

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET**

MARIJA D. ILIĆ

**PRIMENA *IN VITRO* I *IN SILICO*
METODA ZA PREDVIĐANJE LEK -
HRANA INTERAKCIJE: TABLETE SA
MODIFIKOVANIM OSLOBAĐANJEM
NIFEDIPINA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2015. godina

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY**

MARIJA D. ILIĆ

**APPLICATION OF *IN VITRO* AND
IN SILICO METHODS FOR THE
PREDICTION OF DRUG-FOOD
INTERACTIONS: NIFEDIPINE
MODIFIED RELEASE TABLETS**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2015

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju
Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.

Mentor

Dr sc. Jelena Parojčić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

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

Dr sc. Vjera Pejanović, naučni savetnik

Datum odbrane _____

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se mentoru prof. dr Jeleni Parojčić na posvećenom vremenu, ukazanom poverenju, pomoći, ohrabrenjima i savetima koje mi je pružila tokom rada na ovoj doktorskoj disertaciji.

Članovima komisije prof. dr Svetlani Ibrić i dr sc. Vjeri Pejanović zahvaljujem na podršci, korisnim savetima i saradnji prilikom izrade ove disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem mojim roditeljima Stani i Dragutinu i sestri Ani koji su uvek bili moja podrška i oslonac i koji mi pružaju bezuslovnu ljubav i razumevanje.

Posebnu i najveću zahvalnost dugujem suprugu Miodragu i mojim anđelima Jovani i Vojinu na strpljenju, razumevanju i ljubavi koju mi pružaju i koji su dali smisao svemu što radim i čemu težim u životu.

PRIMENA *IN VITRO* I *IN SILICO* METODA ZA PREDVIĐANJE LEK - HRANA INTERAKCIJE: TABLETE SA MODIFIKOVANIM OSLOBAĐANJEM NIFEDIPINA

Rezime

Apsorpcija lekovitih supstanci iz oralno primenjenih preparata predstavlja složen proces na koji mogu uticati brojni faktori, kao što su fizičko-hemijska svojstva lekovite supstance, karakteristike farmaceutskog oblika leka i fiziološki faktori na mestu apsorpcije. Prisustvo hrane u gastrointestinalnom traktu dodatno doprinosi složenosti procesa apsorpcije i može da dovede do promena fizioloških uslova ili fizičko-hemijskih interakcija lekova i određenih sastojaka obroka, koje mogu da izazovu promene u brzini i/ili stepenu apsorpcije istovremeno primenjenog leka. Predviđanje uticaja hrane tokom razvoja lekova i procena ovih efekata na farmakokinetiku leka imaju veliki značaj u savremenim istraživanjima i postižu se primenom *in silico*, *in vitro* i *in vivo* metoda.

U literaturi su opisani različiti efekti hrane na brzinu i stepen apsorpcije nifedipina i predložena različita objašnjenja uočenih fenomena. Većina sprovedenih ispitivanja ukazuje da je apsorpcija nifedipina u prisustvu hrane specifična za formulaciju lekovitog preparata, odnosno da zavisi od vrste farmaceutskog oblika i sastava formulacije.

Cilj ovog istraživanja je bila biofarmaceutska karakterizacija fizičko-hemijskih interakcija između hrane i različitih, komercijalno dostupnih, preparata sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina i procena mogućnosti primene različitih *in vitro* i *in silico* metoda za predviđanje uticaja hrane.

U okviru eksperimentalnog rada detaljno su analizirani literaturni *in vivo* podaci primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda (Wagner-Nelson, Loo-Riegelman i numerička dekonvolucija) i sprovedeno je *in vitro* ispitivanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja nifedipina iz tableta tipa osmotske pumpe i hidrofilnih matriks sistema pod različitim eksperimentalnim uslovima. U okviru *in silico* ispitivanja razvijeni su i validirani fiziološki zasnovan farmakokinetički model gastrointestinalne simulacije i model veštačke neuronske mreže. Mogućnost uspostavljanja *in vitro* – *in vivo* korelacije ispitana je primenom dekonvolucionog i konvolucionog pristupa.

Na osnovu analiziranih *in vivo* studija uticaja hrane na apsorpciju nifedipina iz različitih preparata, u ovom istraživanju su predloženi kriterijumi za efekat hrane zasnovani na izračunavanju vrednosti *in vivo* stepena efekta hrane. Rezultati dobijeni primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda pokazali su prednost metode numeričke dekonvolucije na osnovu farmakokinetičkog profila nakon oralne primene za identifikaciju kinetike rastvaranja *in vivo* i proučavanje apsorpcije leka koji podleže intenzivnom presistemskom metabolizmu.

In vitro ispitivanje je pokazalo da izbor aparature, kao i medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja, značajno utiče na oslobađanje nifedipina iz preparata sa modifikovanim oslobađanjem, uključujući relativno robusne formulacije, kao što su osmotski kontrolisane tablete. Primena fiziološki zasnovanih medijuma koji simuliraju primenu leka na gladno i nakon obroka, pokazala je odsustvo uticaja u slučaju tableta tipa osmotske pumpe, odnosno izražen efekat hrane u slučaju tableta tipa hidrofилnog matriksa, što ukazuje na diskriminativnu sposobnost ovih medijuma u cilju procene uticaja hrane.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da se različiti *in silico* modeli mogu uspešno koristiti u cilju uspostavljanja *in vitro* – *in silico* – *in vivo* korelacije. Tehnika gastrointestinalne simulacije pokazala je prednost u pogledu predviđanja apsorpcije pokazujući veću sposobnost generalizacije u odnosu na model veštačke neuronske mreže. Prednost ovog modela je pokazana primenom kako konvolucionog, tako i dekonvolucionog pristupa uspostavljanju *in vitro* – *in vivo* korelacije, što je značajno sa aspekta identifikacije biorelevantnih specifikacija za ispitivanje brzine oslobađanja nifedipina iz ispitivanih preparata i primene modela korelacije u različitim fazama razvoja i proizvodnje lekovitog preparata u cilju obezbeđenja kvaliteta, i posledično efikasnosti i bezbednosti leka.

Ključne reči: predviđanje apsorpcije, uticaj hrane, nifedipin, brzina rastvaranja, gastrointestinalna simulacija, veštačka neuronska mreža, *in vitro* – *in vivo* korelacija

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

UDK broj: 615.225:[615.032:57.085 (043.3)]

APPLICATION OF *IN VITRO* AND *IN SILICO* METHODS FOR THE PREDICTION OF DRUG-FOOD INTERACTIONS: NIFEDIPINE MODIFIED RELEASE TABLETS

Abstract

Oral drug absorption is complex process affected by a number of factors related to drug substance physicochemical properties, dosage form characteristics and physiological conditions after drug administration. Presence of food within the gastrointestinal tract is an additional factor that contributes to this complexity, since it can alter physiological conditions or cause physicochemical interactions of drug and meal components, changing the rate and/or extent of drug absorption. Prediction of oral drug absorption and food effect have been increasingly important in drug development, by using *in silico*, *in vitro* and *in vivo* methods.

Literature data on various food effects on rate and extent of nifedipine absorption are available from a number of sources and different potential interaction mechanisms have been suggested. Majority of studies reports that nifedipine food effect is formulation specific, depending on dosage form characteristics and product composition.

The aim of the present study was biopharmaceutical characterisation of physicochemical interactions of food and different commercially available nifedipine modified release dosage forms and evaluation of applicability and usefulness of different *in vitro* and *in silico* methods predictive of food effect.

Detailed analysis of the literature data on nifedipine pharmacokinetics was performed by applying conventional pharmacokinetic methods (Wagner-Nelson, Loo-Riegelman and numerical deconvolution). *In vitro* solubility and dissolution testing of nifedipine osmotic tablets and hydrophilic matrix tablets were performed under various experimental conditions. *In silico* modeling was employed by development and validation of physiologically based pharmacokinetic model of gastrointestinal simulation and artificial neural network. *In vitro* – *in vivo* correlation was evaluated using deconvolution and convolution approach.

Based on *in vivo* food effect studies of various nifedipine dosage forms, criteria for food effect prediction have been proposed based on calculation of *in vivo* food effect ratio. The results obtained by applying conventional pharmacokinetic analysis indicated the advantage of numerical deconvolution based on the oral reference for the identification of *in vivo* delivery and absorption analysis of drugs exhibiting extensive presystemic metabolism.

In vitro dissolution testing indicated that nifedipine release from modified release dosage forms was highly susceptible to the influence of apparatus and dissolution media employed, including relatively robust osmotic controlled release tablets. Physiologically based dissolution media simulating fasting and fed states were indicative of *in vivo* food effect, showing the lack of food effect for osmotic tablets and positive food effect in the case of nifedipine hydrophilic matrix tablets.

The results obtained indicate that different *in silico* models may be successfully employed in *in vitro* – *in silico* – *in vivo* correlation development. Gastrointestinal simulation exhibited better generalisation ability in absorption prediction compared to artificial neural network. The advantage of this model was shown in both convolution and deconvolution approach, providing valuable predictions in the course of bioperformance dissolution method and *in vitro* – *in vivo* correlation development in drug discovery and manufacturing, ensuring quality, efficacy and safety of the drug product.

Keywords: absorption prediction, food effect, nifedipine, dissolution, gastrointestinal simulation, artificial neural network, *in vitro* – *in vivo* correlation

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical technology

UDC number: 615.225:[615.032:57.085 (043.3)]

Sadržaj:

I OPŠTI DEO	1
1. APSORPCIJA LEKOVA	3
1.1. Fizičko-hemijska svojstva lekovite supstance	5
1.2. Karakteristike farmaceutskog oblika leka	7
1.3. Fiziološki faktori	11
1.4. Uticaj hrane na apsorpciju lekova	14
2. INTERAKCIJE LEKOVA I HRANE	15
2.1. Fizičko-hemijske interakcije lekova i hrane	15
2.2. Fiziološki mehanizmi uticaja hrane	17
2.3. Mogućnost predviđanja uticaja hrane na apsorpciju leka	19
2.3.1. Predviđanje uticaja hrane na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika lekovite supstance	19
2.3.2. Predviđanje uticaja hrane zasnovano na Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije	21
2.3.3. Predviđanje uticaja hrane prema Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije zasnovanom na dispoziciji lekovitih supstanci	22
3. <i>IN VITRO</i> I <i>IN SILICO</i> METODE ZA PREDVIĐANJE LEK-HRANA INTERAKCIJA	24
3.1. <i>In vitro</i> metode	25
3.1.1. Fiziološki zasnovani medijumi za ispitivanje brzine rastvaranja	25
3.1.2. Dinamički modeli gastrointestinalnog trakta	27
3.2. <i>In silico</i> metode	29
3.2.1. Fiziološki zasnovani farmakokinetički modeli	30
3.2.2. Veštačke neuronske mreže	34
4. NIFEDIPIN	35
4.1. Biofarmaceutska svojstva nifedipina	35
4.2. Farmakokinetička svojstva nifedipina	37
4.3. Interakcije nifedipina i hrane	38
4.4. Farmaceutski oblici sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina	39

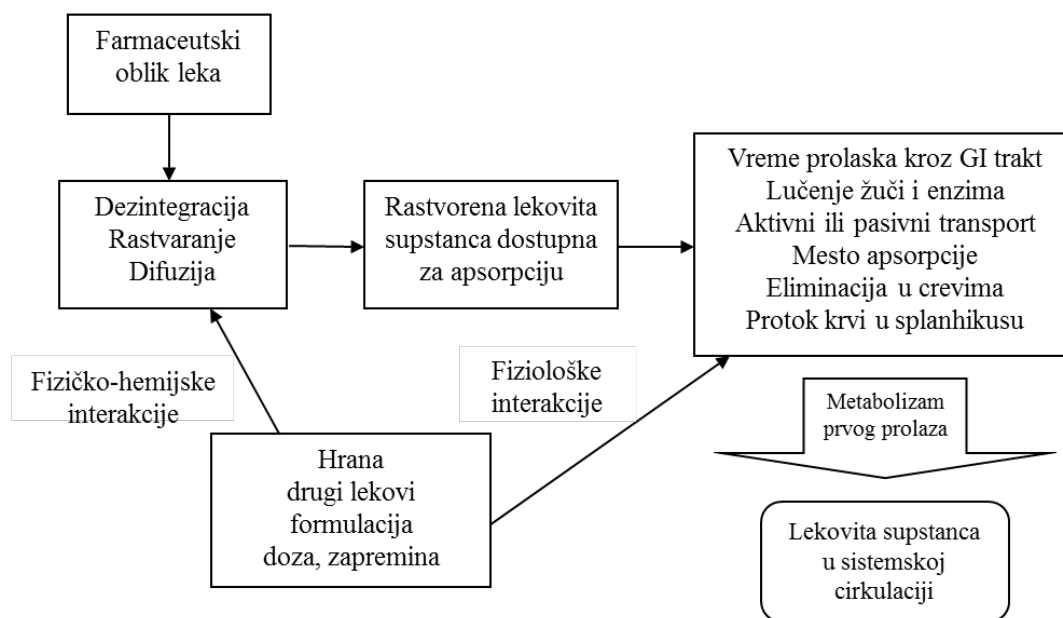
5. CILJ ISTRAŽIVANJA	43
II EKSPERIMENTALNI DEO	44
6. MATERIJAL I METODE	45
6.1. Materijal	45
6.2. Metode	46
6.2.1. <i>In vivo</i> podaci	46
6.2.2. Konvencionalna farmakokinetička analiza	47
6.2.2.1. Metoda Wagner-Nelson	47
6.2.2.2. Metoda Loo-Riegelman	47
6.2.2.3. Numerička dekonvolucija	48
6.2.3. <i>In silico</i> metode	50
6.2.3.1. Tehnika gastrointestinalne simulacije	50
6.2.3.2. Metodologija veštačkih neuronskih mreža	51
6.2.4. Ispitivanje rastvorljivosti	53
6.2.5. Ispitivanje brzine rastvaranja	54
6.2.6. <i>In vitro</i> – <i>in vivo</i> korelacija	56
7. REZULTATI I DISKUSIJA	58
7.1. <i>IN VIVO</i> STUDIJE	58
7.1.1. <i>In vivo</i> studije različitih farmaceutskih oblika nifedipina	58
7.1.2. <i>In vivo</i> studije uticaja hrane	59
7.1.3. Identifikacija i uporedna analiza <i>in vivo</i> input profila nifedipina dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda	65
7.1.4. Identifikacija <i>in vivo</i> stepena efekta hrane	73
7.2. <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJA	78
7.2.1. Ispitivanje rastvorljivosti nifedipina	78
7.2.2. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja	80
Tablete tipa osmotske pumpe	80
Tablete tipa hidrofilnih matriksa	84
7.3. <i>IN SILICO</i> ISPITIVANJA	94
7.3.1. GASTROINTESTINALNA SIMULACIJA	96
7.3.1.1. Razvoj i validacija modela	96

Preparati sa trenutnim oslobađanjem nifedipina	99
Preparati sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina	100
7.3.1.2. Gastrointestinalna simulacija apsorpcije nifedipina	103
Tablete tipa osmotske pumpe	103
Tablete tipa hidrofilnih matriksa	107
7.3.1.3. Identifikacija <i>in vivo</i> profila rastvaranja i apsorpcije primenom modela gastrointestinalne simulacije	110
Tablete tipa osmotske pumpe	111
Tablete tipa hidrofilnih matriksa	114
7.3.2. VEŠTAČKE NEURONSKE MREŽE	117
7.3.2.1. Razvoj i validacija modela	117
7.3.2.2. Simulacija apsorpcije nifedipina primenom modela veštačke neuronske mreže	118
7.3.2.3. Identifikacija <i>in vivo</i> profila rastvaranja primenom modela veštačke neuronske mreže	122
7.4. <i>IN VITRO</i> – <i>IN VIVO</i> KORELACIJA	128
7.4.1. Dekonvolucioni pristup uspostavljanju <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> korelacije	128
7.4.2. Konvolucioni pristup uspostavljanju <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> korelacije	136
8. ZAKLJUČCI	143
9. LITERATURA	147
BIOGRAFIJA	167
IZJAVA O AUTORSTVU	168
IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA	169
IZJAVA O KORIŠĆENJU	170

I OPŠTI DEO

UVOD

Interakcije lekova i hrane se definišu kao promene u apsorpciji, metabolizmu i eliminaciji lekovitih supstanci izazvane komponentama hrane, koje mogu imati značajan uticaj na terapijsku efikasnost i bezbednosni profil leka (Genser, 2008). Sa biofarmaceutskog aspekta značajne su interakcije na nivou apsorpcije, koje mogu dovesti do promene u biološkoj raspoloživosti, a time i promene u ispoljavanju terapijskog efekta leka. U zavisnosti od karakteristika lekovite supstance, farmaceutskog oblika leka, kao i vrste i količine unete hrane, kao rezultat interakcije može doći do povećanog ili smanjenog obima i/ili brzine apsorpcije lekovite supstance. Interakcije lekova i hrane se, na osnovu mehanizma nastanka mogu podeliti na fizičko-hemijske i fiziološke, međutim, uočeni efekat je često rezultat istovremenog uticaja većeg broja različitih faktora. Na slici 1 dat je pregled faktora uključenih u interakcije lekova i hrane na nivou apsorpcije (prema Fleisher i sar., 1999).

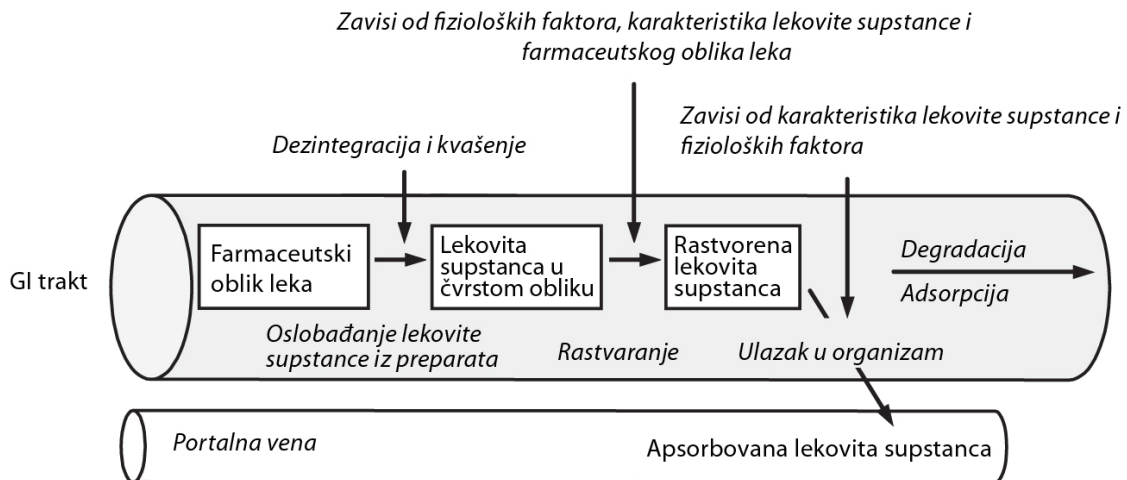


Slika 1. Pregled faktora koji mogu uticati na apsorpciju lekova u prisustvu hrane (prema Fleisher i sar., 1999)

Interakcije koje su specifične za datu lekovitu supstancu se ispituju u ranim fazama razvoja leka, međutim, sklonost konkretne formulacije ka ispoljavanju uticaja hrane često nije u potpunosti ispitana. Zbog toga je važno razviti odgovarajuće *in vitro* i *in silico* metode koje se mogu koristiti za njihovu biofarmaceutsku karakterizaciju i predviđanje potencijalne interakcije.

1. APSORPCIJA LEKOVA

Apsorpcija lekovite supstance iz gastrointestinalnog (GI) trakta, nakon primene čvrstih farmaceutskih oblika lekova, uključuje više uzastopnih procesa, i to: (i) dezintegraciju i posledično, oslobađanje lekovite supstance iz preparata, (ii) njeno rastvaranje u gastrointestinalnim tečnostima (uz moguću degradaciju, adsorpciju ili kompleksiranje) i (iii) transport lekovite supstance kroz ćelijsku membranu epitela creva. Šematski prikaz procesa apsorpcije lekovite supstance iz gastrointestinalnog trakta dat je na slici 2. Poznavanje procesa uključenih u apsorpciju lekova i mogućnost njihovog predviđanja su od velike važnosti za sagledavanje i proučavanje kinetike apsorpcije lekova (Cao i sar., 2008; Johansson i Paterson, 2008; Shargel i sar., 2005).



Slika 2. Šematski prikaz procesa apsorpcije lekovite supstance iz gastrointestinalnog trakta (prema Johansson i Paterson, 2008)

Apsorpcija oralno primenjenih lekova se pretežno odvija u tankom crevu i uključuje više različitih mehanizama. Lipofilne molekule male molekulske mase se apsorbuju kroz lipidnu membranu tankog creva procesom transcelularne pasivne difuzije, u pravcu koncentracionog gradijenta. Mnoge hidrofilne supstance se apsorbuju aktivnim transportom posredovanim nosačima, nasuprot koncentracionog gradijenta. Nosači mogu biti visoko selektivni za određene molekule, što uslovljava kompeticiju između različitih lekovitih supstanci i komponenata hrane. Važna karakteristika ovog procesa je njegova saturabilna priroda, s obzirom na ograničen broj molekula nosača, odnosno transportera. Poslednjih godina izvršena je karakterizacija velikog broja transportera, u pogledu strukture, lokalizacije u ćeliji i specifičnosti za određeni supstrat. Manje zastupljena u procesu apsorpcije lekova, olakšana difuzija se takođe odvija posredstvom transportera, ali se od aktivnog transporta razlikuje po tome što kretanje molekula lekovite supstance sledi pravac koncentracionog gradijenta. Paracelularni transport se odnosi na prolazak rastvorenih molekula male molekulske mase kroz prostore između epitelnih ćelija. Imajući u vidu varijabilnost integriteta međućelijskih veza duž GI trakta, kao i ograničenje u pogledu veličine molekula, značaj ovog načina transporta za apsorpciju lekova je diskutabilan. Makromolekuli i čestice se mogu apsorbovati procesom endocitoze, pri čemu ih ćelijska membrana okružuje i transportuje unutar ćelije, formirajući intraćelijske vezikule. Više mehanizama transporta može istovremeno biti uključeno u apsorpciju lekovite supstance, mada je najbrži proces dominantan i određuje ukupan obim i brzinu apsorpcije (Cao i sar., 2008; Shargel i sar., 2005; Washington i sar., 2002).

Kao što je već rečeno, apsorpcija lekova predstavlja složen proces na koji mogu uticati brojni faktori, kao i njihove interakcije. Najvažniji faktori od kojih zavisi apsorpcija lekova su: (i) fizičko-hemijska svojstva lekovite supstance, (ii) karakteristike farmaceutskog oblika leka, kao i (iii) fiziološki faktori na mestu apsorpcije. Razmatranje ovih faktora je od izuzetnog značaja za razvoj formulacije i biofarmaceutsku karakterizaciju lekovitog preparata u cilju postizanja odgovarajuće biološke raspoloživosti, a time i optimalnog terapijskog efekta i prihvatljive bezbednosti za pacijenta.

1.1. Fizičko-hemijska svojstva lekovite supstance

Preduslov za apsorpciju je odgovarajuća rastvorljivost i permeabilnost lekovite supstance u gastrointestinalnom traktu. Ovi parametri zavise od molekulske strukture jedinjenja, što omogućava uspostavljanje veze između strukture i efekta leka s ciljem optimizacije njegovog farmakokinetičkog profila i *in vivo* ponašanja. Stoga su, fizičke i hemijske karakteristike lekovite supstance, kao i ekscipijenas, od izuzetnog značaja u procesu razvoja formulacije i moraju se uzeti u obzir prilikom proučavanja procesa apsorpcije.

Rastvorljivost

Rastvorljivost je jedan od najznačajnijih fizičko-hemijskih faktora koji utiču na apsorpciju lekovite supstance, jer je, u najvećem broju slučajeva, njeno prisustvo u rastvorenom obliku preduslov za transport kroz ćelijsku membranu epitela creva. Rastvorljivost većine lekovitih supstanci u fiziološkim uslovima zavisi od pH vrednosti sredine i stepena jonizacije, što se mora uzeti u obzir prilikom formulacije lekovitih preparata za oralnu primenu. Pri tome, treba imati u vidu da niska rastvorljivost u vodi ne podrazumeva obavezno i slabu rastvorljivost u GI traktu, s obzirom na solubilizirajući kapacitet fizioloških tečnosti (Tong, 2008; Clarysse i sar., 2011). Savremeni trendovi u proceni rastvorljivosti lekovitih supstanci *in vivo*, u gastrointestinalnom traktu, podrazumevaju upotrebu fiziološki zasnovanih medijuma, koji sadrže kompleksne smeše žučnih soli i drugih površinski aktivnih materija prisutnih u gastrointestinalnom traktu, uz dodatak komponenata sličnih lipidima iz hrane, kao što su gliceril-monooleat i natrijum-oleat. Osim upotrebe veštačkih medijuma koji simuliraju uslove u GI traktu, procena rastvorljivosti se može vršiti i u aspiratima humanog ili životinjskog porekla izolovanim iz GI trakta u uslovima na gladno ili nakon uzimanja obroka (Dressman i sar., 2007; Butler i Dressman, 2010; Kalantzi i sar., 2006a). Prednost u ispitivanju rastvorljivosti u ranim fazama razvoja leka imaju fiziološki zasnovani medijumi, kod kojih se u poslednje vreme insistira na „funkcionalnoj“, više nego na biorelevantnosti u pogledu sastava (Clarysse i sar., 2011). Ovaj pristup podrazumeva razvoj fiziološki zasnovanih medijuma za ispitivanje rastvorljivosti koji će imati uporediv kapacitet za rastvaranje u odnosu na gastrointestinalne tečnosti, dok je istovetnost sastava *in vitro* medijuma i tečnosti u GI

traktu, u pogledu koncentracija biorelevantnih komponenata, od manjeg značaja. Osim toga, koncept funkcionalne biorelevantnosti podrazumeva razvoj alternativnih medijuma jednostavnijih sastava koji su stabilni i jednostavni za pripremu, što omogućava njihovu širu primenu za ispitivanje i predviđanje rastvorljivosti lekovitih supstanci u organizmu.

Permeabilnost

Permeabilnost lekovite supstance predstavlja njenu sposobnost da prođe kroz intestinalnu membranu, uključujući različite transportne mehanizme. Kao parameter koji opisuje permeabilnost najčešće se koristi efektivna permeabilnost (P_{eff}). Poslednjih godina razvijeni su brojni *in vitro*, *in situ* i *in silico* modeli za procenu permeabilnosti lekovitih supstanci u GI traktu. *In vitro* tehnike za procenu permeabilnosti u fazi otkrića i razvoja lekova obuhvataju izolovana intestinalna tkiva eksperimentalnih životinja, kulture ćelija koje simuliraju intestinalni epitel, kao i veštačke membrane. Caco-2 ćelije humanog adenokarcinoma kolona su najviše ispitivani ćelijski modeli koji se poslednjih 20 godina široko upotrebljavaju za proučavanje permeabilnosti lekovitih supstanci. Rezultati brojnih istraživanja su pokazali da je moguće uspostaviti matematički odnos između koeficijenta permeabilnosti određenog na jednoslojnim kulturama Caco-2 ćelija i stepena apsorpcije leka nakon oralne primene kod ljudi. Savremeni trendovi u farmaceutskoj industriji usmereni su na potpunu automatizaciju Caco-2 sistema, što omogućava brže ispitivanje većeg broja jedinjenja. Pored ovih, koriste se i druge vrste ćelija, kao što su MDCK ćelije dobijene iz bubrega psa, koje u poređenju sa Caco-2 ćelijama imaju kraći period kultivacije (3 dana, nasuprot 3 nedelje), pri čemu rezultati ispitivanja permeabilnosti uglavnom odgovaraju onim dobijenim sa Caco-2 ćelijama (Balimane i Chong, 2008; Johnson i Zheng, 2006). Određivanje permeabilnosti paralelnim veštačkim membranama (*Parallel artificial membrane permeability assay*, PAMPA) zasniva se na transportu lekovite supstance između dva prostora (donor i akceptor) razdvojenih veštačkom membranom (Bujard i sar., 2015). U zavisnosti od prirode veštačke membrane, ovom tehnikom se može proceniti permeabilnost kroz tri osnovne fiziološke barijere: kožu, krvno-moždanu barijeru i GI trakt. Koeficijent pasivne efektivne GI permeabilnosti (P_e) izračunava se pomoću matematičkih jednačina zasnovanih na koncentraciji lekovite supstance u donorskom i akceptorskom prostoru pre uspostavljanja stanja ravnoteže

(Bujard i sar., 2015; di Cagno i sar., 2015). Poslednjih godina sve veću primenu imaju kombinovane tehnike Caco-2 ćelija i veštačkih membrana koje omogućavaju dobijanje velikog broja informacija o permeabilnosti u kratkom vremenskom periodu.

In situ perfuzija segmenata intestinuma pacova i zečeva se često koristi za proučavanje permeabilnosti. Osnovna prednost ovih modela u odnosu na *in vitro* tehnike je prisustvo intaktnog krvotoka i inervacije u eksperimentalnim životinjama. Ispitivanja se zasnivaju na perfuziji rastvora lekovite supstance u fiziološkom puferu kroz izolovani segment intestinuma, pri čemu se apsorpcija procenjuje na osnovu smanjenja koncentracije leka u lumenu creva. Ograničenja ovog pristupa postoje kod lekovitih supstanci sa izraženim presistemskim ili luminalnim metabolizmom, kao i zbog potrebe za velikim brojem životinja i velikim količinama lekovite supstance (koje nisu uvek dostupne u ranim fazama razvoja leka). Lennernas i saradnici su 90-ih godina prošlog veka razvili metodu za sprovođenje studije perfuzije i pouzdano predviđanje permeabilnosti kod ljudi (Balimane i Chong, 2008; Lennernas, 2000; 2014).

In silico modeli za predviđanje permeabilnosti lekovitih supstanci na osnovu lipofilnosti, molekulske mase, polarne površine i drugih svojstava zaokupljaju pažnju istraživača širom sveta. Danas su komercijalno dostupni softverski paketi koji se koriste za predviđanje permeabilnosti u ranim fazama razvoja leka. Nedostatak ovih modela je, najčešće mali broj podataka korišćen za njihov razvoj i validaciju, što ograničava njihovu univerzalnu primenu. U cilju razvoja globalnog modela potreban je veći obim podataka kako bi model bio primenljiv u svrhu optimizacije i preciznog predviđanja permeabilnosti lekovitih supstanci (Balimane i Chong, 2008; Johnson i Zheng, 2006).

1.2. Karakteristike farmaceutskog oblika leka

Karakteristike farmaceutskog oblika leka koje utiču na brzinu i/ili obim apsorpcije lekovite supstance zavise od vrste farmaceutskog oblika leka i vrste i količine prisutnih ekscipijenasa (Cao i sar., 2008). Brzinu apsorpcije lekovite supstance iz farmaceutskog preparata, koja uključuje dezintegraciju čvrstih farmaceutskih oblika, oslobađanje i rastvaranje lekovite supstance i prolazak supstance kroz ćelijsku membranu epitela creva, određuje najsporiji od pomenutih kinetičkih procesa. U slučaju preparata koji sadrže

nisko rastvorljive lekovite supstance, brzina rastvaranja supstance iz farmaceutskog oblika određuje brzinu apsorpcije. Kod preparata koji sadrže hidrofilne lekovite supstance, ograničavajući proces tokom apsorpcije predstavlja prolazak lekovite supstance kroz intestinalnu ćelijsku membranu (Shargel i sar., 2005; Panakanti i Narang, 2012).

Ekscipijensi

Ekscipijensi koji ulaze u sastav lekovitog preparata mogu da utiču na stabilnost lekovite supstance, na procese dezintegracije i brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata, kao i na karakteristike formulacije sa aspekta kompresibilnosti i ujednačenosti sadržaja čvrstih farmaceutskih oblika (Shargel i sar., 2005; Panakanti i Narang, 2012). Iako su ekscipijensi farmakodinamski neaktivni sastojci formulacije, fizičko-hemijske interakcije ekscipijenasa i lekovite supstance, kao i uticaj ekscipijenasa na fiziološke faktore na mestu apsorpcije, mogu da utiču na biološku raspoloživost leka. Imajući u vidu dostupnost velikog broja različitih ekscipijenasa, poznavanje i proučavanje mehanizama ovih interakcija doprinosi razvoju čvrstih farmaceutskih oblika lekova sa optimalnom biološkom raspoloživošću (Panakanti i Narang, 2012).

Fizičko-hemijske interakcije ekscipijenasa i lekovite supstance mogu da dovedu do promena fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih karakteristika lekovite supstance od kojih zavisi proces apsorpcije. Stvaranjem kompleksa lekovite supstance i ekscipijensa mogu nastati molekulske strukture promenjene rastvorljivosti, stabilnosti i koeficijenta difuzije. Hidrofobne supstance amorfnе i/ili mikrokristalne strukture se mogu formulisati u obliku čvrstih disperzija u hidrofilnom polimernom nosaču čime se povećava brzina rastvaranja lekovite supstance iz preparata (Panakanti i Narang, 2012).

Ekscipijensi mogu da utiču na fiziološke uslove, kao što su pH vrednost gastrointestinalne tečnosti, vreme prolaska kroz GI trakt, permeabilnost intestinalne membrane, metabolizam, a time i na obim apsorpcije lekovite supstance iz preparata. Upotrebom odgovarajućih ekscipijenasa moguće je uticati na pH vrednost kako bi se povećala brzina rastvaranja supstanci koje pokazuju pH-zavisnu rastvorljivost i podležu prelasku iz amorfnoг u kristalno stanje i precipitaciji u zavisnosti od promena pH vrednosti u organizmu (Badawy i Hussain, 2007). U literaturi je opisan efekat smanjenja

vremena prolaska leka kroz tanko crevo u prisustvu manitola, ksilitola i laktuloze (Adkin i sar., 1995; Yuen, 2010; Panakanti i Narang, 2012). Uticaj pomenutih šećera na vreme prolaska kroz GI trakt pripisuje se nemogućnosti apsorpcije ovih ekscipijenasa i povećanju osmotskog pritiska koje stimuliše peristaltiku creva. Prisutvo lipidnih ekscipijenasa koji se koriste u formulacijama lipozoma, mikroemulzija i nanočestica može da utiče na pokretljivost određenih delova GI trakta. Poznato je da makrogoli povećavaju pokretljivost u GI traktu i tako utiču na stepen apsorpcije lekovite supstance (Panakanti i Narang, 2012). Mnogi ekscipijensi koji su u širokoj upotrebi u farmaceutskoj industriji, kao što su površinski aktivne materije i različiti polimeri, mogu da dovedu do inhibicije izoenzima CYP 3A4 u crevima i jetri, i posledično do promena u biološkoj raspoloživosti lekovite supstance. Utvrđeno je da stepen inhibicije metaboličkih enzima zavisi od koncentracije ekscipijensa (Tompkins i sar., 2010; Ren i sar., 2008). Brojni radovi pokazuju da ekscipijensi mogu da utiču na aktivnost membranskih proteina uključenih u proces apsorpcije lekovite supstance (Bhardway i sar., 2008; Goole i sar., 2010). Inhibicijom efluks transportera kao što je P-glikoprotein (P-gp) ekscipijensi mogu da dovedu do porasta stepena apsorpcije lekovite supstance, dok interakcijom sa inluks transporterima ekscipijensi mogu da dovedu do smanjene permeabilnosti membrane i posledično biološke raspoloživosti lekovite supstance (Goole i sar., 2010). Usled prisustva membranskog transportera P-gp u većini tkiva, kao i njegove sposobnosti transporta velikog broja različitih lekovitih supstanci, fiziološke interakcije ekscipijenasa i P-gp su od izuzetnog značaja za razvoj farmaceutskih oblika lekova za oralnu primenu. Inhibitorni efekat na P-gp potvrđen je u slučaju polietilenglikola, površinski aktivnih materija, lipidnih ekscipijenasa (fosfolipidi i steroli) i ciklodekstrina, ispitivanjima na *in vitro* ćelijskim kulturama (Goole i sar., 2010). Sagledavajući specifičnost fizioloških interakcija velikog broja ekscipijenasa i transportera uključenih u proces apsorpcije, kao i kliničke posledice ovih interakcija, nameće se pitanje da li bi ekscipijense trebalo razmatrati kao aktivne sastojke formulacije. Ovakav pristup doveo bi do revizije mnogih smernica kao i principa procene biološke ekvivalentnosti generičkih preparata, sa posebnim osvrtom na sastav ekscipijenasa i mehanizme fizičko-hemijskih i fizioloških interakcija (Goole i sar., 2010).

Brzina rastvaranja lekovite supstance iz preparata

Procesu apsorpcije prethodi oslobađanje i rastvaranje lekovite supstance iz lekovitog preparata. Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata predstavlja jedan od najznačajnijih testova u razvoju formulacije, optimizaciji proizvodnog procesa i kontroli kvaliteta lekovitog preparata. Osim toga, poslednjih godina sve veći značaj ovog testa je mogućnost procene i predviđanja *in vivo* ponašanja leka na osnovu informacija dobijenih *in vitro*. U tu svrhu, *in vitro* metod bi trebalo da simulira brojne i varijabilne fiziološke uslove koji utiču na proces oslobađanja i rastvaranja lekovite supstance. Postoje tri osnovna pristupa za sprovođenje ovako složenog koncepta (Abrahamsson, 2000). Prvi, pragmatičan pristup podrazumeva razvoj *in vitro* testa koji daje rezultate u skladu sa kinetikom rastvaranja lekovite supstance *in vivo*, u organizmu, nezavisno od fiziološke relevantnosti primenjenih uslova. Nedostatak ovog pristupa je rizik da korelacija *in vitro* i *in vivo* podataka neće biti validna u slučaju promena u formulaciji za koju je *in vitro* test prvobitno razvijen. Drugi pristup podrazmeva razvoj *in vitro* testa koji potpuno simulira fiziološke uslove u GI traktu. Uzimajući u obzir složenost i dinamičku prirodu ovih uslova postavlja se pitanje koliko je realan cilj potpuno simulirati situaciju u organizmu. Treći pristup se zasniva na razvoju formulacije koja obezbeđuje oslobađanje i rastvaranje lekovite supstance nezavisno od fizioloških faktora, što je poželjno sa biofarmaceutskog aspekta (primer ovakve formulacije je sistem tipa osmotske pumpe).

U svrhu razvoja specifičnog testa za određeni proizvod, diskriminativnog za različite formulacije, promene u proizvodnji ili karakteristikama lekovite supstance, izvode se ispitivanja pod različitim eksperimentalnim uslovima, što uključuje izbor aparature, brzine mešanja, zapremine, sastava, pH vrednosti i viskoziteta medijuma. Dizajn *in vivo* relevantnog *in vitro* testa podrazumeva razmatranje fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih svojstava lekovite supstance, karakteristika formulacije, kao i fizioloških faktora. Ovaj koncept omogućava izostavljanje ispitivanja biološke raspoloživosti i/ili ekvivalentnosti kod ljudi na osnovu pouzdanog, biofarmaceutski verifikovanog (u odnosu na *in vivo* podatke) i diskriminativnog *in vitro* testa brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata (Abrahamsson, 2000; Shargel i sar., 2005; Lee i sar., 2008).

Savremeni trendovi u razvoju lekova podrazumevaju integraciju biofarmaceutskih aspekata i principa koncepta *Quality-by-Design (QbD)* u cilju obezbeđenja ciljanog

kvaliteta proizvoda. Ovaj pristup zahteva bolje razumevanje procesnih parametara i karakteristika proizvoda i njihovog uticaja na biološku raspoloživost i profil rastvaranja/oslobađanja lekovite supstance. Cilj je moguće postići uspostavljanjem veze između specifikacija *in vitro* testa brzine oslobađanja/rastvaranja i *in vivo* ponašanja leka (Selen i sar., 2010).

Na osnovu koncepta *QbD* uveden je pojam *Quality target product profile (QTPP)* koji definiše kritične karakteristike proizvoda koje usmeravaju razvoj leka sa željenim kliničkim svojstvima. *QTPP* usmerava dizajn formulacije na osnovu unapred definisanog profila oslobađanja lekovite supstance *in vitro* ili profila koncentracije lekovite supstance u krvi dobijenog mehanističkim proučavanjem apsorpcije. Na osnovu *QTPP* principa, razvijen je koncept *Equivalence-by-Design*, koji ima za cilj ubrzan razvoj novih formulacija i olakšan postupak registracije generičkih lekova, jer se težište pomera sa studija bioekvivalentnosti na razvoj leka sa ciljnim *in vivo* svojstvima. Ugradnjom *QTPP* principa u razvoj i evaluaciju preparata sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance moguće je obezbediti odgovarajući kvalitet i terapijsku ekvivalentnost farmaceutskog oblika leka, što je od velikog značaja imajući u vidu složenost i raznovrsnost ovih terapijskih sistema (Raw i sar., 2011).

1.3. Fiziološki faktori

Gastrointestinalni trakt ima značajnu ulogu u procesima lučenja želudačnih i crevnih sokova, varenja hrane i apsorpcije lekovitih supstanci, i predstavlja veoma složenu sredinu koja se menja u zavisnosti od unosa hrane, nivoa enzima, starosti, pola i zdravstvenog stanja. Tokom razvoja formulacije i odgovarajućih *in vitro* i *in vivo* ispitivanja, neophodno je razmotriti fiziološke faktore, kao što su: brzina pražnjenja želuca, pokretljivost u gastrointestinalnom traktu, sastav i pH vrednost gastrointestinalnog sadržaja i uticaj hrane.

Brzina pražnjenja želuca

Scintigrafskim tehnikama obeležavanja sastojaka obroka i lekovitog preparata radionukleotidima, utvrđeno je da vreme zadržavanja lekovitog preparata u želucu zavisi

od vrste farmaceutskog oblika leka i njegovih dimenzija (kada se radi o čvrstim farmaceutskim oblicima), kao i prisustva, vrste i količine hrane, kada se razmatra primena lekova uz obrok. U slučaju tečnih lekovitih preparata vreme zadržavanja u želucu je kraće i manje je varijabilno u odnosu na vreme zadržavanja čvrstih farmaceutskih oblika. Vreme zadržavanja u želucu zavisi od veličine obroka i raste sa povećanjem kalorijske vrednosti obroka. Uticaj hrane je više izražen u slučaju monolitnih preparata u odnosu na višestručne oblike doziranja kao što su pelete (Wilson, 2000; Washington i sar., 2002; Varum i sar., 2010).

Kod supstanci visoke rastvorljivosti i permeabilnosti, brzina pražnjenja želuca određuje brzinu apsorpcije i ispoljavanja terapijskog efekta. Brojni faktori kao što su uzimanje leka na gladno, ležanje na desnoj strani tela, unos tečnosti bez kalorijske vrednosti, primena prokinetika, ubrzavaju pražnjenje želuca; dok uzimanje visokokaloričnog obroka, ležanje na levoj strani tela, primena antiholinergičkih lekova, konzumiranje alkohola, usporavaju ovaj proces (Shargel i sar., 2005; Cao i sar., 2008).

Pokretljivost u gastrointestinalnom traktu

Pokretljivost u gastrointestinalnom traktu podrazumeva propulzivne pokrete koji određuju vreme prolaska leka kroz tanko crevo i pokrete mešanja koji omogućavaju kontakt lekovite supstance sa površinom epitela kroz koji se odvija apsorpcija. Tanko crevo poseduje najveću efektivnu površinu raspoloživu za apsorpciju, usled nabora mukoze, vila i mikrovila, kao i najveću raspoloživost transportera neophodnih za apsorpciju lekova posredovanu nosačima. Vreme prolaska različitih farmaceutskih oblika lekova (tablete, pelete, tečni preparati) kroz tanko crevo je slično i iznosi od 3 do 4 sata. Utvrđeno je da se pokretljivost tankog creva sastoji iz sekvenci mirovanja, sporih i brzih pokreta i da više od polovine ukupnog vremena prolaska ne predstavlja aktivni tranzit već periode mirovanja farmaceutskog oblika u tankom crevu (Weitschies i sar., 2005a; McConnell i sar., 2008). Iako je vreme prolaska leka kroz tanko crevo manje varijabilno u odnosu na zadržavanje leka u želucu i prolazak kroz kolon, zabeležena je inter- i intraindividualna varijabilnost u pogledu tranzita leka kroz tanko crevo, dok prisustvo hrane uglavnom ne utiče na ovaj parametar (McConnell i sar., 2008; Varum i sar., 2010). Vreme zadržavanja leka u tankom crevu je posebno značajno u slučaju preparata sa

modifikovanim oslobađanjem, kao i preparata koji sadrže slabo rastvorljive lekovite supstance.

Kao i u tankom crevu, pokretljivost kolona nije kontinuirana i česti su periodi staze, uslovljavajući veoma varijabilno vreme prolaska leka kroz kolon (6-48 h, čak i do 70 h) (McConnell i sar., 2008). Ovo doprinosi i varijabilnosti ukupnog vremena tranzita kroz GI trakt, koje na primer, u slučaju osmotskih tableta, kod zdravih ispitanika iznosi od 5.1 do 58.3 sata (McConnell i sar., 2008). Na ukupno vreme GI tranzita leka može uticati i vreme doziranja (jutarnje ili večernje), dnevne aktivnosti, patološka stanja, starost, pol i drugi faktori (Wilson, 2010).

Savremena istraživanja bazirana na tehnici magnetnog obeležavanja (*Magnetic Marker Monitoring – MMM*) omogućavaju ispitivanje procesa dezintegracije čvrstih preparata i njihovog prolaska kroz GI trakt, bez upotrebe jonizujućeg zračenja. Ova tehnika se zasniva na obeležavanju lekovitog preparata kao magnetnog dipola ugradnjom feromagnetnog materijala (gvožđe-oksidi) i naknadnom magnetizacijom. Nakon oralne primene preparata vrši se merenje generisanog magnetnog signala veoma osetljivim tehnikama, što omogućava ispitivanje procesa oslobađanja lekovite supstance u organizmu, kinetike tranzita kroz GI trakt i obima regionalne apsorpcije (Weitschies i sar., 2001; Weitschies i sar., 2005a; Weitschies i sar., 2005b; Bergstrand i sar., 2012).

pH vrednost

pH vrednost u gastrointestinalnom traktu određuje brzinu rastvaranja jonizovane lekovite supstance iz preparata i tako utiče na proces apsorpcije i biološku raspoloživost leka. Gastrointestinalna pH vrednost zavisi od starosti, prisustva hrane, primene lekova kao što su inhibitori protonske pumpe, pratećih oboljenja (hipohloridija, hipergastrinemija, HIV). pH vrednost u gastrointestinalnom traktu pokazuje značajnu intraindividualnu varijabilnost u zavisnosti od vremena ispitivanja, kao i interindividualnu varijabilnost koja može biti veća od dve pH jedinice za isti region GI trakta. Kod zdravih osoba pH vrednost raste od želuca, gde iznosi 1 – 2.5, preko jejunuma (6.6 ± 0.5), ileuma (7.5 ± 0.5) do kolona ($6.4 - 7.0 \pm 0.6$) i značajno se menja u zavisnosti od gore navedenih fizioloških faktora (McConnell i sar., 2008).

Karakteristike gastrointestinalnih tečnosti

Gastrointestinalne tečnosti, neohodne za procese dezintegracije čvrstih farmaceutskih oblika lekova, rastvaranja i apsorpcije lekovite supstance nakon oralne primene, su složenog sastava i varijabilne u pogledu zapremine, sadržaja elektrolita, enzima, žučnih soli, proteina i lipida. Tehnikom magnetne rezonance (*Magnetic Resonance Imaging – MRI*) utvrđena je prosečna zapremina vode u tankom crevu od 105 ml i debelom crevu od 13 ml, koja nije homogeno distribuirana već se nalazi u obliku diskretnih „džepova“ (McConnell i sar., 2008; Sutton, 2009).

Želudačna i crevna tečnost se međusobno razlikuju u pogledu pH vrednosti, osmolalnosti, koncentracije elektrolita i žučnih kiselina, jonske jačine, dok se prosečan sadržaj proteina u ovim delovima GI trakta ne razlikuje značajno. Fizičko-hemijska svojstva ovih tečnosti pokazuju inter- i intraindividualnu varijabilnost, dok razlike među polovima u pogledu sastava ovih tečnosti nisu uočene (Lindahl i sar., 1997).

Poznavanje sastava i zapremine GI tečnosti, kao i faktora koji utiču na dinamičku prirodu ove sredine, od izuzetnog je značaja za razvoj fiziološki zasnovanih medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz preparata.

1.4. Uticaj hrane na apsorpciju lekova

Prisustvo hrane u GI traktu dodatno doprinosi složenosti procesa apsorpcije i može značajno da utiče na biološku raspoloživost lekova, dovodeći do promena u brzini i/ili stepenu apsorpcije istovremeno primenjenog leka. Klinički značaj uticaja hrane na proces apsorpcije lekova zavisi od stepena interakcije i ishoda koji može dovesti do povećane, smanjene ili odložene apsorpcije leka, što se može odraziti i na terapijsku efikasnost (Welling, 1989; Singh, 1999; Davit i Conner, 2008). Značaj ovih interakcija je prepoznat od strane farmaceutske industrije i odgovarajućih regulatornih tela, tako da se ispitivanja uticaja hrane na apsorpciju sprovode u ranim fazama razvoja novih lekova i prilikom ispitivanja biološke ekvivalentnosti generičkih u odnosu na referentne preparate (FDA, 2002; EMA, 2010). Karakterizacija efekata hrane u regulatorne svrhe podrazumeva farmakokinetičke studije kod zdravih ispitanika i praćenje promene primarnih farmakokinetičkih parametara u prisustvu hrane, odnosno poređenje ponašanja

generičkog i referentnog leka u studijama sprovedenim na gladno i nakon uzimanja obroka (FDA, 2002; EMA, 2010). Naučna javnost je, takođe, zainteresovana za proučavanje mehanizama uticaja hrane na proces apsorpcije leka i mogućnosti predviđanja ovih efekata (Welling, 1989; Charman i sar., 1997; Fleisher i sar., 1999; Singh, 1999; Schmidt i Dalhoff, 2002; Lentz, 2008; Varum i sar., 2013; Mathias i sar. 2015).

Iako hrana može da utiče na različite farmakokinetičke procese, najznačajnije su interakcije na nivou apsorpcije, koje za posledicu mogu da imaju visok rizik terapijskog neuspeha (usled smanjene biološke raspoloživosti) ili toksičnih efekata (usled povećane biološke raspoloživosti i povećane koncentracije lekovite supstance u krvi). Uticaj hrane ili pojedinih njenih komponenata na receptorskom nivou je znatno manje zastupljen, tako da farmakodinamske interakcije hrane i lekova imaju manji klinički značaj u odnosu na farmakokinetičke interakcije (Schmidt i Dalhoff, 2002). S obzirom na prepoznat značaj uticaja hrane na proces apsorpcije leka kao prvog koraka u postizanju terapijskog efekta, brojna istraživanja u toku poslednjih 20 godina su imala za cilj proučavanje mehanizama uticaja hrane na proces apsorpcije lekova (Fleisher i sar., 1999; Singh, 1999; Schmidt i Dalhoff, 2002; Abrahamsson i sar., 2004; Varum i sar., 2013; Mathias i sar. 2015).

2. INTERAKCIJE LEKOVA I HRANE

Kao što je već navedeno, prisustvo hrane u GI traktu može da dovede do promena fizioloških uslova ili fizičko-hemijskih interakcija lekova i određenih sastojaka obroka, koje mogu da izazovu promene u brzini i/ili stepenu apsorpcije istovremeno primenjenog leka. Stoga se mehanizmi uticaja hrane mogu podeliti u dve kategorije: (i) fizičko-hemijske i (ii) fiziološke interakcije interakcije hrane i lekova (Fleisher i sar., 1999; Yu i sar., 2004).

2.1. Fizičko-hemijske interakcije lekova i hrane

Fizičko-hemijske interakcije lekova i hrane se mogu ispoljiti kao direktne interakcije lekovite supstance sa nekim od sastojaka obroka ili indirektno, kao uticaj promenjenih

uslova u gastrointestinalnom traktu na oslobađanje lekovite supstance, njeno rastvaranje i difuziju u lumenu gastrointestinalnog trakta (Fleisher i sar., 1999; Davit i Conner, 2008). Rastvorljivost lekovite supstance i njena brzina rastvaranja iz preparata mogu biti izmenjene usled promene pH vrednosti u GI traktu nakon obroka. Hrana koja povećava pH vrednost u želucu smanjuje brzinu rastvaranja, a time i apsorpciju jedinjenja tipa slabe baze, dok isti obrok dovodi do povećanja brzine rastvaranja i posledično apsorpcije u slučaju jedinjenja tipa slabe kiseline. Reakcije kompleksiranja i helacije između lekova i jona metala poreklom iz hrane, dijetetskih suplemenata ili antacida, takođe mogu da dovedu do promene u rastvorljivosti i brzini rastvaranja, a time i apsorpciji određenih lekovitih supstanci (Singh, 1999; Davit i Conner, 2008). Reakcije adsorpcije lekova na sastojke obroka, kao što su pektini, takođe mogu da smanje brzinu rastvaranja i posledično biološku raspoloživost određenih lekovitih supstanci (Singh, 1999).

Povećanje viskoziteta u lumenu creva nakon uzimanja obroka predstavlja fizičku barijeru koja usporava proces difuzije lekovite supstance do epitela creva. Viskozne barijere imaju najizraženiji efekat u gornjem delu tankog creva, dok se u središnjim i donjim regijama ovaj efekat smanjuje usled procesa varenja hrane i razblaživanja crevnog sadržaja. Stoga, efekti viskoziteta mogu da dovedu do klinički značajnog smanjenja obima i brzine apsorpcije lekova koji se pretežno apsorbuju u gornjem delu tankog creva (Welling, 1989; Singh, 1999; Washington i sar., 2002).

Uticaj hrane na apsorpciju je najviše izražen u slučaju preparata sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance. Jedan od vidova interakcije hrane i preparata sa modifikovanim oslobađanjem je mogućnost nastanka naglog, prekomernog oslobađanja lekovite supstance iz preparata ("*dose dumping*"). Brojni autori su istraživali interakcije hrane i preparata sa produženim oslobađanjem teofilina i zaključili da, usled odloženog pražnjenja želuca, može doći do dvostrukog uvećanja maksimalnih koncentracija leka u krvi u odnosu na vrednosti na gladno (Welling, 1989; Singh, 1999; Davit i Conner, 2008; Klein, 2009). Uzimajući u obzir da je reč o leku sa malom terapijskom širinom, brza apsorpcija velike količine teofilina može da izazove ozbiljne toksične efekte. Uticaj hrane na apsorpciju visoko rastvorljive i visoko permeabilne lekovite supstance iz preparata sa trenutnim oslobađanjem je manje verovatan u odnosu na preparate sa modifikovanim oslobađanjem, jer je apsorpcija ovakvih supstanci obično pH-nezavisna i nije ograničena

brzinom rastvaranja. Ipak, kod nekih supstanci iz ove grupe koje podležu presistenskom metabolizmu, adsorpciji, kompleksiranju ili su nestabilne u GI traktu, hrana može ispoljiti uticaj na apsorpciju (FDA, 2002; Yu i sar., 2004; Davit i Conner, 2008).

