

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Đorđe P. Medarević

**KARAKTERIZACIJA I OPTIMIZACIJA
BINARNIH I TERNARNIH ČVRSTIH
DISPERZIJA I CIKLODEKSTRIN-
POLIMER SISTEMA KAO NOSAČA U
CILJU POBOLJŠANJA BRZINE
RASTVARANJA TEŠKO RASTVORLJIVE
LEKOVITE SUPSTANCE**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Đorđe P. Medarević

**CHARACTERIZATION AND
OPTIMIZATION OF BINARY AND
TERNARY SOLID DISPERSIONS AND
CYCLODEXTRIN-POLYMER SYSTEMS
AS CARRIERS WITH THE AIM OF
IMPROVING DISSOLUTION RATE OF
POORLY SOLUBLE DRUG**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTOR

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

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc Kyriakos Kachrimanis, vanredni profesor,
Farmaceutski fakultet, Aristotelov Univerzitet u Solunu, Grčka/
*associate professor, School of Pharmacy,
Aristotle University of Thessaloniki, Greece*

Dr sc Jelena Đuriš, docent,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

Izrada ove doktorske disertacije realizovana je u okviru projekta TR34007: „Razvoj proizvoda i tehnologija koje obezbeđuju željeno oslobađanje lekovitih supstanci iz čvrstih farmaceutskih oblika”, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru ovog rada prof. dr Svetlani Ibrić za nesebičnu podršku i optimizam tokom celog toka istraživanja i korisne savete u toku procesa oblikovanja doktorske disertacije.

Izuzetnu zahvalnost dugujem prof. dr Kirjakosu Kahrmanisu za veliku podršku tokom eksperimentalnog rada, uloženi trud i korisne savete u toku pripreme publikacija.

Zahvaljujem se prof. dr Piteru Klajnebudeu na pruženoj prilici za rad na Institutu za farmaciju i biofarmaciju, Farmaceutskog fakulteta, Hajnrih Hajne Univerziteta u Dizeldorfu, Nemačka, kao i na korisnim savetima datim tokom pripreme publikacija.

Najiskrenije se zahvaljujem prof. dr Zorici Đurić na bezrezervnoj podršci tokom svih faza izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se doc. dr Jeleni Đuriš na korisnim savetima u početnim fazama eksperimentalnog rada i sugestijama vezanim za izgled doktorske disertacije.

Najiskrenije se zahvaljujem i dr. sc Aleksandru Šošiću iz kompanije BASF na izuzetnoj saradnji i obezbeđivanju supstanci neophodnih za eksperimentalni rad.

Veliku zahvalnost dugujem i dr. sc Nebojši Cvetkoviću sa Instituta za istraživanje i razvoj, Galenika a.d., Beograd, za korisne savete u eksperimentalnom radu i obezbeđivanje neophodnih supstanci za realizaciju ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr. sc Miodragu Mitriću sa Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Beograd na pomoći u analizi uzoraka primenom difrakcije X-zraka.

Zahvaljujem se kolegama doc. dr Bojanu Markoviću i dr. sc Vladimiru Dobričiću sa Katedre za farmaceutsku hemiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na pomoći u ispitivanju uzoraka primenom FT-IR spektroskopije.

Zahvaljujem se i kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na pruženoj podršci i razumevanju.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na velikoj podršci tokom celokupnog školovanja i njima posvećujem ovu doktorsku disertaciju

Karakterizacija i optimizacija binarnih i ternarnih čvrstih disperzija i ciklodekstrin-polimer sistema kao nosača u cilju poboljšanja brzine rastvaranja teško rastvorljive lekovite supstance

