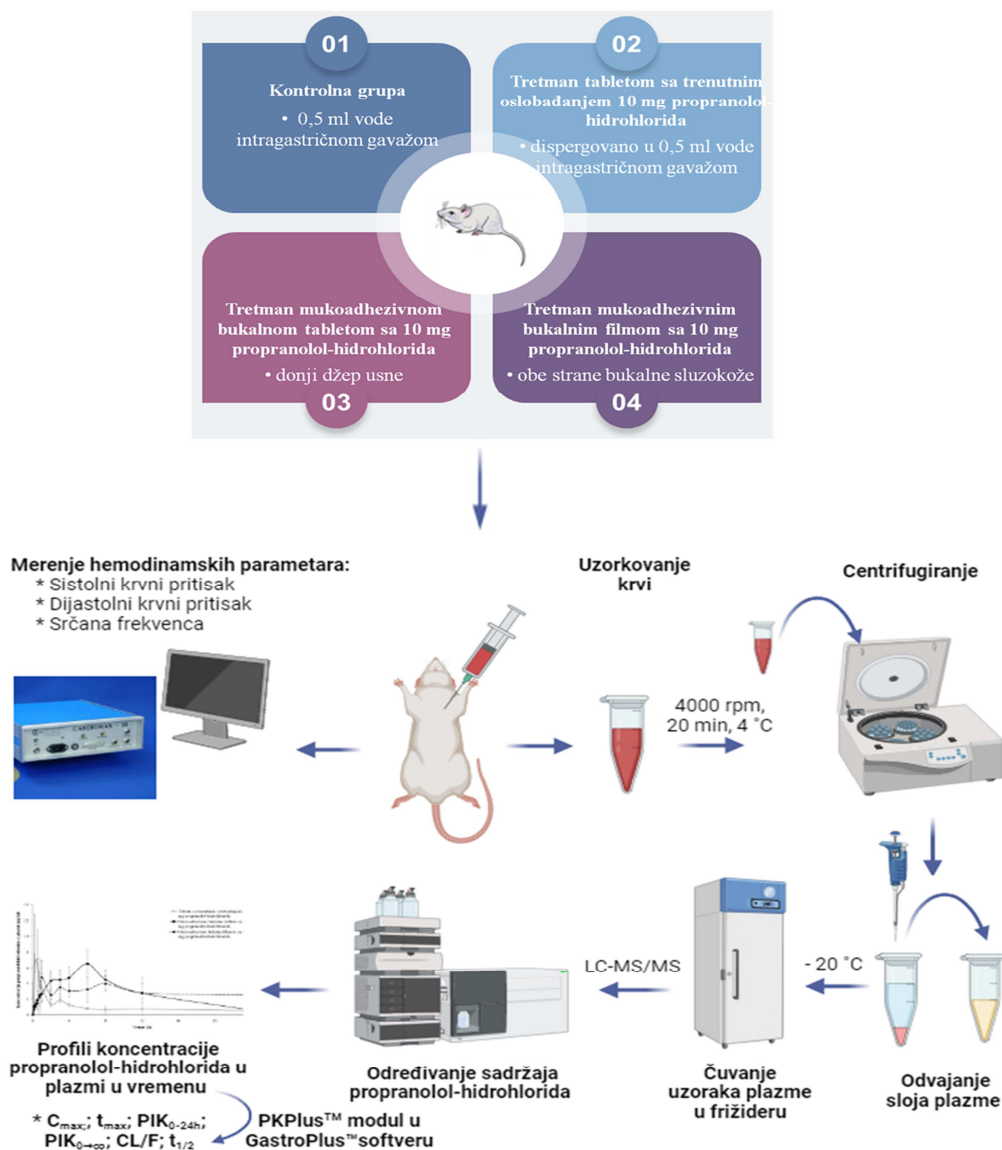
### 3.4.1.2 *Merenja hemodinamskih parametara*

Merenja sistolnog krvnog pritiska (SKP), dijastolnog krvnog pritiska (DKP) i frekvence srčanih kontrakcija (FS) su vršena na anesteziranim pacovima primenom intraperitonealne injekcije natrijum-pentobarbitala (35 mg/kg telesne mase, Nembutal<sup>®</sup>, Serva, Heidelberg, Nemačka), koji su držani pod anestezijom u trajanju od 6 h kako bi se sprečilo da životinje uklone tabletu/film žvakanjem i/ili gutanjem. Životinje su hirurški operisane na levoj femoralnoj arteriji kako bi se postavio kateter (PE-50 kateter, Clay-Adams Parsippany, SAD) ispunjen fiziološkim rastvorom sa heparinom. Povezivanjem katetera preko elektromehaničkog pretvarača sa Cardiomax III-TCR uređajem (9800TCR Thermodilution Cardiac Output for mice, rats and large subjects, Columbus Instruments, Columbus, SAD) vršeno je direktno merenje SKP, DKP i FS u unapred definisanim vremenskim tačkama: 0 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h i 24 h (Slika 3.6).

Odmah nakon merenja hemodinamskih parametara, uzorkovana je krv (700  $\mu$ L) u heparinizovane tube. Nakon uzimanja uzoraka krvi izdvojena je plazma centrifugiranjem na 4000 rpm tokom 20 min na 4 °C (Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific, Masačusets, SAD). Uzorci plazme su čuvani na - 20 °C do dalje analize. Na kraju ispitivanja pacovi su eutanazirani prekomernom dozom anestetika (Slika 3.7).

### 3.4.1.3 *Statistička analiza*

Statistička obrada podataka izvršena je u softveru za statističku analizu IBM SPSS<sup>®</sup> Statistics 23.0 (Systat Software Inc., San Jose, Kalifornija, SAD). Za poređenje hemodinamskih parametara u različitim vremenskim tačkama u okviru pojedinačnih eksperimentalnih grupa, primenjena je jednofaktorska analiza varijanse za ponovljena merenja (engl. *One way repeated measures analysis of variance*) sa Bonferroni post hoc testom, ukoliko su podaci imali normalnu raspodelu, ili *Friedman*-ov test, ukoliko podaci nisu imali normalnu raspodelu sa *Wilcoxon Signed-Ranks* ukoliko *Friedman*-ov test pokaže statističku značajnost. Za procenu normalnosti raspodele podataka korišćen je *Shapiro-Wilk*-ov test, koji je pogodan za testiranje normalnosti kad je broj uzoraka manji od 50. Pri tome, ukoliko je p vrednost testa bila manja od definisanog praga značajnosti od 0,05, smatrano je da podaci nemaju normalnu raspodelu, i suprotno, ukoliko je p vrednost testa bila veća od 0,05 smatrano je da podaci imaju normalnu raspodelu. Dvofaktorska mešovita analiza varijanse za ponovljena merenja (engl. *Two-way mixed repeated measures analysis of variance*) sa Bonferroni post hoc testom je korišćena za istovremeno ispitivanje efekata dva faktora (vreme i tretman) na izmerene hemodinamske parametre kod sve četiri eksperimentalne grupe pacova. U slučaju značajne interakcije faktora korišćen je test jednostavnih efekata u dvofaktorskoj mešovitoj analizi varijanse.



**Slika 3.7.** Šematski prikaz farmakodinamske i farmakokinetičke analize na spontano hipertenzivnim pacovima (kreirano pomoću BioRender.com)

#### 3.4.1.4 *Određivanje sadržaja propranolol-hidrohlorida u uzorcima plazme primenom LC-MS/MS metode*

Koncentracija propranolol-hidrohlorida u plazmi je određena primenom tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Hromatografska analiza je obavljena na tačnom hromatografu (ACELLA, Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, VI, SAD) u sprezi sa trostrukim kvadrupolnim masenim detektorom (TSK Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific Inc., Medison, VI, SAD). Mobilna faza je bila smeša acetonitrila i 10 mM amonijum-formata pripremljena u 0,1% (v/v) mravljoj kiselini (80:20, v/v). Korišćena je hromatografska kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4,6 × 100 mm; 2,7 mm (Agilent, Santa Klara,

Kalifornija, SAD). Temperatura kolone je podešena na 35 °C, a temperatura autosamplera na 10 °C. Brzina protoka mobilne faze bila je 300 µL/min, a injekciona zapremina 10 µL. Bisoprolol-fumarat je korišćen kao interni standard. Analiza je trajala 4,5 min.

Identifikacija i kvantifikacija propranolol-hidrohlorida i internog standarda je izvedena u režimu pozitivnih jona (ESI+). Sledeći prelazi su praćeni u režimu rada sa praćenjem višestruke reakcije (engl. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM): m/z (odnos masa/naelektrisanje) 260,2 > 116,2 za propranolol i m/z 326,2 > 116,1 za bisoprolol. Tokom procesa optimizacije dobijeni su sledeći parametri: napon raspršivanja 4500 V, temperatura isparivača 100 °C, omotač pritisak gasa 40 proizvoljnih jedinica, pritisak gasa za čišćenje jona 0,0 proizvoljnih jedinica, pritisak pomoćnog gasa 35 proizvoljnih jedinica, temperatura kapilare 350 °C, kapilarni ofset 35 proizvoljnih jedinica, ofset cevnog sočiva 88 proizvoljnih jedinica. Kontrola sistema i prikupljanje podataka vršeni su pomoću softvera *TSQ Tune* i *XCalibur*.

#### **3.4.1.5 *In vivo* ispitivanje farmakokinetike propranolol-hidrohlorida iz izrađenih mukoadhezivnih farmaceutskih oblika lekova na soju pacova sa urođenom hipertenzijom**

Farmakokinetički parametri su izračunati iz pojedinačnih grafika zavisnosti koncentracije propranolol-hidrohlorida u funkciji vremena u plazmi primenom PKPlus<sup>TM</sup> modula implementiranog u GastroPlus<sup>TM</sup> programski paket (verzija 9.8.2 SimulationsPlus Inc., Lancaster, Kalifornija, SAD). Primenom neprostone farmakokinetičke analize izračunati su sledeći farmakokinetički parametri propranolol-hidrohlorida: maksimalna koncentracija propranolol-hidrohlorida u plazmi ( $C_{max}$ ), vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije propranolol-hidrohlorida u plazmi ( $t_{max}$ ), površine ispod krive koncentracije propranolol-hidrohlorida u plazmi ( $AUC_{0 \rightarrow t}$  i  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ), ukupni klirens (Cl/F) i poluvreme eliminacije propranolol-hidrohlorida ( $t_{1/2}$ ). Statistička analiza farmakokinetičkih parametara je izvršena primenom programa SPSS<sup>®</sup> *Statistics* 23.0 (Systat Software Inc., San Jose, Kalifornija, SAD). Za poređenje farmakokinetičkih parametara propranolol-hidrohlorida nakon primene intraoralnih i peroralnih formulacija korišćen je Studentov t-test za nezavisne uzorke za parametre čije vrednosti su imale normalnu raspodelu i Mann-Whitney U test, za parametre kod kojih raspodela nije bila normalna. Razlike su se smatrale statistički značajnim ako je  $p$  vrednost manja od 0,05.



## 3.5 Metode četvrte faze eksperimentalnog rada

### 3.5.1 Razvoj, validacija i primena *in silico* fiziološki zasnovanog modela za predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola iz mukoadhezivnih bukalnih farmaceutskih oblika

Za *in silico* modelovanje i simulaciju apsorpcije propranolola i procenu uticaja karakteristika formulacije i vrste farmaceutskog oblika leka na biološku raspoloživost propranolola nakon intraoralne i peroralne primene korišćen je GastroPlus™ programski paket (verzija 9.7.0007, SimulationsPlus Inc., SAD). GastroPlus™ programski paket predstavlja kolekciju matematičkih modela i korelacija koje se koriste sa ciljem predviđanja/simulacije apsorpcije lekovitih supstanci primenjenih različitim putevima, uključujući peroralnu i intraoralnu primenu. U tom pogledu su za *in silico* modelovanje i simulaciju apsorpcije propranolola nakon intraoralne i peroralne primene korišćeni prostorni model apsorpcije i tranzita kroz usnu duplju (OCCAT™) i unapređen prostorni model apsorpcije i tranzita (ACAT™) kroz regione GI trakta.

Primenjeni pristup *in silico* modelovanja se sastojao iz tri faze. Prva faza je obuhvatila razvoj propranolol-specifičnog fiziološki-zasnovanog modela apsorpcije i dispozicije, druga faza validaciju tog modela, a treća faza primenu generisanog validiranog modela za predviđanje/simulaciju apsorpcije propranolola. Ulazni parametri koji su korišćeni za izgradnju modela propranolola za predviđanje bioperformansi farmaceutskog oblika leka kod ljudi prikazani su u [Tabeli 3.10](#). Navedeni parametri obuhvataju biofarmaceutske i farmakokinetičke podatke o propranololu koju su preuzeti iz literature ili *in silico* određeni, kao i podaci koji se odnose na farmaceutski oblik leka. Farmakokinetički podaci propranolola odgovaraju jednodimenzionalnom modelu i preračunati su na osnovu *in vivo* profila koncentracije lekovite supstance nakon primene intravenske infuzije [200,201]. Eksperimentalno određeni profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz izrađenih mukoadhezivnih bukalnih farmaceutskih oblika lekova korišćeni su kao ulazni parametri koji opisuju *in vivo* rastvaranje lekovite supstance. Parametri OCCAT™ i ACAT™ modela koji opisuju humanu fiziologiju u uslovima “na gladno”, podešeni su na podrazumevane (engl. *default*) vrednosti, izuzev brzine protoka salive. Podrazumevana vrednost brzine protoka salive prema GastroPlus™ programu je 0,04 mL/min, što odgovara uobičajenom protoku u uslovima “mirovanja”, tj. prazne usne duplje. Brzina protoka salive je optimizovana na vrednost od 0,6 mL/min, što odgovara stimulisanim protoku salive koji izaziva prisustvo “stranog tela”, tj. farmaceutskog oblika leka u ustima.

Ulazni podaci specifični za formulaciju koji opisuju mukoadhezivne bukalne formulacije uključuju: dozu (10 mg i 30 mg), vrstu formulacije - bukalni film (engl. *buccal patch*), površinu odabrane formulacije, eksperimentalno određene profile brzine rastvaranja lekovite supstance i model oralnog tranzita (“*Hold, Rinse & Swallow*”). Treba napomenuti da je bukalni film trenutno jedina softverska opcija koja omogućava unos eksperimentalno određenog profila brzine rastvaranja lekovite supstance za farmaceutske oblike lekova koji se apsorbuju u/kroz usnu duplju, te je stoga ova opcija odabrana u cilju procene *in vivo* bioperformansi MBT i MBF. Primenom bukalnog filma neoslobođena količina lekovite supstance se zadržava u usnoj duplji, dok se oslobođena/rastvorena količina lekovite supstance apsorbuje iz usne duplje ili se proguta i apsorbuje iz GI trakta. Kao model oralnog tranzita odabran je “*Hold, Rinse & Swallow*” model koji podrazumeva zadržavanje primenjenog farmaceutskog oblika leka u usnoj duplji određeni

vremenski period bez gutanja, nakon čega se saliva proguta sa određenom zapreminom vode. Vreme zadržavanja salive i zapremina vode za ispiranje podešeni su u skladu sa prethodno publikovanim podacima koji se odnose na primenu sublingvalnih tableta: 15 minuta vreme zadržavanja i 240 mL vode) (Tabela 3.11).

PKPlus<sup>TM</sup> modul, integrisan u okviru programskog paketa GastroPlus<sup>TM</sup>, korišćen je za izračunavanje farmakokinetičkih parametara, na osnovu *in vivo* profila koncentracije lekovite supstance u plazmi. WebPlotDigitizer (verzija 4.2, [202]) korišćen je za očitavanje numeričkih podataka sa grafičkih prikaza *in vivo* profila koncentracije propranolol-hidrohlorida u plazmi dostupnih u literaturi.

**Tabela 3.10.** Ulazni parametri za *in silico* predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola kod ljudi u GastroPlus<sup>TM</sup> programu

Parametar	Vrednost	Referenca
Molekulska masa (baza)	259,34 g/mol	[19]
logP	3,22	[203]
pKa (baza)	9,09	[6]
Rastvorljivost	225 mg/mL (pH 1,2; 37 °C) 130 mg/mL (pH 6,8; 37 °C)	[204]
Difuzioni koeficijent	$0,8304 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$	GastroPlus <sup>TM</sup> procenjena vrednost (na osnovu molekulske mase)
Permeabilnost kroz humani jejunum, $P_{\text{eff}}$	$2,7 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$	[205]
Srednje vreme precipitacije	900 s	GastroPlus <sup>TM</sup> vrednost
Poluprečnik čestice leka	25 $\mu\text{m}$	GastroPlus <sup>TM</sup> vrednost
Odnos koncentracije lekovite supstance u krvi/plazmi	0,78	[24]
Slobodna frakcija lekovite supstance u plazmi	10%	[24]
Metabolizma prvog prolaza kroz jetru	62,89%	[206]
Klirens, CL	0,7 L/h/kg	Optimizovana vrednost
Volumen distribucije, Vd	0,493 L/kg	Izračunato iz <i>in vivo</i> podataka [201] koristeći PKPlus <sup>TM</sup> modul
Konstanta brzine distribucije, $k_{12}$	11,40 L/h	Izračunato iz <i>in vivo</i> podataka [201] koristeći PKPlus <sup>TM</sup> modul
Konstanta brzine distribucije, $k_{21}$	1,91 L/h	Izračunato iz <i>in vivo</i> podataka [201] koristeći PKPlus <sup>TM</sup> modul
Poluvreme eliminacije	3, 71 h	Izračunato iz <i>in vivo</i> podataka [201]

koristeći PKPlus™ modul		
Dodatni parametri za OCCAT™ model		
Doza lekovite supstance	10 mg	Primenjeno za sublingvalne tablete [206]
	30 mg	Primenjeno za ispitivane mukoadhezivne bukalne tablete
	10 mg	Primenjeno za ispitivane mukoadhezivne bukalne tablete i filmove
Zapremina vode za ispiranje	240 ml	[206]
Brzina protoka salive	0,6 ml/min	Optimizovana vrednost
Površina farmaceutskog oblika	0,785 cm <sup>2</sup>	Primenjeno za ispitivane mukoadhezivne bukalne tablete jačine 30 mg
	0,071 cm <sup>2</sup>	Primenjeno za ispitivane mukoadhezivne bukalne tablete jačine 10 mg
	1 cm <sup>2</sup>	Primenjeno za ispitivane mukoadhezivne bukalne filmove

Validacija izgrađenog modela je izvršena poređenjem rezultata simulacija sa farmakokinetičkim podacima iz publikovanih kliničkih studija nakon primene propranolol-hidrohlorida u vidu i.v. infuzije [200], tableta sa trenutnim oslobađanjem [207] i sublingvalnih tableta [206], a podaci korišćeni za validaciju prikazani su u [Tabeli 3.11](#). Navedeni podaci su se odnosili na farmaceutski oblik leka (doza, trajanje infuzije, količina vode sa kojom se farmaceutski oblik leka primenjuje), dok su fiziološki parametri podešeni na uobičajene vrednosti za populaciju na kojoj je ispitivanje sprovedeno. Prihvatljivost modela procenjena je izračunavanjem greške predviđanja u procentima (engl. *percent prediction error*, PE) između simuliranih i *in vivo* srednjih vrednosti farmakokinetičkih parametara primenom [jednačine 3.8](#):

$$PE (\%) = (in\ vivo\ srednja\ vrednost - simulirana\ vrednost) \times 100 / in\ vivo\ srednja\ vrednost \quad 3.8$$

Nakon faze validacije, model za intraoralnu i peroralnu primenu je korišćen za predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola nakon primene MBT i MBF, kao i tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida. Kao mukoadhezivni bukalni preparati razmatrani su različiti prethodno pripremljeni i ispitani uzorci MBT ([Tabela 3.1, 3.8](#)) i uzorci MBF ([Tabela 3.9](#)), sa ciljem procene uticaja sastava formulacije i vrste farmaceutskog oblika leka na stepen i brzinu apsorpcije propranolola. Svi fiziološki parametri su podešeni na uobičajene vrednosti za odraslu osobu telesne mase 70 kg u uslovima “na gladno.

**Tabela 3.11.** Podaci iz kliničkih studija korišćeni za validaciju propranolol-specifičnog modela

<b>Farmaceutski oblik</b>	<b>Doza</b>	<b>Drugi podaci</b>	<b>Referenca</b>
i.v. infuzija	2,2 mg	Trajanje infuzije 20 min, prosečna telesna masa ispitanika 66 kg	[200]
Tabele sa trenutnim oslobađanjem	80 mg	Prosečna telesna masa ispitanika 64 kg, 18 ispitanika, uzeto sa 150 mL vode, stanje „na gladno”	[207]
Sublingvalne tablete	10 mg	Uzeto sa 240 mL vode 15 minuta nakon postavljanja tablete u usta, 20 ispitanika uzrasta od 18 do 60 godina	[206]

4

## **REZULTATI I DISKUSIJA**

## 4.1 Rezultati i diskusija prve faze istraživanja

### 4.1.1 Fizičko-hemijska i farmaceutsko-tehnološka karakterizacija mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova

#### 4.1.1.1 Procena kompatibilnosti lekovite supstance i ekscipijenas

U cilju procene potencijalnih interakcija između propranolol-hidrohlorida i ostalih komponenti formulacije dvoslojnih mukoadhezivnih bukalnih tableta izvršena je FT-IR analiza mukoadhezivne bukalne tablete formulacije F2 (prisustvo svih polimera u podjednakom udelu) i svih komponenti formulacije, a dobijeni spektri prikazani su na [Slici 4.1](#). Na FT-IR spektru propranolol-hidrohlorida, prisutne su sledeće karakteristične apsorpcione trake koje potiču od funkcionalnih grupa prisutnih u strukturi njegovih molekula: O–H istezanje na  $3281\text{ cm}^{-1}$ ; N–H istezanje na  $2968\text{ cm}^{-1}$ ; C–O–C istezanje na  $1106\text{ cm}^{-1}$ ; aromatično C=C istezanje na  $1587\text{ cm}^{-1}$ ; C–O istezanje na  $1242\text{ cm}^{-1}$ ; simetrično i asimetrično  $\text{CH}_3$  istezanje na  $2968\text{ cm}^{-1}$  i  $2844\text{ cm}^{-1}$ , respektivno; simetrično i asimetrično  $\text{CH}_2$  istezanje na  $1402\text{ cm}^{-1}$  i  $1453\text{ cm}^{-1}$ , respektivno i apsorpciona traka na  $797\text{ cm}^{-1}$  zbog supstituisane naftalinske grupe [208–210].

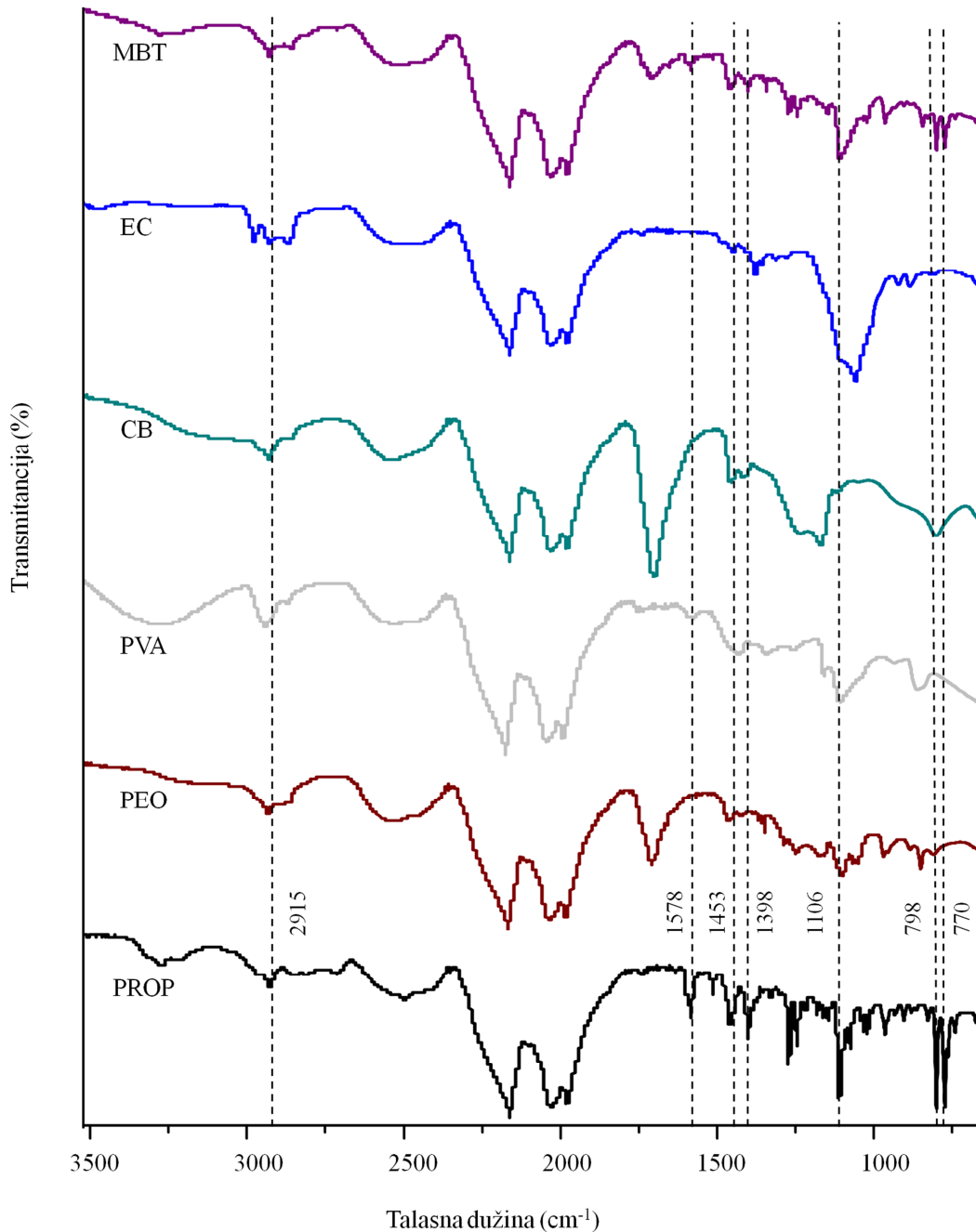
Sve karakteristične trake koje potiču od propranolol-hidrohlorida zadržavaju svoju poziciju u FT-IR spektru dvoslojne mukoadhezivne bukalne tablete sa propranolol-hidrohloridom. Odsustvo širenja i pomeranja karakterističnih traka propranolol-hidrohlorida u spektru mukoadhezivne bukalne tablete je potvrda da u formulaciji nije došlo do interakcije usled inkorporiranja lekovite supstance ([Slika 4.1](#)).

FT-IR spektri MBT sa propranolol-hidrohloridom, kao i spektri ekscipijenas koji čine sastav tableta prikazani su na [Slici 4.2](#). Na FT-IR spektru PEO polimera prikazanom na [Slici 4.2](#) prisutne su karakteristične apsorpcione trake na:  $3433\text{ cm}^{-1}$  usled O–H istezanja;  $1286\text{ cm}^{-1}$  C–O–C asimetrično istezanje i  $1094\text{ cm}^{-1}$  C–O–C simetrično istezanje; i  $2889\text{ cm}^{-1}$  istezanje alifatske C–H veze [211,212]. FT-IR spektar manitola pokazuje istaknute apsorpcione trake na  $3387\text{ cm}^{-1}$  zbog O–H istezanja,  $2970\text{ cm}^{-1}$  C–H istezanja, i  $1076\text{ cm}^{-1}$  C–O istezanja [213]. Karakteristične apsorpcione trake u FT-IR spektru silicijum dioksida, koloidnog, se pojavljuje na  $470\text{ cm}^{-1}$ ,  $800\text{ cm}^{-1}$  i  $1109\text{ cm}^{-1}$  koji potiču od Si–O–Si istezanja [214,215]. FT-IR spektar magnezijum-stearata pokazuje apsorpcione trake između  $2850$  i  $2916\text{ cm}^{-1}$  usled C–C istezanja. Opsezi apsorpcije između  $1464$  i  $1538\text{ cm}^{-1}$  se takođe primećuju na spektru zbog asimetričnog istezanja C–O–O veze.

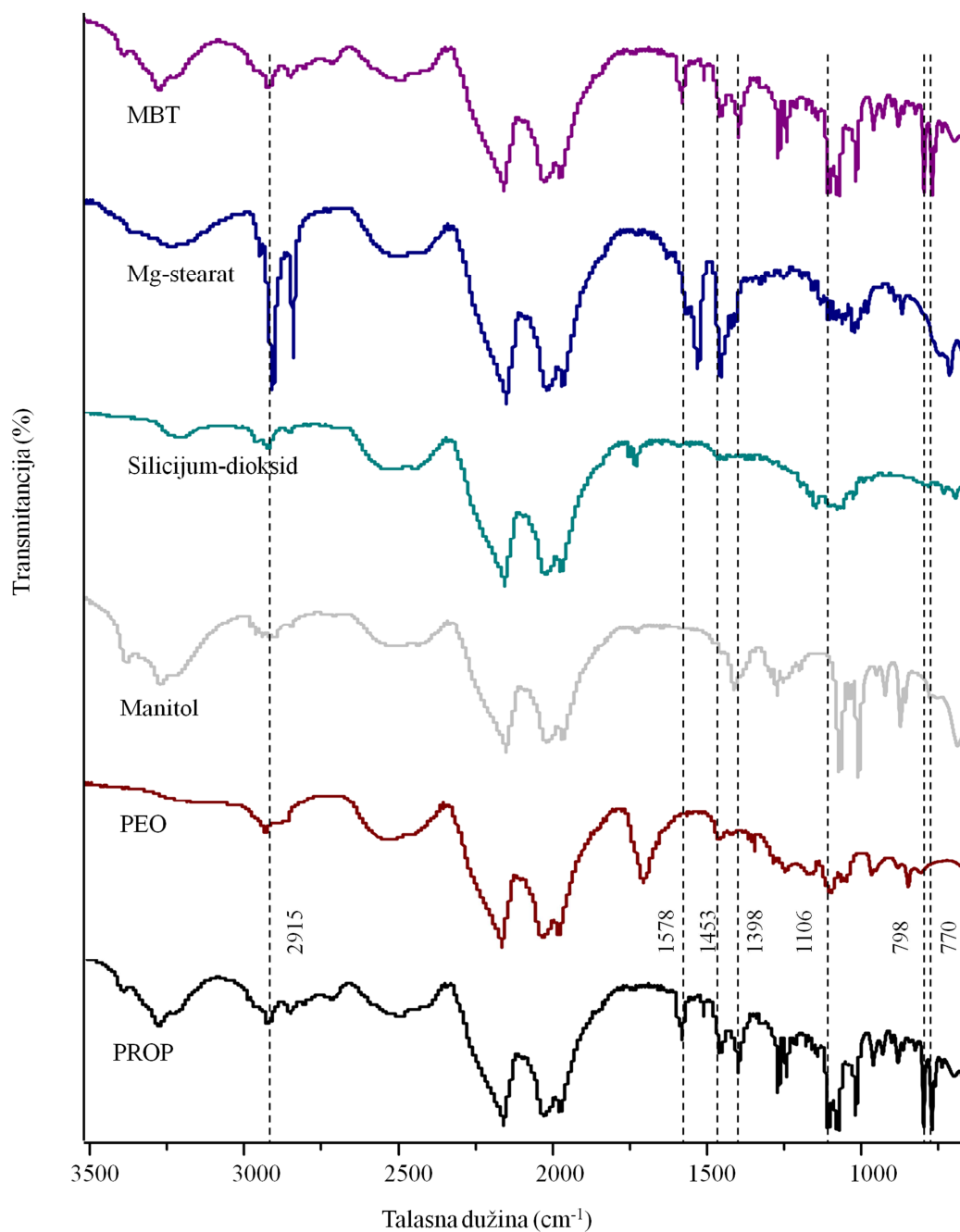
Sve karakteristične apsorpcione trake koji potiču od propranolol-hidrohlorida zadržavaju svoje pozicije u spektru MBT ([Slika 4.2](#)). Odsustvo širenja i pomeranja apsorpcionih traka propranolol-hidrohlorida u spektru MBT je potvrda da nema značajnih interakcija između lekovite supstance i ekscipijenas u formulaciji MBT.

FT-IR spektri MBF sa propranolol-hidrohloridom, placebo filma, kao i spektri ekscipijenas koji čine sastav filmova prikazani su na [Slici 4.3](#). Karakteristične apsorpcione trake na  $3521\text{ cm}^{-1}$  (O–H istezanje);  $2877\text{ cm}^{-1}$  (C–H istezanje);  $1144$ ,  $1096$  i  $1057\text{ cm}^{-1}$  (pikovi C–O–C vibracionog istezanja);  $1360$  i  $1342\text{ cm}^{-1}$  (istezanje  $\text{CH}_2$  grupe) primećeni su na FT-IR spektru PEO [211]. FT-IR spektar PVA sadržao je apsorpcione trake na  $3280\text{ cm}^{-1}$  (široka traka O–H istezanja),  $2925$  i  $2854\text{ cm}^{-1}$  (C–H istezanje),  $1734$  i  $1704\text{ cm}^{-1}$  (C=O i C–O istezanje), i  $1241\text{ cm}^{-1}$  (istezanje sekundarnog alkohola) [216]. Karakteristične apsorpcione trake na  $3453\text{ cm}^{-1}$  (O–H istezanje),  $2925\text{ cm}^{-1}$  (C–H istezanje),  $1054\text{ cm}^{-1}$  (jaka traka C–O–C istezanja),  $1452\text{ cm}^{-1}$  (asimetrično O– $\text{CH}_3$  istezanje),  $1373$  i  $1306\text{ cm}^{-1}$  (simetrično istezanje O– $\text{CH}_3$ ), i  $950\text{ cm}^{-1}$  (istezanje piranoznog prstena) primećeni su na FT-IR spektru HPMC [217,218].

FT-IR spektar MBF sa propranolol-hidrohloridom zadržao je sve karakteristične apsorpcione trake propranolol-hidrohlorida, što implicira da nije bilo interakcija između lekovite supstance i ekscipijenasa u formulaciji MBF.

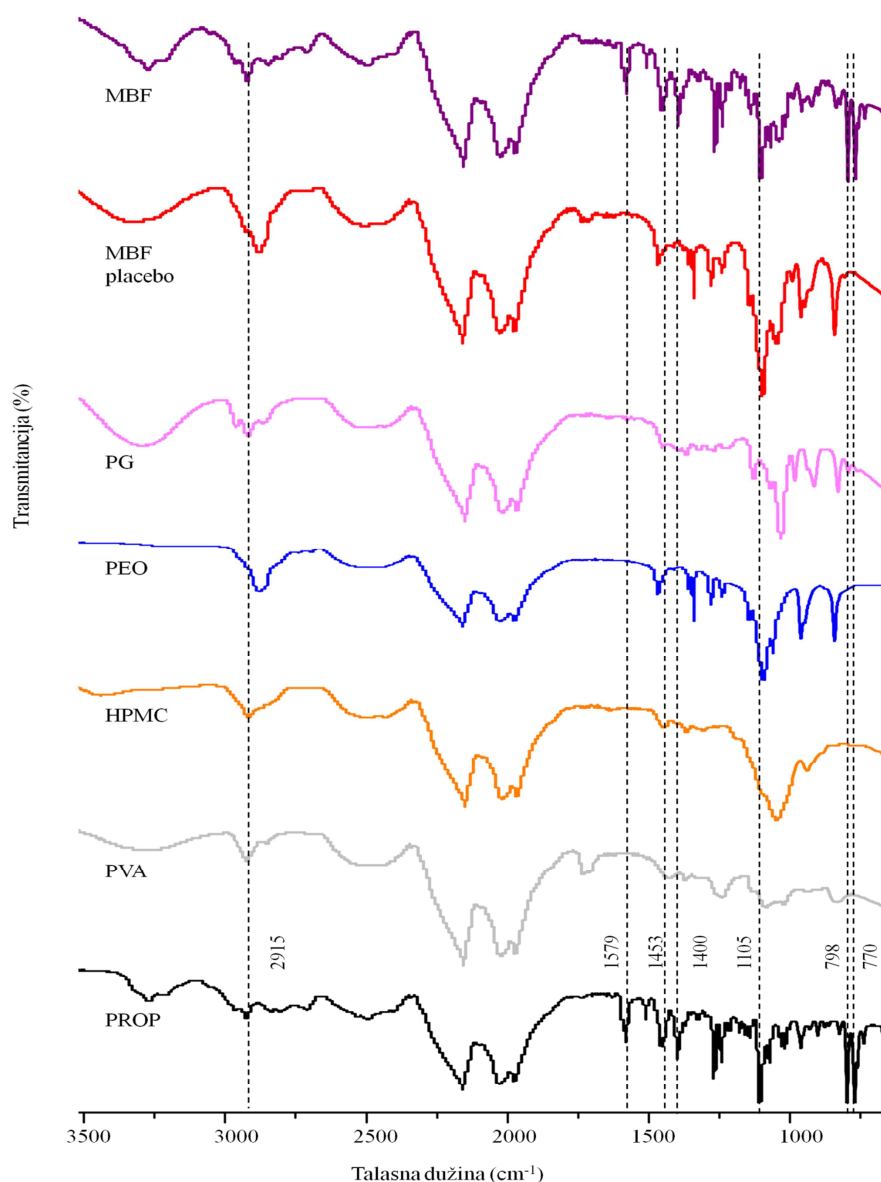


**Slika 4.1.** FT-IR spektri propranolol-hidrohlorida (PROP), polietilenoksidnog polimera (PEO), polivinilalkohola (PVA), karbomera (CB), etilceluloze (EC) i izrađene mukoadhezivne bukalne tablete sa propranolol-hidrohloridom (MBT)



**Slika 4.2.** FT-IR spektri propranolol-hidrohlorida (PROP); polietilenoksidnog polimera (PEO); manitola; silicijum-dioksida, koloidnog; magnezijum-stearata (Mg-stearat) i izrađene mukoadhezivne bukalne tablete sa propranolol-hidrohloridom (MBT)





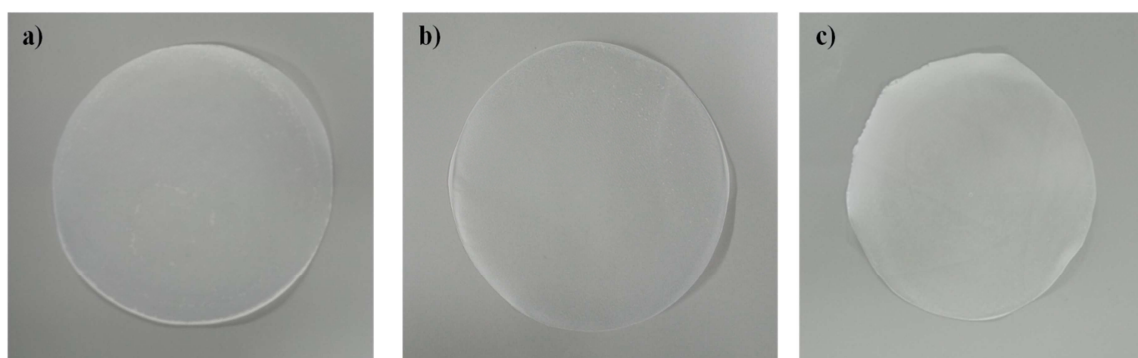
**Slika 4.3.** FT-IR spektri propranolol-hidrohlorida (PROP); polivinilalkohola (PVA), hidroksipropilmetilceluloze (HPMC), polietilenoksidnog polimera (PEO), propilenglikola (PG) i izrađene placebo formulacije mukoadhezivnog bukalnog filma (MBF placebo) i mukoadhezivnog bukalnog filma sa propranolol-hidrohloridom (MBF)

#### 4.1.1.2 *Organoleptičkih svojstava vodenih disperzija i placebo formulacija mukoadhezivnih bukalnih filmova*

Homogenost pripremljenih vodenih disperzija je procenjivana vizuelnim posmatranjem neposredno pre izlivanja u kalupe, dok su izgled, lakoća vađenja filma iz kalupa i sečenje, kao i elastičnost i krtoš dobijenih filmova vizuelno procenjivani nakon sušenja na sobnoj temperaturi i vađenja iz kalupa uz primenu tehnike izdržljivosti na preklapanje na gumenoj podlozi. U [Tabeli](#)

4.1 dat je prikaz organoleptičkih svojstava vodenih disperzija i izrađenih placebo formulacija mukoadhezivnih filmova.