Poznato je da etanol i alkoholni napici usporavaju pražnjenje želuca i povećavaju propustljivost epitela tankog creva. Pomenuti fiziološki efekti alkohola mogu da dovedu do prekomernog oslobađanja i rastvaranja lekovite supstance u želucu, odnosno povećane apsorpcije lekovite supstance u crevima, što može nepovoljno da utiče na bezbednosni profil leka (Varum i sar., 2013). U slučaju istovremene primene gastrozistentnih oblika lekova i alkohola može doći do prevremenog oslobađanja leka usled naglog rastvaranja polimerne obloge u prisustvu alkohola. Pri istovremenoj primeni alkohola i preparata sa produženim oslobađanjem lekovite supstance može doći do promene kinetike i obima oslobađanja lekovite supstance, što najčešće rezultuje povećanjem koncentracija leka u krvi (Varum i sar., 2013). Nakon upozorenja Američke agencije za hranu i lekove 2005. godine, u vezi sa interakcijom alkohola i kapsula sa produženim oslobađanjem hidromorfina koja dovodi do potencijalno letalnih doza leka u krvi, prepoznat je značaj ispitivanja ovih interakcija (Walden i sar., 2007). Regulatorne preporuke za ispitivanje interakcija preparata sa modifikovanim oslobađanjem i alkohola odnose se na *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja u medijumima koji sadrže različite koncentracije etanola, što može da ukaže na potrebu sprovođenja *in vivo* ispitivanja u prisustvu alkohola (FDA, 2014). Levina i saradnici (2007) su pokazali da tablete sa produženim oslobađanjem felodipina, gliklazida i metformina, koje sadrže hidroksipropilmetilcelulozu, zadržavaju integritet matriksa i svojstva bubrenja u medijumima sa 5 % i 40 % etanola. Sa druge strane, Smith i saradnici su utvrdili brže oslobađanje lekovitih supstanci iz različitih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem u medijumima koji su sadržavali do 40 % etanola (Smith i sar., 2010).

2.2. Fiziološki mehanizmi uticaja hrane

Pored izmena u apsorpciji nastalih kao rezultat fizičko-hemijskih interakcija lekova i hrane, izmenjena apsorpcija može biti i posledica fizioloških efekata hrane. Fiziološke promene izazvane hranom uključuju promenu pH vrednosti i brzine pražnjenja želuca,

promene pokretljivosti u gastrointestinalnom traktu i vremena zadržavanja leka u različitim delovima GI trakta, promene u lučenju želudačnih i crevnih sokova (Fleisher i sar., 1999; Mudie i sar., 2010; Varum i sar., 2013).

Brzina pražnjenja želuca u prisustvu hrane zavisi od zapremine, kalorijske vrednosti i viskoziteta primenjenog obroka (Fleisher i sar., 1999). Proces pražnjenja želuca je brži u slučaju uzimanja tečnosti bez kalorijske vrednosti, dok se usporava primenom čvrste hrane. Uzimanje obroka dovodi do povećanja pH vrednosti u želucu, mada je uticaj kalorijske vrednosti obroka na brzinu pražnjenja želuca dominantan u odnosu na porast pH vrednosti (Fleisher i sar., 1999). Hrana dovodi do odloženog pražnjenja želuca u zavisnosti od svoje kalorijske vrednosti i na taj način utiče na varijabilnost apsorpcije lekovitih supstanci. Ukoliko nema promene pH vrednosti, odloženo pražnjenje želuca u prisustvu hrane može da dovede do smanjene apsorpcije lekovitih supstanci koje su nestabilne u kiseloj sredini, dok apsorpcija slabo rastvorljivih, stabilnih lekovitih supstanci može biti povećana usled produženog vremena raspoloživog za oslobađanje i rastvaranje lekovite supstance.

Srednje vreme prolaska leka kroz GI trakt u velikoj meri zavisi od prisustva hrane. Smanjena apsorpcija može biti posledica precipitacije jedinjenja tipa slabih baza, degradacije izazvane enzimima pankreasa, kompleksiranja ili smanjene difuzije usled povećanog viskoziteta crevnog sadržaja (Fleisher i sar., 1999). Sa druge strane, povećana apsorpcija može biti rezultat pojačanog izlučivanja žučnih soli i crevnih sokova nakon obroka, što omogućava bolje uslove za rastvaranje slabo rastvorljivih supstanci u odnosu na primenu leka nezavisno od uzimanja hrane (Fleisher i sar., 1999).

Fiziološki mehanizmi koji se javljaju kao odgovor na obroke bogate mastima, uglavnom podrazumevaju povećano lučenje žuči i produženo vreme zadržavanja leka u želucu, s obzirom na činjenicu da masna hrana odlaže pražnjenje želuca. Povećano lučenje žuči dovodi do povećanja koncentracije žučnih soli u GI traktu, koje mehanizmom micelarne solubilizacije povećavaju brzinu rastvaranja lekovitih supstanci niske rastvorljivosti (npr. cefuroksim, ciklosporin, grizeofulvin, danazol). Osim toga, unošenje hrane izaziva povećano lučenje želudačnih i crevnih sokova koji mogu da dovedu do povećanog rastvaranja lekovite supstance (Singh, 1999; Davit i Conner, 2008).

2.3. Mogućnost predviđanja uticaja hrane na apsorpciju leka

Kao što je već navedeno, poznavanje interakcija lekova i hrane je značajno sa aspekta razvoja lekova, njihove kliničke primene, kao i regulatornog aspekta. Identifikacija potencijalnih fizičko-hemijskih interakcija predstavlja izazov za istraživače u cilju razvoja formulacija optimalnih karakteristika, kod kojih neće doći do ispoljavanja uticaja hrane. Stoga, predviđanje uticaja hrane u ranim fazama otkrića lekova i procena ovih efekata na farmakokinetiku leka imaju veliki značaj u savremenim istraživanjima. Proučavanje mehanizama i stepena interakcije hrane na farmakokinetiku leka što ranije u procesu razvoja omogućava prevazilaženje potencijalnih problema odgovarajućim pristupima razvoju formulacije, kad god je to moguće.

Postoje različite metode za predviđanje uticaja hrane, koje se mogu podeliti u tri osnovne grupe: *in silico*, *in vitro* i *in vivo* metode (Lentz, 2008). S obzirom na značaj i zastupljenost *in silico* i *in vitro* metoda, one će biti detaljnije opisane u sledećem poglavlju. Ovde će biti razmotreni modeli korelacije između fizičko-hemijskih karakteristika lekovite supstance i uticaja hrane na njihovu apsorpciju (Singh, 2005; Gu i sar., 2007; Fleisher i sar., 1999; Custodio i sar., 2008). Prednost ovih modela je što se potencijalni uticaj hrane može predvideti na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika lekovite supstance, kao što su rastvorljivost i permeabilnost, koje je moguće odrediti u ranoj fazi razvoja leka. Nedostatak ovih modela je što nije moguće kvantitativno proceniti očekivani uticaj hrane na promenu farmakokinetičkih parametara, već se identifikuju grupe jedinjenja kod kojih se očekuje pozitivan uticaj hrane, negativan uticaj hrane ili odsustvo ovog uticaja. Osim toga, ovi modeli ne uzimaju u obzir faktore formulacije i ne opisuju mehanizme uticaja hrane (Singh, 2005; Gu i sar., 2007).

2.3.1. Predviđanje uticaja hrane na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika lekovite supstance

Singh je ispitivao mogućnost primene fizičko-hemijskih karakteristika lekovite supstance (rastvorljivost u vodi, odnos doze i rastvorljivosti i particioni koeficijent) u cilju predviđanja uticaja hrane *in vivo* (Singh, 2005). Sistematskom analizom više od 100

strukturno različitih jedinjenja primenjenih u obliku oralnih preparata sa trenutnim oslobađanjem, razvijeni su modeli zasnovani na korelaciji između površine ispod krive (PIK) koncentracije leka u krvi nakon uzimanja obroka i na gladno (kao farmakokinetičkog parametra) i pomenutih fizičko-hemijskih karakteristika lekovite supstance. Primenom ovih modela procenjen je opseg unutar koga se ne očekuje da prisustvo hrane utiče značajno na apsorpciju lekovite supstance, a koji je definisan sledećim vrednostima ispitivanih fizičko-hemijskih karakteristika: rastvorljivost u opsegu 0.148 – 89.39 mg/ml, odnos doze i rastvorljivosti u vodi u opsegu 0.23 – 624 ml i particioni koeficijent u opsegu vrednosti 1.13 – 2.98.

Gu i saradnici su razvili statistički model zasnovan na fizičko-hemijskim karakteristikama koje obuhvataju rastvorljivost, dozni broj, permeabilnost, maksimalnu apsorbovanu dozu, broj vodoničnih veza i polarnu i ukupnu površinu molekula (Gu i sar., 2007). Ovaj model predviđa uticaj hrane (pozitivan, negativan ili odsustvo uticaja) za jedinjenja sličnih fizičko-hemijskih svojstava. Tačnost predviđanja ovog modela za 92 ispitivana jedinjenja je iznosila 97, 79 i 68 % za jedinjenja sa pozitivnim, negativnim ili bez uticaja hrane, redom. Autori su zaključili da je osnovni nedostatak ovog modela isključiva zasnovanost na svojstvima lekovite supstance, pri čemu nisu uzeti u obzir faktori formulacije koji značajno doprinose efektima hrane na apsorpciju.

Mathias i saradnici (2015) su predložili hibridni pristup izučavanju uticaja hrane na apsorpciju lekova koji objedinjuje elemente statističkih i mehanističkih modela. Odnos *in vitro* stepena oslobađanja 22 model supstance u fiziološki zasnovanim medijumima u prisustvu hrane i na gladno je odgovarao *in vivo* odnosu stepena apsorpcije nakon obroka i u uslovima gladovanja. Autori preporučuju primenu *in vitro dissolution* testa za početno ispitivanje uticaja hrane na apsorpciju lekova, zatim *in vivo* studije na modelima životinja u slučaju lekovitih supstanci kod kojih je *in vitro* utvrđen značajan efekat hrane. Ovako dobijeni podaci mogu se koristiti u *in silico* modelima za ispitivanje apsorpcije u prisustvu hrane u zavisnosti od različitih fizičko-hemijskih i fizioloških faktora (Mathias i sar., 2015).

2.3.2. Predviđanje uticaja hrane zasnovano na Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije

Koncept Biofarmaceutskog sistema klasifikacije (BSK) koji su predložili Amidon i saradnici podrazumeva klasifikaciju lekovitih supstanci na osnovu rastvorljivosti u vodi i intestinalne permeabilnosti. Osnovni cilj ovog sistema je mogućnost predviđanja apsorpcije lekovite supstance na osnovu *in vitro* određene rastvorljivosti, permeabilnosti i brzine rastvaranja iz lekovitog preparata (Amidon i sar., 1995). Biofarmaceutski sistem klasifikacije predstavlja naučnu osnovu za mehanističko razumevanje procesa apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja lekovitih supstanci, kao i osnovu za potencijalno izostavljanje *in vivo* ispitivanja biološke ekvivalentnosti lekova (*BCS-Based Bioequivalence*), prihvaćenu od strane regulatornih tela (Amidon i sar., 2011).

Fleisher i saradnici su razmatrali uticaj hrane na apsorpciju lekova formulisanih u obliku preparata sa trenutnim oslobađanjem u zavisnosti od toga kojoj grupi BSK pripada lekovita supstanca (Fleisher i sar., 1999). Zaključak autora ukazuje da hrana bogata mastima uglavnom nema uticaja na biološku raspoloživost lekovitih supstanci I grupe BSK, povećava apsorpciju lekovitih supstanci II grupe, smanjuje raspoloživost lekovitih supstanci III grupe, dok je kod lekovitih supstanci IV grupe stepen apsorpcije mali bez obzira na uticaj hrane (Fleisher i sar., 1999).

Sastav i kalorijska vrednost obroka, kao i zapremina i temperatura obroka utiču na uslove u GI traktu, a time i na biološku raspoloživost oralno primenjenih lekova. Uopšteno, obroci bogati mastima imaju veći potencijal da menjaju fiziološke uslove u GI traktu, i na taj način ispoljavaju izraženiji efekat na biološku raspoloživost lekova. Stoga, regulatorna tela preporučuju upotrebu visokokaloričnih obroka sa velikim sadržajem masti pri ispitivanju biološke raspoloživosti i ekvivalentnosti u prisustvu hrane (FDA, 2002; Yu i sar., 2004; Shargel i sar., 2005).

Nakon oralne primene preparata koji sadrže lekovite supstance visoke rastvorljivosti i visoke permeabilnosti koje se brzo oslobađaju iz preparata, moguća je odložena ili usporena apsorpcija u prisustvu hrane. Osnovni mehanizam je odloženo ili usporeno pražnjenje želuca i/ili povećana pH vrednost želuca nakon uzimanja obroka. Kao posledica ovih promena, produžava se srednje vreme zadržavanja u želucu i odlaže

apsorpcija koja se pretežno odvija u gornjem delu tankog creva, što dovodi do smanjenja maksimalne koncentracije leka u krvi i produženja vremena do postizanja ove koncentracije. Ukupan obim apsorpcije lekovite supstance u ovom slučaju uglavnom nije promenjen, osim ukoliko je lek nestabilan u GI traktu. Klinički značaj odložene ili usporene apsorpcije procenjuje se u zavisnosti od farmakoloških svojstava leka. U slučaju antibiotika hrana može da dovede do smanjenja efikasnosti usled smanjenog nivoa lekovite supstance u krvi, dok kod verapamila može doći do klinički značajnog odlaganja terapijskog efekta (Singh, 1999; Davit i Conner, 2008).

Jedna od najviše ispitivanih interakcija lekova i hrane je istovremena primena sa sokom od grejpfruta, koji povećava biološku raspoloživost brojnih lekova, inhibicijom efluks transportera P-glikoproteina i izoenzima citohroma CYP3A. Ove interakcije su od posebnog značaja za lekove koji podležu metabolizmu u crevima. Pacijenti na terapiji lekovima koji su supstrati CYP3A i P-glikoproteina, kao što je ciklosporin, ili primaju lekove koji su supstrati CYP3A4, kao što je felodipin, savetuju se da izbegavaju istovremenu primenu grejpfruta i soka od grejpfruta. Produženo vreme zadržavanja leka u želucu može da dovede do povećane brzine rastvaranja i apsorpcije nisko rastvorljivih lekovitih supstanci. Ovom efektu doprinose tečnosti unete sa hranom, kao i izlučivanje žuči i pankreasne tečnosti izazvano hranom (Singh, 1999; Davit i Conner, 2008).

Smanjenje brzine i obima apsorpcije u prisustvu hrane može biti posledica hidrolize lekova koji su nestabilni u kiseloj sredini tokom produženog zadržavanja leka u želucu. Smanjena apsorpcija lekovitih supstanci III grupe BSK u prisustvu hrane može nastati usled fizičkog ili hemijskog vezivanja sa komponentama obroka.

2.3.3. Predviđanje uticaja hrane prema Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije zasnovanom na dispoziciji lekovitih supstanci

U toku razvoja ovog koncepta, Benet i saradnici su razmatrali fiziološke uslove u GI traktu, međusobnu vezu procesa apsorpcije, transporta i eliminacije, fizičko-hemijska svojstva supstance (rastvorljivost i permeabilnost), kao i stepen metabolizma (Custodio i sar., 2008). Polazeći od činjenice da je metabolizam glavni put eliminacije jedinjenja I i II grupe BSK (koje karakteriše visoka permeabilnost), dok se lekovite supstance III i IV

grupe (koje karakteriše niska permeabilnost) eliminišu u nepromenjenom obliku putem urina i/ili žuči, Wu i Benet su predložili revidiran BSK koncept i nazvali ga Biofarmaceutski sistem klasifikacije zasnovan na dispoziciji lekovitih supstanci (BDDSK) (Wu i Benet, 2005). U ovom konceptu, parametar permeabilnost je zamenjen stepenom metabolizma lekovite supstance, uz objašnjenje da je klasifikacija zasnovana na stepenu metabolizma jednostavnija i nedvosmislena u poređenju sa Biofarmaceutskim sistemom klasifikacije koji uzima u obzir procenu vrednosti permeabilnosti kod ljudi, što dovodi do razlika u klasifikaciji od strane različitih grupa autora (Custodio i sar., 2008). Uticaj hrane bogate mastima na apsorpciju lekovitih supstanci određenih grupa BDDSK odgovara efektima koje prisustvo hrane ispoljava na apsorpciju lekovitih supstanci analognih grupa BSK, kao što je predstavljeno na slici 3.

		Rastvorljivost	
		visoka	niska
Metabolizam	intenzivan	I grupa \leftrightarrow PIK $\uparrow T_{\max}$	II grupa \uparrow PIK $\uparrow \downarrow \leftrightarrow T_{\max}$
	slab	III grupa \downarrow PIK $\uparrow T_{\max}$	IV grupa $\uparrow \downarrow \leftrightarrow$ PIK $\uparrow \downarrow \leftrightarrow T_{\max}$

*Slika 3: Predviđanje uticaja hrane bogate mastima zasnovano na BDDSK
(prema Custodio i sar., 2008)*

Pomenuti model pretpostavlja interakcije lekovite supstance i transportnih enzima (transportera) kao važan mehanizam efekata hrane, pored ostalih poznatih mehanizama. Hrana bogata mastima nema značajan uticaj na stepen biološke raspoloživosti lekova I grupe, s obzirom da se apsorpcija uglavnom odvija pasivnom difuzijom, tako da se ne očekuju značajne interakcije lekovitih supstanci ove grupe i transportera (Custodio i sar.,

2008). Visokokalorična hrana povećava stepen biološke raspoloživosti lekova II grupe, usled inhibicije efluks transportera, kao što je P-glikoprotein, što dovodi do smanjenja količine metabolizovanog leka i povećanja bioraspoloživosti (Custodio i sar., 2008). Drugi mehanizam koji doprinosi ovom efektu moglo bi da bude povećanje rastvorljivosti postupkom micelarne solubilizacije (Custodio i sar., 2008). Kod lekova III grupe hrana bogata mastima smanjuje stepen biološke raspoloživosti usled inhibicije nosača za apsorpciju, dok je kod lekova IV grupe teško predvideti ovaj efekat s obzirom da se ova jedinjenja u organizmu mogu ponašati kao lekovi II ili III grupe BDDSK.

3. *IN VITRO* I *IN SILICO* METODE ZA PREDVIĐANJE LEK - HRANA INTERAKCIJA

Klinički značaj i različiti mehanizmi interakcija lekova i hrane sa jedne strane, i sve veći broj složenih formulacija za kontrolisano oslobađanje lekovite supstance sa druge strane, usloveli su intenzivan razvoj metoda za predviđanje efekata hrane na apsorpciju tokom otkrića i razvoja lekova. Težnja da se smanji obim farmakokinetičkih studija kod ljudi, uz racionalizaciju troškova i uštedu vremena, doprinela je razvoju i optimizaciji inovativnih alatki za biofarmaceutsku karakterizaciju preparata za oralnu primenu.

Brojni istraživački radovi iz ove oblasti ukazuju na kontinuirano unapređenje postojećih i razvoj novih modela, sa posebnim akcentom na *in silico* i *in vitro* tehnike, s obzirom na njihove prednosti i mogućnost predviđanja uticaja hrane na apsorpciju lekova. Do danas nije razvijen univerzalan model za simulaciju interakcija lekova i hrane koji bi bio primenljiv na sve lekove u svim fazama razvoja. U zavisnosti od toga da li je cilj procena potencijalnih promena u apsorpciji lekova u prisustvu hrane, sagledavanje kliničkog značaja stepena interakcija lekova i hrane ili proučavanje faktora formulacije kojima bi se umanjio uticaj hrane na apsorpciju lekovite supstance, mogu se koristiti različiti dostupni modeli (Lentz, 2008; Kostewicz i sar., 2014a; 2014b; Sjogren i sar., 2014).

Evropska unija kofinansira istraživački projekat velikih razmera pod nazivom *OrBiTo* (*Oral Biopharmaceutical Tools*), čiji je cilj unapređenje razumevanja procesa apsorpcije u GI traktu i integrisanje saznanja u razvoj novih ili unapređenje postojećih biofarmaceutskih metoda za predviđanje ponašanja lekovitih preparata u organizmu. Ovaj

projekat okuplja vodeće svetske istraživače u oblasti apsorpcije lekova, proizvođače inovativnih lekova, regulatorna tela, predstavnike univerziteta, kao i kompanije koje se bave razvojem *in silico* i *in vitro* modela za simulaciju apsorpcije. Očekuje se da će rezultati projekta doprineti razvoju farmaceutskih oblika zasnovanom na integrisanoj upotrebi *in vitro* i *in silico* modela predviđanja, u skladu sa konceptom *QbD*, kao i značajnom smanjenju *in vivo* ispitivanja (Lennernas i sar., 2014; Kostewicz i sar., 2014a; 2014b; Garbacz i sar., 2015; Khadra i sar., 2015; Olivares-Morales i sar., 2015).

3.1. *In vitro* metode

Razvoj *in vitro* metoda na osnovu kojih je moguće proceniti ponašanje oralno primenjenih farmaceutskih preparata u organizmu je veoma poželjan u ranim fazama razvoja, kao i nakon stavljanja leka u promet kada se planiraju izmene u sastavu i/ili procesu proizvodnje preparata. Savremene *in vitro* metode za procenu uticaja hrane predstavljaju različiti dinamički modeli gastrointestinalnog trakta uz primenu fiziološki zasnovanih medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja.

3.1.1. Fiziološki zasnovani medijumi za ispitivanje brzine rastvaranja

Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika leka, osim tradicionalne primene za kontrolu kvaliteta, ima poseban značaj kao *in vitro* metoda za proučavanje oslobađanja lekovite supstance u organizmu, što može biti zamena za ispitivanje bioekvivalentnosti u različitim fazama razvoja leka. Značaj ovog ispitivanja u svrhu predviđanja *in vivo* ponašanja leka je posebno izražen u procesu razvoja formulacije, razmatranju postregistracionih izmena i identifikaciji potencijalnih efekata hrane, što je omogućilo novu regulatornu perspektivu ovog testa. Izbor odgovarajućeg medijuma za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja je od ključnog značaja za mogućnost predviđanja efekata hrane na proces oslobađanja lekovite supstance u organizmu. Jednostavni vodeni medijumi i rastvori pufera koji se uobičajeno koriste u svrhu kontrole kvaliteta ne odražavaju sve aspekte fizioloških uslova u GI traktu, tako da je korelacija između dobijenih rezultata i podataka uočenih *in vivo* ograničena. Smatra se da je

simulacija gastrointestinalnih uslova od ključnog značaja za adekvatno predviđanje performansi lekovitog preparata u organizmu („*bioperformance*“) (Mudie i sar., 2010). Da bi se postigao površinski napon koji odgovara površinskom naponu gastrointestinalnih tečnosti, u medijume se dodaju žučne soli, kao što je natrijum-tauroholat i fosfolipidi, kao što je lecitin. Uticaj hrane se simulira dodatkom proizvoda razgradnje lipida, kao što su gliceril-monooleat i natrijum-oleat. Brojna i veoma opsežna ispitivanja sastava GI tečnosti imaju za cilj razvoj medijuma što sličnijih uslovima u organizmu, koji će omogućiti uspostavljanje bolje korelacije između *in vitro* dobijenih rezultata i kinetike apsorpcije lekovite supstance *in vivo*, sa posebnim akcentom na uticaj hrane (McConnell i sar., 2008). Fiziološki zasnovani medijumi se konstantno razvijaju i unapređuju u pogledu sastava i fizičko-hemijskih svojstava kako bi adekvatno reprezentovali uslove u organizmu (Jantratid i sar., 2008a; Klein, 2010; Dressman, 2014; Makropoulos i sar., 2015).

Razvoj biorelevantnih specifikacija ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata u cilju predviđanja uticaja hrane zahteva pažljivo razmatranje fizioloških uslova u GI traktu, pored fizičko-hemijskih svojstava lekovite supstance i karakteristika formulacije. Sprovedena su brojna ispitivanja sastava i karakteristika gastrointestinalnog sadržaja i tako postignut ogroman napredak u dizajnu fiziološki zasnovanih medijuma koji odražavaju uslove u organizmu u pogledu osmolalnosti, jonske jačine, viskoziteta, površinskog napona, uzimajući u obzir i prisustvo hrane (Galia i sar., 1998; Horter i Dressman, 2001; Kostewicz i sar., 2002; Vertzoni i sar., 2005; Kalantzi i sar., 2006b; Jantratid i sar., 2008a; Vertzoni i sar., 2010). Jantratid i saradnici su predložili nove sastave biorelevantnih medijuma „druge generacije“ koji simuliraju želudačni i crevni sok na gladno i nakon uzimanja obroka, unapređene u odnosu na prethodne na osnovu podataka dobijenih iz humanih aspirata, tako da približnije odražavaju uslove u organizmu u odnosu na ranije verzije (Jantratid i sar., 2008a).

S obzirom da su biorelevantni medijumi „druge generacije“ razvijeni na osnovu najnovijih saznanja o fiziološkim uslovima u GI traktu kod ljudi, očekuje se da će pružiti veću mogućnost predviđanja uticaja hrane na apsorpciju kada se primene za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja. O primeni i značaju biorelevantnih medijuma svedoče brojna istraživanja i publikovani radovi u kojima se posebno ističe značaj ovih medijuma

za simulaciju *in vivo* ponašanja preparata koji sadrže slabo rastvorljive supstance (Kostewicz i sar., 2002; Vertzoni i sar., 2005; Jantratid i sar., 2009b; Klein, 2009; Wagner i sar., 2012; Wagner i sar., 2013). U savremenim istraživanjima biorelevantni medijumi se uspešno koriste u cilju uspostavljanja *in vitro* - *in vivo* korelacije (Jantratid i sar., 2008b; Lue i sar., 2008; Fei i sar., 2013; Kambayashi i sar., 2013).

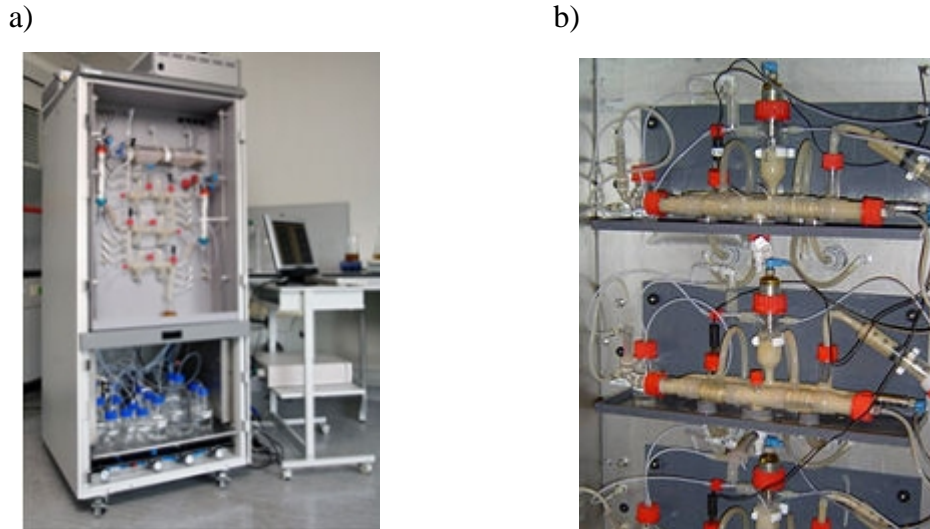
Potencijal biorelevantnih medijuma u svrhu predviđanja apsorpcije i efekata hrane je dobio novu perspektivu u najnovijim istraživanjima u kojima se rezultati ispitivanja u ovim medijumima uspešno koriste za simulaciju koncentracija lekovite supstance u plazmi pomoću *in silico* metoda o kojima će biti više reči u poglavlju 3.2 (Shono i sar., 2009; Shono i sar., 2010; Juenemann i sar., 2011; Wagner i sar., 2012).

Viskozitet hrane je jedan od fizioloških parametara koji mogu da utiču na apsorpciju lekovite supstance iz oralno primenjenog preparata. U literaturi se predloženi različiti mehanizmi uticaja viskoziteta hrane, kao što su: usporeno pražnjenje želuca uz modifikovano vreme prolaska kroz creva, usporena difuzija molekula lekovite supstance do intestinalne membrane, produženo vreme dezintegracije preparata i smanjena brzina oslobađanja lekovite supstance iz preparata (Parojčić i sar., 2008; Radwan i sar., 2012; 2014). Objavljeni rezultati ukazuju na mogućnost simulacije luminalnog viskoziteta nakon obroka relativno jednostavnim i stabilnim medijumima za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata, koji sadrže različite koncentracije hidroksipropilmetilceluloze (Parojčić i sar., 2008; Radwan i sar., 2012).

3.1.2. Dinamički modeli gastrointestinalnog trakta

In vitro gastrointestinalni modeli predstavljaju dinamičke, višeprostrorne, računarski kontrolisane sisteme koji simuliraju fiziološke uslove u GI traktu. Ovi modeli su razvijeni u *TNO* istraživačkom centru u Holandiji i validirani su na osnovu ispitivanja kod ljudi i životinja (Blanquet i sar., 2004). Ovaj tip *in vitro* gastrointestinalnog modela daje mogućnost simulacije fizioloških uslova kod ljudi u pogledu prisustva enzima, koenzima i žučnih soli u fiziološkim količinama, pH vrednosti, vremena prolaska i mešanja sadržaja u određenim fazama apsorpcije iz GI trakta.

Gastrointestinalni model *TIM-1* simulira fiziološke uslove u želucu i tankom crevu, dok *TIM-2* model predstavlja debelo crevo sa bogatom mikrobiološkom florom (www.tno.nl). Izgled ovih modela prikazan je na slici 4.



Slika 4. Gastrointestinalni model želuca i tankog creva – *TIM-1* sistem (a) i model debelog creva – *TIM-2* sistem (b) (www.tno.nl)

TIM-1 sistem simulira dinamičke uslove u gornjim delovima GI trakta u pogledu temperature, pH vrednosti, prisustva GI tečnosti (saliva, želudačni i pankreasni sok, uključujući enzime i žučne soli), peristaltičkih pokreta, vremena prolaska kroz GI trakt i uklanjanja proizvoda varenja. Gastrointestinalni parametri se mogu prilagoditi tako da simuliraju specifične uslove vezano za uzrast, vrstu obroka i prisustvo specifičnih oboljenja (Blanquet i sar., 2004). *TIM-2* sistem simulira uslove u debelom crevu u pogledu pH vrednosti, metabolički aktivne mikroflore humanog porekla i preuzimanja sastojaka iz lumena tankog creva. U naučnoj literaturi su objavljeni rezultati dobijeni sa sistemima *TIM-1* i *TIM-2* u svrhu predviđanja apsorpcije lekova i potencijalnih efekata hrane koji ukazuju na mogućnost uspostavljanja *in vitro* – *in vivo* korelacije (Blanquet i sar., 2004; Souliman i sar., 2006; Souliman i sar., 2007; Brouwers i sar., 2011; Brouwers i Augustijns, 2014). U ovim radovima se ističe prednost gastrointestinalnih modela u odnosu na oficinalne metode za ispitivanje brzine rastvaranja sa aspekta predviđanja

uticaja hrane i ukazuje na značaj ovih modela kao komplementarne tehnike sa *in vitro* ispitivanjem brzine rastvaranja u procesu otkrića i razvoja lekova.

Kompleksnost modela *TIM-1* i *TIM-2* i visoka cena ispitivanja ograničavaju njihovu rutinsku primenu za biofarmaceutsku karakterizaciju čvrstih lekovitih preparata. Nedavno su Weitschies i Koziolk sa saradnicima, nakon opsežnog proučavanja fizičko-hemijskih i fizioloških promena u želucu uslovljenih hranom, razvili kompjuterski zasnovan, dinamički model za simulaciju uslova u želucu u prisustvu hrane (*Fed Stomach Model, FSM*) (Koziolk i sar., 2013; 2014). Ovaj model predstavlja modifikovanu aparaturu sa lopaticom u kojoj su posude za simulaciju uslova u želucu dinamičke protočne ćelije sa maksimalnom zapreminom od 100 ml. Tehnikom magnetnog obeležavanja dobijeni su rezultati u skladu sa *in vivo* podacima i potvrđena mogućnost primene FSM modela za simulaciju mehaničkih parametara želuca nakon obroka, kao što su pokretljivost u želucu i vreme prolaska lekovitog preparata. Dalji planovi autora usmereni su na integrisanje fizioloških faktora i kompleksne prirode želudačnog sadržaja u model FSM (Koziolk i sar., 2014).

3.2. *In silico* metode

Implementacija koncepta *QbD* u proces razvoja leka zahteva odgovarajuće tehnike kojima se mogu povezati *in vitro* karakteristike lekovitog preparata sa performansama u organizmu. Mehanistički, fiziološki zasnovani modeli apsorpcije imaju veliki potencijal u implementaciji ovog koncepta u svim fazama razvoja leka (Zhang i sar., 2011). Metode modelovanja i apsorpcije prepoznate su od strane farmaceutske industrije u cilju usmeravanja razvoja i optimizacije formulacije, kao i sa regulatornog aspekta, u cilju donošenja odluka i odgovarajućih preporuka u vezi potrebe sprovođenja specifičnih kliničkih studija. Američka agencija za hranu i lekove podržava upotrebu metoda modelovanja i simulacije u cilju implementacije principa *QbD* (Jiang i sar., 2011). Ove metode se koriste prilikom razvoja biorelevantnih specifikacija, definisanja kriterijuma za procenu biološke ekvivalentnosti preparata sa modifikovanim oslobađanjem,

uspostavljanja *in vitro* – *in vivo* korelacije i predviđanja efekata hrane na apsorpciju lekova (Jiang i sar., 2011).

Primena računarskih, *in silico* tehnologija u procesu otkrića i razvoja lekova omogućava uštedu vremena i smanjenje broja eksperimenata potrebnih za izbor potencijalnih lekovitih supstanci, razvoj formulacije i karakterizaciju preparata. Apсорpcija u GI traktu i potencijalni efekti hrane mogu se proučavati primenom *in silico* metoda, kao što su različiti fiziološki zasnovani farmakokinetički modeli i veštačke neuronske mreže.

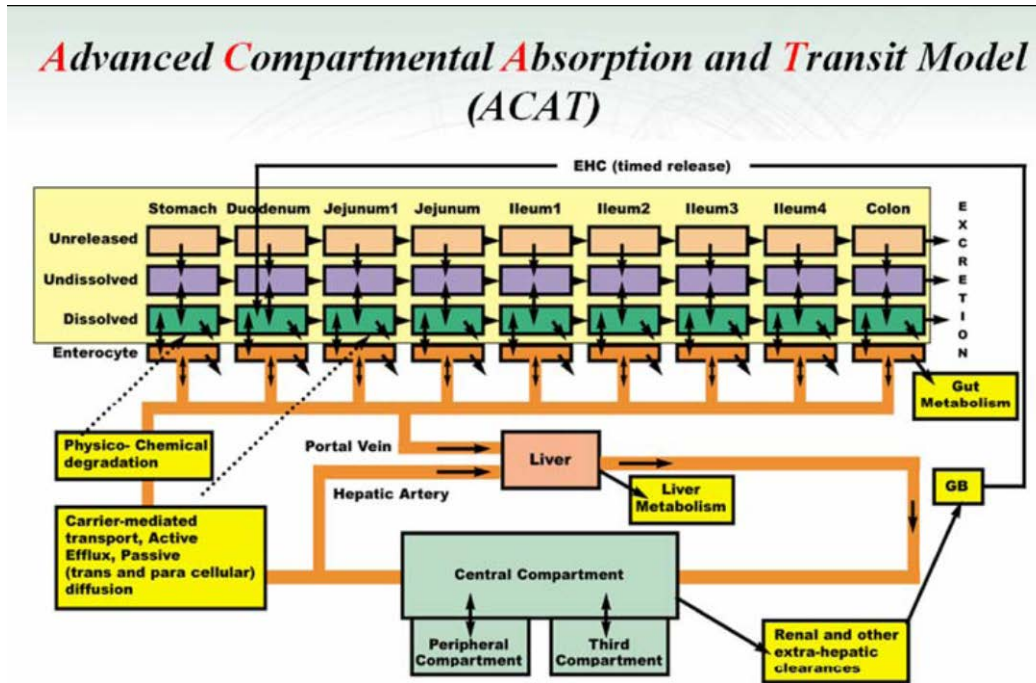
3.2.1. Fiziološki zasnovani farmakokinetički modeli

***ACAT* model**

Unapređen model prostorne apsorpcije i tranzita (*Advanced Compartmental Absorption and Transit* – *ACAT*) je fiziološki zasnovan model koji se sastoji od 18 prostora koji odgovaraju različitim segmentima GI trakta (želudac, 7 prostora tankog creva, kolon i 9 prostora enterocita). *ACAT* model uzima u obzir 6 stanja u kojima može da se nađe lek u svakom prostoru (neosloboden, nerastvoren, rastvoren, razgrađen, metabolisan i apsorbovan), kao i 3 stanja ekskretovanog materijala (neosloboden, nerastvoren i rastvoren). Ukupna količina apsorbovanog materijala je suma integrisanih apsorbovanih/eksorbovanih količina iz svakog prostora apsorpcije/tranzita. Simulacija gastrointestinalne apsorpcije pomoću *ACAT* modela se zasniva na fizičko-hemijskim (pKa, rastvorljivost, veličina i gustina čestica, permeabilnost), fiziološkim (pražnjenje želuca, vreme zadržavanja u različitim delovima GI trakta, metabolizam prvog prolaza, luminalni transport) i faktorima formulacije (doza, vrsta farmaceutskog oblika leka i brzina rastvaranja lekovite supstance iz preparata) (Agoram i sar., 2001; Huang i sar., 2009). Šematski prikaz *ACAT* modela dat je na slici 5.

Komercijalno dostupan programski paket GastroPlus[™] razvijen je na osnovu *ACAT* modela i uspešno korišćen za simulaciju apsorpcionih profila tokom otkrića i razvoja lekova (Parrott i Lave, 2002; De Buck i sar., 2007). Ovaj *in silico* model apsorpcije omogućava uspostavljanje *in vitro* – *in vivo* korelacije na osnovu *in vitro* podataka o brzini rastvaranja lekovite supstance iz preparata (Lobenberг i sar., 2000), kao i

predviđanje efekata hrane na osnovu *in vitro* određenih vrednosti ulaznih parametara i *in vivo* prekliničkih i kliničkih farmakokinetičkih podataka (Parrott i sar., 2009).



Slika 5. Šematski prikaz ACAT modela (prema Huang i sar., 2009)

Savremeni trendovi u simulaciji apsorpcije slabo rastvorljivih supstanci i uticaja hrane na ovaj proces podrazumevaju kombinovanje *in vitro* ispitivanja u fiziološki zasnovanim medijumima i *in silico* metoda simulacije. Upotrebom podataka o rastvorljivosti u biorelevantnim medijumima i fiziološki zasnovanog modela apsorpcije pomoću softvera GastroPlus™, dobijeni su apsorpcioni profili u skladu sa *in vivo* podacima i potvrđena mogućnost primene modela za predviđanje klinički značajnih efekata hrane na apsorpciju lipofilnih lekovitih supstanci (Jones i sar., 2006). Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance druge grupe BSK u biorelevantnim medijumima korišćeni su u svrhu simulacije apsorpcije pomoću kompjuterskog programa GastroPlus™ i uspostavljanja *in vitro* - *in vivo* korelacije (Wei i Lobenberg, 2006). Softverski paket GastroPlus™ prepoznat je i kao *in silico* model značajan za predviđanje *in vivo* rastvaranja i definisanje biorelevantne specifikacije ispitivanja brzine rastvaranja supstance iz farmaceutskog oblika leka (Tsume i sar., 2012). Ovaj model omogućava preciznu procenu koncentracije

supstrata P-gp i CYP 3A4 u enterocitima (Abuasal i sar., 2012) i uspostavljanje *in vitro* – *in vivo* korelacije (Mirza i sar., 2013).

Simcyp[®] Simulator

Softverski paket Simcyp[®] Simulator (Simcyp Limited, Velika Britanija) predstavlja višeprostrorni model GI trakta zasnovan na unapređenom modelu rastvaranja, apsorpcije i metabolizma (*Advanced Dissolution Absorption and Metabolism – ADAM*). Ovaj model uzima u obzir populacione parametre i interindividualnu varijabilnost u pogledu fizioloških uslova na gladno i nakon primene obroka, kao i karakteristike specifične za vrstu, uzrast, rasu i oboljenja (Kostewicz i sar., 2014b). Rezultat simulacija pomoću ovog modela zavisi od definisanih fizioloških faktora, karakteristika lekovite supstance i farmaceutskog oblika leka (Jamei i sar., 2009; Bouzom i sar., 2012). Simcyp[®] model uzima u obzir varijabilnu brzinu pražnjenja želuca za različite farmaceutske oblike lekova, interindividualne razlike u vremenu prolaska kroz GI trakt, različite pH vrednosti GI tečnosti u zavisnosti od uzrasta, populacije i unosa hrane, kao i varijabilnost zapremine i sastava fizioloških tečnosti. Informacije o različitim enzimima i regionalnoj distribuciji transportera u ćelijama epitela creva takođe su integrisane u model Simcyp[®] što omogućava precizno podešavanje uslova tokom simulacije. Osim toga, model daje mogućnost predviđanja efekata hrane na proces apsorpcije promenom navedenih fizioloških uslova (Jamei i sar., 2009). Karakteristike lekovite supstance integrisane u ovaj model obuhvataju rastvorljivost, permeabilnost, degradaciju i metabolizam, dok su svojstva farmaceutskog oblika leka definisana brzinom rastvaranja lekovite supstance (Jamei i sar., 2009). Simcyp[®] model je korišćen za predviđanje farmakokinetičkih parametara i profila koncentracije leka u krvi na osnovu *in vitro* i prekliničkih *in vivo* podataka tokom otkrića lekova u cilju usmeravanja daljih istraživanja (Chen i sar., 2012; Shaffer i sar., 2012). Patel i saradnici su koristeći model Simcyp ispitivali mogućnost predviđanja uticaja hrane specifičnog za tri različite formulacije nifedipina i dobili rezultate u skladu sa kliničkim podacima (Patel i sar., 2014).

PK-Sim[®]

PK-Sim[®] (Bayer Technology Services GmbH, Nemačka) je fiziološki zasnovan prostorni farmakokinetički model celog organizma u kome je svaki organ podeljen na vaskularni i ekstravaskularni prostor što omogućava izračunavanje podeonog koeficijenta između tkiva i plazme. Ovaj model uzima u obzir procese koji se odvijaju u zidu GI trakta, kao što su presistemski metabolizam, aktivni transport i interakcije lekova i proteina (Kostewicz i sar., 2014b). Softverski paket PK-Sim[®] omogućava izračunavanje rastvorljivosti lekovite supstance u zavisnosti od pH vrednosti u GI traktu i permeabilnosti na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika lekovite supstance, kao što su lipofilnost, molekulska masa i pK_a vrednost (Kostewicz i sar., 2014b). PK-Sim[®] softver u kombinaciji sa rezultatima *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja korišćen je za procenu *in vivo* rastvaranja nifedipina iz mekih želatinskih kapsula (Thelen i sar., 2010). Ovi autori su pretpostavili da je odložena apsorpcija nakon primene kapsula od 20 mg rezultat precipitacije u želucu i naknadnog, odloženog rastvaranja u tankom crevu (Thelen i sar., 2010). Primenom PK-Sim[®] modela u koji su integrisani literaturni podaci o presistemskom metabolizmu, simulirani su apsorpcioni profili nifedipina pri istovremenoj primeni mekih želatinskih kapsula i soka od grejpfruta i uspostavljen odnos *in vitro* i *in silico* podataka sa *in vivo* profilima koncentracije nifedipina u plazmi (Wagner i sar., 2013).

Ostali *in silico* modeli

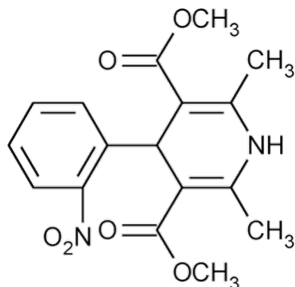
Objavljeni rezultati brojnih istraživanja potvrđuju prednost fiziološki zasnovanih u odnosu na oficinalne medijume i ukazuju na značajan potencijal *in silico* farmakokinetičkih modela na osnovu brzine rastvaranja u fiziološki zasnovanim medijumima u svrhu predviđanja uticaja hrane na apsorpciju lipofilnih supstanci (Shono i sar., 2009; Shono i sar., 2010; Juenemann i sar., 2011; Wagner i sar., 2012, Wagner i sar., 2013). Uspostavljen odnos simuliranih profila koncentracije leka u plazmi pomoću softverskog paketa STELLA[®] i stvarnih koncentracija u plazmi na gladno i nakon uzimanja obroka okarakterisan je kao *in vitro* - *in silico* - *in vivo* korelacija (Shono i sar., 2009; Shono i sar., 2010; Juenemann i sar., 2011; Wagner i sar., 2012). Računarski program STELLA[®] (*Structural Thinking Experimental Learning Laboratory with*

Animation) (Cognitus Ltd., North Yorkshire, Velika Britanija) omogućava korisniku šematsku izgradnju modela i simulacije farmakokinetičkih profila na osnovu grafičke prezentacije modela (Kostewicz i sar., 2014b).

3.2.2. Veštačke neuronske mreže

Veštačke neuronske mreže su računarski programi koji simuliraju određene funkcije ljudskog mozga koristeći različite algoritme učenja na osnovu iskustva (Sun i sar., 2003). Osnovna komponenta mreže je neuron, jednostavna matematička procesna jedinica koja na osnovu jednog ili više ulaznih parametara, odnosno učenjem iz zadatih primera, stvara odgovor. Mreža se sastoji od velikog broja neurona (perceptrona) strukturno organizovanih u različite arhitekture mreže (Sun i sar., 2003). Modeli veštačkih neuronskih mreža „uče“ odnose unutar predstavljenog seta eksperimentalnih podataka na osnovu iskustva koje se stiče tokom treninga. Veze između jedinica mreže se optimizuju sve dok se greška u predviđanju ne svede na minimalnu i mreža dostigne specifičan nivo tačnosti predviđanja. Trenirana mreža se, zatim izlaže novim ulaznim parametrima u svrhu predviđanja odgovora. Veštačke neuronske mreže predstavljaju moćne tehnike modelovanja koje su posebno korisne u slučaju nelinearnih kompleksnih sistema. Mogućnost optimizacije i predviđanja su osnovni ciljevi primene ovih modela na polju farmaceutskih i biomedicinskih nauka (Ichikawa, 2003). Primena veštačkih neuronskih mreža povezana je sa svojstvima ovih modela, kao što su (a) sposobnost prepoznavanja i učenja postojećih veza između ulaznih i izlaznih parametara bez razmatranja funkcionalnih formi veza, (b) visok nivo tolerancije za podatke koji sadrže šumove i greške u merenju i (c) sposobnost generalizacije koja omogućava primenu ovih modela na novom skupu podataka (Basheer i Hajmeer, 2000). Primena veštačkih neuronskih mreža u oblasti istraživanja i razvoja u farmaciji je relativno nova i zauzima posebno značajno mesto u domenu optimizacije formulacije i procesa (Chen i sar., 1999; Ibrić i sar., 2002; Sun i sar., 2003; Petrović i sar., 2009). Ovi modeli su korišćeni i u svrhu predviđanja farmakokinetičkih i farmakodinamskih profila (Belić i sar., 2005; Paixao i sar., 2009; Tolle i sar., 2000), kao i uspostavljanja *in vitro* – *in vivo* korelacije (Dowell i sar., 1999; Parojčić i sar., 2007).

4. NIFEDIPIN



Dimetil 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(*o*-nitrofenil)-3,5-piridindikarboksilat

Nifedipin je specifični i potentni antagonist kalcijuma 1,4-dihidropiridinskog tipa koji se koristi za profilaksu hronične stabilne angine pektoris i terapiju blage do umerene hipertenzije. Osnovno dejstvo nifedipina je relaksacija glatkih mišića arterija u koronarnoj i perifernoj cirkulaciji. Terapijske doze nifedipina iznose od 10 do 20 mg dva puta dnevno, do maksimalne dnevne doze od 60 mg (Sažetak karakteristika leka – SmPC Adalat, tablete sa modifikovanim oslobađanjem, Bayer plc).

4.1. Biofarmaceutska svojstva nifedipina

U biofarmaceutskom smislu, nifedipin se opisuje kao lekovita supstanca koja pokazuje nisku rastvorljivost i visoku permeabilnost, na osnovu čega se svrstava u drugu grupu BSK. S obzirom da podleže intenzivnom metabolizmu, nifedipin pripada drugoj grupi Biofarmaceutskog sistema klasifikacije zasnovanom na dispoziciji lekova.

Literaturni podaci o rastvorljivosti nifedipina u vodi se kreću od 0.01 mg/ml (Abrahamsson i sar., 1998) do skoro 0.02 mg/ml (Hecq i sar., 2005). U fiziološkim uslovima nifedipin ne jonizuje tako da rastvorljivost nifedipina nije pH-zavisna (Wagner i sar., 2013). Literaturni podaci za rastvorljivost nifedipina u biorelevantnim medijumima iznose 11.13 µg/ml u FaSSGF, 71.47 µg/ml u FeSSGF, 17.05 µg/ml u FaSSIF i 56.16 µg/ml u FeSSIF (Wagner i sar., 2013). Clarysse i saradnici su ispitivali rastvorljivost 17 lekovitih supstanci u intestinalnoj tečnosti ljudi i medijumima koji simuliraju crevni sok na gladno i nakon primene obroka (Clarysse i sar., 2011). Ovi autori su proučavali

mogućnost upotrebe jednostavnijih medijuma zasnovanih na konceptu funkcionalne biorelevantnosti u svrhu procene rastvorljivosti lekovitih supstanci u organizmu, koristeći rastvor površinski aktivne materije D- α -tokoferil-polietilenglikol 1000 - sukcinat u fosfatnom puferu. Dobijeni rezultati ukazuju da srednje vrednosti rastvorljivosti nifedipina u fiziološki zasnovanim medijumima koji simuliraju crevni sok na gladno i nakon uzimanja obroka (41.6 i 133 μ M, redom) odgovaraju rezultatima dobijenim u humanim aspiratima iz duodenuma, 66.7 μ M na gladno i 126 μ M nakon primene tečnog obroka. Rastvorljivost nifedipina u 0.1 % rastvoru D- α -tokoferil-polietilenglikol 1000 – sukcinata je iznosila 76.2 μ M, dok je u 0.5 % rastvoru bila 283 μ M, ukazujući da se ovaj rastvor, budući da je jednostavnog sastava i stabilan, može koristiti za procenu *in vivo* rastvorljivosti (Clarysse i sar., 2011).

Poznato je da se nifedipin dobro apsorbuje iz svih delova tankog creva i kolona (Bode i sar., 1996; Abrahamsson i sar., 1998). Brzina apsorpcije nifedipina je najveća u jejunumu, dok je u ostalim regionima GI trakta apsorpcija sporija i više varijabilna, posebno u kolonu (Bode i sar., 1996). Prividna permeabilnost nifedipina određena na Caco-2 ćelijama koje sadrže enzim CYP3A4 iznosi $28.4 \pm 1.2 \times 10^{-6}$ cm/s (Hu i sar., 1999), dok permeabilnost određena na MDCK II ćelijama iznosi 61×10^{-6} cm/s (Patel i sar., 2014). Iako efektivna permeabilnost u jejunumu (P_{eff}) ne odražava permeabilnost duž celog intestinuma, ovaj parametar se koristi za procenu stepena apsorpcije jer se smatra da se sve lekovite supstance kod kojih je ova vrednost veća od 1.5×10^{-4} cm/s potpuno apsorbuju bez obzira na mehanizam transporta (Lennernas, 2014). Efektivna permeabilnost nifedipina u jejunumu (P_{eff}) procenjena upotrebom *in vitro* MDCK II ćelija i *in silico* modela Simcyp iznosi 10.5×10^{-4} cm/s (Patel i sar., 2014). Pretpostavka autora je da je procenjena vrednost P_{eff} veća od stvarne, što nema značajan uticaj na predviđanje biološke raspoloživosti u prisustvu hrane jer permeabilnost nifedipina ne ograničava proces apsorpcije. Literaturni podaci o intestinalnoj permeabilnosti nifedipina koja se koristi u fiziološki zasnovanim *in silico* modelima u cilju predviđanja apsorpcije se kreću od 2.079×10^{-5} cm/s (Thelen i sar., 2010) do 3.6×10^{-5} cm/s (Wagner i sar., 2013).

4.2. Farmakokinetička svojstva nifedipina

Nakon oralne primene nifedipin se brzo i gotovo kompletno apsorbira iz GI trakta. Biološka raspoloživost nifedipina primenjenog u obliku oralnih preparata sa trenutnim oslobađanjem iznosi od 45 do 56 %, usled metabolizma prvog prolaza kroz jetru (SmPC Adalat; Croom i Wellington, 2006). Biološka raspoloživost nifedipina iz tableta sa modifikovanim oslobađanjem u stanju ravnoteže je 68 – 86 % u odnosu na meke želatinske kapsule (SmPC Adalat; Croom i Wellington, 2006). Maksimalne koncentracije u plazmi se postižu 0.5 - 1 sat nakon primene čvrstih farmaceutskih oblika sa trenutnim oslobađanjem, odnosno 1.5 - 4.2 sata u slučaju tableta sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina (SmPC Adalat; Croom i Wellington, 2006). Maksimalne vrednosti koncentracija nifedipina u plazmi nakon primene mekih želatinskih kapsula u dozi od 20 mg su rasponu 170 - 200 ng/ml, 50 – 100 ng/ml nakon primene tableta sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina jačine 20 mg, odnosno 20 - 50 ng/ml nakon primene 60 mg nifedipina u formulaciji tipa osmotske pumpe (Croom i Wellington, 2006; Meredith, 2007). Objavljeni rezultati ispitivanja biološke ekvivalentnosti brojnih preparata sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina ukazuju na značajne interindividualne varijacije profila koncentracije leka u krvi. Nakon oralne primene preparata nifedipina u dozi od 20 mg uočene su srednje vrednosti C_{max} u rasponu od 35 do 75 ng/ml, dok su srednje vrednosti PIK bile u opsegu od 200 do 400 ng/ml (Blume i Mutschler, 1996; Piovella, 1987; Tröger i sar., 1995). Velike razlike u farmakokinetičkim parametrima C_{max} i PIK nakon oralne primene posledica su interindividualnih varijacija u presistemskom metabolizmu (Tröger i sar., 1995; Kirsten i sar., 1998). Nifedipin pokazuje linearnu farmakokinetiku u opsegu terapijskih doza od 20 mg do 60 mg (Banzet i sar., 1983; Ahsan i sar., 1993).

Vezivanje za proteine plazme iznosi 92 – 98 %. Volumen distribucije u ravnotežnom stanju je 0.77 – 1.32 l/kg (Croom i Wellington, 2006; Kirsten i sar., 1998). Poluvreme distribucije nakon intravenske primene iznosi 5 - 6 minuta (SmPC Adalat).

Nakon oralne primene, nifedipin se metaboliše u zidu tankog creva i jetri, prvenstveno oksidativnim procesima. U jetri se metabolizam odvija posredstvom izoenzima CYP 3A4 do neaktivnih metabolita koji se izlučuju pretežno putem urina i, oko 5 - 15 %, putem

žući. Nepromenjena supstanca se može naći samo u tragovima u urinu (manje od 0.1 %). (SmPC Adalat). Ukupni klirens nifedipina i njegovih metabolita je 6.4 - 7 ml/min/kg (Kirsten i sar., 1998).