Rezime

Formulacija farmaceutskih oblika za peroralnu primenu sa teško rastvorljivim lekovitim supstancama predstavlja sve veći problem usled niske biološke raspoloživosti ovih supstanci koja je ograničena njihovom niskom brzinom rastvaranja. Formulacija čvrstih disperzija, u kojima je lekovita supstanca rastvorena ili dispergovana unutar polimernog matriksa, predstavlja često korišćen pristup u cilju povećanja brzine rastvaranja teško rastvorljivih lekovitim supstancama. Iako se formulacijom čvrstih disperzija često postiže značajno povećanje brzine rastvaranja teško rastvorljivih lekovitim supstancama, njihova primena je često ograničena faktorima kao što su: problemi sa obezbeđenjem dugoročne stabilnosti lekovite supstance, visok odnos lekovita supstanca:polimer i problemi sa formulacijom finalnog farmaceutskog oblika. Pored formulacije čvrstih disperzija, građenje inkluzionih kompleksa lekovitim supstancama sa ciklodekstrinima takođe predstavlja veoma efikasan pristup za povećanje brzine rastvaranja teško rastvorljivih lekovitim supstancama. Ipak, niska efikasnost kompleksiranja, uz veliku molekulsku masu ciklodekstrina često ograničava njihovu primenu na formulaciju niskodoziranih lekovitim supstancama. Brojna istraživanja se sprovode kako bi se prevazišli nedostaci primene čvrstih disperzija i lekovita supstanca-ciklodekstrin kompleksa i neki od navedenih problema su razmatrani i u ovom istraživanju.

U ovom istraživanju razmatrana je mogućnost primene čvrstih disperzija, binarnih lekovita supstanca-ciklodekstrin i ternarnih lekovita supstanca-ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema kao nosača za povećanje brzine rastvaranja karbamazepina, kao teško rastvorljive i visokodozirane lekovite supstance koja pokazuje polimorfizam.

U prvoj fazi istraživanja razmatrana je mogućnost primene binarnih čvrstih disperzija karbamazepina sa poloksamerom 188 i poloksamerom 407 u cilju povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. Disperzije su izrađivane primenom metoda topljenja u karbamazepin:poloksamer masenim odnosima 1:1, 1:2 i 1:3. Rezultati fizičko-hemijske karakterizacije primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije, polarizacije

mikroskopije na zagrejanjoj ploči i difrakcije X-zraka na prašku pokazali su da je svim uzorcima čvrstih disperzija karbamazepin prisutan u kristalnom obliku i to u termodinamički najstabilnijem polimorfnom obliku III (monoklinični oblik). Primenom FT-IR spektroskopije pokazano je odsustvo karbamazepin-poloksamer interakcija, što zajedno sa težnjom molekula karbamazepina ka međusobnoj agregaciji, uočenoj primenom simulacije molekularne dinamike predstavlja moguće objašnjenje za uočenu kristalnu prirodu karbamazepina u uzorcima. Iz svih uzoraka čvrstih disperzija postignuto je značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina. Tako se tokom prvih 10 minuta ispitivanja rastvorilo više od 80% karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa poloksamerom 188 i 57-67% karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa poloksamerom 407, dok se iz uzoraka čistog karbamazepina rastvorilo tek oko 15% ove lekovite supstance. Brže rastvaranje karbamazepina postignuto je iz čvrstih disperzija izrađenih sa poloksamerom 188, u odnosu na čvrste disperzije sa poloksamerom 407, što se objašnjava većim udelom hidrofilnih etilen oksidnih lanaca kod poloksamera 188. Sa povećanjem udela poloksamera došlo je do smanjenja brzine rastvaranja karbamazepina, što može predstavljati posledicu termoreverzibilno gelirajućih osobina poloksamera.

U drugoj fazi istraživanja, prvi put je prikazana kombinovana primena tehnika eksperimentalnog dizajna smeše i veštačkih neuronskih mreža u razvoju čvrstih disperzija. Ternarne karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrste disperzije izrađivane su metodom rastvaranja, uz variranje udela karbamazepina, Soluplus[®]-a i poloksamera 188 u okviru unapred postavljenih granica. Iz izrađenih ternarnih čvrstih disperzija postignuto je značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina, pri čemu se u toku prvih 10 minuta ispitivanja, kod 11 od 22 izrađene formulacije, rastvorilo više od 80% karbamazepina. Primenom D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše i veštačkih neuronskih mreža tipa višeslojnog perceptrona dobijeni su modeli koji dobro opisuju zavisnost između udela svih komponenata u ternarnim karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstim disperzijama i količine rastvorenog karbamazepina (%) nakon 10 (Q_{10}) i 20 (Q_{20}) minuta ispitivanja, što pokazuju dobijene vrednosti koeficijenta determinacije (R^2) iznad 0,95. Dobijeni modeli pokazali su najveći uticaj udela karbamazepina i poloksamera 188 na Q_{10} i Q_{20} , pri čemu su najviše vrednosti ovih parametara zabeležene pri najvišim udelima poloksamera 188 (20%) i najnižim udelima

karbamazepina (20%). Proverom sposobnosti predviđanja dobijenih modela na test setu podataka pokazana je bolja sposobnost predviđanja modela veštačkih neuronskih mreža ($R^2=0,978$) u odnosu na model dobijen primenom eksperimentalnog dizajna smeše ($R^2=0,741$). Fizičko-hemijskom karakterizacijom izrađenih formulacija pokazano je da je u svim uzorcima karbamazepin zastupljen u svom termodinamički najstabilnijem polimorfnom obliku III.