Na osnovu 21 izrađene formulacije filmova, zaključeno je da je optimalna koncentracija PVA 1,5% kako bi se dobio kompaktni, ravnomerni film odgovarajuće debljine. Za dalju farmaceutsko-tehnološku karakterizaciju odabrane su formulacije sa većim udelima hidrofilnih polimera PEO i HPMC koje su pokazale kompaktni, homogeni, savitljiv film bez oštećenja, koji se lako vadi iz kalupa i seče. Odabrane su formulacije sa većim udelima hidrofilnih polimera zbog pretpostavke da će takvi filmovi imati bolja mukoadhezivna svojstva. U tom smislu, za inkorporiranje propranolol-hidrohlorida i sva dalja ispitivanja odabrane su formulacije F15, F16 i F21, kao najoptimalnije. Fotografije odabranih filmova prikazane su na [Slici 4.4](#). U daljem tekstu zbog formulacije F15, F16 i F21 su redom označene kao formulacije F1, F2 i F3



**Slika 4.4.** Izgled ispitivanih mukoadhezivnih bukalnih filmova formulacije (a) F15, (b) F16 i (c) F21.

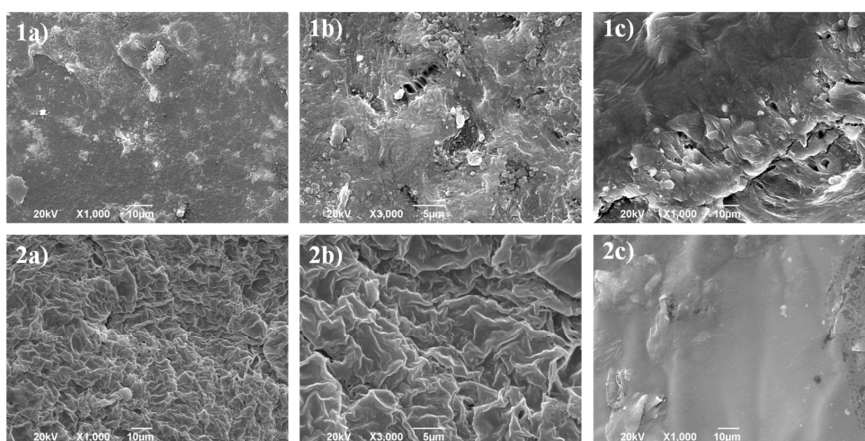
**Tabela 4.1.** Organoleptička svojstva vodenih disperzija i placebo formulacija mukoadhezivnih bukalnih filmova

Formulacija	Homogenost disperzije	Izgled filma	Vađenje iz kalupa i sečenje	Savitljivost	Krtost
F1	Homogen	Homogen, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F2	Homogen	Homogen, beličaste boje	Malo se teže vadi iz kalupa, lako se seče	Dobra	Nije krt
F3	Homogen	Nije homogen, hrapave površine, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F4	Homogean	Homogen, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F5	Homogen	Nije homogen, prisustvo malo mehurića, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F6	Homogen	Nije homogen, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F7	Homogen	Homogen, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F8	Homogen	Nije homogen, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F9	Homogen sa prisutnim mehurićima	Nije homogen, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F10	Homogen	Nije homogen, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F11	Homogen	Homogen, prijatan na dodir, gladak, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F12	Homogen	Nije dovoljno homogen, mekan, prijatan na dodir, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F13	Homogen	Homogen, nežan na dodir, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F14	Homogen	Homogen, nežan na dodir,	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt

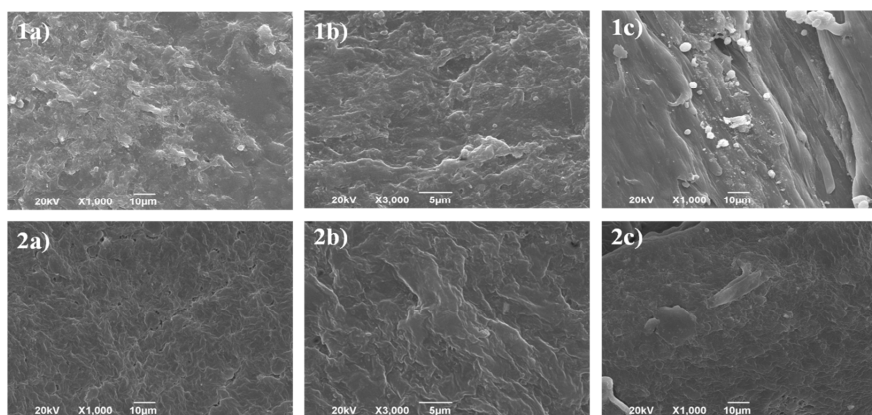
		beličaste boje			
<b>F15</b>	Homogen	Homogen, mekan na dodir, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
<b>F16</b>	Homogen	Homogen, mekan na dodir, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F17	Homogen	Homogen, deluje tanko i plastično, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F18	Homogen	Nehomogeni, naborani, deluje tanko i plastično, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F19	Homogen	Homogen, deluje tanko na dodir, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
F20	Homogen	Homogen, deluje tanko na dodir, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt
<b>F21</b>	Homogen	Homogen, beličaste boje	Lako se vadi i seče	Dobra	Nije krt

#### 4.1.1.3 Ispitivanje morfologije površine mukoadhezivnih bukalnih filmova

Mikroskopije su moćne analitičke tehnike za proučavanje površinske i poprečnog preseka farmaceutskih oblika lekova tipa filmova na mikrostrukturnom nivou. SEM mikrografije izrađenih MBF sa propranolol-hidrohlridom i odgovarajućih placebo formulacija su predstavljene na Slikama 4.5-4.7. Površina filma je izgledala glatko i kompaktno, bez vidljivih pora, što sugerise da su svi sastojci formulacije pomešani i ravnomerno raspoređeni u filmu. SEM mikroskopija je jasno pokazala prisustvo kristala propranolol-hidrohlrida u veličini od 0,6 - 9  $\mu\text{m}$ .



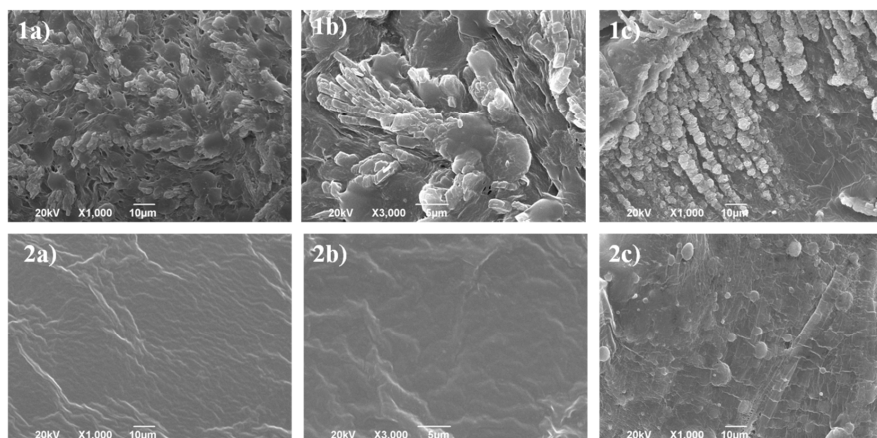
**Slika 4.5.** SEM mikrografije mukoadhezivnog bukalnog filma sa propranolol-hidrohlridom (formulacija F1) (1) i odgovarajuće placebo formulacije (2): (a) površina filma pri uvećanju 1000x; (b) površina filma pri uvećanju 3000x i (c) poprečni presek filma pri uvećanju 1000x



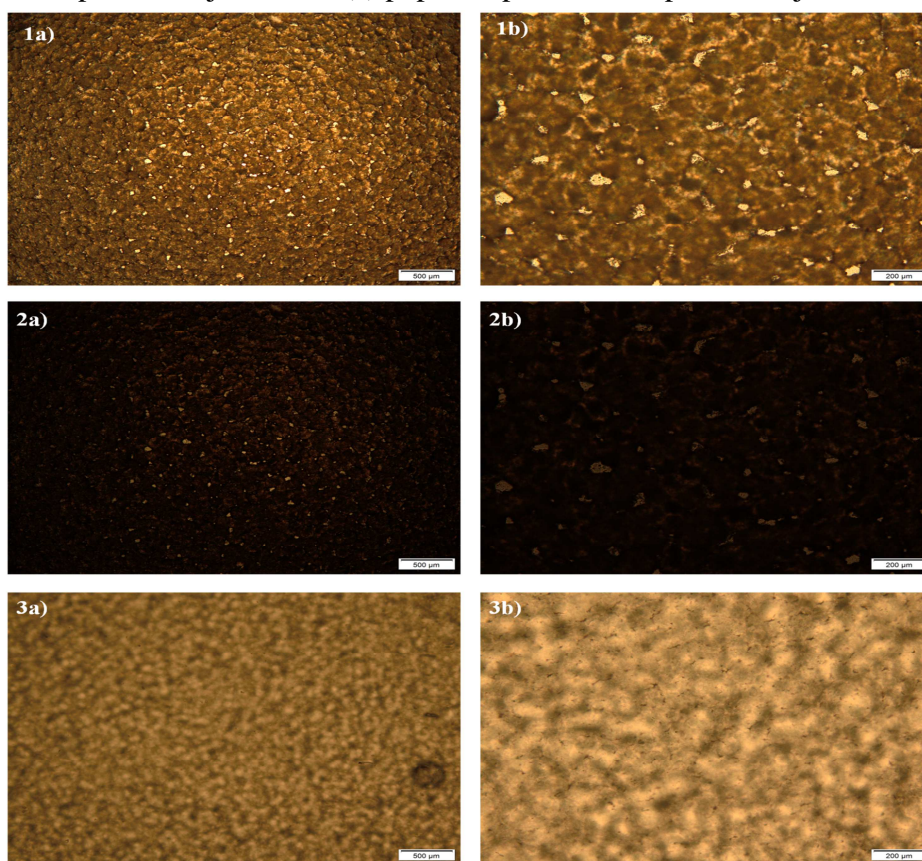
**Slika 4.6.** SEM mikrografije mukoadhezivnog bukalnog filma sa propranolol-hidrohlridom (formulacija F2) (1) i odgovarajuće placebo formulacije (2): (a) površina filma pri uvećanju 1000x; (b) površina filma pri uvećanju 3000x i (c) poprečni presek filma pri uvećanju 1000x

Mikrografije ispitivanih uzoraka MBF sa propranolol-hidrohlridom formulacije F2 i odgovarajućih placebo uzoraka, dobijene pomoću polarizacionog mikroskopa prikazane su na Slici 4.8. Polarizaciona mikroskopija je pokazala ujednačenu površinu MBF-a bez pukotina ili šupljina vazduha sa prisustvom kristala propranolol-hidrohlrida koji su homogeno raspoređeni u

polimernom matriksu (Slika 4.8-1,2a,1,2b). Polarizaciona mikroskopija kod placebo uzoraka nije pokazala prisustvo kristalnih regiona polimera (Slika 4.8-3a,3b).



**Slika 4.7.** SEM mikrografije mukoadezivnog bukalnog filma sa propranolol-hidrohloridom (formulacija F3) (1) i odgovarajuće placebo formulacije (2): (a) površina filma pri uvećanju 1000x; (b) površina filma pri uvećanju 3000x i (c) poprečni presek filma pri uvećanju 1000x



**Slika 4.8.** Mikrografije mukoadezivnog bukalnog filma sa propranolol-hidrohloridom formulacije F2 (1); prisustvo kristala propranolol-hidrohlorida (2) i mikrografije placebo uzorka mukoadezivnog bukalnog filma (3) pri uvećanju od 4x (a) i 10x (b) snimljene polarizacionim mikroskopom

#### **4.1.1.4 Ispitivanje variranja mase i debljine mukoadhezivnih bukalnih tableta**

Rezultati ispitivanja uniformnosti mase i debljine ispitivanih MBT prikazani su u [Tabeli 4.2](#). Masa MBT je varirala u opsegu od 193 mg do 207 mg, ali su svi uzorci zadovoljili farmakopejski zahtev u pogledu variranja mase, te tako ni jedna MBT nije odstupala za više od 7,5% od izračunate srednje vrednosti mase 20 ispitivanih uzoraka MBT.

Ispitivane MBT su pored uniformnosti mase imale i ujednačenu debljinu čije su vrednosti bile u opsegu  $\pm 5\%$  izračunate srednje vrednosti debljine.

#### **4.1.1.5 Ispitivanje ujednačenosti sadržaja propranolol-hidrohlorida u mukoadhezivnim bukalnim tabletama**

Rezultati ispitivanja ujednačenosti sadržaja propranolol-hidrohlorida u MBT prikazani su u [Tabeli 4.2](#). Ispitivane MBT su zadovoljile farmakopejski zahtev u pogledu ujednačenosti sadržaja lekovite supstance jer je sadržaj propranolol-hidrohlorida u svakoj MBT pojedinačno bio u okviru dozvoljenog intervala od 85-115% od izračunate srednje vrednosti sadržaja propranolol-hidrohlorida.

Ujednačenost mase MBT i sadržaja lekovite supstance u MBT su važne mere kvaliteta čvrstih farmaceutskih oblika. Ujednačenost mase tableta ukazuje na dobru protočnost praškova tokom procesa kompresije, a zajedno sa ujednačenim sadržajem lekovite supstance obezbeđuju da pacijent uzima odgovarajuću dozu leka. U konkretnom slučaju, MBT su izrađivane pojedinačno odmeravanjem tačno definisane količine smeše praškova koja je potom komprimovana, pa u tom smislu nije razmatrana protočnost praškova, ali je značajno da je navedeni postupak izrade tablete obezbedio njihov odgovarajući kvalitet u pogledu sadržaja lekovite supstance.

#### **4.1.1.6 Ispitivanje friabilnosti i zatezne čvrstine mukoadhezivnih bukalnih tableta**

Rezultati ispitivanja friabilnosti MBT pokazali su da sve formulacije MBT imaju friabilnost ispod 1% ([Tabela 4.2](#)). Prilikom ovog ispitivanja uočeno je da su tablete očuvale svoju slojevitost, odnosno nije došlo do razdvajanja slojeva tablete.

Prosečna sila potrebna za lomljenje MBT je  $115 \pm 6$  N, dok je prosečna izračunata zatezna čvrstina iznosila  $2,81 \pm 0,14$  MPa ([Tabela 4.2](#)). Dobijeni rezultati ukazuju na dobru mehaničku otpornost izrađenih MBT, što je važna karakteristika kvaliteta kako u fazama izrade/proizvodnje, pakovanja i čuvanja, tako i prilikom primene MBT od strane pacijenta.

**Tabela 4.2.** Karakteristike izrađenih mukoadhezivnih bukalnih tableta

Uzorak	Masa <sup>a</sup> (mg)	Broj tableta izvan limita (92,5-107,5%)	Debljina <sup>a</sup> (mm)	Sadržaj propranolol- hidrohlorida <sup>b</sup> (mg)	Broj tableta izvan limita (85-115%)	Friabilnost <sup>c</sup> (%)	Čvrstina tableta <sup>d</sup> (N)	Zatezna čvrstina <sup>d</sup> (MPa)
F1	204 ± 3	/	2,60 ± 0,08	31 ± 1,8	/	0,20	116 ± 6	2,84 ± 0,15
F2	199 ± 2	/	2,61 ± 0,05	28 ± 3,1	/	0,14	114 ± 8	2,78 ± 0,20
F3	203 ± 4	/	2,61 ± 0,04	30 ± 2,2	/	0,15	118 ± 8	2,87 ± 0,20
F4	200 ± 4	/	2,60 ± 0,04	30 ± 2,4	/	0,12	113 ± 4	2,76 ± 0,11
F5	199 ± 5	/	2,60 ± 0,09	29 ± 1,5	/	0,16	111 ± 3	2,71 ± 0,08
F6	200 ± 5	/	2,61 ± 0,08	30 ± 1,3	/	0,15	117 ± 6	2,85 ± 0,15
F7	198 ± 4	/	2,60 ± 0,04	29 ± 1,8	/	0,24	113 ± 5	2,77 ± 0,12
F8	198 ± 5	/	2,60 ± 0,08	29 ± 0,7	/	0,22	114 ± 5	2,79 ± 0,13
F9	201 ± 4	/	2,61 ± 0,05	30 ± 2,4	/	0,18	117 ± 9	2,85 ± 0,22
F10	200 ± 3	/	2,60 ± 0,05	29 ± 1,6	/	0,18	115 ± 6	2,82 ± 0,14
F11	202 ± 3	/	2,61 ± 0,04	30 ± 1,9	/	0,26	116 ± 7	2,83 ± 0,17
F12	203 ± 3	/	2,61 ± 0,08	31 ± 1,8	/	0,24	117 ± 5	2,85 ± 0,13
F13	202 ± 4	/	2,61 ± 0,04	29 ± 2,0	/	0,18	116 ± 4	2,83 ± 0,10
F14	198 ± 3	/	2,60 ± 0,05	28 ± 2,7	/	0,24	114 ± 5	2,78 ± 0,12

<sup>a</sup> srednja vrednost ± SD (n = 20)

<sup>b</sup> srednja vrednost ± SD (n = 5)

<sup>c</sup> srednja vrednost ± SD (n = 20)

<sup>d</sup> srednja vrednost ± SD (n = 10)



#### 4.1.1.7 *Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava mukoadhezivnih bukalnih tableta*

Izmerene vrednosti maksimalne sile odvajanja  $F_{\max}$  kretale su se između 1,03 i 2,26 N, a ove vrednosti su uporedive sa podacima za mukoadhezivne bukalne tablete risperidona (0,95 – 2,55 N) za koje su smatra da su dovoljne da obezbede produženi kontakt sa bukalnom sluznicom [79]. Primećeno je da sila mukoadhezije zavisi od sastava tablete formulacije. Naime, formulacije koje sadrže samo CB ili PEO polimer, ili CB u kombinaciji sa PEO i/ili PVA su imale visoke vrednosti sile odvajanja: F14 (2,26 N) > F8 (2,05 N) > F4 (2,02 N) > F11 (1,96 N) > F12 (1,92 N), dok su formulacije sa visokim sadržajem PVA (F3, F10 i F6), i formulacija F2 sa podjednakim sadržajem svih polimera pokazale niže vrednosti sile odvajanja.

Pošto je sastav formulacija varirao prema eksperimentalnom planu koji je dobijen primenom D-optimalnog eksperimentalnog dizajna, dobijene vrednosti za silu odvajanja su analizirane primenom statističkog testa ANOVA. Na taj način je dobijena [jednačina 4.1](#) u kodiranom obliku:

$$F_{\max} (N) = 1,43A + 1,24B + 2,22C \quad 4.1$$

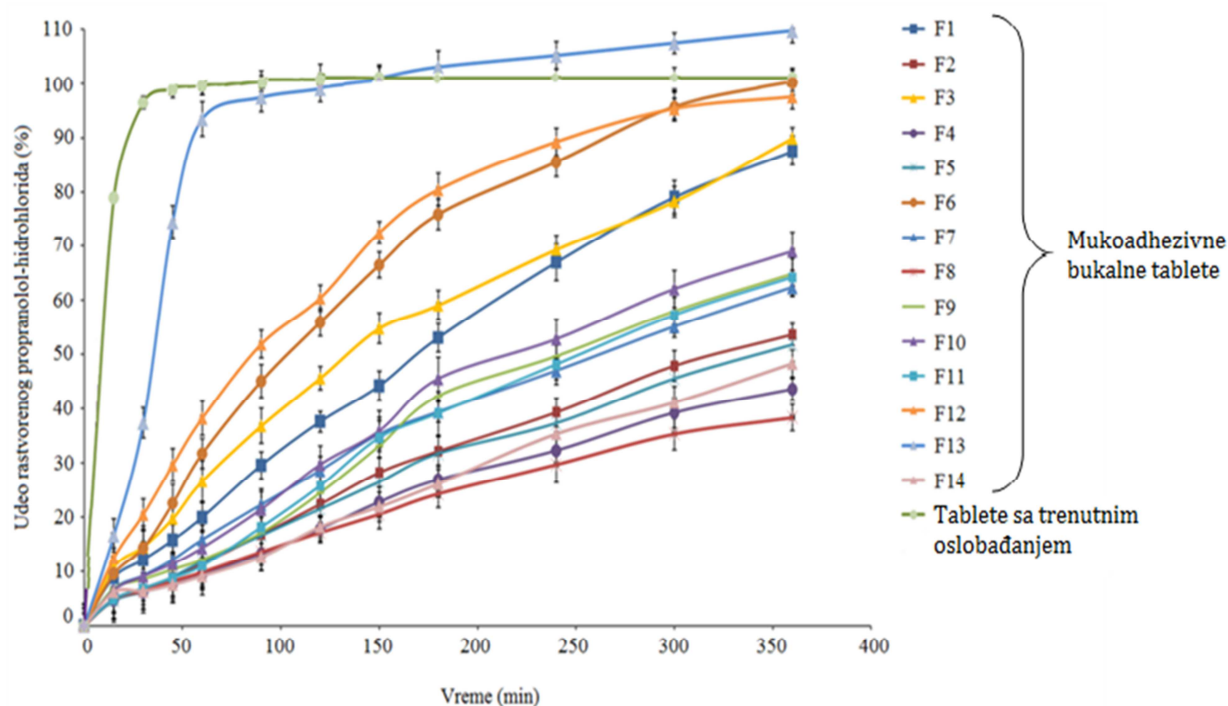
Vrednosti  $p$  manje od 0,05 ukazuju na to da su članovi modela bili značajni. Iz dobijene jednačine se vidi na silu mukoadhezije značajno utiču vrsta i količina odabranih polimera. Pozitivan predznak ispred koeficijenata ispitivanih faktora ukazuje da sila odvajanja raste sa povećanjem koncentracije odabranih polimera. Na osnovu vrednosti koeficijenta može se zaključiti da koncentracija CB ima najveći uticaj na silu odvajanja, slede koncentracija PEO polimera i na kraju koncentracija PVA. Uočena visoka sila odvajanja za MBT sa CB je u skladu sa publikacijom Madsena i sar. [219]. Karbomeri poseduju visoku gustinu dostupnih grupa koje formiraju vodoničnu vezu, pa mogu da stupe u jače veze sa glikoproteinima mucina. Karboksilne grupe u strukturi CB-a su odgovorne za snažno vezivanje za oligosaharidne lance mucina usled stvaranja vodoničnih veza [220]. PEO polimeri imaju dugo lančanu linearnu strukturu koja im omogućava da formiraju snažnu međuprožimajuću mrežu sa oligosaharidnim lancima mucina. Poznato je da sposobnost adhezije PEO zavisi od molekulske mase PEO polimera. *In vitro* test mukoadhezije je pokazao da se maksimalna adhezija javlja u slučaju PEO polimera prosečne molekulske mase  $4 \times 10^6$ , a da dalje povećanje molekulske mase ovog polimera dovodi do smanjenja adhezije [221,222]. Optimalna molekulska masa PEO polimera za postizanje dovoljnih mukoadhezivnih karakteristika je oko  $4 \times 10^6$  g/mol [223]. Zaključuje se da i vrsta polimera i njegova koncentracija imaju izražen uticaj na silu odvajanja, a među ispitivanim formulacijama MBT, MBT sa karbomerom se izdvajaju kao tablete sa najvećom jačinom mukoadhezije.

#### 4.1.1.8 *Ispitivanje brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta*

Profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz izrađenih dvoslojnih MBT i komercijalnih tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida prikazani su na [Slici 4.9](#). Najveća brzina rastvaranja propranolol-hidrohlorida je postignuta iz komercijalnih tableta sa trenutnim oslobađanjem. Ovakvi rezultati se očekuju zbog visoke rastvorljivosti propranolol-hidrohlorida i brze dezintegracije komercijalne formulacije tableta.

U slučaju izrađenih MBT uočeno je da se iz formulacije F13, koja sadrži 70% PVA, postiže najbrže rastvaranje propranolol-hidrohlorida među ispitivanim MBT, sa 37% propranolol-hidrohlorida rastvorenog nakon pola sata i više od 90% nakon 60 minuta ispitivanja. Nasuprot tome, iz MBT koje sadrže visok udeo PEO polimera (formulacija F12) se nakon 30 minuta

oslobodilo samo 20% propranolol-hidrohlorida i približno 38% nakon 60 minuta. Na kraju ispitivanja, posle 360 minuta, najveći udeo rastvorenog propranolol-hidrohlorida je postignut iz formulacija F6, F12, F13 ( $100,3 \pm 1,06\%$ ;  $97,51 \pm 1,74\%$ ;  $108 \pm 1,60\%$ , respektivno). Najsporija brzina rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz izrađenih MBT bila je primećena u slučaju formulacije F8 gde se samo 38% propranolol-hidrohlorida oslobodilo tokom 6 sati ispitivanja.



**Slika 4.9.** *In vitro* profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz izrađenih mukoadhezivnih bukalnih tableta i komercijalnih tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida

Efekat nezavisnih varijabli (udeo korišćenih polimera) i njihovih interakcija na zavisne varijable - količinu rastvorenog propranolol-hidrohlorida nakon 30 min, 60 min, 180 min i 360 min ( $Y_{30min}$ ,  $Y_{60min}$ ,  $Y_{180min}$ ,  $Y_{360min}$ ) ispitani su statistički testom ANOVA kroz metodologiju D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše. Izbor zavisnih varijabli je zasnovan na pokrivanju vremenskog trajanja ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance.

Jednačine 4.2-4.5 koje opisuju zavisnost između ispitivanih zavisnih i nezavisnih varijabli, dobijene primenom ANOVA testa, su prikazane u svom kodiranom obliku:

$$Y_{30min} = 20,02A + 36,20B + 7,04C - 54,32AB - 28,22 AC - 50,13BC \quad 4.2$$

$$Y_{60min} = 37,75A + 89,16B + 11,47C - 135,50AB - 53,45AC - 148,12BC \quad 4.3$$

$$Y_{180min} = 75,53A + 94,40B + 27,01C - 88,98AB - 114,17AC - 78,43BC \quad 4.4$$

$$Y_{360min} = 85,80A + 95,80B + 42,86C + 0,34AB - 99,00AC + 1,69BC - 399,91ABC \quad 4.5$$

ANOVA analiza je pokazala da brzina rastvaranja propranolol-hidrohlorida zavisi od koncentracije odabranih polimera, kao i od njihovih interakcija. Generisani modeli za procenat rastvorenog propranolol-hidrohlorida je značajan, sa visokim vrednostima za  $R^2$  i prilagođen  $R^2$  ( $Y_{30\text{min}}$ : 0,9764; 0,9617;  $Y_{60\text{min}}$ : 0,9631; 0,9400;  $Y_{180\text{min}}$ : 0,9611; 0,9368;  $Y_{360\text{min}}$ : 0,9761; 0,9557; respektivno), što potvrđuje da su četiri zavisne varijable dobro opisane predloženim modelima. Ispitivanje je otkrilo da sve ispitivane nezavisne varijable značajno utiču na oslobađanje propranolol-hidrohlorida iz izrađenih formulacija MBT sledećim redosledom: PVA (B) > PEO (A) > CB (C). Pored toga, primećene su značajne interakcije između ovih faktora (PEO/PVA (AB); PEO/CB (AC); PVA/CB (BC); PEO/PVA/CB (ABC)). Dobijeni rezultati ukazuju da je važno pažljivo birati količinu svakog mukoadhezivnog polimera zbog njihovog značajnog uticaja (uključujući uticaj interakcija polimera) na brzinu rastvaranja propranolol-hidrohlorida.

Nakon što je model dobijen, izvršena je procena prediktivne moći dobijenog modela. Za ovo, softveru su zadati željene karakteristike/izlazi. U cilju postizanja usporenog (modifikovanog) oslobađanja lekovite supstance, postavljene su sledeće karakteristike: minimalna količina propranolol-hidrohlorida oslobođena nakon 30, 45, 60 i 90 minuta i potpuno oslobođena nakon 360 min, kao i najveća sila mukoadhezije. Na osnovu zadatih karakteristika, program je predložio dve formulacije ( $F_{MP1}$  i  $F_{MP2}$ ) čiji je sastav prikazan u [Tabeli 4.3](#).

**Tabela 4.3.** Sastav formulacija mukoadhezivnih bukalnih tableta za procenu moći predviđanja

Sastav (mg)	Formulacija	
	$F_{MP1}$	$F_{MP2}$
Propranolol-hidrohlordid	30	30
Polietilen oksidni polimer	42	42
Polivinilalkohol	3	22
Karbomer	25	6
Etilceluloza	100	100
Ukupno	200	200

U [Tabeli 4.4](#) prikazane su eksperimentalno dobijene i *in silico* predviđene vrednosti udela rastvorenog propranolol-hidrohlorida iz izrađenih optimizovanih formulacija MBT, kao i vrednosti mukoadhezivne sile. Eksperimentalno dobijeni i predviđeni profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida upoređeni su izračunavanjem faktora sličnosti  $f_2$ , kao i izračunavanjem koeficijenta korelacije ( $R^2$ ). Na osnovu dobijenih vrednosti za faktor sličnosti za  $FO_1$  ( $f_2=93$ ) i  $FO_2$  ( $f_2=67$ ) zaključuje se da se predviđeni i eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida međusobno slični. Takođe, visoke vrednosti  $R^2$  od 0,9994 za  $F_{MP1}$  i 0,9953 za  $F_{MP2}$ , ukazuju na odličnu korelaciju između predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti udela rastvorenog propranolol-hidrohlorida. Izračunata greška predviđanja za mukoadhezivnu silu kod  $F_{MP1}$  i  $F_{MP2}$  je bila niska (5,63; 3,60, respektivno), što podržava dalju primenu razvijenih modela.

**Table 4.4.** Eksperimentalno dobijene i predviđene vrednosti udela rastvorenog propranolol-hidrohlorida iz formulacija mukoadhezivnih bukalnih tableta i sila odvajanja

Vreme (minuti)	Udeo rastvorenog propranolol-hidrohlorida (%)			
	$F_{MP1}$		$F_{MP2}$	
	Eksperimentalna vrednost	<i>In silico</i> predviđena vrednost	Eksperimentalna vrednost	<i>In silico</i> predviđena vrednost
30	6,54	7,14	9,75	11,12
45	9,46	9,2	13,25	15,82
60	11,78	11,72	17,39	21,58
90	16,49	16,76	28,43	30,47
360	46,22	48,19	79,05	70,94
$f_2$	93,27		67,37	
$R^2$	0,9994		0,9953	
Sila odvajanja (N)	1,60	1,69	1,39	1,44
Greška predviđanja (%)	5,63		3,60	

#### 4.1.1.9. Poređenje profila brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta model - zavisnom i model - nezavisnom analizom

Kako bi se ispitao mehanizam oslobađanja propranolol-hidrohlorida iz izrađenih dvoslojnih MBT, primenjeni su *Higuchi*, *Peppas-Sahlin* i *Korsmeyer-Peppas* modeli. U cilju poredjenja sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem, ispitana je kinetika oslobađanja komercijalnih tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida (Propranolol<sup>®</sup>, Galenika ad, Srbija). Kinetički parametri dobijeni primenom ovih matematičkih modela na krive oslobađanja propranolol-hidrohlorida iz MBT prikzani su u **Tabeli 4.5**. Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da su profili brzine rastvaranja najbolje opisani *Peppas-Sahlin* modelom jer su kod ovog modela uočene najveće vrednosti koeficijenta korelacije  $R^2$  (između 0,959 i 0,997) i najmanje AIC vrednosti, izuzev formulacije F13 koja sadrži visoki udeo PVA. To znači da se propranolol-hidrohlrid dominantno oslobađa anomalnim mehanizmom transporta koji predstavlja kombinaciju mehanizama *Fick*-ove difuzije i tip II transporta (erozije).

Što se tiče načina oslobađanja propranolol-hidrohlorida iz komercijalnih tableta, propranolol-hidrohlrid se brzo oslobađa, tj. nije prisutno modifikovano oslobađanja propranolol-hidrohlorida (**Slika 4.9**). Eksponent oslobađanja  $n$  u *Korsmeyer-Peppas* modelu ukazuje na mehanizam oslobađanja lekovite supstance. Iz dobijenih vrednosti za difuzioni eksponent  $n$  (**Tabela 4.5**) može se zaključiti da se propranolol-hidrohlrid iz izrađenih MBT oslobađa kombinovanim mehanizmom erozije i difuzije. Vrednosti  $n$  su bile između 0,61 i 0,9 izuzev formulacije F13 ( $n = 0,39$ ) koja sadrži visoki udeo PVA, a kod koje se propranolol-hidrohlrid oslobodio mehanizmom *Fick*-ove difuzije.

**Table 4.5.** Kinetički parametri procesa oslobađanja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta dobijeni primenom različitih matematičkih modela

Formulacija	Higuchi model			Peppas-Sahlin model				Korsmeyer-Peppas model			
	$k_H$	$R^2$	AIC	$k_R/k_F$	$m$	$R^2$	AIC	$k_{KP}$	$n$	$R^2$	AIC
F1	4,00	0,915	81	1,19	0,350	0,997	42	0,92	0,77	0,996	45
F2	2,42	0,904	72	0,81	0,344	0,996	33	0,46	0,81	0,997	34
F3	4,34	0,961	72	0,74	0,208	0,990	53	1,48	0,70	0,993	55
F4	1,98	0,907	66	2,65	0,377	0,995	31	0,48	0,76	0,992	39
F5	2,32	0,909	70	0,81	0,337	0,997	29	0,43	0,81	0,997	25
F6	5,20	0,951	80	0,75	0,121	0,968	70	1,26	0,75	0,931	77
F7	2,91	0,937	70	0,80	0,286	0,995	50	0,79	0,74	0,996	32
F8	1,81	0,937	58	3,58	0,359	0,996	25	0,63	0,69	0,993	29
F9	2,92	0,881	79	0,81	0,366	0,985	52	0,57	0,80	0,977	55
F10	3,17	0,904	78	0,64	0,307	0,990	49	0,60	0,81	0,990	47
F11	2,87	0,878	80	0,53	0,314	0,989	48	0,34	0,90	0,989	47
F12	5,45	0,970	73	0,88	0,057	0,959	71	2,75	0,61	0,933	75
F13	7,35	0,711	104	0,06	0,048	0,803	89	1252	0,39	0,428	95
F14	2,07	0,879	71	0,09	0,538	0,992	37	0,57	0,73	0,962	53
<b>srednja vrednost</b>		0,903	75			0,975	48			0,939	51

$k_H$ ,  $k_R/k_F$ ,  $k_{KP}$  - konstante brzine rastvaranja odgovarajućih modela

$m$  - difuzioni eksponent za farmaceutski oblik bilo koje geometrije koji pokazuje kontrolisano oslobađanje lekovite supstance

$n$  - difuzioni eksponent koji ukazuje na mehanizam oslobađanja lekovite supstance

$R^2$  - koeficijent korelacije

AIC - Akaikeov informacijski kriterijum

Kako se *Peppas–Sahlin* model pokazao kao najpogodniji za podatke brzine rastvaranja lekovite supstance, dalje je analiziran uticaj udela polimera (nezavisne varijable) na dobijene kinetičke parametre *Peppas–Sahlin* modela (zavisne varijable) primenom softvera Design-Expert®. Rezultati su pokazali da kubni model najbolje opisuje uticaj nezavisnih na zavisne varijable:  $k_R, k_F, m$ . Za  $k_R$  su dobijeni statistički parametri  $p = 0,0032$ ;  $R^2 = 0,9969$ ; prilagođeni  $R^2 = 0,9900$ ; za  $k_F$   $p = 0,0032$ ;  $R^2 = 0,9969$ ; prilagođeni  $R^2 = 0,9900$  i za  $m$   $p = 0,0091$ ;  $R^2 = 0,9953$ ; prilagođeni  $R^2 = 0,9847$ . Nakon što je odabran matematički model, primenom ANOVA testa isključeni su parametri koji nisu bili statistički značajni ( $p > 0,05$ ). Na taj način su dobijeni redukovani matematički modeli, odnosno finalne jednačine 4.6-4.8 za zavisne varijable:  $k_R, k_F, m$ .

$$k_R = 2,812 \cdot \text{PEO} + 1289,423 \cdot \text{PVA} - 1,415 \cdot \text{CB} - 37,724 \cdot \text{PEO} \cdot \text{PVA} - 38,019 \cdot \text{PVA} \cdot \text{CB} + 0,788 \cdot \text{PEO} \cdot \text{PVA} \cdot \text{CB} + 0,431 \cdot \text{PEO} \cdot \text{PVA} \cdot (\text{PEO} \cdot \text{PVA}) - 0,486 \cdot \text{PVA} \cdot \text{CB} \cdot (\text{PVA} \cdot \text{CB}) \quad 4.6$$

$$k_F = -3,289 \cdot \text{PEO} - 1289,792 \cdot \text{PVA} + 1,4112 \cdot \text{CB} + 37,735 \cdot \text{PEO} \cdot \text{PVA} + 38,028 \cdot \text{PVA} \cdot \text{CB} - 0,788 \cdot \text{PEO} \cdot \text{PVA} \cdot \text{CB} - 0,431 \cdot \text{PEO} \cdot \text{PVA} \cdot (\text{PEO} \cdot \text{PVA}) + 0,486 \cdot \text{PVA} \cdot \text{CB} \cdot (\text{PVA} \cdot \text{CB}) \quad 4.7$$

$$m = 0,069 \cdot \text{PEO} - 2,20897\text{E-}003 \cdot \text{PVA} + 0,529 \cdot \text{CB} + 0,343 \cdot \text{PEO} \cdot \text{PVA} + 0,218 \cdot \text{PEO} \cdot \text{CB} + 0,267 \cdot \text{PVA} \cdot \text{CB} + 1,681 \cdot \text{PEO} \cdot \text{PVA} \cdot \text{CB} + 1,267 \cdot \text{PVA} \cdot \text{CB} \cdot (\text{PVA} \cdot \text{CB}) \quad 4.8$$

Isključivanjem određenih parametara utiče se na poboljšanje vrednosti predviđenog i prilagođenog koeficijenta korelacije, kao i na značajnost primene tog modela. Na osnovu dobijenog matematičkog modela moguće je za bilo koje vrednosti ulaznih parametara, a u okviru postavljenih graničnih vrednosti, predvideti procenat oslobođenog karbamazepina u različitim vremenima.

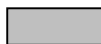
Što je veći koeficijent uz nezavisnu varijablu to je njen uticaj na vrednost zavisne varijable veći. Predznak ispred koeficijenta ukazuje da li je efekat pozitivan ili možda negativan. Tako su kod procene uticaja polimera i njihovih interakcija na  $k_R$  najveći pozitivan efekat pokazali udeo PVA i interakcije PVA i PEO i PVA i CB, koje su ispoljile negativni efekat. U slučaju  $k_F$  situacija je potpuno suprotna. Najveći negativan efekat pokazao je udeo PVA, do su interakcije PVA i PEO i PVA i CB ispoljile najveći pozitivan efekat. U slučaju difuzionog koeficijenta  $m$  najveći pozitivni efekat su pokazali udeo CB i interakcije PEO, PVA i CB i PVA·CB·(PVA·CB).

U Tabeli 4.6 prikazane su izračunate vrednosti faktora razlike i faktora sličnosti za profile brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBT (F1-F14) i tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida (F15).

Na osnovu izračunatih vrednosti faktora sličnosti, može se zaključiti da se profil brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz formulacije F15 i F13 razlikuju od svih ostalih profila brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida. To su formulacije iz kojih se postiže najbrže oslobađanje lekovite supstance, a čiji profili odgovaraju trenutnom oslobađanju. Dobijeni rezultati ukazuju da su profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz formulacija F2, F4, F5, F8, F14 međusobno slični. Takođe, međusobno slične profile imaju formulacije F7, F9, F10 i F11; formulacije F1 i F3; kao i formulacije F6 i F12.

**Tabela 4.6.** Poređenje profila brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta (F1-F14) i komercijalnih tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida (F15) izračunavanjem faktora sličnosti ( $f_2$ )

$f_2$	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15
<b>F1</b>	/	38	64	33	37	43	46	31	46	52	46	39	17	34	11
<b>F2</b>	38	/	34	65	91	26	64	58	61	54	63	25	12	70	7
<b>F3</b>	64	34	/	30	33	51	41	28	41	45	40	45	20	31	12
<b>F4</b>	33	65	30	/	70	23	50	81	49	44	50	22	10	84	6
<b>F5</b>	37	91	33	70	/	26	60	61	58	51	59	24	11	75	7
<b>F6</b>	43	26	51	23	26	/	30	22	31	33	30	66	23	24	15
<b>F7</b>	46	64	41	50	60	30	/	46	76	71	78	28	14	52	8
<b>F8</b>	31	58	28	81	61	22	46	/	45	41	46	21	10	71	6
<b>F9</b>	46	61	41	49	58	31	76	45	/	76	87	28	13	51	8
<b>F10</b>	52	54	45	44	51	33	71	41	76	/	73	30	14	46	9
<b>F11</b>	46	63	40	50	59	30	78	46	87	73	/	28	13	52	8
<b>F12</b>	39	25	45	22	24	66	28	21	28	30	28	/	26	22	17
<b>F13</b>	17	12	20	10	11	23	14	10	13	14	13	26	/	10	29
<b>F14</b>	34	70	31	84	75	24	52	71	51	46	52	22	10	/	6
<b>F15</b>	11	7	12	6	7	15	8	6	8	9	8	17	29	6	/

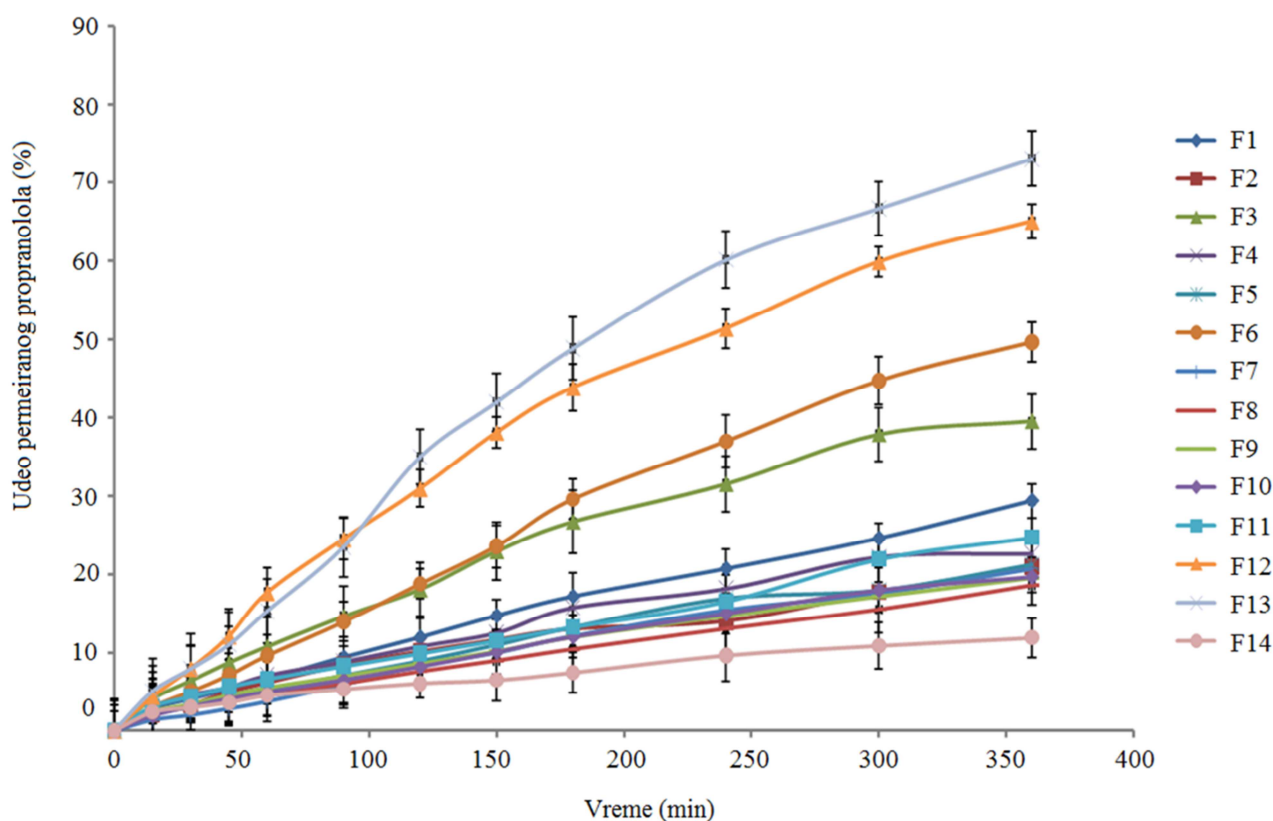
 profili se smatraju sličnim

 profili se međusobno razlikuju

#### 4.1.1.10 Ispitivanje brzine permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta

Izvedeno je ispitivanje permeacije propranolol-hidrohlorida kako bi se procenio mogući uticaj faktora formulacije na permeaciju propranolol-hidrohlorida kroz veštačku membranu. Drugim rečima, ova ispitivanja je omogućilo da se ispita u kojoj meri faktori formulacije utiču na permeaciju propranolol-hidrohlorida zbog toga što propranolol-hidrohlrid pripada grupi I Biofarmaceutikog sistema klasifikacije. U ovom slučaju, moguće razlike u profilima permeacije propranolola ukazivale bi na uticaj faktora formulacije - koncentracije i vrste polimera.

Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine permeacije propranolol-hidrohlorida iz izrađenih MBT prikazani su na Slici 4.12. Na osnovu njih zaključuje se da se najveći stepen permeacije propranolola ostvaruje iz formulacije F13 (sadrži najveći udeo PVA) koja je istovremeno pokazala i najbrže rastvaranje propranolol-hidrohlorida. Najniži stepen permeacije propranolola primećen je kod formulacije F14 (sadrži najveći udeo CB). Rezultati ispitivanja permeacije bili su u dobroj korelaciji sa rezultatima koji su dobijeni u ispitivanjima brzine rastvaranja lekovite supstance. Drugim rečima, što je brže oslobađanje lekovite supstance, to je veća brzina permeacije lekovite supstance kada je supstanca visoko rastvorljiva poput propranolol-hidrohlorida. Ovo je naznačeno visokim vrednostima koeficijenta korelacije ( $R^2$ ) između udela rastvorene i permeirane lekovite supstance, koje su se kretale između 0,9052 i 0,9936. Formulacija F13 je odstupila od ovog opsega ( $R^2 = 0,6432$ ), što se može objasniti činjenicom da je F13 jedina formulacija sa trenutnim oslobađanjem, pa je brzina rastvaranja lekovite supstance znatno veća nego brzina permeacije propranolola.



Slika 4.10. *In vitro* profili brzine permeacije propranolola iz mukoadhezivnih bukalnih tableta.

Efekti ispitivanih faktora formulacije i njihovih interakcija na količinu permeiranog propranolola posle 180 min ( $Y_{180\text{min}}$ ), kao i njihova statistička značajnost, procenjeni su korišćenjem statističkog testa ANOVA. Reprezentativna konačna jednačina 4.9, dobijena za zavisnu varijablu  $Y_{180\text{min}}$ , prikazana je u nastavku u svom kodiranom obliku:



$$Y_{180\text{min}} = 22,06A + 32,52B - 36,74C - 80,88AC - 91,62BC$$

4.9

Generisani model za obim permeacije propranolola je značajan, a visoke vrednosti  $R^2$  i prilagođenog  $R^2$  ukazuju da je  $Y_{180\text{min}}$  dobro opisan predloženim modelom (0,9854; 0,9623; respektivno). Iz [jednačine 4.9](#) se može videti da na obim permeacije propranolola značajno utiču tri odabrana polimera (A, B, C), interakcija između PEO i CB (AC) i PVA i CB (BC). Pomenute značajne interakcije utiču na smanjenje obima permeacije propranolola, na šta ukazuje negativni predznak ispred koeficijenata interakcija. Na osnovu vrednosti koeficijenata, može se zaključiti da je interakcija PVA i CB pokazala najveći efekat na obim permeacije propranolola, nakon čega sledi PEO i CB interakcija, zatim koncentracija CB, koncentracija PVA i, na kraju, koncentracija PEO polimera. Drugim rečima, ovo implicira da ako se udeo CB poveća, procenat permeiranog leka će se smanjiti, kao i njegova brzina oslobađanja, jer je to polimer koji je prisutan u obe uočene negativne interakcije. To je, istovremeno, polimer koji ima najveći pozitivni efekat na silu mukoadhezije MBT. Zbog toga je važna optimizacija farmaceutskog oblika leka kako bi on zadovoljio ciljni profil kvaliteta proizvoda.

## 4.2 Rezultati i diskusija druge faze istraživanja

### 4.2.1 Ispitivanje variranja mase mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova i ujednačenosti sadržaja propranolol-hidrohlorida u mukoadhezivnim bukalnim tabletama i filmovima

Rezultati ispitivanja uniformnosti mase MBT i MBF i sadržaja lekovite supstance kao kritičnih atributa kvaliteta mukoadhezivnih bukalnih farmaceutskih oblika lekova prikazani su u [Tabeli 4.7](#). Uzorci MBT su zadovoljili farmakopejski zahtev u pogledu variranja mase, jer nijedna pojedinačna masa MBT nije odstupala za više od 10% od izračunate srednje vrednosti mase 20 ispitivanih uzoraka tableta. I ispitivani uzorci MBF su takođe zadovoljili farmakopejski zahtev (Ph. Eur. 11.0, poglavlje 2.9.5) u pogledu variranja mase filmova, pri primeni kriterijuma koje je namenjeno za ispitivanje malih tableta, u nedostatku priznatih kriterijuma za oralne filmove. Tako nijedna pojedinačna masa MBF nije odstupala za više od 10% izračunate srednje vrednosti mase 20 ispitivanih uzoraka filmova.

Sadržaj propranolol-hidrohlorida je dobro korelirao sa procenjenim teorijskim sadržajem od 10 mg ([Tabela 4.7](#)). Ispitivane MBT i MBF su zadovoljili farmakopejski zahtev u pogledu ujednačenosti sadržaja propranolol-hidrohlorida jer je sadržaj propranolol-hidrohlorida u svakoj MBT, odnosno MBF pojedinačno bio u okviru dozvoljenog intervala 85-115% od srednje vrednosti sadržaja.

**Tabela 4.7.** Kritični atributi kvaliteta izrađenih mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova

Farmaceutski oblik	Uzorak	Masa (mg) <sup>a</sup>	Broj tableta/filmova izvan limita (90-110%)	Sadržaj propranolol-hidrohlorida (mg) <sup>b</sup>	Broj tableta/filmova izvan limita (85-115%)
Mukoadhezivne bukalne tablete	F1	25,901 ± 0,716	/	8,692 ± 0,466	/
	F2	25,442 ± 0,688	/	9,361 ± 0,604	/
	F3	25,594 ± 0,464	/	9,743 ± 0,666	/
Mukoadhezivni bukalni filmovi 1 × 1 cm	F1	48,523 ± 3,093	/	10,746 ± 0,679	/
	F2	51,277 ± 3,053	/	10,576 ± 0,498	/
	F3	49,925 ± 2,115	/	10,378 ± 0,618	/

<sup>a</sup> srednja vrednost ± SD (n = 20)

<sup>b</sup> srednja vrednost ± SD (n = 10)

### 4.2.2 Ispitivanje friabilnosti i zetezne čvrstine mukoadhezivnih bukalnih tableta

Najznačajnija mehanička svojstva mukoadhezivnih bukalnih tableta su zatezna čvrstina i friabilnost, tj. otpornost tableta na habanje, koji su prepoznati kao fizički atributi kvaliteta MBT. Friabilnost MBT je procenjena u skladu sa preporukama Ph. Eur. 11, pri čemu je farmakopejski prihvatljiva vrednost za gubitak mase nakon okretanja u bunju 1%. Ispitivane MBT su zadovoljile ovaj farmakopejski zahtev, a određena friabilnost je bila je 0,22% (F1); 0,37% (F2) i 0,24% (F3).

Izmerena vrednost otpornosti na lomljenje MBT je bila 50,4 ± 14,91 N (F1); 53,16 ± 13,3 N (F2) i 48,16 ± 6,37 N (F3). Na osnovu izerene otpornosti na lomljenje i debljine MBT (4 mm) izračunata je zatezna čvrstina izrađenih MBT. Zatezna čvrstina MBT je bila 2,67 ± 0,79 MPa (F1); 2,82 ± 0,71 MPa (F2) i 2,55 ± 0,34 MPa (F1).

### 4.2.3 Ispitivanje mehaničkih svojstava mukoadhezivnih bukalnih filmova

Jedan od izazova pri razvoju novih (mukoadhezivnih) formulacija filmova je nedostatak uspostavljenih i usklađenih metoda za određivanje mehaničke čvrstine i drugih kritičnih atributa filmova. Ne postoji pravi odgovor na to kolika bi trebalo da bude zatezna čvrstina ili izduženje pri kidanju bukalnog filma. Evropska farmakopeja navodi da je potrebno preduzeti mere „*kako bi se osiguralo da mukoadhezivne bukalne tablete ili bukalni filmovi poseduju odgovarajuću mehaničku čvrstoću kako bi se odupreli rukovanju bez krunjenja ili lomljenja*“ bez navođenja bilo kakvih daljih numeričkih vrednosti ili metoda za njihovo dobijanje [5].

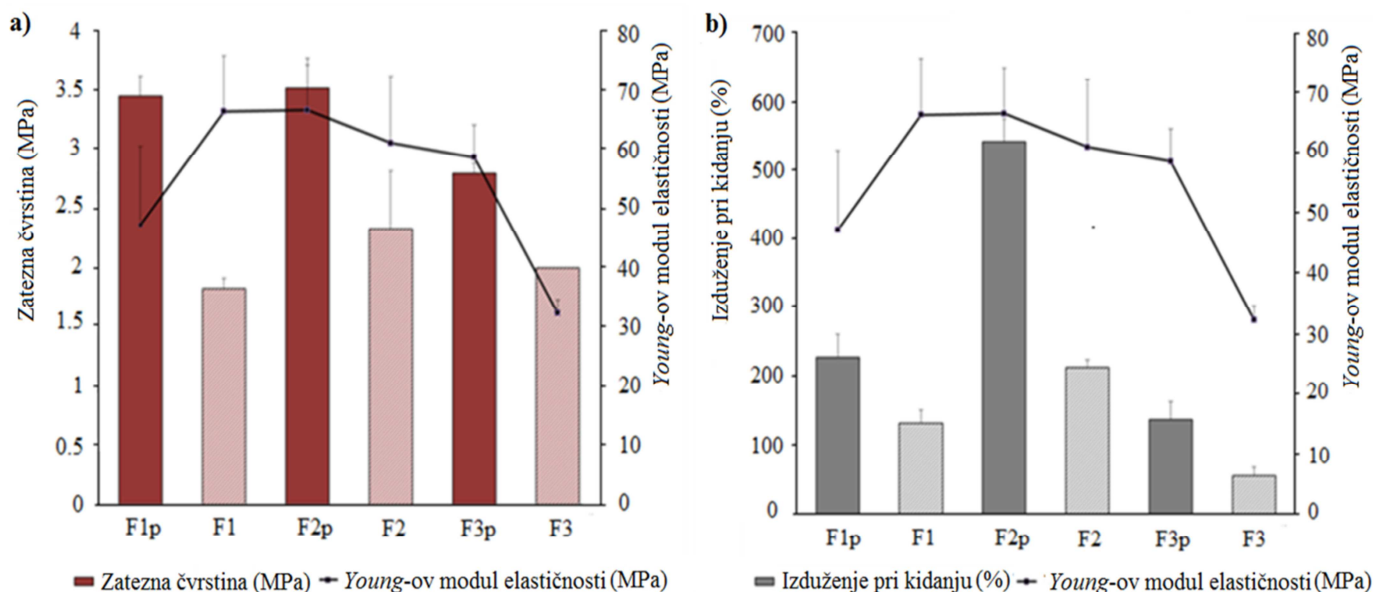
Mehanička svojstva filmova procenjena određivanjem zatezne čvrstine, izduženja pri kidanju i *Young*-ovog modula elastičnosti. Ova tri parametra predstavljaju fizičke attribute kvaliteta MBF koji su izračunati na osnovu dobijene krive odnosa napon-deformacija (engl. *stress-strain*) i sila-pomeraj (engl. *force-distance*).

Mehanička čvrstina je jedan od kritičnih atributa kvaliteta mukoadhezivnih bukalnih filmova i značajna je kako zbog procesa izrade i pakovanja, tako i tokom upotrebe od strane pacijenta. Mukoadhezivni bukalni filmovi moraju biti fleksibilni i dovoljno čvrsti da ne puknu i ne raspadnu se. Međutim, ni prevelika fleksibilnost nije poželjna jer može izazvati raspadanje i gubitak fizičkog oblika. Kada su u pitanju MBF, nema definisanih preporučenih vrednosti za zateznu čvrstinu, izduženje pri kidanju i *Young*-ov modul elastičnosti. Podaci iz literature sugerišu da je poželjno da MBF imaju relativno visoku zateznu čvrstinu (2 MPa i više) i izduženje pri kidanju (10% i više od toga), a nizak *Young*-ov modul elastičnosti (ne veće od 400 MPa) [83,224].

Rezultati ispitivanja zatezne čvrstine, izduženja pri kidanju i *Young*-ovog modula elastičnosti MBF kao fizičkih atributa kvaliteta prikazani su na [Slici 4.13](#). Svi ispitivani filmovi bili su dovoljno mehanički otporni i lako su se skidali sa staklene površine bez oštećenja što je dovoljno za mehaničke manipulacije. Dobijeni podaci jasno pokazuju da se inkorporiranjem propranolol- hidrohlorida u filmove smanjila njihovu zatezna čvrstina. Ovaj rezultat se objašnjava činjenicom da čestice ugrađene u polimerni film ometaju kontinuitet matrice polimera koji formira film, što dovodi do smanjenja zatezne čvrstine filma [225]. Prisustvo propranolol-hidrohlorid sa udelom od 20% m/m imao je značajan uticaj na smanjenje izduženja pri prekidu, pa se može zaključiti da je dodavanje lekovite supstance smanjilo fleksibilnost i elastičnost filmova u sve tri formulacije filmova. Izduženje pri kidanju filmova sa lekovitom supstancom iznosilo je između 70% i 200%. Ovako visoke vrednosti ukazuju na to da su filmovi elastični i fleksibilni. Visoka fleksibilnost i elastičnost filma može biti korisna u pogledu palatabilnih svojstava povezanih sa bukalnom primenom. Svi filmovi su pokazali niske vrednosti *Young*-ovog modula elastičnosti, u rasponu od 30 MPa do 80 MPa, što ukazuje da filmovi nisu lomljivi i pokazuju visoku otpornost na deformacije. Inkorporiranje propranolol-hidrohlorida je smanjilo *Young*-ov modul elastičnosti, izuzev u slučaju formulacije F1. Smanjenje *Young*-ovog modula elastičnosti ukazuje da je došlo do smanjenja čvrstine i krutosti filma. Izrađeni MBF poseduju visoke vrednosti zatezne čvrstine, izraženu elongaciju i niske vrednosti *Young*-ovog modula elastičnosti, tako da su formirani fleksibilni filmovi, laki za nanošenje i rukovanje, kao i fizički stabilni.

Dobijeni rezultati mehaničkih karakteristika filmova su u skladu sa podacima iz literature za MBF različitog sastava [101,224,226,227]. Pripremljeni MBF imaju prihvatljiva mehanička svojstva za bukalnu isporuku lekovite supstance, posebno sa aspekta dovoljne čvrstine, elastičnosti i fleksibilnosti.

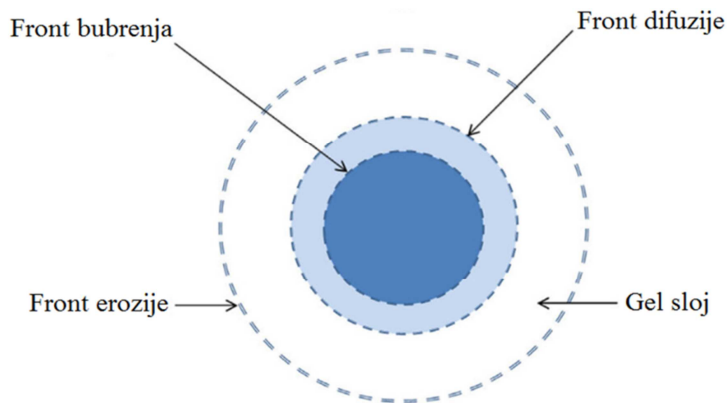
Literaturni podaci koji se odnose na mehanička svojstva komercijalno dostupnih oralno-disperzibilnih filmova određenih testom punkcije pokazuju da takve formulacije imaju punkcionu čvrstina (engl. *puncture strength*) u intervalu od  $0,08 \pm 0,01$  do  $0,40 \pm 0,09$  N/mm<sup>2</sup> i izduženje pri kidanju  $1,03 \pm 0,21\%$  do  $6,54 \pm 0,89\%$  [83]. Pretpostavlja se da proizvodi koji se prometuju imaju prihvatljiva mehanička svojstva, što su autori ove publikacije potvrdili kroz rukovanje bez oštećenja. Može se zaključiti da oralno-disperzibilni filmovi mogu imati niže vrednosti izbuženja pri kidanju i punkcione čvrstine. Ipak, treba istaći da bukalni filmovi imaju drugačiji vid primene te da je poželjno da budu elastičniji kako bi se omogućila adhezija za bukalnu sluzokožu i pokreti vilice (pričanje, gutanje) bez rizika za odvajanje bukalnog filma.



**Slika 4.13.** Fizički atributi kvaliteta mukoadezivnih bukalnih filmova (placebo formulacije filmova: F1p, F2p, F3p i filmovi sa propranolol-hidrohloridom: F1, F2 i F3): (a) kombinovani prikaz zatezne čvrstine i *Young*-ovog modula elastičnosti; (b) kombinovani prikaz izduženja pri kidanju i *Young*-ovog modula elastičnosti.

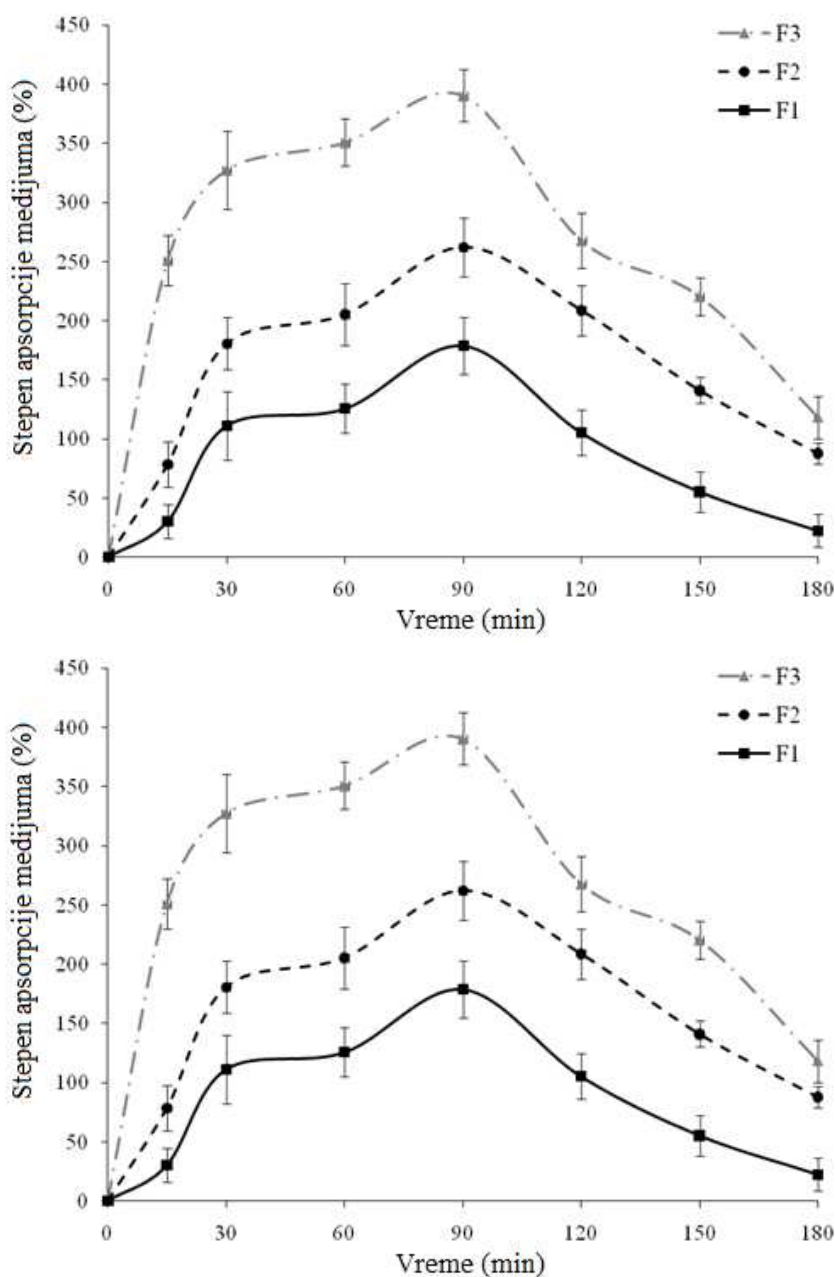
#### 4.2.4 Ispitivanje stepena bubrenja mukoadezivnih bukalnih tableta i filmova

Mukoadezivni polietilenoksidni polimer koji je odabran za formulaciju MBT odlikuje se sposobnošću apsorbovanja vode i visokim stepenom bubrenja koje ne zavisi od pH vrednosti i jonske jačine. Dobro je poznato da izabrani polimer igra važnu ulogu u određivanju trajanja produženog oslobađanja gde centralno mesto u oslobađanju lekovite supstance zauzimaju bubrenje i erozija polimera. Kada se hidrofilna matriks tableta izloži vodenom medjumu, suvi polimer počinje da se hidratiše i oko suvog jezgra tablete dolazi do formiranja viskoznog gel sloja kroz koji difunduje lekovita supstanca. Na taj način hidratacija polimernih lanaca dovodi do formiranja gel sloja koji usporava oslobađanje lekovite supstance iz matriks tableta. U toku rastvaranja hidrofilne matriks tablete razlikuju se suvo stanje i sloj gela (engl. dry state and the gel layer), koji se označavaju kao front bubrenja, a drugi front, front erozije, koji odvaja gel sloj i okolni medijum za oslobađanje (Slika 4.14) [228].



**Slika 4.14.** Zone u hidrofilnoj matriks tableti u toku procesa rastvaranja

Stepen bubrenja izrađenih MBT i MBF prikazan je na [Slici 4.15](#). Za sve tri formulacije MBT na bazi hidrofilnog polimera PEO ispitana je sposobnost apsorpcije medijuma, izraženo kao stepen bubrenja ili stepen apsorpcije medijuma. Tako su nakon 30 minuta bubrenja u veštačkoj salivi, sve tri formulacije MBT apsorbovale su više od 100% veštačke salive (računato u odnosu na početnu masu tablete). Zbog prelaska hidrofilnih polimera u gelirano stanje tokom bubrenja, došlo je do postepene erozije tableta. Nakon 90 min ispitivanja, erozija je imala prednost u odnosu na bubrenje. Nakon 90 min bubrenja, najveći stepen apsorpcije veštačke salive (390,27%) određen je u uzorcima formulisanim sa 35% PEO (F3). Postoji tendencija da formulacija sa višom koncentracijom hidrofilnih polimera ima veću sposobnost apsorbovanja medijuma. Kapacitet formulacije da apsorbuje medijum je važan parametar polimernih farmaceutskih oblika koji treba posebno razmotriti u slučaju modifikovanog oslobađanja lekovite supstance na/kroz površinu sluznice. Osim toga, proces adhezije na sluznicu nastaje ubrzo nakon bubrenja i zavisi od stepenu hidratacije [229].



**Slika 4.15.** Stepen bubrenja izrađenih (a) mukoadhezivnih bukalnih tableta i (b) mukoadhezivnih bukalnih filmova

#### 4.2.5 Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova

Sila odvajanja, odnosno jačina vezivanja je kritični atribut kvaliteta mukoadhezivnih farmaceutskih oblika lekova. Mukoadhezivna svojstva izrađenih MBT i MBF su procenjena merenjem sile odvajanja (sile pri kojoj dolazi do razdavanja veze između mukoadhezivnog bukalnog farmaceutskog oblika leka i diska mucina, odnosno disperzije mucina) na analizatoru teksture (Slika 3.2 i 3.5) i izračunavanjem jačine vezivanja.

Sila odvajanja za bukalne tablete sa 35% PEO (F3) polimera od diska mucina bila je  $832 \pm 160$  mN. U slučaju bukalnih tableta sa 25% PEO (F2) polimera, izmerena sila adhezije je iznosila  $680 \pm 53$  mN, dok je za bukalne tablete sa 15% PEO (F1) polimera izmerena sila iznosila  $567 \pm 50$  mN. Na osnovu izmerenih vrednosti sile odvajanja, primenom jednačine 1.7, određena je jačina vezivanja za izrađene tri formulacije MBT: (F3  $2940 \pm 570$  N/cm<sup>2</sup>; F2:  $2410 \pm 190$  N/cm<sup>2</sup>; F1:  $2010 \pm 180$  N/cm<sup>2</sup>). Jačina vezivanja uzima u obzir dimenzije tableta, pa se ovaj parametar može koristiti za pređenje mukoadhezije između farmaceutskih oblika različitih dimenzija. Može se primetiti da se sa povećanjem sadržaja polimera u formulaciji povećava i stepen hidratacije i broj linearnih lanaca koji formiraju jaku međusobno prožimanje mrežu sa mucinom, uglavnom zbog formiranja slabih veza i Van der Walsovih sile, vodoničnih veza ili elektrostatičkih interakcija [230]. Ovi rezultati su u skladu sa ranijom publikacijom koja je pokazala superiornost PEO polimera u odnosu na HPMC polimere u pogledu mukoadhezivnih svojstava bukalnih tableta sa usporenim oslobađanjem lekovite supstance [231]. ANOVA ukazuje da između ove tri formulacije MBT postoji statistički značajna razlika u izmerenoj sili adhezije ( $F(2,13) = 8,003$ ;  $p = 0,007$ ). Bonferroni post hoc test je pokazao da postoji statistički značajna razlika između F1 i F3 ( $p = 0,006$ ), dok između F1 i F2 ( $p = 0,412$ ), i F2 i F3 ( $p = 0,162$ ) nije primećena statistički značajna razlika u sili adhezije.

Jačina vezivanja između MBF formulacije F1 sa propranolol-hidrohloridom i disperzije mucina iznosila je  $821 \pm 121$  mN/cm<sup>2</sup>;  $876 \pm 105$  mN/cm<sup>2</sup> za formulaciju F2, i  $657 \pm 130$  mN/cm<sup>2</sup> za formulaciju F3. U slučaju placebo filmova F1, F2 i F3, određene jačine vezivanja su bile  $937 \pm 124$  mN/cm<sup>2</sup>;  $956 \pm 55$  mN/cm<sup>2</sup>; i  $831 \pm 113$  mN/cm<sup>2</sup> respektivno. U ovom slučaju, inkorporiranje lekovite supstance u film dovelo je do smanjenja mukoadhezivnosti, ali treba napomenuti da je uticaj različitih vrsta i koncentracija lekovitih supstanci na mukoadheziju teško predvidljiv [190]. Uočeno smanjenje sile adhezije bilo je između 8% (F2) i 20% (F3). MBF formulacije F2 sa najvećim sadržajem PEO polimera (3,5%) pokazao je najveću silu adhezije, odnosno jačinu vezivanja, a time i najbolja mukoadhezivna svojstva, dok je formulacija F3 sa najvećim sadržajem HPMC pokazala najmanju silu adhezije.

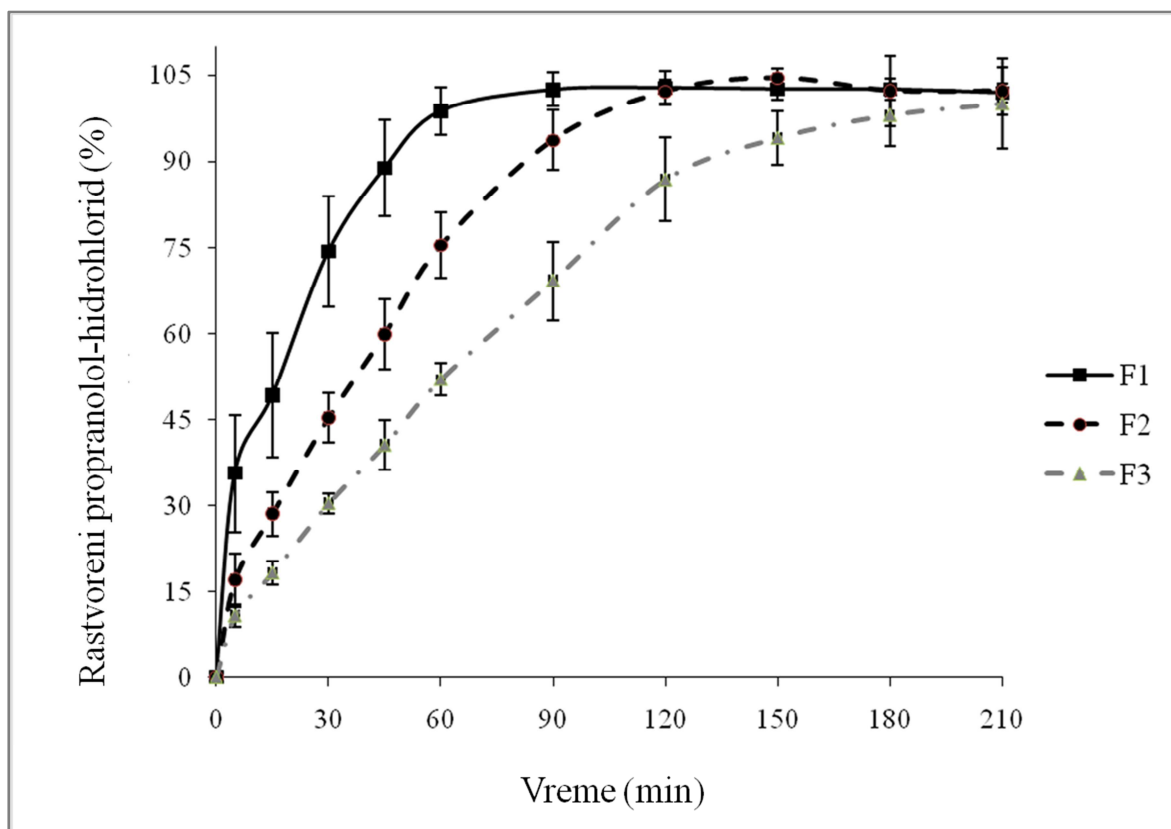
Na osnovu rezultata zaključuje se da koncentracija PEO polimera pozitivno utiče na silu odvajanja, odnosno jačinu vezivanja farmaceutskog oblika leka. Tako sa povećanjem udela PEO polimera u formulaciji farmaceutskog oblika dolazi do porasta sile adhezije. Izmerene vrednosti jačine vezivanja bile su veće u slučaju MBT u poređenju sa MBF, što je najverovatnije posledica merenja sile adhezije za različite vrste supstrata bukalne sluzokože.

#### 4.2.6 Ispitivanje brzine rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta

Profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBT koje sadrže različite udele mukoadhezivnog polimera prikazani su na Slici 4.16 kao srednje vrednosti sa standardnom devijacijom. Posle 30 min, približno 75% propranolol-hidrohlorida je oslobođeno iz formulacije F1, dok se 45% oslobodilo iz formulacije F2 i 30% iz formulacije F3. Nakon 60 min ispitivanja 50% propranolol-hidrohlorida se oslobodilo iz formulacije 3, dok se za isto vreme oslobodilo oko 98% iz formulacije F2 i oko 75% propranolol-hidrohlorida iz formulacije F3. Kompletno oslobađanje propranolol-hidrohlorida iz formulacije F1, koja sadrži najniži odabrani udeo mukoadhezivnog polimera, postignuto je nakon 90 min ispitivanja. Sa povećanjem sadržaja PEO polimera u formulaciji, oslobađanje propranolol-

hidrohlorida je bilo sporije. Tako se kompletno oslobađanje leka iz formulacije F2 postiglo nakon 120 min, odnosno 180 min u slučaju formulacije F3.

Poređenje dobijenih profila brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida izračunavanjem faktora sličnosti ( $f_2$ ) je pokazalo da se profili brzine rastvaranja lekovite supstance za formulacije F1 i F2 ( $f_2 = 39$ ), F1 i F3 ( $f_2 = 27$ ) i F2 i F3 ( $f_2 = 42$ ) međusobno razlikuju. Ovaj rezultat se može objasniti uticajem koncentracije PEO polimera koji se koristi kao mukoadhezivna supstanca, ali i kao supstanca koja kontroliše brzinu oslobađanja lekovite supstance.



**Slika 4.16.** Profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta formulacija F1-F3

Uporednom analizom podataka se može zaključiti da je brzina rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBT obrnuto srazmerna stepenu bubrenja, pa su tako MBT sa 15% m/m PEO polimera (F1) apsorbivale najmanju količinu vode i najbrže oslobodile propranolol-hidrohlorid. Formulacije sa većim udelom PEO polimera (F2 i F3) sporije bubre, apsorbuju veću količinu vode, što sve zajedno dovodi do usporavanja brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida.

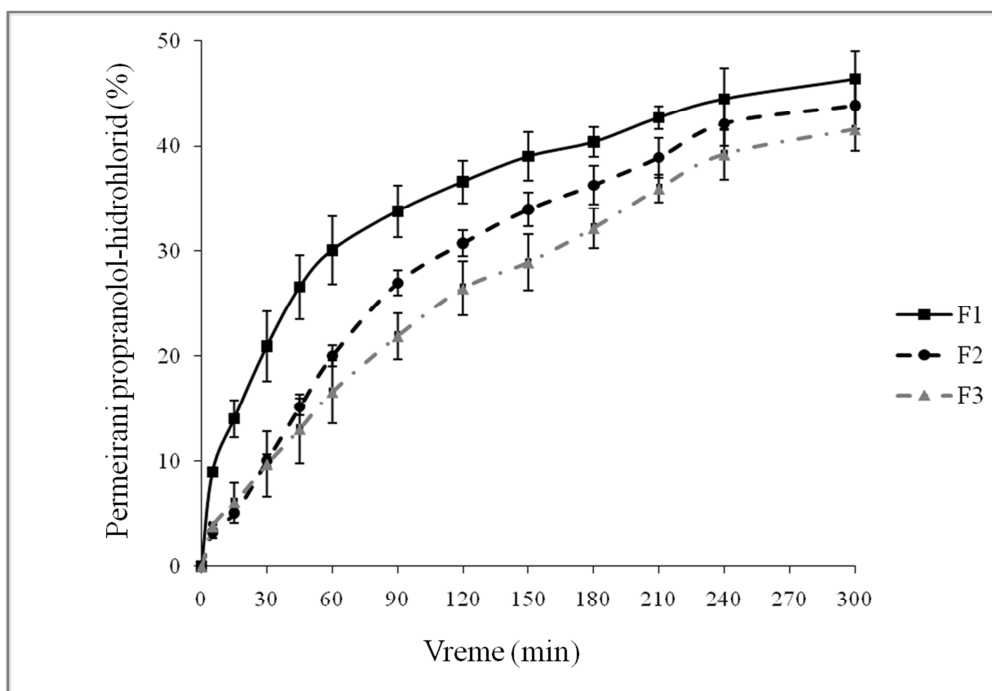
Profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBT analizirani su primenom različitih matematičkih modela u cilju boljeg razumevanja mehanizama oslobađanja lekovite supstance. Primenjeni su sledeći modeli: *Higuchi*, *Korsmeyer-Peppas*, *Peppas-Sahlin* i kinetika prvog reda. Izračunati parametri kinetike brzine oslobađanja propranolol-hidrohlorida iz MBF prikazani su u [Tabeli 4.8](#).

Visoke vrednosti  $R^2$  i najniže AIC vrednosti ukazuju da su profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBT našli najbolje slaganje sa *Peppas-Sahlin modelom*, što znači da oslobađanju lekovite supstance doprinose procesi difuzije i erozije. Ovakav zaključak ide u prilog teorijskom objašnjenju da kod hidrofilnih matriks sistema preovlađuje bimodalno oslobađanje, koje kombinuje procese difuzije i erozije.

**Table 4.8.** Kinetički parametri procesa oslobađanja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta dobijeni primenom različitih matematičkih modela

Matematički modeli i njegovi parametri		Formulacija		
		F1	F2	F3
<i>Higuchi</i>	$k_H$	10,470	9,067	7,174
	$R^2$	0,817	0,982	0,958
	AIC	70,316	50,083	55,375
<i>Peppas-Sahlin</i>	$kR/ kF $	0,049	0,026	0,195
	$m$	0,45	0,45	0,45
	$R^2$	<b>0,981</b>	<b>0,980</b>	<b>0,995</b>
	AIC	<b>53,975</b>	<b>54,991</b>	<b>39,346</b>
<i>Korsmeyer-Peppas</i>	$k_{KP}$	17,114	8,337	3,329
	$n$	0,426	0,528	0,668
	$R^2$	0,737	0,976	0,995
	AIC	75,589	54,582	38,650
<i>Kinetika prvog reda</i>	$k$	0,061	0,027	0,012
	$R^2$	0,968	0,971	0,976
	AIC	54,629	54,612	50,460

*In vitro* ispitivanje permeacije propranolol-hidrohlorida omogućilo je da se proceni u kojoj meri sadržaj polimera, kao faktor formulacije, utiče na permeaciju propranolol-hidrohlorida. Profili brzine permeacije propranolol-hidrohlorida iz izrađenih MBT su prikazani na [Slici 4.17](#). Uočava se da je najveći stepen permeacije propranolol-hidrohlorida postignut iz formulacije F1, koja istovremeno pokazala najbrže rastvaranje lekovite supstance, dok je najniži stepen permeacije propranolol-hidrohlorida postignut iz formulacije F3, koja je pokazala najsporije rastvaranje propranolol-hidrohlorida. U slučaju visoko rastvorljive lekovite supstance poput propranolol-hidrohlorida, razlika u brzini permeacije propranolol-hidrohlorida je posledica uticaja koncentracije mukoadhezivni polimera.



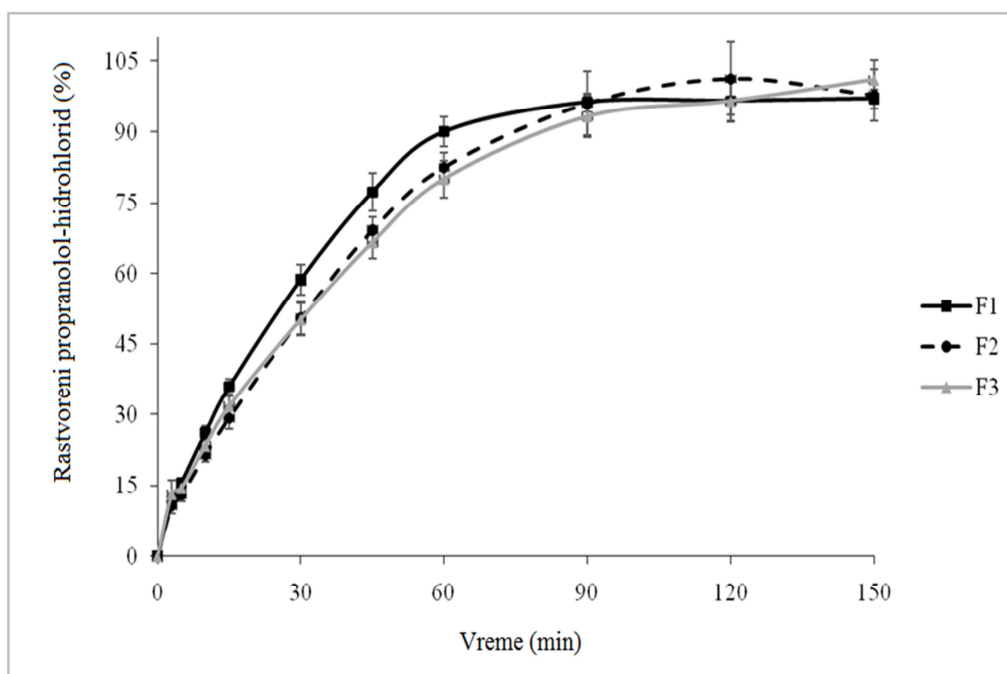
**Slika 4.17.** Profili brzine permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta formulacija F1-F3



Za dalja *in vivo* ispitivanja na eksperimentalnim životinjama odabrane su MBT formulacije F2, iz kojih se postiže srednja brzina rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida, a koje su pokazale visoku silu odvajanja, odnosno jačinu adhezije.

#### 4.2.7. Ispitivanje brzine rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih filmova

Rezultati ispitivanja *in vitro* brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih filmova, prikazani su na [Slici 4.18](#) kao srednje vrednosti procenta rastvorene lekovite supstance u jedinici vremena. Ova *in vitro* metoda ispitivanja je važna za karakterizaciju performansi farmaceutskog oblika leka jer može da pružiti uvid u *in vivo* performanse leka. Količina oslobođenog propranolol-hidrohlorida iz sve tri ispitivane formulacije MBF bila je preko 80% nakon 60 minuta ispitivanja. Celokupna količina propranolol-hidrohlorida se oslobodila za 120 minuta. Na osnovu izračunatih vrednosti faktora sličnosti ( $f_2$ ), zaključuje se da su profili brzine rastvaranja iz formulacija F1 i F2 ( $f_2 = 64$ ), F1 i F3 ( $f_2 = 62$ ), i F2 i F3 ( $f_2 = 78$ ) međusobno slični.



**Slika 4.18.** Profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih filmova formulacija F1-F3

Rezultati ispitivanja brzine permeacije propranolol-hidrohlorida prikazani su na [Slici 4.19](#) kao srednje vrednosti procenta permeirane lekovite supstance u jedinici vremena. Može se zaključiti da je najveći obim permeiranog propranolol-hidrohlorida postignut iz formulacije F1 (više od 45% u toku 240 minuta), koja je pokazala i najveću brzinu oslobađanja propranolol-hidrohlorida, dok je najmanji obim permeiranog propranolola postignut iz formulacije F3 (oko 40% u toku 240 minuta) koji je imao najsporiju brzinu rastvaranja propranolol hidrohlorida. Male razlike primećene u profilima brzine permeacije su posledica uticaja faktora formulacije - koncentracije polimera, dok rastvorljivost propranolol-hidrohlorida nije ograničavajući faktor za permeaciju jer spada u klasu I lekovitih supstanci prema BSK koju odlikuju visoka rastvorljivost i visoka permeabilnost [6].

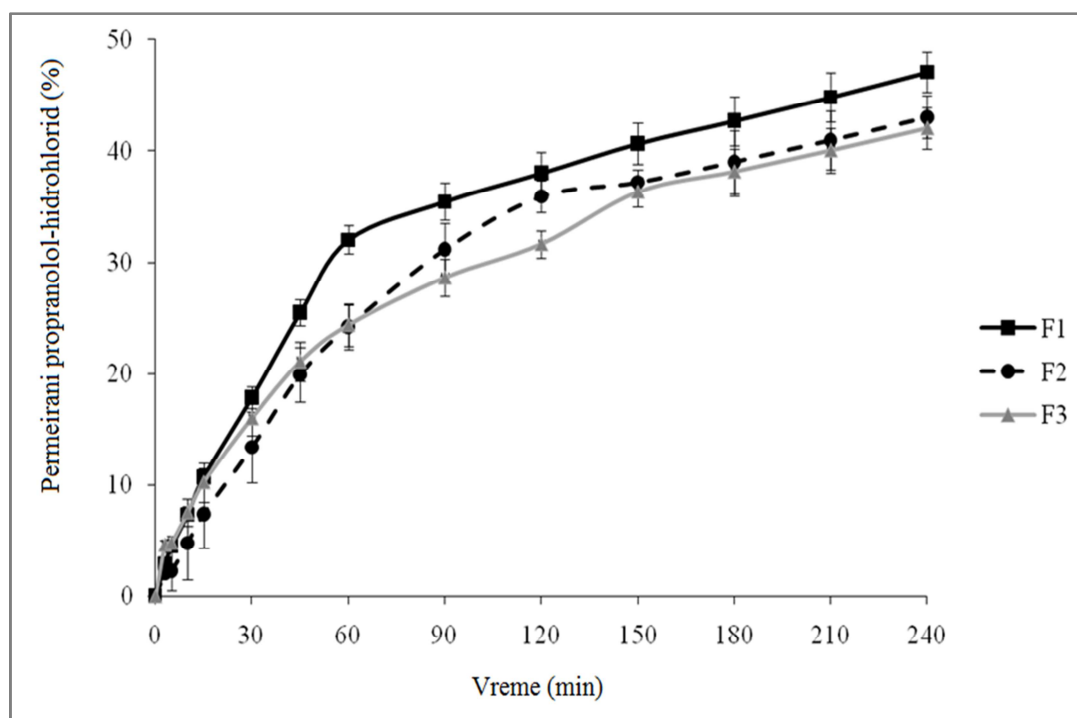
Profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBF analizirani su primenom različitih matematičkih modela u cilju boljeg razumevanja mehanizama oslobađanja lekovite supstance. Primenjeni su sledeći modeli: *Higuchi*, *Korsmeyer-Peppas*, *Peppas-Sahlin* i kinetika prvog reda.