Poluvreme eliminacije nifedipina kod preparata sa trenutnim oslobađanjem iznosi 1.7 - 3.4 sata, dok u slučaju preparata sa modifikovanim oslobađanjem, zbog odložene apsorpcije, iznosi 6 - 11 sati (SmPC Adalat; Kirsten i sar., 1998). Nakon dugotrajne primene uobičajenih doza ne dolazi do akumulacije leka. Utvrđeno je da ne postoje značajne razlike u farmakokinetici nifedipina između zdravih i osoba sa oboljenjem bubrega. Kod pacijenata sa oštećenom funkcijom jetre, poluvreme eliminacije je produženo i ukupni klirens je smanjen (SmPC Adalat).

4.3. Interakcije nifedipina i hrane

O značaju uticaja hrane na apsorpciju nifedipina iz različitih preparata svedoče brojni radovi objavljeni u stručnoj literaturi (Hirasawa i sar., 1985; Challenor i sar., 1986; Armstrong i sar., 1997; Abrahamsson i sar., 1998, 1999; Schug i sar., 2002a-c; Toal, 2004; Wonnemann i sar., 2008; Patel i sar., 2014). Publikovani rezultati ispitivanja biološke raspoloživosti nifedipina u prisustvu hrane su veoma različiti i u izvesnoj meri kontradiktorni. Uočeni su i pozitivni i negativni efekti hrane na stepen i/ili obim apsorpcije nifedipina i predložena različita objašnjenja ovih interakcija. Abrahamsson i saradnici (1998) su uočili povećanu brzinu apsorpcije nifedipina iz matriks tableta sa produženim oslobađanjem u prisustvu hrane, što je objašnjeno uticajem hrane na proces erozije tablete. Kao faktori koji doprinose eroziji matriksa izdvojeni su povećana pokretljivost u GI traktu i lučenje želudačnih i crevnih sokova nakon primene obroka (Abrahamsson i sar., 1998). U narednim istraživanjima razmatran je uticaj hidrodinamike i mehaničkog mešanja kao glavni faktor koji doprinosi eroziji tablete u prisustvu hrane (Abrahamsson i sar., 1999).

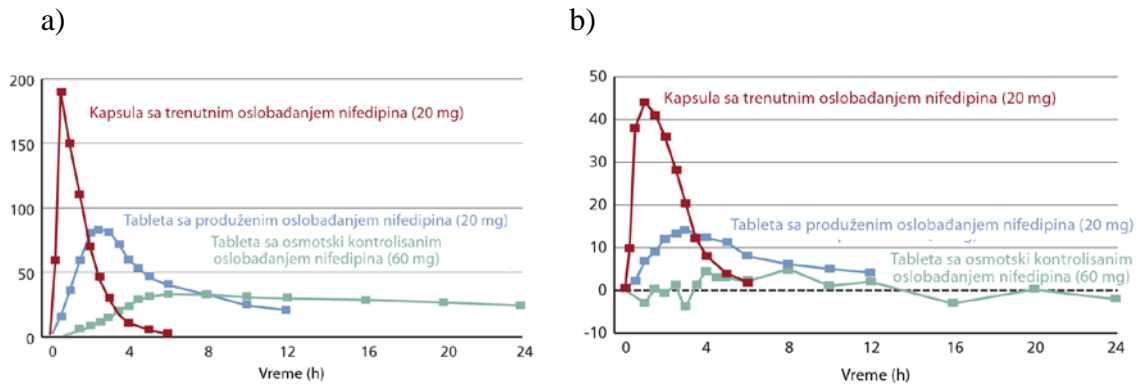
Uticaj hrane na apsorpciju nifedipina iz različitih preparata sa modifikovanim oslobađanjem bio je predmet istraživanja većeg broja autora (Schug i sar., 2002a-c; Toal, 2004; Wonnemann i sar., 2008; Patel i sar., 2014). Rezultati ovih studija ukazuju da su uočeni efekti hrane na biološku raspoloživost nifedipina specifični za formulaciju i da se

razlikuju u zavisnosti od vrste farmaceutskog oblika leka i sastava formulacije (Schug i sar., 2002a-c; Toal, 2004; Wonnemann i sar., 2008; Patel i sar., 2014). U slučaju tableta kod kojih je mehanizam oslobađanja erozija, uočeno je naglo, prekomerno oslobađanje nifedipina u prisustvu hrane („*dose dumping*“) (Schug i sar., 2002a). Sličan efekat hrane uočen je i u slučaju kapsula napunjenih mini tabletama koje sadrže hidroksipropilmetilcelulozu (Schug i sar., 2002b), kao i kod matriks tableta sa produženim oslobađanjem nifedipina (Wonnemann i sar., 2008). Apsorpcija nifedipina iz gastrozistentnih tableta tipa polimernog matriksa je bila značajno odložena u prisustvu hrane, što je objašnjeno produženim zadržavanjem preparata u želucu (Schug i sar., 2002c). U ovim studijama naglašen je značaj ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata u uslovima što sličnijim fiziološkim kako bi se otkrio potencijal za nastanak *in vivo* interakcija leka i hrane (Schug i sar., 2002a-c; Wonnemann i sar., 2008). Kvantitativno predviđanje interakcija nifedipina i hrane ispitivano je primenom fiziološki zasnovanog farmakokinetičkog modela Simcyp[®] u kombinaciji sa *in vitro* rezultatima rastvaranja nifedipina iz preparata sa trenutnim i modifikovanim oslobađanjem (Patel i sar., 2014). Autori navode da razvijeni model nema sposobnost generalizacije i predviđanja različitih efekata hrane na apsorpciju nifedipina, ali ima značaj u prekliničkoj fazi za procenu *in vivo* ponašanja.

4.4. Farmaceutski oblici sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina

S obzirom na kratko poluvreme eliminacije (2 – 4 sata) i brzu i potpunu apsorpciju duž celog intestinuma, nifedipin je pogodan kandidat za primenu preparata sa modifikovanim oslobađanjem (Abrahamsson i sar., 1998). Na tržištu postoje brojne formulacije sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina kojima se postiže bolja komplijansa u hroničnoj terapiji hipertenzije i angine pektoris i smanjenje maksimalnih koncentracija u krvi koje mogu dovesti do neželjenih dejstava. Sa druge strane, ovi preparati nose određeni rizik za nastanak interakcija tokom procesa apsorpcije, posebno pri istovremenoj primeni sa hranom (Abrahamsson i sar., 1998; Schug i sar., 2002a). Prvobitno razvijeni konvencionalni preparati nifedipina (meke želatinske kapsule) zahtevali su učestalo doziranje i bili povezani sa izraženim neželjenim dejstvima leka usled fluktuacija

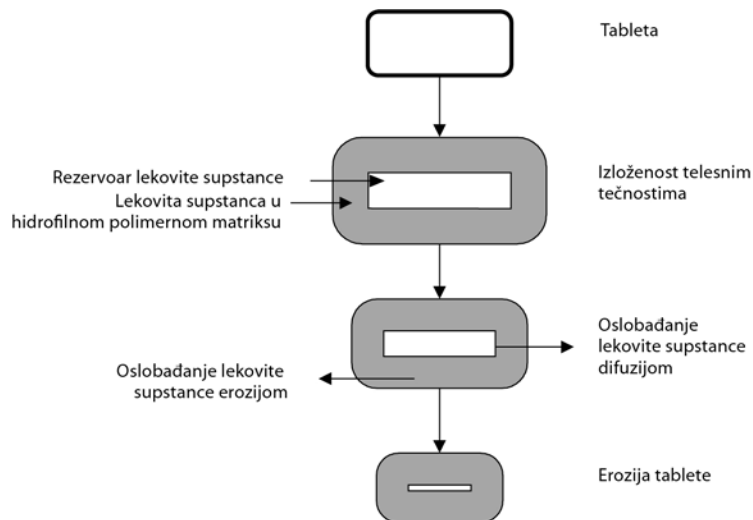
koncentracija leka u krvi. Farmakokinetička svojstva nifedipina su specifična za formulaciju, tako da brzina oslobađanja nifedipina iz preparata i mehanizam apsorpcije u sistemsku cirkulaciju predstavljaju značajne faktore koji određuju terapijski efekat (Toal, 2004). Zavisnost farmakokinetičkih parametara nifedipina kao što su $t_{1/2}$, C_{max} , PIK, od vrste farmaceutskog oblika leka je potvrđena u studijama u kojima su poređene različite formulacije nifedipina, intravenska infuzija, kapsula sa trenutnim oslobađanjem i tableta sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina (Croom i Wellington, 2006; Meredith, 2007). Uticaj formulacije različitih farmaceutskih oblika nifedipina koji uslovljava klinički značajne farmakodinamske razlike, ilustrovan je na slici 6.



Slika 6. (a) Efekat formulacije na profil koncentracije nifedipina u plazmi; (b) Farmakodinamski efekat formulacije na srčani ritam (prema Meredith, 2007)

Prikazani profili koncentracija na slici 6a se odnose na srednje profile lekovite supstance u krvi. Analizom pojedinačnih profila utvrđena je veća interindividualna varijabilnost za različite formulacije nifedipina, koja može biti posebno izražena u slučaju primene leka uz obrok (Meredith, 2007; Schug i sar., 2002a).

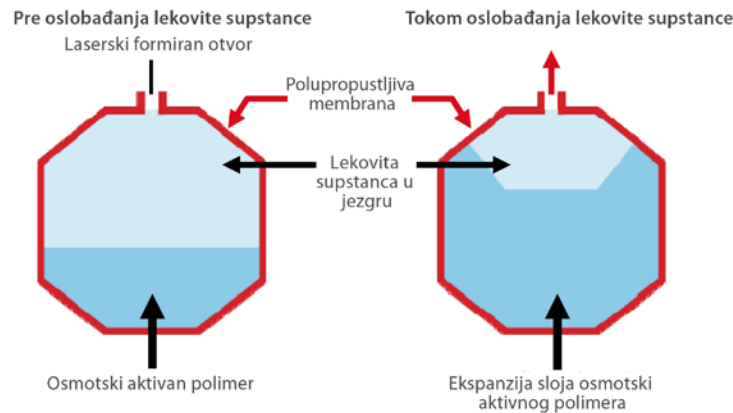
Matriks tablete sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina uglavnom sadrže laktozu, mikrokristalnu celulozu ili hidrokspipilmetilcelulozu u tabletnom jezgru i različite derivate celuloze i makrogole u sastavu film omotača.



Slika 7. Šematski prikaz matriks tableta sa produženim oslobađanjem nifedipina (prema Prisant i Elliott, 2003)

Matriks tablete sa produženim oslobađanjem nifedipina (Adalat[®] LA, Adalat[®] retard, Adalat[®] CC) sadrže lekovitu supstancu u hidrofilnom polimernom matriksu koji je obložen slojem sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance (slika 7). U GI traktu površina tablete bubri, a nifedipin se oslobađa difuzijom kroz hidrirani gel i sporom erozijom gela matriksa (Prisant i Elliott, 2003).

Gastrointestinalni terapijski sistemi (GITS) tipa osmotske pumpe (Adalat[®] OROS, Procardia[®] XL) obezbeđuju oslobađanje nifedipina kinetikom nultog reda i doziranje jednom dnevno. Tableta se sastoji od 2 sloja, osmotski aktivnog polimera (polietilenoksida) i sloja lekovite supstance, obloženih celuloznom membranom, koja je selektivno propustljiva za vodu, a nepermeabilna za lekovitu supstancu i osmotski aktivan ekscipijens. Nakon oralne primene leka, dolazi do apsorpcije vode iz GI trakta kroz polupropustljivu membranu, bubrenja polimera i formiranja suspenzije lekovite supstance unutar tablete. Ekspanzija sloja osmotski aktivnog polimera dovodi do potiskivanja lekovite supstance kroz laserski formiran otvor na membrani (slika 8). Ovim mehanizmom obezbeđuje se kontinuirano oslobađanje nifedipina tokom 18-22 sata.



*Slika 8. Gastrointestinalni terapijski sistem nifedipina tipa osmotske pumpe
(prema Grundy i Foster, 1996)*

Komparativne farmakokinetičke studije u kojima je ispitivana GITS formulacija u odnosu na preparate sa trenutnim oslobađanjem (kapsule) i tablete sa produženim oslobađanjem tipa matriksa potvrdile su kontrolisano oslobađanje lekovite supstance i predvidljive, uravnotežene koncentracije nifedipina u krvi (Meredith, 2007). Savremeni terapijski sistemi kao što su osmotske pumpe, obezbeđuju ujednačenu koncentraciju lekovite supstance u krvi tokom 24 sata što ima povoljan efekat na kontrolu hipertenzije.

Usled izražene biofarmaceutske varijabilnosti brojnih formulacija nifedipina i specifičnih farmakokinetičkih i farmakodinamskih svojstava lekovite supstance, kao i potencijalnog uticaja hrane na apsorpciju zavisno od tipa farmaceutskog oblika, pitanje i potvrda biološke ekvivalentnosti na gladno i u prisustvu hrane, su od izuzetnog značaja u slučaju nifedipina.

5. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opšti cilj ovog istraživanja je biofarmaceutska karakterizacija fizičko-hemijskih interakcija između hrane i različitih, komercijalno dostupnih, preparata sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina i procena mogućnosti primene različitih *in vitro* i *in silico* metoda za predviđanje uticaja hrane.

Ciljevi *in silico* ispitivanja su:

- razvoj validiranog modela gastrointestinalne apsorpcije nifedipina zasnovanog na unapređenom modelu prostorne apsorpcije i tranzita;
- razvoj validiranog modela veštačke neuronske mreže za simulaciju apsorpcije nifedipina;
- identifikacija hipotetičkog profila brzine oslobađanja nifedipina iz lekovitog preparata u organizmu primenom konvencionalne farmakokinetičke analize, tehnikom gastrointestinalne simulacije i veštačkih neuronskih mreža;
- kritička procena prednosti i nedostataka svake od navedenih metoda za procenu apsorpcije lekova.

Ciljevi *in vitro* ispitivanja su:

- procena uticaja eksperimentalnih uslova na brzinu oslobađanja nifedipina iz sistema tipa osmotske pumpe i hidrofилnih matriks sistema;
- procena mogućnosti uspostavljanja *in vitro* – *in vivo* korelacije;
- identifikacija biorelevantnih specifikacija za ispitivanje brzine oslobađanja nifedipina na gladno i u prisustvu hrane.

II EKSPERIMENTALNI DEO

6. MATERIJAL I METODE

6.1. Materijal

Za pripremu medijuma za ispitivanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja nifedipina iz tableta korišćene su sledeće supstance: lecitin (fosfatidilholin poreklom iz jajeta, 60 %, Fluka Chemie AG, Švajcarska), gliceril-monooleat (99,5 % monoglicerida), natrijum-oleat (82,7 %), natrijum-tauroholat (97 %), natrijum-laurilsulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), natrijum-hlorid (Riedel-de Haën, Nemačka), glacijalna sirćetna kiselina, natrijum-acetat, hlorovodonična kiselina (37 %), natrijum-hidroksid (analitički stepen čistoće, Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka), hidroksipropilmetilceluloza (HPMC, Methocel K4M, Colorcon Co, Velika Britanija), pepsin (Ph.Eur., 0.7 U/mg) i maleinska kiselina (99 %, Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka). Dugotrajno mleko sa 3,5 % mlečne masti je kupljeno u slobodnoj prodaji.

Za pripremu mobilne faze za određivanje sadržaja nifedipina u uzorcima fiziološki zasnovanih medijuma metodom visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC) korišćeni su acetonitril (99,9 %), metanol (99,8 %) i dihlorometan proizvođača Merck KGaA (Darmstadt, Nemačka). Demineralizovana voda dobijena je pomoću uređaja *Easy Pure RF (Compact Ultrapure Water System; Sartorius AG, Nemačka)*.

U ispitivanju brzine rastvaranja korišćena su tri komercijalno dostupna preparata sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina. Dva ispitivana proizvoda su bile film tablete tipa hidrofilnog matriksa (tablete sa produženim oslobađanjem nifedipina označene kao M1 i M2), dok je treći preparat bio tipa osmotske pumpe (gastrointestinalni terapijski sistem označen kao O). U tabeli 1 uporedno je prikazan kvalitativni sastav ispitivanih preparata nifedipina.

Tabela 1. Kvalitativni sastav ispitivanih preparata

Oznaka / sastav preparata	M1	M2	O
Aktivna supstanca	Nifedipin 20 mg	Nifedipin 20 mg	Nifedipin 30 mg
Ekscipijensi <i>Sastav tabletnog jezgra:</i>	Laktoza, monohidrat Skrob, kukuruzni Celuloza, mikrokristalna Magnezijum-stearat Silicijum–dioksid, koloidni, bezvodni Povidon K30	Laktoza, monohidrat Skrob, kukuruzni Celuloza, mikrokristalna Magnezijum-stearat Polisorbat 80 Talk	Polietilenoksid Hipromeloza Magnezijum-stearat Natrijum-hlorid Gvožđe-oksid, crveni
<i>Sastav film omotača:</i>	Hipromeloza Makrogol 6000 Titan-dioksid Gvožđe-oksid, crveni	Hipromeloza Makrogol 6000 Titan-dioksid Gvožđe-oksid, crveni	Hipromeloza Makrogol 3350 Titan-dioksid Celuloza-acetat Hidroksipropilceluloza Propilenglikol Gvožđe-oksid, crveni

6.2. Metode

6.2.1. *In vivo* podaci

Opsežan pregled literaturnih *in vivo* podataka za različite preparate nifedipina sproveden je upotrebom baza podataka *Pubmed* i *Science Direct* posredstvom Konzorcijuma biblioteka Srbije za objedinjenu nabavku (KoBSON).

U cilju biofarmaceutske karakterizacije fizičko-hemijskih interakcija između hrane i ispitivanih preparata i mogućnosti njihovog predviđanja, u ovom istraživanju su korišćeni literaturni profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni nakon primene preparata sa trenutnim oslobađanjem (Rashid i sar., 1995) i preparata sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina (Piovella, 1987; Schug i sar., 2002a).

6.2.2. Konvencionalna farmakokinetička analiza

6.2.2.1. Metoda Wagner-Nelson

Metoda Wagner-Nelson je klasična, model-zavisna metoda dekonvolucije profila koncentracije leka u plazmi, zasnovana na jednodimenzionalnom farmakokinetičkom modelu. Ova metoda podrazumeva da je količina apsorbovanog leka u sistemskoj cirkulaciji u trenutku t jednaka sumi količine leka u organizmu i kumulativne količine eliminisanog leka do tog trenutka (Wagner i Nelson, 1963). Frakcija apsorbovanog leka Fa može se izračunati primenom sledeće jednačine:

$$Fa(t) = \frac{C_p + k_{el} \int_0^t C dt}{k_{el} \int_0^{\infty} C dt} \quad \text{[jednačina 1]}$$

Prednost ovog pristupa je mogućnost izračunavanja stepena apsorpcije na osnovu konstante brzine eliminacije k_{el} i profila koncentracije nakon oralne primene leka, bez poznavanja *in vivo* profila nakon intravenske primene leka.

U ovom istraživanju metoda Wagner-Nelson je primenjena upotrebom softverskog paketa *Kinetica 5.0 (Thermo Fisher Scientific)*.

6.2.2.2. Metoda Loo-Riegelman

Metoda Loo-Riegelman je model-zavisna metoda dekonvolucije zasnovana na dvodimenzionalnom farmakokinetičkom modelu i zahteva poznavanje *in vivo* koncentracija leka nakon oralne i intravenske primene kod istog ispitanika (Loo i Riegelman, 1968). Stepenu apsorpcije leka može se izračunati primenom sledeće jednačine:

$$Fa(t) = \frac{C + k_{10} \int_0^t C dt + k_{12} \cdot e^{-k_{21} \cdot t} \int_0^t C \cdot e^{k_{21} \cdot t} dt}{k_{10} \int_0^\infty C dt} \quad \text{[jednačina 2]}$$

U ovom istraživanju metoda Loo-Riegelman je primenjena upotrebom komercijalno dostupnog programa *Kinetica 5.0 (Thermo Fisher Scientific)*.

6.2.2.3. Numerička dekonvolucija

Numerička dekonvolucija je model-nezavisna, konvencionalna farmakokinetička metoda za izračunavanje *in vivo* profila rastvaranja ili apsorpcije, koji su od izuzetnog značaja za biofarmaceutsku karakterizaciju lekovitog preparata (Abrahamsson i Ungell, 2009). U ovoj metodi definisane su tri osnovne komponente, i to: ulazna funkcija, težinska funkcija i izlazna funkcija (tabela 2). Ulazna funkcija opisuje kinetiku ulaska leka u organizam, odnosno *in vivo* profil rastvaranja ili apsorpcije ispitivanog preparata nakon oralne primene. Težinska funkcija predstavlja profil koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon oralne ili intravenske primene referentnog rastvora, ili, u slučaju preparata sa modifikovanim oslobađanjem, tableta ili kapsula sa trenutnim oslobađanjem. Izlazna funkcija opisuje farmakokinetički profil ispitivanog preparata (Abrahamsson i Ungell, 2009).

Kada se kao težinska funkcija koristi farmakokinetički profil nakon oralne primene referentnog rastvora (ili, preparata sa trenutnim oslobađanjem), numeričkom dekonvolucijom se dobija *in vivo* profil rastvaranja lekovite supstance. Ukoliko se kao težinska funkcija u numeričkoj dekonvoluciji koristi farmakokinetički profil nakon intravenske primene referentnog rastvora, dobija se *in vivo* profil apsorpcije ispitivane lekovite supstance.

Tabela 2. Pregled različitih funkcija uključenih u dekonvolucione i konvolucione proračune (prema Abrahamsson i Ungell, 2009)

Ulazna funkcija (<i>Input</i>)	Težinska funkcija (<i>Weighting</i>)	Funkcija odgovora (<i>Response</i>)
	Profili koncentracije lekovite supstance u plazmi za:	Profili koncentracije lekovite supstance u plazmi za:
Profil brzine rastvaranja lekovite supstance iz čvrstog farmaceutskog oblika	Oralno primenjen rastvor	Oralno primenjen čvrst farmaceutski oblik
Profil apsorpcije lekovite supstance iz čvrstog farmaceutskog oblika	Intravenski primenjen rastvor	Oralno primenjen čvrst farmaceutski oblik
Profil apsorpcije lekovite supstance iz oralno primenjenog rastvora	Intravenski primenjen rastvor	Oralno primenjen rastvor

Stepen i brzina rastvaranja, odnosno apsorpcije lekovite supstance se izračunavaju kao suma odgovora na jedinični impuls (težinsku funkciju, C_{δ}), na osnovu sledeće jednačine (Li i sar., 2008):

$$C(t) = \int_0^t f(\tau) \cdot C_{\delta}(t - \tau) d\tau \quad \text{[jednačina 3]}$$

U ovom istraživanju numerička dekonvolucija je primenjena upotrebom programskog paketa *Kinetica 5.0 (Thermo Fisher Scientific)*, koristeći podatke o koncentraciji nifedipina u plazmi nakon intravenske primene i oralne primene kapsula sa trenutnim oslobađanjem kao težinske funkcije. Da bi se uzeli u obzir različiti intervali uzorkovanja izabrana je opcija „*Interpolation*“ u programu *Kinetica 5.0 Deconvolution analysis mode*. Kada je kao težinska funkcija korišćen profil koncentracija u plazmi nakon oralne primene kapsula sa trenutnim oslobađanjem, *default Method option* „*Extrapolated Civ(t=0)*“ (koji se odnosi na i.v. profil) je promenjen na *Method option* „*Civ (t=0) = User define value*“ pri čemu je „*user define value*“ podešen na $C=0$ pri $t=0$, u skladu sa *in vivo* situacijom prilikom oralne primene lekovitog preparata.

6.2.3. *In silico* metode

6.2.3.1. Tehnika gastrointestinalne simulacije

Programski paket GastroPlus™ (verzija 8.0, SimulationsPlus, Lancaster, California, SAD) je korišćen za gastrointestinalnu simulaciju apsorpcije nifedipina iz različitih preparata prilikom primene na gladno, odnosno nakon uzimanja obroka, u cilju određivanja profila rastvaranja i apsorpcije leka u organizmu, kao i predviđanja profila koncentracije leka u plazmi u zavisnosti od uzimanja obroka. Literaturni podaci o fizičko-hemijskim i farmakokinetičkim karakteristikama nifedipina i eksperimentalno dobijeni profili oslobađanja nifedipina iz ispitivanih preparata su korišćeni kao ulazni parametri za gastrointestinalnu simulaciju.

U početnoj fazi istraživanja razvijen je i validiran model gastrointestinalne simulacije za preparat sa trenutnim oslobađanjem nifedipina. Model je smatran validiranim na osnovu izračunate vrednosti greške predviđanja (*Prediction Error, PE*) određenih farmakokinetičkih parametara (C_{max} , t_{max} , PIK_{0-inf} i PIK_{0-t}), kao i vrednosti statističkih parametara (koeficijenta korelacije R^2 , sume kvadrata greške SSE, korena srednje vrednosti kvadrata greške RMSE, srednje vrednosti apsolutne greške MAE). Greška predviđanja je izračunata kao relativni odnos razlike stvarne i predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara, prema sledećem izrazu (FDA, CDER, 1997):

$$PE (\%) = \frac{\text{stvarna} - \text{predviđena vrednost}}{\text{stvarna vrednost}} \times 100 \quad [\text{jednačina 4}]$$

U narednoj fazi istraživanja model je prilagođen za simulaciju apsorpcije nifedipina iz preparata tipa osmotske pumpe, promenom ulaznih farmakokinetičkih parametara i profila brzine rastvaranja, uz fiziološke parametre koji odgovaraju uslovima na gladno, kao i prisustvu hrane.

Razvijeni i validirani GastroPlus™ modeli korišćeni su za identifikaciju hipotetičkog *in vivo* profila rastvaranja/apsorpcije nifedipina iz preparata i uporednu analizu sa profilima dobijenim primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda i veštačkih neuronskih

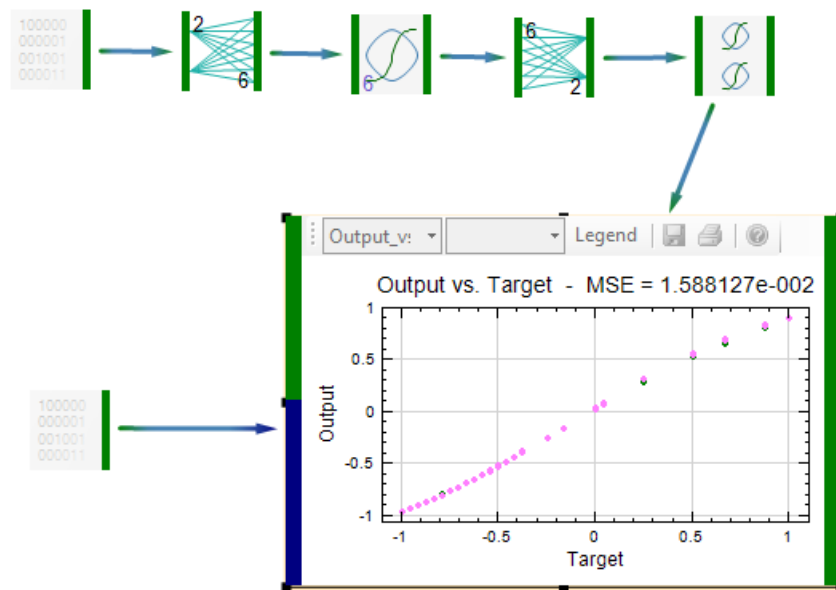
mreža. Ovi modeli su upotrebljeni za simulaciju profila koncentracije nifedipina u plazmi na gladno i u prisustvu hrane i upoređeni sa *in vivo* profilima objavljenim u literaturi u cilju uspostavljanja *in vitro* - *in vivo* korelacije.

6.2.3.2. Metodologija veštačkih neuronskih mreža

Model veštačke neuronske mreže za simulaciju apsorpcije nifedipina je razvijan korišćenjem individualnih *in vivo* profila koncentracija nakon primene preparata tipa osmotske pumpe (Schug i sar., 2002a). Kao ulazni parametri korišćeni su hipotetički *in vivo* profili izračunati numeričkom dekonvolucijom iz individualnih profila koncentracija leka u plazmi (Schug i sar., 2002a) i profila koncentracija nifedipina u plazmi nakon primene preparata sa trenutnim oslobađanjem (Rashid i sar., 1995). Izlazni parametri u razvoju ovog modela bili su odgovarajući profili koncentracija nifedipina u plazmi uočeni *in vivo*.

Tokom razvoja modela veštačke neuronske mreže za simulaciju apsorpcije nifedipina ispitivani su različiti tipovi mreža - *Multi Layered Perceptron*, *Recurrent One Layer* i *Elman Neural Network*, upotrebom komercijalno dostupnog programskog paketa *Peltarion*[®] *software* (Synapse, Švedska). Optimalan model simulacije apsorpcije dobijen je korišćenjem mreže višeslojni perceptron (*Multi Layered Perceptron*, MLP). Arhitektura MLP veštačke neuronske mreže korišćene u ovom istraživanju je prikazana na slici 9.

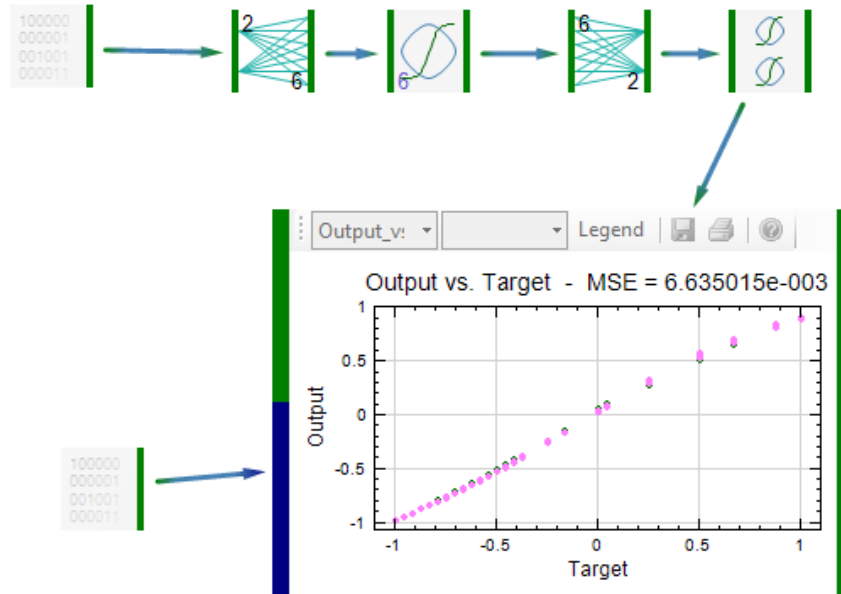
Podaci korišćeni za razvoj modela simulacije podeljeni su u tri grupe: set podataka za treniranje mreže, set podataka za validaciju mreže i set podataka za testiranje mreže. Set podataka za validaciju mreže je iznosio 15 % uzoraka za treniranje mreže i odabran je nasumično pomoću programskog paketa. Proces učenja (treniranja) MLP mreže je bio algoritam sa povratnim prostiranjem (*backpropagation*), gde mreža najpre u jednom smeru generiše neki izlaz, a zatim u suprotnom smeru svakom neuronu dodeljuje određenu grešku (razliku između željenog i stvarnog izlaznog parametra) i u trećem prolasku koriguje težinske koeficijente ulaza koji pobuđuju taj neuron.



Slika 9. Arhitektura veštačke neuronske mreže Multi Layered Perceptron za simulaciju apsorpcije nifedipina u uslovima na gladno

Brzina učenja je podešena na 0.1 i momentum na 0.7. Ulazni signali (koncentracije nifedipina u plazmi u određenim vremenskim intervalima) se prenose do prvog skrivenog sloja koji čini šest neurona. Nivo aktivacije neurona u funkcionalnom delu sloja definisan je *Tanh* sigmoidnom funkcijom. Iz skrivenog sloja mreže informacije se prenose do izlaznog sloja koji čine dva neurona. Na kraju procesa učenja *Delta terminator* upoređuje dva signala, jedan, stvarni odgovor iz seta podataka i drugi, koji predstavlja izlazni parametar predviđen mrežom. Način organizacije i povezivanja slojeva mreže, odnosno arhitektura mreže, je bila ista za simulaciju apsorpcije nifedipina na gladno i u prisustvu hrane. Arhitektura MLP veštačke neuronske mreže za ispitivanje uticaja hrane na proces apsorpcije prikazana je na slici 10. Mreže su progresivno trenirane sve do 10.000 epoha kako bi se odredila završna tačka procesa učenja. Proces učenja mreže je završen kada nije više bilo promena greške učenja ili kada je greška validacije počela da se menja. Srednja vrednost greške treniranja i validacije MLP mreže iznosila je 1.59×10^{-2} za simulaciju apsorpcije nifedipina na gladno i 6.64×10^{-3} za simulaciju apsorpcije nifedipina nakon uzimanja obroka.

Razvijene i validirane mreže korišćene su za simulaciju apsorpcije nifedipina na gladno i u prisustvu hrane na osnovu eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja nifedipina iz ispitivanih preparata (konvolucioni pristup), kao i za identifikaciju *in vivo* profila rastvaranja nifedipina iz ispitivanih preparata na osnovu literaturnih *in vivo* podataka (dekonvolucioni pristup).



Slika 10. Arhitektura veštačke neuronske mreže Multi Layered Perceptron za simulaciju apsorpcije nifedipina nakon primene obroka

6.2.4. Ispitivanje rastvorljivosti

Rastvorljivost nifedipina određena je u vodi, fiziološki zasnovanim medijumima koji simuliraju želudačni i crevni sok na gladno i nakon uzimanja obroka, 1 % rastvoru natrijum-laurilsulfata, 0.5 % rastvoru HPMC i 40 % etanolu. Ravnotežna rastvorljivost je određena dodavanjem supstance u višku u određenu zapreminu medijuma za ispitivanje. Svi eksperimenti su rađeni na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svetlosti zbog fotosenzitivnosti nifedipina. Uzorci su stavljeni na mešalicu (*Unimax 1010*, Heidolph, Schwabach, Nemačka) i mešani u toku 6 sati. U određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci medijuma, centrifugirani i profiltrirani kroz membranski filter (veličina pora 0.45 μm). Kvantitativna

analiza uzoraka je izvršena UV spektrofotometrijski (*Varian Cary 50, Varian Inc, Holandija*) na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije nifedipina (340 nm).

6.2.5. Ispitivanje brzine rastvaranja

Ispitivanje brzine rastvaranja nifedipina iz komercijalno dostupnih preparata (M1, M2 i O) sprovedeno je pod različitim eksperimentalnim uslovima, zaštićeno od svetlosti, na temperaturi $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Korišćena su tri tipa aparature:

- aparatura sa lopaticom (*Erweka DT 600*) sa 500 ml medijuma, pri brzini od 100 obrtaja/min - aparatura 2 (Ph. Eur. 8.0);
- aparatura tipa cilindra sa povratnim kretanjem (*BioDis, Vankel*) pri 10 uranjanja/min, sa promenom sudova nakon 30 minuta, a zatim na svakih sat do 12 sati (ukupna zapremina medijuma 3500 ml) - aparatura 3 (Ph. Eur. 8.0);
- aparatura sa protočnom ćelijom (*SOTAX CE-7 smart*), otvoren sistem, pri brzini protoka medijuma od 8 ml/min (ukupna zapremina medijuma je iznosila 11520 ml za 24 sata) - aparatura 4 (Ph. Eur. 8.0).

Ispitivanje brzine rastvaranja nifedipina iz preparata sprovedeno je u sledećim medijumima:

- vodi;
- 0.1 M HCl (pH 1.0);
- fosfatnom puferu pH 6.8;
- fiziološki zasnovanim medijumima;
- 1 % vodenom rastvoru natrijum-laurilsulfata;
- 0.5 % rastvoru HPMC u vodi;
- 40 % etanolu.

U tabeli 3 uporedno je prikazan sastav i osnovne karakteristike fiziološki zasnovanih medijuma koji simuliraju želudačni sok na gladno (*Fasted State Simulated Gastric Fluid - FaSSGF*) i nakon uzimanja obroka (*Fed State Simulated Gastric Fluid - FeSSGF*), kao i medijuma koji simuliraju crevni sok na gladno (*Fasted State Simulated Intestinal Fluid - FaSSIF*) i nakon uzimanja obroka (*Fed State Simulated Intestinal Fluid - FeSSIF*).

Tabela 3. Sastav i karakteristike fiziološki zasnovanih medijuma^a

	FaSSGF	FeSSGF	FaSSIF	FeSSIF
Natrijum-hlorid (mM)	34.20	237.02	68.62	125.50
Natrijum-tauroholat (mM)	0.08		3.00	10.00
Lecitin (mM)	0.02		0.20	2.00
Maleinska kiselina (mM)			19.12	55.02
Gliceril-monooleat (mM)				5.00
Natrijum-oleat (mM)				0.80
Pepsin (mg/ml)	0.10			
Sirćetna kiselina (mM)		17.12		
Natrijum-acetat (mM)		29.75		
Hlorovodonična kiselina qs	pH 1.6			
Natrijum-hidroksid (mM) qs		pH 5	34.80	81.65
Mleko/pufer		1:1		
Voda, prečišćena qs do	1 l			
pH vrednost	1.6	5	6.5	5.8
Osmolalnost (mOsm/kg)	120.7±2.5	400	180±10	390±10
Puferski kapacitet (mmol/l/pH)	-	25	10	25
Površinski napon (mN/m) ^b	42.6	52.3±0.3	54.3	40.5±0.2

^aJantratid i sar., 2008a

^bJantratid i sar., 2009a

Ispitivanje je sprovedeno sa najmanje tri tablete. Uzorci medijuma su uzimani nakon 30 minuta, a zatim na svakih sat vremena, profiltrirani (0.45 µm PVDF filter, 25 mm GD/X, Whatman) i kvantitativno analizirani. Sadržaj nifedipina u uzorcima određivan je UV spektrofotometrijski na 340 nm u vodenim rastvorima, dok je u fiziološki zasnovanim medijumima određivanje sadržaja nifedipina vršeno visokoeffikasnom tečnom hromatografijom (HPLC Agilent 1100 series). Kada je kao medijum korišćen fiziološki zasnovan medijum koji simulira želudačni sok nakon uzimanja obroka (FeSSGF) gde je mleko bilo jedna od komponenti, uzorci za kvantitativnu analizu su pripremljeni na sledeći način: u 3 ml uzorka dodato je 2 ml izopropil alkohola i, nakon mešanja,

centrifugirano na 3500 obrtaja/min u trajanju od 5 minuta. Izdvojeni supernatant je korišćen za kvantitativnu analizu.

Eksperimentalni uslovi HPLC metode za određivanje sadržaja nifedipina bili su u skladu sa uslovima HPLC metode prema Ph. Eur. 8.0. Za određivanje sadržaja nifedipina HPLC metodom u ovom istraživanju korišćena je kolona Zorbax SB C18, dimenzija 4.6 mm x 150 mm. Mobilna faza se sastojala od acetonitrila, metanola i vode u odnosu 9:36:55, v/v/v, sa brzinom protoka 1.5 ml/min. Zapremina injektovanja je iznosila 50 µl, a talasna dužina detekcije 235 nm. Svaka analitička serija se sastojala od serije standardnih rastvora nifedipina za kalibracionu krivu, ispitivanih uzoraka i praznog medijuma.

***In vitro* stepen efekta hrane**

Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja u fiziološki zasnovanim medijumima upotrebljeni su za izračunavanje *In vitro* stepena efekta hrane, I_{vitro} (*In vitro food effect ratio*), prema sledećem izrazu (Mathias i sar., 2015):

$$I_{vitro} = \frac{PIK (FeSSIF)}{PIK (FaSSIF)} \quad \text{[jednačina 5]}$$

gde PIK (FeSSIF) predstavlja površinu ispod krive brzine rastvaranja nifedipina u medijumu koji simulira prisustvo hrane, dok je PIK (FaSSIF) površina ispod krive brzine rastvaranja nifedipina u medijumu koji simulira uslove na gladno (Mathias i sar., 2015).

6.2.6. *In vitro* – *in vivo* korelacija

Dekonvolucioni pristup

U cilju uspostavljanja kvantitativne korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, hipotetički profili rastvaranja nifedipina *in vivo* dobijeni *in silico* modelima gastrointestinalne simulacije i veštačkih neuronskih mreža su grafički predstavljani u odnosu na eksperimentalno dobijene profile brzine rastvaranja nifedipina iz ispitivanih

preparata pri različitim eksperimentalnim uslovima. Linearnom regresionom analizom određeni su statistički parametri korelacije *in vitro* i *in vivo* podataka (nagib krive regresije, a i koeficijent korelacije, r) i procenjivan uticaj *in vitro* kinetike rastvaranja na farmakokinetički profil lekovite supstance u organizmu.

Konvolucioni pristup

U ovom pristupu, profili koncentracije nifedipina u plazmi predviđeni primenom odgovarajućih *in silico* metoda (model gastrointestinalne simulacije i veštačke neuronske mreže) su upoređeni sa srednjim *in vivo* profilima koncentracija lekovite supstance u plazmi. Linearnom regresionom analizom određeni su statistički parametri korelacije (nagib krive regresije, a i koeficijent korelacije, r). Analizom statističkih parametara korelacije procenjivana je mogućnost primene *in silico* modela za predviđanje apsorpcije nifedipina na gladno, odnosno nakon primene obroka.

7. REZULTATI I DISKUSIJA

7.1. *IN VIVO* STUDIJE

7.1.1. *In vivo* studije različitih farmaceutskih oblika nifedipina

Detaljnim pregledom *in vivo* podataka dostupnih u literaturi za različite farmaceutske oblike nifedipina, izabrani su farmakokinetički profili koji su korišćeni kao referentni profili u ovom istraživanju. U cilju biofarmaceutske karakterizacije fizičko-hemijskih interakcija između hrane i ispitivanih preparata i mogućnosti njihovog predviđanja, korišćeni su literaturni profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni nakon intravenske primene i oralne primene preparata sa trenutnim oslobađanjem (Rashid i sar., 1995) i preparata sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina tipa hidrofilnog matriksa (Piovella, 1987) i osmotske pumpe (Schug i sar., 2002a).

Rashid i saradnici (1995) su ispitivali faktore koji utiču na apsolutnu biološku raspoloživost nifedipina i utvrdili da hepatski i intestinalni metabolizam nifedipina zavise od genetskih faktora i istovremene primene obroka. Piovella (1987) je proučavao terapijsku efikasnost i biološku raspoloživost preparata sa produženim oslobađanjem nifedipina. Schug i saradnici (2002a) su ispitivali uticaj hrane na apsorpciju nifedipina iz različitih preparata, ukazujući na mogućnost predviđanja efekata hrane specifičnih za formulaciju na osnovu rezultata odgovarajućih *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja.

Osnovni farmakokinetički parametri uočeni nakon primene izabranih farmaceutskih oblika nifedipina, kao predstavnika preparata sa različitim mehanizmima oslobađanja, prikazani su u tabeli 4. Na osnovu vrednosti parametara prikazanih u tabeli 4 može se zaključiti da se kinetika apsorpcije nifedipina u organizmu značajno razlikuje u zavisnosti od tipa i sastava farmaceutskog oblika leka. Uzimajući u obzir da pomenute razlike uslovljavaju i različite terapijske efekte različitih farmaceutskih oblika nifedipina, biofarmaceutska karakterizacija i proučavanje potencijalnog efekta hrane dobijaju još veći značaj. U tom smislu, *in vitro* i *in silico* modeli predviđanja apsorpcije nifedipina iz različitih formulacija zauzimaju važno mesto u preformulacionim i formulacionim istraživanjima, kao i proceni postregistracionih izmena u sastavu ili procesu proizvodnje čvrstih farmaceutskih oblika.

Tabela 4. Farmakokinetički parametri različitih farmaceutskih oblika nifedipina

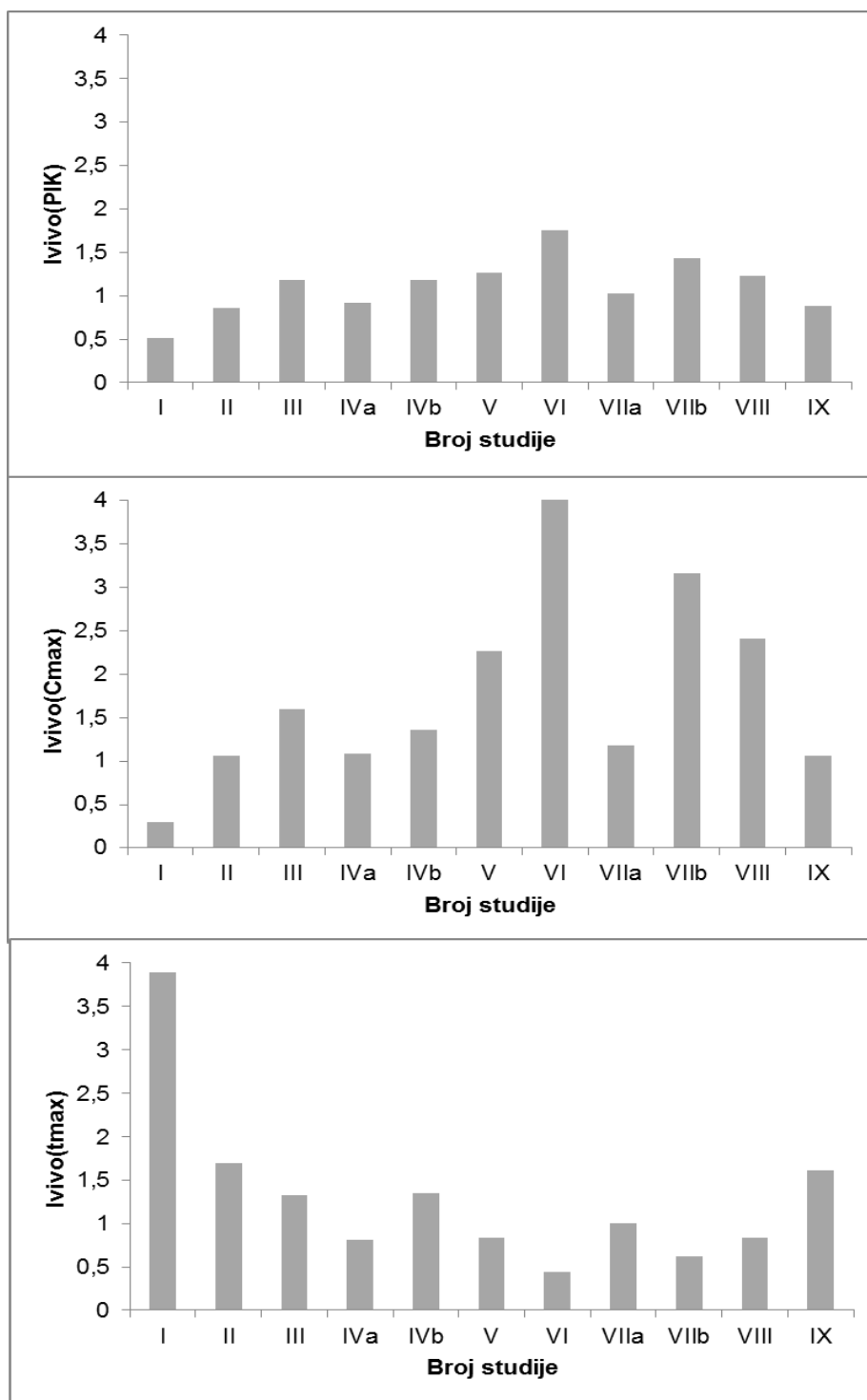
Farmaceutski oblik (doza)	PIK _{0-inf} ± SD (ngh/ml)	C _{max} ± SD (ng/ml)	t _{1/2} ± SD (h)	t _{max} ± SD (h)	Referenca
Rastvor za intravensku primenu (2.5 mg)	78.0 ± 20.0	75.0	1.7 ± 0.5	/	Rashid i sar., 1995
Kapsula sa trenutnim oslobađanjem (10 mg)	191.0 ± 59.0	124.0 ± 51.0	2.5 ± 1.1	0.38	Rashid i sar., 1995
Matriks tableta sa modifikovanim oslobađanjem, (20 mg)	239.9 ± 39.2	40.2 ± 12.4	5.4 ± 1.7	2.1 ± 1.1	Piovella, 1987
Tableta tipa osmotske pumpe, (60 mg)	487.7 ± 1.9	23.2 ± 1.6	4.9 ± 1.4	9 (5-36)	Schug i sar., 2002a

7.1.2. *In vivo* studije uticaja hrane

U svrhu proučavanja procesa apsorpcije nifedipina iz različitih preparata, razmatranja faktora koji utiču na ovaj proces i procene uticaja hrane, sproveden je opsežan pregled dostupne literature. U objavljenim radovima iz ove oblasti opisani su veoma različiti, kako pozitivni, tako i negativni efekti hrane na brzinu i stepen apsorpcije nifedipina i predložena različita moguća objašnjenja uočenih fenomena. U tabeli 5 i na slici 11 dat je prikaz odnosa vrednosti osnovnih farmakokinetičkih parametara nakon primene na gladno i nakon obroka za različite preparate nifedipina. Ovaj odnos, koji se može označiti kao „stepen efekta hrane“ (*I_{vivo}*) primenjen je s ciljem kvantifikacije uticaja hrane uočenog u okviru odgovarajućih *in vivo* studija. Nivo promena farmakokinetičkih parametara nakon uzimanja obroka u odnosu na primenu leka na gladno (*I_{vivo}*(PIK), *I_{vivo}*(C_{max}), *I_{vivo}*(t_{max})) za različite farmaceutske oblike nifedipina ukazuje da je apsorpcija ove lekovite supstance u prisustvu hrane specifična za formulaciju i da zavisi od vrste farmaceutskog oblika i sastava formulacije.

Tabela 5. Pregled literaturnih in vivo podataka o uticaju hrane na apsorpciju nifedipina iz različitih preparata

Broj studije	Farmaceutski oblik	I_{vivo} (PIK)	I_{vivo} (C_{max})	I_{vivo} (t_{max})	Uticaj hrane	Literatura
I	kapsula sa trenutnim oslobađanjem	0.51	0.30	3.89	↓PIK ↓ C_{max} ↑ t_{max} odložena i nepotpuna apsorpcija	Hirasawa i sar., 1985
II	formulacija sa dvofaznim oslobađanjem	0.86	1.06	1.69	↑ t_{max} usporeno pražnjenje želuca	Challenor i sar., 1986
III	tableta sa modifikovanim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa	1.18	1.60	1.32	↑ C_{max}	Armstrong i sar., 1997
IVa	tableta sa modifikovanim oslobađanjem tipa osmotske pumpe	0.92	1.09	0.81	↓ t_{max}	FDA, 1998
IVb	matriks tableta sa produženim oslobađanjem	1.18	1.36	1.35	↑PIK, ↑ C_{max} , ↑ t_{max}	
V	film tableta sa produženim oslobađanjem	1.26	2.27	0.84	↑PIK, ↑ C_{max} , ↓ t_{max}	Nemes i sar., 1998
VI	matriks tableta sa produženim oslobađanjem	1.76	4.03	0.44	↑PIK, ↑ C_{max} , ↓ t_{max} brza erozija tablete	Abrahamsson i sar., 1998
VIIa	tableta sa modifikovanim oslobađanjem tipa osmotske pumpe	1.03	1.18	1.00	nema uticaja	Schug i sar., 2002a
VIIb	matriks tableta sa produženim oslobađanjem	1.43	3.16	0.62	↑PIK, ↑ C_{max} , ↓ t_{max} ("dose dumping")	
VIII	kapsula napunjena mini tabletama	1.23	2.41	0.83	↑ C_{max} "dose dumping" uticaj formulacije	Schug i sar., 2002b
IX	gastrorezistentna tableta tipa polimernog matriksa	0.88	1.06	1.61	↑ t_{max} , ↑ zadržavanje u želucu izraženo <i>lag-time</i>	Schug i sar., 2002c



Slika 11. Zavisnost in vivo stepena efekta hrane od farmaceutskog oblika nifedipina (za legendu studija pogledati tabelu 5)

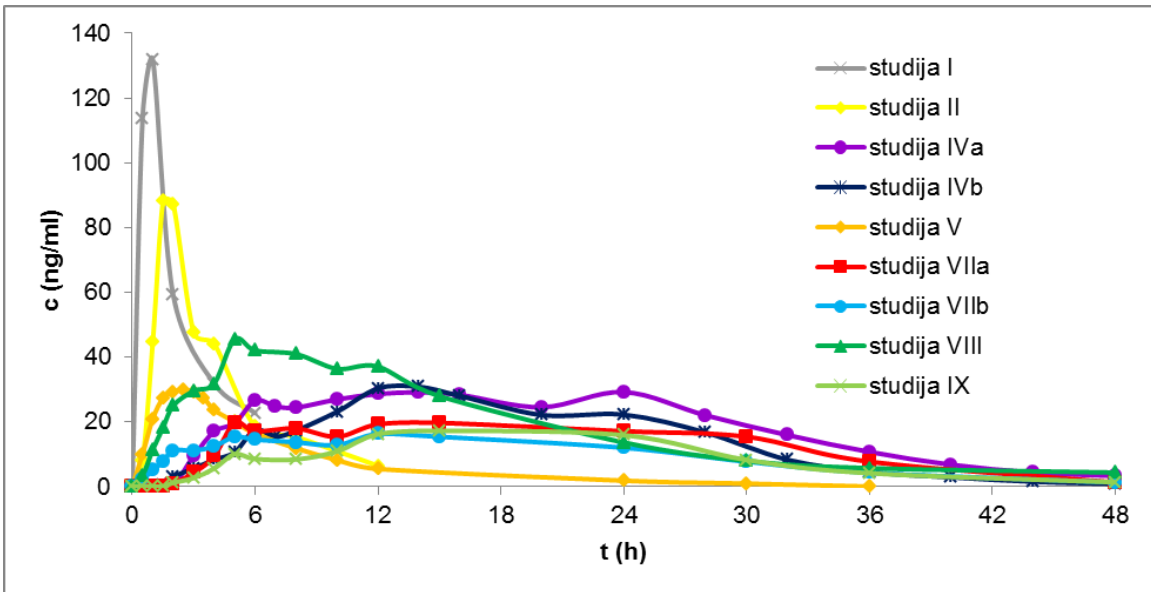
Hirasawa i saradnici (1985) su ispitivali apsorpciju nifedipina i hemodinamske efekte nakon primene kapsula sa trenutnim oslobađanjem jačine 10 mg, na gladno i nakon obroka, kod 10 ispitanika (tabela 5, studija I). Challenor i saradnici (1986) su sprovedi komparativnu farmakokinetičku studiju za tablete sa dvofaznim oslobađanjem nifedipina (5 mg sa trenutnim i 15 mg sa odloženim oslobađanjem) u odnosu na konvencionalne kapsule jačine 10 mg i tablete sa produženim oslobađanjem nifedipina jačine 20 mg. Ispitivani preparati su primenjeni na gladno i nakon obroka kod 22 dobrovoljca, pri čemu je utvrđen značajan uticaj hrane na apsorpciju nifedipina iz preparata sa dvofaznim oslobađanjem (tabela 5, studija II). Uticaj dva tipa obroka na apsorpciju nifedipina iz hidrofilnih matriks tableta sa modifikovanim oslobađanjem kod 8 dobrovoljaca ispitivali su Armstrong i saradnici (1997) i utvrdili da sastav obroka, posebno sadržaj masti, značajno utiče na farmakokinetiku nifedipina (tabela 5, studija III). U izveštaju studija biološke ekvivalentnosti matriks tableta sa produženim oslobađanjem nifedipina nakon pojedinačne doze na gladno i nakon obroka, i posle ponovljenog doziranja kod 38 dobrovoljaca, uočen je uticaj hrane (FDA, 1998; tabela 5, studija IVb). Izražen uticaj hrane uz naglo oslobađanje nifedipina iz film tableta sa produženim oslobađanjem zabeležen je u studiji bioekvivalencije koju su sprovedi Nemes i saradnici (1998) (tabela 5, studija V). U ovoj studiji je učestvovalo 12 ispitanika. Abrahamsson i saradnici (1998) su publikovali rezultate randomizovanih studija bioekvivalencije na gladno i nakon obroka, sa unakrsnim dizajnom na ukupno 48 dobrovoljaca, i utvrdili da prisustvo hrane značajno povećava brzinu i stepen apsorpcije nifedipina iz razvojne formulacije hidrofilnih matriks tableta sa produženim oslobađanjem usled povećane erozije, u poređenju sa tabletama osmotskog tipa gde uticaj hrane nije uočen (tabela 5, studija VI). Schug i saradnici (2002a,b,c) su utvrdili da je efekat hrane specifičan za formilaciju nifedipina, na osnovu rezultata randomizovanih studija bioekvivalencije sa unakrsnim dizajnom na 24 dobrovoljca (tabela 5, studije VIIa,b, VIII i IX).