U trećoj fazi istraživanja ispitivana je mogućnost primene karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin binarnih i karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer ternarnih sistema u cilju povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. Ispitivanjem fazne rastvorljivosti karbamazepina pokazano je da rastvorljivost karbamazepina linearno raste (0,56-102,20 mmol/l) sa porastom koncentracije hidroksipropil- β -ciklodekstrina (0-40% m/v), dajući tzv. A_L tip dijagrama fazne rastvorljivosti, koji ukazuje na formiranje inkluzionih kompleksa karbamazepina sa hidroksipropil- β -ciklodekstrinom u stehiometrijskom odnosu 1:1. Dodatkom hidrofilnih polimera (Soluplus[®] i dva tipa hidroksipropilmetilceluloze različitog stepena substitucije i viskoziteta-Metolose[®] 90SH-100 i Metolose[®] 65SH-1500) rastvorima hidroksipropil- β -ciklodekstrina ostvaren je porast efikasnosti kompleksiranja hidroksipropil- β -ciklodekstrina za karbamazepin od 1,5 puta u odnosu na same rastvore hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Simulacijom molekularne dinamike u sistemu karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidroksipropilmetilceluloza pokazano je da dolazi do interakcija između molekula karbamazepina koji disosuju iz kompleksa sa hidroksipropil- β -ciklodekstrinom i hidroksipropilmetilceluloze. Uočene interakcije mogu sprečiti nastanak dimera karbamazepina i kristalizaciju slobodnih molekula karbamazepina iz rastvora, što predstavlja moguće objašnjenje za uočen porast rastvorljivosti karbamazepina u rastvorima hidroksipropil- β -ciklodekstrina nakon dodatka hidrofilnih polimera. Primenom tehnike sušenja raspršivanjem dobijeni su binarni karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarni karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistemi iz kojih je postignuto značajno brže rastvaranje karbamazepina, kako u odnosu na čist karbamazepin, tako i u odnosu na fizičke smeše ekvivalentnog sastava. Najveća brzina rastvaranja karbamazepina postignuta je iz formulacija binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-Soluplus[®] sistema, gde je

celokupna količina karbamazepina rastvorena već nakon 5 minuta ispitivanja. Kod formulacija izrađenih sa oba tipa hidroksipropilmetilceluloze (Metolose® 90SH-100 i Metolose® 65SH-1500) zabeleženo je nešto sporije i nepotpuno rastvaranje karbamazepina i to naročito kod formulacije izrađene sa tipom hidroksipropilmetilceluloze većeg viskoziteta (Metolose® 65SH-1500), gde je za rastvaranje više od 90% karbamazepina bilo potrebno oko 60 minuta. Fizičko-hemijskom karakterizacijom uzoraka pokazano je da je u svim formulacijama dobijenim sušenjem raspršivanjem karbamazepin prisutan u amorfnom obliku, što može ukazati na formiranje inkluzionih kompleksa sa hidroksipropil- β -ciklodekstrinom. Primenom tehnika simulacije molekularnog vezivanja karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina i simulacije molekularne dinamike pokazano je prisustvo hemijskih interakcija između molekula karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina, što je potvrđeno i primenom FT-IR spektroskopije. Uočene interakcije mogu značajno doprineti stabilizaciji nastalih inkluzionih kompleksa.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da formulacija binarnih i ternarnih čvrstih disperzija, kao i lekovita supstanca-ciklodekstrin binarnih i lekovita supstanca-ciklodekstrin-hidrofilni polimer ternarnih sistema predstavlja uspešan formulacioni pristup za povećanje brzine rastvaranja karbamazepina. Kako je karbamazepin visokodozirana supstanca, prednost se može dati formulaciji binarnih i ternarnih čvrstih disperzija, pošto sadrže visok udeo karbamazepina.