Izračunati parametri kinetike brzine oslobađanja propranolol-hidrohlorida iz MBF prikazani su u Tabeli 4.9.

**Table 4.9.** Kinetički parametri procesa oslobađanja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih filmova dobijeni primenom različitih matematičkih modela

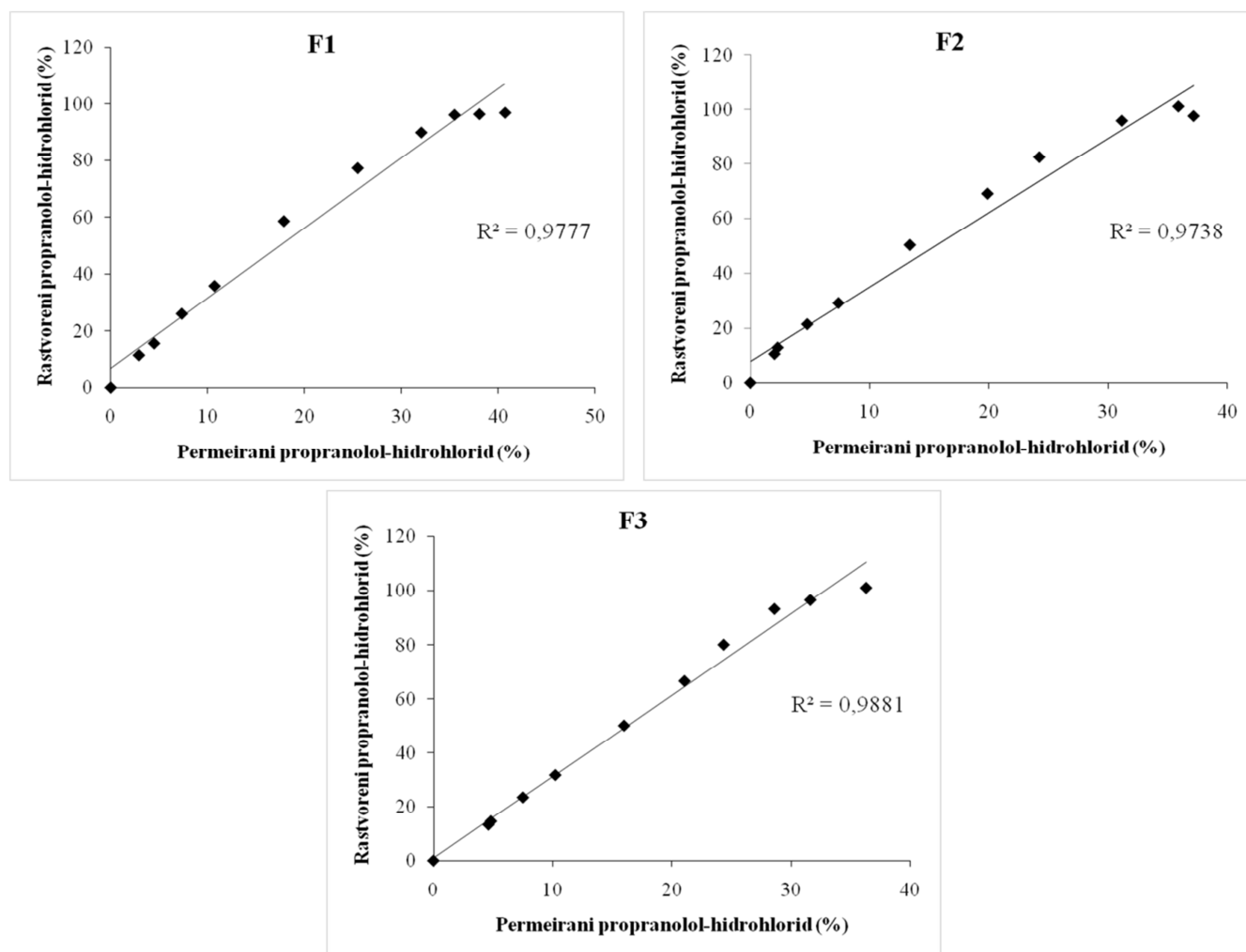
Matematički modeli i njegovi parametri		Formulacija		
		F1	F2	F3
<i>Higuchi</i>	$k_H$	9,416	9,138	9,042
	$R^2$	0,929	0,955	0,973
	AIC	78,345	73,459	66,982
<i>Peppas-Sahlin</i>	$kR/kF$	0,017	0,012	0,009
	$m$	0,450	0,450	0,450
	$R^2$	0,942	0,952	0,971
	AIC	80,058	78,460	72,004
<i>Korsmeyer-Peppas</i>	$k_{KP}$	9,388	6,644	8,620
	$n$	0,511	0,549	0,524
	$R^2$	0,919	0,925	0,961
	AIC	81,849	81,243	73,396
<i>Kinetika prvog reda</i>	$k$	0,035	0,028	0,024
	$R^2$	<b>0,993</b>	<b>0,992</b>	<b>0,993</b>
	AIC	<b>53,549</b>	<b>55,151</b>	<b>52,500</b>

Najveće vrednosti  $R^2$  i najmanje AIC vrednosti prikazane u Tabeli 4.9 ukazuju da su profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBF našli najbolje slaganje sa kinetikom prvog reda, što znači da promena koncentracije u toku vremena zavisi samo od koncentracije lekovite supstance. Lošije uklapanje profila brzine oslobađanja leka u *Higuchi*, *Peppas-Sahlin* i *Korsmeyer-Peppas* modele, pokazano je kroz niže vrednosti  $R^2$  i više AIC vrednosti .



**Slika 4.19.** Profili brzine permeacije propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih filmova formulacija F1-F3

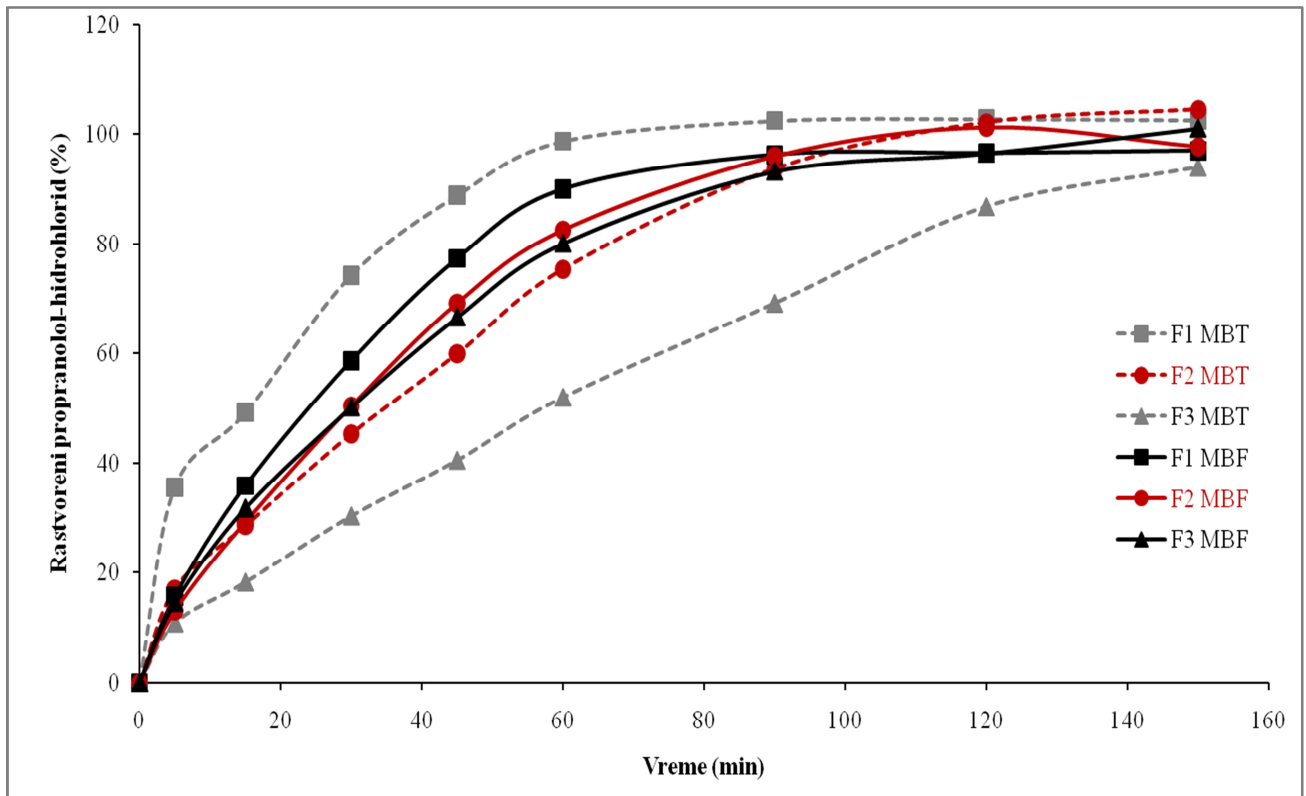
Dobijene visoke vrednosti koeficijenta korelacije ( $R^2$ ), od 0,9738 do 0,9881, ukazuju na relativno dobru linearnu zavisnost između količine rastvorenog i permeiranog propranolol-hidrohlorida (Slika 4.20). U tom smislu možemo zaključiti da se sa povećanjem količine oslobođenog propranolol-hidrohlorida povećava količina permeiranog propranolol-hidrohlorida.



**Slika 4.20.** Korelacija između količine rastvorenog i permeiranog propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih buklanih filmova formulacija F1-F3

Na osnovu analize kritičnih atributa kvaliteta gotovog proizvoda (sadržaj lekovite supstance, ujednačenost sadržaja lekovite supstance, zatezna čvrstina, izduženje pri kidanju, *Young*-ovog modula elastičnosti, jačine adhezije i profil brzine rastvaranja i permeacije) MBF formulacije F2 odabran je za dalja *in vivo* ispitivanja koja su sprovedena na spontano hipertenzivnim pacovima (SHR) *Okamoto-Aoki* soja. Rezultati pokazuju da je MBF formulacije F2 zadovoljio farmakopejski zahtev u pogledu sadržaja i ujednačenosti sadržaja lekovite supstance, pokazao najbolja mukoadhezivna i mehanička svojstva - najveća vrednost sile adhezije, zatezne čvrstine i izduženja pri kidanju, čiji je profil oslobađanja sličan ostalim ispitivanim formulacijama MBF.

U cilju poređenja i lakšeg sagledavanja dobijenih profila brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBT i MBF, profili su zbirno prikazani na Slici 4.21, dok su izračunati faktori sličnosti sumirani u Tabeli 4.10. Crvenom bojom prikazani su profili brzine rastvaranja mukoadhezivnih buklanih formulacija koje su uključene u dalja *in vivo* ispitivanja na sponatano hipertenzivnim pacovima. Profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz formulacija MBT F2 i MBF F2 su slični ( $f_2 = 64$ , Tabela 4.10).



**Slika 4.21.** Profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadezivnih bukalnih tableta (MBT) i filmova (MBF) formulacija F1-F3

**Tabela 4.10.** Poređenje profila brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadezivnih bukalnih tableta (MBT) i mukoadezivnih bukalnih filmova (MBF) formulacija F1-F3 izračunavanjem faktora sličnosti ( $f_2$ )

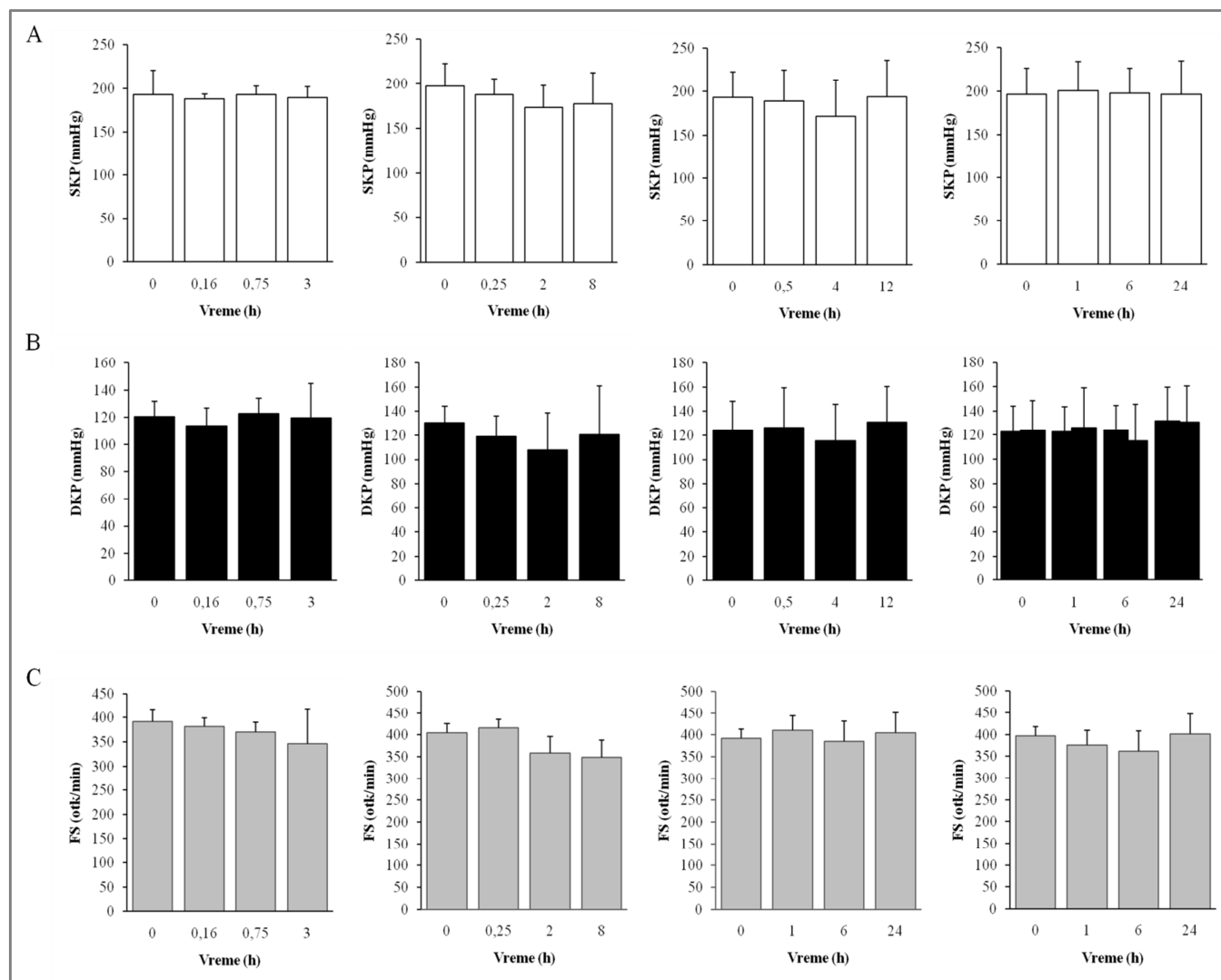
$f_2$	F1 MBT	F2 MBT	F3 MBT	F1 MBF	F2 MBF	F3 MBF
F1 MBT	/	37	24	47	40	40
F2 MBT	37	/	40	51	<b>64</b>	69
F3 MBT	24	40	/	32	36	38
F1 MBF	47	51	32	/	64	62
F2 MBF	40	<b>64</b>	36	64	/	78
F3 MBF	40	69	38	62	78	/

profili se smatraju sličnim  
 profili se međusobno razlikuju

## 4.3 Rezultati i diskusija treće faze istraživanja

### 4.3.1 Farmakokinetička i farmakodinamska studija primene MBT i MBF sa propranolol-hidrohloridom na soju pacova sa urođenom hipertenzijom

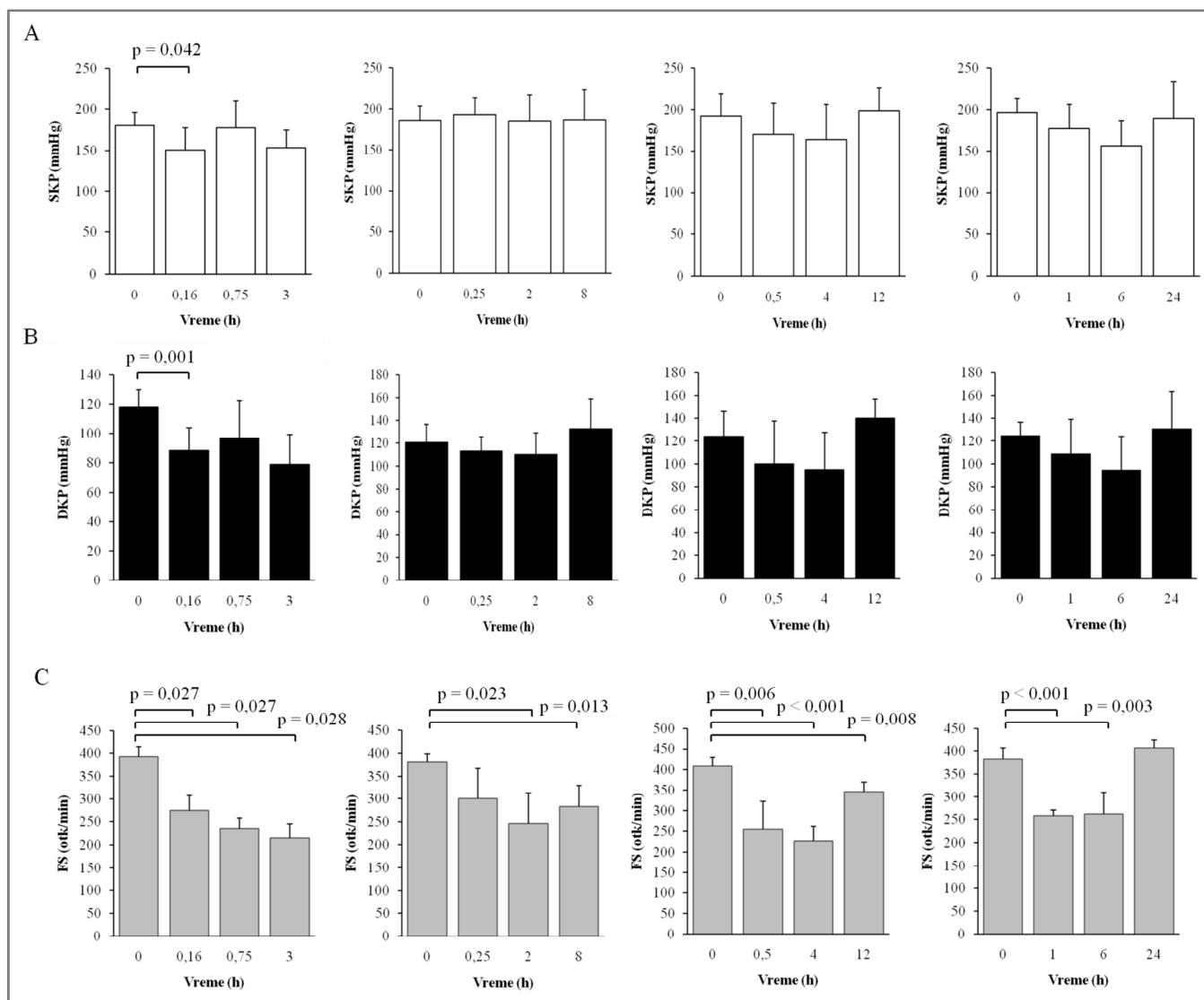
Vrednosti sistolnog krvnog pritiska (SKP), dijastolnog krvnog pritiska (DKP) i frekvence srčanih kontrakcija (FS) kod sve četiri eksperimentalne grupe pacova u svim vremanskim tačkama su prikazane na Slikama 4.22–4.25. Jednofaktorska ANOVA za ponovljena merenja je pokazala da u kontrolnoj grupi ne postoji statistički značajna razlika između hemodinamskih parametara registrovanih u početnim i ostalim vremanskim tačkama (Slika 4.22). Ovo pokazuje da upotreba anestetika nembutala nije uticala na vrednosti krvnog pritiska i FS i potvrđuje njegovu primenjivost u ovom eksperimentalnom modelu.



**Slika 4.22.** Sistemske hemodinamske parametre u kontrolnoj grupi spontano hipertenzivnih pacova: sistolni krvni pritisak (SKP) (A), dijastolni krvni pritisak (DKP) (B) i frekvencija srčanih kontrakcija (FS) (C). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnom devijacijom (n = 6)

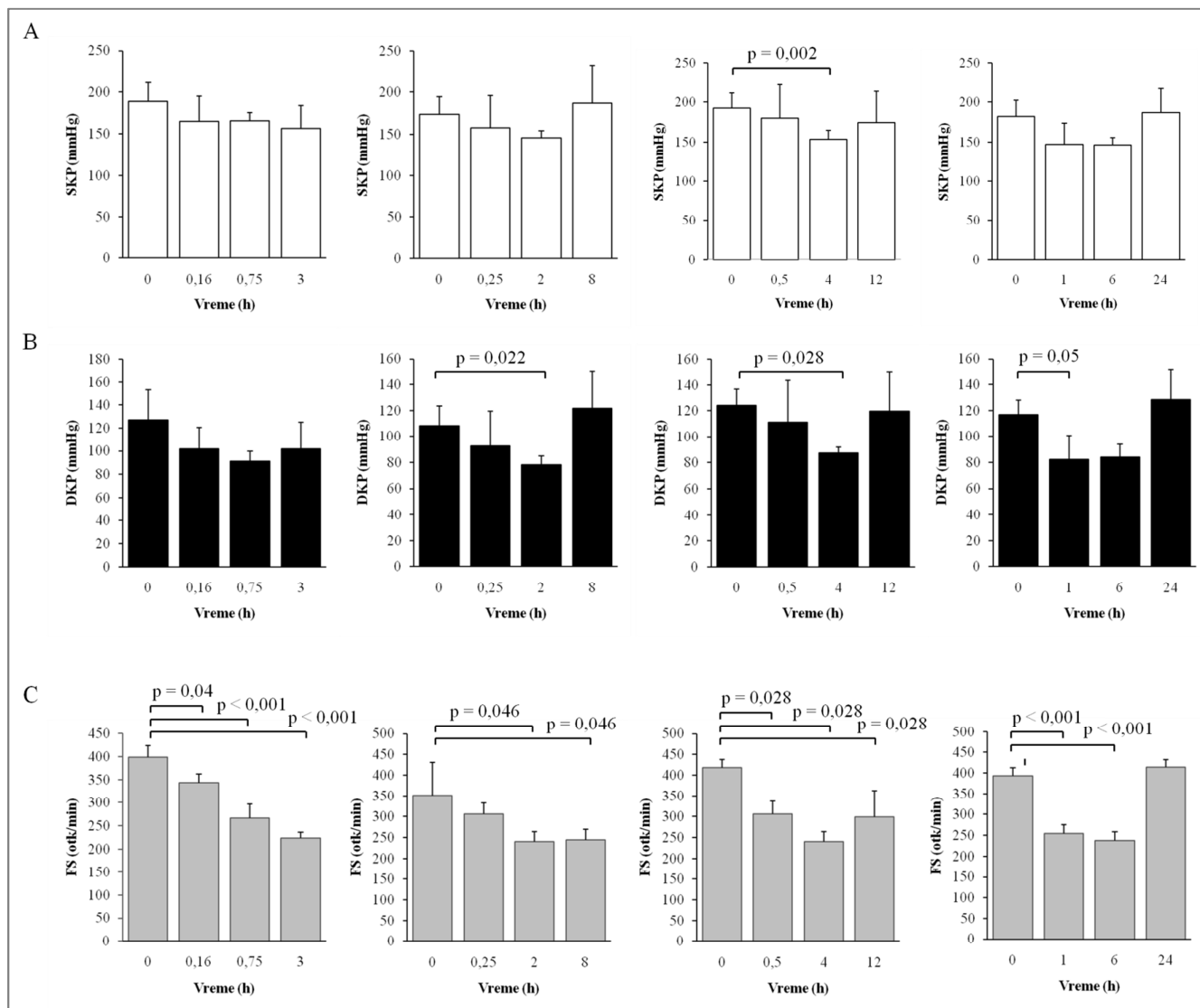
Tretman tabletom sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida doveo je do statistički značajnog smanjenja SKP ( $p = 0,042$ ) i DKP ( $p = 0,001$ ), u odnosu na početnu vremensku tačku, već nakon 10-og minuta ispitivanja (Slika 4.23A,B). Uočeno smanjenje SKP i DKP u odnosu na početnu vremensku tačku bilo je 17% i 25%, respektivno, ali kratkotrajno jer u narednim vremanskim tačkama značajnog smanjenja krvnog pritiska nije bilo (Slika 4.23A,B). Takođe, u ovoj grupi pacova primećeno

je statistički značajno smanjenje FS u poređenju sa nultom vremenskom tačkom počevši od 10-og min pa sve do 12-og sata ispitivanja (Slika 4.23C). Smanjenje FS je bilo između 16% i 45%, a najveće smanjenje vrednosti FS od 45% primećeno je u 3. i 4. satu ispitivanja.



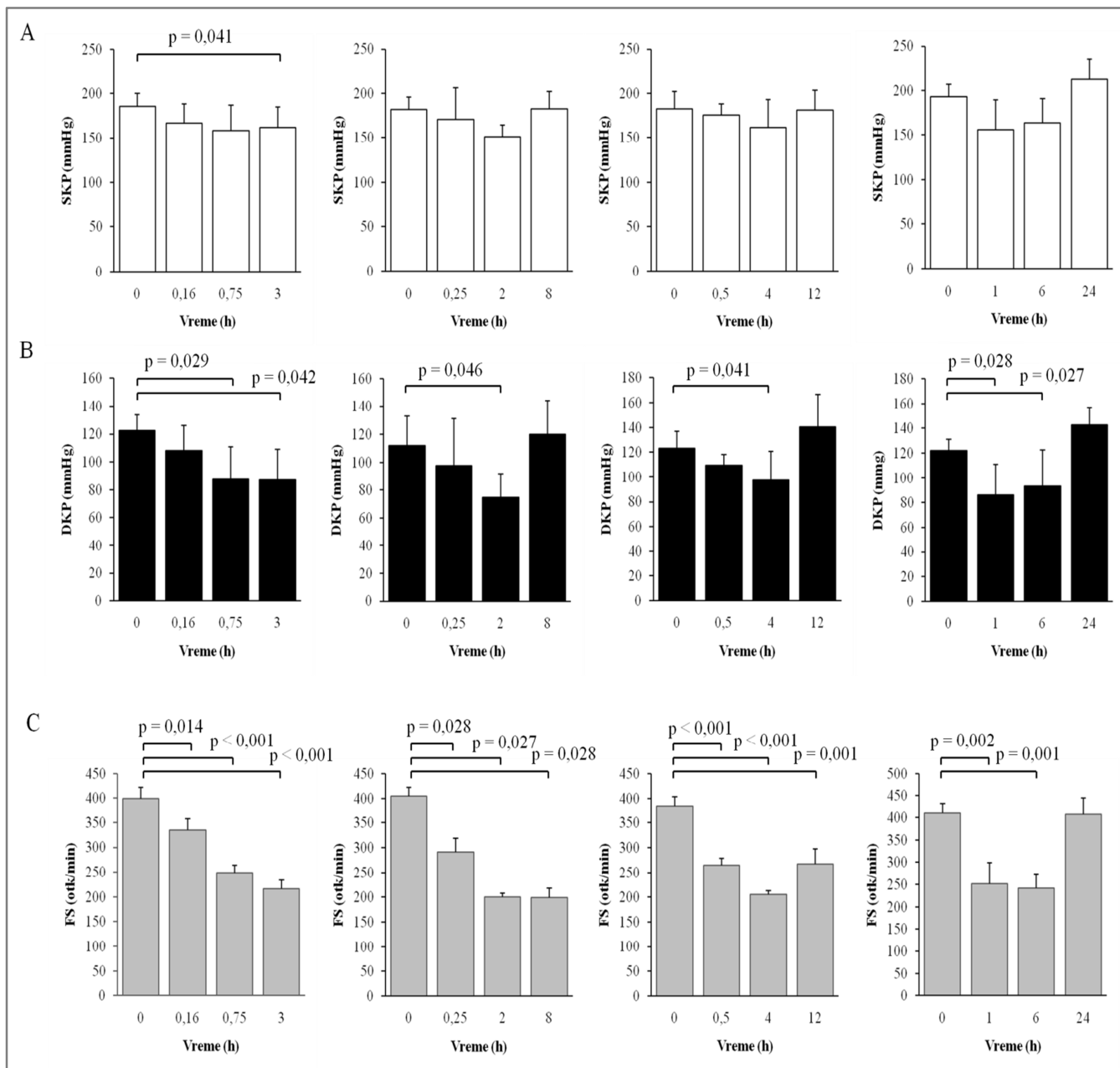
**Slika 4.23.** Sistemske hemodinamske parametre u grupi spontano hipertenzivnih pacova tretiranih tabletama sa trenutnim oslobađanjem 10 mg propranolol-hidrohlora: sistolni krvni pritisak (SKP) (A), dijastolni krvni pritisak (DKP) (B) i frekvencija srčanih kontrakcija (FS) (C). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnom devijacijom (n = 6)

U grupi pacova koji su bili na tretmanu mukoadhezivnom bukalnom tabletom (Slika 4.24A), u 4-om satu ispitivanja, primećeno je statistički značajno smanjenje vrednosti SKP od 20% ( $p = 0,002$ ) u odnosu na njegovu početnu vrednost. Smanjenje SKP bilo je između 7% i 20%. Takođe, statistički značajno smanjenje vrednosti DKP u odnosu na početnu vrednost je primećeno u 1-om (29%), 2-om (28%) i 4-om (30%) satu ispitivanja (Slika 4.24B). Smanjenje DKP bilo je između 11% i 30%. U ovoj grupi, značajno smanjenje FS u odnosu na njegovu početnu vrednost bilo je primećeno je u 10-om minutu i održalo se sve do 12-og sata ispitivanja (Slika 4.24C). Uočeno smanjenje FS je bilo između 13% i 44%, dok je najveće smanjenje od 44% i 43% primećeno u 3. i 4-om satu ispitivanja, respektivno. Izraženo smanjenje FS (27-44%) se održalo od 30-og minuta do 12-og sata ispitivanja.



**Slika 4.24.** Sistemske hemodinamske parametre u grupi spontano hipertenzivnih pacova tretiranih mukoadhezivnim bukalnim tabletama sa 10 mg propranolol-hidrohlorida: sistolni krvni pritisak (SKP) (A), dijastolni krvni pritisak (DKP) (B) i frekvencija srčanih kontrakcija (FS) (C). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnom devijacijom (n = 6)

Kod pacova koji su bili na tretmanu mukoadhezivnim bukalnim filmom, u 3-em satu ispitivanja, primećeno je statistički značajno smanjenje vrednosti SKP (13%,  $p = 0,041$ ) u odnosu na njegovu početnu vrednost (Slika 4.25A). Smanjenje vrednosti SKP bilo je između 4% i 19%. Takođe, statistički značajno smanjenje DKP je primećeno u 45-om minutu i održalo se do 6-og sata ispitivanja (Slika 4.25B), a opseg smanjenja vrednosti DKP je bio između 21% i 33%. Kao i u prethodnoj grupi, efekat propranolol-hidrohlorida je bio najizraženiji u pogledu uticaja na smanjenje FS. Statistički značajno smanjenje je primećeno u 10-om minutu i održalo se do 12-og sata ispitivanja (Slika 4.25C). Uočeno smanjenje FS je bilo između 16% i 51%, dok je najveće smanjenje od 51% primećeno u 2-om i 8-om satu ispitivanja. Izraženo smanjenje FS (28-51%) se održalo od 30-og minuta do 12-og sata ispitivanja.



**Slika 4.25.** Sistemske hemodinamske parametre u grupi spontano hipertenzivnih pacova tretiranih mukoadhezivnim bukalnim filmovima sa 10 mg propranolol-hidroklorida: sistolni krvni pritisak (SKP) (A), dijastolni krvni pritisak (DKP) (B) i frekvencija srčanih kontrakcija (FS) (C). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnom devijacijom (n = 6).

Da bi se istovremeno procenile sve četiri eksperimentalne grupe pacova zajedno, primenjena je dvofaktorska mešovita ANOVA koja analizira efekat dva faktora - tretmana (faktor između grupa) i vremena (faktor unutar grupa) na izmerene hemodinamske parametre (Slika 4.26-4.28). Pokazalo se da je glavni efekat vremena na SKP značajan kod sve četiri podgrupe pacova ( $p < 0,05$ ; Tabela 4.11). Pored toga, i glavni efekat tretmana na SKP se pokazao značajnim u ( $p = 0,032$ ;  $\eta_p^2 = 0,351$ ) u prvoj podgrupi pacova: 0-om minutu;, 10-om minutu;, 45-om minutu i 3-em. satu (Tabela 4.11, Slika 4.26). Sa druge strane, postojao je značajan efekat interakcije vremena i tretmana ( $p = 0,014$ ;  $\eta_p^2 = 0,278$ , Tabela 4.11) u 0-om minutu, 1-om, 6-om i 24-om satu, zbog čega je urađen test jednostavnih efekata. Ovaj test je pokazao da tretman mukoadhezivnom bukalnom tabletom dovodi do značajnog sniženja vrednostisti SKP u 1-om i 6-om satu u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 4.12, Slika 4.26).

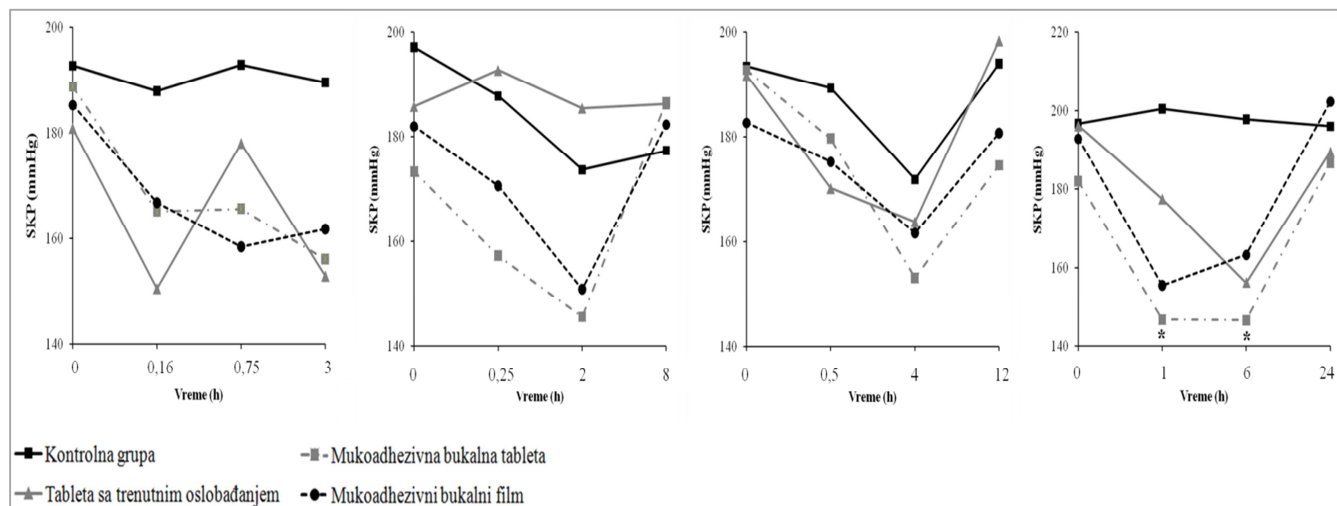


**Tabela 4.11.** Dvofaktorska mešovita ANOVA za sistolni krvni pritisak kod četiri kod četiri eksperimentalne podgrupe

Podgrupa	Faktor unutar subjekata, faktor između subjekata, interakcija faktora	SS	DF	MS	F vrednost	p vrednost	$\eta_p^2$
I	Vreme: 0 h; 0,16 h; 0,75 h; 3h	6831,37	3	2277,12	6,54	<b>0,001</b>	0,246
	Tretman	9921,12	3	3307,04	3,60	<b>0,032</b>	0,351
	Vreme i Tretman	3965,79	9	440,64	1,26	0,275	0,160
II	Vreme: 0 h; 0,25 h; 2 h; 8 h	6370,95	3	2123,65	3,81	<b>0,014</b>	0,160
	Tretman	7644,28	3	2548,09	1,94	0,156	0,225
	Vreme i Tretman	5590,34	9	621,15	1,11	0,366	0,143
III	Vreme: 0 h; 0,5 h; 4 h; 12 h	10911,45	3	3637,15	4,18	<b>0,009</b>	0,173
	Tretman	2421,28	3	807,09	0,57	0,641	0,079
	Vreme i Tretman	2539,93	9	282,21	0,32	0,964	0,046
IV	Vreme: 0 h; 1 h; 6 h; 24 h	16558,70	3	5519,57	12,76	<b>0,000</b>	0,389
	Tretman	12498,70	3	4166,23	2,09	0,133	0,239
	Vreme i Tretman	10014,18	9	1112,69	2,57	<b>0,014</b>	0,278

**Tabela 4.12.** Test jednostavnih efekata za sistolni krvni pritisak sa statističkom značajnošću razlika (p vrednost)

Poređenje tretmana		Vreme (h)			
		0h	1h	6h	24h
Kontrola	IR PROP tableta	1,000	1,000	0,061	1,000
	Mukoadhezivna bukalna tableta	1,000	<b>0,042</b>	<b>0,014</b>	1,000
	Mukoadhezivni bukalni film	1,000	0,124	0,171	1,000
Mukoadhezivni bukalni film	Kontrola	1,000	0,124	0,171	1,000
	IR PROP tableta	1,000	1,000	1,000	1,000
	Mukoadhezivna bukalna tableta	1,000	1,000	1,000	1,000



**Slika 4.26.** Sistolni krvni pritisak (SKP) kod četiri grupe spontano hipertenzivnih pacova: kontrolna grupa pacova, pacovi tretirani tabletom sa trenutnim oslobađanjem 10 mg propranolol-hidrohlorida, pacovi tretirani mukoadhezivnom bukalnom tabletom sa 10 mg propranolol-hidrohlorida i pacovi tretirani mukoadhezivnim bukalnim filmom sa 10 mg propranolol-hidrohlorida. Prikazane su srednje vrednosti ( $n = 6$ ). \*  $p < 0,05$  vs. kontrolna grupa pacova

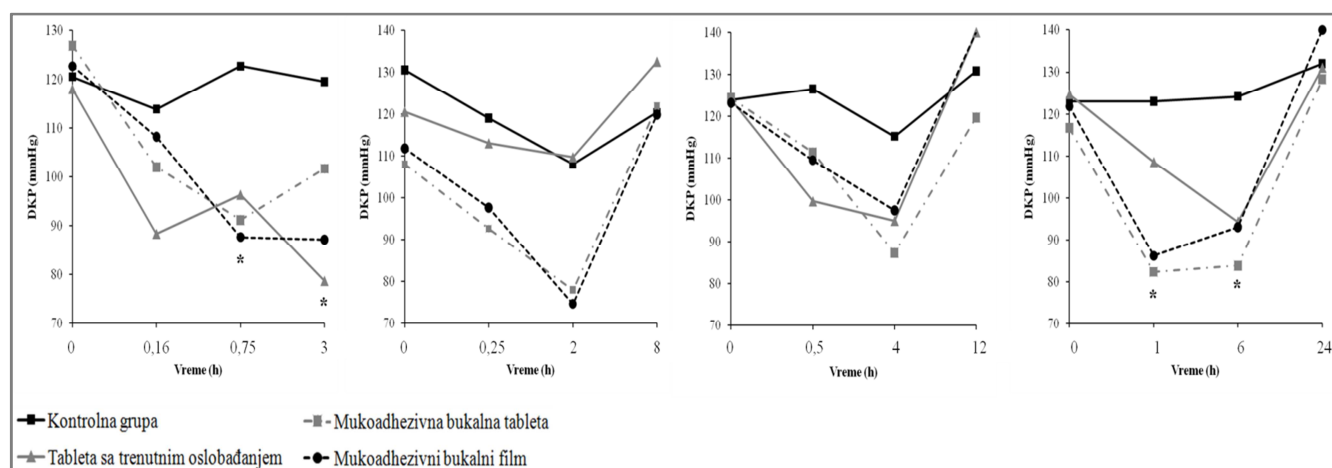
Sa druge strane, postojao je značajan glavni efekat vremena na vrednosti DAP u svim ispitivanim vremenskim tačkama (Tabela 4.12, Slika 4.27), kao i glavni efekat tretmana u 0-om minutu, 10-om minutu, 45-om minutu i 3-em satu ( $p = 0,024$ ;  $\eta_p^2 = 0,369$ ; Tabela 4.12) i 0-om minutu, 15-om minutu, 2-om i 8-om satu ( $p = 0,042$ ;  $\eta_p^2 = 0,330$ ; Tabela 4.12) Takođe, postojao je značajan interakcijski efekat tretmana i vremena na DAP u 0-om minutu, 10-om minutu, 45-om minutu i 3. satu ( $p = 0,030$ ,  $\eta_p^2 = 0,253$ , Tabela 4.12, Slika 4.27). Prateći ovaj efekat interakcije, test jednostavnog efekta je pokazao da je, u poređenju sa kontrolnom grupom, tretman mukoadhezivnim bukalnim filmom doveo do značajnog sniženja DAP u 45-om minutu ispitivanja u odnosu na kontrolnu grupu pacova ( $p = 0,026$ ; Tabela 4.14; Slika 4.27), dok je tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida u odnosu na kontrolnu grupu dovela do većeg sniženja ovog parametra u 3-em satu ispitivanja ( $p = 0,035$ , Tabela 4.14, Slika 4.27). Slično, efekat interakcije tretmana i vremena na DAP u 0-om minutu, 1-om satu, 6-om satu i 24-om satu je takođe bio značajan ( $p = 0,011$ ;  $\eta_p^2 = 0,287$ ; Tabela 4.13, Slika 4.27), a test jednostavnih efekata je pokazao da je tretman mukoadhezivnom bukalnom tabletom doveo do nižih vrednosti DAP u 1-om i 6-om satu u poređenju sa kontrolnom grupom pacova. Rezultati su pokazali da između MBT i MBF ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima DAP-a u svim vremenskim tačkama (Tabela 4.14, Slika 4.27).