Terapijski sistemi tipa osmotske pumpe (studije IVa i VIIa) su osmišljeni tako da kontrolisano oslobađaju lekovitu supstancu, nezavisno od promena fizioloških uslova *in vivo*, što potvrđuje odnos farmakokinetičkih parametara u prisustvu hrane i na gladno blizak vrednosti jedan, odnosno 0.92 i 1.09 za PIK i C_{max} u slučaju preparata Procardia[®] XL (FDA, 1998), kao i 1.03 i 1.18 za preparat Adalat[®] OROS (Schug i sar., 2002a).

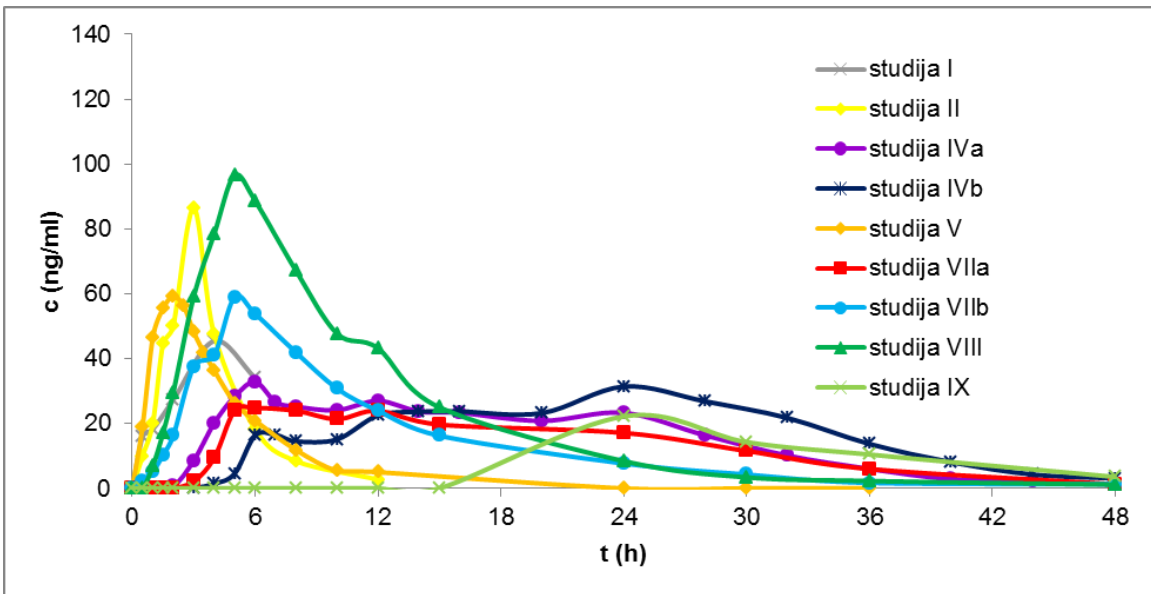
Kod većine preparata sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina uočen je pozitivan efekat hrane koji dovodi do porasta vrednosti PIK i C_{max} pri istovremenoj primeni leka sa obrokom (studije III, IVb, V, VI, VIIb i VIII). Značajan porast vrednosti maksimalnih koncentracija nifedipina u krvi u prisustvu hrane, i to 2.27 puta u slučaju preparata Cordaflex[®] (Nemes i sar., 1998), 4.03 puta kod razvojne formulacije hidrofилnih matriks tableta sa produženim oslobađanjem (Abrahamsson i sar., 1998), 3.16 puta u slučaju preparata Coral[®] (Schug i sar., 2002a) i 2.41 puta kod preparata Nifedicon[®] (Schug i sar., 2002b), udružen sa skraćenim vremenom za postizanje ovih koncentracija, ukazuje na prekomerno i naglo oslobađanje lekovite supstance, što se u literaturi opisuje kao “*dose dumping*” fenomen (studije V, VI, VIIb i VIII, redom). Odložena apsorpcija nifedipina nakon primene preparata Slofedipine[®] XL sa hranom (povećanje vrednosti t_{max} 1.61 puta) objašnjeno je produženim zadržavanjem gastrozistentnog preparata tipa polimernog matriksa u želucu (Schug i sar., 2002c). Drugo moguće objašnjenje odložene apsorpcije nifedipina primenjenog sa obrokom može biti usporeno bubrenje i erozija tablete usled prisustva viskoznog sadržaja i formiranja filma oko tablete u prisustvu hrane (Abrahamsson i sar., 2004). Negativan efekat hrane na apsorpciju nifedipina uočen je i kod kapsula sa trenutnim oslobađanjem, gde je istovremena primena hrane dovela do odložene i nepotpune apsorpcije leka (studija I, Hirasawa i sar., 1985).

Na osnovu prikaza *in vivo* stepena efekta hrane (I_{vivo}) na slici 11 može se uočiti da su razlike u brzini i stepenu apsorpcije nifedipina iz analiziranih preparata, nakon primene obroka u odnosu na gladno, specifične za formulaciju. Uticaj vrste farmaceutskog oblika na apsorpciju nifedipina nakon primene obroka, više se odražava na vreme dostizanja i vrednosti maksimalnih koncentracija u krvi, u odnosu na ukupan obim apsorpcije.

Profili koncentracija nifedipina u krvi uočeni u okviru publikovanih ispitivanja analiziranih farmaceutskih oblika nakon primene na gladno prikazani su na slici 12. Na slici 13 predstavljeni su profili koncentracija nifedipina u krvi iz primenjenih preparata nakon obroka. Prikupljeni *in vivo* podaci su dalje analizirani u cilju identifikacije kinetike apsorpcije nifedipina u uslovima primene na gladno, kao i nakon obroka. Primenom različitih metoda konvencionalne farmakokinetičke analize i *in silico* metoda, dobijeni rezultati su uporedno analizirani kako bi se procenile prednosti i nedostaci primenjenih metoda.



Slika 12. Profili koncentracija nifedipina u krvi nakon primene preparata na gladno (za legendu studija pogledati tabelu 5)



Slika 13. Profili koncentracija nifedipina u krvi nakon primene preparata nakon obroka (za legendu studija pogledati tabelu 5)

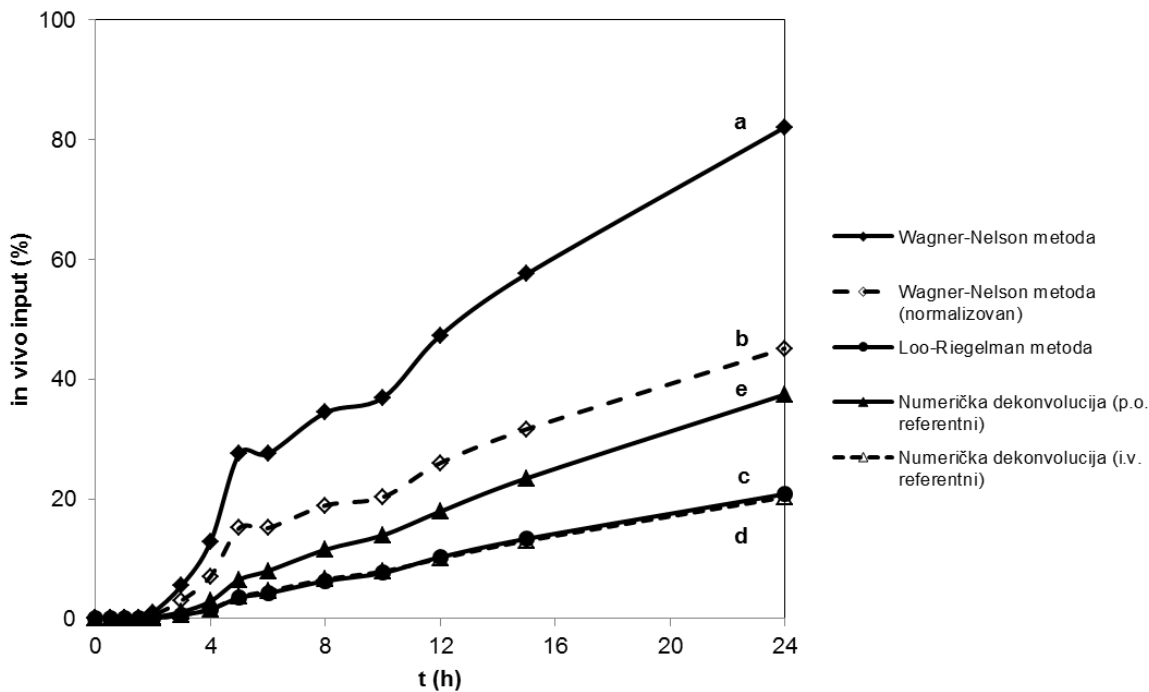
7.1.3. Identifikacija i uporedna analiza *in vivo* input profila nifedipina dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda

Razvoj biorelevantnog i diskriminativnog testa za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata zasniva se na poznavanju kinetike „ulaska“ (rastvaranje i apsorpcija) lekovite supstance u organizam. Stoga je precizno određivanje profila oslobađanja (rastvaranja) i apsorpcije lekovite supstance iz preparata *in vivo*, koje nije direktno merljivo, od izuzetnog značaja. U tu svrhu primenjene su različite metode konvencionalne farmakokinetičke analize (Wagner-Nelson, Loo-Riegelman i numerička dekonvolucija na osnovu intravenski i oralno primenjenog referentnog preparata) upotrebom softverskog paketa *Kinetica 5.0* i literaturnih profila koncentracija nifedipina u plazmi nakon primene analiziranih preparata.

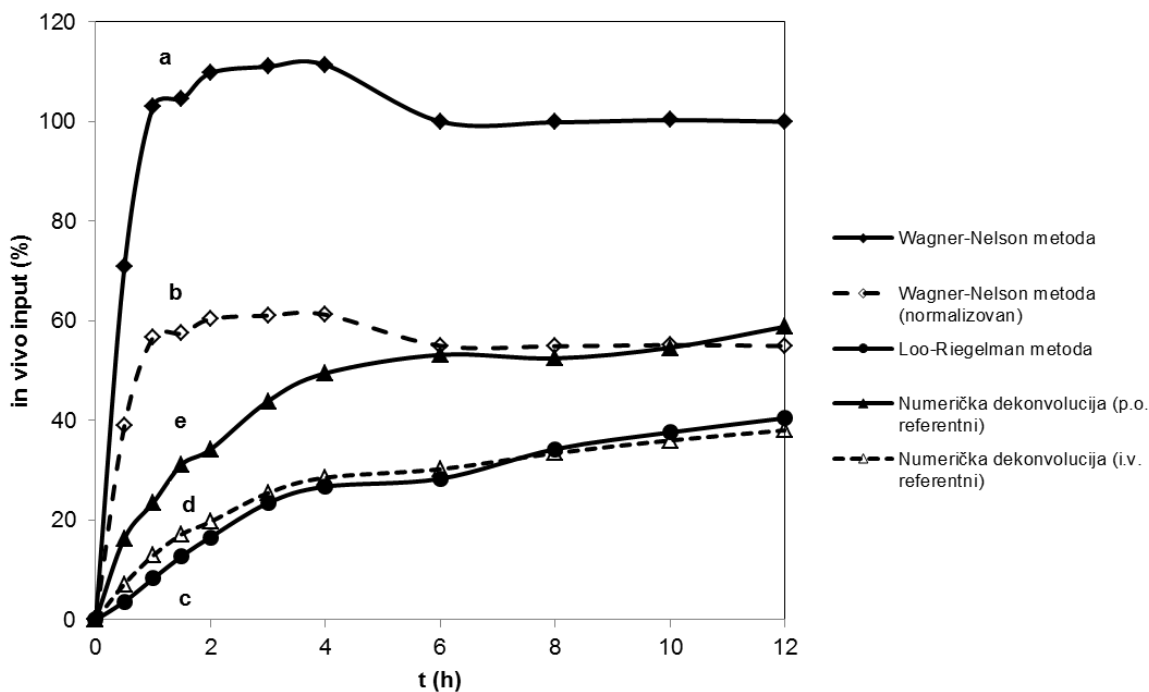
***In vivo* studija VII**

Poređenje konvencionalnih farmakokinetičkih metoda sa aspekta mogućnosti primene za određivanje *in vivo* input profila, sprovedeno je na primeru preparata sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina – tablete tipa osmotske pumpe (Schug i sar., 2002a) i hidrofilne matriks tablete (Piovella, 1987), usled dostupnosti individualnih profila koncentracija u plazmi u objavljenim publikacijama.

In vivo input profili dobijeni (a) metodom Wagner-Nelson, kao i (b) profil normalizovan faktorom 0.55 što odgovara relativnoj biološkoj raspoloživosti, (c) profil dobijen izračunavanjem pomoću algoritma Loo-Riegelman i profili dobijeni numeričkom dekonvolucijom, na osnovu profila koncentracija lekovite supstance u plazmi nakon (d) intravenske i (e) oralne primene korišćenih kao težinske funkcije, za preparat tipa osmotske pumpe (Schug i sar., 2002a) prikazani su na slici 14. Profili dobijeni primenom navedenih metoda za tablete tipa hidrofilnog matriksa (Piovella, 1987), predstavljeni su na slici 15.



Slika 14. In vivo input profili nifedipina iz tableta tipa osmotske pumpe (Schug i sar., 2002a) dobijeni primenom različitih farmakokinetičkih metoda



Slika 15. In vivo input profili nifedipina iz hidrofiličnih matriks tableta (Piovela, 1987) dobijeni primenom različitih farmakokinetičkih metoda

Na osnovu prikazanih rezultata na slikama 14 i 15 mogu se uočiti izražene razlike između input profila dobijenih primenom različitih farmakokinetičkih metoda, kao i razlike u kinetici ovih profila između osmotskog i matriks sistema, što odgovara značajno različitim mehanizmima oslobađanja nifedipina iz ispitivanih farmaceutskih oblika.

Primenom metode Wagner-Nelson dobijeni su profili apsorpcije nifedipina koji pokazuju obim apsorpcije veći od 100 %, što ukazuje na to da jednodimenzionalni farmakokinetički model ne opisuje adekvatno farmakokinetički profil nifedipina. Hipotetički *in vivo* profili dobijeni ovom metodom ukazuju na brže rastvaranje i apsorpciju u odnosu na profile dobijene drugim farmakokinetičkim metodama. Da bi se uzeo u obzir visok stepen presistemskog metabolizma nifedipina, profili dobijeni metodom Wagner-Nelson su korigovani faktorom 0.55, koji odgovara relativnoj biološkoj raspoloživosti nifedipina (Croom i Wellington, 2006). Korigovani input profili nifedipina su bili u skladu sa profilima brzine rastvaranja nifedipina *in vivo* dobijenim numeričkom dekonvolucijom. Ovakvi rezultati potvrđuju značaj sagledavanja presistemskog metabolizma nifedipina u kontekstu proučavanja apsorpcije lekovite supstance iz oralno primenjenih preparata.

Primenom algoritma Loo-Riegelman na profile koncentracija ispitivanog osmotskog i matriks sistema, dobijeni su input profili skoro identični profilima apsorpcije nifedipina izračunatim numeričkom dekonvolucijom. Iako su ove dve metode zasnovane na različitim pristupima, dobijeni rezultati su veoma slični i ukazuju na stepen apsorpcije od svega 20 % u toku 24 sata u slučaju preparata tipa osmotske pumpe, odnosno 38 % u toku 12 sati u slučaju hidrofilnih matriks tableta.

Profili brzine rastvaranja nifedipina *in vivo* izračunati numeričkom dekonvolucijom ukazuju na 50 % rastvorene lekovite supstance nakon 48 sati za osmotski sistem i 58 % nakon 12 sati za matriks tabletu. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti nifedipina koja, usled uticaja presistemskog metabolizma, iznosi 45 do 56 % primenjene doze (SmPC Adalat; Croom i Wellington, 2006). Niže vrednosti stepena apsorpcije nifedipina dobijene numeričkom dekonvolucijom koje su iznosile 27 % nakon 48 sati za osmotski sistem i 38 % nakon 12 sati za matriks tabletu, su posledica izraženog metabolizma prvog prolaska nifedipina kroz jetru.

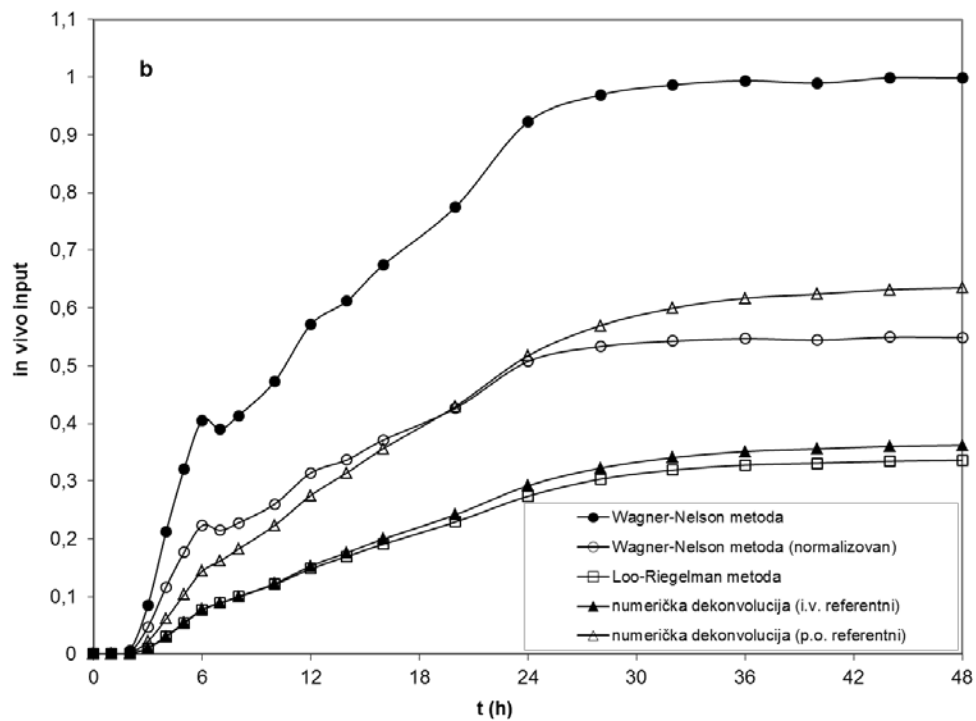
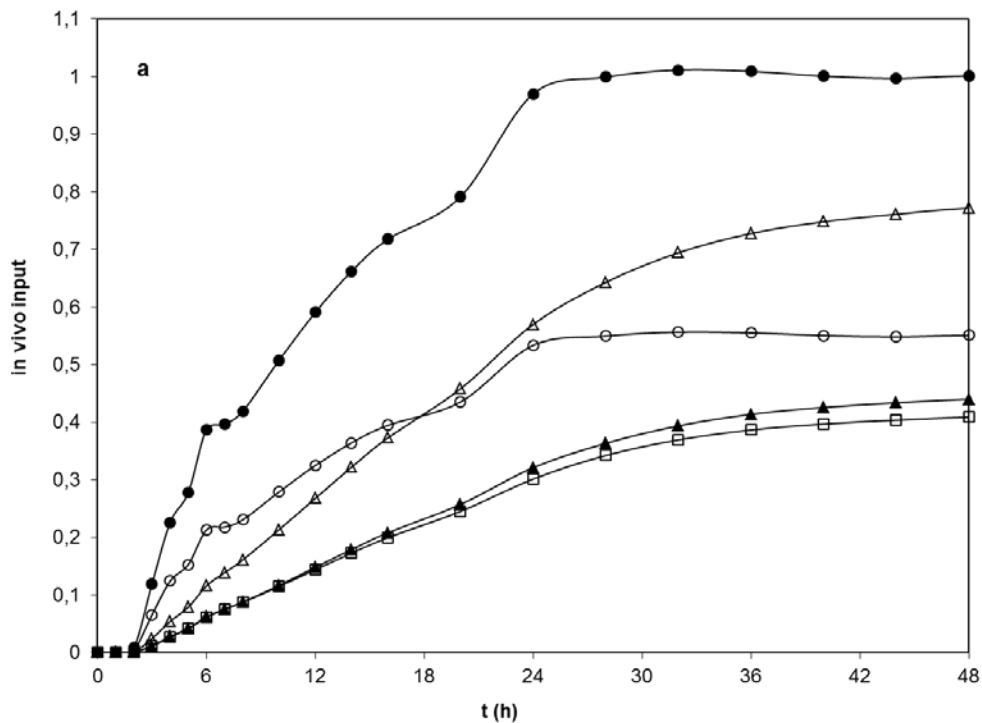
Poznavanje *in vivo* profila rastvaranja od izuzetnog je značaja za razvoj fiziološki relevantnog testa za ispitivanje brzine rastvaranja i uspostavljanje modela *in vitro* – *in*

vivo korelacije. U nedavno ažuriranoj smernici Evropske agencije za lekove koja se odnosi na farmakokinetičku i kliničku procenu preparata sa modifikovanim oslobađanjem, izbor referentne formulacije u metodi dekonvolucije se ističe kao jedan od najvažnijih elemenata za uspešno uspostavljanje *in vitro* – *in vivo* korelacije (EMA, 2014). Za pouzdanu procenu *in vivo* profila oslobađanja lekovite supstance iz oralnog preparata sa modifikovanim oslobađanjem predlaže se oralni rastvor ili farmaceutski oblik sa trenutnim oslobađanjem aktivne supstance, kao referentna formulacija u metodi dekonvolucije (EMA, 2014).

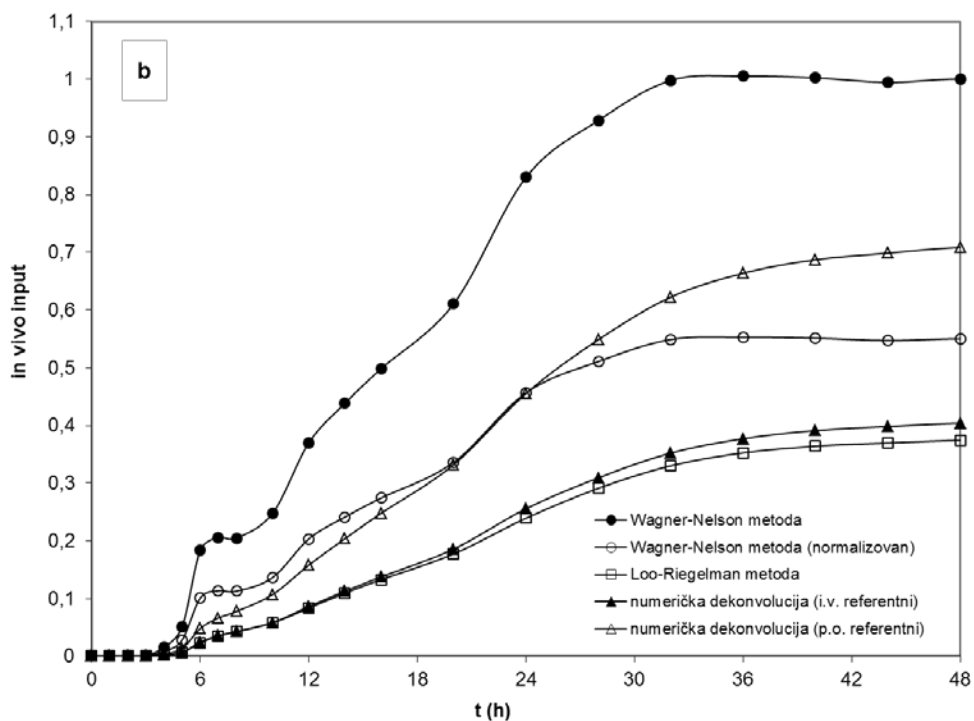
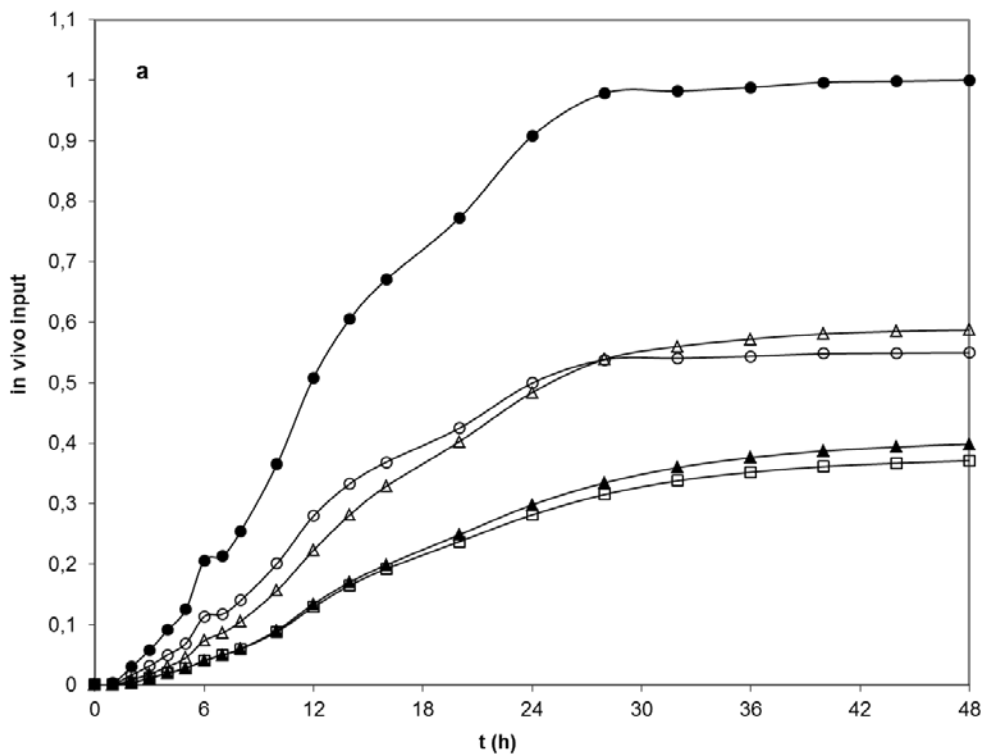
***In vivo* studija IV**

U daljem toku istraživanja rezultati studije biološke ekvivalentnosti matriks tableta sa produženim oslobađanjem nifedipina (Nifedipine ER) u odnosu na referentni preparat tipa osmotske pumpe (Procardia[®] XL) su analizirani u cilju identifikacije *in vivo* profila rastvaranja/apsorpcije i metodološkog pristupa proučavanju potencijalnog efekta hrane na apsorpciju nifedipina, usled dostupnosti *in vivo* podataka nakon primene pojedinačne i ponovljene doze na gladno, kao i nakon primene obroka (FDA, 1998).

In vivo input profili rastvaranja/apsorpcije nifedipina dobijeni primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda na *in vivo* podatke objavljene u studiji FDA (1998) za tablete tipa osmotske pumpe i hidrofилne matriks tablete prikazani su na slikama 16 i 17. Kod preparata tipa osmotske pumpe uticaj hrane na proces rastvaranja/apsorpcije je manje izražen u poređenju sa matriks tabletama. *In vivo* input profili rastvaranja/apsorpcije nifedipina nakon primene na gladno, odnosno nakon obroka, su skoro identični u toku prva 24 sata nakon primene leka i mogu se opisati kinetikom nultog reda. Ukupna količina rastvorenog nifedipina je iznosila 78 % na gladno i 64 % nakon primene obroka, izračunato numeričkom dekonvolucijom.



Slika 16. In vivo input profili nifedipina iz preparata Procardia[®] XL dobijeni korišćenjem različitih farmakokinetičkih metoda: (a) primena leka na gladno, (b) primena leka nakon obroka



Slika 17. In vivo input profili nifedipina iz preparata Nifedipine ER dobijeni korišćenjem različitih farmakokinetičkih metoda: (a) primena leka na gladno, (b) primena leka nakon obroka

Kod ispitivanih tableta tipa hidrofilnog matriksa hrana dovodi do odloženog i usporenog oslobađanja lekovite supstance, pri čemu je ukupna količina rastvorene supstance veća u poređenju sa uslovima primene leka na gladno. Numeričkom dekonvolucijom izračunata je ukupna količina rastvorenog nifedipina od 59 % nakon primene na gladno i 72 % pri primeni nakon obroka. Sve primenjene metode identifikacije *in vivo* inputa ukazuju na odloženu pojavu nifedipina u krvi (*lag time*) i do 3 sata nakon primene tableta osmotskog tipa, nezavisno od obroka. U slučaju matriks tableta, hrana dodatno odlaže oslobađanje i apsorpciju produžavajući *lag time* sa 3 na 5 sati.

In vivo input profili dobijeni metodom Wagner-Nelson ukazuju da je 100 % nifedipina apsorbovano nakon 36 sati sledećom dinamikom: oko 20 % je apsorbovano nakon 8 sati, oko 30 % nakon 12 sati i približno 70 % za 24 sata. Dobijeni rezultati bili su u skladu sa *in vivo* inputima objavljenim od strane Abrahamsson i saradnika (1998). Iako se farmakokinetika nifedipina uobičajeno opisuje dvoprostornim modelom, ovi autori opravdavaju primenu metode Wagner-Nelson sličnošću profila apsorpcije i rezultata dobijenih primenom numeričke dekonvolucije. U cilju procene stepena apsorpcije profili izračunati pomoću algoritma Wagner-Nelson normalizovani su faktorom 0.55, u skladu sa podacima o relativnoj biološkoj raspoloživosti nifedipina (SmPC Adalat). Ovako dobijeni *in vivo* inputi bili su slični profilima brzine rastvaranja nifedipina *in vivo* dobijenim primenom numeričke dekonvolucije.

Iako se nifedipin skoro potpuno apsorbuje iz GI trakta, biološka raspoloživost nakon primene oralnih preparata iznosi od 45 do 77 %, usled intenzivnog presistemskog metabolizma (Croom i Wellington, 2006). Ova činjenica se mora uzeti u obzir prilikom izračunavanja *in vivo* input profila nifedipina iz oralnih preparata. Sličnost ulaznih *in vivo* profila nifedipina iz analiziranih preparata dobijenih Wagner-Nelson metodom uz korekciju u skladu sa podacima o relativnoj biološkoj raspoloživosti i rezultata dobijenih primenom numeričke dekonvolucije u odnosu na oralni referentni preparat koji takođe podleže metabolizmu u jetri, potvrđuju značaj izbora adekvatnog referentnog farmaceutskog oblika za pouzdanu procenu *in vivo* rastvaranja i apsorpcije nifedipina iz oralnih preparata.

In vivo input profili dobijeni primenom metode Loo-Riegelman ukazuju na izvesne razlike u profilima apsorpcije nifedipina iz tableta tipa osmotske pumpe i hidrofilnih

matriks tableta. Ukupna količina apsorbovanog nifedipina kreće se u rasponu 31 – 42 %, što je u skladu sa intenzivnim metabolizmom prvog prolaza kroz jetru nakon oralne primene preparata nifedipina (Kirsten i sar., 1998). Primenom Loo-Riegelman metode dobijeni su skoro identični input profili kao i profili apsorpcije nifedipina izračunati numeričkom dekonvolucijom.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju na prednost primene farmakokinetičkog profila nakon oralne primene za identifikaciju kinetike rastvaranja i proučavanje apsorpcije leka koji podleže intenzivnom presistemskom metabolizmu. Uzimajući u obzir da se korišćenjem oralnog referentnog preparata u metodama dekonvolucije dobija *in vivo* profil rastvaranja, ovakav pristup ima prednost sa aspekta uspostavljanja *in vitro* – *in vivo* korelacije i dizajna fiziološki relevantne metodologije ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata, što je u skladu i sa savremenim regulatornim smernicama.

Uporednom analizom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda primenjenih u ovom istraživanju mogu se izdvojiti sledeće prednosti i nedostaci svake od njih:

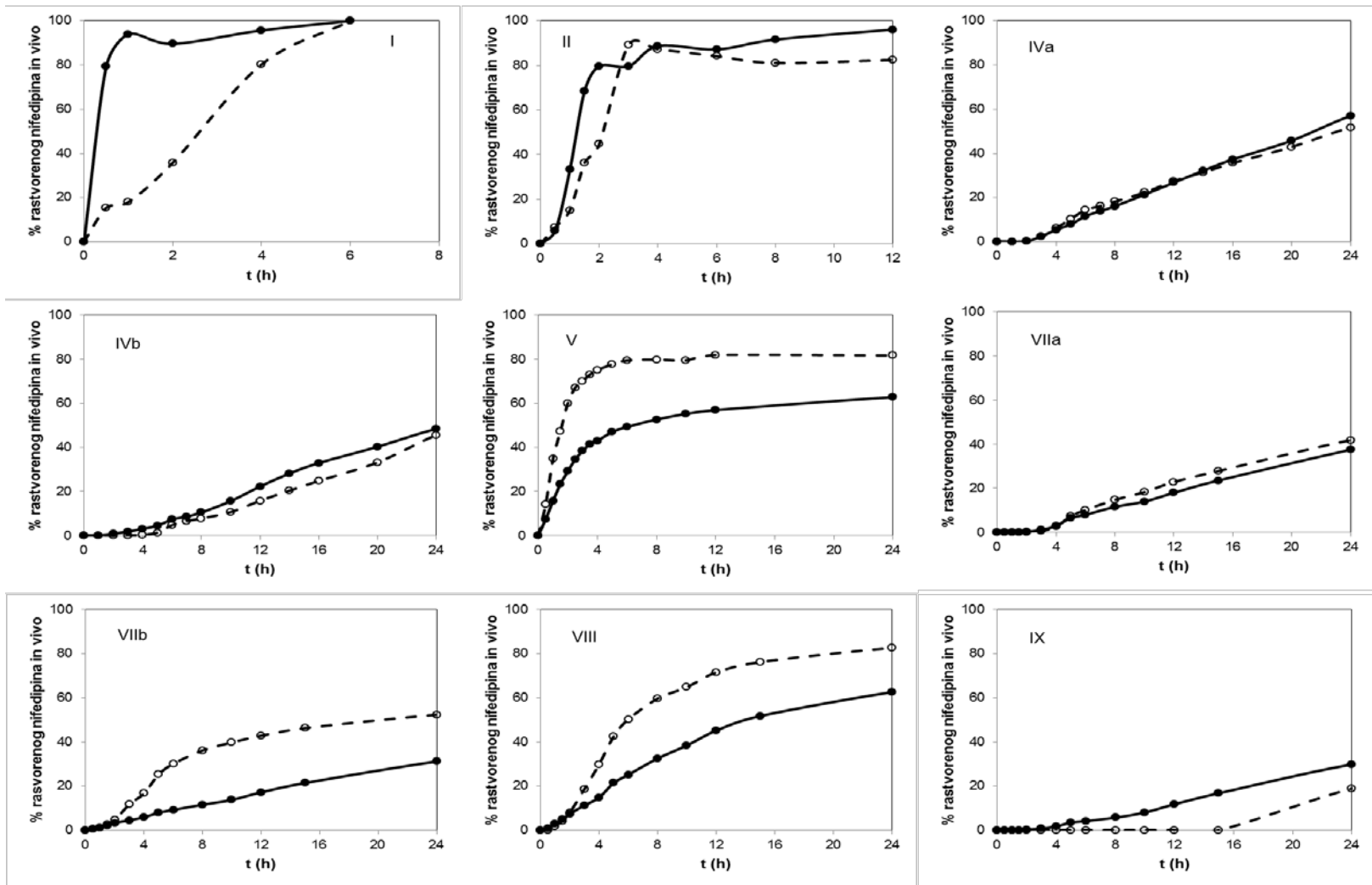
- metoda Wagner-Nelson omogućava izračunavanje stepena apsorpcije lekovite supstance na osnovu konstante brzine eliminacije i profila koncentracije nakon oralne primene leka, bez poznavanja *in vivo* profila nakon intravenske primene leka. Ovaj pristup podrazumeva da ukupan stepen apsorpcije iznosi 100 %. Usled toga, u slučaju identifikacije profila apsorpcije nifedipina iz oralnih preparata, neophodno je korigovati dobijene rezultate podacima o relativnoj biološkoj raspoloživosti nifedipina;
- metoda Loo-Riegelman je model-zavisna metoda dekonvolucije zasnovana na dvoprostornom farmakokinetičkom modelu, kojim se najčešće opisuje kinetika nifedipina. Ova metoda zahteva poznavanje koncentracija leka u krvi nakon oralne i intravenske primene kod istog ispitanika, što je često ograničavajući faktor za primenu u cilju identifikacije profila apsorpcije;
- numerička dekonvolucija, kao model-nezavisna farmakokinetička metoda za izračunavanje *in vivo* profila rastvaranja ili apsorpcije, ima prednost sa aspekta uspostavljanja *in vitro* – *in vivo* korelacije u odnosu na model-zavisne metode, kao što su Wagner-Nelson i Loo-Riegelman (EMA, 2014). Kada se kao težinska

funkcija koristi farmakokinetički profil nakon oralne primene referentnog rastvora ili preparata sa trenutnim oslobađanjem, numeričkom dekonvolucijom se dobija profil rastvaranja *in vivo*, koji se može porediti sa rezultatima *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata. Ukoliko se kao težinska funkcija u numeričkoj dekonvoluciji koristi farmakokinetički profil nakon intravenske primene referentnog rastvora, dobija se *in vivo* profil apsorpcije ispitivanog preparata. Najnovije regulatorne smernice u ovoj oblasti ističu značaj i preporučuju primenu numeričke dekonvolucije korišćenjem farmakokinetičkog profila u plazmi nakon oralne primene referentnog preparata. Ovako dobijeni profili rastvaranja *in vivo* su od izuzetnog značaja za biofarmaceutsku karakterizaciju preparata sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance, dajući pouzdanu osnovu za dekonvolucioni pristup uspostavljanju *in vitro* – *in vivo* korelacije.

Usled navedenih prednosti, *in vivo* profili rastvaranja nifedipina (*in vivo* input profili) identifikovani primenom numeričke dekonvolucije uz korišćenje farmakokinetičkog profila u plazmi nakon oralne primene referentnog preparata sa trenutnim oslobađanjem, uzeti su kao osnov za razvoj metode za *in vitro* ispitivanje i *in silico* modelovanje i simulaciju procesa koji se odvijaju u organizmu.

7.1.4. Identifikacija *in vivo* stepena efekta hrane

Uzimajući u obzir prethodno prikazane rezultate, kao i regulatorne preporuke za primenu metode numeričke dekonvolucije gde se kao težinska funkcija koristi farmakokinetički profil nakon oralne primene preparata sa trenutnim oslobađanjem, u nastavku istraživanja ova metoda je primenjena u cilju proučavanja uticaja hrane na apsorpciju nifedipina iz različitih preparata. Detaljno su analizirani *in vivo* podaci dostupni u literaturi (studije navedene u tabeli 5). Profili rastvaranja dobijeni numeričkom dekonvolucijom iz farmakokinetičkih profila nifedipina nakon primene na gladno i nakon obroka, objavljenih u literaturi, prikazani su na slici 18. Kao težinska funkcija korišćen je profil koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon oralne primene kapsula sa trenutnim oslobađanjem nifedipina (Rashid i sar., 1995).



Slika 18. In vivo profili rastvaranja nifedipina iz različitih preparata nakon primene na gladno (puna linija) i nakon obroka (isprekidana linija) dobijeni numeričkom dekonvolucijom (studije su navedene u tabeli 5)

Iako se publikovane studije razlikuju po dizajnu i demografskim karakteristikama ispitanika, kinetika *in vivo* inputa pri primeni preparata sa modifikovanim oslobađanjem na gladno je relativno konzistentna: nakon izvesnog vremena odlaganja (*lag time*) koje iznosi od 30 minuta do 3 sata u zavisnosti od sastava formulacije, rastvaranje nifedipina sledi kinetiku nultog reda sve do 24 sata. Od opisane kinetike profila rastvaranja odstupaju rezultati dobijeni u slučaju kapsula sa trenutnim oslobađanjem, formulacije sa dvofaznim oslobađanjem i film tableta sa produženim oslobađanjem nifedipina (studije I, II i V). Sa druge strane, farmakokinetičkom analizom profila koncentracija u plazmi nakon primene preparata uz obrok dobijeni su *in vivo* input profili koji su se međusobno značajno razlikovali. Preparati nifedipina koji su pokazali nešto brže *in vivo* rastvaranje nakon primene na gladno u odnosu na tablete osmotskog tipa, kao što su tablete sa produženim oslobađanjem i kapsule napunjene mini tabletama, pri primeni nakon obroka doveli su do naglog i prekomernog oslobađanja leka u organizmu, što je opisano kao “*dose dumping*” (studije V, VIIb i VIII). Za razliku od njih, oslobađanje nifedipina iz gastrozistentnih tableta tipa polimernog matriksa je dodatno odloženo u prisustvu hrane (studija IX).

Povećana brzina apsorpcije nifedipina iz matriks tableta sa produženim oslobađanjem u prisustvu hrane (studija VI), praćena četverostrukim povećanjem maksimalnih koncentracija u plazmi, objašnjena je intenzivnijom i bržom erozijom matriksa, kao i povećanom pokretljivošću u GI traktu nakon obroka i fiziološkim efektima komponenti obroka uključujući povećanu sekreciju GI tečnosti (Abrahamsson i sar., 1998).

In vivo profili rastvaranja dobijeni numeričkom dekonvolucijom iz profila koncentracija različitih farmaceutskih preparata nifedipina u okviru studija VIIb, VIII i IX ukazuju na značajne promene u brzini rastvaranja lekovite supstance iz preparata u prisustvu hrane (Schug i sar., 2002a-c). Istovremena primena hrane dovodi do naglog i prekomernog oslobađanja nifedipina iz tableta tipa erozivnog matriksa (studija VIIb), što je opisano kao „*dose dumping*“ fenomen (Schug i sar., 2002a). Slična pojava je uočena i pri primeni kapsula sa produženim oslobađanjem napunjenih mini tabletama na bazi HPMC (studija VIII), gde je hrana dovela do „značajnog gubitka karakteristika modifikovanog oslobađanja“ (Schug i sar., 2002b). Schug i saradnici (2002a-c) zaključuju da je uticaj hrane u slučaju ispitivanih preparata nifedipina specifičan za formulaciju, dok skoro

identični *in vivo* input profili osmotski kontrolisanog sistema nakon primene na gladno i nakon obroka ukazuju da uticaj hrane kod ovog preparata nije izražen (studija VIIa).

In vivo profili rastvaranja nifedipina dobijeni primenom numeričke dekonvolucije, prikazani na slici 18, analizirani su u cilju izračunavanja stepena efekta hrane. *In vivo* stepen efekta hrane, I_{vivo} , predstavlja odnos površine ispod krive profila *in vivo* rastvaranja lekovite supstance nakon primene leka uz obrok i nakon primene leka na gladno (Mathias i sar., 2015). U tabeli 6 prikazane su dobijene vrednosti *in vivo* stepena efekta hrane za različite preparate nifedipina.

Tabela 6. Vrednosti *in vivo* stepena efekta hrane, I_{vivo} , za različite preparate nifedipina

Broj studije	Farmaceutski oblik	I_{vivo}
I	kapsula sa trenutnim oslobađanjem	0.64
II	formulacija sa dvofaznim oslobađanjem	0.89
IVa	tableta sa modifikovanim oslobađanjem tipa osmotske pumpe	0.87
IVb	matriks tableta sa produženim oslobađanjem	1.08
V	film tableta sa produženim oslobađanjem	1.40
VIIa	tableta sa modifikovanim oslobađanjem tipa osmotske pumpe	1.07
VIIb	matriks tableta sa produženim oslobađanjem	1.73
VIII	kapsula napunjena mini tabletama	1.34
IX	gastrorezistentna tableta tipa polimernog matriksa	0.70

Izračunate vrednosti *in vivo* stepena efekta hrane su bliske vrednostima dobijenim za odnos površina ispod krive koncentracije leka u krvi nakon primene preparata uz obrok i na gladno, objavljenim u literaturi i predstavljenim u tabeli 5. Na osnovu grafičkog prikaza *in vivo* profila rastvaranja na slici 18, u studijama V, VIIb i VIII uočava se izražen uticaj hrane na rastvaranje nifedipina, opisan vrednostima *in vivo* stepena efekta hrane većim od 1.3. U studijama I i IX zabeležen je negativan efekat hrane na *in vivo* rastvaranje nifedipina, udružen sa vrednostima *in vivo* stepena efekta hrane manjim od

0.7. Na osnovu analiziranih *in vivo* studija uticaja hrane na apsorpciju nifedipina iz različitih preparata, u ovom istraživanju su predloženi kriterijumi za efekat hrane, koji su predstavljeni u tabeli 7.

Tabela 7. Predloženi kriterijumi za efekat hrane na in vivo rastvaranje nifedipina

Efekat hrane	I_{vivo}
Pozitivan efekat hrane	≥ 1.3
Hrana nema uticaja	0.7 – 1.3
Negativan efekat hrane	≤ 0.7

Predložene granične vrednosti za izražavanje stepena efekta hrane su u skladu sa regulatornim zahtevima za biološku ekvivalentnost preparata u opsegu 0.80 – 1.25 (EMA, 2010). Interval prihvatljivih vrednosti farmakokinetičkih parametara je širi u slučaju lekova koji pokazuju intraindividualnu varijabilnost kao što je nifedipin, i iznosi 0.77 – 1.29 ili više, u zavisnosti od stepena varijabilnosti farmakokinetičkih parametara lekovite supstance. Predloženi kriterijumi za efekat hrane na rastvaranje i apsorpciju nifedipina iz različitih preparata su konzistentni sa rezultatima Mathias i saradnika (2015), koji su na osnovu *in vitro* – *in vivo* – *in silico* ispitivanja 17 model lekovitih supstanci predložili stepen efekta hrane sa granicama 0.8 – 1.2. Za vrednosti odnosa farmakokinetičkih parametara nakon obroka i na gladno veće od 1.2 ovi autori predviđaju pozitivan efekat hrane kod ljudi, dok za vrednosti manje od 0.8 očekuju negativan efekat hrane na apsorpciju lekovite supstance.

7.2. IN VITRO ISPITIVANJA

In vitro ispitivanje brzine rastvaranja nifedipina iz komercijalno dostupnih preparata tipa osmotske pumpe i hidrofilnih matriks tableta (kvalitativni sastav tableta naveden je u tabeli 1) je sprovedeno u cilju razmatranja uticaja različitih eksperimentalnih uslova: vrste i sastava medijuma, tipa aparature kao i hidrodinamičkih uslova na kinetiku oslobađanja lekovite supstance. Kao medijumi za ovo ispitivanje korišćeni su: vodeni medijumi različitih pH vrednosti (voda, 0.1 M HCl (pH 1.0), fosfatni pufer (pH 6.8)), rastvor surfaktanta (1 % rastvor natrijum-laurilsulfata), alkoholni medijum (40 % etanol), viskozni medijum (0.5 % rastvor HPMC), kao i fiziološki zasnovani medijumi (FaSSGF, FaSSIF, FeSSGF i FeSSIF). Ispitivanje brzine rastvaranja nifedipina iz komercijalno dostupnih preparata (M1, M2 i O) sprovedeno je u tri aparature: aparaturi sa lopaticom, aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem (BioDis) i aparaturi sa protočnom ćelijom.

7.2.1. Ispitivanje rastvorljivosti nifedipina

Rezultati ispitivanja rastvorljivosti nifedipina u različitim medijumima prikazani su u tabeli 8, uporedo sa fizičko-hemijskim karakteristikama primenjenih medijuma.

Sastav i karakteristike fiziološki zasnovanih medijuma su bliski svojstvima gastrointestinalnih tečnosti kod ljudi i odražavaju digestivne procese za razliku od medijuma propisanih u farmakopejama. Ovi medijumi su osmišljeni i formulisani tako da u pogledu puferskog kapaciteta, jonskog sastava, površinskog napona i osmolaliteta odgovaraju fiziološkim gastrointestinalnim tečnostima (Klein, 2010). Ovi medijumi imaju svojstva pufera u fiziološkom opsegu pH vrednosti (od 1.6 do 5.8), dok je površinski napon podešen na osnovu vrednosti izmerenih u humanim aspiratima. Puferski kapacitet medijuma koji simuliraju uslove na gladno je znatno manji u poređenju sa ovim vrednostima medijuma koji simuliraju sastav gastrointestinalnih tečnosti nakon primene obroka. Osmolalnost pokazuje nagli porast nakon uzimanja obroka, tako da fiziološki zasnovani medijumi koji simuliraju sastav gastrointestinalnih tečnosti nakon obroka imaju veću osmolalnost u odnosu na medijume koji simuliraju uslove na gladno (Klein, 2010).

Tabela 8. Rastvorljivost nifedipina u različitim medijumima

Medijum	pH	Osmolalnost (mOsm/kg)	Puferski kapacitet (mmol/l/pH)	Površinski napon (mN/m)	Rastvorljivost nifedipina (mg/ml)
FaSSGF	1.6	120.7±2.5 ^a	-	42.6 ^b	0.01
FeSSGF	5.0	400.0 ^a	25.0 ^a	52.3±0.3 ^b	0.071 ^c
FaSSIF	6.5	180.0±10.0 ^a	10.0 ^a	54.3 ^b	0.024
FeSSIF	5.8	390.0±10.0 ^a	25.0 ^a	40.5±0.2 ^b	0.06
Voda, prečišćena	5.8	21.0 ^d	-	72.0	0.006
1 % NaLS	7.5			30.0	0.25
40 % etanol				29.6	1.05
0.5 % HPMC	6.8	115.0 ^e	-	50.0	-

^a Jantratid i sar., 2008a.

^c Wagner i sar., 2013.

^e Radwan i sar., 2012.

^b Jantratid i sar., 2009a.

^d Williams i sar., 2009.

Rastvorljivost nifedipina u fiziološki zasnovanim medijuma koji simuliraju želudačni i crevni sok nakon uzimanja obroka (FeSSGF i FeSSIF) je značajno veća u odnosu na rastvorljivost u medijumima koji simuliraju gastrointestinalne sokove na gladno (FaSSGF i FaSSIF). Eksperimentalno određena rastvorljivost nifedipina u medijumu koji simulira želudačni sok na gladno je iznosila 0.01 mg/ml, što odgovara vrednosti koji su objavili Wagner i saradnici (2013). Rastvorljivost nifedipina u medijumu koji simulira želudačni sok nakon uzimanja obroka je 7 puta veća u odnosu na rastvorljivost u medijumu koji simulira uslove na gladno. Eksperimentalno određene vrednosti rastvorljivosti nifedipina u medijumima koji simuliraju crevni sok pokazuju skoro trostruko povećanje u prisustvu hrane u odnosu na uslove gladovanja, što je u skladu sa publikovanim podacima. Clarysse i saradnici (2011) su objavili povećanje rastvorljivosti nifedipina 3.18 puta u medijumu koji simulira crevni sok nakon uzimanja obroka u odnosu na medijum koji simulira crevni sok na gladno. U istraživanju Wagner i saradnika (2013), eksperimentalno dobijena vrednost rastvorljivosti nifedipina u medijumu koji simulira crevni sok nakon uzimanja obroka bila je 3.29 puta veća u odnosu na medijum koji simulira uslove na gladno. Prema zaključku Wagner i saradnika (2013), ne očekuje se klinički značaj

uočenih razlika u rastvorljivosti nifedipina, s obzirom da je uopšteno sagledavajući rastvorljivost ovog leka, ona i dalje niska.

Na osnovu eksperimentalno određenih vrednosti, uočava se da prisustvo surfaktanta i etanola značajno utiče na rastvorljivost nifedipina, što ukazuje na mogući nastanak naglog i prekomernog oslobađanja lekovite supstance iz preparata u slučaju primene uz hranu bogatu mastima ili emulgatorima, kao i uz konzumiranje alkoholnih napitaka.

7.2.2. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja

Tablete tipa osmotske pumpe

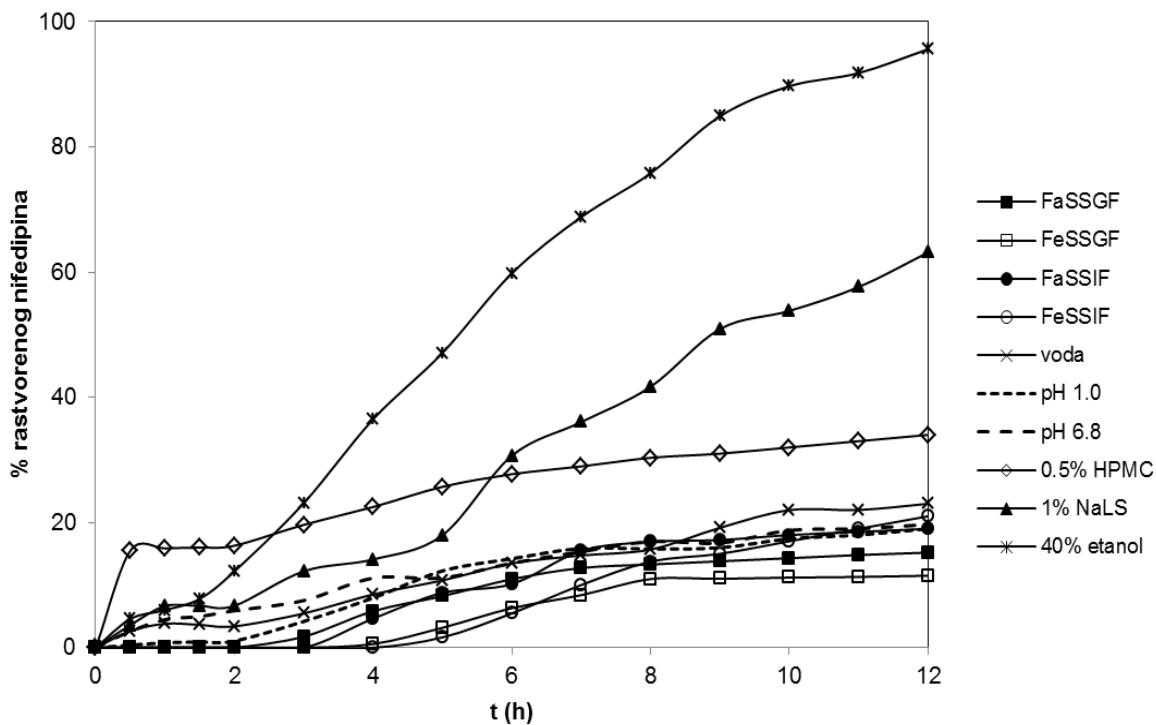
Tablete tipa osmotske pumpe su osmišljene kao robustne formulacije koje obezbeđuju kontinuirano oslobađanje lekovite supstance kinetikom nultog reda nezavisno od uslova u okolnoj sredini. Eksperimentalno dobijeni profili oslobađanja nifedipina iz sistema tipa osmotske pumpe u aparaturi sa lopaticom uz primenu različitih medijuma su prikazani na slici 19. Oslobađanje i rastvaranje nifedipina iz ispitivanog preparata u vodi je sporo i nepotpuno i nakon 12 sati iznosi 23 %. Dobijeni rezultati su u skladu sa eksperimentalno određenim vrednostima za rastvorljivost nifedipina u vodi (0.006 mg/ml). Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja u fiziološki zasnovanim medijumima ukazuju na malo izražene razlike u profilima oslobađanja nifedipina u simuliranim uslovima na gladno u odnosu na simulirane uslove nakon uzimanja obroka. Ovi rezultati su očekivani s obzirom da je u objavljenim *in vivo* ispitivanjima potvrđeno da hrana ne ispoljava značajan uticaj na preparate nifedipina tipa osmotske pumpe (Schug i sar., 2002a; FDA, 1998). Osim toga, nešto manja brzina rastvaranja nifedipina u medijumima koji simuliraju uslove nakon obroka u odnosu na medijume koji simuliraju uslove na gladno u GI traktu, može se dovesti u vezu sa nešto nižom vrednosti C_{max} i nešto većom vrednosti t_{max} uočenim u *in vivo* studiji nakon primene leka posle obroka. Faktori koji doprinose ovakvom efektu su usporeno pražnjenje želuca, smanjena difuzija u lumenu gornjeg dela GI trakta usled povećanog viskoziteta, adsorpcija na sastojke obroka i građenje kompleksa sa žučnim solima (Marasanapalle i sar., 2009).