Ključne reči: ciklodekstrini, čvrste disperzije, efikasnost kompleksiranja, eksperimentalni dizajn smeše, fizičko-hemijska karakterizacija, hidrofilni polimeri, karbamazepin, povećanje brzine rastvaranja, simulacija molekularne dinamike, veštačke neuronske mreže

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

UDK broj: 616-092.4:615.015.14:004.896(043.3)

Characterization and optimization of binary and ternary solid dispersions and cyclodextrin-polymer systems as carriers with the aim of improving dissolution rate of poorly soluble drug

Abstract

Formulation of pharmaceutical dosage forms for peroral administration of poorly soluble drugs represents growing problem due to their poor bioavailability, which is limited with their low dissolution rate. Formulation of solid dispersions where drug is dissolved or dispersed within the polymeric matrix is frequently used approach for improving dissolution rate of poorly soluble drugs. Although significant improvement of drug dissolution rate is often achieved with solid dispersion formulation, their application is often limited with factors, such as problems with ensuring of long term drug stability, high drug:polymer ratios and problems with formulation of final dosage form. Besides solid dispersions formulation, formation of drug-cyclodextrin inclusion complexes is also very efficient approach for improving dissolution rate of poorly soluble drugs. However, low complexation efficiency, together with high molecular weight of cyclodextrins often limits their application on the formulations with low dose drugs. Numerous researches have been conducted to overcome aforementioned drawbacks of solid dispersions and drug-cyclodextrins complexes and some of these problems were studied in this research.

This study investigated possibility of using solid dispersions, binary drug-cyclodextrin and ternary drug-cyclodextrin-hydrophilic polymer systems, as carriers for improving dissolution rate of carbamazepine, as poorly soluble high dose drug that exhibits polymorphism.

First phase of research evaluated application of binary solid dispersions of carbamazepine with poloxamer 188 and poloxamer 407 for improving dissolution rate of carbamazepine. Solid dispersions were prepared by melting method in carbamazepine:poloxamer weight ratios of 1:1, 1:2 and 1:3. The results of physicochemical characterization obtained using differential scanning calorimetry, hot-stage polarized light microscopy and powder X-ray diffraction showed that in all solid dispersion samples, carbamazepine was present in the crystalline state, in its most stable polymorphic form III (monoclinic form). FT-IR spectroscopy showed absence of

carbamazepine-poloxamer interactions, which together with tendency of carbamazepine molecules toward aggregation, observed using molecular dynamics simulation is possible explanation for observed crystalline nature of carbamazepine in the samples. From all of the solid dispersion samples, significant increase of carbamazepine dissolution rate was observed. During the first 10 minutes of testing, more than 80% of carbamazepine was dissolved from poloxamer 188 solid dispersions and 57-67% from poloxamer 407 solid dispersions, while only 15% of carbamazepine was dissolved from the samples of pure drug. Faster carbamazepine dissolution was achieved from solid dispersions prepared with poloxamer 188, compared to solid dispersions prepared with poloxamer 407, which can be explained with higher proportion of hydrophilic ethylene oxide chains in poloxamer 188. Increasing in the proportion of poloxamer led to decreasing of carbamazepine dissolution rate and this can be consequence of thermoreversible gelation properties of poloxamers.

The second phase of the research for the first time demonstrated combined application of mixture experimental design and artificial neural networks in the solid dispersions development. Ternary carbamazepine-Soluplus[®]-poloxamer 188 solid dispersions have been prepared by solvent casting method, with variation in the proportions of carbamazepine, Soluplus[®] and poloxamer 188, within the predefined constraints. Significant increase of carbamazepine dissolution rate was achieved from ternary solid dispersions, wherein from 11 of 22 prepared formulations more than 80% of carbamazepine was dissolved during the first 10 minutes of testing. D-optimal mixture experimental design and multi layer perceptron artificial neural networks gave models that well describe dependence between proportions of all components in the ternary carbamazepine-Soluplus[®]-poloxamer 188 solid dispersions and amount of dissolved carbamazepine (%) after 10 (Q_{10}) and 20 (Q_{20}) minutes of the testing, as indicated by the coefficient of determination (R^2) higher than 0.95. Obtained models showed the largest influence of the proportions of carbamazepine and poloxamer 188 on both Q_{10} and Q_{20} , wherein the highest values of these parameters were observed with the highest proportions of poloxamer 188 (20%) and the lowest proportions of carbamazepine (20%). Testing of the predictability of the obtained models on test data set showed better predictability of artificial neural network model ($R^2=0.978$), compared to mixture experimental design model ($R^2=0.741$). Physicochemical

characterization of prepared formulations showed presence of the most stable crystalline polymorphic form III of carbamazepine in all samples.