**Tabela 4.13.** Dvofaktorska mešovita ANOVA za dijastolni krvni pritisak kod četiri eksperimentalne podgrupe

Podgrupa	Faktor unutar subjekata, faktor između subjekata, interakcija faktora	SS	DF	MS	F vrednost	<i>p</i> vrednost	$\eta_p^2$
I	Vreme: 0 h; 0,16 h; 0,75 h; 3h	9384,70	3	3128,23	11,79	<b>0,000</b>	0,371
	Tretman	7333,36	3	2444,45	3,90	<b>0,024</b>	0,369
	Vreme i Tretman	5380,43	9	597,82	2,25	<b>0,030</b>	0,253
II	Vreme: 0 h; 0,25 h; 2 h; 8 h	13628,25	3	4542,75	10,12	<b>0,000</b>	0,336
	Tretman	8338,08	3	2779,36	3,29	<b>0,042</b>	0,330
	Vreme i Tretman	3272,50	9	363,61	0,81	0,609	0,108
III	Vreme: 0 h; 0,5 h; 4 h; 12 h	15660,33	3	5220,11	8,95	<b>0,000</b>	0,309
	Tretman	2299,67	3	766,56	0,92	0,448	0,121
	Vreme i Tretman	4104,67	9	456,07	0,78	0,634	0,105
IV	Vreme: 0 h; 1 h; 6 h; 24 h	20648,58	3	6882,86	25,00	<b>0,000</b>	0,556
	Tretman	6427,67	3	2142,56	1,88	0,165	0,220
	Vreme i Tretman	6638,58	9	737,62	2,67	<b>0,011</b>	0,287

**Tabela 4.14.** Test jednostavnih efekata za dijastolni krvni pritisak sa statističkom značajnošću razlika (*p* vrednost)

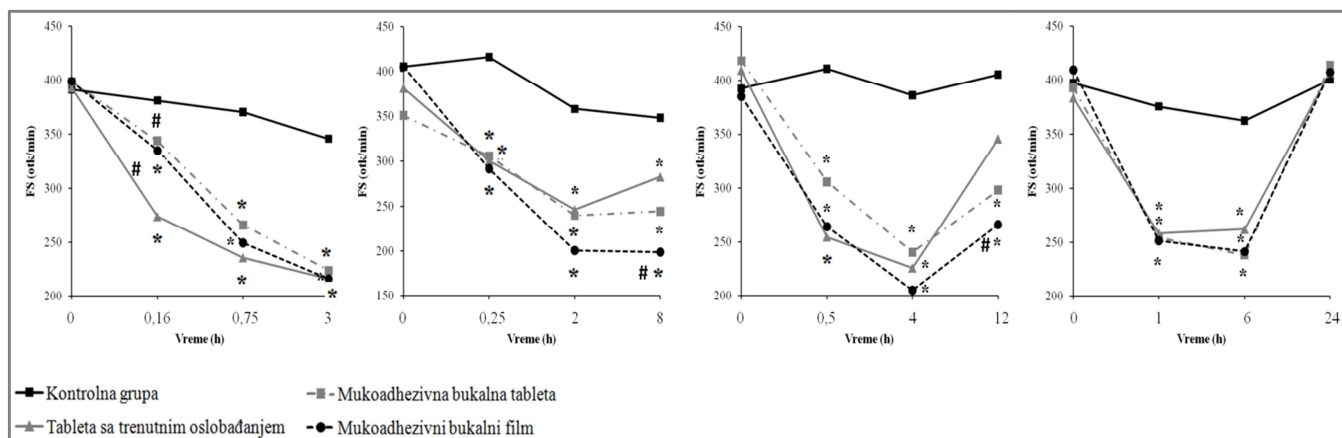
Poređenje tretmana		Vreme (h)			
		0 h	0,16 h	0,75 h	3 h
Kontrola	IR PROP tableta	1,000	0,084	0,152	<b>0,035</b>
	Mukoadhezivna bukalna tableta	1,000	1,000	0,054	1,000
	Mukoadhezivni bukalni film	1,000	1,000	<b>0,026</b>	0,143
Mukoadhezivni bukalni film	Kontrola	1,000	1,000	<b>0,026</b>	0,143
	IR PROP tableta	1,000	0,294	1,000	1,000
	Mukoadhezivna bukalna tableta	1,000	1,000	1,000	1,000
		0 h	1 h	6 h	24 h
Kontrola	IR PROP tableta	1,000	1,000	0,252	1,000
	Mukoadhezivna bukalna tableta	1,000	<b>0,048</b>	<b>0,049</b>	1,000
	Mukoadhezivni bukalni film	1,000	0,089	0,207	1,000
Mukoadhezivni bukalni film	Kontrola	1,000	0,089	0,207	1,000
	IR PROP tableta	1,000	0,728	1,000	1,000
	Mukoadhezivna bukalna tableta	1,000	1,000	1,000	1,000



**Slika 4.27.** Dijastolni krvni pritisak (DKP) kod četiri grupe spontano hipertenzivnih pacova: kontrolna grupa pacova, pacovi tretirani tabletom sa trenutnim oslobađanjem 10 mg propranolol-hidrohlorida, pacovi tretirani mukoadhezivnom bukalnom tabletom sa 10 mg propranolol-hidrohlorida i pacovi tretirani mukoadhezivnim bukalnim filmom sa 10 mg propranolol-hidrohlorida. Prikazane su srednje vrednosti (n = 6). \* *p* < 0,05 vs. kontrolna grupa pacova

U slučaju FS, uočen je značajan glavni efekat vremena i tretmana, kao i značajan efekat interakcija ovih faktora u svim vremenskim tačkama ( $p < 0,001$ ,  $0,426 \leq \eta_p^2 \leq 0,881$ , Tabela 4.15, Slika 4.28). Ova analiza je pokazala da je u poređenju sa kontrolnom grupom, tretman mukoadhezivnim bukalnim filmom značajno smanjio FS počevši od 10-og minuta pa sve do 12-og sata ispitivanja, dok je tretman mukoadhezivnom bukalnom tabletom značajno smanjio FS od 15-og minuta pa do 12-og sata ispitivanja. Dalja analiza ovih interakcijskih efekata je pokazala da je tretman tabletom sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohloridom u poređenju sa kontrolnom grupom, značajno smanjio vrednosti FS samo do 8-og sata ispitivanja (Tabela 4.16, Slika 4.28). Dalje, ova analiza je pokazala da je

u poređenju sa tabletom sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida, mukoadhezivni bukalni film postigao značajno niže vrednosti FS u 8-om i 12-om satu ispitivanja ( $p = 0,002$  i  $p = 0,021$ , respektivno, [Tabela 4.16](#)). Tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida je u poređenju sa mukoadhezivnom bukalnom tabletom i filmom jedino dovela do većeg smanjenja FS u 10-om minutu ( $p = 0,002$ , [Tabela 4.16](#)). Analiza jednostavnih efekata nije pokazala statistički značajnu razliku u vrednostima hemodinamskih parametara između tretmana mukoadhezivnim bukalnim filmom i tabletom. Međutim, jednofaktorska ANOVA za ponovljena merenja upućuje da tretman mukoadhezivnim bukalnim filmom dovodi do izraženijeg efekta u pogledu smanjenja pre svega FS, a potom i DKP, bez značajne razlike u uticaju na SKP.



**Slika 4.28.** Frekvencija srčanih kontrakcija (FS) kod četiri grupe spontano hipertenzivnih pacova: kontrolna grupa pacova, pacovi tretirani tabletom sa trenutnim oslobađanjem 10 mg propranolol-hidrohlorida, pacovi tretirani mukoadhezivnom bukalnom tabletom sa 10 mg propranolol-hidrohlorida i pacovi tretirani mukoadhezivnim bukalnim filmom sa 10 mg propranolol-hidrohlorida. Prikazane su srednje vrednosti ( $n = 6$ ). \*  $p < 0,05$  vs. kontrolna grupa pacova; #  $p < 0,05$  vs. pacovi tretirani tabletom sa trenutnim oslobađanjem

**Tabela 4.15.** Dvofaktorska mešovita ANOVA za frekvencu srčanih kontrakcija kod četiri eksperimentalne podgrupe

Podgrupa	Faktor unutar subjekata, faktor između subjekata, interakcije faktora	SS	DF	MS	F vednost	p vrednost	$\eta_p^2$
I	Vreme: 0 h; 0,16 h; 0,75 h; 3h	292688,03	3	97562,68	148,23	<b>0,000</b>	0,881
	Tretman	115417,28	3	38472,43	30,44	<b>0,000</b>	0,820
	Vreme i Tretman	61479,09	9	6831,01	10,38	<b>0,000</b>	0,609
II	Vreme: 0 h; 0,25 h; 2 h; 8 h	243371,61	3	81123,87	63,29	<b>0,000</b>	0,760
	Tretman	171073,28	3	57024,43	23,74	<b>0,000</b>	0,781
	Vreme i Tretman	57183,09	9	6353,68	4,96	<b>0,000</b>	0,426
III	Vreme: 0 h; 0,5 h; 4 h; 12 h	233956,70	3	77985,57	90,68	<b>0,000</b>	0,819
	Tretman	185873,28	3	61957,76	31,21	<b>0,000</b>	0,824
	Vreme i Tretman	97568,76	9	10840,97	12,60	<b>0,000</b>	0,654
IV	Vreme: 0 h; 1 h; 6 h; 24 h	354011,78	3	118003,93	133,67	<b>0,000</b>	0,870
	Tretman	58937,28	3	19645,76	14,83	<b>0,000</b>	0,690
	Vreme i Tretman	71308,26	9	7923,14	8,97	<b>0,000</b>	0,574

**Tabela 4.16.** Test jednostavnih efekata za frekvencu srčanih kontrakcija sa statističkom značajnošću razlika (*p* vrednost)

Poređenje tretmana		Vreme (h)			
		0 h	0,16 h	0,75 h	3 h
Kontrola	IR PROP tableta	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
	Mukoadhezivna bukalna tableta	1,000	0,087	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
	Mukoadhezivni bukalni film	1,000	<b>0,021</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
Mukoadhezivni bukalni film	Kontrola	1,000	<b>0,021</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
	IR PROP tableta	1,000	<b>0,002</b>	1,000	1,000
	Mukoadhezivna bukalna tableta	1,000	1,000	1,000	1,000
		0 h	0,25 h	2 h	8 h
Kontrola	IR PROP tableta	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	<b>0,020</b>
	Mukoadhezivna bukalna tableta	0,239	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
	Mukoadhezivni bukalni film	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
Mukoadhezivni bukalni film	Kontrola	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
	IR PROP tableta	1,000	1,000	0,403	<b>0,002</b>
	Mukoadhezivna bukalna tableta	0,243	1,000	0,666	0,191
		0 h	0,5 h	4 h	12 h
Kontrola	IR PROP tableta	0,763	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,133
	Mukoadhezivna bukalna tableta	0,154	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>
	Mukoadhezivni bukalni film	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
Mukoadhezivni bukalni film	Kontrola	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
	IR PROP tableta	0,206	1,000	1,000	<b>0,021</b>
	Mukoadhezivna bukalna tableta	0,350	0,603	0,221	1,000
		0 h	1 h	6 h	24 h
Kontrola	IR PROP tableta	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	1,000
	Mukoadhezivna bukalna tableta	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	1,000
	Mukoadhezivni bukalni film	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	1,000
Mukoadhezivni bukalni film	Kontrola	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	1,000
	IR PROP tableta	0,295	1,000	1,000	1,000
	Mukoadhezivna bukalna tableta	1,000	1,000	1,000	1,000

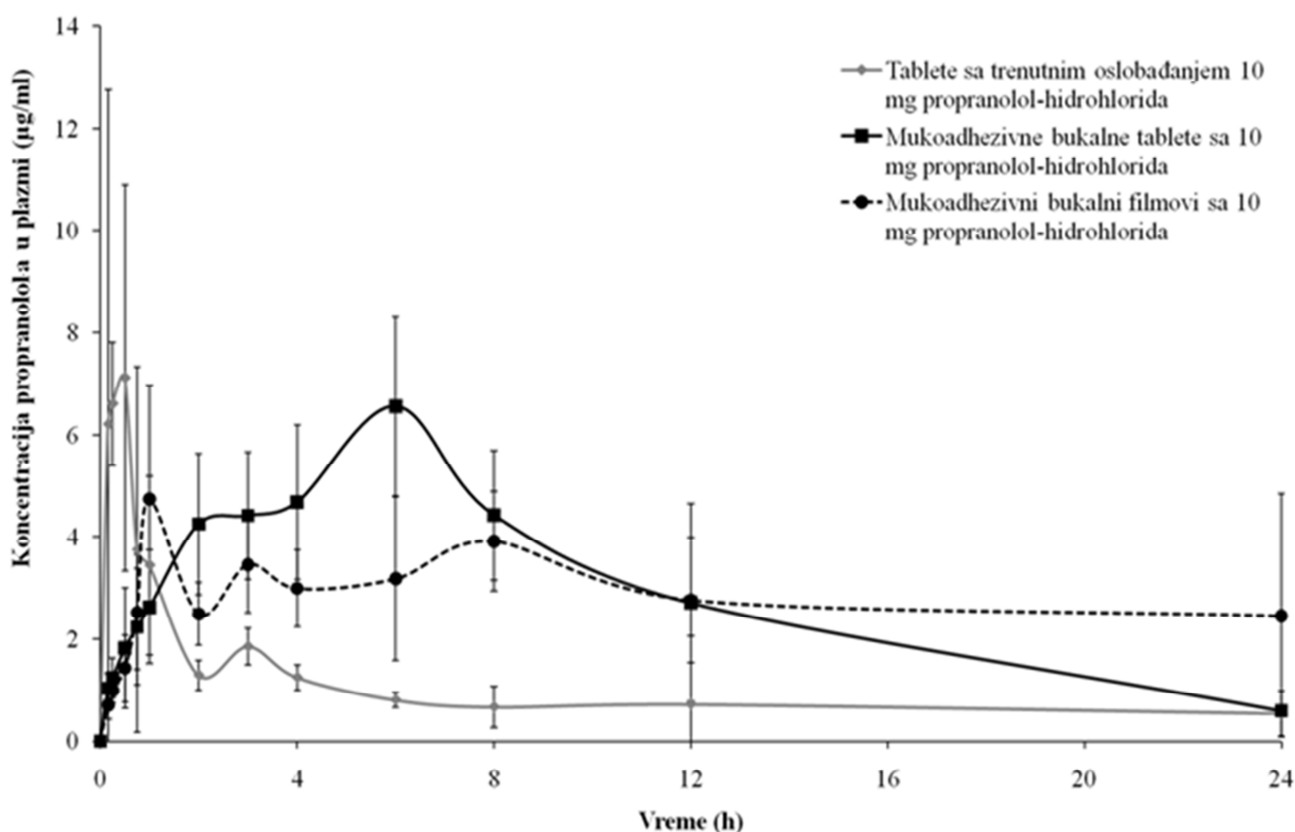
#### 4.3.2 *In vivo* ispitivanje farmakokinetike propranolol-hidrohlorida na spontano hipertenzivnim pacovima

Na *Slici 4.29* prikazani su srednji profili koncentracije propranolola u plazmi u funkciji vremena, nakon peroralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida i intraoralne primene MBT i MBF kod SHR pacova. *Tabela 4.17* daje prikaz farmakokinetičkih parametara propranolola izračunatih neprostornom farmakokinetičkom analizom iz profila koncentracije propranolola u plazmi u funkciji vremena.

Nakon peroralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida i intraoralne primene MBT i MBF kod pacova, statistička analiza nije pokazala značajnu razliku u vrednostima  $C_{max}$  ( $F(2, 13,077) = 2,834$ ;  $p = 0,090$ ). Sporije oslobađanje propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih formulacija dovelo je do sporijeg postizanja  $C_{max}$ , na šta ukazuje to da je u slučaju MBT i MBF u poređenju sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem uočena statistički značajna razlika u vrednostima  $t_{max}$  (Mann-Whitney U test:  $Z = -2,966$ ,  $p = 0,002$ ). Osim toga, pokazano je da je u slučaju MBT,  $t_{max}$

vrednost statistički značajno viša u odnosu na  $t_{max}$  vrednost MBF (Mann-Whitney U test:  $Z = -3,00$ ;  $p = 0,002$ ) što ukazuje na to da se primenom MBT maksimalna koncentracija propranolola postigne značajno sporije nego primenom MBF. Najveća razlika između ova tri farmaceutička oblika leka uočena je u stepenu apsorpcije propranolol-hidrohlorida, izraženo kao PIK vrednost. Vrednost  $PIK_{0-24h}$  propranolol-hidrohlorida bila je više od 2,5 puta veća nakon primene MBT i MBF u poređenju sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem ( $F(2, 3830,086) = 15,984$ ;  $p < 0,001$ ). Takođe, vrednost ovog parametra je bila značajno viša kod MBF u poređenju sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem ( $F(2, 6162,146) = 9,817$ ;  $p = 0,001$ ). Međutim, ova analiza je pokazala da između MBT i MBF nema značajne razlike u pogledu  $PIK_{0-24h}$  vrednosti. Dalje, uočena je značajna razlika u vrednostima  $CL/F$  kod primene MBT i MBF u poređenju sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem (Mann-Whitney U test:  $Z = -2,562$ ;  $p = 0,009$ ;  $Z = -2,082$ ;  $p = 0,041$ ; respektivno) dok značajne razlike u ovoj vrednosti između MBT i MBF nije bilo. Pored toga, vrednost  $t_{1/2}$  nakon primene MBF bila je više nego duplo veća u poređenju sa ovom vrednošću nakon primene tablete sa trenutnim oslobađanjem ( $F(2, 213,039) = 9,361$ ;  $p = 0,006$ ). Osim toga, značajne razlike ima u vrednostima  $t_{1/2}$  između MBT i MBF ( $p = 0,006$ ) (Tabela 4.17).

Vrednosti  $PIK_{0-24h}$ ,  $PIK_{0-\infty}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{1/2}$  i  $CL/F$  su najbolji pokazatelji prednosti korišćenja mukoadhezivnih bukalnih farmaceutskih oblika lekova. Ovi rezultati pokazuju da bukalna isporuka propranolol-hidrohlorida poboljšava stepen apsorpcije i terapijski efekat usled produženog zadržavanja farmaceutskog oblika leka u usnoj duplji i smanjenog metabolizma u jetri [232]. Na taj način manja količina propranolola je dostupna za presistemski metabolizam u jetri, pa dolazi do dužeg zadržavanja relativno visokih koncentracije propranolola u sistemske cirkulaciji.



**Slika 4.29.** Srednji profili koncentracije propranolola u plazmi nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem, mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova sa 10 mg propranolol-hidrohlorida kod spontano hipertenzivnih pacova



**Tabela 4.17.** Farmakokinetički parametri propranolola izračunati iz profila koncentracije leka u plazmi u toku vremena dobijeni nakon peroralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem i bukalne primene mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova sa 10 mg propranolol-hidrohlorida kod pacova

Parametar	Tablete sa trenutnim oslobađanjem 10 mg propranolol-hidrohlorida	Mukoadhezivne bukalne tablete sa 10 mg propranolol-hidrohlorida	Mukoadhezivni bukalni filmovi sa 10 mg propranolol-hidrohlorida
$C_{max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$7,11 \pm 3,48$	$6,21 \pm 1,15$	$4,22 \pm 0,66$
$t_{max}$ (h)	$0,58 \pm 0,20$	$5,33 \pm 1,03^{**}$	$3,33 \pm 0,52^{**\#}$
$PIK_{0 \rightarrow 24h}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ )	$24,61 \pm 3,31$	$70,32 \pm 19,56^{***}$	$66,13 \pm 18,03^{***}$
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ )	$47,85 \pm 6,34$	$76,36 \pm 17,86$	$111,82 \pm 39,04^{***}$
CL/F (L/h)	$0,21 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,03^{**}$	$0,12 \pm 0,07^*$
$t_{1/2}$ (h)	$7,09 \pm 2,63$	$10,63 \pm 2,63$	$12,41 \pm 7,38^{**\#}$

$C_{max}$  - maksimalna koncentracija propranolola u plazmi;  $t_{max}$  - vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije propranolola;  $PIK_{0-24h}$  - ukupna površina ispod krive koncentracije propranolola (ukupna izloženost leka telu od 0-24h);  $PIK_{0-24h}$  - ukupna površina ispod krive koncentracije propranolola (ukupna izloženost leka telu od 0- $\infty$  vremena); CL/F - prividni ukupni klirens propranolola;  $t_{1/2}$  - poluvreme eliminacije propranolola (vreme koje je potrebno da se koncentracija propranolola smanji na pola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD

\*  $p < 0,05$  u poređenju sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem 10 mg propranolol-hidrohlorida

\*\*  $p < 0,01$  u poređenju sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem 10 mg propranolol-hidrohlorida

\*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem 10 mg propranolol-hidrohlorida

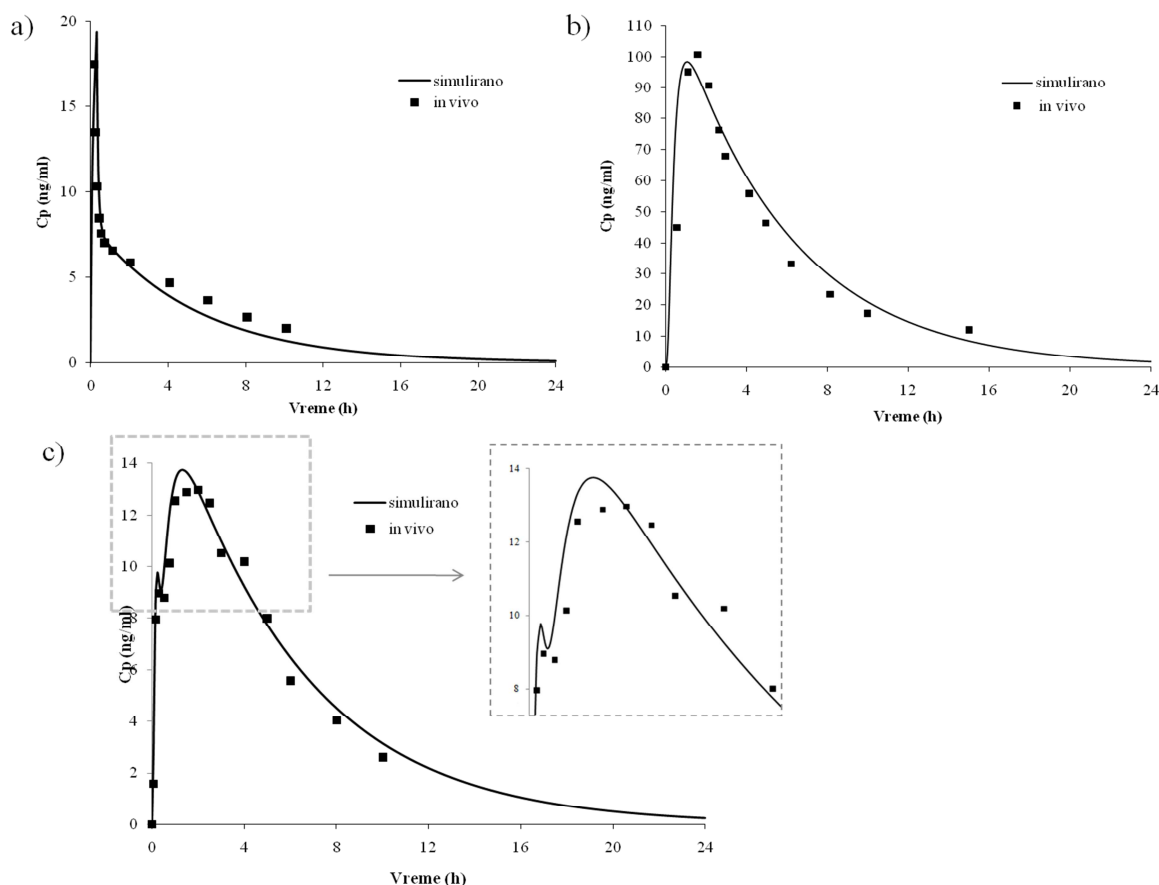
#  $p < 0,01$  u poređenju sa mukoadhezivnim bukalnim tabletama sa 10 mg propranolol-hidrohlorida

## 4.4 Rezultati i diskusija četvrte faze istraživanja

Četvrti i poslednji deo istraživanja ove disertacije bavi se razvojem, validacijom i primenom *in silico* fiziološki zasnovanog modela za predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola kod čoveka. Do sada je publikovano svega nekoliko radova koji se bave *in silico* modelovanjem apsorpcije lekovite supstance iz intraoralnih formulacija primenom OCCAT<sup>TM</sup> modela [175,178,179]. Ovo je prvi publikovani primer koji se bavi *in silico* modelovanjem mukoadhezivnih bukalnih formulacija sa propranolol-hidrohloridom.

### 4.4.1 Razvoj i validacija *in silico* fiziološki zasnovanog modela za predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola

Prikaz ulaznih parametara prilikom razvoja *in silico* modela apsorpcije propranolola dat je u Tabeli 3.5. U cilju validacije modela, odnosno procene moći predviđanja izgrađenog modela, predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara propranolola su poređene sa odgovarajućim vrednostima preuzetim iz publikovanih kliničkih studija [233]. Farmakokinetički parametri su izračunati na osnovu predviđenih i *in vivo* srednjih profila koncentracije propranolola u plazmi dobijenih u kliničkim studijama, koji su prikazani na Slici 4.30. Tabela 4.18 daje sumarni prikaz predviđenih i *in vivo* srednjih vrednosti farmakokinetičkih parametara za propranolol nakon intravenske primene infuzije sa 2,2 mg propranolol-hidrohlorida, peroralne primene tablete sa trenutnim oslobađanjem 80 mg propranolol-hidrohlorida i intraoralne primene sublingvalne tablete sa 10 mg propranolol-hidrohlorida.



**Slika 4.30.** Predviđeni i *in vivo* uočeni srednji profili koncentracije propranolola u plazmi nakon (a) i.v. primene 2,2 mg propranolol-hidrohlorida [200]; (b) peroralne primene 80 mg tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida [207]; (c) intraoralne primene 10 mg sublingvalnih tableta propranolol-hidrohlorida [206], uvećani prikaz malog pika ukazuje na apsorpciju propranolola iz usne duplje

Pokazano je dobro slaganje između simuliranih i *in vivo* određenih vrednosti za  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i PIK, (Tabela 4.18). Izračunate greške predviđanja kod sva tri procenjivana farmaceutska oblika zajedno su bile u opsegu 2-36%. Kod onih farmakokinetičkih parametara gde su uočene veće vrednosti greške predviđanja, simulirana vrednost je bila u okviru opsega individualnih vrednosti određenih u kliničkim studijama. U tom smislu, generisani model se može smatrati prihvatljivim za dalja predviđanja apsorpcije i dispozicije propranolola nakon bukalne primene mukoadhezivnih formulacija.

*In silico* modelovanjem je procenjeno da tek 36% primenjene doze propranolola dospeva u sistemsku cirkulaciju nakon peroralnog unosa doze od 80 mg. To odgovara literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti propranolola koja je u opsegu 30-40% [15]. Dakle, procenat primenjene doze propranolol-hidrohlorida koji dospeva u sistemsku cirkulaciju je daleko manji od procenta apsorbovanog propranolola usled intenzivnog presistemskog metabolizma [14,15]. Kako bi se validirao odabir ulaznih parametara za OCCAT™ model, simulacije su takođe izvedene za sublingvalne tablete sa 10 mg propranolol-hidrohlorida. Modelovanjem je predviđena nešto veća vrednost biološke raspoloživosti ( $\approx 48\%$ ) propranolola nakon sublingvalne primene u poređenju sa peroralnom primenom. Dizajnirani OCCAT™ model omogućio je da se pored apsorpcije u gastrointestinalnom traktu simulira i apsorpcija propranolola iz usne duplje, što je prikazano pojavom malog pika u petnaestom minutu ispitivanja (Slika 4.30c).

**Tabela 4.18.** Predviđene i *in vivo* uočene vrednosti farmakokinetičkih parametara propranolola nakon primene različitih farmaceutskih oblika

Doza/ farmaceutski oblik	Parametar	$C_{max}$ (ng/mL)	$t_{max}$ (h)	$PIK_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	$PIK_{0-t}$ (ng·h/mL)	$F_a$ (%)	$F_b$ (%)
2,2 mg i.v. infuzija	Simulirana vrednost	19,38	/	47,61	47,05	99,99	99,97
	<i>In vivo</i> srednja vrednost <sup>a</sup>	17,50	/	59,51	45,33	/	/
	<i>In vivo</i> opseg <sup>a</sup>	/	/	57,12-61,30	/	/	/
	PE (%)	10,40	/	20,00	3,78	/	/
80 mg tableta sa trenutnim oslobađanjem	Simulirana vrednost	98,23	1,04	644,23	635,31	99,90	35,96
	<i>In vivo</i> srednja vrednost <sup>b</sup>	102,26	1,52	965,10	650,30	/	/
	<i>In vivo</i> opseg <sup>b</sup>	61,90-168,70	0,80-1,80	371,00-969,40	345,00-915,40	/	/
	PE (%)	3,94	31,58	33,25	2,30	/	/
10 mg sublingvalna tableta	Simulirana vrednost	13,75	1,28	96,75	95,40	99,92	47,41
	<i>In vivo</i> srednja <sup>c</sup> vrednost	12,97	2,00	87,98	76,18	/	/
	<i>In vivo</i> opseg <sup>c</sup>	9,90-21,10	0,58-2,82	55,30 -123,30	49,00 -104,33	/	/
	PE (%)	6,01	36,00	9,97	25,23	/	/

$C_{max}$ -maksimalna koncentracija propranolola;  $t_{max}$ -vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije propranolola;  $PIK_{0-\infty}$ -ukupna površina ispod krive koncentracije propranolola do poslednje vremenske tačke;  $PIK_{0-t}$ -ukupna površina ispod krive koncentracije propranolola ekstrapolirajući površinu na beskonačno vreme;  $F_a$ -apsorbovana frakcija propranolola;  $F_b$ -frakcija propranolola koja dospeva u sistemsku cirkulaciju nakon metabolizma prvog prolaza (peroralna biološka raspoloživost)

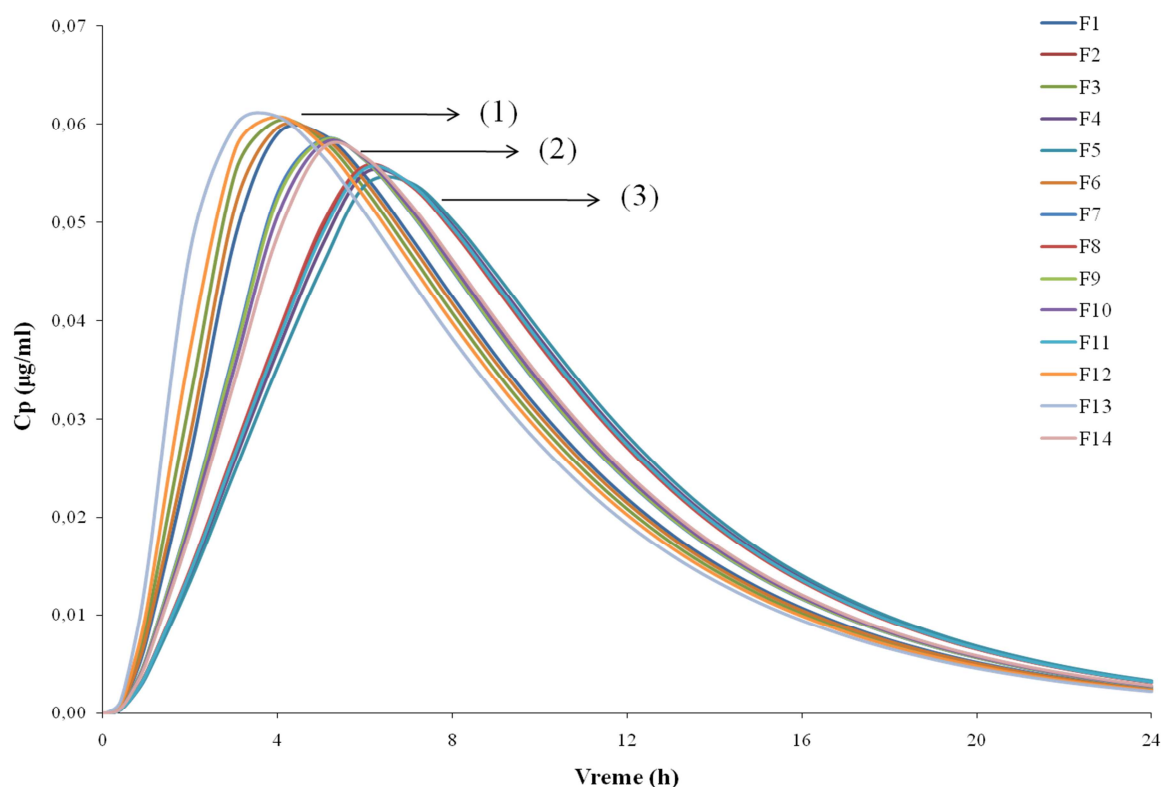
<sup>a</sup> Literaturni podaci iz Cid et al, 1986; <sup>b</sup> Literaturni podaci iz Ismail et al., 2004; <sup>c</sup> Literaturni podaci iz Wang et al., 2013

## 4.4.2 Primena *in silico* fiziološki zasnovanog modela za predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola iz mukoadhezivnih bukalnih formulacija

### 4.4.2.1 Predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola iz dvoslojnih mukoadhezivnih bukalnih tableta

Razvijen i validiran *in silico* model propranolola je u narednom koraku primenjen za predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola nakon intraoralne primene MBT. Za opisivanje brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida u organizmu korišćeni su eksperimentalno dobijeni *in vitro* profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBT prikazani na [Slici 4.9](#).

Predviđeni profili koncentracije propranolola u plazmi, nakon primene jedne doze leka od 30 mg u obliku mukoadhezivnih bukalnih tableta (F1-F14) kod ljudi u stanju "na gladno" prikazani su na [Slici 4.31](#), dok su odgovarajući farmakokinezički parametri prikazani u [Tabeli 4.19](#). Generisani profili koncentracije propranolola u plazmi se mogu podeliti u 3 grupe. Između grupa postoji značajna razlika u brzini apsorpcije propranolola ( $t_{max}$ ), ali bez razlika u vrednosti  $C_{max}$  i stepenu apsorpcije propranolola, što je izraženo kroz PIK vrednost.



**Slika 4.31.** Predviđeni profili koncentracije propranolola u plazmi u funkciji vremena za mukoadhezivne bukalne tablete formulacije F1-F14

**Tabela 4.19.** Predviđene vrednosti farmakokinezičkih parametra propranolola za tri grupe profila koncentracije propranolola u plazmi za mukoadhezivne bukalne tablete

Grupa	Formulacije	$C_{max}$ (ng/mL)	$t_{max}$ (h)	$PIK_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	$PIK_{0-t}$ (ng·h/mL)	Fa (%)	Fb (%)
1	F1, F3, F6, F12, F13	60,44	4,10	571,33	558,41	99,99	99,98
2	F7, F9, F10, F14	58,00	5,16	571,33	556,24	99,99	99,98
3	F2, F4, F5, F8, F11	55,45	6,24	571,34	553,84	99,99	99,98

$C_{max}$  - maksimalna koncentracija propranolola;  $t_{max}$  - vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije propranolola;  $PIK_{0-\infty}$  - ukupna površina ispod krive koncentracije propranolola do poslednje vremenske tačke;  $PIK_{0-t}$  - ukupna površina ispod krive koncentracije propranolola ekstrapolirajući površinu na beskonačno vreme;  $F_a$  - apsorbovana frakcija propranolola;  $F_b$  - frakcija propranolola koja dospeva u sistemsku cirkulaciju nakon metabolizma prvog prolaza (peroralna biološka raspoloživost).

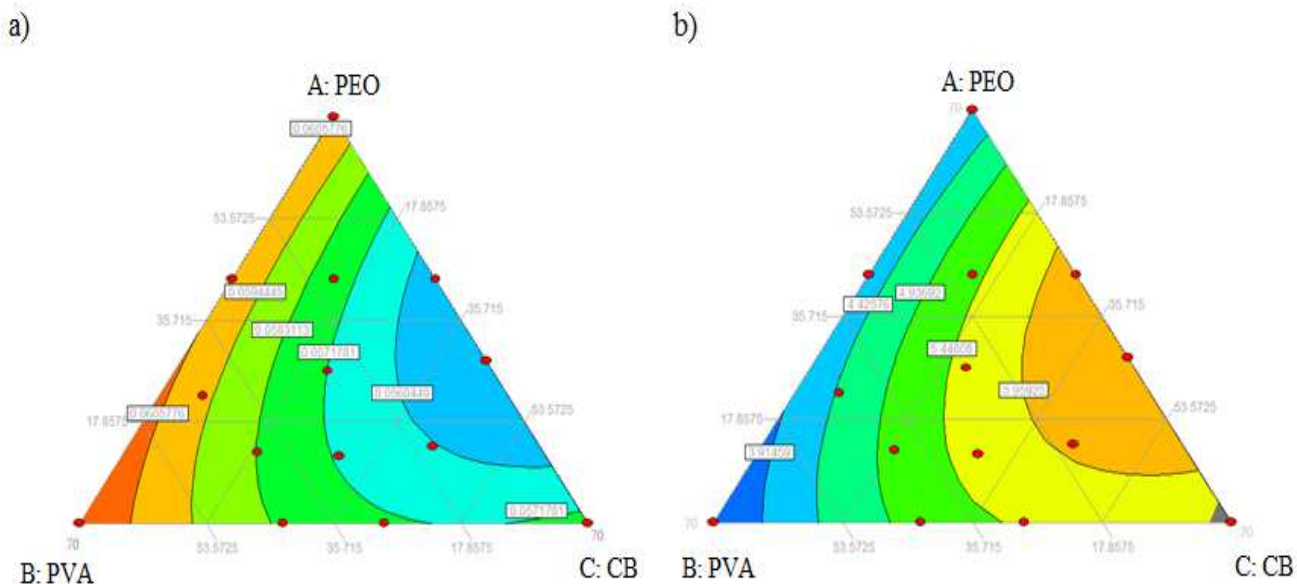
Razlike između ove tri grupe odražavaju istovremeni uticaj sastava formulacije i brzine rastvaranja lekovite supstance na predviđene profile koncentracije lekovite supstance u plazmi. Može se primetiti da su razlike između formulacija uočene *in vitro* (tj. profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida) bile manje izražene u predviđenim profilima koncentracije propranolol-hidrohlorida u plazmi. Najveće razlike su primećene u vrednosti  $t_{max}$ . Iz formulacija F1, F3, F6, F12, F13, koje pripadaju prvoj grupi, postiže se najveća brzina apsorpcije propranolola (srednja vrednost  $t_{max} = 4,10$  h), potom slede formulacije F7, F9, F10 i F14 koje pripadaju drugoj grupi i kod kojih je srednja vrednost za  $t_{max}$  5,16 h. Najsporija apsorpcije propranolola postiže se iz formulacija koje pripadaju trećoj grupi, u koje spada F2, F4, F5, F8 i F11, kod kojih se je srednja vrednost za  $t_{max}$  6,24 h. Pored toga, rezultati simulacija (Tabela 4.19) ukazuju na poboljšanu biološku raspoloživost propranolola ( $F_b = 99,98\%$ ) u svim ispitivanim formulacijama, jer je primećeno da je biološka raspoloživost propranolola povećana 2,5 puta nakon primene mukoadhezivnih bukalnih tableta u dozi od 30 mg u poređenju sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida u dozi od 80 mg. S obzirom da je potrebna koncentracija propranolola u plazmi za optimalni antihipertenzivni efekat u opsegu od 50 do 100 ng/mL [234], simulirane vrednosti  $C_{max}$  za ispitivane mukoadhezivne bukalne tablete ukazuju da bukalni put primene može da obezbedi efektivne terapijske koncentracije propranolola pri nižim dozama (npr. 30 mg).

Da bi se uspostavio odnos između sastava formulacije i farmakokinetičkih parametara koji se odnose na efikasnost propranolola, procenjen je istovremeni efekat koncentracije PEO, PVA i CB na predviđene vrednosti  $C_{max}$  i  $t_{max}$ . Pošto je utvrđeno da su PIK vrednosti relativno nezavisne od sastava ispitivanih formulacija, ovaj parametar nije uključen u analizu. Generisani modeli za  $C_{max}$  i  $t_{max}$  (jednačine 4.10-4.11) su bili značajni ( $p < 0,05$ ), što ukazuje da su obe zavisne varijable dobro opisane predloženim modelima.

$$C_{max} (\mu\text{g/mL}) = 0,061A + 0,062B + 0,058C - 2,573 \times 10^3 AB - 0,016AC - 7,803 \times 10^3 BC \quad 4.10$$

$$t_{max} (\text{h}) = 3,96A + 3,4B + 5,38C + 1,82AB + 6,92AC + 3,83BC \quad 4.11$$

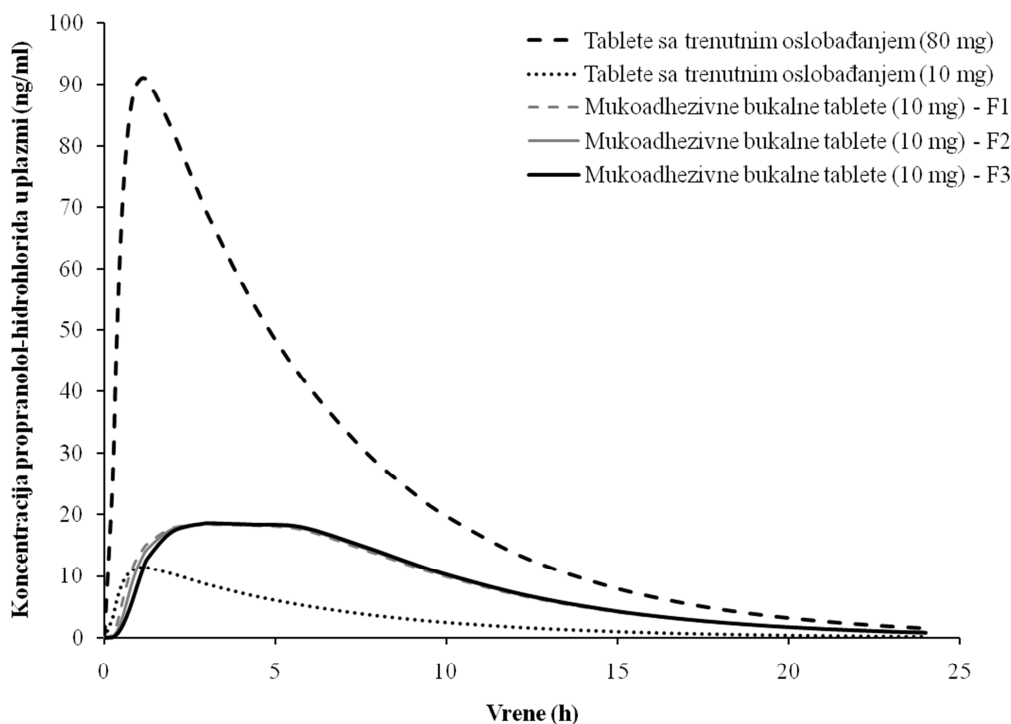
Iz jednačine 4.11 se može videti da na  $t_{max}$  značajno utiču prisustvo CB i interakcija CB i PEO. To znači da povećanje koncentracije CB dovodi do povećanja vrednosti  $t_{max}$  i smanjenje vrednosti  $C_{max}$ . Da bi se dodatno ilustrovao efekat istraženog faktora na vrednosti  $C_{max}$  i  $t_{max}$ , prikazani su dobijeni podaci u vidu dvodimenzionalnih konturnih dijagrama (Slika 4.32). Regioni ternarnog grafika su obojeni (tamnoplava, svetloplava, zelena, žuta i crvena) prema različitim vrednostima  $C_{max}$  i  $t_{max}$ . Na konturnom dijagramu koji pokazuje zavisnost  $C_{max}$  od ispitivanog faktora, oblast visoke koncentracije CB je obojena u tamno- i svetloplavu boju, što vizuelno pokazuje da se povećanje koncentracije CB smanjuje koncentraciju lekovite supstance u plazmi. S druge strane, na konturnom dijagramu za  $t_{max}$ , ovaj region je obojen žutom i narandžastom bojom, što ukazuje na to da povećanje koncentracije CB rezultira visokim vrednostima  $t_{max}$ . Suprotan efekat je primećen za uticaj koncentracije PVA na ispitivane parametre. Konturni dijagrami predstavljeni na Slici 4.32, kao i jednačine 4.10-4.11 pružaju objašnjenje odnosa između sastava mukoadhezivnih bukalnih tableta i njihovih bioperformansi. Stoga je na osnovu sastava formulacije moguće predvideti farmakokinetička svojstva lekovite supstance nakon bukalne primene.