Prisustvo natrijum-laurilsulfata u medijumu dovodi do povećanja rastvorljivosti i bržeg rastvaranja nifedipina iz tablete osmotskog tipa, koje iznosi 63 % nakon 12 sati. Slične

rezultate objavili su i drugi autori (Schug i sar., 2002a; Wonnemann i sar., 2008). Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja nifedipina iz tableta tipa osmotske pumpe u 1 % rastvoru natrijum-laurilsulfata u vodenim medijumima različitih pH vrednosti (0.1 M HCl, acetatni pufer pH vrednosti 4.5, fosfatni pufer pH vrednosti 6.8 i 8.0) pokazuju da se nakon 12 sati rastvori 50 – 60 % nifedipina, dok je nakon 24 sata rastvoreno 90 – 100 % nifedipina (Schug i sar., 2002a). Wonnemann i saradnici (2008) su publikovali profile oslobađanja nifedipina iz osmotskih tableta u istim medijumima kao onim u istraživanju Schug i saradnika (2002a), koji pokazuju da se nakon 2 sata odlaganja 50 % nifedipina rastvori nakon 12 sati i celokupna količina iz preparata nakon 24 sata.

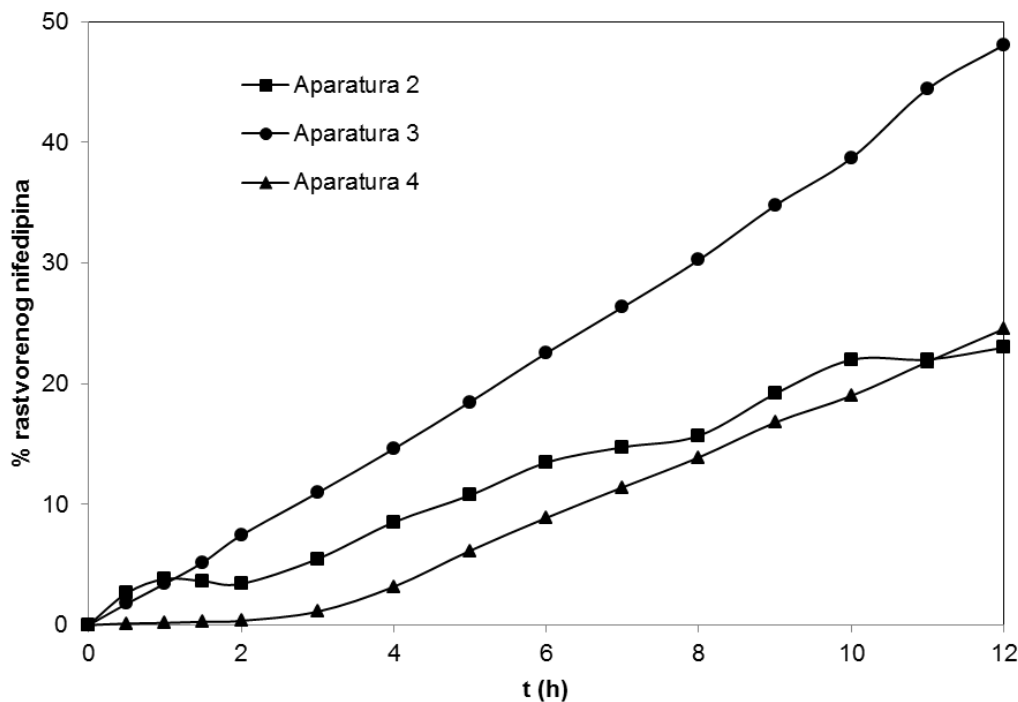
U viskoznom medijumu uočeno je početno naglo oslobađanje praćeno postepenim rastvaranjem nifedipina kinetikom nultog reda do ukupno 34 % nakon 12 sati. Dobijeni rezultati mogu se objasniti smanjenim kvašenjem tablete i smanjenom difuzijom rastvorene lekovite supstance u viskoznom medijumu.

U alkoholnom medijumu primećeno je značajno brže oslobađanje nifedipina u odnosu na druge medijume, linearnom kinetikom do ukupno 95 % rastvorene lekovite supstance nakon 12 sati ispitivanja. Ovakvi rezultati mogu se objasniti pretpostavkom da, osim rastvorljivosti nifedipina, i drugi faktori kao što je izmenjena propustljivost omotača tablete u prisustvu etanola, doprinose bržem oslobađanju nifedipina iz sistema tipa osmotske pumpe. Konzumiranje alkoholnih napitaka, pored toga može dovesti i do promene fizioloških uslova u GI traktu, kao što je smanjenje brzine pražnjenja želuca i povećanje permeabilnosti sluzokože creva (Varum i sar., 2013). Povećana brzina rastvaranja lekovite supstance u želucu i veća intestinalna permeabilnost dovode do većih vrednosti koncentracija lekovite supstance u plazmi i potencijalnih bezbednosnih problema pri istovremenoj primeni leka sa alkoholom.



Slika 19. Profili oslobađanja nifedipina iz tableta tipa osmotske pumpe (preparat O) u različitim medijumima u aparaturi sa lopaticom

Brzina rastvaranja nifedipina iz tableta osmotskog tipa u aparaturi sa lopaticom je ograničena zapreminom medijuma i rastvorljivošću nifedipina, tako da u vodi iznosi oko 20 % nakon 12 sati. Kako bi se sagledao uticaj hidrodinamike i zapremine medijuma na kinetiku oslobađanja nifedipina iz osmotskog sistema primenjene su i druge oficinalne aparature za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata. Na slici 20 prikazani su uporedni profili oslobađanja nifedipina u vodi u aparaturi sa lopaticom (aparatura 2), aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem (aparatura 3) i aparaturi sa protočnom ćelijom (aparatura 4).

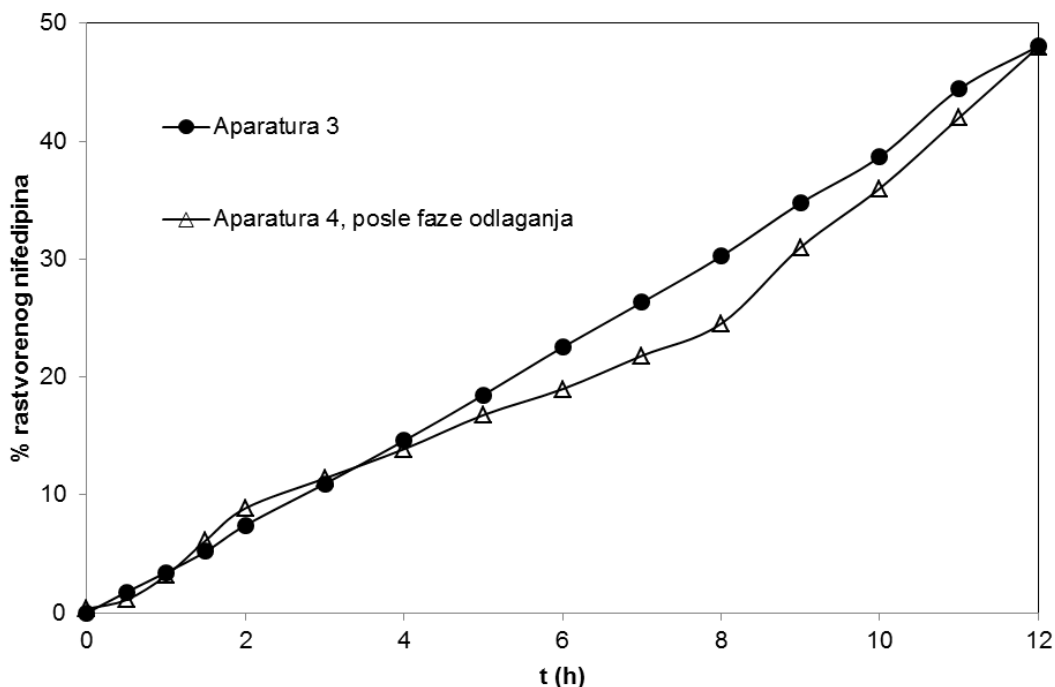


Slika 20. Profili oslobađanja nifedipina iz tableta tipa osmotske pumpe (preparat O) u različitim aparaturama (u vodi kao medijumu)

U aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem obezbeđeno je dodatno mešanje i veća zapremina medijuma (ukupno 3500 ml za 12 sati ispitivanja), što je dovelo do 48 % rastvorenog nifedipina u vodi nakon 12 sati.

U aparaturi sa protočnom ćelijom ukupna zapremina medijuma iznosila je 11520 ml za 24 sata ispitivanja. Oslobađanje nifedipina u ovoj aparaturi u vodi pokazalo je početno vreme odlaganja (*lag time*) od 3 sata praćeno daljim oslobađanjem kinetikom nultog reda sve do približno 60 % nakon 24 sata.

Važno je istaći da je brzina rastvaranja nifedipina iz tableta osmotskog tipa u aparaturi sa protočnom ćelijom, nakon početne faze odlaganja veoma slična kinetici oslobađanja uočenoj u aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem. Poređenjem profila oslobađanja nifedipina iz osmotskog sistema nakon faze odlaganja u aparaturi sa protočnom ćelijom i aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem, dobijeni su gotovo podudarni profili sličnog nagiba, što ukazuje na odsustvo uticaja hidrodinamičkih uslova na kinetiku oslobađanja lekovite supstance (slika 21).



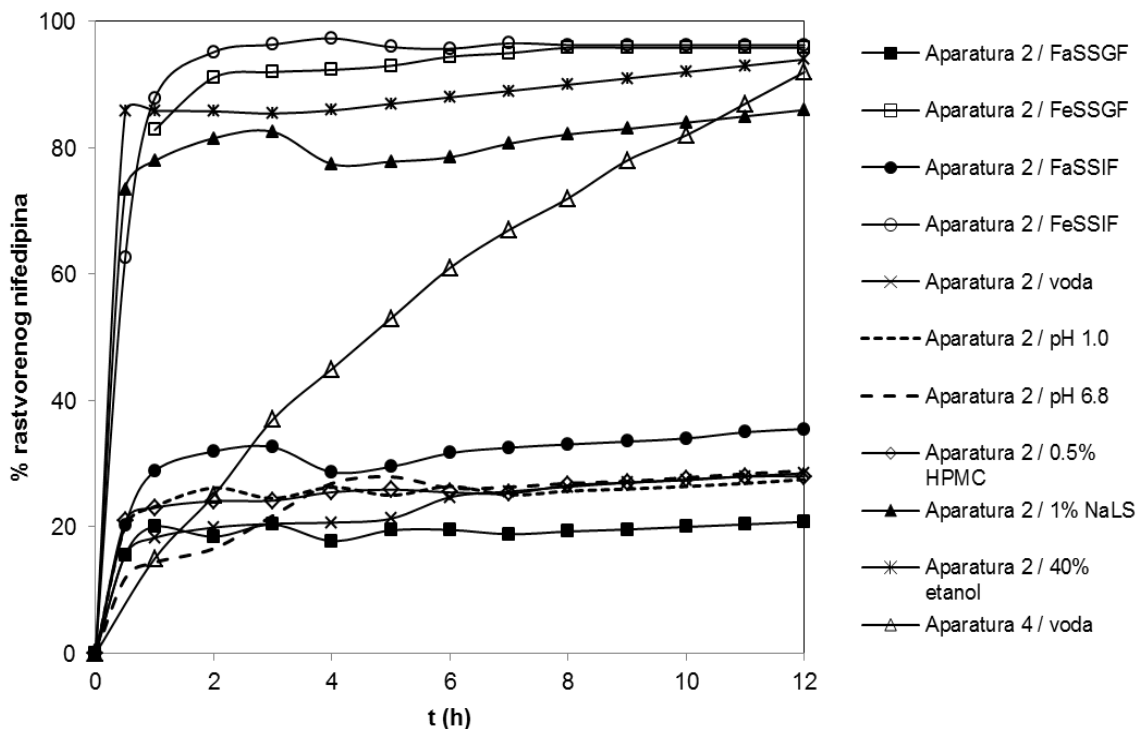
Slika 21. Profili oslobađanja nifedipina iz tableta tipa osmotske pumpe (preparat O) u vodi u aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem i aparaturi sa protočnom ćelijom nakon faze odlaganja

Tablete tipa hidrofilnih matriksa

Ispitivanje brzine rastvaranja nifedipina iz hidrofilnih matriks tableta ukazalo je na značajne razlike u profilima oslobađanja u zavisnosti od primenjenih eksperimentalnih uslova. Profili oslobađanja nifedipina iz komercijalno dostupnih matriks tableta sa produženim oslobađanjem (uzorci M1 i M2) prikazani su na slikama 22 i 23. Može se uočiti relativno brzo oslobađanje i postizanje maksimalnih količina rastvorenog nifedipina već nakon 2 sata ispitivanja. Međutim, u zavisnosti od vrste medijuma, maksimalne količine rastvorenog nifedipina razlikovale su se i do 4 puta. U vodenim medijumima (voda, 0.1 M HCl, fosfatni pufer pH 6.8, 0.5 % HPMC) rastvoreno je manje od 30 % nifedipina, nezavisno od pH vrednosti i viskoziteta medijuma. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa eksperimentalno dobijenim, kao i literaturnim podacima o rastvorljivosti nifedipina u vodi koja iznosi 0.006 - 0.01 mg/ml i ne zavisi od pH vrednosti primenjenog medijuma. Ograničeno rastvaranje nifedipina u viskoznom medijumu može se objasniti

usporenim i nepotpunim rastvaranjem film omotača u prisustvu sredstva za povećanje viskoziteta.

Slični rezultati *in vitro* oslobađanja dobijeni su i u medijumima koji simuliraju gastrointestinalne uslove na gladno, gde je ukupno 20 % nifedipina rastvoreno u medijumu koji simulira želudačni sok na gladno, dok je 35 % nifedipina rastvoreno u medijumu koji simulira crevni sok na gladno. Oslobađanje nifedipina iz matriks tableta u medijumima koji simuliraju fiziološke uslove u prisustvu hrane bilo je brzo i kompletno, pri čemu su dobijeni profili bili relativno slični bez obzira na razlike u pH vrednosti, površinskom naponu i puferskom kapacitetu između FeSSGF i FeSSIF. Ovakvi rezultati mogu se dovesti u vezu sa povećanom rastvorljivošću nifedipina u medijumima koji simuliraju fiziološke uslove nakon primene obroka u odnosu na medijume koji simuliraju uslove na gladno. Pozitivan uticaj hrane na apsorpciju nifedipina iz hidrofилnih matriks tableta zabeležen je u brojnim *in vivo* studijama (Schug i sar., 2002a; Toal, 2004; Wonnemann i sar., 2008). U 1 % rastvoru natrijum-laurilsulfata rastvaranje nifedipina je bilo veoma brzo i iznosilo 73 % nakon 30 minuta, što je u skladu sa značajnim porastom rastvorljivosti nifedipina u prisustvu surfaktanta. Brzo i kompletno oslobađanje nifedipina (85 % za 30 minuta) uočeno je i u 40 % rastvoru etanola. Dobijeni rezultati ukazuju da prisustvo površinski aktivnih materija i etanola u medijumu značajno utiče na brzinu rastvaranja nifedipina iz hidrofилnih matriks tableta, što se može objasniti poznatim efektom prirodnih i sintetskih surfaktanata, kao i etanola, na rastvorljivost nifedipina i povećanu propustljivost omotača tablete. Ovakvi rezultati upućuju na mogući „*dose dumping*“ efekat pri istovremenoj primeni matriks tableta sa hranom ili alkoholom.

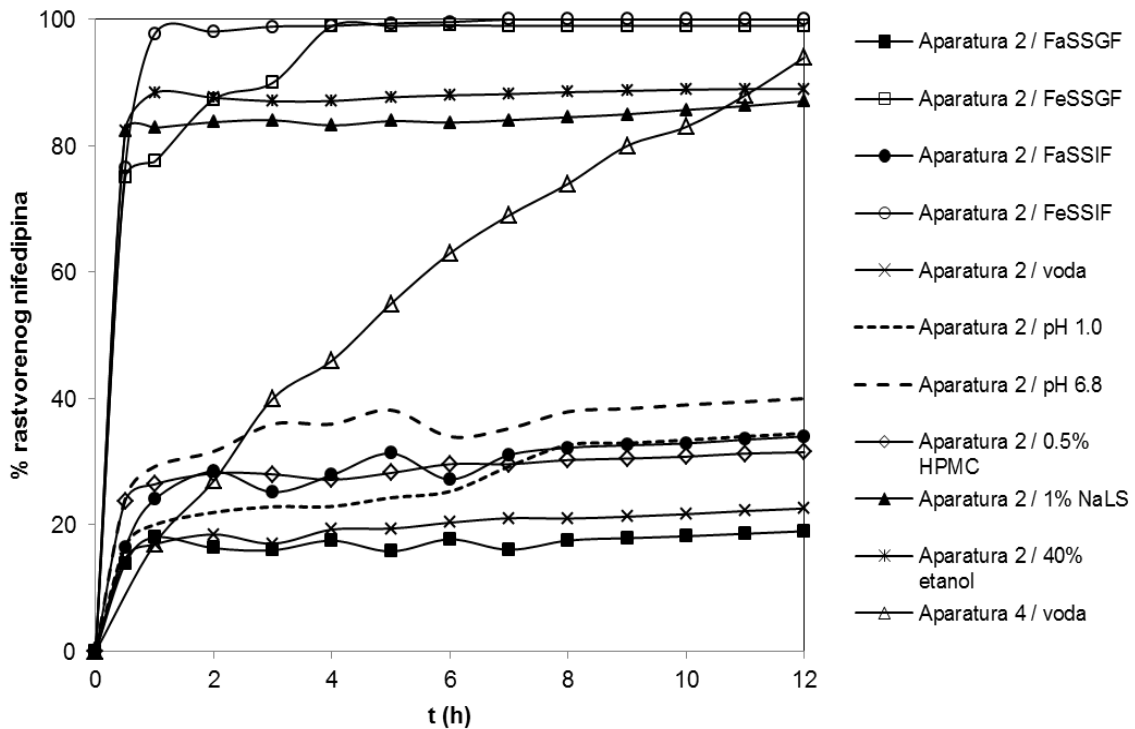


Slika 22. Profili oslobađanja nifedipina iz hidrofilnih matriks tableta (preparat M1) u različitim medijumima i aparaturama

Oslobađanje nifedipina iz hidrofilnih matriks tableta u aparaturi sa lopaticom u vodi, vodenim medijumima različitih pH vrednosti, fiziološki zasnovanim medijumima koji simuliraju uslove na gladno i viskoznom medijumu je nepotpuno i dostiže 20 – 30 % nakon 2 sata ispitivanja. Sa druge strane, u fiziološki zasnovanim medijumima koji simuliraju uslove nakon obroka, rastvoru surfaktanta i alkoholnom medijumu, nakon 2 sata rastvara se 80 – 100 % nifedipina. U aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem veoma brzo je započeta erozija matriksa, tako da su se tablete dezintegrisale nakon 15 do 20 minuta od početka ispitivanja (rezultati nisu prikazani). U aparaturi sa protočnom ćelijom uz primenu vode kao medijuma ispitivane matriks tablete pokazale su svojstva produženog oslobađanja, pri čemu je nakon 12 sati rastvorena celokupna količina nifedipina.

In vitro ispitivanje brzine rastvaranja nifedipina iz drugog komercijalno dostupnog preparata tipa hidrofilnih matriks tableta (M2) dalo je slične rezultate u primenjenim

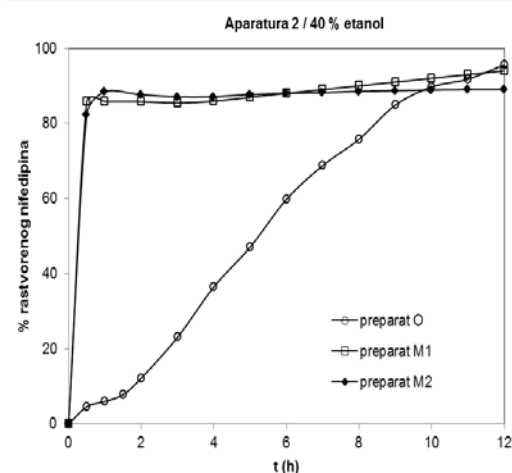
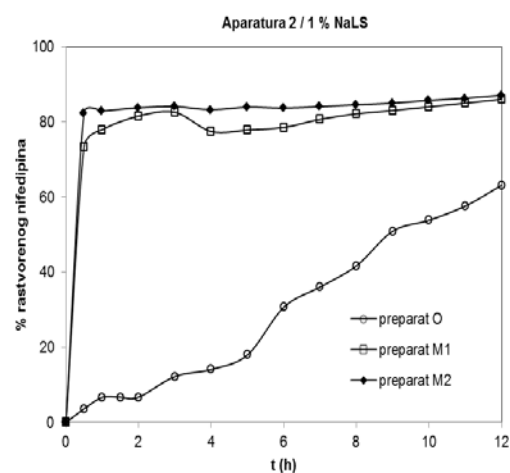
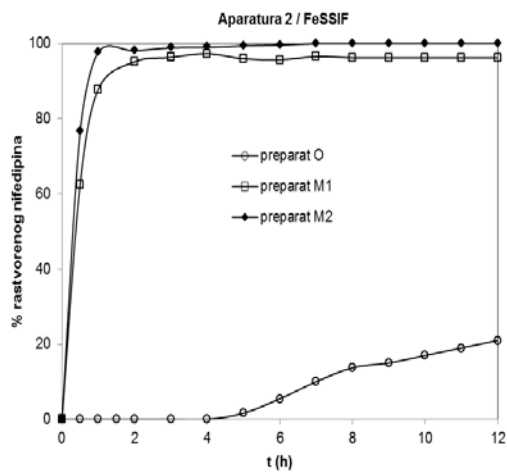
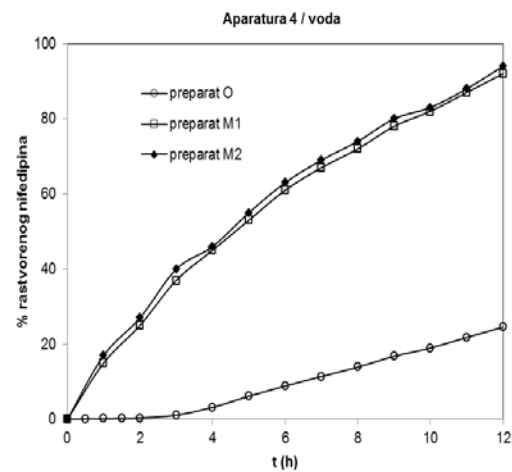
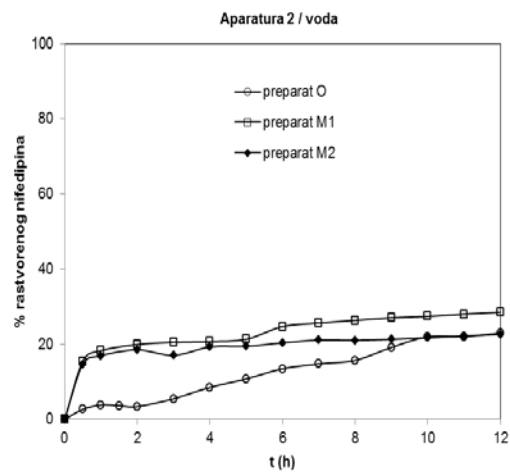
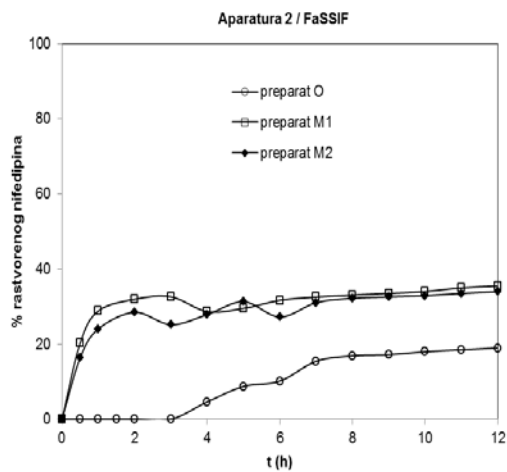
uslovima. Nepotpuno oslobađanje (20 – 40 % nakon 12 sati) uočeno je u vodenim medijumima (voda, 0.1 M HCl, fosfatni pufer pH 6.8, 0.5 % HPMC) i fiziološki zasnovanim medijumima na gladno, dok je relativno brzo i kompletno oslobađanje (oko 80 % za 2 sata) zabeleženo u prisustvu surfaktanta, etanola, kao i u medijumima koji simuliraju GI sokove nakon primene obroka.



Slika 23. Profili oslobađanja nifedipina iz hidrofилnih matriks tableta (preparat M2) u različitim medijumima i aparaturama

Iako pripadaju grupi preparata sa produženim oslobađanjem, komercijalno dostupne tablete tipa hidrofилnih matriksa pokazale su slabo izražene karakteristike modifikovanog oslobađanja nifedipina u primenjenim uslovima ispitivanja.

Na slici 24 uporedno su prikazani izabrani profili oslobađanja nifedipina iz ispitivanih tableta osmotskog tipa i hidrofилnih matriksa. Može se uočiti da *in vitro* brzina rastvaranja nifedipina zavisi od tipa i sastava farmaceutskog preparata, vrste medijuma i primenjenih hidrodinamičkih uslova.



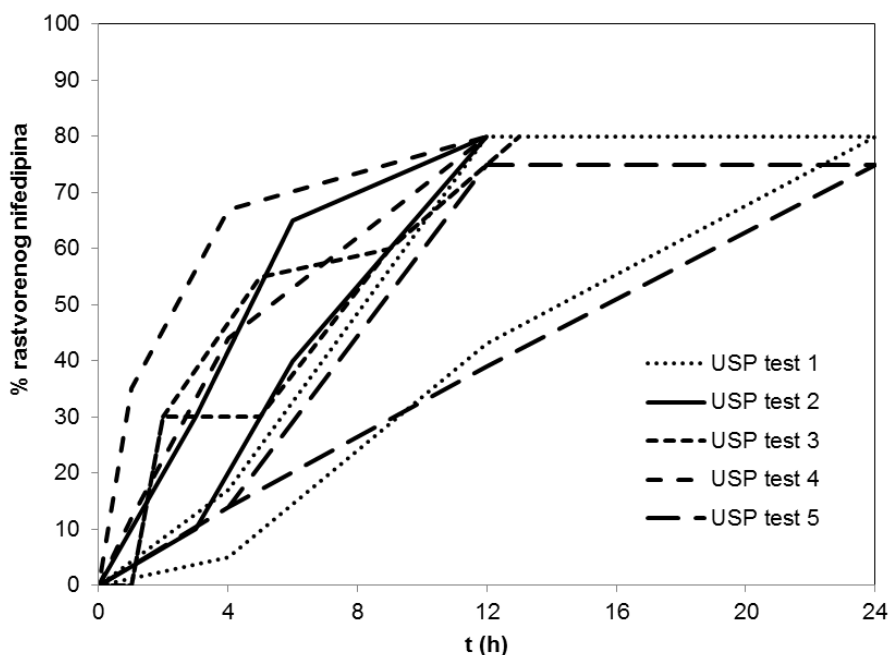
Slika 24. Uporedni profili oslobađanja nifedipina iz tableta osmotskog tipa i hidrofилnih matriks tableta

Iako postoji opšti konsenzus da *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata treba da ukaže na njeno oslobađanje u organizmu, postojeći farmakopejski propisi često nisu usklađeni sa ovakvim očekivanjima. Tako, na primer, Američka farmakopeja navodi pet različitih testova za ispitivanje brzine rastvaranja nifedipina iz tableta sa produženim oslobađanjem. Pregled odgovarajućih eksperimentalnih uslova prikazan je u tabeli 9.

Tabela 9. Pregled USP uslova za ispitivanje brzine rastvaranja nifedipina iz tableta sa produženim oslobađanjem

Broj testa	Aparatura	Vrsta i zapremina medijuma	Zahtevi	
Test 1	Aparatura 7, 15-30 ciklusa/min	Voda, 50 ml	4 h	5 – 17 %
			8 h	-
			12 h	43 – 80 %
			16 h	-
			20 h	-
			24 h	najmanje 80 %
Test 2	Aparatura 2, 50 rpm	1 % rastvor NaLS u fosfatnom puferu pH 6.8, 900 ml	3 h	10 – 30 %
			6 h	40 – 65 %
			12 h	najmanje 80 %
Test 3	Aparatura 2, 100 rpm	Faza 1: 0.05 M fosfatni pufer pH 7.5, 900 ml	Tablete 30 mg	Tablete 60 mg
			1 h	25 min
	Aparatura 2, 100 rpm	Faza 2: 0.5 % rastvor NaLS u veštačkom želudačnom soku bez enzima pH 1.2, 900 ml	Tablete 30 mg	Tablete 60 mg
			1 h najviše 30 %	najviše 30 %
			4 h 30 – 55 %	40 – 70 %
			8 h najmanje 60 %	najmanje 70 %
			12 h najmanje 80 %	najmanje 80 %
Test 4	Aparatura 2, 100 rpm	0.5 % rastvor NaLS u veštačkom želudačnom soku bez enzima pH 1.2, 900 ml	Tablete 30 mg	Tablete 60 mg
			1 h 12 – 35 %	10 – 30 %
			4 h 44 – 67 %	40 – 63 %
			12 h najmanje 80 %	najmanje 80 %
Test 5	Aparatura 7, 30 uranjanja/min	Voda, 50 ml	4 h	najviše 14 %
			12 h	39 – 75 %
			24 h	najmanje 75 %

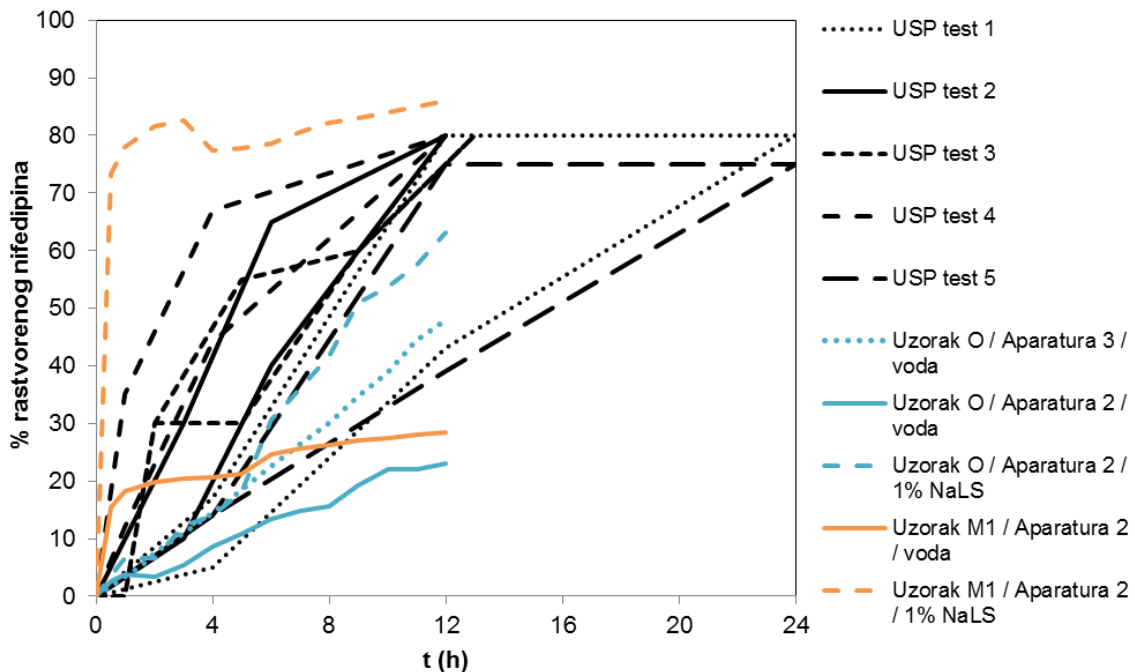
Uzimajući u obzir broj testova za ispitivanje brzine rastvaranja nifedipina koji podrazumevaju različite aparature, sastave medijuma i intenzitete mešanja, kao i odgovarajuće specifikacije u USP monografiji za tablete sa produženim oslobađanjem nifedipina (prikazane u tabeli 9), nameće se značaj definisanja fiziološke zasnovanosti, odnosno biorelevantnosti propisanih metoda i identifikacije seta eksperimentalnih uslova kojima će biti moguće predviđanje ponašanja leka u organizmu. Raspon specifikacijskih granica za testove 1 do 5 prikazan je na slici 25. S obzirom da su interakcije nifedipina i hrane uočene *in vivo* pretežno specifične za formulaciju, odnosno fizičko-hemijske prirode više nego fiziološki zasnovane, pažljivo definisanje eksperimentalnih uslova za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja je od presudnog značaja za identifikaciju uticaja hrane na biološku raspoloživost nifedipina iz ispitivanih farmaceutskih oblika.



Slika 25. Grafički prikaz raspona specifikacijskih granica za ispitivanje brzine rastvaranja nifedipina iz tableta sa produženim oslobađanjem

U cilju sagledavanja dobijenih rezultata *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja nifedipina iz tableta osmotskog tipa i hidrofилnih matriks tableta u kontekstu farmakopejskih

zahteva, izabrani profili oslobađanja za preparate O i M1 prikazani su uporedo sa zahtevima USP (slika 26). Izabrani su profili oslobađanja u vodi kao reprezentativni za sporo i nepotpuno rastvaranje i profili oslobađanja u rastvoru surfaktanta kao predstavnici bržeg i potpunijeg rastvaranja nifedipina. Profil oslobađanja nifedipina iz ispitivanih hidrofilnih matriks tableta u 1 % rastvoru natrijum-laurilsulfata je brži u odnosu na specifikacijske granice postavljene u okviru testova definisanih u USP. Interesantno je da profil oslobađanja nifedipina iz tableta osmotskog tipa u 1 % rastvoru NaLS odgovara gornjoj specifikacijskoj granici definisanoj za testove 1 i 5, iako se radi o rezultatima dobijenim u aparaturi sa lopaticom (u okviru USP testova 1 i 5 radi se o aparaturi tipa cilindra, odnosno nosača sa povratnim kretanjem). Eksperimentalno dobijeni rezultati u aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem u skladu su sa farmakopejskim specifikacijskim granicama navedenim za testove 1 i 5, iako je korišćena drugačija zapremina medijuma, uz brzinu kretanja cilindra od 10 urotanjanja/min.



Slika 26. Uporedni prikaz farmakopejskih zahteva za ispitivanje brzine rastvaranja nifedipina iz tableta sa produženim oslobađanjem i izabranih profila oslobađanja nifedipina iz ispitivanih preparata O i M1

In vitro ispitivanje je pokazalo da izbor aparature, kao i medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja, značajno utiče na oslobađanje nifedipina iz preparata sa modifikovanim oslobađanjem, uključujući relativno robusne formulacije, kao što su osmotski kontrolisane tablete. Usled toga, ispitivanje brzine rastvaranja nifedipina iz preparata pod različitim eksperimentalnim uslovima trebalo bi da obezbedi da se dobijeni rezultati upotrebe za uspostavljanje biorelevantne specifikacije *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance, specifične za ispitivanu formulaciju.

***In vitro* stepen efekta hrane**

In vitro stepen efekta hrane (I_{vitro}) za ispitivane preparate nifedipina izračunat je za kombinacije medijuma primenjenih tokom *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja: FeSSGF/FaSSGF, FeSSIF/FaSSIF, 1 % NaLS/voda, 0.5 % HPMC/voda i 40 % etanol/voda. Odgovarajuće vrednosti ovog parametra prikazane su u tabeli 10.

Tabela 10. *In vitro* stepen efekta hrane za ispitivane preparate nifedipina

Medijum	FeSSGF / FaSSGF	FeSSIF / FaSSIF	1% NaLS / voda	0.5% HPMC / voda	40% etanol / voda
I_{vitro} (preparat O)	0.66	0.78	2.39	1.99	4.28
I_{vitro} (preparat M1)	4.71	2.98	3.41	1.08	3.73

U slučaju tableta tipa osmotske pumpe vrednost I_{vitro} od 0.78 izračunata za kombinaciju medijuma FeSSIF/FaSSIF, najbolje odslikava *in vivo* situaciju, gde su, na osnovu farmakokinetičkih parametara uočenih u okviru ispitivanja uticaja hrane izračunate vrednosti I_{vivo} od 0.92 i 1.03 (tabela 5). Vrednost I_{vivo} izračunata na osnovu *in vivo* profila rastvaranja nifedipina iz osmotskih tableta dobijenih primenom numeričke dekonvolucije iznosila je 0.87 i 1.07 (tabela 6).

U slučaju tableta tipa hidrofilnog matriksa može se pretpostaviti da uticaj hrane najbolje odslikava vrednost I_{vitro} od 2.98 izračunata za kombinaciju medijuma FeSSIF/FaSSIF, odnosno 3.41 za kombinaciju medijuma 1 % NaLS/voda, s obzirom na sličnost tipa i sastava ovog preparata sa tabletama sa produženim oslobađanjem nifedipina opisanim u

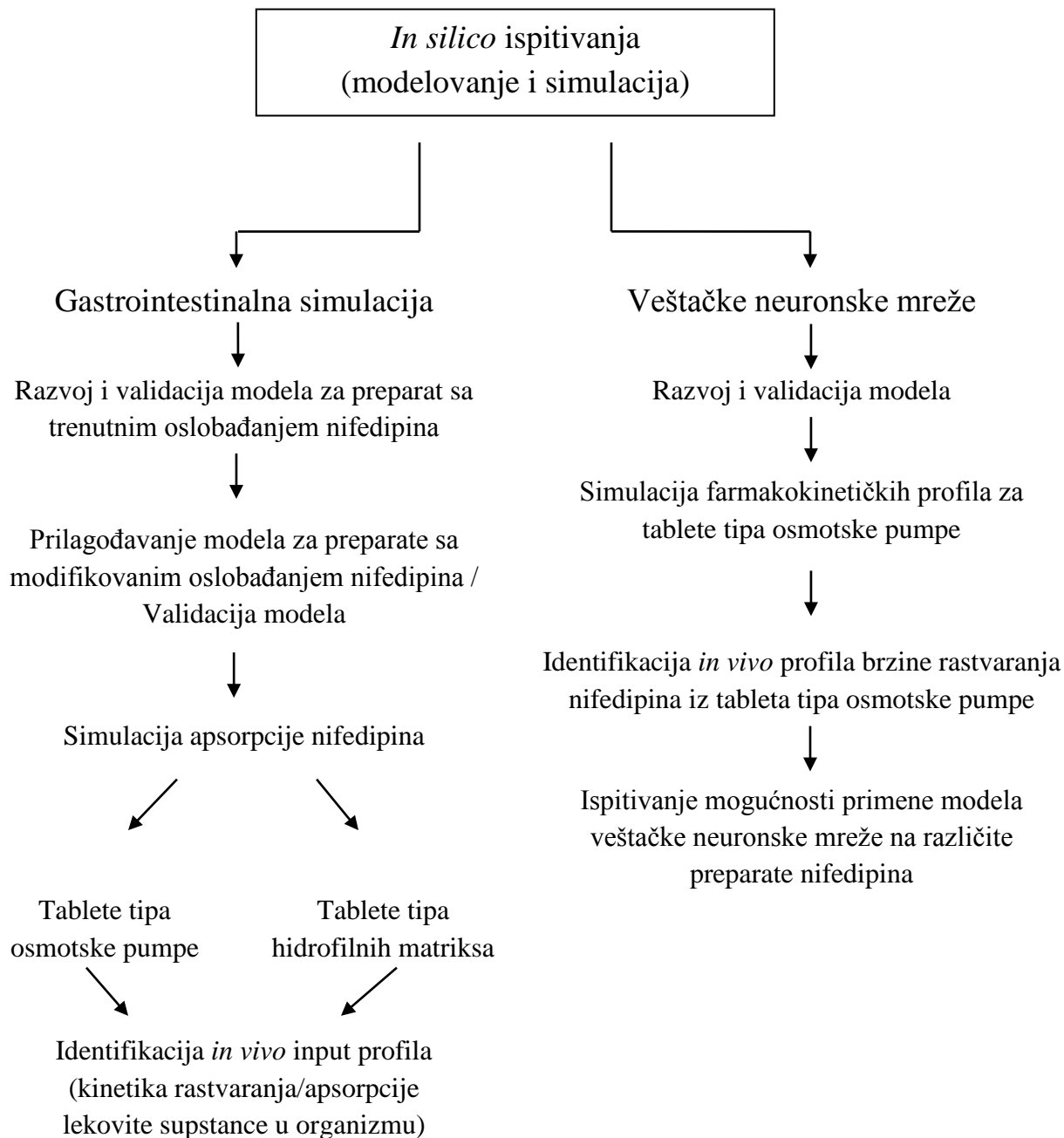
objavljenim *in vivo* studijama (tabela 5). Vrednosti I_{vivo} izračunate na osnovu publikovanih rezultata *in vivo* ispitivanja matriks tableta sa produženim oslobađanjem nifedipina iznosile su od 1.18 do 1.43 (tabela 5). Vrednosti *in vivo* stepena efekta hrane izračunate na osnovu profila rastvaranja nifedipina *in vivo* dobijenih numeričkom dekonvolucijom iznosile su od 1.40 do 1.73 (tabela 6).

Primena fiziološki zasnovanih medijuma koji simuliraju primenu leka na gladno, odnosno nakon obroka, pokazala je odsustvo uticaja u slučaju tableta tipa osmotske pumpe, dok je u slučaju tableta tipa hidrofilnog matriksa u medijumu koji simulira uslove nakon obroka došlo do relativno brzog oslobađanja celokupne količine lekovite supstance, za razliku od medijuma koji simulira uslove na gladno, gde je rastvaranje nifedipina bilo nepotpuno. Iako su profili brzine rastvaranja nifedipina u fiziološki zasnovanim medijumima koji simuliraju primenu leka na gladno, okarakterisani oslobađanjem ograničene količine nifedipina (manje od 30 % deklarisanе količine), što nije u skladu sa *in vivo* situacijom, ovi medijumi su pokazali izvesnu diskriminativnu sposobnost procene uticaja hrane.

7.3. *IN SILICO* ISPITIVANJA

Metodologija matematičkog modelovanja i simulacije postaje sve važnija tokom istraživanja i razvoja lekovitih preparata, kao i pri razmatranju uticaja različitih izmena na kvalitet, efikasnost i bezbednost registrovanog leka. Fiziološki zasnovani farmakokinetički modeli pružaju mogućnost predviđanja stepena apsorpcije, kinetike procesa apsorpcije, kao i faktora koji utiču na ovaj proces, zahvaljujući mogućnosti integracije velikog broja ulaznih parametara (Jiang i sar., 2011; Rowland i sar., 2011; Zhao i sar., 2011). Sve veće interesovanje za *in silico* modele opravdava mogućnost njihove primene u svrhu proučavanja interakcija lekova i hrane. Literaturni izvori vezani za modele simulacije uticaja hrane na proces apsorpcije oralno primenjenih lekova svedoče o značaju i aktuelnosti ove teme (Jones i sar., 2006; Jamei i sar., 2009; Juenemann i sar., 2011; Patel i sar., 2014; Shono i sar., 2010; Wagner i sar., 2012). Poslednjih godina modeli simulacije na nivou apsorpcije i ispitivanje uticaja hrane zaokupljaju sve veću pažnju naučnoistraživačkih grupa, kao i farmaceutske industrije. U okviru ovog poglavlja biće opisan razvoj i validacija *in silico* modela za simulaciju apsorpcije nifedipina iz različitih farmaceutskih oblika, sa ciljem ispitivanja mogućnosti njihove primene za predviđanje interakcija preparata nifedipina i hrane.

U ovom istraživanju primenjen je mehanistički, fiziološki zasnovan farmakokinetički model gastrointestinalne simulacije i model veštačke neuronske mreže u svrhu simulacije apsorpcije nifedipina i proučavanja potencijalnog uticaja hrane. Dijagram toka koji opisuje postupak *in silico* ispitivanja primenom modela gastrointestinalne simulacije i veštačkih neuronskih mreža šematski je prikazan na slici 27.



Slika 27. Šematski prikaz postupka *in silico* ispitivanja

7.3.1. GASTROINTESTINALNA SIMULACIJA

7.3.1.1. Razvoj i validacija modela

Simulacija apsorpcije nifedipina iz GI trakta sprovedena je upotrebom komercijalno dostupnog programa GastroPlusTM (verzija 8.0) u modulu pojedinačne simulacije (*Single Simulation Mode*) sa neoptimizovanim vrednostima *Absorption Scale Factor (ASF)*, u fiziološkim modulima koji odgovaraju uslovima na gladno, kao i nakon primene uz obrok. Profil koncentracije nifedipina u plazmi je simuliran na osnovu fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih parametara, prikazanih u tabeli 11 i na osnovu odgovarajućih fizioloških parametara, u uslovima na gladno i nakon primene obroka, koji su prikazani u tabeli 12. Eksperimentalno dobijeni profili oslobađanja nifedipina iz tableta sa modifikovanim oslobađanjem u različitim medijumima i aparaturnama korišćeni su kao ulazni farmaceutsko-tehnološki parametri za simulaciju apsorpcije. U cilju poređenja *in vivo* i *in silico* profila koncentracije nifedipina u plazmi, korišćeni su srednji profili koncentracije nifedipina u plazmi iz studija Rashid i sar., 1995, Piovella, 1987, Schug i sar., 2002a.

Literaturni podaci o rastvorljivosti nifedipina u vodi kreću se od 0.01 mg/ml (Abrahamsson i sar., 1998) do 0.02 mg/ml (Hecq i sar., 2005). U simulacijama u ovom istraživanju je korišćena niža vrednost kako bi se kritički procenio uticaj rastvorljivosti na apsorpciju nifedipina. Vrednost efektivne permeabilnosti nifedipina je procenjena pomoću programa GastroPlusTM na osnovu *in vitro* vrednosti prividne permeabilnosti dobijene u studiji na Caco-2 ćelijama (Hu i sar., 1999). Procenjena vrednost humane permeabilnosti u jejunumu (1.565×10^{-4} cm/s) pomoću modela gastrointestinalne simulacije je dodatno optimizovana na osnovu *in vivo* profila koncentracija nifedipina u plazmi nakon primene tableta sa modifikovanim oslobađanjem tipa osmotske pumpe (FDA, 1998). Na slici 28 ilustrovan je uticaj vrednosti efektivne permeabilnosti na gastrointestinalnu simulaciju apsorpcije nifedipina. Konačna optimizovana vrednost 3×10^{-4} cm/s je u skladu sa visokom permeabilnošću nifedipina duž GI trakta, objavljenoj u studiji regionalne apsorpcije (Bode i sar., 1996).

Tabela 11. Prikaz ulaznih parametara korišćenih za razvoj modela gastrointestinalne simulacije

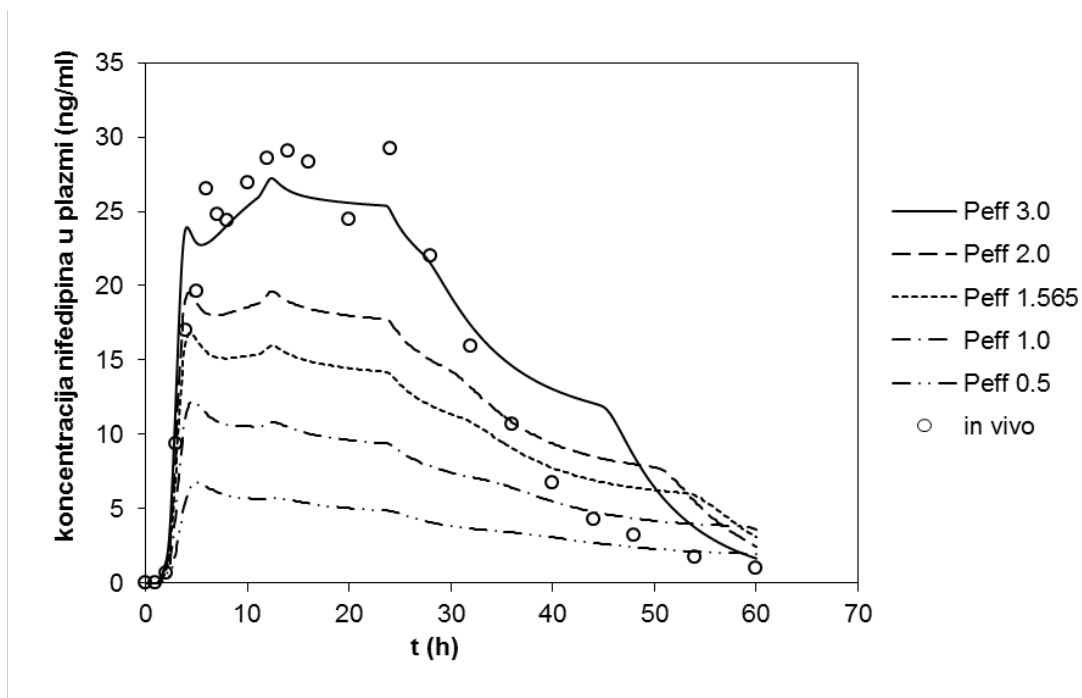
Parametar (jedinice mere)	Vrednost	
Molekulska masa	346.34	
Rastvorljivost pri pH 7 (mg/mL)	0.01 ^a	
Log P	2.4	
Efektivna permeabilnost, P_{eff} (cm/s)	3×10^{-4}	^b
Doza (mg)	60	(10)
Zapremina tečnosti uzeta sa lekom (mL)	250	
Srednje vreme precipitacije (s)	900 ^c	
Gustina čestica lekovite supstance (g/mL)	1.2 ^c	
Efektivni radijus čestica (μm)	25 ^c	
Koeficijent difuzije (cm^2/s)	0.711×10^{-5}	
Presistemski metabolizam (%)	45 ^d	
Slobodna frakcija leka u plazmi, f_u (%)	5 ^d	
Klirens, CL (l/h)	25 ^e	(32)
Volumen distribucije, V_c (l/kg)	0.17	(0.1)
Poluvreme eliminacije, $t_{1/2}$ (h)	5.26	(2.98)
Telesna masa ispitanika (kg)	70	
Vreme simulacije (h)	48	

Vrednosti navedene u zagradi se odnose na razvoj modela za preparat sa trenutnim oslobađanjem

^apodatak iz literature (Abrahamsson i sar., 1998); ^boptimizovana vrednost pomoću programa GastroPlusTM na osnovu permeabilnosti na Caco ćelijama (Hu i sar., 1999); ^cGastroPlusTM vrednost; ^dpodatak iz literature (SmPC, Adalat LA tablete, Bayer Limited); ^eoptimizovana vrednost na osnovu literaturnih podataka (Kirsten i sar., 1998)

Tabela 12. Fiziološki parametri u simulacijama apsorpcije

Prostor	ASF	pH na gladno / nakon obroka	Vreme tranzita (h) na gladno / nakon obroka
Želudac	0	1.30 / 4.90	0.25 / 1.00
Duodenum	1.304	6.00 / 5.40	0.26
Jejunum 1	1.376	6.20 / 5.40	0.93
Jejunum 2	1.545	6.40 / 6.00	0.74
Ileum 1	1.760	6.60	0.58
Ileum 2	2.035	6.90	0.42
Ileum 3	2.420	7.40	0.29
Cekum	0.504	6.40	4.19
Ascedentni kolon	0.708	6.80	12.57

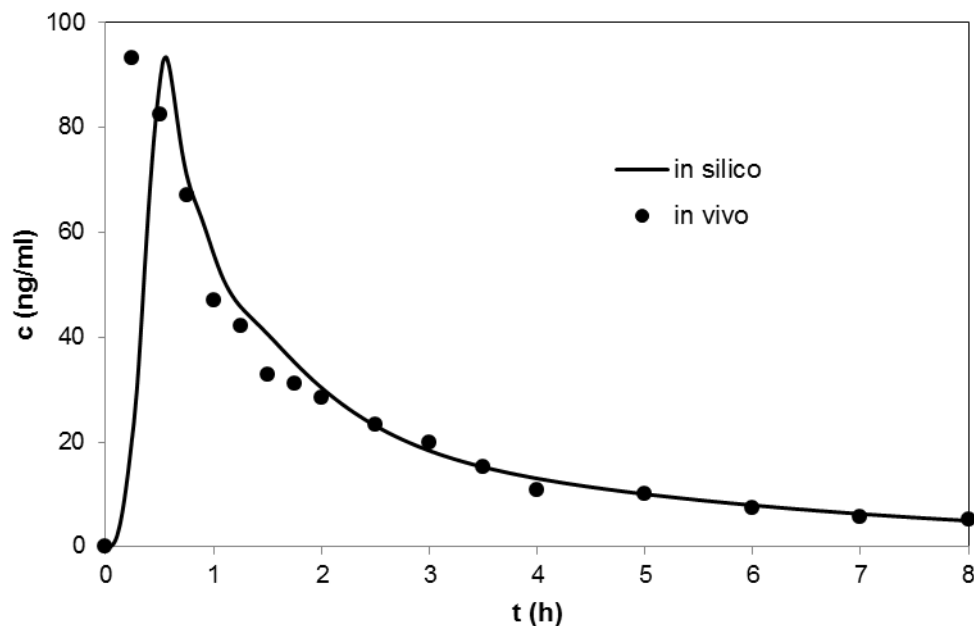


Slika 28. Optimizacija efektivne permeabilnosti nifedipina primenom gastrointestinalne simulacije: uticaj vrednosti efektivne permeabilnosti na simulaciju apsorpcije nifedipina

Koeficijent difuzije je procenjen pomoću programa gastrointestinalne simulacije na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika nifedipina. Podaci o stepenu presistemskog metabolizma i frakciji slobodnog leka u plazmi preuzeti su iz Sažetka karakteristika leka Adalat LA, tablete (dostupnim na internet stranici <http://www.medicines.ie>). Vrednost klirensa nifedipina je optimizovana na osnovu podataka iz studije Kirsten i saradnika (1998), dok je volumen distribucije izračunat tako da poluvreme eliminacije bude u skladu sa objavljenim podacima (Ochs i sar., 1984; Schug i sar., 2002a,b).