Third phase of the research studied possibility of using binary carbamazepine-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and ternary carbamazepine-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-hydrophilic polymer systems with the aim to increase carbamazepine dissolution rate. Phase solubility study showed linear increase of carbamazepine solubility (0.56-102.20 mmol/l) with increase of hydroxypropyl- β -cyclodextrin concentration (0-40% m/v), giving A_L -type phase solubility plot that indicates formation of carbamazepine-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in 1:1 stoichiometric ratio. Addition of hydrophilic polymers (Soluplus[®] and two types of hydroxypropyl methylcellulose of different degree of substitution and viscosity-Metolose[®] 90SH-100 and Metolose[®] 65SH-1500) to hydroxypropyl- β -cyclodextrin solutions led to 1.5 times increase of complexation efficiency of hydroxypropyl- β -cyclodextrin for carbamazepine, compared to pure hydroxypropyl- β -cyclodextrin solutions. Molecular dynamics simulation in carbamazepine-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-hydroxypropyl methylcellulose system showed interactions between hydroxypropyl methylcellulose and carbamazepine molecules that dissociate from complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Observed interactions can prevent formation of carbamazepine dimers and crystallization of free carbamazepine molecules from the solution and this can be possible explanation for observed increase of carbamazepine solubility in the hydroxypropyl- β -cyclodextrin solutions upon addition of hydrophilic polymers. By using of spray drying technique, both binary carbamazepine-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and ternary carbamazepine-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-hydrophilic polymer systems were prepared, which resulted in significantly higher carbamazepine dissolution rate compared to both pure carbamazepine, as well as to physical mixtures of equivalent composition. The highest carbamazepine dissolution rate was achieved from formulations of binary carbamazepine-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and ternary carbamazepine-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-Soluplus[®] systems, where the entire amount of carbamazepine was dissolved after 5 minutes of testing. Formulations prepared with both types of hydroxypropyl methylcellulose (Metolose[®] 90SH-100 and Metolose[®] 65SH-1500) exhibit somewhat slower and incomplete carbamazepine dissolution,

particularly in the case of formulation prepared with hydroxypropyl methylcellulose type of higher viscosity (Metolose[®] 65SH-1500), where 60 minutes was necessary for dissolution of more than 90% of carbamazepine. Physicochemical characterization showed presence of amorphous carbamazepine in all formulations prepared by spray drying, which can indicate on the formation of inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Molecular docking simulation between carbamazepine and hydroxypropyl- β -cyclodextrin and molecular dynamics simulations showed presence of chemical interactions between carbamazepine and hydroxypropyl- β -cyclodextrin molecules, which was confirmed by using of FT-IR spectroscopy. Observed interactions can significantly contribute to stabilization of the resulting inclusion complexes.

Based on the obtained results, it can be concluded that formulation of binary and ternary solid dispersions as well as binary drug-cyclodextrin and ternary drug-cyclodextrin-hydrophilic polymer systems represent successful formulation approach for improving solubility of carbamazepine. Since carbamazepine is administered in high doses, preference can be given to the formulation of binary and ternary solid dispersions which contain higher carbamazepine content.