**Slika 4.32.** Dvodimenzionalni konturni dijagrami koji pokazuju zavisnost (a)  $C_{max}$  i (b)  $t_{max}$  od ispitivanih faktora: A (koncentracija PEO), B (koncentracija PVA) i C (koncentracija CB)

#### 4.4.2.2 Predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola iz mukoadhezivnih bukalnih tableta

Razvijen i validiran *in silico* model propranolola je u primenjen za predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola nakon intraoralne primene MBT. Na osnovu adekvatno odabranih ulaznih parametara (Tabela 3.10) i *in vitro* dobijenih profila brzine rastvaranja leka (Slika 4.14), predviđeni su profili koncentracije propranolola u plazmi kod ljudi. Simulacije su sprovedene za slučaj primene jedne doze leka od 10 mg u stanju “na gladno”. U cilju poređenja, predviđena je apsorpcija propranolola nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem 10 mg i 80 mg propranolol-hidrohlorida. Na Slici 4.33 su prikazani predviđeni profili koncentracije propranolola u plazmi u funkciji vremena kod ljudi nakon primene mukoadhezivnih bukalnih tableta sa 10 mg propranolol-hidrohlorida i tableta sa trenutnim oslobađanjem u dozi od 10 mg i 80 mg propranolol-hidrohlorida. *In silico* predviđeni farmakokinetički parametri propranolola su prikazani u Tabeli 4.18.



**Slika 4.33.** Predviđeni profili koncentracije propranolola u plazmi u funkciji vremena za formulacije mukoadhezivnih bukalnih tableta sa 10 mg propranolol-hidrohlorida (F1-F3) i tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida u dozi od 10 mg i 80 mg (profili za formulacije F1-F3 se preklapaju)

Izbor farmaceutskog oblika uticao je na predviđene profile koncentracije propranolola u plazmi (Slika 4.33). Rezultati simulacija su pokazali da je brzina apsorpcije propranolola iz tableta sa trenutnim oslobađanjem gotovo 3 puta veća u poređenju sa MBT, na šta upućuje skoro 3 puta niža vrednost  $t_{max}$  kod tableta sa trenutnim oslobađanjem u poređenju sa MBT. Primećeno je da se primenom mukoadhezivnih bukalnih tableta sa 10 mg propranolol-hidrohlorida očekuju 1,6 puta veće vrednosti  $C_{max}$  u odnosu na tablete sa trenutnim oslobađanjem u istoj dozi (Tabela 4.20). Uočena je takođe značajna razlika u obimu apsorpcije propranolola izraženo kao PIK vrednost. Predviđena PIK vrednost u slučaju primene MBT bila je više od 2,5 puta veća u odnosu na tablete sa trenutnim oslobađanjem pri istoj dozi od 10 mg propranolol-hidrohlorida (Tabela 4.20). Može se primetiti da je simulacijom predviđena potpuna apsorpcija propranolola nakon peroralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem, izraženo kao  $F_a$  vrednost, ali se zbog intenzivnog presistemskog metabolizama u jetri očekuje značajno smanjenje biološke raspoloživosti (izraženo kao  $F_b$  vrednost), i to za više od 2,5 puta.

Iako je na osnovu izračunatih vrednosti faktora sličnosti  $f_2$  uočena razlika između *in vitro* profila brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBT (Slika 4.14), to se nije odrazilo na predviđene profile koncentracije propranolola u plazmi. Naime, simulacijom je zaključeno da apsorpcija propranolola nije osetljiva na uočene razlike u brzini rastvaranja propranolol-hidrohlorida koje su uslovljene razlikama u sastavu formulaje.

Najveća razlika u profilima MBT uočena je kod vrednosti  $t_{max}$  (163 min-182 min). Najbrže oslobađanje propranolol-hidrohlorida postignuto je iz F1, što se odrazilo najmanjom vrednosti  $t_{max}$ , dok je najsporije oslobađanje propranolol-hidrohlorida ostvareno je F3, za koju je predviđena najveća vrednost  $t_{max}$ . Između ostalih farmakokinetičkih parametara nije bilo razlike.



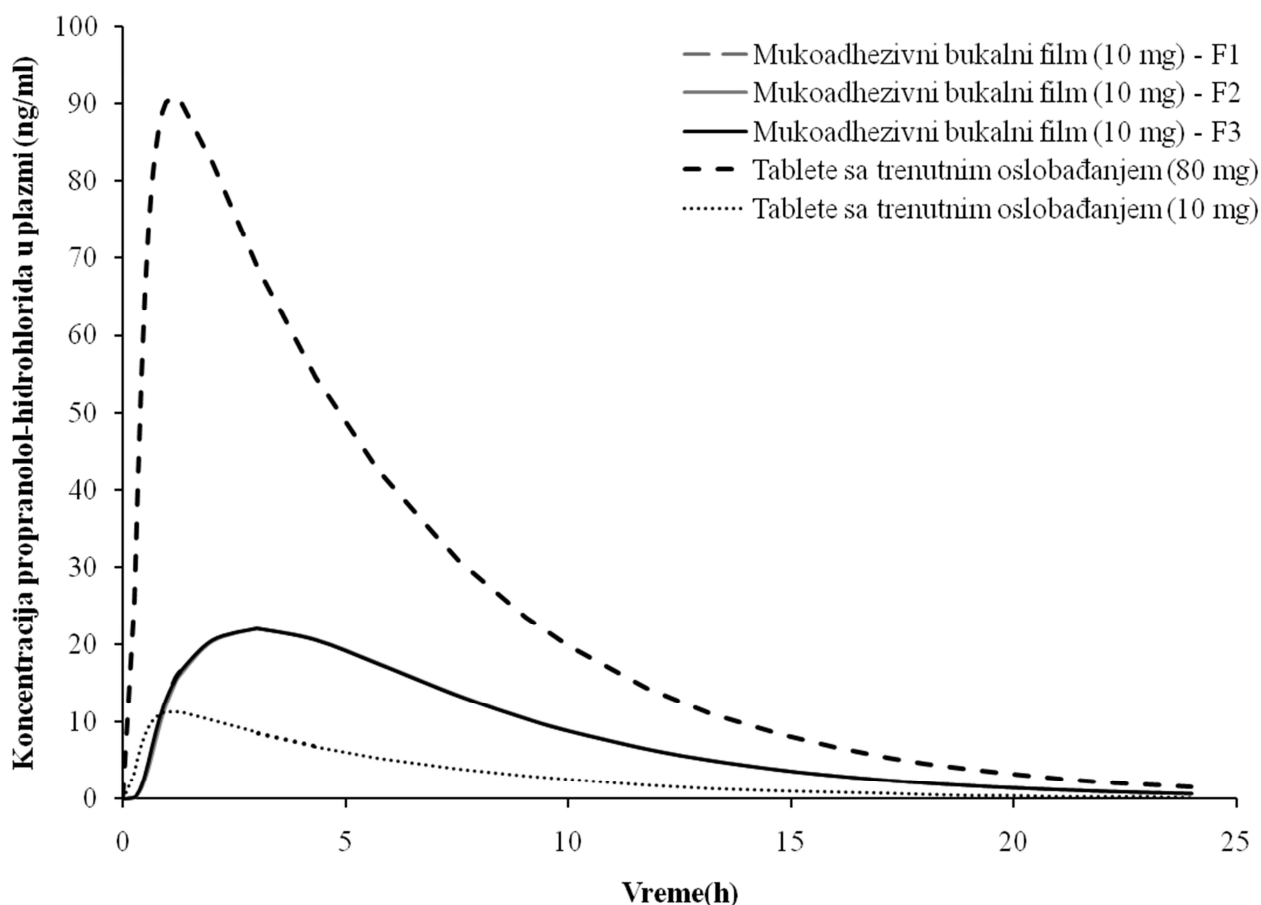
**Tabela 4.20.** Predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara propranolola za ispitivane mukoadhezivne bukalne tablete i tablete sa trenutnim oslobađanjem (IR) propranolol-hidrohlorida

Parametar	Mukoadhezivn abukalna tableta (10 mg) - F1	Mukoadhezivn abukalna tableta (10 mg) - F2	Mukoadhezivn abukalna tableta (10 mg) - F3	80 mg IR tableta	10 mg IR tableta
$C_{max}$ (ng/mL)	18,47	18,53	18,58	91,00	11,37
$t_{max}$ (h)	2,72	2,88	3,04	1,12	1,12
$PIK_{0 \rightarrow t}$ (ng·h/mL)	199,67	199,58	199,48	596,61	74,58
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng·h/mL)	204,05	204,05	204,05	605,11	75,64
$F_a$ (%)	99,99	99,99	99,994	99,87	99,87
$F_b$ (%)	99,98	99,98	99,98	37,06	37,06

$C_{max}$  - maksimalna koncentracija propranolola;  $t_{max}$  - vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije propranolola;  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  - ukupna površina ispod krive koncentracije propranolola do poslednje vremenske tačke;  $PIK_{0 \rightarrow t}$  - ukupna površina ispod krive koncentracije propranolola ekstrapolirajući površinu na beskonačno vreme;  $F_a$  - apsorbovana frakcija propranolola;  $F_b$  - frakcija propranolola koja dospeva u sistemsku cirkulaciju nakon metabolizma prvog prolaza (peroralna biološka raspoloživost).

#### 4.4.2.3 Predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola iz mukoadhezivnih bukalnih filmova

Razvijen i validiran *in silico* model propranolola je u primenjen za predviđanje apsorpcije i dispozicije propranolola nakon intraoralne primene MBF. Na osnovu adekvatno odabranih ulaznih parametara (Tabela 3.10) i *in vitro* dobijenih profila brzine rastvaranja leka (Slika 4.18), predviđeni su profili koncentracije propranolola u plazmi kod ljudi. Simulacije su sprovedene za slučaj primene jedne doze leka od 10 mg u stanju “na gladno”. U cilju poređenja, predviđena je apsorpcija propranolola nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem 10 mg i 80 mg propranolol-hidrohlorida. Na Slici 4.34 su prikazani predviđeni profili koncentracije propranolol u plazmi u funkciji vremena kod ljudi nakon primene MBF sa 10 mg propranolol-hidrohlorida i tableta sa trenutnim oslobađanjem u dozi od 10 mg i 80 mg propranolol-hidrohlorida. Relevantni farmakokinetički parametri su prikazani u Tabeli 4.21.



**Slika 4.34.** Predviđeni profili koncentracije propranolola u plazmi u funkciji vremena za formulacije mukoadhezivnih bukalnih filmova sa 10 mg propranolol-hidrohlorida (F1-F3) i tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida u dozi od 10 mg i 80 mg (profili za formulacije F1-F3 se preklapaju)

**Tabela 4.21.** Predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara propranolola za ispitivane mukoadhezivne bukalne filmove i tablete sa trenutnim oslobađanjem (IR) propranolol-hidrohlorida

Parametar	Mukoadhezivni bukalni film-F1	Mukoadhezivni bukalni film-F2	Mukoadhezivni bukalni film-F3	80 mg IR tableta	10 mg IR tableta
$C_{max}$ (ng/mL)	22,04	22,04	22,05	91,00	11,37
$t_{max}$ (h)	3,04	3,04	2,96	1,12	1,12
$PIK_{0 \rightarrow t}$ (ng·h/mL)	200,17	200,16	200,19	596,61	74,58
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng·h/mL)	204,04	204,04	204,04	605,11	75,64
$F_a$ (%)	99,99	99,99	99,99	99,87	99,87
$F_b$ (%)	99,98	99,98	99,98	37,06	37,06

$C_{max}$ -maksimalna koncentracija propranolola;  $t_{max}$ -vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije propranolola;  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ -ukupna površina ispod krive koncentracije propranolola do poslednje vremenske tačke;  $PIK_{0 \rightarrow t}$ -ukupna površina ispod krive koncentracije propranolola ekstrapolirajući površinu na beskonačno vreme;  $F_a$ -apsorbovana frakcija propranolola;  $F_b$ -frakcija propranolola koja dospeva u sistemsku cirkulaciju nakon metabolizma prvog prolaza (peroralna biološka raspoloživost).

Zapažanja po pitanju predviđenih profila koncentracije propranolola u plazmi slična su kao za MBT. Očekivana brzina apsorpcije propranolola iz tableta sa trenutnim oslobađanjem je gotovo 3 puta veća u poređenju sa MBF, na šta upućuje skoro 3 puta niža vrednost  $t_{max}$  kod tableta sa trenutnim oslobađanjem u poređenju sa MBF (Tabela 4.21). Primećeno je da se primenom MBF sa 10 mg propranolol-hidrohlorida postižu duplo veće vrednosti  $C_{max}$  u odnosu na tablete sa trenutnim oslobađanjem u istoj dozi (Tabela 4.21). Uočena je takođe značajna razlika u obimu apsorpcije propranolola izraženo kao PIK vrednost. Predviđena PIK vrednost u slučaju primene MBF bila je oko 2,5 puta veća u odnosu na tablete sa trenutnim oslobađanjem pri istoj dozi od 10 mg propranolol-hidrohlorida (Tabela 4.21). Može se primetiti da je simulacijom predviđena potpuna apsorpcija propranolola nakon peroralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem (izraženo kao  $F_a$  vrednost), ali se usled intenzivnog presistemskog metabolizma u jetri očekuje značajno smanjenje biološke raspoloživosti (izraženo kao  $F_b$  vrednost), i to za više od 2,5 puta. Dobro je poznato da biološka raspoloživost propranolola zavisi od stepena metabolizma u jetri [234]. Rezultati simulacija pokazuju da se presistemski metabolizam u jetri, kao glavna prepreka efikasnoj isporuci leka, može smanjiti/izbeći odabirom drugog puta primene leka kao što je bukalni (intraoralni) put. Na osnovu izračunatih vrednosti faktora sličnosti  $f_2$  nije uočena razlika između *in vitro* profila brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz MBF (Slika 4.18), odnosno dobijeni *in vitro* profili brzine rastvaranja su međusobno slični, što se odrazilo na predviđene profile koncentracije propranolola u plazmi. Rezultati simulacija pokazuju da se profili koncentracije propranolola za formulacije F1-F3 preklapaju, odnosno da apsorpcija propranolola nije osetljiva na razlike u sastavu formulaje.

T-test za nezavisne uzorke je primenjen u cilju poređenja  $C_{max}$  vrednosti kod MBT i MBF. Otkrivena je značajna razlika u vrednostima  $C_{max}$  između ispitivanih MBT i MBF ( $t(4) = 109,9$ ,  $p < 0,001$ ). Srednja  $C_{max}$  vrednost kod MBF 22,04 ng/mL bila je značajno veća u poređenju sa srednjom  $C_{max}$  vrednosti kod MBT 18,53 ng/mL. Između ostalih farmakokinetičkih parametara nije bilo statistički značajne razlike.

Bilo bi korisno kada bi se OCCAT™ model mogao validirati poređenjem *in vivo* uočenog profila koncentracije lekovite supstance u plazmi kod pacova sa predviđenim profilom koncentracije lekovite supstance kod pacova, ali trenutno, OCCAT™ model nije razvijen za model pacova. Trenutno dostupni OCCAT™ modeli uključuju fiziologiju ljudi, majmuna, pasa i zečeva [235]. Rezultati *in silico* modelovanja i simulacija pružaju dodatni doprinos razumevanju mukoadhezivnih bukalnih farmaceutskih oblika lekova.

### 4.4.3 Analiza glavnih komponentata (PCA) karakteristika mukoadhezivnih bukalnih tableta

Analiza glavnih komponentata (PCA) sprovedena je kako bi se ocenio međusobni uticaj karakteristika MBT i grupisanje uzoraka MBT na osnovu rezultata njihove sveobuhvatne karakterizacije.

Primenom PCA metode, uzorci MBT sa propranolol-hidrohloridom mogu da se identifikuju na osnovu izmerenih farmaceutsko-tehnoloških parametara, pa ovakav pristup, koji podrazumeva međuzavisnost između promenljivih, omogućava razlikovanje uzoraka tableta dobijenih pri različitom sastavu formulacije.

Doprinos varijabli - udeo rastvorenog propranolol-hidrohloridana u 30-om, 60-om, 180-om i 360-om minutu (d30, d60, d180, d360); udeo permeiranog propranolol-hidrohlorida u 30-om, 60-om, 180-om i 360-om minutu (p30, p60, p180, p360); sadržaj PEO u formulaciji (PEO); sadržaj PVA u formulaciji (PVA); sadržaj CB u formulaciji (CB); sila odvajanja (indikator mukoadhezije - MUC); *in silico* predviđena vrednost maksimalne koncentracije propranolol-hidrohlorida u plazmi kod ljudi ( $C_{max}$ ); *in silico* predviđena vrednost vremena za koje se postigne maksimalna koncentracija propranolol-hidrohlorida u plazmi kod ljudi ( $t_{max}$ ) na izračunavanje glavnih komponentata za MBT prikazan je u Tabeli 4.22.

**Tabela 4.22.** PCA analiza doprinosa varijabli na izračunavanje glavnih komponentata za mukoadhezivne bukalne tablete

Varijable	Glavna komponenta 1	Glavna komponenta 2	Glavna komponenta 3
d30	<b>0,30380</b>	-0,13833	-0,04567
d60	<b>0,28984</b>	-0,19367	-0,10508
d180	<b>0,31942</b>	-0,01852	-0,01375
d360	<b>0,29641</b>	-0,01157	-0,11484
p30	<b>0,28698</b>	0,03794	-0,11589
p60	<b>0,29662</b>	0,12376	-0,14409
p180	<b>0,31214</b>	0,07519	-0,15928
p360	<b>0,31306</b>	0,06386	-0,16623
PEO	0,05817	<b>0,68191</b>	-0,27114
PVA	0,19065	<b>-0,55309</b>	0,09152
CB	<b>-0,25488</b>	-0,14572	0,18883
MUC	0,04153	0,34399	<b>0,70364</b>
$C_{max}$	<b>0,27897</b>	0,05792	0,39080
$t_{max}$	<b>-0,28946</b>	-0,05055	-0,34771

Na izračunavanje prve glavne komponente (PC1) najviše su uticale varijable d30, d60, d180, d360, p30, p60, p180, p360, CB,  $C_{max}$  i  $t_{max}$ . čiji je doprinos približno isti, dok su PEO i PVA najviše uticali na izračunavanje druge glavne komponente (PC2), a MUC je najviše uticao na izračunavanje treće glavne komponente (PC3).

Kako je analiza zasnovana na korelacionoj matrici, koeficijente možemo posmatrati kao koeficijente korelacije između odgovarajuće varijable i glavne komponente. Zaključujemo da je PC1 pozitivno korelisana sa varijablama koje se odnose na brzinu rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida kao i sa maksimalnom koncentracijom propranolol-hidrohlorida u plazmi ( $C_{max}$ ), dok je sa varijablama  $t_{max}$ , CB i MUC negativno korelisana. PC2 je u pozitivnoj korelaciji sa varijablama koje se odnose na permeaciju propranolol-hidrohlorida, PEO, MUC i  $C_{max}$ , dok je negativno korelisana sa varijablama

koje se odnose na brzinu rastvaranja propranolol-hidrohlorida, PVA, CB i  $t_{max}$ . PC3 je u pozitivnoj korelaciji sa PVA, CB, MUC i  $C_{max}$ , dok je u negativnoj korelaciji sa promenljivim koje se odnose na brzinu rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida, PEO i  $t_{max}$ .

Iz [Tabele 4.23](#) uočava se da prve dve glavne komponente prikazuju (objašnjavaju) 80,44% ukupne varijabilnosti, dok prve tri glavne komponente prikazuju 90,68% ukupne varijabilnosti, što se smatra dovoljnim za prikaz celokupne varijabilnosti karakteristika MBT.

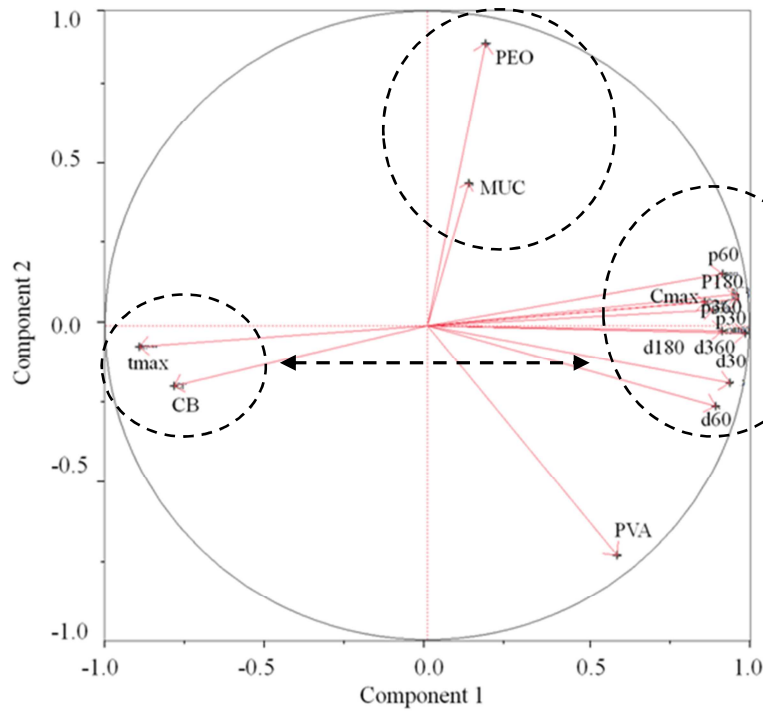
**Tabela 4.23.** Karakteristične svojstvene vrednosti korelacione matrice i procenti objašnjene varijabilnosti počenog skupa podataka

Redni broj glavne komponente	Svojstvena vrednost	Ukupna varijabilnost (%)	Kumulativna varijabilnost (%)
1	9,5243	68,031	68,031
2	1,7370	12,407	80,438
3	1,4338	10,242	90,680
4	0,7788	5,563	96,243
5	0,3023	2,159	98,402
6	0,1611	1,150	99,552
7	0,0416	0,297	99,849
8	0,0094	0,067	99,916
9	0,0069	0,049	99,965
10	0,0028	0,020	99,985
11	0,0013	0,010	99,994
12	0,0008	0,006	100,000
13	0,0000	0,000	100,000

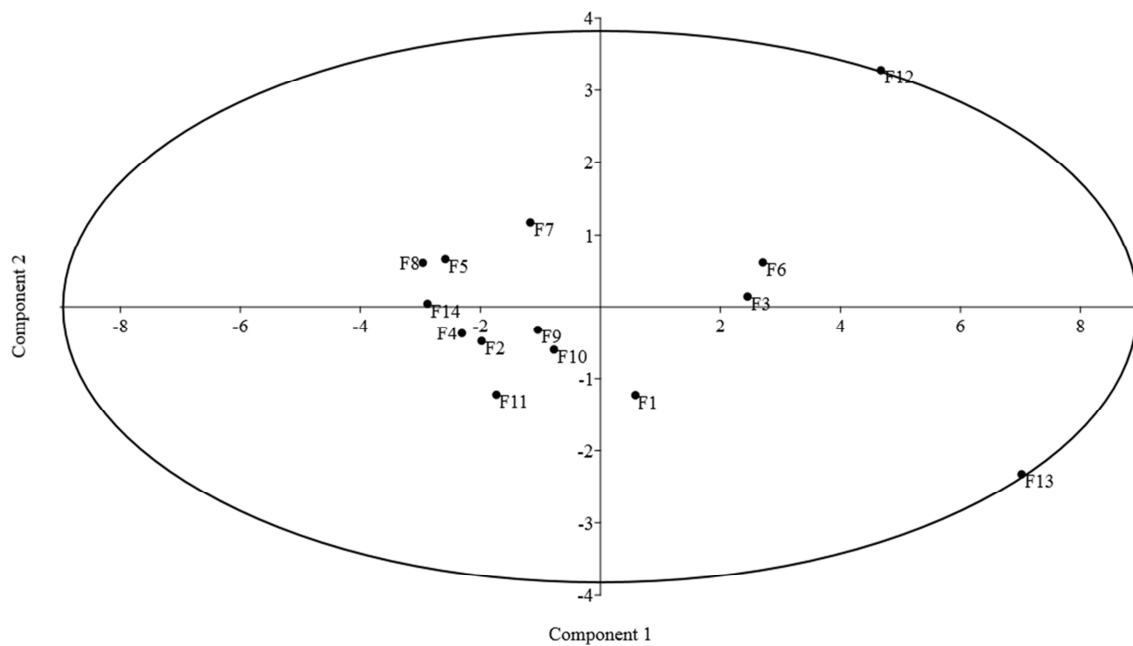
Rezultati PCA analize prikazani su dijagramom na [Slikama 4.35-4.36](#). Na [Slici 4.35a](#) prikazan je dijagram opterećenja (engl. *loading plot*) koji prikazuje raspored polova (varijabli) i korelaciju varijabli u ravni glavnih komponenata. U smeru rasta polova, rastu i merene vrednosti datih promenljivih, za određene uzorke. PCA analiza je pokazala da su varijable koje se odnose na udeo rastvorenog i permeiranog propranolol-hidrohlorida i  $C_{max}$  u pozitivnoj korelaciji. Potom, da su udeo PEO polimera i sila mukoadhezije (MUC), kao i udeo CB i  $t_{max}$  u pozitivnoj korelaciji ([Slika 4.35a](#), prikazano isprekidanim krugom), dok su udeo CB i  $t_{max}$  sa jedne strane, i varijable koje se odnose na udeo rastvorenog i permeiranog propranolol-hidrohlorida i  $C_{max}$ , sa druge strane, u negativnoj korelaciji ([Slika 4.35a](#), prikazano isprekidanom strelicom).

Na [Slici 4.35b](#) prikazan je raspored uzoraka MBT u u faktorskoj ravni, dok [Slika 4.36a](#) prikazuje zajednički raspored ispitivanih varijabli i uzoraka MBT u ravni PC1 i PC2. Kako je rečeno da u smeru rasta polova rastu i merene vrednosti datih promenljivih, za određene uzorke, tako uzorak 12 ima veći udeo PEO polimera i veću vrednost sile mukoadhezije, dok uzorak 13 ima veći udeo PVA polimera. Uzorci na desnoj strani grafika (1, 3, 6, 12, 13) imaju veće vrednosti udela rastvorenog i permeiranog propranolol-hidrohlorida, kao i veće  $C_{max}$  vrednosti. Uzorci na levoj strani grafika (2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 14) imaju veći sadržaj CB i veće  $t_{max}$  vrednosti ([Slika 4.35b](#)). Promenljive  $C_{max}$  i  $t_{max}$  su raspoređene na suprotnim krajevima, tako da uzorci sa visokom  $C_{max}$  vrednošću imaju nizak  $t_{max}$  i obrnuto važi ([Slika 4.35a](#)). Na [Slici 4.36b](#) je prikazan raspored varijabli i formulacija MBT u sistemu PC1 i PC3, dok je na [Slici 4.36c](#) prikazan njihov raspored u sistemu PC2 i PC3. Uzorci na gornjoj strani [Slika 4.36b-4.36c](#) (1, 3, 7, 9, 10, 14) imaju veće vrednosti sile mukoadhezije (MUC).

(a)

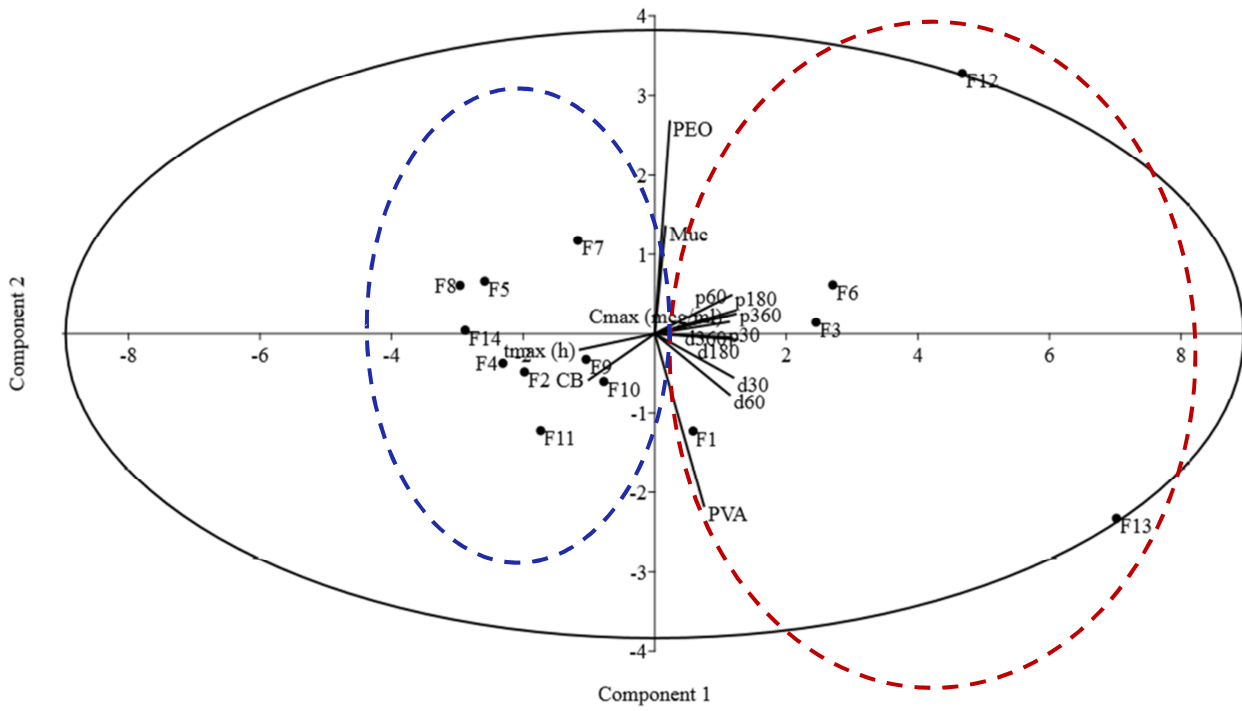


(b)

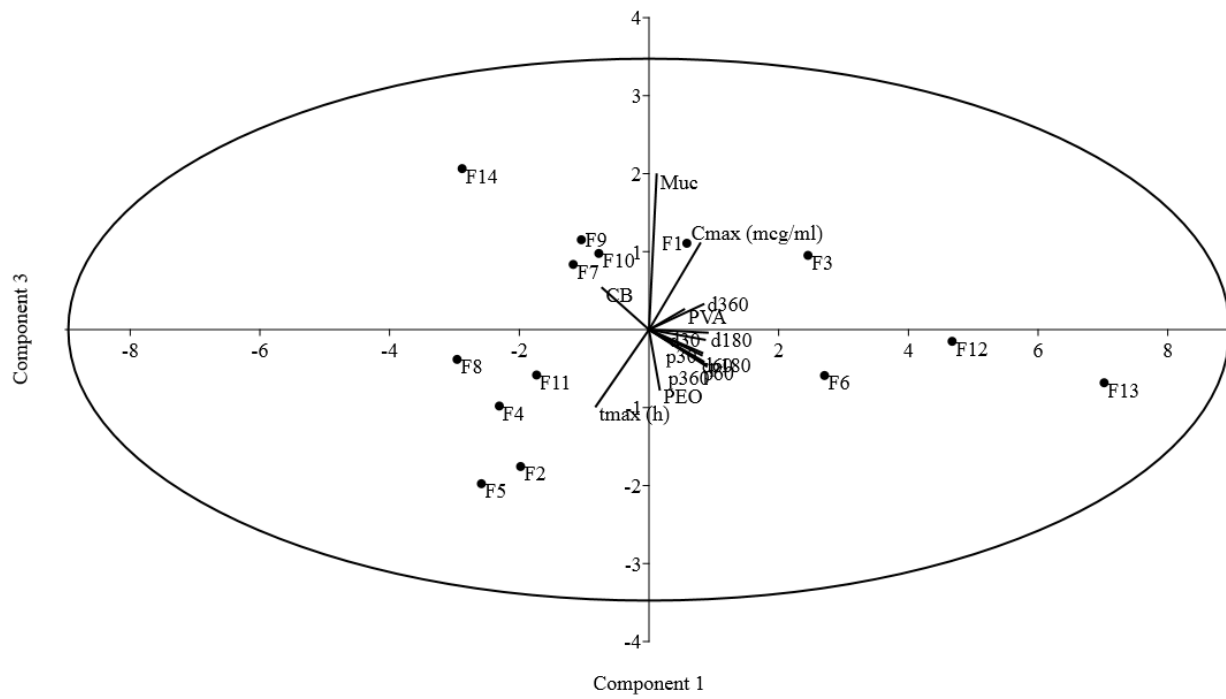


**Sika 4.35.** Analiza glavnih komponenata (PCA) za ispitivane mukoadhezivne bukalne tablete: (a) korelacioni dijagram opterećenja (engl. *loading plot*) koji prikazuje korelaciju između varijabli u ravni prve dve glavne komponente i (b) grafik skorova (engl. *score plot*) koji prikazuje raspored uzoraka mukoadhezivnih bukalnih tableta (MBT) u ravni prve dve glavne komponente

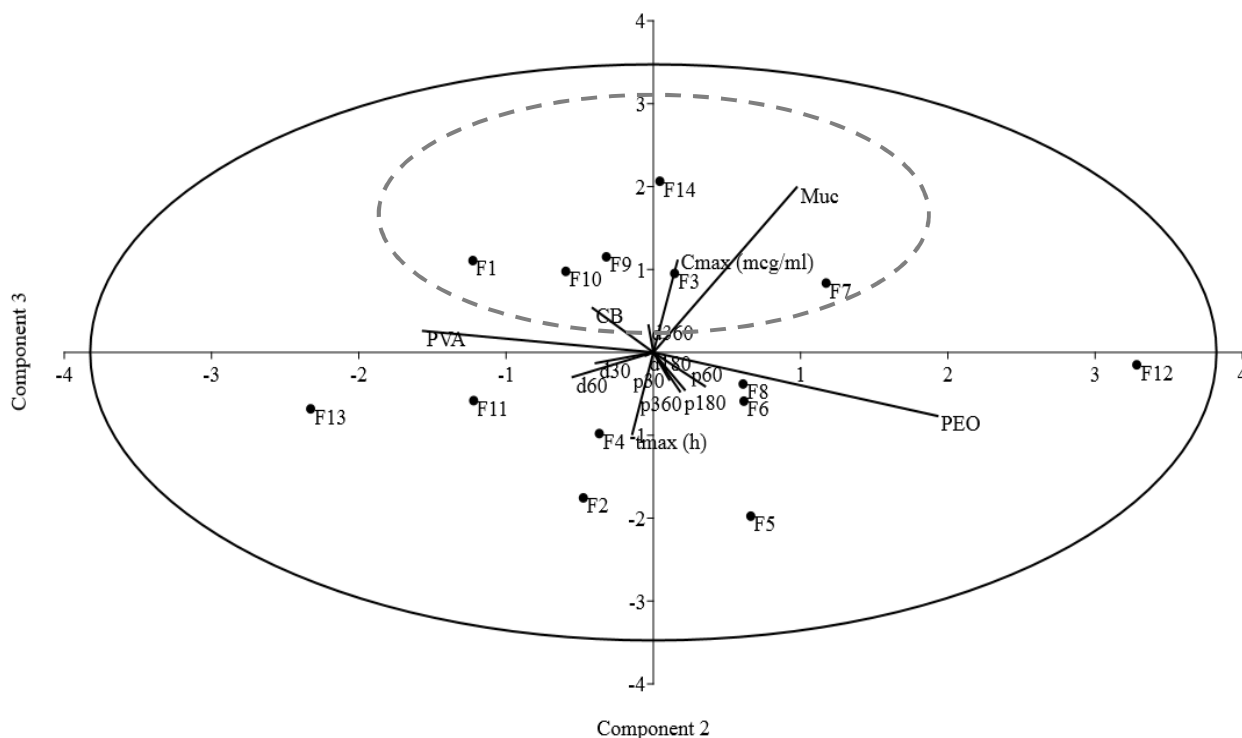
(a)



(b)



(c)



**Slika 4.36.** Analiza glavnih komponenata (PCA) za ispitivane mukoahезivne bukalne tablete - *scatter biplot* grafik sa rasporedom varijabli i uzoraka mukoahезivnih bukalnih tableta u ravni glavnih komponenata: (a) PC1 i PC2; (b) PC1 i PC3 i (c) PC2 i PC3.

Upotreba PCA analize otkrila je prisustvo tri grupe uzoraka MBT: grupa MBT sa najvećim vrednostima brzine rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida i najmanjim vrednostima  $t_{max}$ ; grupa MBT sa najmanjim vrednostima brzine rastvaranja i permeacije propranolol-hidrohlorida i najvećim vrednostima  $t_{max}$ ; grupa MBT sa najvećim vrednostima sile mukoahезije (MUC).

#### 4.4.4 Analiza glavnih komponenata (PCA) karakteristika mukoahезivnih bukalnih filmova

Analiza glavnih komponenata (PCA) sprovedena je kako bi se ocenio međusobni uticaj karakteristika MBF i grupisanje uzoraka MBF na osnovu rezultata njihove sveobuhvatne karakterizacije.

Uticaj varijabli, kao što su sadržaj HPMC i PEO polimera; udeo rastvorenog i permeiranog propranolol-hidrohlorida u 30-om, 60-om, 120-om i 240-om minutu; zatezna čvrstina (TS); *Young*-ovo modul elastičnosti (YM); procenat izduženja pri kidanju (EB); jačina mukoahезivne veze (MUC); *in silico* predviđene vrednosti maksimalne koncentracije propranolol-hidrohlorida u plazmi kod ljudi ( $C_{max}$ ); *in silico* predviđena vrednost vremena za koje se postiže maksimalna koncentracija propranolol-hidrohlorida u plazmi kod ljudi ( $t_{max}$ ) na izračunavanje glavnih komponenata za MBF prikazan je u [Tabeli 4.24](#).



Formiranju prve glavne komponente (PC1) najviše su doprineli YM, udeo permeiranog leka u 120-om minutu (p120), sadržaj HPMC i PEO polimera, MUC,  $C_{max}$  i  $t_{max}$ , dok su formiranju druge glavne komponente (PC2) najveći doprinos imali TS, udeo rastvorenog leka u 30-om i 120-om minutu (d30, d120), udeo permeiranog leka u 30-om i 60-om minutu (p30, p60). PC1 objašnjava više od 60% ukupne varijabilnosti uzoraka, dok prve dve glavne komponente objašnjavaju 100% ukupne varijabilnosti uzoraka (Tabela 4.25).