Preparati sa trenutnim oslobađanjem nifedipina

Gastrointestinalna simulacija apsorpcije nifedipina započeta je razvojem i validacijom modela gastrointestinalne simulacije za kapsule sa trenutnim oslobađanjem nifedipina (10 mg). Kao ulazni parametri za simulaciju korišćeni su podaci prikazani u tabeli 11. Simulirani profil koncentracije nifedipina u plazmi nakon primene na gladno bio je u skladu sa *in vivo* profilom objavljenim u literaturi (Rashid i sar., 1995), što je predstavljeno na slici 29.



Slika 29. Simulirani profil koncentracije nifedipina nakon primene kapsule sa trenutnim oslobađanjem u odnosu na *in vivo* podatke

Na osnovu izračunatih vrednosti greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara (C_{max} , t_{max} , PIK_{0-inf} i PIK_{0-t}), kao i vrednosti statističkih parametara (koeficijenta korelacije R^2 , sume kvadrata greške SSE, korena srednje vrednosti kvadrata greške RMSE, srednje vrednosti apsolutne greške MAE), prikazanih u tabeli 13, model gastrointestinalne simulacije za preparat sa trenutnim oslobađanjem nifedipina je smatran validiranim.

Tabela 13. Vrednosti in vivo uočenih i in silico predviđenih farmakokinetičkih parametara, odgovarajućih greški predviđanja (% PE), kao i statistički parametri simulacije za kapsule sa trenutnim oslobađanjem nifedipina

Farmakokinetički parametar	stvarna vrednost (in vivo)	predviđena vrednost (in silico)	greška predviđanja (% PE)
C_{max} (ng/ml)	93.18	93.46	0.30
t_{max} (h)	0.25	0.56	124.00
PIK_{0-inf} (ngh/ml)	221.41	187.43	15.35
PIK_{0-t} (ngh/ml)	172.87	165.81	4.08
Statistički parametri simulacije apsorpcije			
R^2	0.629		
SSE	5.333×10^3		
RMSE	1.826		
MAE	7.068		

Preparati sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina

U sledećoj fazi istraživanja model je prilagođen za simulaciju apsorpcije nifedipina iz preparata tipa osmotske pumpe, korišćenjem ulaznih parametara navedenih u tabeli 10, kao i profila brzine rastvaranja dobijenih za ovaj preparat, uz zadržavanje prethodno definisanih fizioloških parametara u uslovima na gladno.

Validacija razvijenog modela gastrointestinalne simulacije sprovedena je poređenjem *in vivo* profila srednjih koncentracija nifedipina nakon primene sistema tipa osmotske pumpe (Schug i sar., 2002a) i profila predviđenog modelom gastrointestinalne simulacije.

Na osnovu dobijenih vrednosti greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara (C_{max} , t_{max} , PIK_{0-inf} i PIK_{0-t}), manjih od 10 %, kao i vrednosti statističkih parametara (R^2 , SSE, RMSE, MAE), prikazanih u tabeli 14, model gastrointestinalne simulacije je smatran validiranim i kao takav korišćen za dalja ispitivanja.

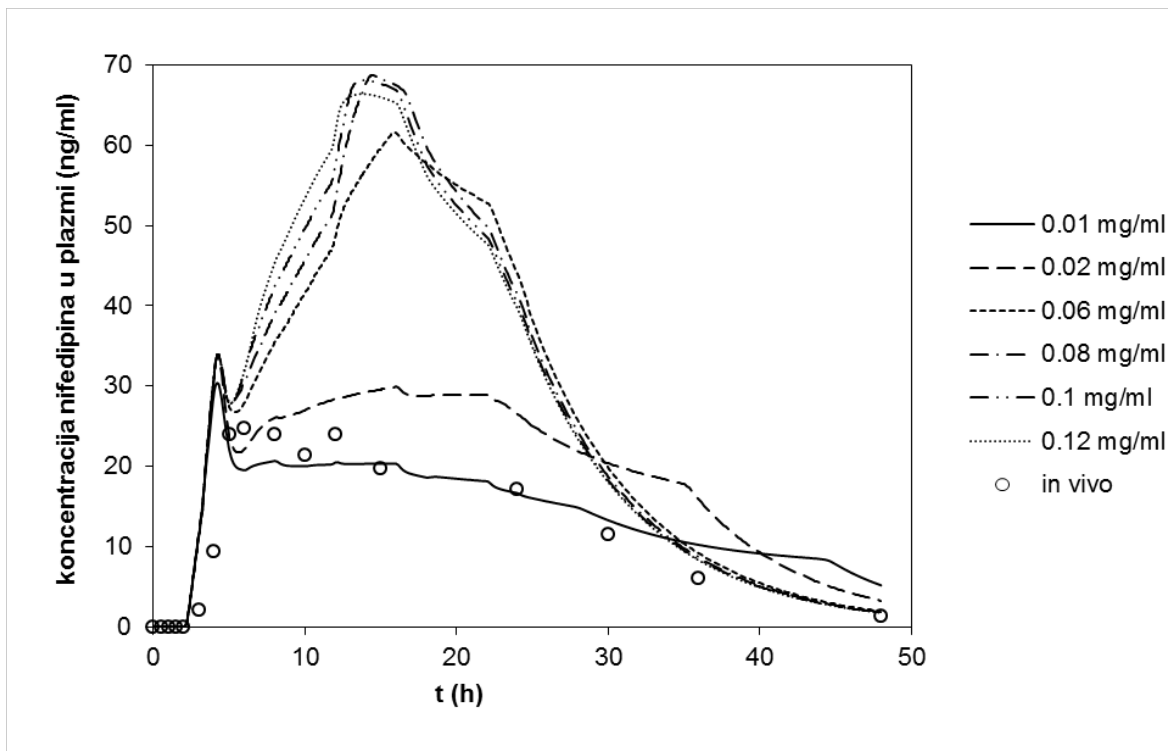
Tabela 14. Vrednosti in vivo uočenih i in silico predviđenih farmakokinetičkih parametara, odgovarajućih greški predviđanja (% PE), kao i statistički parametri simulacije za tablete tipa osmotske pumpe u uslovima na gladno

Farmakokinetički parametar	stvarna vrednost (in vivo)	predviđena vrednost (in silico)	greška predviđanja (% PE)
C_{max} (ng/ml)	19.66	20.75	5.55
t_{max} (h)	5.0	3.62	27.60
PIK_{0-inf} (ngh/ml)	598.33	585.87	2.08
PIK_{0-t} (ngh/ml)	589.74	560.66	4.93
Statistički parametri simulacije apsorpcije			
R^2	0.656		
SSE	2.400×10^2		
RMSE	4.296		
MAE	3.257		

Tokom razvoja modela gastrointestinalne simulacije za preparat tipa osmotske pumpe nakon primene uz obrok primenjeni su sledeći pristupi:

- promena seta fizioloških parametara u odnosu na model simulacije na gladno (u skladu sa podacima u tabeli 12);
- promena ulaznog *in vitro* profila oslobađanja u odnosu na model simulacije na gladno;
- promena seta fizioloških parametara i ulaznog *in vitro* profila oslobađanja;
- variranje rastvorljivosti nifedipina u opsegu 0.01 – 0.12 mg/ml u modelu sa fiziološkim parametrima koji odgovaraju primeni leka nakon obroka;
- promena vremena prolaska leka kroz različite delove gastrointestinalnog trakta u modelu sa fiziološkim parametrima koji odgovaraju primeni leka nakon obroka.

Promena ulaznog *in vitro* profila oslobađanja u odnosu na model simulacije na gladno, variranje rastvorljivosti nifedipina, kao i promena vremena prolaska leka kroz različite delove gastrointestinalnog trakta, nije dalo zadovoljavajuće simulirane profile koncentracije u poređenju sa stvarnim *in vivo* profilom (Schug i sar., 2002a). Uticaj variranja rastvorljivosti nifedipina na simulaciju apsorpcije u uslovima koji odgovaraju primeni leka nakon obroka, predstavljen na slici 30, ukazuje da povećanje rastvorljivosti preko vrednosti 0.01 mg/ml dovodi do povećane apsorpcije koja nije u skladu sa *in vivo* situacijom.



Slika 30. Uticaj rastvorljivosti nifedipina na gastrointestinalnu simulaciju apsorpcije u uslovima koji odgovaraju primeni leka nakon obroka

Najveća sličnost stvarnog *in vivo* profila i *in silico* predviđenog profila u prisustvu hrane dobijena je izborom modela pojedinačne simulacije (*GastroPlus Single Simulation Mode*) sa neoptimizovanim, programski zadatim vrednostima Apsorpcionih faktora proporcionalnosti (*Absorption Scale Factor, ASF*) i setom fizioloških parametara koji odgovaraju primeni leka nakon obroka (*Human-Physiological-Fed mode*). Validacija

modela je sprovedena izračunavanjem greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara (C_{\max} , t_{\max} , $PIK_{0-\text{inf}}$ i PIK_{0-t}), kao i na osnovu vrednosti statističkih parametara simulacije apsorpcije (R^2 , SSE, RMSE i MAE). Parametri validacije modela simulacije apsorpcije nakon primene leka uz obrok prikazani su u tabeli 15.

Tabela 15. Vrednosti in vivo uočenih i in silico predviđenih farmakokinetičkih parametara, odgovarajućih greški predviđanja (% PE), kao i statistički parametri simulacije za tablete tipa osmotske pumpe nakon primene uz obrok

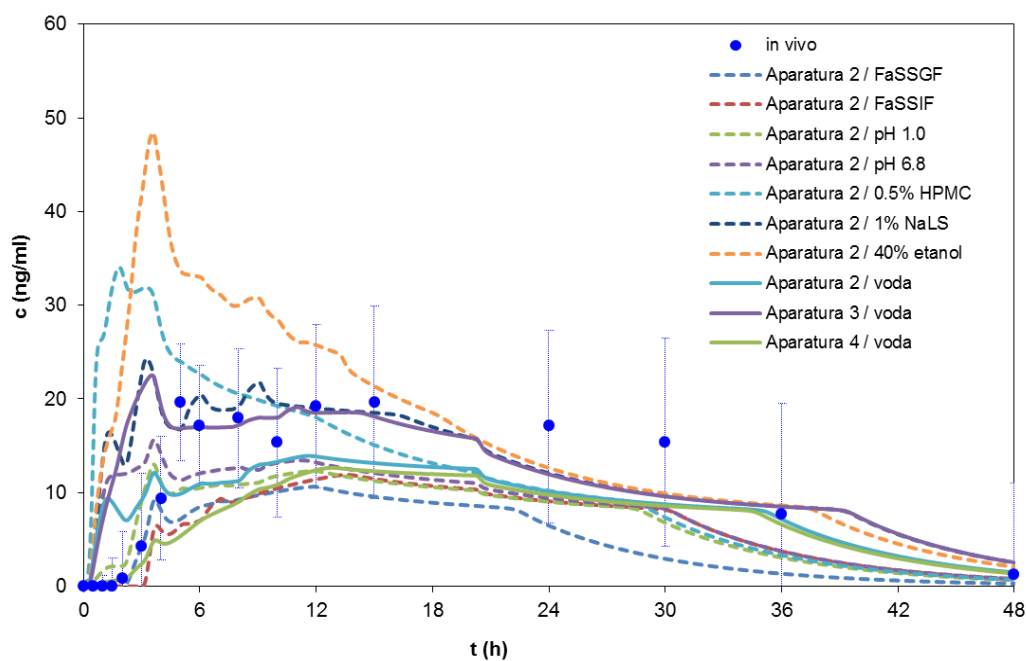
Farmakokinetički parametar	stvarna vrednost (in vivo)	predviđena vrednost (in silico)	greška predviđanja (% PE)
C_{\max} (ng/ml)	24.79	25.08	1.21
t_{\max} (h)	6.0	4.26	29.00
$PIK_{0-\text{inf}}$ (ngh/ml)	609.99	632.27	3.65
PIK_{0-t} (ngh/ml)	600.00	604.18	0.69
Statistički parametri simulacije apsorpcije			
R^2	0.469		
SSE	4.480×10^2		
RMSE	6.110		
MAE	4.849		

7.3.1.2. Gastrointestinalna simulacija apsorpcije nifedipina

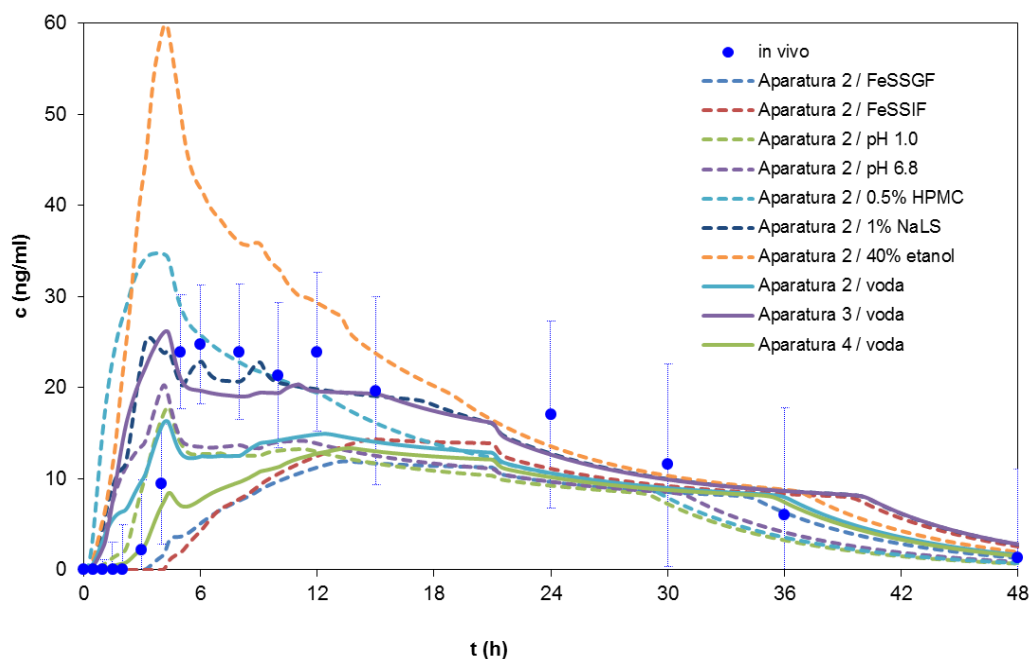
Mogućnost primene razvijenog i validiranog modela gastrointestinalne simulacije za simulaciju profila koncentracija nifedipina u plazmi ispitana je na primeru tableta osmotskog tipa i hidrofilnih matriks tableta, u uslovima primene na gladno, kao i primene nakon obroka.

Tablete tipa osmotske pumpe

Simulirani profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni primenom validiranog modela gastrointestinalne simulacije na osnovu eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja pod različitim uslovima prikazani su na slikama 31 i 32.



Slika 31. Profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni primenom gastrointestinalne simulacije u uslovima na gladno za tablete tipa osmotske pumpe (preparat O)



Slika 32. Profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni primenom gastrointestinalne simulacije za tablete tipa osmotske pumpe (preparat O) nakon primene obroka

Simulirani profili predstavljani na slikama 31 i 32 ukazuju da na rezultate gastrointestinalne simulacije značajno utiče ulazni *in vitro* profil brzine rastvaranja nifedipina iz tableta. Na osnovu prikazanih profila može se uočiti da se preciznija predviđanja metodologijom gastrointestinalne simulacije dobijaju korišćenjem *in vitro* profila oslobađanja nifedipina u kojima je više od 45 % lekovite supstance rastvoreno nakon 12 sati. Uzimajući u obzir presistemske metabolizam nifedipina koji iznosi oko 45 %, ovaj *in silico* model zahteva odgovarajući *in vitro* profil sa većim stepenom rastvaranja nifedipina, kao ulazni profil za simulaciju. Usled toga, profili sa nepotpunim oslobađanjem nifedipina u fiziološki zasnovanim medijumima, vodi i puferima uslovljeni su simulaciju apsorpcije u manjem obimu u odnosu na farmakokinetičke profile uočene *in vivo*, u studiji nakon primene leka na gladno i uz obrok (Schug i sar., 2002a).

Vrednosti primarnih farmakokinetičkih parametara (C_{max} i PIK_{0-inf}) profila dobijenih gastrointestinalnom simulacijom, kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 16. Na osnovu prikazanih rezultata najveća sličnost simuliranog i stvarnog profila koncentracije nifedipina u plazmi, u oba ispitivana fiziološka stanja, je dobijena kada se kao ulazni profil koristio eksperimentalno određen profil oslobađanja u vodi u aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem. Odlična predviđanja obima apsorpcije su dobijena i korišćenjem profila oslobađanja u rastvoru surfaktanta u aparaturi sa lopaticom, kao ulaznog profila za gastrointestinalnu simulaciju. Profil koncentracija u plazmi simuliran na osnovu profila oslobađanja u aparaturi sa protočnom ćelijom odslikava odloženu pojavu nifedipina u krvi, nakon 3 sata, što je u skladu sa *in vivo* situacijom (Schug i sar., 2002a).

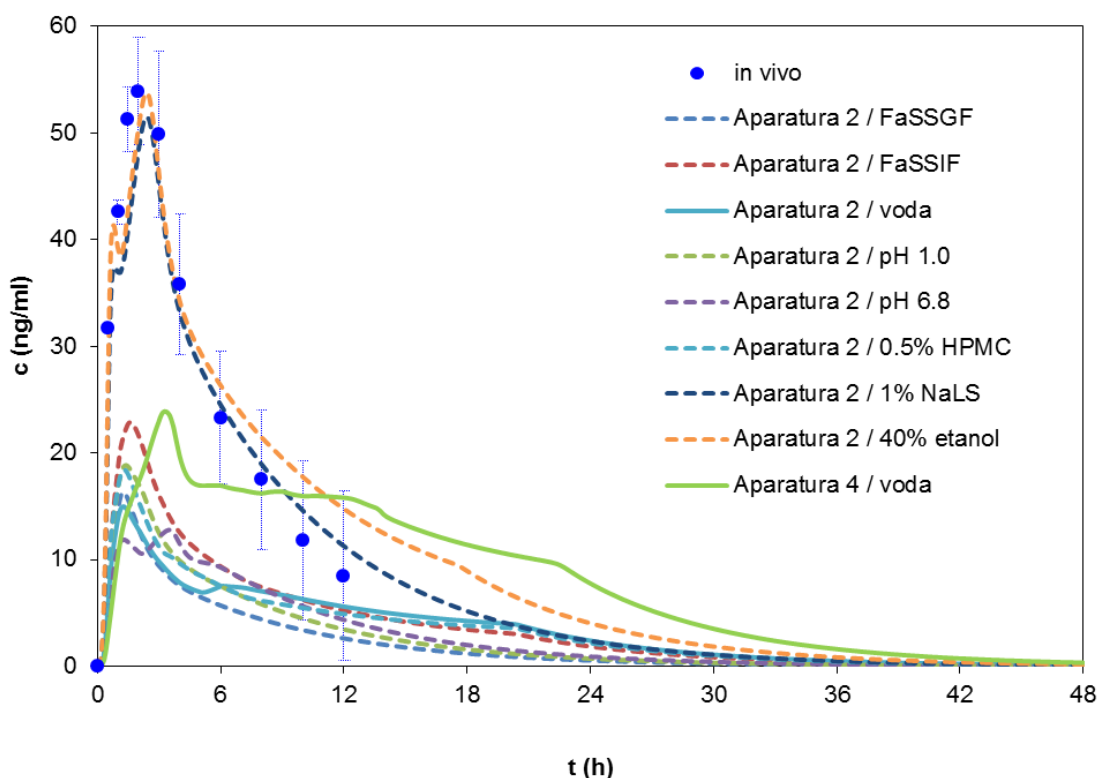
Visoke vrednosti greške predviđanja maksimalnih koncentracija u plazmi su posledica pojave dvostrukih pikova u profilima koncentracija nifedipina u plazmi, koji se mogu objasniti izraženim inter i intraindividualnim fiziološkim razlikama i presistemskim metabolizmom. Ovakvi rezultati nisu od velikog značaja s obzirom na ograničen značaj vrednosti farmakokinetičkog parametra C_{max} za procenu apsorpcije u slučaju farmaceutskih oblika sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance.

Tabela 16. Primarni farmakokinetički parametri predviđeni gastrointestinalnom simulacijom i odgovarajuće greške predviđanja

Input profil	U uslovima primene na gladno				U uslovima primene nakon obroka			
	PIK _{0-inf} (ngh/ml)	% PE	C _{max} (ng/ml)	% PE	PIK _{0-inf} (ngh/ml)	% PE	C _{max} (ng/ml)	% PE
<i>in vivo</i>	598.33		19.66		609.99		24.79	
Aparatura 2 FaSSGF/FeSSGF	239.12	60.03	10.63	45.93	343.67	43,66	11.92	51.92
Aparatura 2 FaSSIF/FeSSIF	318.00	46.85	11.92	39.37	420.94	30.99	14.34	42.15
Aparatura 2 / pH 1.0	336.99	43.68	13.01	33.82	363.77	40.36	17.92	27.71
Aparatura 2 / pH 6.8	394.79	34.02	15.65	20.39	415.30	31,92	20.26	18.27
Aparatura 2 / 0.5 % HPMC	548.61	8.31	34.06	73.24	573.99	5.90	34.78	40.29
Aparatura 2 / 1 % NaLS	617.35	3.18	24.31	23.65	647.13	6.09	25.53	2.98
Aparatura 2 / 40 % etanol	768.24	28.39	48.47	146.54	852.19	39,70	59.82	141.31
Aparatura 2 / voda	435.16	27.27	13.93	29.14	463.75	23.97	16.35	34.04
Aparatura 3 / voda	595.31	0.50	22.54	14.65	634.54	4.02	26.22	5.77
Aparatura 4 / voda	370.20	38.13	12.66	35.60	393.79	35.44	13.36	46.11

Tablete tipa hidrofilnih matriksa

Da bi se ispitala mogućnost primene razvijenog modela gastrointestinalne simulacije za proučavanje apsorpcije nifedipina iz različitih preparata, uspostavljeni model je u daljem toku istraživanja primenjen na rezultate dobijene ispitivanjem hidrofilnih matriks tableta. Na slici 33 prikazani su predviđeni profili koncentracija nifedipina u plazmi simulirani na osnovu eksperimentalnih profila oslobađanja dobijenih ispitivanjem hidrofilnih matriks tableta (M1). Rezultati gastrointestinalne simulacije u modulu koji odgovara primeni leka na gladno predstavljani su u odnosu na rezultate *in vivo* studije (Piovella, 1987).

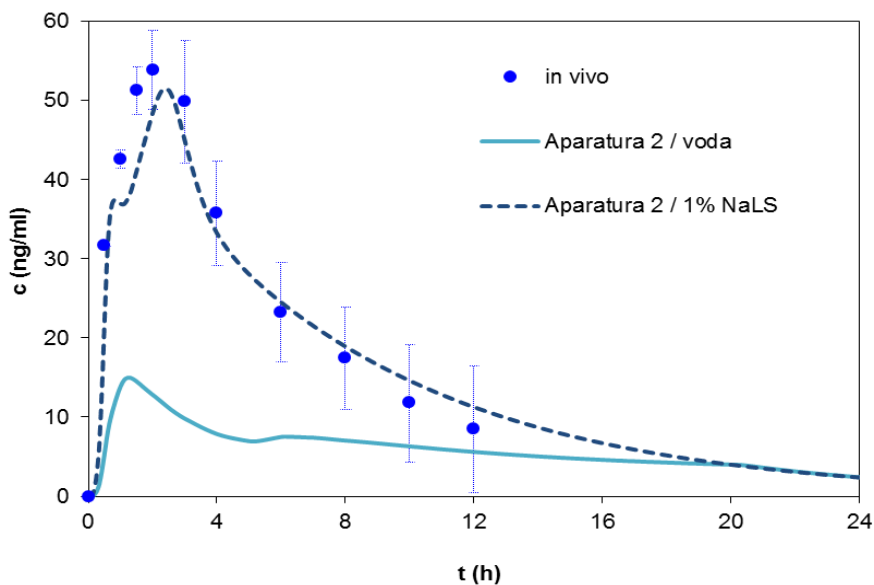


Slika 33. Profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni primenom gastrointestinalne simulacije u uslovima na gladno za tablete tipa hidrofilnog matriksa (preparat M1)

S obzirom da je u slučaju preparata sa modifikovanim oslobađanjem brzina rastvaranja lekovite supstance iz preparata u *in vitro* i *in vivo* uslovima ograničavajući faktor za apsorpciju lekovite supstance, rezultati gastrointestinalne simulacije predstavljeni na slici 33 potvrđuju značaj izbora profila oslobađanja kao ulaznog profila za simulaciju

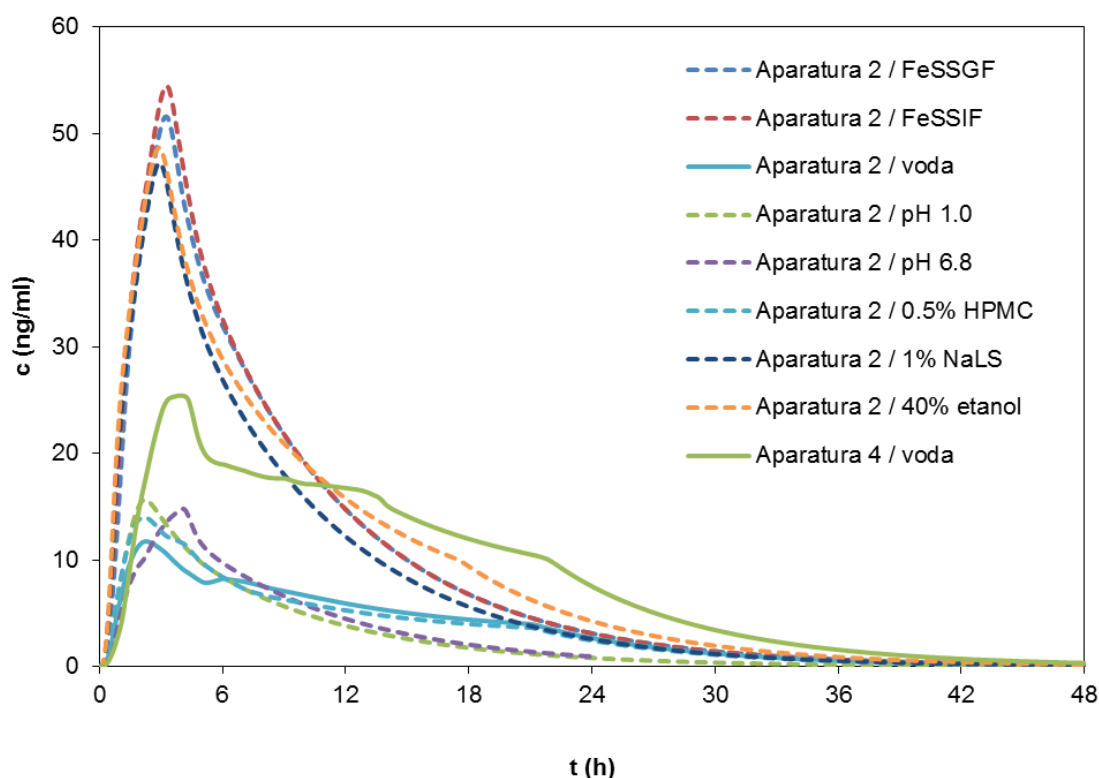
apsorpcije. Imajući u vidu raznolikost formulacija preparata nifedipina sa modifikovanim oslobađanjem i izražen uticaj formulacije na proces oslobađanja lekovite supstance, posebno pri istovremenoj primeni sa hranom, ističe se značaj eksperimentalnog određivanja biorelevantnog *in vitro* profila oslobađanja za svaku formulaciju nifedipina u svrhu *in silico* modelovanja apsorpcije.

Radi jasnijeg sagledavanja uticaja *in vitro* profila rastvaranja lekovite supstance iz preparata kao ulaznog profila za simulaciju apsorpcije, na slici 34 su izdvojeni profili predviđeni na osnovu oslobađanja nifedipina u vodi (30 % rastvoreno nakon 12 sati) i oslobađanja u rastvoru surfaktanta (85 % rastvoreno nakon 12 sati). Dobra saglasnost *in silico* predviđenih profila i *in vivo* uočenih vrednosti koncentracija nifedipina u plazmi dobijena je gastrointestinalnom simulacijom na osnovu profila dobijenog *in vitro* u aparaturi sa lopaticom uz primenu 1 % NaLS kao medijuma. Odgovarajuće vrednosti greški predviđanja primarnih farmakokinetičkih parametara bile su 4.40 za C_{max} i 6.18 za PIK_{0-inf} . S obzirom da su ove vrednosti manje od 10 %, može se zaključiti da model gastrointestinalne simulacije, primarno razvijen za preparat tipa osmotske pumpe, ima i izvesnu sposobnost generalizacije i može se koristiti za predviđanje apsorpcije nifedipina iz hidrofилnih matriks tableta, ukoliko se kao farmaceutsko-tehnološki parametar za simulaciju upotrebi profil oslobađanja u 1 % rastvoru natrijum-laurilsulfata.



Slika 34. Profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni primenom gastrointestinalne simulacije u uslovima na gladno za tablete tipa hidrofилnog matriksa (preparat M1)

Predviđeni profili apsorpcije nifedipina iz ispitivanih hidrofilnih matriks tableta (preparat M1) dobijeni primenom modela gastrointestinalne simulacije u uslovima koji odgovaraju primeni leka uz obrok prikazani su na slici 35. Može se uočiti izražen uticaj rezultata *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja nifedipina iz tableta na simulirani farmakokinetički profil, što potvrđuje značaj uspostavljanja birelevantne specifikacije *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata kako bi se dobili pouzdani *in silico* profili apsorpcije.



Slika 35. Profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni primenom modela gastrointestinalne simulacije za tablete tipa hidrofilnog matriksa (preparat M1) nakon primene obroka

Predviđeni stepen efekta hrane

Rezultati gastrointestinalne simulacije na osnovu izabranih profila oslobađanja upotrebljeni su za izračunavanje predviđenog stepena efekta hrane, I_{silico} , kao odnosa predviđenog stepena apsorpcije (PIK) u uslovima nakon primene obroka i na gladno. Dobijeni rezultati za ispitivane preparate nifedipina su prikazani u tabeli 17. Vrednosti predviđenog stepena efekta hrane za tablete tipa osmotske pumpe su bliske vrednosti stepena efekta hrane izračunatim na osnovu *in vivo* studije (tabela 5, studija VIIa, Schug i sar., 2002a). U slučaju hidrofilnih matriks tableta, jedino fiziološki zasnovan medijum koji simulira crevne sokove predviđa izražen uticaj hrane na proces apsorpcije nifedipina, ukazujući na diskriminativni potencijal biorelevantnog medijuma za *in vitro* i *in silico* proučavanje efekta hrane na apsorpciju nifedipina iz matriks tableta.

Tabela 17. Predviđeni stepen efekta hrane zasnovan na gastrointestinalnoj simulaciji

Input profil	I_{silico} (PIK)	
	Preparat O	Preparat M1
Aparatura 2 FeSSIF/FaSSIF	1.29	2.57
Aparatura 2 / 1% NaLS	1.05	1.00
Aparatura 2 / voda	1.06	1.02
Aparatura 4 / voda	1.06	1.04

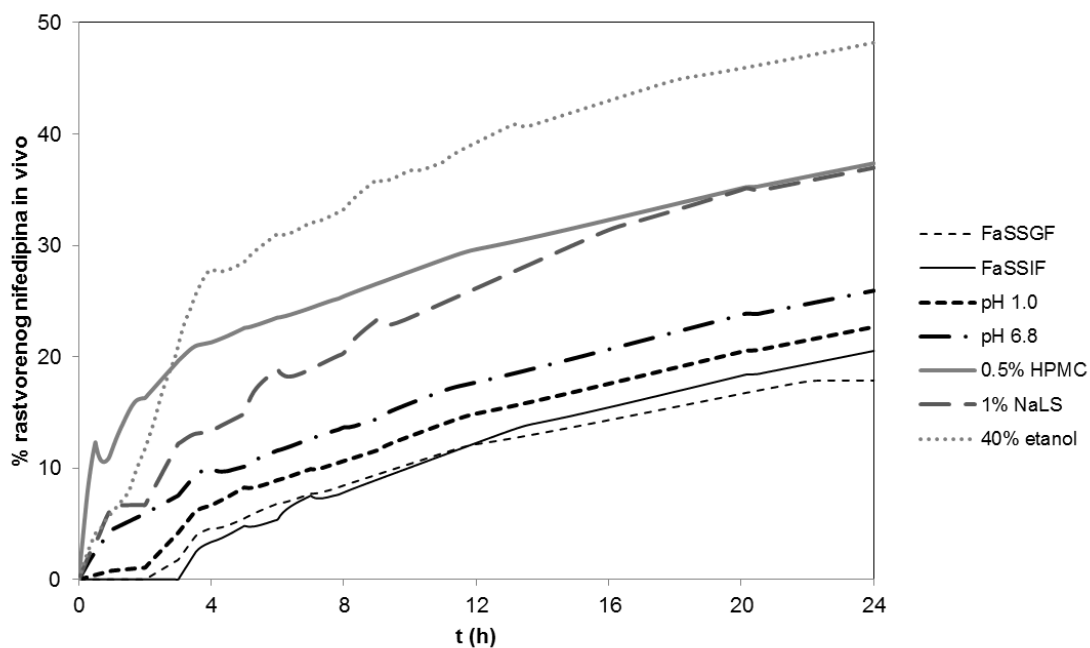
7.3.1.3. Identifikacija *in vivo* profila rastvaranja i apsorpcije primenom modela gastrointestinalne simulacije

Simulacija procesa rastvaranja i apsorpcije nifedipina iz ispitivanih preparata sprovedena je korišćenjem validiranog modela gastrointestinalne simulacije u modulima fizioloških uslova na gladno i nakon primene obroka. Cilj ovih ispitivanja je bio da se proceni mogućnost primene razvijenog *in silico* modela za identifikaciju *in vivo* inputa, kao i

kasniju uporednu analizu sa rezultatima dobijenim konvencionalnim farmakokinetičkim metodama i metodologijom veštačkih neuronskih mreža.

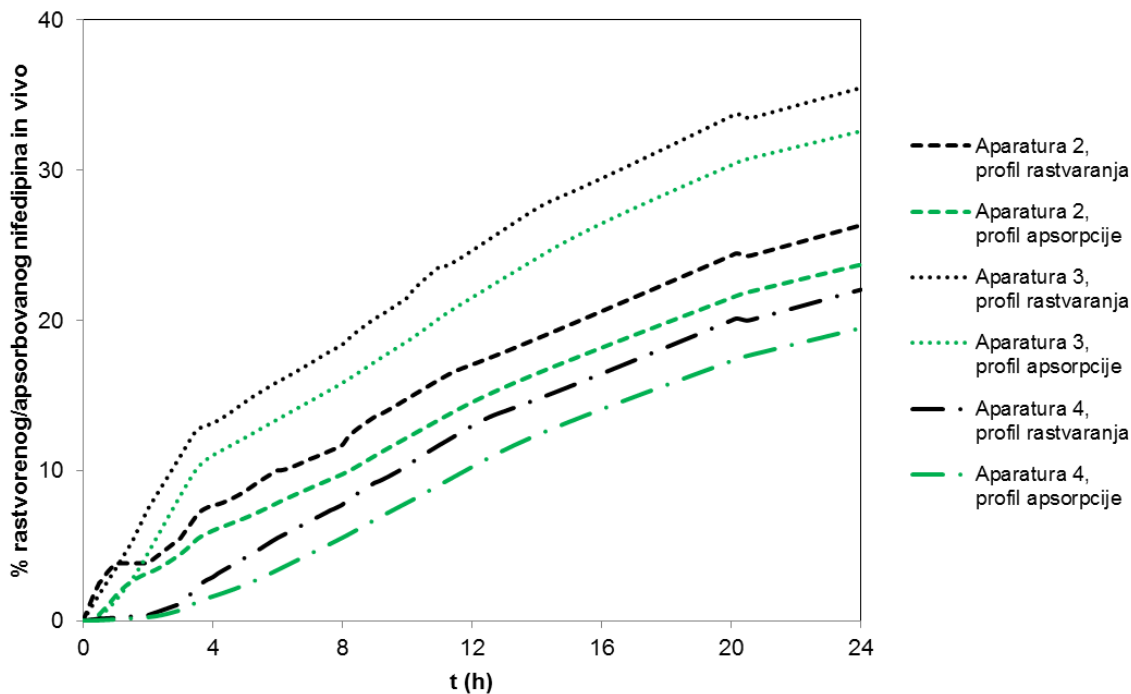
Tablete tipa osmotske pumpe

Profili rastvaranja nifedipina iz tableta tipa osmotske pumpe dobijeni gastrointestinalnom simulacijom u uslovima na gladno, na osnovu eksperimentalnih *in vitro* profila oslobađanja dobijenih ispitivanjem brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje različitih medijuma, predstavljeni su na slici 36.



Slika 36. *In vivo* profili rastvaranja nifedipina dobijeni primenom modela gastrointestinalne simulacije u uslovima na gladno za tablete tipa osmotske pumpe (preparat O)

Evidentne razlike u simuliranim profilima rastvaranja nifedipina potvrđuju dominantan uticaj *in vitro* profila oslobađanja u odnosu na ostale ulazne parametre za gastrointestinalnu simulaciju. Na slici 37 prikazani su uporedni *in silico* profili rastvaranja i apsorpcije nifedipina na osnovu *in vitro* rezultata oslobađanja u različitim aparaturnama u vodi.

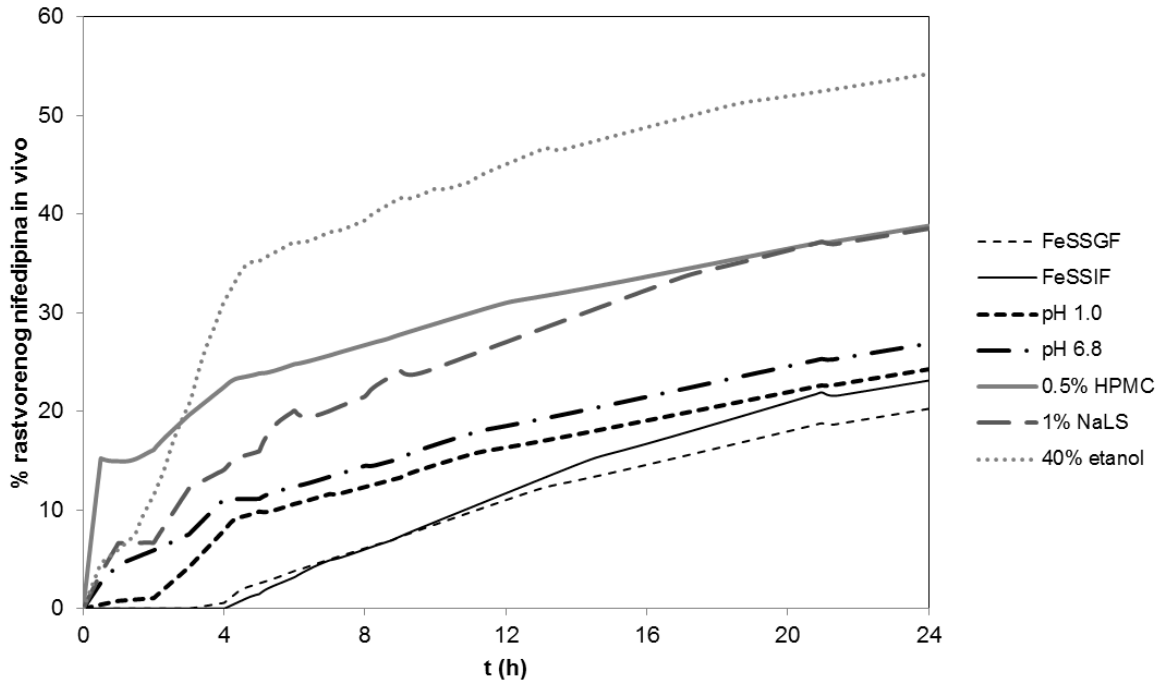


Slika 37. *In vivo* profili rastvaranja i absorpcije nifedipina dobijeni primenom modela gastrointestinalne simulacije u uslovima na gladno za tablete tipa osmotske pumpe (preparat O)

Razlike između simuliranih profila rastvaranja i absorpcije nifedipina u organizmu predstavljene na slici 37 mogu se pripisati precipitaciji nifedipina *in vivo*, koja je opisana u literaturi za doze veće od 10 mg (Wagner i sar., 2013). Isti nivo razlika između profila rastvaranja i absorpcije nifedipina (3 – 5 %) dobijen je i u simulacijama na osnovu profila oslobađanja u aparaturi sa lopaticom u različitim medijumima. Radi preglednosti rezultata, na slici 36 prikazani su samo *in silico* dobijeni profili rastvaranja nifedipina iz tableta tipa osmotske pumpe.

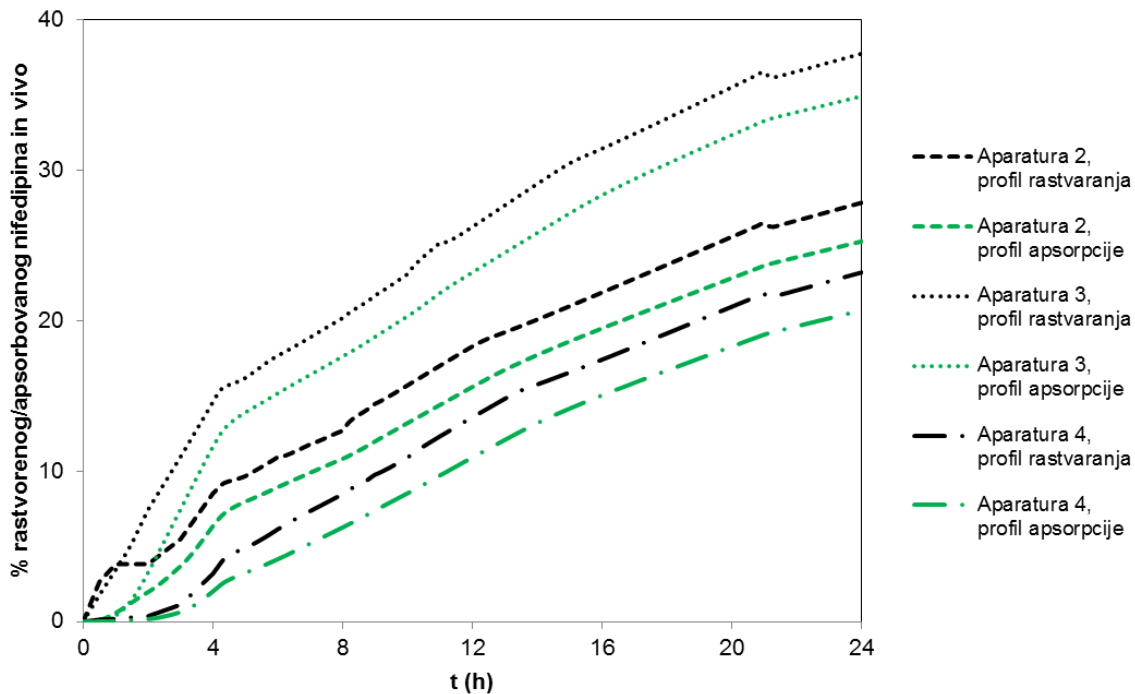
In vivo profili rastvaranja nifedipina dobijeni gastrointestinalnom simulacijom u fiziološkom modulu koji odgovara uslovima primene leka nakon obroka, korišćenjem ulaznih, eksperimentalno dobijenih profila rastvaranja nifedipina iz tableta osmotskog tipa u aparaturi sa lopaticom u različitim medijumima prikazani su na slici 38. Rezultati gastrointestinalne simulacije u uslovima nakon primene obroka na osnovu ulaznih profila

oslobađanja nifedipina u vodi u aparaturi sa lopaticicom, aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem i aparaturi sa protočnom ćelijom prikazani su na slici 39.



Slika 38. In vivo profili rastvaranja nifedipina dobijeni primenom modela gastrointestinalne simulacije za tablete tipa osmotske pumpe (preparat O) nakon primene obroka

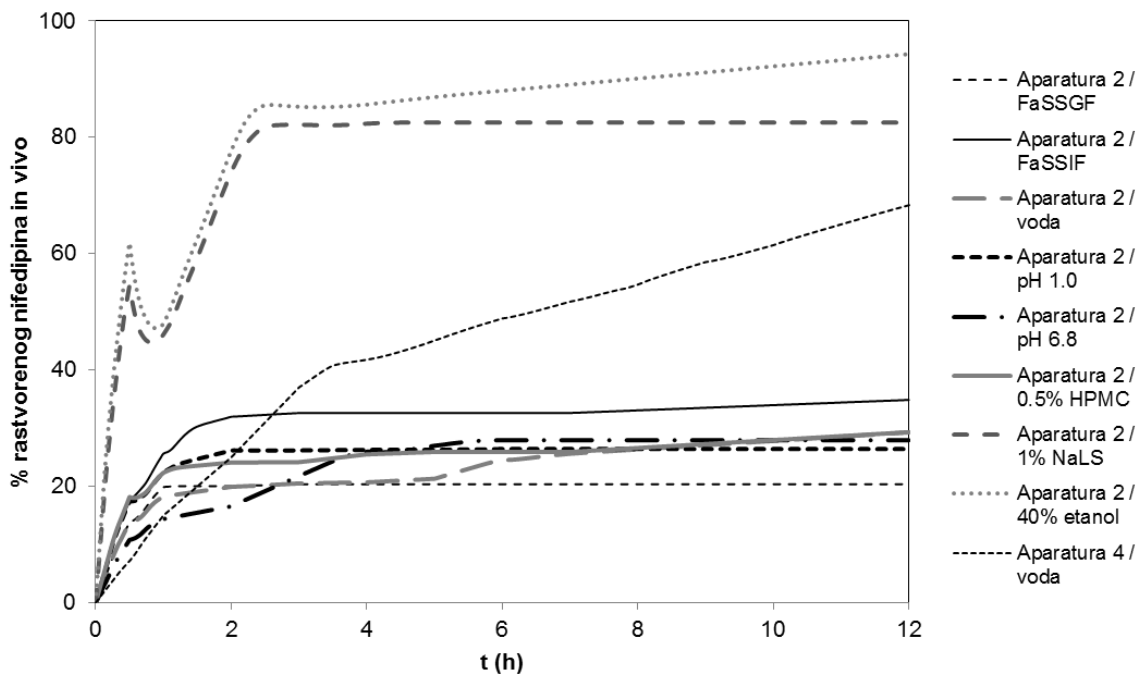
Neznatne razlike u ukupnom stepenu rastvaranja i apsorpcije predviđenim gastrointestinalnim simulacijama u uslovima koji odgovaraju primeni leka nakon obroka u odnosu na uslove na gladno, od 3 do 5 %, potvrđuju odsustvo uticaja hrane na apsorpciju, što je u skladu sa rezultatima uočenim *in vivo* (Schug i sar., 2002a).



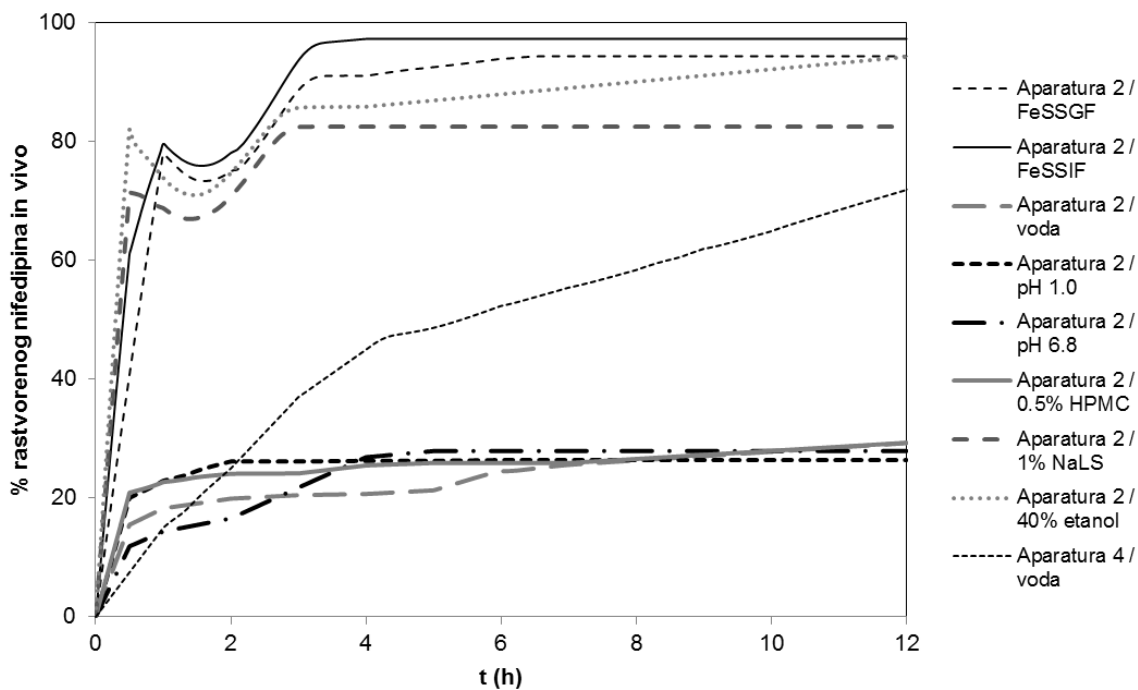
Slika 39. In vivo profili rastvaranja i apsorpcije nifedipina dobijeni primenom modela gastrointestinalne simulacije za tablete tipa osmotske pumpe (preparat O) nakon primene obroka

Tablete tipa hidrofilnih matriksa

Primenom modela gastrointestinalne simulacije u kombinaciji sa eksperimentalno određenim profilima oslobađanja nifedipina iz hidrofilnih matriks tableta u različitim medijumima, predviđeni su profili rastvaranja *in vivo* u uslovima primene leka na gladno, prikazani na slici 40, i u uslovima koji odgovaraju primeni leka nakon obroka koji su predstavljeni na slici 41.



Slika 40. In vivo profili rastvaranja nifedipina dobijeni primenom gastrointestinalne simulacije u uslovima na gladno za tablete tipa hidrofilnog matriksa (preparat M1)



Slika 41. In vivo profili rastvaranja nifedipina dobijeni primenom gastrointestinalne simulacije za tablete tipa hidrofilnog matriksa (preparat M1) nakon primene obroka

Input profili identifikovani modelom gastrointestinalne simulacije pokazuju razlike koje su u skladu sa razlikama između odgovarajućih *in vitro* profila dobijenih pri različitim eksperimentalnim uslovima (slika 22). Kombinovana gastrointestinalna simulacija sa profilima oslobađanja u fiziološki zasnovanim medijumima omogućava identifikaciju efekta hrane na proces oslobađanja i apsorpcije nifedipina iz hidrofilnih matriks tableta. Na osnovu oslobađanja nifedipina u medijumima koji simuliraju želudačni i crevni sok na gladno predviđena količina rastvorene lekovite supstance *in vivo* iznosi 20 %, odnosno 30 % nakon 2 sata. U medijumima koji simuliraju gastrointestinalne uslove u prisustvu hrane oslobađanje nifedipina je brzo i kompletno, tako da *in silico* predviđena količina rastvorene supstance iznosi više od 85 % nakon 2 sata. Potencijalni uticaj hrane na apsorpciju nifedipina iz tableta tipa hidrofilnih matriksa u skladu je sa rezultatima objavljenih *in vivo* studija (Schug i sar., 2002a; Toal, 2004; Wonnemann i sar., 2008). Rezultati *in silico* modelovanja za drugi komercijalno dostupan preparat nifedipina tipa hidrofilnih matriks tableta (preparat M2) su analogni profilima prikazanim na slikama 40 i 41.

7.3.2. VEŠTAČKE NEURONSKE MREŽE

7.3.2.1. Razvoj i validacija modela

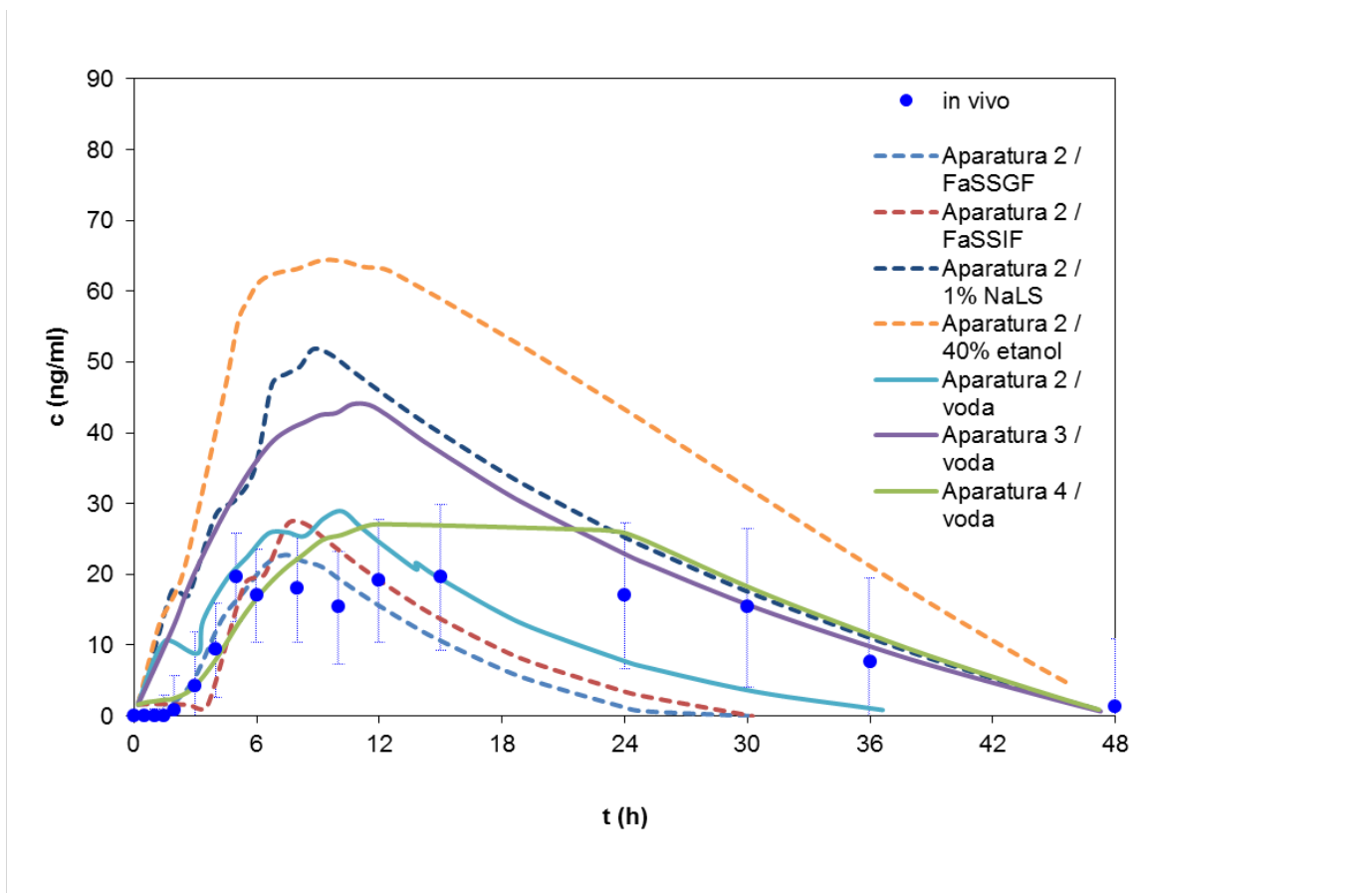
U daljem toku istraživanja ispitana je mogućnost primene metodologije veštačkih neuronskih mreža za simulaciju apsorpcije nifedipina iz preparata i proučavanje uticaja hrane na ovaj proces. Uzimajući u obzir mogućnosti primene veštačkih neuronskih mreža u istraživanju i razvoju u farmaceutskoj industriji i sve veći interes za ovu tehniku modelovanja, kao i ograničenost literaturnih izvora, izazov u razvoju ovog modela simulacije apsorpcije je bio još veći.