Key words: artificial neural networks, complexation efficiency, cyclodextrins, hydrophilic polymers, carbamazepine, improving drug dissolution rate, mixture experimental design, molecular dynamics simulation, physicochemical characterization, solid dispersions

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical technology

UDK number: 616-092.4:615.015.14:004.896(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Čvrste disperzije	1
1.1.1. Uvod	1
1.1.2. Definicija i klasifikacija	2
1.1.3. Metodi za izradu čvrstih disperzija.....	7
1.1.3.1. Metod topljenja.....	7
1.1.3.2. Metod rastvaranja	9
1.1.4. Najčešće korišćene pomoćne materije u izradi čvrstih disperzija	12
1.1.5. Metodi za karakterizaciju čvrstih disperzija.....	15
1.1.6. Trenutna ograničenja primene čvrstih disperzija.....	17
1.2. Ciklodekstrini	19
1.2.1. Analiza fazne rastvorljivosti u sistemu lekovita supstanca-ciklodekstrin	22
1.3. Simulacija molekularne dinamike (eng. <i>molecular dynamics simulations</i>) ..	26
1.3.1. Osnovni principi na kojima se zasniva simulacija molekularne dinamike...	26
1.3.2. Postupak izvođenja simulacije molekularne dinamike.....	27
1.4. Metodologija eksperimentalnog dizajna	31
1.4.1. Eksperimentalni dizajn smeše	33
1.5. Veštačke neuronske mreže.....	36
1.5.1. Primena veštačkih neuronskih mreža u farmaceutskoj tehnologiji	43
1.6. Karbamazepin.....	45
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	48
3. EKSPERIMENTALNI DEO	50
3.1. Formulacija i karakterizacija binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija	50
3.1.1. Materijali	50
3.1.2. Izrada binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija	50
3.1.3. Fizičko-hemijska karakterizacija binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija.....	51
3.1.3.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	51
3.1.3.2. Polarizaciona mikroskopija na zagrejanjoj ploči.....	51
3.1.3.3. Difrakcija X-zraka na prašku.....	51
3.1.3.4. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) ...	52
3.1.3.5. Simulacija molekularne dinamike	52
3.1.3.6. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija	53
3.1.4. Rezultati i diskusija	54
3.1.4.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	54
3.1.4.2. Polarizaciona mikroskopija na zagrejanjoj ploči.....	57
3.1.4.3. Difrakcija X-zraka na prašku.....	60
3.1.4.4. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) ...	61

3.1.4.5. Simulacija molekularne dinamike	63
3.1.4.6. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija	65
3.2. Formulacija i karakterizacija ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija.....	70
3.2.1. Materijali	70
3.2.2. Izrada ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija	70
3.2.3. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija.....	72
3.2.4. Ispitivanje uticaja udela komponenata ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija na brzinu rastvaranja karbamazepina	72
3.2.4.1. Eksperimentalni dizajn smeše	72
3.2.4.2. Veštačke neuronske mreže	74
3.2.5. Fizičko-hemijska karakterizacija odabranih uzoraka ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija.....	76
3.2.5.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	77
3.2.5.2. Polarizaciona mikroskopija na zagrejanoj ploči	77
3.2.5.3. Difrakcija X-zraka na prašku.....	77
3.2.5.4. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) ...	78
3.2.6. Rezultati i diskusija	78
3.2.6.1. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija.....	78
3.2.6.2. Ispitivanje uticaja udela komponenata ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija na brzinu rastvaranja karbamazepina	86
3.2.6.2.1. Eksperimentalni dizajn smeše	86
3.2.6.2.2. Veštačke neuronske mreže	92
3.2.6.3. Fizičko-hemijska karakterizacija odabranih uzoraka ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija.....	95
3.3. Formulacija i karakterizacija binarnih karbamazepin-hidroksipropil-β-ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil-β-ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema	105
3.3.1. Materijali	105
3.3.2. Ispitivanje fazne rastvorljivosti	106
3.3.3. Molekularno modelovanje	107
3.3.3.1. Simulacija molekularnog vezivanja karbamazepina i hidroksipropil-β-ciklodekstrina (eng. <i>molecular docking simulation</i>)	107
3.3.3.2. Simulacija molekularne dinamike	108
3.3.4. Izrada binarnih karbamazepin-hidroksipropil-β-ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil-β-ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema	109
3.3.5. Fizičko-hemijska karakterizacija izrađenih binarnih i ternarnih sistema	110