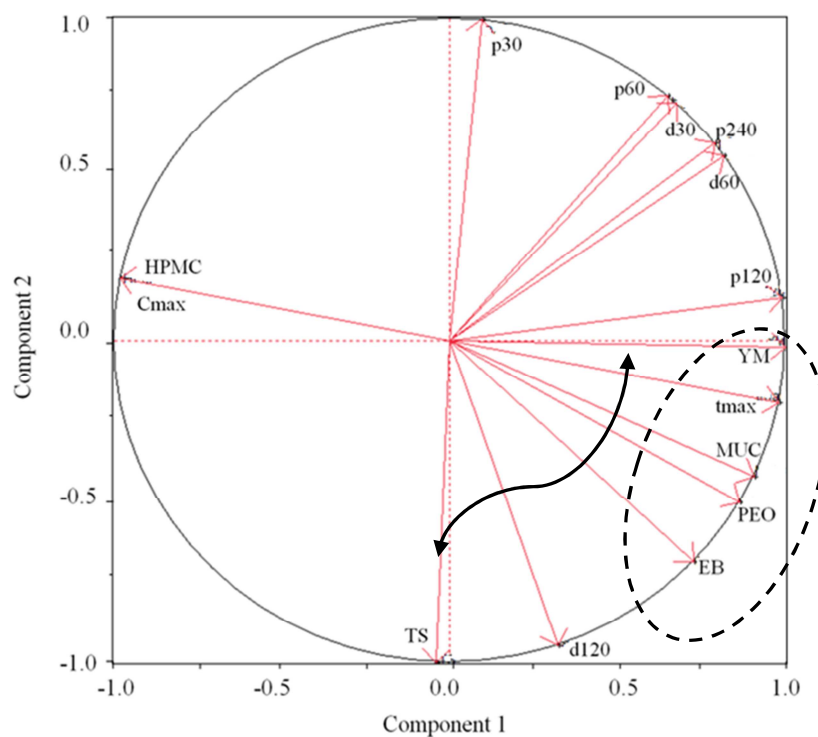
**Tabela 4.24.** PCA analiza doprinosa varijabli na izračunavanje glavnih komponentata za mukoadhezivne bukalne filmove

Varijable	Glavna komponenta 1	Glavna komponenta 2
HPMC	<b>-0,32258</b>	0,08101
PEO	<b>0,28390</b>	-0,21042
d30	0,22219	<b>0,30736</b>
d60	0,26905	0,23972
d120	0,10595	<b>-0,39469</b>
p30	0,03214	<b>0,41493</b>
p60	0,21328	<b>0,31734</b>
p120	<b>0,32588</b>	0,05588
p240	0,25981	0,25559
TS	-0,01294	<b>-0,41660</b>
YM	<b>0,32878</b>	-0,00837
EB	0,23890	-0,28651
MUC	<b>0,29779</b>	-0,17687
$C_{max}$	<b>-0,32258</b>	0,08101
$t_{max}$	<b>0,32258</b>	-0,08101

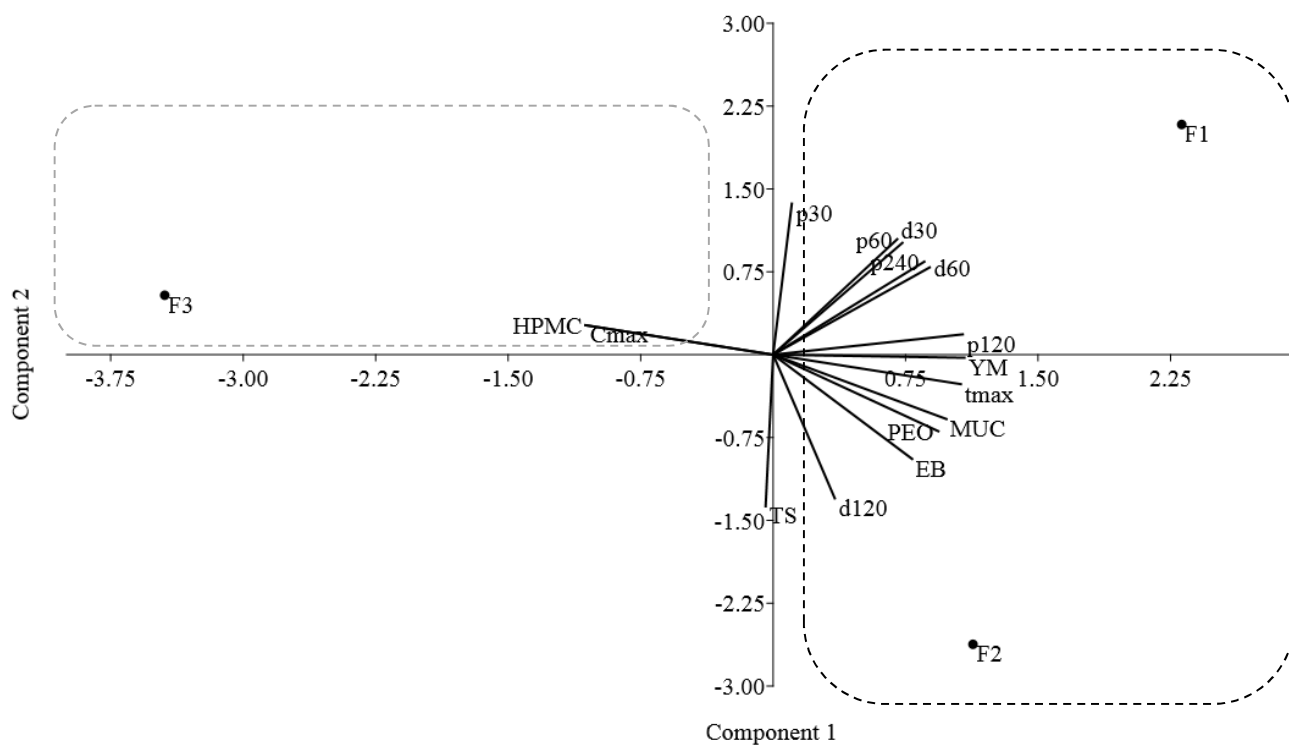
**Tabela 4.25.** Karakteristične svojstvene vrednosti korelacione matrice i procenti objašnjene varijabilnosti počenog skupa podataka

Redni broj glavne komponente	Svojstvena vrednost	Ukupna varijabilnost (%)	Kumulativna varijabilnost (%)
<b>1</b>	<b>9,24713</b>	<b>61,648</b>	<b>61,648</b>
<b>2</b>	<b>5,75287</b>	<b>38,352</b>	<b>100,000</b>

(a)



(b)



**Slika 4.37.** Analiza glavnih komponenta (PCA) za ispitivane mukoahезivne bukalne filmove: (a) korelacioni dijagram opterećenja (engl. *loading plot*) koji prikazuje korelaciju između originalnih

varijabli i prve i druge glavne komponente i (b) *scatter biplot* grafik sa rasporedom varijabli i formulacija mukoadhezivnih bukalnih filmova u ravni prve i druge glavne komponente

Rezultati PCA analize za MBF prikazani su dijagramom na [Slici 4.37](#). Na [Slici 4.37a](#) prikazan je dijagram opterećenja (engl. *loading plot*) koji prikazuje raspored polova (varijabli) i korelaciju varijabli u ravni glavnih komponenata. U smeru rasta polova, rastu i merene vrednosti datih promenljivih za određene uzorke. PCA analiza je pokazala da su varijable YM, EB, sadržaj polimera i MUC u pozitivnoj korelaciji ([Slika 4.37a](#), prikazano isprekidanim krugom). Uočeno je da su  $C_{max}$  i sadržaj HPMC u negativnoj korelaciji sa  $t_{max}$ , kao i YM i TS ([Slika 4.37a](#), prikazano strelicom).

U pozitivnom delu prve ose (PC1) su se izdvojile formulacije F1 i F2 koje karakteriše veći *Young*-ov modul, veća sila mukoadhezije i veći sadržaj PEO polimera, dok se u negativnom delu prve ose izdvojila formulacija F3 koja je imala najveći udeo HPMC. Ukoliko se sagleda raspored (projekcija) uzoraka MBF u odnosu na varijable značajne u formiranju PC1 i PC2, uočava se da je raspored uzorka broj 2 takav da je najbliži varijablama EB, TS, MUC,  $t_{max}$  i PEO ukazujući na veće vrednosti ovih varijabli kod formulacije F2. Ova metoda multivarijantne analize otkriva da uzorak MBF F2 ima najbolja mehanička i mukoadhezivna svojstva.

5

## **ZAKLJUČAK**

U okviru ove disertacije sprovedena su opsežna ispitivanja sa ciljem razvoja mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova sa propranolol-hidrohloridom, kao i njihova farmaceutsko-tehnološka i biofarmaceutska karakterizacija. Mukoadhezivni bukalni farmaceutski oblici lekova omogućavaju produženu isporuku lekovite supstance zahvaljujući produženom kontaktu sa bukalnom sluzokožom usne duplje. Bukalnom primenom lekovita supstanca dolazi u sistemsku cirkulaciju kroz jugularnu venu, čime se zaobilazi potencijalna degradacija ili neželjeni efekti na nivou želuca i smanjuje metabolizam prvog prolaza. Često korišćeni ekscipijensi u formulaciji mukoadhezivnih farmaceutskih oblika lekova su hidrofilni polimeri, dok se relativno jednostavna strategija za kombinovanje polimera sa različitim karakteristikama može koristiti za optimizaciju formulacije. Na taj način se primenom mukoadhezivnog farmaceutskog oblika na bukalnu sluzokožu može poboljšati apsorpcija lekovite supstance, što je od velikog značaja za lekovite supstance niske biološke raspoloživosti. Jedna od takvih lekovitih supstanci je propranolol-hidrohlorid. Da bi se postigao odgovarajući terapijski efekat, obično je potrebno učestalo doziranje konvencionalnih farmaceutskih oblika lekova (3-4 puta dnevno), što čini propranolol-hidrohlorid dobrim kandidatom za razvoj proizvoda sa modifikovanim oslobađanjem. Pripada grupi I Biofarmaceutskog sistema klasifikacije lekovitih supstanci (BSK), sa svojim doznim brojem ( $Do = 0,02$ ) i obimom peroralne apsorpcije od  $95 \pm 5\%$ , što ga svrstava u grupu visoko rastvorljivih i visoko permeabilnih lekovitih supstanci. Međutim, obiman metabolizam prvog prolaza u jetri nakon peroralne primene jer razlog niske biološke raspoloživosti koja se kreće između 15% i 25%. U okviru sprovedenih istraživanja ove disertacije prikazan je razvoj mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova, a na osnovu dobijenih rezultata je doneto više zaključaka iznetih u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja.

- U prvoj fazi istraživanja primenom eksperimentalnog dizajna - dizajna smeše, generisan je eksperimenatalni plan sa 14 formulacija mukoadhezivnih bukalnih tableta sa modifikovanim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida koristeći polietilenoksidni polimer (PEO), polivinilalkohol (PVA) i karbomer (CB) kao mukoadhezivne polimere. Mukoadhezivne bukalne tablete su uspešno izrađene metodom direktne kompresije u dva koraka na ekscenter tablet mašini. FT-IR analiza je pokazala da između propranolol-hidrohlorida i ostalih ekscipijenasa nije bilo hemijskih interakcija. Izrađene mukoadhezivne bukalne tablete su zadovoljile farmakopejske zahteve u pogledu variranja mase, ujednačenosti sadržaja lekovite supstance i friabilnosti, a pokazale su uniformnu debljinu i zateznu čvrstinu. *In vitro* određena sila odvajanja je bila između 1,03 i 2,26 N, što ukazuje da izrađene mukoadhezivne bukalne tablete imaju zadovoljavajuća mukoadhezivna svojstva. Primenom D-optimalnog eksperimentalnim dizajna, dobijen je linearan matematički model koji opisuje uticaj vrste i udela odabranih polimera kao nezavisnih varijabli na silu odvajanja kao zavisne varijable, a koji je ukazao da najveći pozitivni uticaj na silu odvajanja ima koncentracija CB, a potom koncentracija PEO polimera.
- Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz izrađenih mukoadhezivnih bukalnih tableta pokazali su da se najbrže rastvaranje propranolol-hidrohlorida postiže iz formulacije F13 koja sadrži samo PVA gde se više od 90% propranolol-hidrohlorida oslobodilo nakon 60 minuta. Potpuno rastvaranje propranolol-hidrohlorida posle 360 minuta ispitivanja postignuto je iz formulacija F6 i F12 koje nisu sadržale CB u formulaciji, već visoke udele PEO polimera samog ili u kombinaciji sa PVA. Najsporije rastvaranje propranolol-hidrohlorida postignuto je iz formulacija F4, F8 i F14, koje sadrže visoke udele CB, iz kojih se nakon 360 minuta ispitivanja do 45% lekovite supstance. Dobijeni kvadratni i specijalni kubni matematički modeli koji opisuju uticaj vrste i udela odabranih polimera kao nezavisnih varijabli na količinu rastvorenog propranolol-hidrohlorida u toku vremena, ukazuju da najveći uticaj na količinu rastvorenog propranolol-hidrohlorida imaju koncentracija PVA, potom PEO i na kraju CB, kao i njihove interakcije.
- Kinetika oslobađanja propranolol-hidrohlorida iz svih formulacija, izuzev F13, najbolje se uklapa u *Peppas-Sahlin* model, na osnovu statistički najviših vrednosti  $R^2$  i najnižih AIC vrednosti, što ukazuje da se oslobađanje propranolol-hidrohlorida odvija anomalnim mehanizmom transporta koji predstavlja kombinaciju mehanizama difuzije i erozije. To ide u prilog teorijskom objašnjenju da kod hidrofilnih matriks sistema preovlađuje bimodalno oslobađanje, koje kombinuje procese *Fick*-ove difuzije i erozije, odnosno relaksacije polimernih lanaca (Tip II relaksacija).

- Prikazana mogućnost korišćenja aparature sa cilindrom sa povratnim kretanjem (USP aparatura 3) sa ciljem *in vitro* ispitivanja brzine permeacije propranolola koristeći sintetičku hidrofobnu membranu (Whatman® Nuclepore™, veličina pora 0,1 μm), što do sada nije opisano u literaturi. Najbrža permeacija propranolol-hidrohlorida postignuta je iz formulacija F6, F12 i F13 koje nisu sadržale CB u formulaciji, već visoke udele PEO polimera samog ili u kombinaciji sa PVA.
- Pored toga, u prvoj fazi istraživanja u okviru preformulacione studije ispitana je mogućnost izrade mukoadhezivnih bukalnih filmova metodom izlivanja polimerne disperzije i uparavanja rastvarača koristeći kombinacije PEO, HPMC i PVA kao film-formirajućih polimera u različitim koncentracijama, i propilenglikol kao plastifikator, u cilju dobijanja optimalnih mukoadhezivnih filmova namenjenih za bukalnu isporuku propranolol-hidrohlorida. Najbolja organoleptička svojstva u pogledu homogenosti i glatkoće filma, lakoće vađenja iz kalupa, sečenja, savitljivosti i krтости filma od ukupno dizajnirane 21 film-formulacije izdvojile su se 3 formulacije koje su sadržale PVA u koncentraciji od 1,5%, PEO u koncentraciju od 2%, 3% i 3,5% i HPMC u koncentraciji od 0,5% i 1,5% i propilenglikol u koncentraciji od 2%. Koncentracija propranolol-hidrohlorida je podešena na 2%, kako bi se dobili filmovi sa sadržajem propranolol-hidrohlorida od 10 mg/cm<sup>2</sup>. FT-IR analiza je pokazala da između propranolol-hidrohlorida i ostalih ekscipijenasa nije bilo hemijskih interakcija. Mikroskopske analize (polarizaciona mikroskopija i SEM) su pokazale homogenost površine i poprečnog preseka filmova kao i prisustvo kristala propranolol-hidrohlorida u formiranom filmu.
- Tokom druge faze istraživanja izvršeni su detaljni farmaceutsko-tehnološki postupci ispitivanja optimalnih formulacija filmova koji su odabrani u prvoj fazi istraživanja, a koji su u ovoj fazi označeni sa F1, F2 i F3. Sadržaj propranolol-hidrohlorida u izrađenim mukoadhezivnim bukalnim filmovima dimenzija 1 x 1 cm bio je 20% m/m, odnosno 10 mg/cm<sup>2</sup>. Mukoadhezivni bukalni filmovi zadovoljili su farmakopejski zahtev u pogledu variranja mase i ujednačenosti sadržaja lekovite supstance koji se odnose na tablete usled nedostatka literaturnih podataka za filmove za intraoralnu primenu.
- Mehanička svojstva filmova, kao važan kritični atribut kvaliteta, procenjena su određivanjem zatezne čvrstine, izduženja pri kidanju i *Young*-ovog modula. Filmovi sa propranolol-hidrohloridom su imali visoke vrednosti zetezne čvrstine koja je bila između 1,8 MPa i 2,9MPa; visoke vrednosti izduženja pri kidanju koje je bilo između 70% i 200% i niske vrednosti *Young*-ov modula u rasponu od 30MPa do 80MPa. Jačina vezivanja mukoadhezivnih bukalnih filmova je bila između 657 mN/cm<sup>2</sup> i 876 mN/cm<sup>2</sup>. Pimećeno je da je inkorporiranje propranolol-hidrohlorida u film dovelo do smanjenja mukoadhezivnosti, kao i svih parametara za procenu mehaničkih svojstava.
- Rezultati *in vitro* brzine rastvaranja lekovite supstance su ukazali da se celokupna količina propranolol-hidrohlorida oslobodila u toku 120 minuta, kao i da su dobijeni profili oslobađanja međusobno slični (F1 i F2:  $f_2 = 64$ ; F1 i F3:  $f_2 = 62$ ; F2 i F3:  $f_2 = 78$ ). Kinetika oslobađanja propranolol-hidrohlorida iz ovih formulacija najbolje se uklapa u model prvog reda, što znači da promena koncentracije u toku vremena zavisi samo od koncentracije lekovite supstance.
- Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine permeacije ukazali su da je nakon 120 minuta permeiralo oko 35% propranolol-hidrohlorida. Mukoadhezivni bukalni filmovi formulacije F2 odabrani su za dalja *in vivo* ispitivanja na spontano hipertenzivnim pacovima *Okamoto-Aoki* soja jer su rezultati pokazali da su ovi filmovi zadovoljili farmakopejski zahtev u pogledu variranja mase i ujednačenosti sadržaja lekovite supstance, imali najbolja mukoadhezivna i mehanička svojstva - najveća vrednost sile odvajanja odnosno jačine adhezije, najveće vrednosti zatezne čvrstine i izduženja pri kidanju, a čiji je profil oslobađanja sličan ostalim ispitivanim formulacijama mukoadhezivnih bukalnih filmova.
- U toku druge faze izvršeni su detaljni farmaceutsko-tehnološki postupci ispitivanja mukoadhezivnih bukalnih tableta na bazi PEO polimera, a koji su u ovoj fazi označeni sa F1, F2 i F3. Sadržaj propranolol-hidrohlorida u izrađenim mukoadhezivnim bukalnim tabletama prečnika 3 mm bio je 40% m/m. Mukoadhezivne bukalne tablete su zadovoljile farmakopejski zahtev u pogledu variranja mase, ujednačenosti sadržaja lekovite supstance i friabilnosti koji se odnose na tablete za peroralnu primenu usled nedostatka literaturnih podataka za tablete za intraoralnu primenu. Izrađene tablete su imale uniformnu zateznu čvrstinu koja je bila između 2,55 MPa i 2,82MPa. Jačina vezivanja mukoadhezivnih

bukalnih tableta je bila između 201 mN/cm<sup>2</sup> i 294 mN/cm<sup>2</sup>, što je oko tri puta manje u poređenju sa mukoadhezivnim bukalnim filmovima.

- Rezultati *in vitro* brzine rastvaranja lekovite supstance su ukazali da se celokupna količina propranolol-hidrohlorida rastvorila u toku 90 minuta iz F1, 120 minuta iz F2 i 180 minuta iz F3, kao i da su dobijeni profili oslobađanja nisu međusobno slični (F1 i F2:  $f_2 = 39$ ; F1 i F3:  $f_2 = 27$ ; F2 i F3:  $f_2 = 42$ ) što se može objasniti uticajem koncentracije PEO kao polimera koji kontroliše brzinu rastvaranja lekovite supstance. Visoke vrednosti R<sup>2</sup> i najniže AIC vrednosti ukazuju da su profili brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta najbolje uklapaju u *Peppas-Sahlin* model, što znači da oslobađanju lekovite supstance doprinose procesi difuzije i erozije.

- Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine permeacije ukazali su da je nakon 300 minuta permeiralo oko 40% propranolol-hidrohlorida.

- Mukoadhezivne bukalne tablete formulacije F2 odabrane su za dalja *in vivo* ispitivanja na spontano hipertenzivnim pacovima *Okamoto-Aoki* soja jer rezultati ukazuju: da su zadovoljeni farmakopejski zahtevi u pogledu variranja mase, ujednačenosti sadržaja lekovite supstance i friabilnosti, da imaju dobra mukoadhezivna svojstva odnosno veću jačinu vezivanja i srednju brzinu rastvaranja lekovite supstance. Rezultati ukazuju da su profili brzine rastvaranja mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova formulacija F2 međusobno slični ( $f_2 = 64$ ) pa su stoga pogodni za komparativnu procenu hemodinamskih efekata i farmakokinetike propranolola nakon primene mukoadhezivnih bukalnih formulacija na spontano hipertenzivnim pacovima *Okamoto-Aoki*.

- U trećoj fazi istraživanja je sprovedeno *in vivo* ispitivanje hemodinamskih parametara i farmakokinetike propranolol-hidrohlorida na pacovima *Okamoto-Aoki* soja. Rezultati hemodinamskih merenja u kontrolnoj grupi pacova (pacovi bez tretmana propranolol-hidrohlridom) pokazali su da između početnih i svih drugih vremenskih tačaka ne postoji statistički značajna razlika u promeni hemodinamskih parametara (SAD, DAP, FS), što ukazuje da upotreba nembutala, kao anestetika u odgovarajućoj koncentraciji, nije uticala na vrednosti krvnog pritiska i FS. Tretman tabletom sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida doveo je do statistički značajnog smanjenja SKP i DKP u odnosu na početnu vremensku tačku, samo nakon 10-og minuta ispitivanja. Takođe, u ovoj grupi pacova primećeno je statistički značajno smanjenje FS (16-45%) u poređenju sa nultom vremenskom tačkom počevši od 10-og minuta pa sve do 12-og sata ispitivanja. U grupi pacova koji su bili na tretmanu mukoadhezivnom bukalnom tabletom, primećeno je statistički značajno smanjenje vrednosti SKP u 4-om satu ispitivanja od 20% u odnosu na njegovu početnu vrednost. Takođe, statistički značajno smanjenje vrednosti DKP u odnosu na početnu vrednost je primećeno u 1. (29%), 2. (28%) i 4. (30%) satu ispitivanja. Smanjenje DKP bilo je između 11% i 30%. U ovoj grupi, značajno smanjenje FS (13%-44%) u odnosu na njegovu početnu vrednost bilo je primećeno je u 10-om minutu i održavalo se sve do 12-og sata ispitivanja. Tretman mukoadhezivnim bukalnim filmom doveo je do statistički značajnog smanjenja SKP (13%) u odnosu na njegovu početnu vrednost u 3. satu ispitivanja. Takođe, statistički značajno smanjenje DKP je primećeno u 45-om minutu i održalo se do 6-og sata ispitivanja čiji je opseg smanjenja vrednosti DKP bio između 21% i 33%. Kao i u prethodnoj grupi, efekat propranolol-hidrohlorida je bio najizraženiji u pogledu uticaja na smanjenje FS. Statistički značajno smanjenje (16%-51%) je primećeno u 10-om minutu i održalo se do 12-og sata ispitivanja.

- Statistička analiza (dvofaktorska mešovita ANOVA) je pokazala da između tretmana mukoadhezivnom bukalnom tabletom i filmom nije bilo statistički značajne razlike u pogledu SAP, DAP i FS vrednosti. Međutim, jednofaktorska ANOVA za ponovljena merenja upućuje da tretman mukoadhezivnim bukalnim filmom dovodi do izraženijeg efekta u pogledu smanjenja pre svega FS, a potom i DKP, bez značajne razlike u uticaju na SKP. Test jednostavnih efekata je pokazao da je, u poređenju sa tabletom sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida, mukoadhezivni bukalni film postigao značajno niže vrednosti FS u 8-om i 12-om satu ispitivanja, dok je tableta sa trenutnim oslobađanjem propranolol-hidrohlorida je dovela do značajnog smanjenja FS u 10-om minutu u poređenju sa mukoadhezivnom bukalnom tabletom i filmom.

- Interesantno, iako između različitih grupa pacova (pacovi na tretmanu tabletom sa trenutnim oslobađanjem, mukoadhezivnom bukalnom tabletom i filmom) nema statistički značajne razlike u

vrednostima  $C_{max}$ , najveća razlika uočena je u stepenu apsorpcije propranolola (PIK vrednost). Vrednost  $PIK_{0-24h}$  propranolola bila je više od 2,5 puta veća nakon primene mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova u poređenju sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem. Međutim, između mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova nema statistički značajne razlike u pogledu vrednosti  $PIK_{0-24h}$ . Razlike u *in vitro* brzini rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz tri ispitivana farmaceutska oblika, odrazile su se na *in vivo* brzinu apsorpcije propranolola, odnosno na vreme postizanja  $C_{max}$ . Drugim rečima, brzina apsorpcije propranolola određena je njegovom brzinom rastvaranja. U tom smislu, brzina apsorpcije propranolola iz mukoadhezivnih bukalnih formulacija je statistički manja u odnosu na tablete sa trenutnim oslobađanjem. Dalje, uočena je i statistički značajna razlika u vrednostima  $CL/F$  i  $t_{1/2}$ . Značajno niže  $CL/F$  vrednosti dovele su do većih vrednosti  $t_{1/2}$  u slučaju mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova. Izračunati farmakokinetički parametri propranolola pokazuju da bukalna isporuka propranolol-hidrohlorida poboljšava stepen apsorpcije usled produženog zadržavanja farmaceutskog oblika leka u usnoj duplji i produženog oslobađanja propranolol-hidrohlorida iz farmaceutskog oblika, i smanjenog metabolizma u jetri.

- U okviru četvrte faze istraživanja izgrađen je propranolol-specifični fiziološki zasnovani model, koji opisuje ključne farmakokinetičke procese propranolola. Doprinos sprovedenog istraživanja odnosi se na predviđanje profila koncentracije propranolola u plazmi kod ljudi nakon primene mukoadhezivnih bukalnih formulacija primenom prostornog modela apsorpcije i tranzita lekovite supstance kroz usnu duplju (OCCAT™ model) koristeći *in vitro* profile brzine rastvaranja propranolol-hidrohlorida iz mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova. Ovo je prvi publikovan primer posvećen *in silico* modelovanju mukoadhezivnih bukalnih formulacija sa propranolol-hidrohlrodom. Generisan model je validiran poređenjem predviđenih podataka sa farmakokinetičkim podacima određenim iz publikovanih kliničkih studija koje se odnose na primenu propranolol-hidrohlorida u vidu i.v. infuzije, tablete sa trenutnim oslobađanjem i sublingvalne tablete. Uočeno je da se primenom mukoadhezivnih bukalnih filmova i tableta sa 10 mg propranolol-hidrohlorida očekuju do dva puta veće  $C_{max}$  vrednosti u odnosu na tablete sa trenutnim oslobađanjem 10 mg propranolol-hidrohlorida. Takođe, primećeno je da se statistički veće  $C_{max}$  vrednosti očekuju nakon primene mukoadhezivnih bukalnih filmova u odnosu na tablete, bez značajne razlike u ostalim farmakokinetičkim parametrima. Pored toga, rezultati simulacija upućuju da se može očekivati povećanje biološke raspoloživosti propranolola za više od 2,5 puta u poređenju sa tabletama propranolol-hidrohlorida sa trenutnim oslobađanjem u istoj dozi. Poređenja *in silico* predviđenih i *in vivo* učenih profila koncentracije propranolola u plazmi kod pacova nije bilo moguće sprovesti jer su trenutne mogućnosti softvera takve da uključuju fiziologiju usne duplje ljudi, majmuna, pasa i zečeva, ali ne i pacova.

- PCA analiza je pokazala da PEO polimer ima najveći pozitivan uticaj na silu odvajanja (jačinu mukoadhezije) mukoadhezivnih bukalnih tableta i filmova. Pored toga, pokazano je da prisustvo CB u formulaciji mukoadhezivnih bukalnih tableta ima pozitivan uticaj na predviđene  $t_{max}$  vrednosti, odnosno smanjuje brzinu apsorpcije propranolol-hidrohlorida, dok PVA i PEO imaju negativan uticaj. U slučaju mukoadhezivnih bukalnih filmova prisustvo HPMC u formulaciji ima negativan uticaj na predviđene  $t_{max}$  vrednosti, dok prisustvo PEO polimera ima pozitivan uticaj.



6

## **LITERATURA**

- [1] L.L. Brunton, J.S. Lazo, K.L. Parker, Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, 11th ed., McGraw-Hill, New York, 2005. <https://doi.org/0.1036/0071422803>.
- [2] M.P. Stapleton, Sir James Black and propranolol. The role of the basic sciences in the history of cardiovascular pharmacology, *Tex Hear. Inst J.* 24 (1997) 336–342.
- [3] Varagić V., Milošević M., *Farmakologija, dvadeset t, Elit Medica, Beograd, 2012.*
- [4] B.D. Bhagat, Minireview: Mechanism of the antihypertensive effect of propranolol, *Gen. Pharmacol.* 10 (1979) 291–296. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(79\)90055-7](https://doi.org/10.1016/0306-3623(79)90055-7).
- [5] European Pharmacopoeia, 11th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2023.
- [6] H. Vogelpoel, J. Welink, G.L. Amidon, H.E. Junginger, K.K. Midha, H. Möller, M. Olling, V.P. Shah, D.M. Barends, Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on Biopharmaceutics Classification System (BCS) literature data: Verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 1945–1956. <https://doi.org/10.1002/jps.20131>.
- [7] P. Artursson, J. Karlsson, Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175 (1991) 880–885. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)91647-U](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)91647-U).
- [8] P. Zakeri-Milani, H. Valizadeh, Y. Tajerzadeh, Hosnieh Azarmi, Z. Islambolchilar, M. Barzegar, Saeed Barzegar-Jalali, Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat, *J. Pharm. Sci.* 3 (2007) 368–379.
- [9] N. Nagare, A. Damre, K.S. Singh, S.R. Mallurwa, S. Iyer, A. Naik, M. Chintamaneni, Determination of site of absorption of propranolol in rat gut using in situ single-pass intestinal perfusion, *Indian J Pharm Sci.* 72 (2010) 625–629. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.78533>.
- [10] Å. Sjöberg, M. Lutz, C. Tannergren, C. Wingolf, A. Borde, A.L. Ungell, Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique, *Eur. J. Pharm. Sci.* 48 (2013) 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.007>.
- [11] N.A. Kasim, M. Whitehouse, C. Ramachandran, M. Bermejo, H. Lennernäs, A.S. Hussain, H.E. Junginger, S.A. Stavchansky, K.K. Midha, V.P. Shah, G.L. Amidon, Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification., *Mol. Pharm.* 1 (2004) 85–96. <https://doi.org/10.1021/mp034006h>.
- [12] H. Lennernäs, Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination, *Xenobiotica.* 37 (2007) 1015–1051. <https://doi.org/10.1080/00498250701704819>.
- [13] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* 12 (1995) 413–420. <https://doi.org/10.1023/A:1016212804288>.
- [14] P. Routledge, D. Shand, Clinical pharmacokinetics of propranolol, *Clin Pharmacokinet.* 4 (1977) 73–90. <https://doi.org/10.2165/00003088-197904020-00001>.
- [15] G.S. Nace, A.J.J. Wood, Pharmacokinetics of long acting propranolol implications for therapeutic use, *Clin. Pharmacokinet.* 13 (1987) 51–64. <https://doi.org/10.2165/00003088-198713010-00003>.
- [16] FDA/CDER, Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, 2017.
- [17] EMA/CHMP, ICH M9 guideline on biopharmaceutics classification system-based biowaivers., 2018.
- [18] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings,

Adv. Drug Deliv. Rev. 23 (1997) 3–25. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1).

- [19] Pub Chem:National Library of Medicine, Propranolol Hydrochloride, (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propranolol-Hydrochloride>.
- [20] MediaLab, Elimination of weak acid and weak base drugs, (2024).
- [21] A. Dahan, J.M. Miller, G.L. Amidon, Prediction of solubility and permeability class membership: Provisional BCS classification of the world's top oral drugs, *AAPS J.* 11 (2009) 740–746. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9144-x>.
- [22] M. Pokrajac, *Farmakokinetika*, Grafolik, Beograd, 2002.
- [23] A.S. Nies, D.G. Shand, Clinical pharmacology of propranolol, *Circulation.* 52 (1975) 6–15. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.52.1.6>.
- [24] E. Taylor, P. Turner, The distribution of propranolol, pindolol and atenolol between human erythrocytes and plasma., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 12 (1981) 543–548. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1981.tb01263.x>.
- [25] R.A. Branch, D.G. Shand, Propranolol disposition in chronic liver disease: a physiological approach, *Clin Pharmacokinet.* 1 (1976) 264–279. <https://doi.org/10.2165/00003088-197601040-00002>.
- [26] M.-W. Lo, B. Silber, S. Riegelman, An automated HPLC method for the assay of propranolol and its basic metabolites in plasma and urine, *J. Chromatogr. Sci.* 20 (1982) 126–131. <https://doi.org/10.1093/chromsci/20.3.126>.
- [27] R. Mehvar, D. Brocks, Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans, *J. Pharm. Sci.* 4 (2001) 185–200.
- [28] T. Walle, U.K. Walle, L.S. Olanoff, Quantitative account of propranolol metabolism in urine of normal man, *Drug Metab. Dispos.* 13 (1985) 204–209.
- [29] Y.A. Weiss, M.E. Safar, J.P. Lehner, J.A. Levenson, A. Simon, J.M. Alexandre, (+)-Propranolol clearance, an estimation of hepatic blood flow in man, *Br J Clin Pharmacol.* 5 (1978) 457–460. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1978.tb01655.x>.
- [30] M. Preis, C. Woertz, P. Kleinebudde, J. Breitzkreutz, Oromucosal film preparations: Classification and characterization methods, *Expert Opin Drug Deliv.* 10 (2013) 1303–1317. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.804058>.
- [31] J.O. Morales, J.T. McConville, Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77 (2011) 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.023>.
- [32] J.D. Smart, Buccal drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2 (2005) 507–517. <https://doi.org/https://doi.org/10.1517/17425247.2.3.507>.
- [33] J.D. Smart, Chapter 7: Theories of mucoadhesion, in: V. V. Khutoryanskiy (Ed.), *Mucoadhesive Mater. Drug Deliv. Syst.*, 1st editio, John Wiley & Sons, Ltd, 2014: pp. 159–174.
- [34] R.A. Cone, Barrier properties of mucus, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 75–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.008>.
- [35] A.M. Wu, G. Csako, A. Herp, Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins, *Mol. Cell. Biochem.* 137 (1994) 39–55. [https://doi.org/Wu, A. M., Csako, G., & Herp, A. \(1994\). Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. Molecular and Cellular Biochemistry, 137\(1\), 39–55. doi:10.1007/bf00926038](https://doi.org/Wu, A. M., Csako, G., & Herp, A. (1994). Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. Molecular and Cellular Biochemistry, 137(1), 39–55. doi:10.1007/bf00926038).
- [36] J.O. Morales, J.T. McConville, Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77 (2011) 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.023>.
- [37] Rajesh B. Gandhi, J.R. Robinson, Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13 (1994) 43–74. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-409X\(94\)90026-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-409X(94)90026-4).
- [38] B.M. Boddupalli, Z.N.K. Mohammed, R. Nath A., D. Banji, Mucoadhesive drug delivery system:

- An overview, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 1 (2010) 381–387. <https://doi.org/10.4103/0110-5558.76436>.
- [39] V.F. Patel, F. Liu, M.B. Brown, Advances in oral transmucosal drug delivery, *J. Control. Release.* 153 (2011) 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.027>.
- [40] R.K. Verma, S. Garg, Drug delivery technologies and future directions, *Pharm. Technol.* 25 (2001) 1–14.
- [41] S. Bogdansky, Natural polymers as drug delivery systems, *Drugs Pharm. Sci.* 45 (1990) 231–259.
- [42] J. Lee, J. Park, J.R. Robinson, Bioadhesive-based dosage forms: The next generation, *J. Pharm. Sci.* 89 (2000) 850–866.
- [43] N. Salamat-Miller, M. Chittchang, T.P. Johnston, The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1666–1691. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.003>.
- [44] E. Russo, F. Selmin, S. Baldassari, C.G.M. Gennari, G. Caviglioli, F. Cilurzo, P. Minghetti, B. Parodi, A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 32 (2016) 113–125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.06.016>.
- [45] P. Chinna Reddy, K.S.C. Chaitanya, Y. Madhusudan Rao, A review on bioadhesive buccal drug delivery systems: Current status of formulation and evaluation methods, *DARU, J. Pharm. Sci.* 19 (2011) 385–403.
- [46] C. Müller, A. Bernkop-Schnürch, Chapter 11: Thiomers, in: V. V. Khutoryanskiy (Ed.), *Mucoadhesive Mater. Drug Deliv. Syst.*, 1st editio, ohn Wiley & Sons, Ltd., 2014: pp. 255–278.
- [47] B. Chatterjee, N. Amalina, P. Sengupta, U.K. Mandal, Mucoadhesive polymers and their mode of action: A recent update, *J. Appl. Pharm. Sci.* 7 (2017) 195–203. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70533>.
- [48] Rukiye Sevinç Özakar, E. Özakar, Current overview of oral thin films, *Turk J Pharm Sci.* 18 (2021) 111–121. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2020.76390>.
- [49] A. Abruzzo, F.P. Nicoletta, F. Dalena, T. Cerchiara, B. Luppi, F. Bigucci, Bilayered buccal films as child-appropriate dosage form for systemic administration of propranolol, *Int. J. Pharm.* 531 (2017) 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.070>.
- [50] A.F. Borges, C. Silva, J.F.J. Coelho, S. Simões, Oral films: Current status and future perspectives: I - Galenical development and quality attributes, *J Control Releas.* 206 (2015) 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.006>.
- [51] G.L. Myers, S.D. Hilbert, B.J. Boone, A. Bogue, P. Sanghvi, M. Hariharan, Sublingual and buccal film compositions, United States patent No.: 8,475,832 B2, 2013.
- [52] A. Kulkarni, H. Deokule, M. Mane, Ghadge DM, Exploration of different polymers for use in the formulation of oral fast dissolving strips, *J. Curr. Pharm. Res. JCPR.* 2 (2010) 33–35.
- [53] R.K. Yang, R.C. Fuisz, G.L. Myers, J.M. Fuisz, Polyethylene oxide-based films and drug delivery systems made therefrom, United States patent No.:8,017,150 B2, 2011.
- [54] Buccal mucoadhesive films: A Review, Rajaram, D M Laxman, Sharada Deore. 8 (2017) 31–38. <https://doi.org/10.5530/srp.2017.1.7>.
- [55] J.A. Nicolazzo, B.L. Reed, B.C. Finnin, Buccal penetration enhancers - How do they really work?, *J. Control. Release.* 105 (2005) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.01.024>.
- [56] H. Sohi, A. Ahuja, F.J. Ahmad, R.K. Khar, Critical evaluation of permeation enhancers for oral mucosal drug delivery, *Drug Dev Ind Pharm.* 36 (2010) 254–282. <https://doi.org/10.1080/03639040903117348>.
- [57] Color additive status list, FDA. (n.d.). <https://www.fda.gov/industry/color-additive-inventories/color-additive-status-list> (accessed October 9, 2022).

- [58] F. V. Borbolla-Jiménez, S.I. Peña-Corona, S.J. Farah, M.T. Jiménez-Valdés, E. Pineda-Pérez, A. Romero-Montero, M.L. Del Prado-Audelo, S.A. Bernal-Chávez, J.J. Magaña, G. Leyva-Gómez, Films for wound healing fabricated using a solvent casting technique, *Pharmaceutics*. 15 (2023) 1914. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071914>.
- [59] S. Karki, H. Kim, S.-J. Na, D. Shin, Thin films as an emerging platform for drug delivery, *Asian J. Pharm. Sci.* 11 (2016) 559–574. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.004>.
- [60] ICH Q3C(R3) — Tables and list guidance for industry, 2017.
- [61] M.K. Preis, Oromucosal film preparations for pharmaceutical use – formulation development and analytical characterization, Heinrich Heine University Düsseldorf, 2014. <https://dnb.info/1056035986/34>.
- [62] Package leaflet: Information for the user BREAKYL buccal film, 2019. <https://www.hpra.ie/img/uploaded/swedocuments/a70073ae-96cf-4ab7-ade5-4a5cfc0aa75a.pdf>.
- [63] S.N. Politis, P. Colombo, G. Colombo, D.M. Rekkas, Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43 (2017) 889–901. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1291672>.
- [64] L.X. Yu, G. Amidon, M.A. Khan, S.W. Hoag, J. Polli, G.K. Raju, J. Woodcock, Understanding pharmaceutical quality by design, *AAPS J.* 16 (2014) 771–783. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9598-3>.
- [65] B. Benedetti, V. Caponigro, F. Ardini, Experimental design step by step: A practical guide for beginners, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 52 (2020) 1015–1028. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1848517>.
- [66] S.S. Nur Izzati, Mohamad Zen Abd Gani, R. Shamsudin, H.R. Fard Masoumi, The use of D-optimal mixture design in optimizing development of okara tablet formulation as a dietary supplement, *Sci. World J.* 684319 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/684319>.
- [67] M. Gibson, *Preformulacija i formulacija lekova*, drugo izda, Informa Healthcare USA, Inc., 2009.
- [68] I.T. Jolliffe, J. Cadima, Principal component analysis: a review and recent developments, *Phil. Trans. R. Soc. A.* 374 (2016) 20150202. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>.
- [69] K.H. Esbensen, P. Geladi, Principal Component Analysis: Concept, geometrical interpretation, mathematical background, algorithms, history, practice, *Compr. Chemom.* 2 (2009) 211–226. <https://doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00043-0>.
- [70] L. Shipp, F. Liu, L. Kerai-Varsani, T.C. Okwuosa, Buccal films: A review of therapeutic opportunities, formulations & relevant evaluation approaches, *J. Control. Release.* 352 (2022) 1071–1092. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.10.058>.
- [71] Z. Weifeng, C. Xiao, Y. Xiao, B. Tian, D. Gao, W. Fan, G. Li, S. He, G. Zhai, An overview of in vitro dissolution testing for film dosage forms, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 71 (2022) 103297.
- [72] S. Klein, M. Sakagami, S.K. Li, K. Warner, Testing the in vitro product performance of mucosal drug products: View of the USP expert panel, 2023. <https://doi.org/dx.doi.org/10.14227/DT300423P202>.
- [73] I. Speer, M. Preis, J. Breitzkreutz, Dissolution testing of oral film preparations: Experimental comparison of compendial and non-compendial methods, *Int. J. Pharm.* 561 (2019) 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.042>.
- [74] FDA, Dissolution methods database, (n.d.). [https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp\\_getallData.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm) (accessed April 4, 2020).
- [75] J. Ali, J.B. Lee, S. Gittings, A. Iachelini, J. Bennett, A. Cram, M. Garnett, C.J. Roberts, P. Gershkovich, Development and optimisation of simulated salivary fluid for biorelevant oral cavity dissolution, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 160 (2021) 125–133.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.01.017>.

- [76] G. İkinçi, S. Şenel, C.G. Wilson, M. Şumnu, Development of a buccal bioadhesive nicotine tablet formulation for smoking cessation, *Int. J. Pharm.* 277 (2004) 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.10.040>.
- [77] A.M. Mumtaz, H.S. Ch'ng, Design of a dissolution apparatus suitable for in situ release study of triamcinolone acetonide from bioadhesive buccal tablets, *Int. J. Pharm.* 121 (1995) 129–139. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00406-U](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00406-U).
- [78] F.P. Fernandes, A.C. Fortes, S.G. da C. Fonseca, J. Breitreutz, H.G. Ferraz, Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films based on pectin and gellan gum containing triamcinolone acetonide, *Int. J. Polym. Sci.* (2018) 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2018/2403802>.
- [79] B. Çelik, Risperidone mucoadhesive buccal tablets: Formulation design, optimization and evaluation, *Drug Des. Devel. Ther.* 11 (2017) 3355–3365. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S150774>.
- [80] S. Koirala, P. Nepal, G. Ghimire, R. Basnet, I. Rawat, A. Dahal, J. Pandey, K. Parajuli-Baral, Formulation and evaluation of mucoadhesive buccal tablets of aceclofenac, *Heliyon*. 7 (2021) 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06439>.
- [81] O. Esim, A. Savaser, C.K. Ozkan, Z. Bayrak, C. Tas, Y. Ozkan, Effect of polymer type on characteristics of buccal tablets using factorial design, *Saudi Pharm. J.* 26 (2018) 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.013>.
- [82] O. Esim, A. Savaser, C.K. Ozkan, C. Tas, Y. Ozkan, Investigation of the mucoadhesivity, swelling and drug release mechanisms of indomethacin buccal tablets: effect of formulation variables, *Drug Dev Ind Pharm.* 46 (2020) 1979–1987. <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1831526>.
- [83] M. Preis, K. Knop, J. Breitreutz, Mechanical strength test for orodispersible and buccal films, *Int. J. Pharm.* 461 (2014) 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.033>.
- [84] A. Abruzzo, T. Cerchiara, F. Bigucci, M.C. Gallucci, B. Luppi, Mucoadhesive Buccal Tablets Based on Chitosan/Gelatin Microparticles for Delivery of Propranolol Hydrochloride, *J. Pharm. Sci.* 104 (2015) 4365–4372. <https://doi.org/10.1002/jps.24688>.
- [85] M. Jovanović, N. Tomić, S. Cvijić, D. Stojanović, S. Ibrić, P. Uskoković, Mucoadhesive gelatin buccal films with propranolol hydrochloride: Evaluation of mechanical, mucoadhesive, and biopharmaceutical properties, *Pharmaceutics*. 13 (2021) 1–19. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020273>.
- [86] V.M. Patel, B.G. Prajapati, M.M. Patel, Formulation, evaluation, and comparison of bilayered and multilayered mucoadhesive buccal devices of propranolol hydrochloride, *AAPS PharmSciTech.* 8 (2007) 1–8. <https://doi.org/10.1208/pt0801022>.
- [87] V.M. Patel, B.G. Prajapati, H. V. Patel, K.M. Patel, Mucoadhesive bilayer tablets of propranolol hydrochloride, *AAPS PharmSciTech.* 8 (2007) 1–6. <https://doi.org/10.1208/pt0803051>.
- [88] A. Abruzzo, F. Bigucci, T. Cerchiara, F. Cruciani, B. Vitali, B. Luppi, Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 581–588. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.024>.
- [89] J.F. Alopaeusa, M. Hellfritschb, T. Gutowskib, R. Scherließ, A. Almeida, B. Sarmento, N. Škalko-Basnet, I. Tho, Mucoadhesive buccal films based on a graft co-polymer – A mucin-retentive hydrogel scaffold, *Eur. J. Pharm. Sci.* 142 (2020) 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105142>.
- [90] X.-Q. Li, Z.-M. Ye, J.-B. Wang, C.-R. Fan, A.-W. Pan, C. Li, R.-B. Zhang, Mucoadhesive buccal films of tramadol for effective pain management, *Brazilian J. Anesthesiol. (English Ed.)* 67 (2017) 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2015.08.016>.