Model veštačke neuronske mreže za simulaciju apsorpcije nifedipina je razvijan korišćenjem individualnih *in vivo* profila koncentracija lekovite supstance u krvi nakon primene preparata tipa osmotske pumpe koje su objavili Schug i saradnici (2002a). Kao ulazne funkcije korišćeni su hipotetički *in vivo* profili brzine rastvaranja izračunati numeričkom dekonvolucijom iz individualnih profila koncentracija leka u plazmi (Schug i sar., 2002a) i profila koncentracija nifedipina u plazmi nakon primene preparata sa trenutnim oslobađanjem (Rashid i sar., 1995). Izlazne funkcije u razvoju ovog modela bili su odgovarajući profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni *in vivo*. Optimalan model simulacije apsorpcije dobijen je korišćenjem mreže višeslojni perceptron (*Multi Layered Perceptron*, MLP) pomoću komercijalno dostupnog programskog paketa *Peltarion*[®] *software* (Synapse, Švedska).

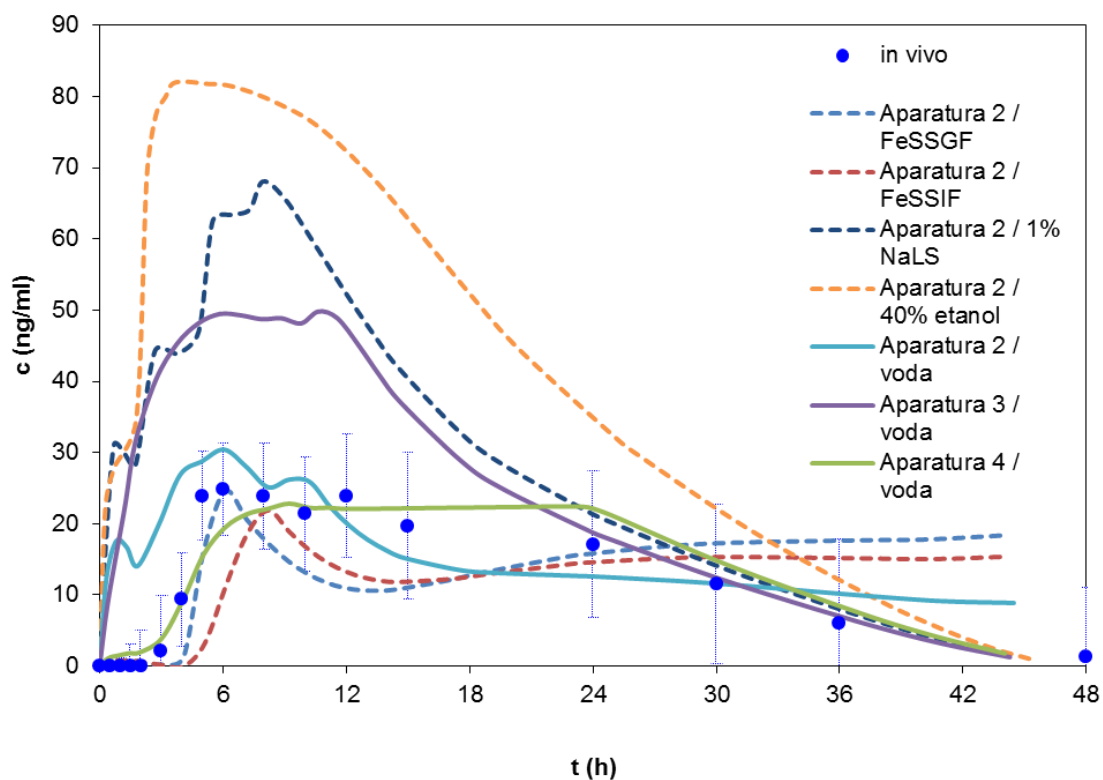
Razvijene i validirane mreže korišćene su za simulaciju apsorpcije nifedipina u uslovima koji odgovaraju primeni leka na gladno i nakon obroka na osnovu eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja nifedipina iz preparata (konvolucioni pristup), kao i za identifikaciju *in vivo* profila rastvaranja nifedipina iz preparata na osnovu literaturnih *in vivo* podataka (dekonvolucioni pristup).

7.3.2.2. Simulacija apsorpcije nifedipina primenom modela veštačke neuronske mreže

Profili koncentracija nifedipina u plazmi za tablete tipa osmotske pumpe predviđeni primenom modela izabrane MLP mreže u uslovima na gladno i nakon primene obroka prikazani su na slikama 42 i 43. Dobijeni rezultati pokazuju značajan uticaj *in vitro* profila oslobađanja primenjenih kao ulazne funkcije za simulaciju apsorpcije. Pomenuti uticaj je više izražen u slučaju metodologije veštačke neuronske mreže u odnosu na gastrointestinalnu simulaciju modelom GastroPlusTM. Opseg predviđenih vrednosti PIK modelom MLP u uslovima primene leka na gladno je iznosio 259.21 – 1733.00 ngh/ml (odnos 6.7), dok je u slučaju modela gastrointestinalne simulacije raspon bio od 239.12 – 768.24 ngh/ml (odnos 3.2) u zavisnosti od upotrebljenog profila oslobađanja primenjenog kao ulazna funkcija. U simulacijama apsorpcije u uslovima koji odgovaraju primeni leka nakon obroka vrednosti PIK predviđene MLP mrežom su bile od 573.00 – 1804.40 ngh/ml (odnos 3.2), dok je model gastrointestinalne simulacije predvideo vrednosti PIK u rasponu 343.67 – 852.19 ngh/ml (odnos 2.5), u zavisnosti od primenjenog *in vitro* inputa. Za razliku od modela gastrointestinalne simulacije gde se pouzdanija predviđanja apsorpcije dobijaju korišćenjem *in vitro* profila kod kojih je rastvoreno više od 45 % nifedipina nakon 12 sati, u slučaju MLP mreže veću sličnost sa *in vivo* vrednostima pokazuju *in silico* profili simulirani na osnovu *in vitro* profila sa manjim stepenom oslobađanja, kao što su fiziološki zasnovani medijumi. Ovakvi rezultati mogu se pripisati razlikama u samim modelima, odnosno farmakokinetičkim i fiziološkim parametrima (kao što je stepen presistemskog metabolizma, vreme prolaska leka kroz različite delove gastrointestinalnog trakta) koji su integrisani u model gastrointestinalne simulacije, dok u metodologiji veštačkih neuronskih mreža nisu uzeti u obzir prilikom modelovanja procesa apsorpcije.



Slika 42. Profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni primenom modela MLP u uslovima na gladno za tablete tipa osmotske pumpe (preparat O)



Slika 43. Profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni primenom modela MLP za tablete tipa osmotske pumpe (preparat O) u uslovima nakon primene obroka

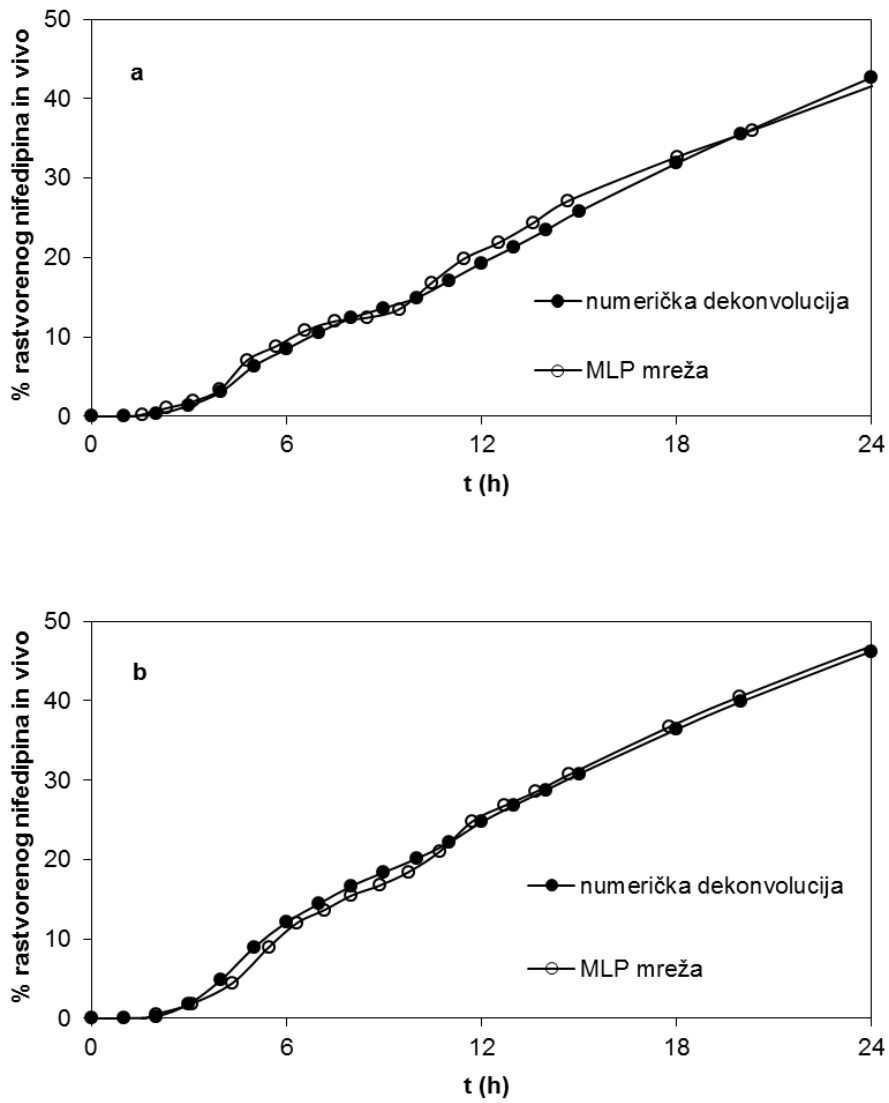
Vrednosti primarnih farmakokinetičkih parametara (C_{max} i PIK_{0-inf}) profila koncentracija nifedipina u plazmi dobijenih primenom modela veštačke neuronske mreže, kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 18. Najbolja predviđanja obima i stepena apsorpcije pomoću MLP mreže dobijena su kada je kao ulazna funkcija za simulaciju korišćen profil oslobađanja dobijen *in vitro* u aparaturi sa lopaticom u fiziološki zasnovanim medijumima i u aparaturi sa protočnom ćelijom u vodi, gde je zabeleženo sporo i nepotpuno oslobađanje nifedipina. Profil koncentracija lekovite supstance u plazmi simuliran na osnovu *in vitro* profila oslobađanja nifedipina u aparaturi sa protočnom ćelijom pokazao je početno vreme odlaganja (*lag time*) i dužinu platoa u skladu sa rezultatima uočenim *in vivo* (Schug i sar., 2002a).

Tabela 18. Primarni farmakokinetički parametri predviđeni modelom veštačke neuronske mreže i odgovarajuće greške predviđanja

Farmakokinetički parametar	U uslovima primene na gladno				U uslovima primene nakon obroka			
	PIK _{0-inf} (ngh/ml)	% PE	C _{max} (ng/ml)	% PE	PIK _{0-inf} (ngh/ml)	% PE	C _{max} (ng/ml)	% PE
<i>in vivo</i>	598.33		19.66		609.99		24.79	
Aparatura 2 FaSSGF/FeSSGF	259.21	56.67	22.76	15.77	630.23	3.32	24.56	0.93
Aparatura 2 FaSSIF/FeSSIF	307.93	48.53	27.12	37.94	573.00	6.06	21.88	11.74
Aparatura 2 / 1 % NaLS	1112.40	85.92	51.82	163.58	1234.00	102.29	68.08	174.63
Aparatura 2 / 40 % etanol	1733.00	189.64	64.34	227.26	1804.40	195.80	82.09	231.14
Aparatura 2 / voda	471.56	21.19	28.93	47.15	671.36	10.06	30.42	22.71
Aparatura 3 / voda	1005.10	67.98	44.03	123.96	1056.30	73.16	49.82	100.97
Aparatura 4 / voda	790.08	32.05	27.10	37.84	667.78	9.47	22.84	7.87

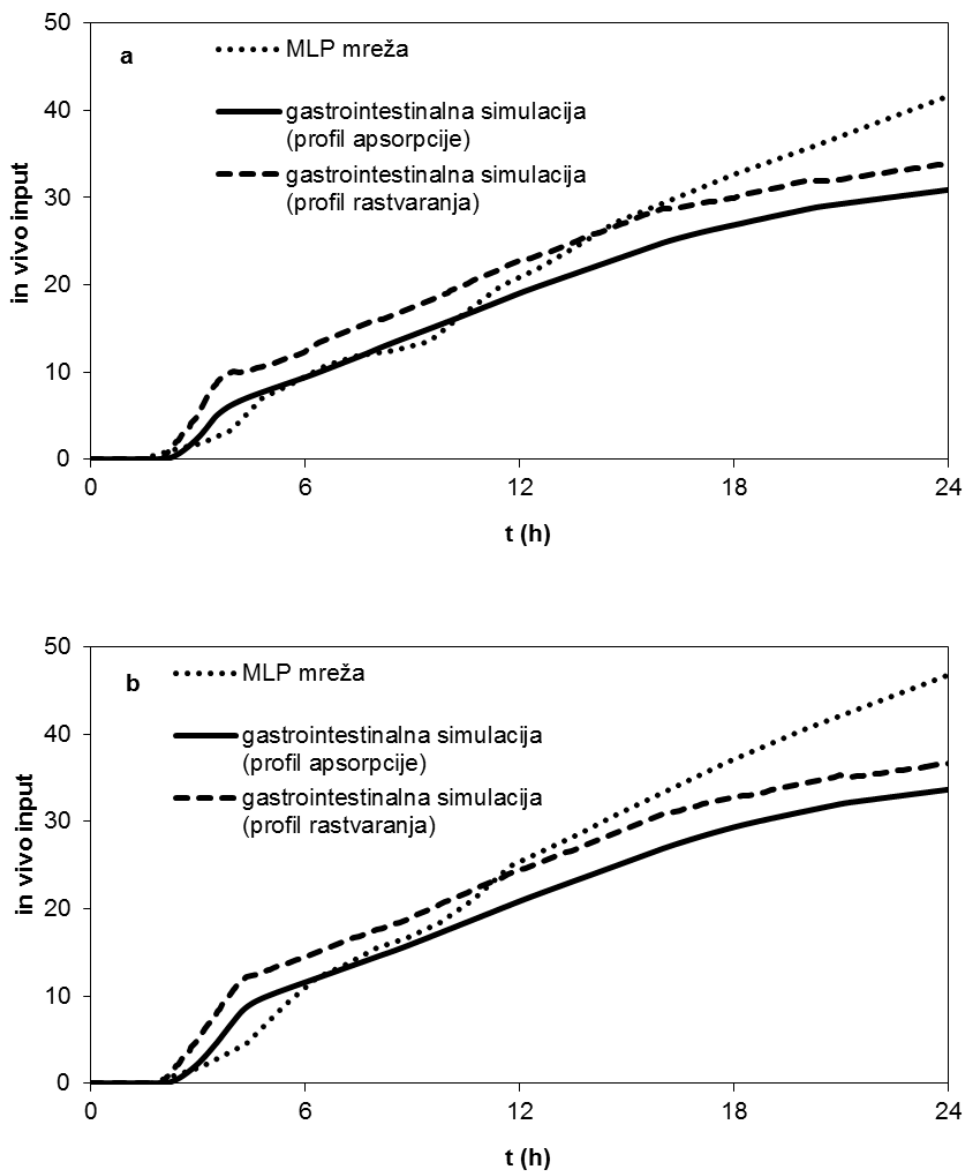
7.3.2.3. Identifikacija *in vivo* profila rastvaranja primenom modela veštačke neuronske mreže

Model MLP veštačke neuronske mreže je dalje razvijan u cilju identifikacije *in vivo* profila brzine rastvaranja nifedipina iz preparata. Kao ulazne funkcije za modelovanje korišćeni su individualni *in vivo* profili koncentracija nifedipina u plazmi nakon primene preparata tipa osmotske pumpe objavljeni u studiji Schug i saradnika (2002a). Profili rastvaranja nifedipina *in vivo* izračunati numeričkom dekonvolucijom korišćeni su kao izlazna funkcija u modelu MLP mreže. Nakon treninga i validacije, *in vivo* profili rastvaranja predviđeni MLP mrežom bili su gotovo identični profilima dobijenim numeričkom dekonvolucijom iz srednjeg profila koncentracija nifedipina u plazmi, u uslovima primene leka na gladno, odnosno nakon obroka. Odgovarajući profili rastvaranja nifedipina *in vivo* su prikazani na slici 44.



Slika 44. *In vivo* profili rastvaranja nifedipina dobijeni numeričkom dekonvolucijom i MLP mrežom u uslovima primene leka na gladno (a) i nakon obroka (b) za tablete tipa osmotske pumpe (preparat O)

Poređenje razvijenih *in silico* modela sa aspekta identifikacije *in vivo* profila rastvaranja/apsorpcije nifedipina u fiziološkim uslovima na gladno, odnosno nakon obroka, prikazano je na slici 45. U dekonvolucionom pristupu modelovanju primenom veštačke neuronske mreže dobijen je profil rastvaranja nifedipina *in vivo*, dok su gastrointestinalnom simulacijom dobijeni profili rastvaranja i apsorpcije nifedipina.



Slika 45. *In vivo* input profili nifedipina dobijeni modelom gastrointestinalne simulacije i MLP mreže u uslovima primene leka na gladno (a) i nakon obroka (b) za tablete tipa osmotske pumpe (preparat O)

Bez obzira na razlike u primenjenim *in silico* modelima, *in vivo* input profili predviđeni gastrointestinalnom simulacijom i veštačkom neuronskom mrežom pokazuju sličnu kinetiku, kada se koristi isti ulazni *in vitro* profil oslobađanja. *In silico* profili prikazani na slici 45 dobijeni su primenom razvijenih modela simulacije apsorpcije uz korišćenje *in*

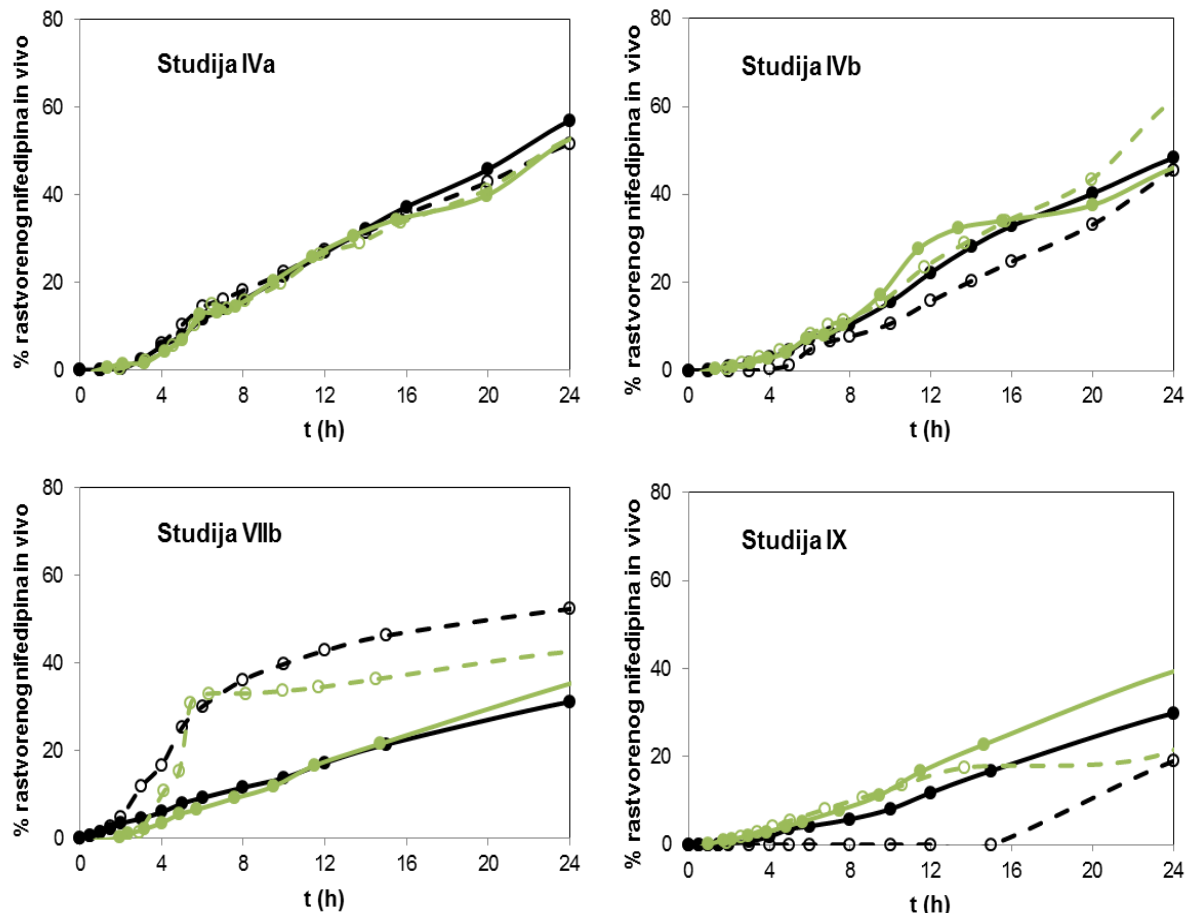
in vitro profila brzine rastvaranja nifedipina iz osmotskih tableta u aparaturi sa lopaticom u 1 % rastvoru NaLS. Nakon 24 sata od primene osmotskih tableta nifedipina na gladno, MLP mreža predviđa 42 % leka rastvorenog *in vivo*, dok model gastrointestinalne simulacije predviđa 33.9 % rastvorenog, odnosno 30.8 % apsorbovanog leka u organizmu. U simulacijama koje odgovaraju primeni leka nakon obroka, MLP mrežom se dobija 47 % rastvorenog leka u organizmu nakon 24 sata, dok model gastrointestinalne simulacije predviđa 36.7 % rastvorenog, odnosno 33.7 % apsorbovanog nifedipina *in vivo*. Dobijeni rezultati ukupnog stepena rastvaranja *in vivo*, odnosno apsorpcije nifedipina predviđeni modelima veštačke neuronske mreže i gastrointestinalne simulacije su u skladu sa literaturnim podacima o ograničenoj bioraspoloživosti nifedipina (SmPC Adalat; Croom i Wellington, 2006).

Mogućnost primene modela MLP veštačke neuronske mreže na različite preparate nifedipina ispitana je primenom dekonvolucionog pristupa na rezultate različitih *in vivo* studija objavljenih u literaturi (FDA, 1998; Schug i sar., 2002a,c). S obzirom da u literaturi nisu dostupni *in vitro* profili oslobađanja nifedipina iz različitih preparata, koji bi bili korišćeni kao ulazna funkcija za simulaciju profila koncentracija lekovite supstance u plazmi, konvolucionni pristup ispitivanju sposobnosti generalizacije MLP mreže nije mogao biti primenjen.

Kao ulazna funkcija korišćeni su publikovani podaci o koncentracijama nifedipina u plazmi iz izabranih preparata u uslovima na gladno i nakon primene obroka (FDA, 1998; Schug i sar., 2002a,c). Kao izlazna funkcija u modelu MLP mreže, dobijeni su simulirani profili rastvaranja nifedipina u gastrointestinalnom traktu. U cilju poređenja metoda, na slici 46 su prikazani profili rastvaranja nifedipina *in vivo* predviđeni MLP mrežom (zelena boja) u odnosu na rezultate dobijene numeričkom dekonvolucijom (profili obeleženi crnom bojom).

Na osnovu rezultata predstavljenih na slici 46 može se zaključiti da MLP mreža poseduje potencijal primene na različite preparate nifedipina, s obzirom da su simulirani profili bili slični profilima dobijenim primenom numeričke dekonvolucije. Najbolje slaganje profila predviđenih primenom veštačke neuronske mreže sa rezultatima numeričke dekonvolucije dobijeno je u slučaju tableta tipa osmotske pumpe (studija IVa). Ovakav

rezultat je očekivan imajući u vidu da je trening i validacija MLP mreže sprovedeno na setu podataka za osmotske tablete (studija VIIa). Prilikom primene mreže na dostupne podatke za različite preparate uočena su manja ili veća odstupanja predviđenih profila u odnosu na stvarne, tako da u slučaju hidrofilnih matriks tableta simulacije apsorpcije nisu bile u skladu sa *in vivo* objavljenim podacima (rezultati nisu predstavljeni). Ovakvi rezultati se mogu objasniti činjenicom da je za tačnost i pouzdanost modela veštačke neuronske mreže od izuzetnog značaja izbor i veličina skupa podataka za učenje mreže (Sun i sar., 2003). Ulazni i izlazni podaci za trening mreže trebalo bi da obuhvate što više različitih primera u određenoj oblasti, kako bi generalizovan model mogao da se primeni na novom, nepoznatom primeru. U tom smislu, sposobnost MLP mreže za simulaciju apsorpcije nifedipina iz matriks tableta moguće je poboljšati izlaganjem mreže većem skupu podataka za trening koji bi obuhvatili individualne *in vivo* profile koncentracija iz različitih formulacija. Ovakvom pristupu doprinosi i činjenica da model veštačkih neuronskih mreža ne uzima u obzir farmaceutsko-tehnološke i fiziološke parametre za simulaciju, tako da se oni mogu predstaviti modelu mreže korišćenjem većeg skupa podataka za trening i validaciju. S obzirom da veštačke neuronske mreže simuliraju način rada ljudskog mozga i imaju sposobnost memorisanja iskustvenog znanja koje koriste za dati zadatak, sposobnost generisanja zadovoljavajućeg predviđanja mreže za preparate nifedipina različite od osmotski kontrolisanih tableta može se poboljšati upotrebom *in vivo* i *in vitro* podataka za različite formulacije nifedipina tokom treninga modela mreže.



Slika 46. In vivo profili rastvaranja nifedipina iz različitih preparata u uslovima na gladno (puna linija) i nakon primene uz obrok (isprekidana linija) dobijeni MLP mrežom (zelena boja) i numeričkom dekonvolucijom (crna boja) (studije su opisane u tabeli 5)

7.4. IN VITRO – IN VIVO KORELACIJA

7.4.1. Dekonvolucioni pristup uspostavljanju *in vitro* – *in vivo* korelacije

U cilju uspostavljanja kvantitativne korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, hipotetički input profili izračunati različitim metodama konvencionalne farmakokinetičke analize (Wagner-Nelson, Loo-Riegelman i numerička dekonvolucija) i profili predviđeni *in silico* modelima (gastrointestinalna simulacija i veštačke neuronske mreže) su analizirani u odnosu na *in vitro* rezultate brzine rastvaranja nifedipina iz ispitivanih preparata pod različitim eksperimentalnim uslovima. *In vivo* input profili dobijeni primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda prikazani su u poglavlju 7.1.3. na slikama 14 i 15 za tablete osmotskog tipa i hidrofилnog matriksa, redom. Profili rastvaranja nifedipina iz tableta tipa osmotske pumpe dobijeni gastrointestinalnom simulacijom predstavljani su na slikama 36-39 u poglavlju 7.3.1.3, dok su odgovarajući profili za hidrofилne matriks tablete prikazani na slikama 40 i 41 u istom poglavlju. *In vivo* profili rastvaranja predviđeni MLP mrežom za tablete osmotskog tipa predstavljani su na slici 44 u poglavlju 7.3.2.3. Eksperimentalno dobijeni profili oslobađanja nifedipina iz tableta tipa osmotske pumpe u različitim medijumima i aparaturama prikazani na slikama 19 i 20, dok su rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja nifedipina iz tableta tipa hidrofилnih matriksa prikazani na slici 22 (poglavlje 7.2.2). Statistički parametri dobijeni linearnom regresionom analizom ispitivanog seta podataka predstavljani su u tabelama 19 i 20. Visok nivo korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, opisan vrednostima koeficijenta korelacije većim od 0.95, dobijen je u najvećem broju slučajeva. Ovakvi rezultati su u skladu sa kinetikom oslobađanja nultog reda uočenom *in vivo* i *in vitro* u najvećem broju ispitivanja brzine rastvaranja.

Tabela 19. Statistički parametri *in vitro* – *in vivo* korelacije za preparat O u uslovima primene na gladno (dekonvolucioni pristup)

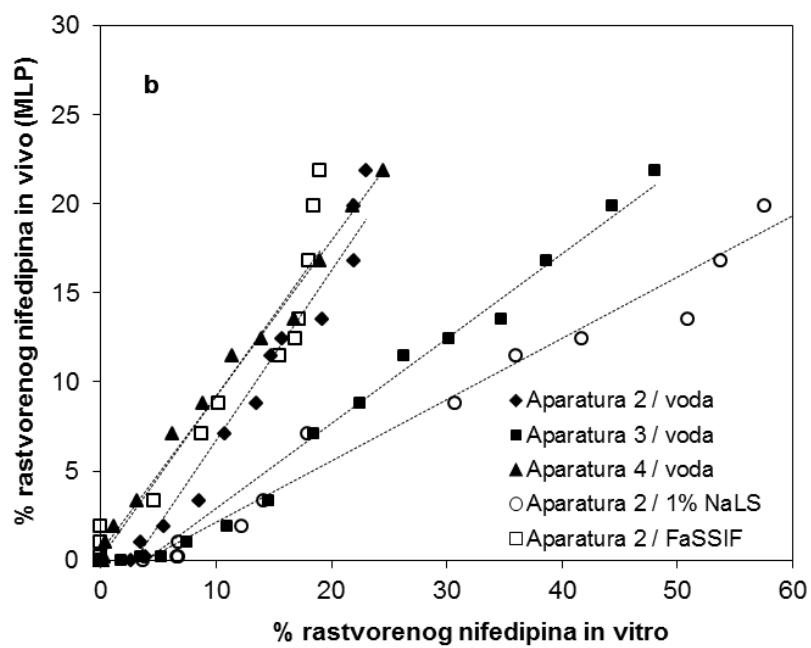
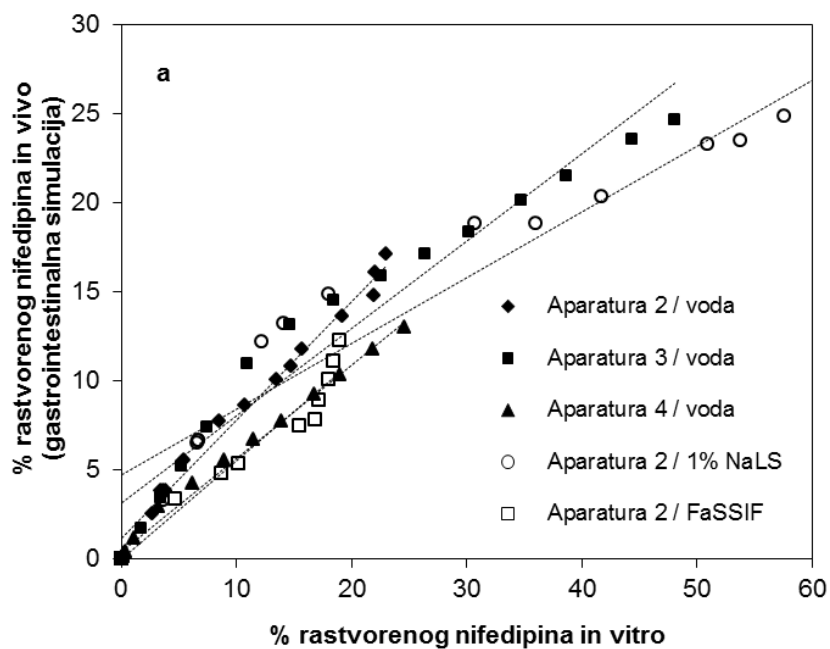
<i>In vitro</i> input/ <i>in vivo</i> input	Nagib pravca/koeffi- jent korelacije	Wagner- Nelson metoda	Wagner-Nelson metoda (normalizovana)	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija (i.v.)	Numerička dekonvolucija (p.o.)	Gastrointesti nalna simulacija	MLP mreža
Aparatura 2 FaSSGF	a	2.7606	1.5182	0.5453	0.5546	0.9785	0.7020	1.1309
	r	0.9877	0.9877	0.9622	0.9710	0.9696	0.9882	0.9518
Aparatura 2 FeSSGF	a	3.3473	1.8408	0.6958	0.7062	1.2450	0.7321	1.4215
	r	0.9428	0.9428	0.9666	0.9733	0.9712	0.9628	0.9587
Aparatura 2 FaSSIF	a	2.1992	1.2095	0.4456	0.4521	0.7978	0.5529	0.9044
	r	0.9797	0.9797	0.9790	0.9854	0.9843	0.9858	0.9652
Aparatura 2 FeSSIF	a	2.0253	1.1138	0.4428	0.4449	0.7859	0.5227	0.9201
	r	0.8958	0.8958	0.9657	0.9628	0.9626	0.9940	0.9745
Aparatura 2 1 % NaLS	a	0.7940	0.4366	0.1671	0.1684	0.2975	0.3680	0.3445
	r	0.9514	0.9514	0.9871	0.9874	0.9872	0.9605	0.9873
Aparatura 2 Voda	a	2.2117	1.2163	0.4523	0.4575	0.8082	0.6660	0.9516
	r	0.9694	0.9694	0.9776	0.9811	0.9810	0.9942	0.9812
Aparatura 2 40 % etanol	a	0.4954	0.2724	0.0996	0.1010	0.1783	0.3664	0.2076
	r	0.9838	0.9838	0.9752	0.9812	0.9805	0.9576	0.9719
Aparatura 2 0.5%HPMC	a	1.6189	0.8903	0.3152	0.3203	0.5657	0.8489	0.7123
	r	0.8760	0.8760	0.8411	0.8480	0.8478	0.9872	0.8650
Aparatura 3 Voda	a	1.1012	0.6056	0.2276	0.2292	0.4053	0.4896	0.4768
	r	0.9684	0.9684	0.9872	0.9864	0.9872	0.9733	0.9918
Aparatura 4 Voda	a	1.9854	1.0918	0.4023	0.4226	0.7469	0.5243	0.8717
	r	0.9531	0.9531	0.9951	0.9926	0.9931	0.9968	0.9957

Tabela 20. Statistički parametri *in vitro* – *in vivo* korelacije za preparat O nakon primene uz obrok (dekonvolucioni pristup)

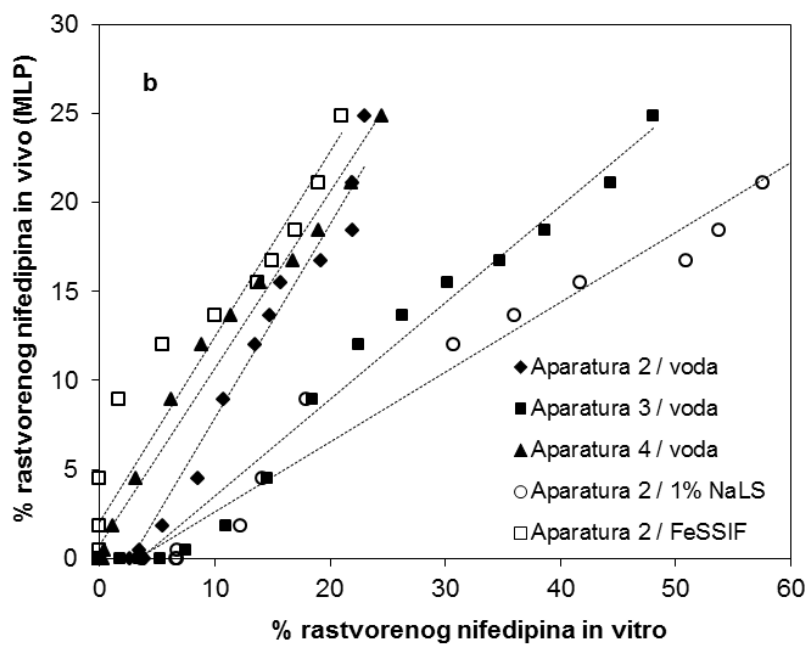
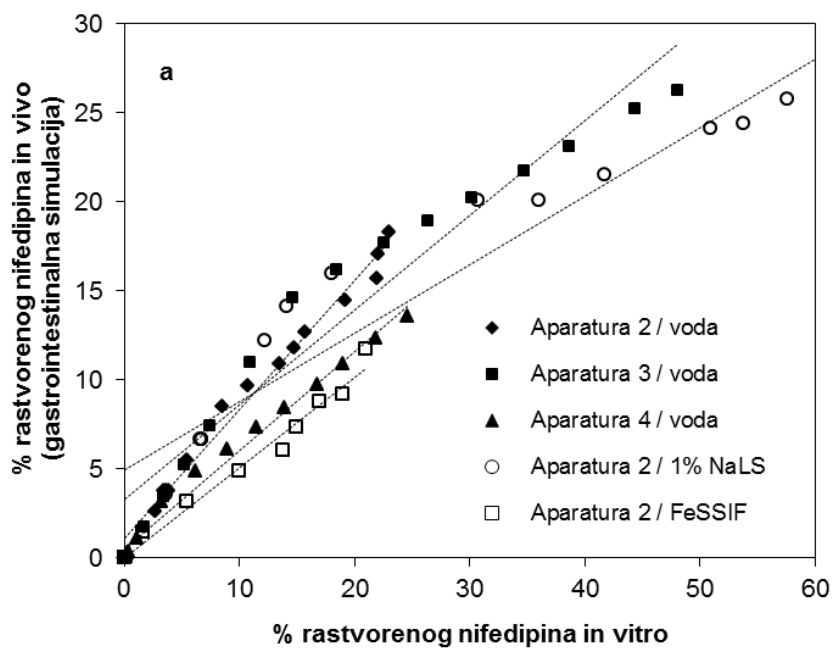
<i>In vitro</i> input/ <i>in vivo</i> input	Nagib pravca/koeffi- jent korelacije	Wagner- Nelson metoda	Wagner-Nelson metoda (normalizovana)	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija (i.v.)	Numerička dekonvolucija (p.o.)	Gastrointesti- nalna simulacija	MLP mreža
Aparatura 2 FaSSGF	a	3.8514	2.1184	0.6994	0.7156	1.2627	0.8065	1.3211
	r	0.9896	0.9896	0.9556	0.9626	0.9623	0.9920	0.9730
Aparatura 2FeSSGF	a	4.7268	2.6000	0.9046	0.9256	1.6307	0.7506	1.6421
	r	0.9561	0.9561	0.9731	0.9802	0.9783	0.9660	0.9844
Aparatura 2FaSSIF	a	3.0772	1.6926	0.5748	0.5872	1.3061	0.6490	1.0479
	r	0.9844	0.9844	0.9779	0.9836	0.9830	0.9885	0.9787
Aparatura 2FeSSIF	a	2.8338	1.5587	0.5771	0.5853	1.0325	0.5058	1.0404
	r	0.9001	0.9001	0.9748	0.9733	0.9726	0.9940	0.9642
Aparatura 21 % NaLS	a	1.1044	0.6075	0.2160	0.2194	0.3873	0.3838	0.3934
	r	0.9503	0.9503	0.9884	0.9885	0.9884	0.9569	0.9866
Aparatura 2 Voda	a	3.0704	1.6888	0.5823	0.5925	1.0464	0.7216	1.0910
	r	0.9664	0.9664	0.9747	0.9764	0.9768	0.9935	0.9844
Aparatura 240 % etanol	a	0.6869	0.3778	0.1277	0.1303	0.2301	0.4418	0.2401
	r	0.9796	0.9796	0.9688	0.9731	0.9731	0.9615	0.9837
Aparatura 2 0.5 % HPMC	a	2.2272	1.2250	0.4008	0.4095	0.7232	0.9066	0.8383
	r	0.8654	0.8654	0.8281	0.8331	0.8334	0.9588	0.8630
Aparatura 3 Voda	a	1.5179	0.8349	0.2927	0.2965	0.5239	0.5325	0.5435
	r	0.9586	0.9586	0.9819	0.9804	0.9813	0.9694	0.9892
Aparatura 4 Voda	a	2.7605	1.5184	0.5439	0.5510	0.9732	0.5544	0.9906
	r	0.9517	0.9517	0.9971	0.9946	0.9951	0.9942	0.9902

Vrednosti nagiba regresione prave približne broju jedan, kao i visoke vrednosti koeficijenta korelacije dobijene su za simulacije MLP mrežom i *in vitro* profile oslobađanja u vodi u sve tri aparature, kao i fiziološki zasnovanim medijumima u aparaturi sa lopaticom. U slučaju gastrointestinalnih simulacija i navedenih *in vitro* profila oslobađanja takođe su dobijene visoke vrednosti koeficijenta korelacije, dok su vrednosti nagiba prave bile u rasponu od 0.49 do 0.72. Ovakvi rezultati se mogu objasniti nepotpunim i sporim oslobađanjem nifedipina iz tableta u navedenim medijumima, što uslovljava niže vrednosti simuliranih inputa *in vivo* u odnosu na stvarne vrednosti, s obzirom da model gastrointestinalne simulacije uzima u obzir izražen efekat prvog prolaza nifedipina.

Reprezentativni grafici dekonvolucionog pristupa uspostavljanju *in vitro* – *in vivo* korelacije primenom *in silico* modela gastrointestinalne simulacije i veštačke neuronske mreže u uslovima primene leka na gladno i nakon obroka prikazani su na slikama 47 i 48. Dobijeni rezultati potvrđuju da se pored konvencionalne farmakokinetičke analize razvijeni *in silico* modeli mogu uspešno koristiti za identifikaciju profila rastvaranja nifedipina iz preparata *in vivo*, što predstavlja osnov za razvoj biorelevantnih specifikacija za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja nifedipina iz preparata.



Slika 47. In vitro – in vivo korelacija u uslovima primene leka na gladno
 (a) gastrointestinalna simulacija; (b) MLP mreža



Slika 48. In vitro – in vivo korelacija u uslovima primene leka nakon obroka
(a) gastrointestinalna simulacija; (b) MLP mreža

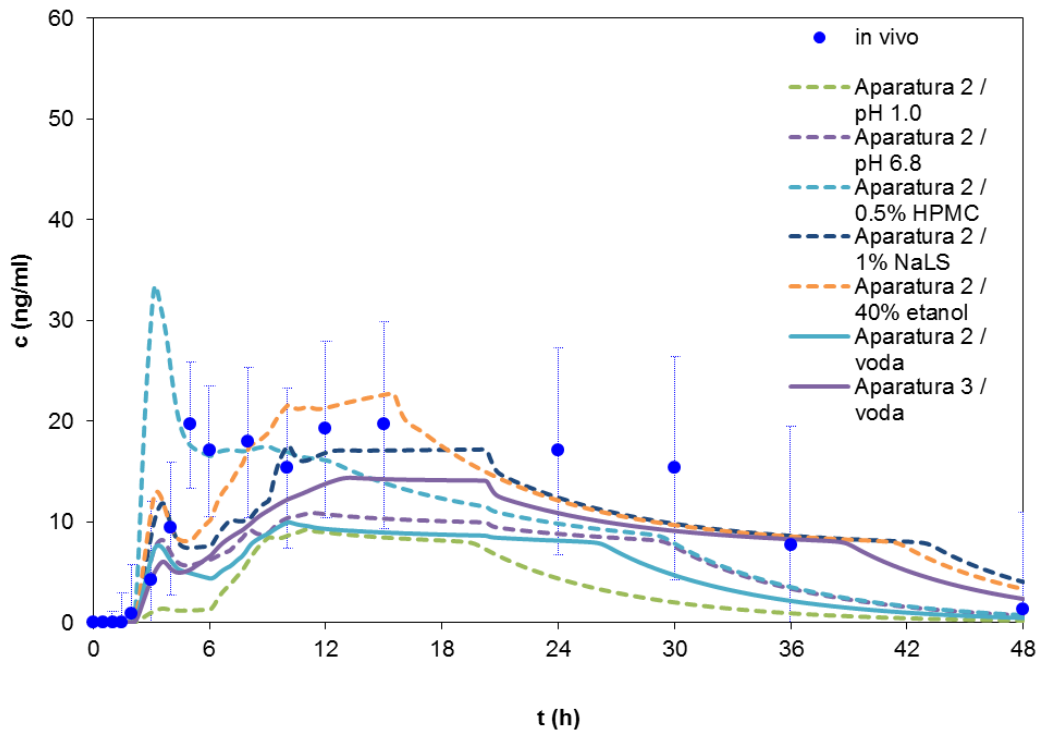
Dekonvolucioni pristup uspostavljanju *in vitro* – *in vivo* korelacije primenjen je i u slučaju hidrofilnih matriks tableta. Eksperimentalno dobijeni *in vitro* profili oslobađanja nifedipina analizirani su u odnosu na hipotetičke profile izračunate konvencionalnim farmakokinetičkim metodama i gastrointestinalnom simulacijom. Simulacije dobijene primenom veštačke neuronske mreže nisu uzete u ova razmatranja, s obzirom da MLP mreža, razvijena na osnovu podataka za tablete sa osmotski kontrolisanim oslobađanjem, nije pokazala zadovoljavajuću sposobnost predviđanja apsorpcije nifedipina iz farmaceutskih oblika kao što su matriks tablete. Statistički parametri dobijeni linearnom regresionom analizom ispitivanih podataka prikazani su u tabeli 21. Vrednosti koeficijenta korelacije veće od 0.95, kao i vrednosti nagiba prave približne broju jedan, dobijene su za profile brzine rastvaranja nifedipina u fiziološki zasnovanim medijumima i vodi i hipotetičke profile brzine rastvaranja nifedipina *in vivo* dobijene primenom gastrointestinalne simulacije.

Tabela 21. Statistički parametri *in vitro* – *in vivo* korelacije za preparat M1 u uslovima primene na gladno (dekonvolucioni pristup)

<i>In vitro</i> input/ <i>in vivo</i> input		Wagner- Nelson metoda	Wagner-Nelson metoda (normalizovana)	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija (i.v.)	Numerička dekonvolucija (p.o.)	Gastrointestinalna simulacija
Aparatura 2	a	5.2404	2.8822	1.4668	1.5151	2.4508	1.0293
FaSSGF	r	0.9633	0.9633	0.6240	0.7343	0.7794	0.9825
Aparatura 2	a	1.1026	0.6064	0.3257	0.3291	0.5357	0.9791
FeSSGF	r	0.9754	0.9754	0.7235	0.8350	0.8756	0.9868
Aparatura 2	a	3.0574	1.6816	1.0364	1.0185	1.6071	1.0167
FaSSIF	r	0.9571	0.9571	0.7509	0.8406	0.8704	0.9815
Aparatura 2	a	1.0861	0.5974	0.3317	0.3345	0.5392	0.9928
FeSSIF	r	0.9881	0.9881	0.6984	0.8024	0.8488	0.9812
Aparatura 2	a	1.2608	0.6934	0.3475	0.3568	0.5801	0.9775
1 % NaLS	r	0.9558	0.9558	0.6096	0.7133	0.7608	0.9040
Aparatura 2	a	3.5188	1.9353	1.5280	1.4325	2.2117	1.0298
Voda	r	0.8572	0.8572	0.8615	0.9201	0.9322	0.9978
Aparatura 2	a	1.1282	0.6205	0.3085	0.3182	0.5198	0.9688
40 % etanol	r	0.9330	0.9330	0.5904	0.6939	0.7437	0.8955
Aparatura 2	a	3.9218	2.1570	1.2791	1.2666	2.0234	1.0321
0.5 % HPMC	r	0.9485	0.9485	0.7160	0.8076	0.8466	0.9928
Aparatura 4	a	0.5426	0.2984	0.4420	0.3799	0.5562	0.7039
Voda	r	0.5189	0.5189	0.9785	0.9581	0.9205	0.9909

7.4.2. Konvolucioni pristup uspostavljanju *in vitro* – *in vivo* korelacije

U konvolucionom pristupu uspostavljanju *in vitro* – *in vivo* korelacije, profili koncentracija nifedipina u plazmi predviđeni primenom gastrointestinalne simulacije i veštačke neuronske mreže analizirani su u odnosu na srednje farmakokinetičke profile uočene u *in vivo* studiji (Schug i sar., 2002a). Kako bi se rezultati uskladili sa *in vivo* situacijom, u slučaju modela gastrointestinalne simulacije uvedeno je vreme odložene apsorpcije (*lag time*) od 3 sata za sve *in vitro* profile osim profila dobijenih u fiziološki zasnovanim medijumima, kao i u aparaturi sa protočnom ćelijom. Na slici 49 prikazani su predviđeni profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni gastrointestinalnom simulacijom na osnovu *in vitro* inputa korigovanih vremenom odlaganja od 3 sata.



Slika 49. Profili koncentracija nifedipina u plazmi dobijeni gastrointestinalnom simulacijom u uslovima primene leka na gladno (preparat O)

Statistički parametri linearne regresione analize za model gastrointestinalne simulacije predstavljeni su u tabeli 22.

Tabela 22. Statistički parametri *in vitro* – *in vivo* korelacije za preparat O primenom gastrointestinalne simulacije (konvolucioni pristup)

<i>In vitro</i> profil	Primena na gladno		Primena nakon obroka	
	a	r	a	r
Aparatura 2/FaSSGF/FeSSGF	0.3792	0.7355	0.3043	0.6832
Aparatura 2 / FaSSIF/FeSSIF	0.5324	0.9305	0.2904	0.5420
Aparatura 2 / 1 % NaLS	0.9899	0.8941	0.9200	0.8954
Aparatura 2 / voda	0.5767	0.9000	0.4574	0.7181
Aparatura 2 / 40 % etanol	1.7479	0.8230	1.8467	0.9489
Aparatura 2 / 0.5 % HPMC	0.9237	0.6538	1.1839	0.9642
Aparatura 3 / voda	1.0509	0.9341	0.9412	0.9181
Aparatura 4 / voda	0.5063	0.8988	0.3373	0.8005

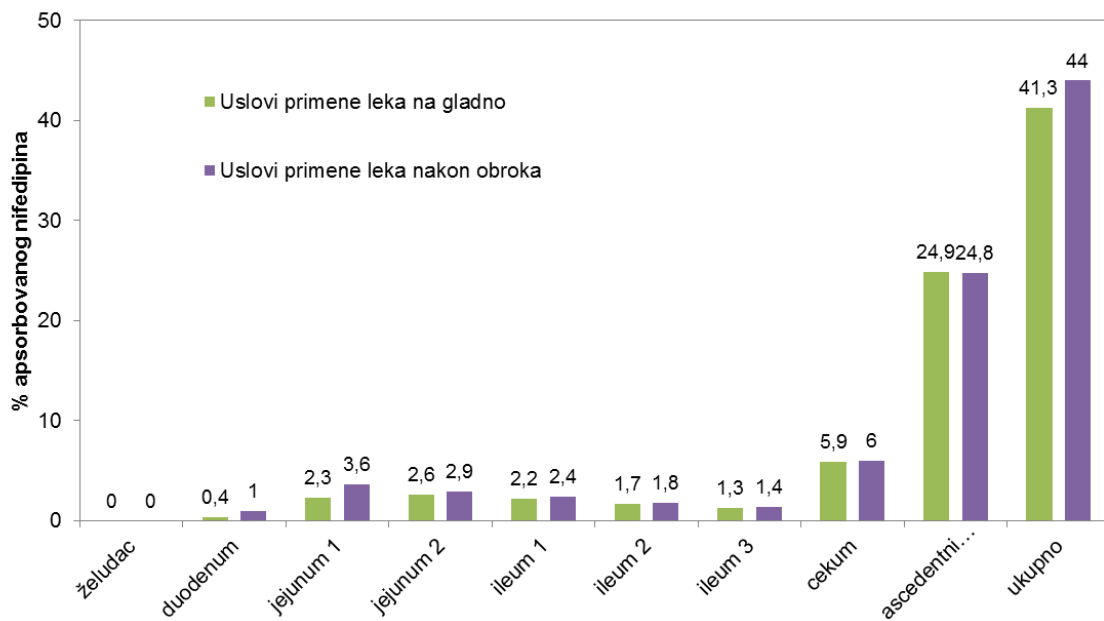
a – nagib regresione prave

r – koeficijent korelacije

Najbolja korelacija predviđenih i *in vivo* uočenih rezultata u slučaju metodologije gastrointestinalne simulacije postignuta je za profil oslobađanja u aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem kada je kao medijum korišćena voda. Vrednosti koeficijenta korelacije iznosile su 0.9341 u uslovima primene leka na gladno i 0.9181 u uslovima primene leka nakon obroka, dok su nagibi regresione prave bili 1.0509 za fiziološke uslove na gladno i 0.9412 za simulaciju uslova nakon uzimanja obroka. Dobra korelacija je dobijena i slučaju simuliranog profila koncentracija nifedipina u plazmi na osnovu *in vitro* rezultata oslobađanja u rastvoru surfaktanta ($a = 0.9899$, $r = 0.8941$ u uslovima na gladno; $a = 0.92$, $r = 0.8954$ nakon obroka), s obzirom da je u ovom medijumu postignuto potpuno oslobađanje nifedipina iz tablete osmotskog tipa.

Razvijeni model gastrointestinalne simulacije je dalje korišćen za ispitivanje regionalne apsorpcije nifedipina na osnovu ulaznih parametara koji su pokazali najveću sličnost

predviđenih sa stvarnim profilima koncentracija leka u plazmi. Na slici 50 dat je prikaz regionalne apsorpcije nifedipina u različitim delovima gastrointestinalnog trakta u uslovima primene na gladno, odnosno nakon obroka, dobijen modelom gastrointestinalne simulacije na osnovu profila oslobađanja u aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem za koji je postignut odgovarajući stepen *in vitro* – *in vivo* korelacije. Dobijeni rezultati ukazuju da se apsorpcija nifedipina iz tableta tipa osmotske pumpe pretežno odvija u ascedentnom kolonu, nezavisno od primene obroka.



Slika 50. Regionalna apsorpcija nifedipina iz preparata O

Statistički parametri linearne regresione analize za model veštačke neuronske mreže prikazani su u tabeli 23.

Tabela 23. Statistički parametri *in vitro* – *in vivo* korelacije za preparat O primenom modela MLP mreže (konvolucioni pristup)

<i>In vitro</i> profil	Primena na gladno		Primena nakon obroka	
	a	r	a	r
Aparatura 2/FaSSGF/FeSSGF	0.6794	0.6736	0.7177	0.8966
Aparatura 2 / FaSSIF/FeSSIF	0.9168	0.7397	0.5652	0.7469
Aparatura 2 / 1 % NaLS	1.6125	0.7835	1.4284	0.6722
Aparatura 2 / voda	1.0447	0.8058	0.4316	0.5841
Aparatura 2 / 40 % etanol	2.5959	0.9050	1.7630	0.5976
Aparatura 3 / voda	1.6650	0.8778	1.9489	0.8317
Aparatura 4 / voda	1.1727	0.8910	0.8227	0.9308

a – nagib regresione prave

r – koeficijent korelacije

Primenom metodologije veštačke neuronske mreže najbolja korelacija predviđenih i stvarnih profila koncentracija nifedipina u plazmi postignuta je za profil simuliran na osnovu *in vitro* rezultata u aparaturi sa protočnom ćelijom koristeći vodu kao medijum. Vrednosti koeficijenta korelacije bile su 0.891 u uslovima primene na gladno i 0.9308 u uslovima primene leka nakon obroka, dok su nagibi regresione prave iznosili 1.1727 za simulaciju na gladno i 0.8227 nakon obroka.

U slučaju hidrofилnih matriks tableta, konvolucioni pristup uspostavljanju *in vitro* – *in vivo* korelacije primenjen je poređenjem predviđenih profila koncentracija nifedipina u plazmi tehnikom gastrointestinalne simulacije i srednjeg profila uočenog *in vivo* (Piovella, 1987). Statistički parametri linearne regresione analize prikazani su u tabeli 24.

Tabela 24. Statistički parametri *in vitro* – *in vivo* korelacije za preparat M1 dobijeni gastrointestinalnom simulacijom primene leka na gladno (konvolucioni pristup)

<i>In vitro</i> profil	a	r
Aparatura 2 / FaSSGF	0.2513	0.9157
Aparatura 2 / FaSSIF	0.3709	0.9423
Aparatura 2 / 1 % NaLS	0.8017	0.9811
Aparatura 2 / voda	0.1986	0.8694
Aparatura 2 / 40 % etanol	0.7974	0.9782
Aparatura 2 / 0.5 % HPMC	0.2727	0.9155
Aparatura 4 / voda	0.1543	0.4164

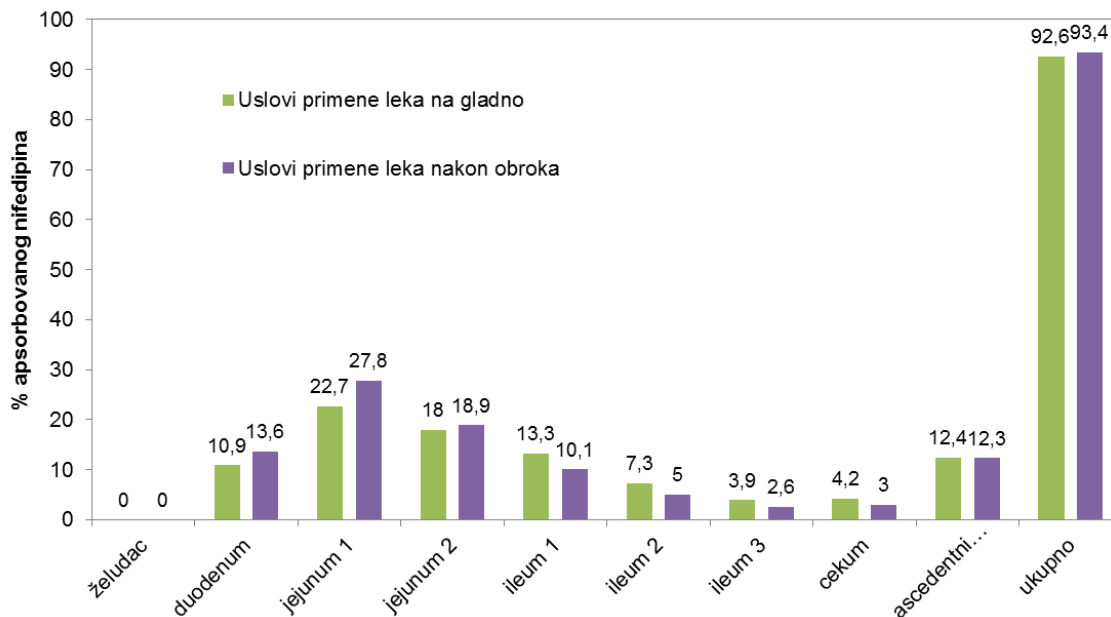
a – nagib regresione prave

r – koeficijent korelacije

Na osnovu vrednosti statističkih parametara prikazanih u tabeli 24 može se zaključiti da je najbolja korelacija *in silico* predviđenih i stvarnih *in vivo* profila koncentracija nifedipina u plazmi iz matriks tableta postignuta gastrointestinalnom simulacijom zasnovanom na *in vitro* profilu oslobađanja nifedipina u 1 % rastvoru natrijum-laurilsulfata u aparaturi sa lopaticom. Vrednost koeficijenta korelacije za ovaj slučaj iznosi 0.9811, dok je nagib regresione linije 0.8017. Ovakvi rezultati potvrđuju sposobnost generalizacije gastrointestinalne simulacije kada se kao ulazni profil za simulaciju apsorpcije koristi *in vitro* profil brzine rastvaranja nifedipina iz preparata koji odlikava situaciju *in vivo*.

Tehnikom gastrointestinalne simulacije dobijeni su i podaci o regionalnoj apsorpciji nifedipina iz hidrofilnih matriks tableta u različitim delovima gastrointestinalnog trakta u uslovima primene na gladno, odnosno nakon obroka. Kao ulazni profil za simulaciju uzet je profil oslobađanja u rastvoru surfaktanta (1 % NaLS) za koji je pokazana najbolja korelacija *in silico* predviđenih profila koncentracija u plazmi sa *in vivo* podacima. Na osnovu rezultata prikazanih na slici 51 može se zaključiti da se apsorpcija nifedipina odvija duž celog gastrointestinalnog trakta sa pretežnom apsorpcijom u jejunumu, što je u

skladu sa rezultatima studije regionalne apsorpcije objavljenim u literaturi (Bode i sar., 1996).



Slika 51. Regionalna apsorpcija nifedipina iz preparata M1

Sposobnost generalizacije primenjenog modela gastrointestinalne simulacije ilustrovana je dobrom korelacijom između *in silico* predviđenih i *in vivo* uočenih profila koncentracija za oba ispitivana preparata, osmotsku i matriks tabletu, koristeći kao ulazni profil za simulacije profil oslobađanja u rastvoru surfaktanta (1 % NaLS). Grafički prikaz *in vitro* – *in vivo* korelacije za preparate O i M1 predstavljen je na slici 52. Linearnom regresionom analizom dobijena je vrednost 0.9686 za koeficijent korelacije i 0.7883 za nagib prave. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju na mogućnost primene generalizovanog modela gastrointestinalne simulacije za biofarmaceutsku karakterizaciju različitih farmaceutskih oblika nifedipina.

8. ZAKLJUČCI

U literaturi su opisani različiti, kako pozitivni, tako i negativni, efekti hrane na brzinu i stepen apsorpcije nifedipina i predložena različita objašnjenja uočenih fenomena. Većina sprovedenih ispitivanja ukazuje da je uticaj hrane na apsorpciju nifedipina specifičan za određenu formulaciju i da zavisi od vrste i sastava farmaceutskog oblika leka. Vrednosti *in vivo* stepena efekta hrane (I_{vivo}) izračunate na osnovu rezultata dostupnih studija kreću se od 0.6 do 1.4 za obim apsorpcije, odnosno 0.3 do 4.0 za brzinu apsorpcije nifedipina iz različitih preparata.

Razvoj biorelevantnog i diskriminativnog testa za ispitivanje brzine rastvaranja zasniva se na poznavanju kinetike „ulaska“ (brzina rastvaranja, odnosno brzina i obim apsorpcije) leka u organizam. Rezultati dobijeni primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda su pokazali da postoje izvesne razlike između profila dobijenih primenom različitih metoda, kao i u zavisnosti od izbora referentnog preparata (intravenski primenjen rastvor, odnosno, oralno primenjene kapsule sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance). Dobijeni rezultati su pokazali da u slučaju preparata sa modifikovanim oslobađanjem, kao referentni preparat prednost ima oralno primenjen rastvor, tableta ili kapsula sa trenutnim oslobađanjem, jer se u ovom slučaju kao ulazna funkcija dobija profil brzine rastvaranja lekovite supstance *in vivo*. Ovako dobijena ulazna funkcija se može direktno uporediti sa profilom oslobađanja lekovite supstance *in vitro* s ciljem uspostavljanja *in vitro* – *in vivo* korelacije i razvoja biorelevantne metodologije za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata.

In vitro ispitivanja brzine rastvaranja nifedipina iz različitih preparata su pokazala da eksperimentalni uslovi, sastav i zapremina medijuma, kao i tip aparature i hidrodinamika mogu u znatnoj meri uticati na kinetiku oslobađanja lekovite supstance. Brzina rastvaranja nifedipina iz ispitivanih preparata u aparaturi sa lopaticom bila je ograničena zapreminom medijuma i rastvorljivošću nifedipina. U slučaju tableta osmotskog tipa, profil oslobađanja nifedipina u aparaturi sa protočnom ćelijom nakon početne faze odlaganja je veoma sličan kinetici oslobađanja u aparaturi tipa cilindra sa povratnim

kretanjem. U slučaju hidrofilnih matriks tableta, ispitivanje uticaja različitih eksperimentalnih uslova na oslobađanje nifedipina ukazuje na moguće naglo oslobađanje celokupne doze („*dose dumping*“ efekat) pri istovremenoj primeni matriks tableta sa hranom ili alkoholnim pićima. Izračunata vrednost *in vitro* stepena efekta hrane (I_{vitro}) od 0.78 za kombinaciju medijuma FeSSIF/FaSSIF, najbolje odslikava *in vivo* situaciju nakon primene tableta tipa osmotske pumpe. U slučaju tableta tipa hidrofilnog matriksa uticaj hrane se može pretpostaviti na osnovu rezultata dobijenih primenom kombinacije odgovarajućih fiziološki zasnovanih medijuma (FeSSIF/FaSSIF) za koje je izračunata vrednost I_{vitro} od 2.98, odnosno kombinacijom medijuma 1 % NaLS/voda za koje je izračunata vrednost I_{vitro} od 3.41. Na osnovu rezultata dobijenih primenom fiziološki zasnovanih medijuma koji simuliraju uslove u gastrointestinalnom traktu nakon primene leka na gladno, odnosno uz obrok, bilo je moguće predvideti odsustvo uticaja hrane u slučaju tableta tipa osmotske pumpe. U slučaju tableta tipa hidrofilnog matriksa je u medijumu koji simulira uslove nakon obroka došlo do relativno brzog oslobađanja celokupne količine lekovite supstance, dok je u medijumu koji simulira uslove na gladno uočeno sporo i nepotpuno oslobađanje nifedipina.

U okviru istraživanja razvijen je i validiran model gastrointestinalne simulacije apsorpcije nifedipina u uslovima primene leka na gladno i nakon obroka. Ovaj model je primenjen s ciljem identifikacije *in vivo* profila rastvaranja i apsorpcije nifedipina. Utvrđeno je da se pouzdanija predviđanja apsorpcije dobijaju na osnovu *in vitro* profila kod kojih je u toku 12 sati ispitivanja rastvoreno više od 45 % nifedipina, što je u skladu sa činjenicom da je u fazi razvoja modela gastrointestinalne simulacije uzet u obzir presistemički metabolizam nifedipina čiji je obim, prema literaturnim podacima, oko 45 %. Na osnovu *in vitro* profila okarakterisanih nepotpunim oslobađanjem nifedipina, koji su uočeni u fiziološki zasnovanim medijumima, vodi i vodenim medijumima različitih pH vrednosti, dobijeni su simulirani *in vivo* profili okarakterisani nižim vrednostima C_{max} i PIK u odnosu na farmakokinetičke profile uočene *in vivo*. Najveća sličnost simuliranog i *in vivo* uočenog profila koncentracije nifedipina u plazmi, u oba ispitivana fiziološka stanja, je dobijena kada je kao ulazna funkcija primenjen eksperimentalno dobijen profil oslobađanja nifedipina u vodi u aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem. Odlična predviđanja

obima apsorpcije su dobijena i kada je kao ulazni profil za gastrointestinalnu simulaciju primenjen profil oslobađanja nifedipina uočen u 1 % rastvoru NaLS u aparaturi sa lopaticom. Profil koncentracija nifedipina u plazmi dobijen simulacijom na osnovu profila oslobađanja uočenog u aparaturi sa protočnom ćelijom, odslikava odloženu pojavu lekovite supstance u krvi (nakon 3 sata), što je u skladu sa situacijom uočenom *in vivo*. Sposobnost generalizacije modela gastrointestinalne simulacije potvrđena je uspešnim predviđanjem apsorpcije nifedipina iz hidrofilnih matriks tableta na osnovu eksperimentalno dobijenog profila oslobađanja u 1 % rastvoru NaLS. Vrednosti predviđenog stepena efekta hrane zasnovane na gastrointestinalnoj simulaciji ukazuju na diskriminativni potencijal fiziološki zasnovanih medijuma za identifikaciju efekta hrane na apsorpciju nifedipina.

U ovom istraživanju uspešno je primenjena validirana veštačka neuronska MLP mreža za simulaciju apsorpcije nifedipina u uslovima primene leka na gladno i nakon obroka na osnovu eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja nifedipina iz preparata (konvolucionni pristup), kao i za identifikaciju *in vivo* profila rastvaranja nifedipina iz preparata na osnovu literaturnih *in vivo* podataka (dekonvolucionni pristup). Uticaj *in vitro* profila oslobađanja kao ulazne funkcije za simulaciju apsorpcije je više izražen u slučaju modela veštačke neuronske mreže u odnosu na gastrointestinalnu simulaciju. Za razliku od modela gastrointestinalne simulacije gde se pouzdanija predviđanja apsorpcije dobijaju na osnovu *in vitro* profila koji pokazuju veći stepen rastvaranja nifedipina, u slučaju MLP mreže veću sličnost sa *in vivo* uočenim vrednostima pokazuju *in silico* profili simulirani na osnovu *in vitro* profila sa nepotpunim oslobađanjem, koji su eksperimentalno dobijeni prilikom ispitivanja u fiziološki zasnovanim medijumima i vodi u aparaturi sa protočnom ćelijom. Dobijeni rezultati mogu se pripisati razlikama u samim *in silico* modelima, odnosno uticaju farmakokinetičkih i fizioloških parametara (kao što je stepen presistenskog metabolizma, vreme prolaska leka kroz različite delove gastrointestinalnog trakta) koji su integrisani u model gastrointestinalne simulacije, dok u metodologiji veštačkih neuronskih mreža nisu uzeti u obzir prilikom modelovanja procesa apsorpcije. Bez obzira na razlike u primenjenim *in silico* modelima, *in vivo* input profili predviđeni modelom gastrointestinalne simulacije i MLP mrežom pokazuju sličnu

kinetiku, kada se koristi isti ulazni *in vitro* profil oslobađanja. Očekuje se da se sposobnost MLP mreže za simulaciju apsorpcije nifedipina iz matriks tableta može poboljšati izlaganjem mreže većem skupu podataka za učenje koji bi obuhvatili individualne *in vivo* profile koncentracija dobijene nakon primene različitih formulacija preparata sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina.

Rezultati dekonvolucionog pristupa uspostavljanju *in vitro* – *in vivo* korelacije potvrđuju da se, pored konvencionalne farmakokinetičke analize, razvijeni *in silico* modeli mogu uspešno koristiti za identifikaciju profila rastvaranja nifedipina iz preparata *in vivo*, što predstavlja osnov za razvoj biorelevantnih specifikacija za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja nifedipina na gladno, odnosno nakon primene obroka.

Visok nivo korelacije između *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih profila koncentracija nifedipina u plazmi dobijenih korišćenjem modela gastrointestinalne simulacije postignut je na osnovu profila oslobađanja nifedipina u vodi u aparaturi tipa cilindra sa povratnim kretanjem. Konvolucionni pristup u slučaju metodologije MLP mreže ukazuje na najbolju korelaciju simuliranih i stvarnih profila kada se kao *in vitro* input koristi profil oslobađanja nifedipina u vodi u aparaturi sa protočnom ćelijom.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da se različiti *in silico* modeli mogu uspešno koristiti u cilju uspostavljanja *in vitro* – *in silico* – *in vivo* korelacije (IVISIVC). Na rezultate simulacije značajno utiču svojstva lekovite supstance i karakteristike farmaceutskog oblika leka, primenjena *in silico* metodologija, kao i eksperimentalni uslovi primenjeni u toku *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata. Tehnika gastrointestinalne simulacije pokazuje prednost u pogledu predviđanja apsorpcije pokazujući veću sposobnost generalizacije u odnosu na model veštačke neuronske mreže. Prednost ovog modela je pokazana primenom kako konvolucionog, tako i dekonvolucionog pristupa uspostavljanju *in vitro* – *in vivo* korelacije, što je značajno sa aspekta identifikacije biorelevantnih specifikacija za ispitivanje brzine oslobađanja nifedipina iz ispitivanih preparata i primene uspostavljenog modela *in vitro* – *in vivo* korelacije u različitim fazama razvoja i proizvodnje lekovitog preparata u cilju obezbeđenja kvaliteta, i posledično efikasnosti i bezbednosti leka.

9. LITERATURA

Abrahamsson B. 2000. Dissolution Testing in the Development of Oral Drug Products, Dressman J.B., Lennernas H. Oral Drug Absorption, Prediction and Assessment, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 197-228.

Abrahamsson B., Albery T., Eriksson A., Gustafsson I., Sjöberg M. 2004. Food effects on tablet disintegration. *Eur. J. Pharm. Sci.* 22, 165-172.

Abrahamsson B., Alpsten M., Bake B., Jonsson U. E., Eriksson-Lepkowska M., Larsson A. 1998. Drug absorption from nifedipine hydrophilic matrix extended-release (ER) tablet – comparison with an osmotic pump tablet and effect of food. *J. Control. Rel.* 52, 301-310.

Abrahamsson B., Roos K., Sjogren J. 1999. Investigation of prandial effects on hydrophilic matrix tablets. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25(6), 765-771.

Abrahamsson B., Ungell A.L. 2009. Biopharmaceutical support in formulation development. Gibson M. *Pharmaceutical preformulation and formulation: a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form*, Informa Healthcare USA Inc., 247-288.

Abuasal B.S., Bolger M.B., Walker D.K., Kaddoumi A. 2012. In silico modeling for the nonlinear absorption kinetics of UK-343,664: a P-gp and CYP3A4 substrate. *Mol. Pharm.* 9, 492-504.

Adkin D.A., Davis S.S., Sparrow R.A., Huckle P.D., Phillips A.J., Wilding I.R. 1995. The effects of pharmaceutical excipients on small intestinal transit. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 39, 381-387.

Agoram B., Woltosz W.S., Bolger M.B. 2001. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50, S41-S67.

Ahsan C.H., Renwick A.G., Waller D.G., Challenor V.F., George C.F., Amanullah M. 1993. The influence of dose and ethnic on the pharmacokinetics of nifedipine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 54, 329-338.

Amidon G.L., Lennernas H., Shah V.P., Crison J.R. 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 12, 413-420.

Amidon K.S., Langguth P., Lennernas H., Yu L., Amidon G.L. 2011. Bioequivalence of oral products and the biopharmaceutics classification system: science, regulation and public policy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 90(3), 467-470.

Armstrong J., Challenor V. F., Macklin B. S., Renwick A.G., Waller D. G. 1997. The influence of two types of meal on the pharmacokinetics of a modified-release formulation of nifedipine (Adalat Retard). *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 53, 141-143.

Badawy S.I.F., Hussain M.A. 2007. Microenvironmental pH modulation in solid dosage forms. *J. Pharm. Sci.* 96, 948-959.

Balimane P.V., Chong S. 2008. Evaluation of Permeability and P-glycoprotein Interactions: Industry Outlook, Krishna R., Yu L. *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*, Springer, 101-138.

Banzet O., Colin J.N., Thibonnier M., Singlas E., Alexandre J.M., Corvol P. 1983. Acute antihypertensive effect and pharmacokinetics of a tablet preparation of nifedipine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24, 145-150.

Basheer I.A., Hajmeer M. 2000. Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. *J. Microbiol. Meth.* 43, 3-31.

Belič A., Grabnar I., Belič I., Karba R., Mrhar A. 2005. Predicting the anti-hypertensive effect of nitrendipine from plasma concentration profiles using artificial neural networks. *Computers in Biology and Medicine* 35, 892-904.

Bergstrand M., Söderlind E., Eriksson U.G., Weitschies W., Karlsson M.O. 2012. A Semi-mechanistic Modeling Strategy for Characterization of Regional Absorption Properties and Prospective Prediction of Plasma Concentrations Following Administration of New Modified Release Formulations. *Pharm. Res.* 29, 574-584.

Bhardwaj R.K., Herrera-Ruiz D.R., Xu Y., Carl S.M., Cook T.J., Vorsa N., Knipp G.T. 2008. Intestinal transporters in drug absorption. Krishna R., Yu L. *Biopharmaceutics applications in drug development.* Springer, 175-261.

Blanquet S., Zeijdner E., Beyssac E., Meunier J-P., Denis S., Havenaar R., Alric M. 2004. A Dynamic Artificial Gastrointestinal System for Studying the Behavior of Orally Administered Drug Dosage Forms Under Various Physiological Conditions. *Pharm. Res.* 21(4), 585-591.

Blume H., Mutschler E. 1996. Bioäquivalenz, Qualitätsbewertung wirkstoffgleicher Fertigarzneimittel, Teil III: Nifedipin Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag, Frankfurt/Main-Eschborn

Bode H., Brendel E., Ahr G., Fuhr U., Harder S., Staib A.H. 1996. Investigation of nifedipine absorption in different regions of the human gastrointestinal (GI) tract after simultaneous administration of ¹³C- and ¹²C-nifedipine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 50, 195-201.

Bouzom F., Ball K., Perdaems N., Walther B. 2012. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling tools: how to fit our needs? *Biopharm. Drug Dispos.* 33, 55-71.

Brouwers J., Anneveld B., Goudappel G-J., Duchateau G., Annaert P., Augustijns P., Zeijdner E. 2011. Food-dependent disintegration of immediate release fosamprenavir tablets: In vitro evaluation using magnetic resonance imaging and a dynamic gastrointestinal system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77, 313-319.

Brouwers J., Augustijns P. 2014. Resolving intraluminal drug and formulation behavior: gastrointestinal concentration profiling in humans. *Eur. J. Pharm. Sci.* 61, 2-10.

Bujard A., Voirol H., Carrupt P.A., Schappler J. 2015. Modification of a PAMPA model to predict passive gastrointestinal absorption and plasma protein binding. *Eur. J. Pharm. Sci.* 77, 273-278.

Butler J.M., Dressman J.B. 2010. The Developability Classification System: Application of Biopharmaceutics Concepts to Formulation Development. *J. Pharm. Sci.* 99(12), 4940-4954.

Cao X., Yu L.X., Sun D. 2008. Drug Absorption Principles, Krishna R., Yu L. *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*, Springer, 75-100.

Challenor V., Waller D. G., Gruchy B. S., Renwick A. G., George C. F., McMurdo E. T., McEwen J. 1986. The effect of food and posture on the pharmacokinetics of a biphasic release preparation of nifedipine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 22, 565-570.

Charman W.N., Porter C.J.H., Mithani S., Dressman J.B. 1997. Physicochemical and Physiological Mechanisms for the Effects of Food on Drug Absorption: The Role of Lipids and pH. *J. Pharm. Sci.* 86(3), 269-282.

Chen Y., Jin J.Y., Mukadam S., Malhi V., Kenny J.R. 2012. Application of IVIVE and PBPK modeling in prospective prediction of clinical pharmacokinetics: strategy and approach during the discovery phase with four case studies. *Biopharm. Drug Dispos.* 33, 85-98.

Chen Y., McCall T.W., Baichwal A.R., Meyer M.C. 1999. The application of an artificial neural network and pharmacokinetic simulations in the design of controlled-release dosage forms. *J. Control. Rel.* 59, 33-41.

Clarysse S., Brouwers J., Tack J., Annaert P., Augustijns P. 2011. Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: Comparison with solubility in human intestinal fluids. *Eur. J. Pharm. Sci.* 43, 260-269.

Croom K.F., Wellington K. 2006. Modified-release nifedipine. A review of the use of modified-release formulations in treatment of hypertension and angina pectoris. *Drugs* 66(4), 497-528.

Custodio J.M., Wu C.Y., Benet L.Z. 2008. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv. Drug Del. Rev.* 60, 717-733.

Davit B.M., Conner D.P. 2008. Food Effects on Drug Bioavailability: Implications for New and Generic Drug Development, Krishna R., Yu L. *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*, Springer, 317-335.

De Buck S.S., Sinha V.K., Fenu L.A., Nijssen M.J, Mackie C.E., Gilissen R.A.H.J. 2007. Prediction of Human Pharmacokinetics Using Physiologically Based Modeling: A Retrospective Analysis of 26 Clinically Tested Drugs. *Drug Metab. Dispos.* 35(10), 1766-1780.

di Cagno M., Bibi H.A., Bauer-Brandl A. 2015. New biomimetic barrier Permeapad™ for efficient investigation of passive permeability of drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 73, 29-34.

Dowell J.A., Hussain A., Devane J., Young D. 1999. Artificial neural networks applied to the in vitro–in vivo correlation of an extended-release formulation: initial trials and experience. *J. Pharm. Sci.* 88, 154-160.

Dressman J. 2014. Evolution of dissolution media over the last twenty years. *Dissolution Technol.* 21, 6-10.

Dressman J.B., Vertzoni M., Goumas K., Reppas C. 2007. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 591-602.

EMA, 2014. Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms, EMA/CHMP/EWP/280/96 Corr1

EMA/CHMP, 2010. Guideline on the investigation of bioequivalence, Doc. Ref: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr **

FDA, 2014. Guidance for industry, Bioavailability and bioequivalence studies submitted in NDAs or INDs, General considerations, draft guidance

FDA/CDER Guidance for Industry. 1997. Extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of *in vitro/in vivo* correlations.

FDA/CDER, 2002. Guidance for Industry: Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies.

Fei Y., Kostewicz E.S., Sheu M.T., Dressman J.B. 2013. Analysis of the enhanced oral bioavailability of fenofibrate lipid formulations in fasted humans using an *in vitro*–*in silico*–*in vivo* approach. Eur. J. Pharm. Biopharm. 85, 1274-1284.

Fleisher D., Li C., Zhou Y., Pao L.H., Karim A. 1999. Drug, Meal and Formulation Interactions Influencing Drug Absorption After Oral Administration: Clinical Implications. Clin. Pharmacokinet. 36(3), 233-254.

Galia E., Nicolaidis E., Horter D., Lobenberg R., Reppas C., Dressman J.B. 1998. Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting *In Vivo* Performance of Class I and II Drugs. Pharm. Res. 15(5), 698-705.

Garbacz G., Rappen G.M., Koziolk, M., Weitschies W. 2015. Dissolution of mesalazine modified release tablets under standard and biorelevant test conditions. J. Pharm. Pharmacol. 67, 199-208.

Genser D. 2008. Food and Drug Interaction: Consequences for the Nutrition/Health Status. Annals of Nutrition & Metabolism 52, 29-32.

Goole J., Lindley D.J., Roth W., Carl S.M., Amighi K., Kauffmann J.M., Knipp G.T. 2010. The effects of excipients on transporter mediated absorption. Int. J. Pharm. 393, 17-31.

- Grundy J.S., Foster R.T. 1996. The nifedipine gastrointestinal therapeutic system (GITS): Evaluation of pharmaceutical, pharmacokinetic and pharmacological properties. *Clin. Pharmacokinet.* 30, 28-51.
- Gu C.H., Li H., Levons J., Lentz K., Gandhi R.B., Raghavan K., Smith R.L. 2007. Predicting effect of food on extent of drug absorption based on physicochemical properties. *Pharm. Res.* 24(6), 1118-1130.
- Hecq J., Deleers M., Fanara D., Vranckx H., Amighi K. 2005. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. *Int. J. Pharm.* 299, 167-177.
- Hirasawa K., Shen W. F., Kelly D.T., Roubin G., Tateda K., Shibata J. 1985. Effect of food ingestion on nifedipine absorption and haemodynamic response. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 28, 105-107.
- Horter D., Dressman J.B. 2001. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 75-87.
- Hu M., Li Y., Davitt C.M., Huang S.M., Thummel K., Penman B.W., Crespi C.L. 1999. Transport and metabolic characterization of Caco-2 cells expressing CYP3A4 and CYP3A4 plus oxidoreductase. *Pharm. Res.* 16, 1352-1359.
- Huang W., Lee S.L., Yu L.X. 2009. Mechanistic approaches to predicting oral drug absorption. *The AAPS Journal* 11(2), 217-224.
- Ibrić S., Jovanović M., Đurić Z., Parojčić J., Solomun, Lj. 2002. The application of generalized regression neural network in the modeling and optimization of aspirin extended release tablets with Eudragit[®] RS PO as matrix substance. *J. Control. Rel.* 82, 213-222.
- Ichikawa H. 2003. Hierarchy neural networks as applied to pharmaceutical problems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1119-1147.

Jamei M., Turner D., Yang J., Neuhoff S., Polak S., Rostami-Hodjegan A., Tucker G. 2009. Population-based mechanistic prediction of oral drug absorption. *The AAPS Journal* 11(2), 225-237.

Jantratid E., De Maio V., Ronda E., Mattavelli V., Vertzoni M., Dressman J.B. 2009b. Application of biorelevant dissolution tests to the prediction of in vivo performance of diclofenac sodium from an oral modified-release pellet dosage form. *Eur J. Pharm. Sci.* 37, 434-441.

Jantratid E., Dressman J.B., 2009a. Biorelevant dissolution media simulating the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Dissolution Technol.* 16(3), 21-25.

Jantratid E., Janssen N., Chokshi H., Tang K., Dressman J.B. 2008b. Designing biorelevant dissolution tests for lipid formulations: Case example – Lipid suspension of RZ-50. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 776-785.

Jantratid E., Janssen N., Reppas C., Dressman J.B. 2008a. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm. Res.* 25(7), 1663-1676.

Jiang W., Kim S., Zhang X., Lionberger R.A., Davit B.M., Conner D.P., Yu L.X. 2011. The role of predictive biopharmaceutical modeling and simulation in drug development and regulatory evaluation. *Int. J. Pharm.* 418, 151-160.

Johansson F., Paterson R. 2008. Physiologically Based in Silico Models for the Prediction of Oral Drug Absorption, Ehrhardt C., Kim K. J. *Drug Absorption Studies*, Springer, 486-509.

Johnson S.R., Zheng W. 2006. Recent Progress in the Computational Prediction of Aqueous Solubility and Absorption. *The AAPS Journal*, 8(1), 27-40.

Jones H.M., Parrott N., Ohlenbusch G., Lave T. 2006. Predicting pharmacokinetic food effects using biorelevant solubility media and physiologically based modelling, *Clin. Pharmacokinet* 45(12), 1213-1226.

Juenemann D., Jantratid E., Wagner C., Reppas C., Vertzoni M., Dressman J.B. 2011. Biorelevant in vitro dissolution testing of products containing micronized or nanosized fenofibrate with a view to predicting plasma profiles. *Eur J. Pharm. Biopharm.* 77, 257-264.

Kalantzi L., Goumas K., Kalioras V., Abrahamsson B., Dressman J.B., Reppas C. 2006b. Characterization of the Human Upper Gastrointestinal Contents Under Conditions Simulating Bioavailability/Bioequivalence Studies. *Pharm. Res.* 23(1), 165-176.

Kalantzi L., Persson E., Polentarutti B., Abrahamsson B., Goumas K., Dressman J.B. Reppas C. 2006a. Canine Intestinal Contents vs. Simulated Media for the Assessment of Solubility of Two Weak Bases in the Human Small Intestinal Contents. *Pharm. Res.* 23(6), 1373-1381.

Kambayashi A., Blume H., Dressman J. 2013. Understanding the in vivo performance of enteric coated tablets using an in vitro - in silico - in vivo approach: case example diclofenac. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 1337-1347.

Khadra I., Zhou Z., Dunn C., Wilson C.G., Halbert G. 2015. Statistical investigation of simulated intestinal fluid composition on the equilibrium solubility of biopharmaceutics classification system class II drugs *Eur. J. Pharm. Sci.* 67, 65-75.

Kirsten R., Nelson K., Kirsten D., Heintz B. 1998. Clinical pharmacokinetics of vasodilators, part I. *Clin. Pharmacokinet.* 34 (6), 457-482.

Klein S. 2009. Predicting food effects on drug release from extended-release oral dosage forms containing a narrow therapeutic index drug. *Dissolution Technol.* 16(3), 28-38.

Klein S. 2010. The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the In Vivo Performance of a Drug. *The AAPS Journal* 12(3), 397-406.

Kostewicz E.S, Abrahamsson B., Brewster M., Brouwers J., Butler J., Carlert S., Dickinson P.A., Dressman J., Holm R., Klein S., Mann J., McAllister M., Minekus M., Muenster U., Müllertz A., Verwei M., Vertzoni M., Weitschies W., Augustijns P. 2014a.

In vitro models for the prediction of *in vivo* performance of oral dosage forms. Eur. J. Pharm. Sci. 57, 342-366.

Kostewicz E.S, Aarons L., Bergstrand M., Bolger M.B., Galetin A., Hatley O., Jamei M., Lloyd R., Pepin X., Rostami-Hodjegan A., Sjögren E., Tannergren C., Turner D.B, Wagner C., Weitschies W., Dressman J. 2014b. PBPK models for the prediction of *in vivo* performance of oral dosage forms. Eur. J. Pharm. Sci. 57, 300-321.

Kostewicz E.S., Brauns U., Becker R., Dressman J.B. 2002. Forecasting the Oral Absorption Behavior of Poorly Soluble Weak Bases Using Solubility and Dissolution Studies in Biorelevant Media. Pharm. Res. 19(3), 345-349.

Koziolok M., Garbacz G., Neumann M., Weitschies W. 2013. Simulating the postprandial stomach: physiological considerations for dissolution and release testing. Mol Pharmaceutics 10, 1610-1622.

Koziolok M., Gorke K., Neumann M., Garbacz G., Weitschies W. 2014. Development of a bio-relevant dissolution test device simulating mechanical aspects present in the fed stomach. Eur. J. Pharm. Sci. 57, 250-256.

Lee S.L., Raw A.S., Yu L. 2008. Dissolution Testing, Krishna R., Yu L. Biopharmaceutics Applications in Drug Development, Springer, 47-74.

Lennernas H. 2000. Human Perfusion Studies, Dressman J.B., Lennernas H. Oral Drug Absorption, Prediction and Assessment, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 99-117.

Lennernas H. 2014. Regional intestinal drug permeation: Biopharmaceutics and drug development. Eur. J. Pharm. Sci. 57, 333-341.

Lennernas H., Aarons L., Augustijns P., Beato S., Bolger M., Box K., Brewster M., Butler J., Dressman J., Holm R., Julia Frank K., Kendall R., Langguth P., Sydor J., Lindahl A., McAllister M., Muenster U., Mullertz A., Ojala K., Pepin X., Reppas C., Rostami-Hodjegan A., Verwei M., Weitschies W., Wilson C., Karlsson C., Abrahamsson

B. 2014. Oral biopharmaceutics tools – Time for a new initiative – An introduction to the IMI project OrBiTo. *Eur. J. Pharm. Sci.* 57, 292-299.

Lentz K.A. 2008. Current methods for predicting human food effects. *The AAPS Journal* 10, 282-288.

Levina M., Vuong H., Rajabi-Siahboomi, A.R. 2007. The influence of hydro-alcoholic media on hypromellose matrix systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33, 1125-1134.

Li S., Royce A.E., Serajuddin A.T.M. 2008. *In vitro – in vivo* correlation in dosage form development: case studies. Krishna R., Yu L. *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*, Springer, 359-382.

Lindahl A., Ungell A-L., Knutson L., Lennernas H. 1997. Characterization of Fluids from the Stomach and Proximal Jejunum in Men and Women. *Pharm. Res.* 14(4), 497-502.

Lobenberg R., Kramer J., Shah V.P. Amidon G.A., Dressman J.B. 2000. Dissolution Testing as a Prognostic Tool for Oral Drug Absorption: Dissolution Behavior of Glibenclamide. *Pharm. Res.* 17(4), 439-444.

Loo J.C., Riegelman S. 1968. New method for calculating the intrinsic absorption rate of drugs. *J. Pharm. Sci.* 57(6), 918-928.

Lue B.M., Nielsen F.S., Magnussen T., Schou H.M., Kristensen K., Jacobsen L.O., Mullertz A. 2008. Using biorelevant dissolution to obtain IVIVC of solid dosage forms containing a poorly-soluble model compound. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 648-657.

Makropoulos C., Andreas C.J., Vertzoni M., Dressman J., Reppas C. 2015. *In-vitro* simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93, 173-182.

Marasanapalle V.P., Crison J.R., Ma J., Li X., Jasti B.R. 2009. Investigation of some factors contributing to negative food effects. *Biopharm. Drug Dispos.* 30, 71-80.

Mathias M., Xu Y., Vig B., Kestur U., Saari A., Crison J., Desai D., Vanarase A., Hussain M. 2015. Food effect in humans: predicting the risk through *in vitro* dissolution and *in vivo* pharmacokinetic models. The AAPS Journal 17, 988-998.

McConnell E.L., Fadda H.M., Basit A.W. 2008. Gut instincts: Explorations in intestinal physiology and drug delivery. Int. J. Pharm. 364, 213-226.

Meredith P.A. 2007. The unique Adalat story – nifedipine gastrointestinal therapeutic system. Eur. Cardiovasc. Dis. 1, 2-7.

Mirza T., Bykadi S.A., Ellison C.D., Yang Y., Davit B.M., Khan M.A., 2013. Use of *in vitro*–*in vivo* correlation to predict the pharmacokinetics of several products containing a BCS class 1 drug in extended release matrices. Pharm. Res. 30, 179-190.

Mudie D.M., Amidon G.L., Amidon G.E. 2010. Physiological parameters for oral delivery and *in vitro* testing. Mol. Pharmaceutics 7(5), 1388-1405.

Nemes K.B., Horvath V., Grezal G., Horvai G., Hrabeczy-Pall A., Kocsi E., Drabant S., Csorgo M., Rencez G., Klebovich I. 1998. Food interaction pharmacokinetic study of Cordaflex 20 mg retard film tablet in healthy volunteers. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 36, 263-269.

Ochs H.R., Ramsch K.D., Verburg-Ochs B., Greenblatt D.J., Gerloff J. 1984. Nifedipine: kinetics and dynamics after single oral doses. Klin. Wochenschr. 62, 427-429.

Olivares-Morales A., Lennernas H., Aarons L., Rostami-Hodjegan A. 2015. Translating human effective jejunal intestinal permeability to surface-dependent intrinsic permeability: a pragmatic method for a more mechanistic prediction of regional oral drug absorption. The AAPS Journal 17, 1177-1192.

Paixao P., Gouveia L.F., Morais J.A.G. 2009. Prediction of drug distribution within blood. Eur. J. Pharm. Sci. 36, 544-554.

- Panakanti R., Narang A.S. 2012. Impact of excipient interactions on drug bioavailability from solid dosage forms. *Pharm Res.* 29, 2639-2659.
- Parojčić J., Ibrić S., Đurić Z., Jovanović M., Corrigan O.I. 2007. An investigation into the usefulness of generalized regression neural network analysis in the development of level A in vitro–in vivo correlation. *Eur J. Pharm. Sci.* 30, 264-272.
- Parojčić J., Vasiljević D., Ibrić S., Đurić Z. 2008. Tablet disintegration and drug dissolution in viscous media: Paracetamol IR tablets. *Int. J. Pharm.* 355, 93-99.
- Parrott N., Lave T. 2002. Prediction of intestinal absorption: comparative assessment of GASTROPLUS™ and IDEA™. *Eur. J. Pharm. Sci.* 17, 51–61.
- Parrott N., Lukacova V., Fraczekiewicz G., Bolger M.B. 2009. Predicting Pharmacokinetics of Drugs Using Physiologically Based Modeling - Application to Food Effects. *The AAPS Journal* 11(1), 45-53.
- Patel N., Polak S., Jamei M., Rostami Hodjegan A., Turner D.B. 2014. Quantitative prediction of formulation-specific food effects and their population variability from in vitro data with the physiologically-based ADAM model: A case study using the BCS/BDDCS Class II drug nifedipine. *Eur. J. Pharm. Sci.* 57, 240-249.
- Petrović J., Ibrić S., Betz, G., Parojčić J., Đurić Z. 2009. Application of dynamic neural networks in the modeling of drug release from polyethylene oxide matrix tablets. *Eur. J. Pharm. Sci.* 38, 172-180.
- Piovella C. 1987. Clinical efficacy and bioavailability of a sustained release nifedipine formulation. *Arzneimittelforschung.* 37(7), 832-835.
- Prisant L.M., Elliott W.J. 2003. Drug delivery systems for treatment of systemic hypertension. *Clin. Pharmacokinet.* 42 (11), 931-940.

Radwan A., Amidon G.L., Langguth P. 2012. Mechanistic investigation of food effect on disintegration and dissolution of BCS class III compound solid formulations: the importance of viscosity. *Biopharm. Drug Dispos.* 33, 403–416.

Radwan A., Wagner M., Amidon G.L., Langguth P. 2014. Bio-predictive tablet disintegration: Effect of water diffusivity, fluid flow, food composition and test conditions. *Eur J. Pharm. Sci.* 57, 273-279.

Rashid T.J., Martin U., Clarke H., Waller D.G., Renwick A.G., George C.F. 1995. Factors affecting the absolute bioavailability of nifedipine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 40, 51-58.

Raw A.S., Lionberger R., Yu L.X. 2011. Pharmaceutical Equivalence by Design for Generic Drugs: Modified-Release Products. *Pharm. Res.* 28, 1445-1453.

Ren X., Mao X., Si L., Cao L., Xiong H., Qiu J., Schimmer A.D., Li G. 2008. Pharmaceutical excipients inhibit cytochrome P450 activity in cell free systems and after systemic administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 279-288.

Rowland M., Peck C., Tucker G. 2011. Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 45-73.

Sažetak karakteristika leka Adalat, tablete sa modifikovanim oslobađanjem, Bayer plc, datum revizije 12.04.2012. (www.medicines.org.uk)

Schmidt L.E., Dalhoff K. 2002. Food-Drug Interactions. *Drugs* 62(10), 1481-1502.

Schug B.S., Brendel E., Wolf D., Wonnemann M., Wargenau M., Blume H.H. 2002a. Formulation-dependent food effects demonstrated for nifedipine modified-release preparations marketed in the European Union. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 279-285.

Schug, B. S., Brendel, E., Wonnemann, M., Wolf, D., Wargenau, M., Dingler, A., Blume, H. H., 2002b. Dosage form-related food interaction observed in a marketed once-daily

nifedipine formulation after a high-fat American breakfast. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 58, 119-125.

Schug B. S., Brendel E., Chantraine E., Wolf D., Martin W., Schall R., Blume H. H. 2002c. The effect of food on the pharmacokinetics of nifedipine in two slow release formulations: pronounced lag-time after a high fat breakfast. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 53, 582-588.

Selen A., Cruanes M.T., Mullertz A., Dickinson P.A., Cook J.A., Polli J.E., Kesisoglou F., Crison J., Johnson K.C., Muirhead G.T., Schofield T., Tsong Y. 2010. Meeting Report: Applied Biopharmaceutics and Quality by Design for Dissolution/Release Specification Setting: Product Quality for Patient Benefit. *The AAPS Journal* 12(3), 465-472.

Shaffer C.L., Scialis R.j., Rong H., Obach R.S. 2012. Using Simcyp to project human oral pharmacokinetic variability in early drug research to mitigate mechanism-based adverse events. *Biopharm. Drug Dispos.* 33, 72-84.

Shargel L., Wu-Pong S., Yu A.B.C. 2005. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, peto izdanje, McGraw-Hill, 371-452.

Shono Y., Jantratid E., Janssen N., Kesisoglou F., Mao Y., Vertzoni M., Reppas C., Dressman J.B. 2009. Prediction of food effects on the absorption of celecoxib based on biorelevant dissolution testing coupled with physiologically based pharmacokinetic modeling. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73, 107-114.

Shono Y., Jantratid E., Kesisoglou F., Reppas C., Dressman J.B. 2010. Forecasting in vivo oral absorption and food effect of micronized and nanosized aprepitant formulations in humans. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76, 95-104.

Singh B.N. 1999. Effects of Food on Clinical Pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* 37(3), 213-255.

Singh B.N. 2005. A quantitative approach to probe the dependence and correlation of food-effect with aqueous solubility, dose/solubility ratio, and partition coefficient (Log P) for orally active drugs administered as immediate-release formulations. *Drug Dev. Res.* 65, 55-75.

Sjogren E., Abrahamsson B., Augustijns P., Becker D., Bolger M., Brewster M., Brouwers J., Flanagan T., Harwood M., Heinen C., Holm R., Juretschke H.P., Kubbinga M., Lindahl A., Lukasova V., Muenster U., Neuhoff S., Nguyen M.A., van Peer A., Reppas C., Rostami-Hodjegan A., Tannergren C., Weitschies W., Wilson C., Zane P., Lennernas H., Langguth P. 2014. *In vivo* methods for drug absorption – Comparative physiologies, model selection, correlations with *in vitro* methods (IVIVC), and applications for formulation/API/excipient characterization including food effects. *Eur. J. Pharm. Sci.* 57, 99-151.

Smith A.P., Moore T.W., Westenberger B.J., Doub W.H. 2010. In vitro dissolution of oral modified-release tablets and capsules in ethanolic media. *Int. J. Pharm.* 398, 93-96.

Souliman S., Beyssac E., Cardot J-M., Denis S., Alric M. 2007. Investigation of the Biopharmaceutical Behavior of Theophylline Hydrophilic Matrix Tablets Using USP Methods and an Artificial Digestive System. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33, 475-483.

Souliman S., Blanquet S., Beyssac E., Cardot J-M. 2006. A level A in vitro/in vivo correlation in fasted and fed states using different methods: Applied to solid immediate release oral dosage form. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 72-79.

Sun Y., Peng Y., Chen Y., Shukla A.J. 2003. Application of artificial neural networks in the design of controlled release drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1201-1215.

Sutton S.C. 2009. Role of Physiological Intestinal Water in Oral Absorption. *The AAPS Journal* 11(2), 277-285.

Thelen K., Jantravid E., Dressman J.B., Lippert J., Willmann S. 2010. Analysis of nifedipine absorption from soft gelatin capsules using PBPK modeling and biorelevant dissolution testing. *J. Pharm. Sci.* 99, 2899-2904.

Toal C.B. 2004. Formulation dependent pharmacokinetics – does the dosage form matter for nifedipine? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44, 82-86.

Tolle K.M., Chen H., Chow H-H. 2000. Estimating drug/plasma concentration levels by applying neural networks to pharmacokinetic data sets. *Decision Support Systems* 30, 139-151.

Tompkins L., Lynch C., Haidar S., Polli J., Wang H. 2010. Effects of commonly used excipients on the expression of CYP3A4 in colon and liver cells. *Pharm. Res.* 27, 1703-1712.

Tong W.Q. 2008. Molecular and Physicochemical Properties Impacting Oral Absorption of Drugs, Krishna R., Yu L. *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*, Springer, 26-46.

Tröger U., Martens J., Meyer F.P., Hoffmann A., Terhaag B. 1995. Study on the bioequivalence of an oral nifedipine formulation and a sustained release reference preparation after single dose and repeated doses. *Arzneimittelforschung.* 45(12), 1266-1270.

Tsume Y., Langguth P., Garcia-Arieta A., Amidon G.L. 2012. In silico prediction of drug dissolution and absorption with variation in intestinal pH for BCS class II weak acid drugs: ibuprofen and ketoprofen. *Biopharm. Drug Dispos.* 33, 366-377.

Varum F.J.O., Hatton G.B., Basit A.W. 2013. Food, physiology and drug delivery. *Int. J. Pharm.* 457, 446-460.

Varum F.J.O., Merchant H.A., Basit A.W. 2010. Oral modified-release formulations in motion: The relationship between gastrointestinal transit and drug absorption. *Int. J. Pharm.* 395, 26-36.

Vertzoni M., Diakidou A., Chatziliadis M., Söderlind E., Abrahamsson B., Dressman J.B., Reppas C. 2010. Biorelevant Media to Simulate Fluids in the Ascending Colon of Humans and Their Usefulness in Predicting Intracolonic Drug Solubility. *Pharm. Res.* 27, 2187-2196.

Vertzoni M., Dressman J., Butler J., Hempenstall J., Reppas C. 2005. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60, 413-417.

Wagner C., Jantratid E., Kesisoglou F., Vertzoni M., Reppas C., Dressman J.B. 2012. Predicting the oral absorption of a poorly soluble, poorly permeable weak base using biorelevant dissolution and transfer model tests coupled with a physiologically based pharmacokinetic model. *Eur J. Pharm. Biopharm.* 82, 127-138.

Wagner C., Thelen K., Willmann S., Selen A., Dressman J.B. 2013. Utilizing in vitro and PBPK tools to link ADME characteristics to plasma profiles: case example nifedipine immediate release formulation. *J. Pharm. Sci.* 102, 3205-3219.

Wagner J.G., Nelson E. 1963. Percent absorbed time plots derived from blood level and/or urinary excretion data. *J. Pharm. Sci.* 52, 610-611.

Walden M., Nicholls F.A., Smith K.J., Tucker G.T. 2007. The effect of ethanol on the release of opioids from oral prolonged-release preparations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33, 1101-1111.

Washington N., Washington C., Wilson C.G. 2002. *Physiological Pharmaceutics, Barriers to drug absorption*, drugo izdanje, Taylor and Francis.

Wei H., Lobenberg R. 2006. Biorelevant dissolution media as a predictive tool for glyburide a class II drug. *Eur. J. Pharm. Sci.* 29, 45-52.

Weitschies W., Hartmann V., Grutzmann R., Breitzkreutz J. 2001. Determination of the disintegration of magnetically marked tablets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 221-226.

Weitschies W., Kosch O., Monnikes H., Trahms L. 2005a. Magnetic Marker Monitoring: An application of biomagnetic measurement instrumentation and principles for the determination of the gastrointestinal behavior of magnetically marked solid dosage forms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1210-1222.

Weitschies W., Wedemeyer R.S., Kosch O., Fach K., Nagel S., Soderlind E., Trahms L., Abrahamsson B., Monnikes H. 2005b. Impact of the intragastric location of extended release tablets on food interactions. *J. Control. Rel.* 108, 375-385.

Welling P.G. 1989. Effects of food on drug absorption. *Pharmac. Ther.* 43, 425-441.

Williams H.D., Ward R., Hardy I.J., Melia C.D. 2009. The extended release properties of HPMC matrices in the presence of dietary sugars. *J. Control. Rel.* 138, 251-259.

Wilson C.G. 2000. *Gastrointestinal Transit and Drug Absorption*, Dressman J.B., Lennernas H. *Oral Drug Absorption, Prediction and Assessment*, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 1-9.

Wilson C.G. 2010. The transit of dosage forms through the colon. *Int. J. Pharm.* 395, 17-25.

Wonnemann, M., Schug, B. S., Anschutz, M., Brendel, E., De Nucci, G., Blume, H. H. 2008. Comparison of two marketed nifedipine modified-release formulations: an exploratory clinical food interaction study. *Clin. Ther.* 30(1), 48-58.

Wu C.Y., Benet L.Z. 2005. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a bipharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm. Res.* 22(1), 11-23.

Yu L.X., Straughn A.B., Faustino P.J., Yang Y., Parekh A., Ciavarella A.B., Asafu-Adjaye E., Mehta M.U., Conner D.P., Lesko L.J., Hussain A.S. 2004. The effect of food on the relative bioavailability of rapidly dissolving immediate-release solid oral products containing highly soluble drugs. *Mol. Pharmaceutics* 1(5), 357-362.

Yuen K.H. 2010. The transit of dosage forms through the small intestine. *Int. J. Pharm.* 395, 9-16.

Zhang X., Lionberger R.A., Davit B.M., Yu L.X. 2011. Utility of physiologically based absorption modeling in implementing Quality by Design in drug development. *The AAPS Journal* 13(1), 59-71.

Zhao P., Zhang L., Grillo J.A., Liu Q., Bullock J.M., Moon Y.J., Song P., Brar S.S., Madabushi R., Wu T.C., Booth B.P., Rahman N.A., Reynolds K.S., Gil Berglund E., Lesko L.J., Huang S.M. 2011. Applications of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation during regulatory review. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89, 259-267.

BIOGRAFIJA

Marija Ilić (Stanojević) je rođena 28.07.1976. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju sa odličnim uspehom. Farmaceutski fakultet u Beogradu je upisala školske 1995/96. godine i diplomirala 2000. godine sa prosečnom ocenom 9,87 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Od druge godine studija je bila stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije. Na petoj godini studija je dobila priznanje i nagradu Farmaceutskog fakulteta za postignut uspeh. Dobitnik je diplome i nagrade Univerziteta u Beogradu za studenta generacije Farmaceutskog fakulteta u 2000. godini i diplome "Prof. dr Ivan Berkeš". Pripravnički staž je obavila u Apotekarskoj ustanovi Beograd i stručni ispit položila 2002. godine.

Poslediplomske studije iz farmaceutske tehnologije je upisala školske 2001/02. godine. Zvanje magistra farmaceutskih nauka je stekla u julu 2005. godine odbranom magistarskog rada pod nazivom "Farmaceutsko-tehnološka karakterizacija hidrogela poli(akrilamida-ko-itakonske kiseline) kao potencijalnih nosača lekovitih supstanci".

Od januara 2001. do novembra 2005. godine je bila zaposlena na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu kao saradnik i asistent-pripravnik u Institutu za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju. U Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije je radila od novembra 2005. do aprila 2010. godine, kao viši stručni saradnik u Farmaceutskom sektoru i Nacionalnom centru za farmakovigilancu, na poslovima ekspertske procene dokumentacije o kvalitetu i bezbednosti lekova i studija/zahteva za izostavljanje bioekvivalencije. Bila je član nacionalne Komisije za obnovu dozvola za lekove i Komisije za farmakopeju. Učestvovala je u radu Komisija za stavljanje humanih i biljnih i tradicionalnih lekova u promet. Od aprila 2010. godine radi u kompaniji PharmaSwiss d.o.o., Beograd u zvanju menadžera za registraciju proizvoda.

Marija Ilić je autor 3 naučna rada objavljena u međunarodnim časopisima, koautor 3 naučna rada objavljena u nacionalnim časopisima i autor/koautor 22 saopštenja prezentovanih na međunarodnim i domaćim skupovima.

IZJAVA O AUTORSTVU

Izjavljujem da u doktorskom radu pod nazivom „Primena *in vitro* i *in silico* metoda za predviđanje lek - hrana interakcije: tablete sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina“ nema delova kojima se narušavaju autorska prava drugih osoba.

U Beogradu, 04.12.2015.

Marija Ilić, magistar farmaceutskih nauka

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE
DOKTORSKOG RADA**

Izjavljujem da su obe verzije doktorskog rada pod nazivom „Primena *in vitro* i *in silico* metoda za predviđanje lek - hrana interakcije: tablete sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina“, štampana i elektronska, identične.

U Beogradu, 04.12.2015.

Marija Ilić, magistar farmaceutskih nauka

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovom izjavom ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da disertaciju pod nazivom „Primena *in vitro* i *in silico* metoda za predviđanje lek - hrana interakcije: tablete sa modifikovanim oslobađanjem nifedipina“ čuva u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu, te je učini dostupnom javnosti.

U Beogradu, 04.12.2015.

Marija Ilić, magistar farmaceutskih nauka