- [91] FDA, Draft guidance on acyclovir buccal tablet, (2015). [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/psg/Acyclovir\\_buccal\\_tablet\\_203791\\_RC09-15.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Acyclovir_buccal_tablet_203791_RC09-15.pdf).
- [92] M. Preis, C. Woertz, K. Schneider, J. Kukawka, J. Broscheit, N. Roewer, J. Breitreutz, Design and evaluation of bilayered buccal film preparations for local administration of lidocaine hydrochloride, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86 (2014) 552–561. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.12.019>.
- [93] Y. Sakuda, A. Ito, M. Sasatsu, Y. Machida, Preparation and evaluation of medicinal carbon oral films, *Chem. Pharm. Bull.* 58 (2010) 454–457. <https://doi.org/10.1248/cpb.58.454>.
- [94] I. Speer, D. Steiner, Y. Thabet, J. Breitreutz, A. Kwade, Comparative study on disintegration methods for oral film preparations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 132 (2018) 50–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.09.005>.
- [95] B. Bánfai, K. Ganzler, S. Kemény, Content uniformity and assay requirements in current regulations, *J. Chromatogr. A.* 1156 (2007) 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.067>.
- [96] Y. Takeuchi, N. Ikeda, K. Tahara, H. Takeuchi, Mechanical characteristics of orally disintegrating films: Comparison of folding endurance and tensile properties, *Int. J. Pharm.* 589 (2020) 119876. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119876>.
- [97] DIN ES ISO 527-1, Plastics — Determination of tensile properties — Part 1: General principles, 2012.
- [98] DIN ES ISO 527-3, Plastics — Determination of tensile properties — Part 3: Test conditions for films and sheets, 2018.
- [99] M. Drašković, S. Cvijić, S. Ibrić, J. Parojčić, Farmaceutsko-tehnološka karakterizacija oralno-disperzibilnih tableta i filmova, *Arh. Farm.* 68 (2018) 839 – 859.
- [100] G.W. Radebaugh, J.L. Murtha, T.N. Julian, J.N. Bondi, Methods for evaluating the puncture and shear properties of pharmaceutical polymeric films, *Int. J. Pharm.* 45 (1988) 39–46. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(88\)90032-4](https://doi.org/10.1016/0378-5173(88)90032-4).
- [101] S. Salehi, S. Boddohi, New formulation and approach for mucoadhesive buccal film of rizatriptan benzoate, *Prog. Biomater.* 6 (2017) 175–187. <https://doi.org/10.1007/s40204-017-0077-7>.
- [102] T.F.R. Alves, A.C. Rios, K. da S. Pontes, D.L. Portella, N. Aranha, P. Severino, E.B. Souto, J.K.M. Gonsalves, R. de S. Nunes, M. V. Chaud, Bilayer mucoadhesive buccal film for mucosal ulcers treatment: Development, characterization, and single study case, *Pharmaceutics.* 12 (2020) 1–24. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070657>.
- [103] J.T. Fell, J.M. Newton, Determination of tablet strength by the diametral-compression test, *J. Pharm. Sci.* 59 (1970) 688–691. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.2600590523>.
- [104] K.G. Pitt, M.G. Heasley, Determination of the tensile strength of elongated tablets, *Powder Technol.* 238 (2013) 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2011.12.060>.
- [105] Z. Żołek-Tryznowska, E. Bednarczyk, M. Tryznowski, T. Kobiela, A comparative investigation of the surface properties of corn-starch-microfibrillated cellulose composite films, *Materials (Basel).* 16 (2023) 3320. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ma16093320>.
- [106] O. Lopez, M.A. Garcia, M.A. Villar, A. Gentili, M.S. Rodriguez, L. Albertengo, Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starch films containing chitin and chitosan, *LWT - Food Sci. Technol.* 57 (2014) 106–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.024>.
- [107] Y.V. Vishnu, K. Chandrasekhar, G. Ramesh, Y.M. Rao, Development of mucoadhesive patches for buccal administration of carvedilol, *Curr. Drug Deliv.* 4 (2007) 27–39.
- [108] Y. Song, Y. Cong, B. Wang, N. Zhang, Applications of Fourier transform infrared spectroscopy

- to pharmaceutical preparations, *Expert Opin. Drug Deliv.* 17 (2020) 551–571. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1737671>.
- [109] Package leaflet: Information for the user Prochlorperazine 3 mg Buccal Tablets, 2023. <https://www.medicines.org.uk/emc/files/pil.5227.pdf>.
- [110] S. Pund, A. Joshi, K. Vasu, M. Nivsarkar, C. Shishoo, Gastroretentive delivery of rifampicin: in vitro mucoadhesion and in vivo gamma scintigraphy, *Int J Pharm.* 411 (2011) 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.048>.
- [111] K. Albrecht, M. Greindl, C. Kremser, C. Wolf, P. Debbage, A. Bernkop-Schnürch, Comparative in vivo mucoadhesion studies of thiomers formulations using magnetic resonance imaging and fluorescence detection, *J. Control. Release.* 115 (2006) 78–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.06.023>.
- [112] M. Cuna, M.J. Alonso, D. Torres, Preparation and in vivo evaluation of mucoadhesive containing amoxicillin-resin complexes for drug delivery to the gastric mucosa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51 (2001) 199–205. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00124-2](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00124-2).
- [113] R.A. Baus, M.F. Haug, C. Lechner, M. Jelkmann, A. Bernkop-Schnürch, In Vitro–in vivo correlation of mucoadhesion studies on buccal mucosa, *Mol. Pharm.* 16 (2019) 2719–2727. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00254>.
- [114] T.M.M. Ways, W.M. Lau, V. V. Khutoryanskiy, Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems, *Polymers (Basel).* 10 (2018) 267. <https://doi.org/10.3390/polym10030267>.
- [115] J.D. Smart, An in vitro assessment of some mucosaadhesive dosage forms, *Int. J. Pharm.* 73 (1991) 69–74. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90101-S](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90101-S).
- [116] H. Park, J.R. Robinson, Physico-chemical properties of water insoluble polymers important to mucin/epithelial adhesion, *J. Control. Release.* 2 (1985) 47–57. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-3659\(85\)90032-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-3659(85)90032-X).
- [117] J. Bassi da Silva, S.B. de S. Ferreira, O. de Freitas, M.L. Bruschi, A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43 (2017) 1053–1070. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1294600>.
- [118] E.E. Hassan, J.M. Gallo, A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength, *Pharm Res.* 7 (1990) 491–495. <https://doi.org/10.1023/a:1015812615635>.
- [119] A.G. Mikos, N.A. Peppas, Bioadhesive analysis of controlled-release systems. IV. An experimental method for testing the adhesion of microparticles with mucus, *J. Control. Release.* 12 (1990) 31–37. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-3659\(90\)90180-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-3659(90)90180-2).
- [120] H. Takeuchi, J. Thongborisute, Y. Matsui, H. Sugihara, H. Yamamoto, Y. Kawashima, Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems, *Adv Drug Deliv Rev.* 57 (2005) 1583–1594. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.008>.
- [121] A. Bernkop-Schnürch, S. Steininger, Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers, *Int. J. Pharm.* 194 (2000) 239–247. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00387-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00387-7).
- [122] P. Stasiak, M. Placzek, P. Lepek, M. Sznitowska, Influence of polymer type, active substance, and experimental model on mucoadhesive properties of selected drug formulations, *J. Dispers. Sci. Technol.* 32 (2011) 1780–1785. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.616175>.
- [123] T.-J. Chang, L.H. Nielsen, A. Boisen, E.-T. Hwu, Open-source force analyzer with broad sensing range based on an optical pickup unit, *HardwareX.* 11 (2022) e00308. <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2022.e00308>.
- [124] C.F. Wong, K.H. Yuen, K.K. Peh, An in-vitro method for buccal adhesion studies: Importance of



instrument variables, *Int. J. Pharm.* 180 (1999) 47–57.

- [125] J.B. da Silva, S.B. de S. Ferreira, A.V. Reis, Bruschi, M.T. Cook, M. Luciano, Assessing mucoadhesion in polymer gels: The effect of method type and instrument variables, *Polymers (Basel)*. 10 (2018) 1–19. <https://doi.org/10.3390/polym10030254>.
- [126] F.C. Carvalho, M.L. Bruschi, R.C. Evangelista, M.P.D. Gremião, Mucoadhesive drug delivery systems, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 46 (2010) 1–17. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502010000100002>.
- [127] R. Shaikh, T.R.R. Singh, M.J. Garland, D. Woolfson, R.F. Donnelly, Mucoadhesive drug delivery systems, *J Pharm Bioallied Sci.* 3 (2011) 89–100.
- [128] P. Kraisit, S. Limmatvapirat, M. Luangtana-Anan, P. Srimornsak, Buccal administration of mucoadhesive blend films saturated with propranolol loaded nanoparticles, *Asian J. Pharm. Sci.* 13 (2018) 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.07.006>.
- [129] A.B. Nair, B.E. Al-Dhubiab, J. Shah, S. Jacob, V. Saraiya, M. Attimarad, N. SreeHarsha, S.H. Akrawi, T.M. Shehata, Mucoadhesive buccal film of almotriptan improved therapeutic delivery in rabbit model, *Saudi Pharm. J.* 28 (2020) 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.11.022>.
- [130] C. Eouani, P. Piccerelle, P. Prinderre, E. Bourret, J. Joachim, In-vitro comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (2001) 45–55. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00146-1](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00146-1).
- [131] S. Skulason, M.S. Asgeirsdottir, J.P. Magnusson, T. Kristmundsdottir, Evaluation of polymeric films for buccal drug delivery, *Pharmazie.* 64 (2009) 197–201. <https://doi.org/10.1691/ph.2009.8188>.
- [132] S. Pinto, M.E. Pintado, B. Sarmiento, In vivo, ex vivo and in vitro assessment of buccal permeation of drugs from delivery systems, *Expert Opin Drug Deliv.* 17 (2020) 33–48. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1699913>.
- [133] S. Wang, A. Zuo, J. Guo, Types and evaluation of in vitro penetration models for buccal mucosal delivery, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 61 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102122>.
- [134] B.H. Ajine, R. Holm, A. Bauer-Brandl, Use of Permeapad® for prediction of buccal absorption: a comparison to in vitro, ex vivo and in vivo method, *Eur. J. Pharm. Sci.* 93 (2016) 399–404. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.08.041>.
- [135] A.H. Beckett, E.J. Triggs, Buccal absorption of basic drugs and its application as an in vivo model of passive drug transfer through lipid membranes, *J Pharm Pharmacol.* 19 (1967) 31S–41S.
- [136] S. Kaaber, The permeability and barrier functions of the oral mucosa with respect to water and electrolytes. Studies of the transport of water, sodium and potassium through the human mucosal surface in vivo, *Acta Odontol Scand Suppl.* 32 (1974) 3–47.
- [137] B.R. Pezzini, M.G. Issa, M.D. Duque, H.G. Ferraz, Applications of USP apparatus 3 in assessing the in vitro release of solid oral dosage forms, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 51 (2015) 265–272. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000200003>.
- [138] J. Krämer, L.T. Grandy, J. Gajendran, Historical development of dissolution testing, in: J. J.K. Dressman (Ed.), *Pharm. Dissolution Test.*, 1st editio, Taylor & Francis Group London, 2005: pp. 1–37.
- [139] I. Borst, S. Ugwu, A.H. Beckett, New and extended applications for USP drug release apparatus 3, *Dissolution Technol.* 4 (1997) 11–18. <https://doi.org/10.14227/DT040197P11>.
- [140] B. Williams, G. Mancina, W. Spiering, E.A. Rosei, M. Azizi, M. Burnier, D.L. Clement, A. Coca, G. de Simone, A. Dominiczak, T. Kahan, F. Mahfoud, J. Redon, L. Ruilope, A. Zanchetti, M. Kerins, S.E. Kjeldsen, R. Kreutz, S. Laurent, G.Y.H. Lip, R. McManus, K. Narkiewicz, F. Ruschitzka, R.E. Schmieder, E. Shlyakhto, C. Tsioufis, V. Aboyans, I. Desormais, 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the

- management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH), *Eur. Heart J.* 39 (2018) 3021–3104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>.
- [141] Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje arterijske hipertenzije, Republika Srbija, 2012. [https://www.zdravlje.gov.rs/view\\_file.php?file\\_id=667&cache=sr](https://www.zdravlje.gov.rs/view_file.php?file_id=667&cache=sr).
- [142] O.A. Carretero, S. Oparil, Essential hypertension part I: Definition and etiology, *Circulation*. 101 (2000) 329–335. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.3.329>.
- [143] M. Moser, Working group report on high blood pressure in pregnancy, *J. Clin. Hypertens.* 3 (2001) 75–88. <https://doi.org/10.1111/j.1524-6175.2001.00458.x>.
- [144] S.Š. Grujičić, D. Miljuš, I. Soldatović, A. Nikolić, I. Vujčić, Prehypertension and hypertension prevalence and risk factors among adult population in Republic of Serbia: A cross-sectional study, *Vojnosanit. Pregl.* 77 (2020) 590–600. <https://doi.org/10.2298/VSP180330114S>.
- [145] World Health Organization, A global brief on hypertension - World Health Day, 2013.
- [146] S. Srikanth, P. Deedwania, Management of dyslipidemia in patients with hypertension, diabetes, and metabolic syndrome, *Curr Hypertens Rep.* 18 (2016) 76. <https://doi.org/10.1007/s11906-016-0683-0>.
- [147] S. Lu, M.-Y. Bao, S.-M. Miao, X. Zhang, Q.-Q. Jia, S.-Q. Jing, T. Shan, X.-H. Wu, Y. Liu, Prevalence of hypertension, diabetes, and dyslipidemia, and their additive effects on myocardial infarction and stroke: a cross-sectional study in Nanjing, China, *Ann Transl Med.* 7 (2019) 436. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.09.04>.
- [148] World Health Organization, Guideline for the pharmacological treatment of hypertension in adults, 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240033986>.
- [149] R.E. Klabunde, *Cardiovascular physiology concepts*, 2nd editio, Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- [150] G.C. Oh, H.-J. Cho, Blood pressure and heart failure, *Clin. Hypertens.* 26 (2020) 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40885-019-0132-x>.
- [151] C. Diaconu, D. Marcu, O. Bratu, A.M. Stanescu, G. Gheorghe, A. Hlescu, D. Mischianu, M. Manea, Beta-blockers in cardiovascular therapy: A review, *J. Mind Med. Sci.* 6 (2019) 216–223. <https://doi.org/10.22543/7674.62.p216223>.
- [152] A. Polak, E. Harasim-Symbor, A. Chabowski, Animal models of hypertension - revisited, *Prog Heal. Sci.* 8 (2018) 167–175. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.1116>.
- [153] C. Dong, A. Ma, L. Shang, Animal models used in the research of nanoparticles for cardiovascular diseases, *J. Nanoparticle Res.* 23 (2021) 172. <https://doi.org/10.1007/s11051-021-05289-z>.
- [154] L.O. Lerman, T.W. Kurtz, R.M. Touyz, D.H. Ellison, A.R. Chade, S.D. Crowley, D.L. Mattson, J.J. Mullins, J. Osborn, A. Eirin, J.F. Reckelhoff, C. Iadecola, T.M. Coffman, Animal models of hypertension: A scientific statement from the American Heart Association, *Hypertension.* 73 (2019) e87–e120. <https://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000090>.
- [155] K. Okamoto, K. Aoki, Development of a strain of spontaneously hypertensive rats, *Jpn. Circ. J.* 27 (1963) 282–293. <https://doi.org/10.1253/jcj.27.282>.
- [156] M. Hallback, L. Weiss, Mechanisms of spontaneous hypertension in rats, *Med. Clin. North Am.* 61 (1977) 593–609. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)31319-0](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)31319-0).
- [157] K. Takeda, Y. Nakagawa, T. Hashimoto, H. Sakurai, S. Imai, Effects of several beta-blocking agents on the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats, *Jpn. J. Pharmacol.* 29 (1979) 171–178. <https://doi.org/10.1254/jjp.29.171>.
- [158] N. Minami, T. Yoshikawa, H. Kataoka, N. Mori, M. Nagasaka, H. Kurosawa, M. Kanazawa, M. Kohzuki, Effects of exercise and  $\beta$ -Blocker on blood pressure and baroreflexes in spontaneously

- hypertensive rats, *Am. J. Hypertens.* 16 (2003) 966–972. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(03\)01010-0](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(03)01010-0).
- [159] B. Igreja, N.M. Pires, M.J. Bonifácio, A.I. Loureiro, C. Fernandes-Lopes, L.C. Wright, P. Soares-Da-Silva, Blood pressure-decreasing effect of etamicastat alone and in combination with antihypertensive drugs in the spontaneously hypertensive rat, *Hypertens. Res.* 38 (2015) 30–38. <https://doi.org/10.1038/hr.2014.143>.
- [160] H.A.J. Struyker-Boudier, H. Van Essen, H.M.N.W. Nievelstein, J.F.M. Smits, Role of baroreflex activation in the regional hemodynamic effects of the beta-blockers tertatolol and propranolol in conscious spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Nephrol.* 6 (1986) 25–29. <https://doi.org/10.1159/000167329>.
- [161] T. Berg,  $\beta$ 1-blockers lower norepinephrine release by inhibiting presynaptic, facilitating  $\beta$ 1-adrenoceptors in normotensive and hypertensive rats, *Front. Neurol.* 5 (2014) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00051>.
- [162] H. Karppanen, Effect of propranolol on the blood pressure of normotensive and pinealectomized hypertensive rats, *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 281 (1974) 1–12.
- [163] J.F.M. Smits, H.A.J. Struyker-Boudier, Propranolol in conscious spontaneously hypertensive rats: II Disposition after subcutaneous and intracerebroventricular administration, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 309 (1979) 19–24.
- [164] B.H. Forman, Mulrow P. J., Effect of propranolol on blood pressure and plasma renin activity in the spontaneously hypertensive rat, *Circ. Res.* 35 (1974) 215–221.
- [165] M.A. Pfeffer, J.M. Pfeffer, A.K. Weiss, E.D. Frohlich, Development of SHR hypertension and cardiac hypertrophy during prolonged beta blockade, *Am. J. Physiol.* 232 (1977) H639–H644. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1977.232.6.H639>.
- [166] J.S. Del Mauro, P.D. Prince, M.A. Allo, Y. Santander Plantamura, M.A. Morettón, G.E. González, F.M. Bertera, A. Carranza, S.B. Gorzalczy, D.A. Chiappetta, C. Morales, R.J. Gelpi, C.A. Taira, A.H. Polizio, M. Donato, C. Höcht, Effects of third-generation  $\beta$ -blockers, atenolol or amlodipine on blood pressure variability and target organ damage in spontaneously hypertensive rats, *J. Hypertens.* 38 (2020) 536–545. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002284>.
- [167] A.F. Wróbel, A. Stępnik, M. Bańcerowska-Górska, K. Stangel-Wójcikiewicz, P. Czuczwar, The efficacy of nebivolol on spontaneously hypertensive rats with overactive bladder – an experimental study, *Arch. Med. Sci.* 18 (2022) 1342–1350. <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.88279>.
- [168] Y.M. Pinto, M. Paul, D. Ganten, Lessons from rat models of hypertension: From Goldblatt to genetic engineering, *Cardiovasc. Res.* 39 (1998) 77–88. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00077-7).
- [169] X.-F. Leong, C.-Y. Ng, K. Jaarin, Animal models in cardiovascular research: Hypertension and atherosclerosis, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/528757>.
- [170] K. Kramer, R. Remie, Measuring blood pressure in small laboratory animals, *Methods Mol. Med.* 108 (2005) 51–62. <https://doi.org/10.1385/1-59259-850-1:051>.
- [171] T.W. Kurtz, K.A. Griffin, A.K. Bidani, R.L. Davisson, J.E. Hall, Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals-Part 2: Blood pressure measurement in experimental animals, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) e22–e33. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000158419.98675.d7>.
- [172] E. Sjögren, H. Thörn, C. Tannergren, In silico modeling of gastrointestinal drug absorption: Predictive performance of three physiologically based absorption models, *Mol. Pharm.* 13 (2016) 1763–1778. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00861>.
- [173] S. Cvijić, J. Ignjatović, J. Parojčić, S. Ibrić, The emerging role of physiologically-based pharmacokinetic/biopharmaceutics modeling in formulation development, *Arh. Farm.* 71 (2021)

318 – 335. <https://doi.org/10.5937/arhfarm71-32479>.

- [174] FDA, Successes and Opportunities in Modeling & Simulation for FDA, 2022. <https://www.fda.gov/media/163156/download>.
- [175] B. Xia, Z. Yang, H. Zhou, V. Lukacova, W. Zhu, M. Milewski, F. Kesisoglou, Development of a Novel Oral Cavity Compartmental Absorption and Transit Model for Sublingual Administration: Illustration with Zolpidem, *AAPS J.* 17 (2015) 631–642. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9727-7>.
- [176] S. Cvijić, Primena in silico metoda biofarmaceutske karakterizacije u razvoju farmaceutskih preparata za oralnu primenu, specijalistički rad, 2015.
- [177] Simulation Plus Inc., GastroPlus™ manual, (2019).
- [178] E.A. Mintah, Applications of mechanistic modeling and simulations in compound and dosage forms selections, Mercer University, 2017. <http://hdl.handle.net/10898/3743>.
- [179] M. Drašković, E. Turković, I. Vasiljević, K. Trifković, S. Cvijić, D. Vasiljević, J. Parojčić, Comprehensive evaluation of formulation factors affecting critical quality attributes of casted orally disintegrating films, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 56 (2020) 101614. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101614>.
- [180] W. Huang, S.L. Lee, L.X. Yu, Mechanistic approaches to predicting oral drug absorption, *AAPS J.* 11 (2009) 217–224. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9098-z>.
- [181] B. Agoram, W.S. Woltosz, M.B. Bolger, Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50 (2001) S41–S67. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00179-x](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00179-x).
- [182] M. Tubic-Grozdanic, M.B. Bolger, and P. Langguth, Application of gastrointestinal simulation for extensions for biowaivers of highly permeable compounds, *AAPS J.* 10 (2008) 213–226. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9023-x>.
- [183] S. Gittings, Development of biorelevant simulated salivary fluids for application in dissolution testing, University of Nottingham, 2017. [http://eprints.nottingham.ac.uk/39862/1/Thesis\\_FINAL\\_version\\_for%0A\\_submission\\_Sally\\_Gittings.pdf](http://eprints.nottingham.ac.uk/39862/1/Thesis_FINAL_version_for%0A_submission_Sally_Gittings.pdf).
- [184] C.A.P. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Design and evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery, *J. Control. Release.* 55 (1998) 143–152. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00044-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00044-3).
- [185] S.S. Shidhaye, N.S. Saindane, S. Sutar, V. Kadam, Mucoadhesive bilayered patches for administration of sumatriptan succinate, *AAPS PharmSciTech.* 9 (2008) 909–916. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9125-x>.
- [186] V. Demiri, Production of multilayer tablets via the novel Gluing Pills Technology and their characterization, Graz University of Technology, 2017. <https://diglib.tugraz.at/download.php?id=5a33ac3d89b13&location=browse>.
- [187] M.L. Bruschi, D.S. Jones, H. Panzeri, M.P.D. Gremião, O. de Freitas, E.H.G. Lara, Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: In vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties, *J Pharm Sci.* 96 (2007) 2074–2089. <https://doi.org/10.1002/jps.20843>.
- [188] G.P. Andrews, L. Donnelly, D.S. Jones, R.M. Curran, R.J. Morrow, A.D. Woolfson, R.K. Malcolm, Characterization of the rheological, mucoadhesive, and drug release properties of highly structured gel platforms for intravaginal drug delivery, *Biomacromolecules.* 10 (2009) 2427–2435. <https://doi.org/10.1021/bm9003332> CCC: \$40.75.
- [189] M.R. Rao, S. Priyanka, Development and evaluation of mucoadhesive buccal tablets of ketorolac tromethamine, *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 48 (2014) 69–74.
- [190] P. Stasiak, M. Placzek, P. Lepek, M. Sznitowska, Influence of polymer type, active substance,

- and experimental model on mucoadhesive properties of selected drug formulations, *J. Dispers. Sci. Technol.* 32 (2011) 1780–1785. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.616175>.
- [191] Yu Lawrence X., J.T. Wang, A.S. Hussain, Evaluation of USP apparatus 3 for dissolution testing of immediate-release products, *AAPS PharmSci.* 4 (2002) 1–5. <https://doi.org/10.1208/ps040101>.
- [192] H. Aronson, Correction factor for dissolution profile calculations, *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 1190–1190. <https://doi.org/10.1002/jps.2600821126>.
- [193] V.P. Shah, Y. Tsong, P. Sathe, J.-P. Liu, In vitro dissolution profile comparison - Statistics and analysis of the similarity factor, *f2*, *Pharm. Res.* 15 (1998) 889–896.
- [194] Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, A. Zou, W. Li, C. Yao, S. Xie, DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles, *AAPS J.* 12 (2010) 263–271. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>.
- [195] M.L. Bruschi, 5 - Mathematical models of drug release, in: M.L. Bruschi (Ed.), *Strateg. to Modify Drug Release from Pharm. Syst.*, Woodhead Publishing, 2015: pp. 63–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>.
- [196] B. Popović, P. Popović, *Statističko modeliranje*, prvo izdan, Prirodno–matematički fakultet, Niš, Srbija, 2018.
- [197] M.L. Bruschi, ed., 5 - Mathematical models of drug release, in: *Strateg. to Modify Drug Release from Pharm. Syst.*, 1st editio, Elsevier - Woodhead Publishing, 2015: pp. 63–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2014-0-02342-8>.
- [198] J.M. Haigh, E.W. Smith, The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2 (1994) 311–330. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0928-0987\(94\)90032-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0928-0987(94)90032-9).
- [199] K.-H. Diehl, R. Hull, D. Morton, R. Pfister, Y. Rabemampianina, D. Smith, J.-M. Vidal, C. Van De Vorstenbosch, A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, *J. Appl. Toxicol.* 21 (2001) 15–23. <https://doi.org/10.1002/jat.727>.
- [200] E. Cid, F. Mella, L. Lucchini, M. Cárcamo, J. Monasterio, Plasma concentrations and bioavailability of propranolol by oral, rectal and intravenous administration in man, *Biopharm. Drug Dispos.* 7 (1986) 559–566. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510070605>.
- [201] L.S. Olanoff, T. Walle, T.D. Cowart, U.K. Walle, M.J. Oexmann, E.C. Conradi, Food effects on propranolol systemic and oral clearance: support for a blood flow hypothesis, *Clin Pharmacol Ther.* 40 (1986) 408–414. <https://doi.org/10.1038/clpt.1986.198>.
- [202] Ankit Rohatgi, WebPlotDigitizer version 4.2, (2019). <https://automeris.io/WebPlotDigitizer>.
- [203] M. Mohsen-Nia, A.H. Ebrahimabadi, B. Niknahad, Partition coefficient n-octanol/water of propranolol and atenolol at different temperatures: Experimental and theoretical studies, *J. Chem. Thermodyn.* 54 (2012) 393–397. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2012.05.021>.
- [204] S. Takka, S. Rajbhandari, A. Sakr, Effect of anionic polymers on the release of propranolol hydrochloride from matrix tablets, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (2001) 75–82. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00147-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00147-3).
- [205] D. Dahlgren, C. Roos, E. Sjögren, H. Lennernäs, Direct in vivo human intestinal permeability (Peff) determined with different clinical perfusion and intubation methods, *J. Pharm. Sci.* 104 (2015) 2702–2726. <https://doi.org/10.1002/jps.24258>.
- [206] Y. Wang, Z. Wang, Z. Zuo, B. Tomlinson, B.T.K. Lee, M.B. Bolger, M.S.S. Chow, Clinical pharmacokinetics of buffered propranolol sublingual tablet (Promptol™) - Application of a new “physiologically based” model to assess absorption and disposition, *AAPS J.* 15 (2013) 787–796. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9479-1>.
- [207] Z. Ismail, M.S.A. Wahab, A.R.A. Rahman, Bioequivalence study of propranolol tablets, *Eur. J.*

Gen. Med. 1 (2004) 42–47. <https://doi.org/10.29333/ejgm/82227>.

- [208] J. Marshall, S. Gunasekaran, The infrared and raman spectra of propranolol hydrochloride, *Indian J. Phys.* 70B (1996) 505–511.
- [209] S. Salehi, S. Boddohi, Design and optimization of kollicoat® IR based mucoadhesive buccal film for co-delivery of rizatriptan benzoate and propranolol hydrochloride, *Mater. Sci. Eng. C.* 97 (2019) 230–244. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.036>.
- [210] S. Takka, Propranolol hydrochloride - anionic polymer binding interaction, *Farm.* 58 (2003) 1051–1056. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(03\)00181-2](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(03)00181-2).
- [211] H.T. Ahmed, O.G. Abdullah, Preparation and composition optimization of PEO:MC polymer blend films to enhance electrical conductivity, *Polymers (Basel)*. 11 (2019) 1–18. <https://doi.org/10.3390/polym11050853>.
- [212] M.V. Venkata, N.S. Rao, S.A. Sunil, B.J. Ram, V. Ramana, M. Kolapalli, Statistical design and evaluation of a propranolol HCl gastric floating tablet, *Acta Pharm. Sin. B.* 2 (2012) 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2011.12.008>.
- [213] V.K. Sharma, D.S. Kalonia, Effect of vacuum drying on protein-mannitol interactions: The physical state of mannitol and protein structure in the dried state, *AAPS PharmSciTech.* 5 (2004) 1–12.
- [214] M. Kopani, M. Mikula, M. Takahashi, J. Rusnák, E. Pincík, FT IR spectroscopy of silicon oxide layers prepared with perchloric acid, *Appl. Surf. Sci.* 269 (2013) 106–109. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.09.081>.
- [215] B. Shokri, M.A. Firouzjah, S.I. Hosseini, FTIR analysis of silicon dioxide thin film deposited by Metal organic-based PECVD, in: *Proc. 19th Int. Symp. Plasma Chem. Soc., Bochum, Germany, 2009*: pp. 26–31.
- [216] H.S. Mansur, C.M. Sadahira, A.N. Souza, A.A.P. Mansur, FTIR spectroscopy characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde, *Mater. Sci. Eng. C.* 28 (2008) 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.088>.
- [217] C. Gustafsson, C. Nyström, H. Lennholm, M.C. Bonferoni, C.M. Caramella, Characteristics of hydroxypropyl methylcellulose influencing compactibility and prediction of particle and tablet properties by infrared spectroscopy, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 494–504. <https://doi.org/10.1002/jps.10323>.
- [218] S. Sahoo, C.K. Chakraborti, P.K. Behera, Spectroscopic investigations of a ciprofloxacin/HPMC mucoadhesive suspension, *Int. J. Appl. Pharm.* 4 (2012) 1–8.
- [219] F. Madsen, K. Eberth, J.D. Smart, A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration, *J. Control. Release.* 50 (1998) 167–178. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(97\)00138-7](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(97)00138-7).
- [220] A.K. Singla, M. Chawla, A. Singh, Potential applications of carbomer in oral mucoadhesive controlled drug delivery system: A review, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26 (2000) 913–924. <https://doi.org/10.1081/DDC-100101318>.
- [221] S. Dhawan, K. Dhawan, M. Varma, V.R. Sinha, Applications of Poly(ethylene oxide ) in drug delivery systems Part II, *Pharm. Technol.* (2005) 82–96.
- [222] S.B. Upadhye, A. Rajabi-Siahboomi, Properties and applications of polyethylene oxide and ethylcellulose for tamper resistance and controlled drug delivery, in: M.A. Repka, N. Langley, J. DiNunzio (Eds.), *Melt Extrus. Mater. Technol. Drug Pod. Des.*, 1st editio, Springer, New York, 2013: pp. 145–158. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8432-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8432-5_6).
- [223] A.F. Shahiwala, 2 Applications of polymers in buccal drug delivery, in: A. Misra, A. Shahiwala (Eds.), *Appl. Polym. Drug Deliv.*, Smithers Rapra Technology, 2014: pp. 59–96.

- [224] K.K. Peh, C.F. Wong, Polymeric films as vehicle for buccal delivery: Swelling, mechanical, and bioadhesive properties., *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2 (1999) 53–61.
- [225] K. Centkowska, E. Ławrecka, M. Sznitowska, Technology of orodispersible polymer films with micronized loratadine—Influence of different drug loadings on film properties, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030250>.
- [226] J. Boateng, O. Okeke, Evaluation of clay-functionalized wafers and films for nicotine replacement therapy via buccal mucosa, *Pharmaceutics*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030104>.
- [227] O.C. Okeke, J.S. Boateng, Nicotine stabilization in composite sodium alginate based wafers and films for nicotine replacement therapy, *Carbohydr. Polym.* 155 (2017) 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.053>.
- [228] A. Körner, A. Larsson, A. Andersson, L. Piculell, Swelling and polymer erosion for poly(ethylene oxide) tablets of different molecular weights polydispersities, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 1225–1238. <https://doi.org/10.1002/jps.21892>.
- [229] V. Harikrishnan, S. Madhusudhan, A. Santhiagu, Design and evaluation of controlled release buccal tablet of tizanidine hydrochloride using natural polymer guar gum, *Der Pharm. Lett.* 8 (2016) 73–79.
- [230] G. Sandri, M. Ruggeri, S. Rossi, M.C. Bonferoni, B. Vigani, F. Ferrari, (Trans)buccal drug delivery, in: J. Martins, H. Santos (Eds.), *Nanotechnol. Oral Drug Deliv. From Concept to Appl.*, 1st ed., Elsevier Inc., Amsterdam, Netherlands, 2020: pp. 225–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818038-9.00013-2>.
- [231] S. Charde, M. Mudgal, L. Kumar, R. Saha, Development and evaluation of buccoadhesive controlled release tablets of lercanidipine, *AAPS PharmSciTech.* 9 (2008) 182–190. <https://doi.org/10.1208/s12249-007-9031-7>.
- [232] D.M. Shinkar, A.S. Dhake, C.M. Setty, Drug delivery from the oral cavity: a focus on mucoadhesive buccal drug delivery systems, *PDA J Pharm Sci Technol.* 66 (2012) 466–500. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2012.00877>.
- [233] European Medicines Agency, Guideline on the reporting of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation, 2018. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-reporting-physiologically-based-pharmacokinetic-pbpb-modelling-and-simulation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-reporting-physiologically-based-pharmacokinetic-pbpb-modelling-and-simulation_en.pdf).
- [234] A.P. Mansur, S.D. Avakian, R.S. Paula, H. Donzella, S.R.C.J. Santos, J.A.F. Ramires, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propranolol in hypertensive patients after sublingual administration: Systemic availability, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 31 (1998) 691–696. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1998000500014>.
- [235] Additional Dosage Routes, GastroPlus™, SimulationsPlus, Inc., SAD. (n.d.). <https://www.simulations-plus.com/software/gastroplus/additional-dosage/#accordion-panel-5ef63ee94c001c4fc88b15be72aca23f> (accessed December 12, 2023).

7

## **PRILOZI**



## 7.1 Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

### Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

- **Kurćubić I**, Djuriš J, Cvijić S, Crevar M, Ibrić S, Miloradović Z, Mihailović-Stanojević N, Karanović D, Ivanov M, Jovović Đ, Vajić UJ. Integrated *in vitro* - *in vivo* - *in silico* studies in the pharmaceutical development of propranolol hydrochloride mucoadhesive buccal films. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2023; 86: 104715.
- **Kurćubić I**, Vajić UJ, Cvijić S, Crevar-Sakač M, Bogavac-Stanojević N, Miloradović Z, Mihailović-Stanojević N, Ivanov M, Karanović D, Jovović Đ, Djuriš J. Mucoadhesive buccal tablets with propranolol hydrochloride: Formulation development and *in vivo* performances in experimental essential hypertension. *International Journal of Pharmaceutics*, 2021; 610: 121266.
- **Kurcubic I**, Cvijic S, Filipcev B, Ignjatovic J, Ibric S, Djuris J. Development of propranolol hydrochloride bilayer mucoadhesive buccal tablets supported by *in silico* physiologically-based modeling. *Reactive and Functional Polymer*, 2020; 151: 104587.

### Rad objavljen u vrhunskom nacionalnom časopisu (M51)

- **Kurćubić I**, Cvijić S, Lukić M, Ibrić S, Djuriš J. Multiparticulate oral formulations as a viable strategy for precise drug dosing in pediatrics: Propranolol case study. *Arh. farm.* 2021; 71: 141-159.

### Radovi saopšteni na međunarodnim skupovima štampani u izvodu (M34)

- **Kurćubić I**, Ibrić S, Djuriš J. Assessment of mucoadhesive buccal tablets with propranolol hydrochloride using principal component analysis. 14<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Ohrid, Severna Makedonija, 28-30. septembar 2023.
- **Kurćubić I**, Vajić UJ, Crevar-Sakač M, Cvijić S, Ibrić S, Miloradović Z, Mihajlović-Stojanović N, Ivanov M, Karanović D, Jovović Đ, Djuriš J. Mucoadhesive buccal tablets with propranolol hydrochloride: *In vivo* performances in spontaneously hypertensive rats. 13<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Gdanjsk, Poljska, 16-18. septembar 2021 (*online učešće*).
- **Kurćubić I**, Cvijić S, Ignjatović J, Ibrić S, Đuriš J. Formulation and *in vitro-in silico* assessment of bilayer mucoadhesive buccal tablets with propranolol hydrochloride. 1<sup>st</sup> International Conference on Adhesion in Aqueous Media - From Biology to Synthetic Materials, Drezden Nemačka, 9-12. septembar 2019.
- **Kurćubić I**, Ibrić S, Djuriš J. Application of mixture experimental design in formulation and characterisation of two-layer tablets with propranolol hydrochloride. III Congress of Pharmacy of Montenegro with international participation, Budva, Crna Gora, 9-12. maj 2019.
- **Kurćubić I**, Joković S, Jovanovic M, Djuris J. Comparison of hydrophilic polymers functionality in formulation of mucoadhesive matrix tablets. 12<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs, Segedin, Mađarska, 20-22. septembar 2018.

## **Radovi saopšteni na nacionalnim skupovima štampani u izvodu (M64)**

- **Kurćubić I**, Vajić UJ, Cvijić S, Crevar-Sakač M, Ibrić S, Miloradović Z, Mihajlović-Stojanović N, Ivanov M, Karanović D, Jovović Đ, Djuriš J. Effects of acute application of mucoadhesive buccal film with propranolol hydrochloride in an animal model of essential hypertension. VIII Serbian congress of pharmacy with international participation, Beograd, Srbija, 12-15. oktobar 2022.
- **Kurćubić I**, Ibrić S, Đuriš J. Comparison of the functional properties of polyethylene oxide polymer in formulation of mucoadhesive dosage forms. VII Congress of Pharmacy with international participation, Beograd, Srbija, 10-14. oktobar 2018.

## 7.2 Biografija autora

Ivana Kurćubić rođena je 24. aprila 1992. godine u Čačku. Osnovnu školu „Dr Dragiša Mišović” i Gimnaziju u Čačku završila je kao nosilac diplome „Vuk Karadžić”. Tokom osnovne škole učestvovala je na takmičenjima iz hemije.

Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2011. godine, smer Opšta farmacija, na kom je 2016. godine diplomirala sa prosečnom ocenom 9,22 i ocenom 10 na završnom radu. Od 2012. do 2016. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Pripravnički staž obavila je u apotekarskoj ustanovi “BENU” u Beogradu u toku 2016/2017. godine, nakon čega je položila stručni ispit za diplomirane farmaceute u maju 2017. godine. Doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu, modul Farmaceutska tehnologija, upisala je 2017. godine, a ispite predviđene planom studija položila sa prosečnom ocenom 9,25. U oktobru 2020. godine položila je kurs „Principi rada sa eksperimentalnim životinjama” na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, čime je stekla pravo obavljanja ogleđa na životinjama u sklopu svog naučnoistraživačkog rada.

Od oktobra 2017. godine do oktobra 2018. godine bila je zaposlena kao saradnik u nastavi na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju. Učestvovala je u izvođenju praktične nastave iz predmeta Farmaceutska tehnologija I, II i III. Od maja 2018. godine do aprila 2021. godine bila je zaposlena kao istraživač pripravnik na projektu iz oblasti tehnološkog razvoja pod nazivom „Razvoj proizvoda i tehnologija koje obezbeđuju željeno oslobađanje lekovitih supstanci iz čvrstih farmaceutskih oblika” (TR 34007), koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Od aprila 2021. do danas zaposlena je kao istraživač saradnik na projektu Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja evidencioni broj 451-03- 9/2021-14/200161 i 51-03-47/2023-01/200161. Od novembra 2020. do marta 2021. godine angažovana je na međunarodnom projektu NeuroDeRisk-HORIZON 2020 IM12-2017-13 kao mlađi saradnik. Kao stipendista *CEEPUS* programa boravila je na stručnom usavršavanju na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Medicinskog Univerziteta u Gdanjsku (Poljska), od oktobra do decembra 2019. godine. Komentor je tri studentska naučnoistraživačka rada koji su prezentovani na Mini-kongresu studenata Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, pod organizacijom Centra za naučnoistraživački rad studenata Farmaceutskog fakulteta (CNIRS).

Autor je i koautor 4 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 2 rada u domaćem časopisu (M52), 5 saopštenja sa međunarodnih (M34) i 2 saopštenja sa domaćih skupova štampanih u izvodu (M64) i koautor 1 poglavlja u knjizi međunarodnog značaja.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Ивана Курћубић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ 34/2017 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Мукоадхезивне букалне таблете и филмови са пропранолол-хидрохлоридом: формулација, *in vitro/in silico* карактеризација и *in vivo* испитивања у анималном моделу есенцијалне хипертензије

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана Курћубић

Број индекса 34/2017

Студијски програм модул Фармацеутска технологија

Наслов рада Мукоадхезивне букалне таблете и филмови са пропранолол-хидрохлоридом: формулација, *in vitro/in silico* карактеризација и *in vivo* испитивања у анималном моделу есенцијалне хипертензије

Ментор др. сц. Јелена Ђуриш и др. сц. Уна-Јована Вајић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

Мукоадхезивне букалне таблете и филмови: формулација, *in vitro/in silico*  
карактеризација и *in vivo* испитивања у анималном моделу есенцијалне хипертензије

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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