3.3.5.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	110
3.3.5.2. Difrakcija X-zraka na prašku.....	111
3.3.5.3. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) .	111
3.3.5.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	111
3.3.5.5. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz binarnih i ternarnih sistema.....	111
3.4. Rezultati i diskusija	112
3.4.1. Ispitivanje fazne rastvorljivosti	112
3.4.2. Simulacija interakcija u sistemu karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer tehnikama molekularnog modelovanja.....	120
3.4.3. Fizičko-hemijska karakterizacija binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin hidrofilni polimer sistema.....	125
3.4.3.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	125
3.4.3.2. Difrakcija X-zraka na prašku.....	127
3.4.3.3. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) .	128
3.4.3.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	130
3.4.3.5. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz binarnih i ternarnih sistema.....	133
4. KRITIČKI OSVRT NA DOBIJENE REZULTATE ISTRAŽIVANJA	137
5. ZAKLJUČAK	142
6. LITERATURA	147
7. PRILOZI	165
7.1. Spisak publikovanih radova i saopštenja koji čine deo doktorske disertacije...	165
7.2. Biografija autora	167

1. UVOD

1.1. Čvrste disperzije

1.1.1. Uvod

Većina novosintetisanih lekovitih supstanci pokazuje slabu rastvorljivost u vodi, što posledično može dovesti do niske biološke raspoloživosti nakon oralne primene i problema u ispoljavanju terapijskog efekta leka. Smatra se da je kod supstanci sa rastvorljivošću u vodi manjom od 100 µg/ml resorpcija ograničena brzinom rastvaranja (Hörter i Dressman, 2001), a procenjuje se da oko 40% od svih preparata sa trenutnim oslobađanjem dostupnih na tržištu sadrži upravo takve lekovite supstance (Takagi i sar., 2006). Povećanom udelu teško rastvorljivih lekovitih supstanci značajno je doprineo razvoj tehnika kombinatorne hemije i visoko efikasnih tehnika ispitivanja (eng. *high throughput screening*), koje su omogućile sintezu i ispitivanje aktivnosti velikog broja supstanci kandidata za novi lek, pri čemu su fizičko-hemijske osobine poput rastvorljivosti supstance stavljene u drugi plan (Lipinski i sar., 2001). Kako je, zajedno sa permeabilnošću, rastvorljivost najznačajnija karakteristika lekovite supstance koja utiče na njenu biološku raspoloživost nakon peroralne primene, razvoj formulacija sa teško rastvorljivim lekovitim supstancama predstavlja jedan od najvećih izazova sa kojima se susreće farmaceutska industrija (Leuner i Dressman, 2000).

Porast broja teško rastvorljivih lekovitih supstanci uporedno je praćen i sve intenzivnijim razvojem tehnika za poboljšanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja takvih lekovitih supstanci. Jedan od načina za poboljšanje rastvorljivosti teško rastvorljivih lekovitih supstanci predstavlja njihova hemijska modifikacija, što se može postići građenjem soli ili rastvorljivih prolekova. Iako se često primenjuje, tehnika građenja soli nosi sa sobom rizik od rekonverzije u početni slabo rastvorljivi kiseli ili bazni oblik supstance u gastrointestinalnom traktu (Vasconcelos i sar., 2007). Ostali pristupi koji se primenjuju obuhvataju smanjenje veličine čestica lekovite supstance, korišćenje različitih polimorfnih oblika, solubilizaciju molekula lekovite supstance pomoću korastvarača i/ili površinski aktivnih materija, formulaciju mikroemulzija, nanoemulzija i nanosuspenzija, građenje kompleksa sa ciklodekstrinima i formulaciju čvrstih

disperzija (Leuner i Dressman, 2000; Vo i sar., 2013). Iako smanjenje veličine čestica dovodi do povećanja specifične površine i brzine rastvaranja lekovite supstance, ove čestice su često podložne aglomeraciji, a povećanje slobodne površine dovodi do otežanog kvašenja kod hidrofobnih supstanci (Vasconcelos i sar., 2007; Leuner i Dressman, 2000). Solubilizacijom lekovite supstance najčešće se dobijaju tečni farmaceutski oblici, a takođe postoje i problemi vezani za obezbeđenje posebnih bezbednosnih uslova pri korišćenju organskih rastvarača, njihovu visoku cenu i potencijalni štetni efekat na zdravlje ljudi i životnu sredinu (Vasconcelos i sar., 2007). Formulacija lekovite supstance u obliku čvrstih disperzija, iako poznata više od 50 godina, poslednjih nekoliko godina doživljava veliku ekspanziju među tehnikama za povećanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja teško rastvorljivih lekovitih supstanci.

1.1.2. Definicija i klasifikacija

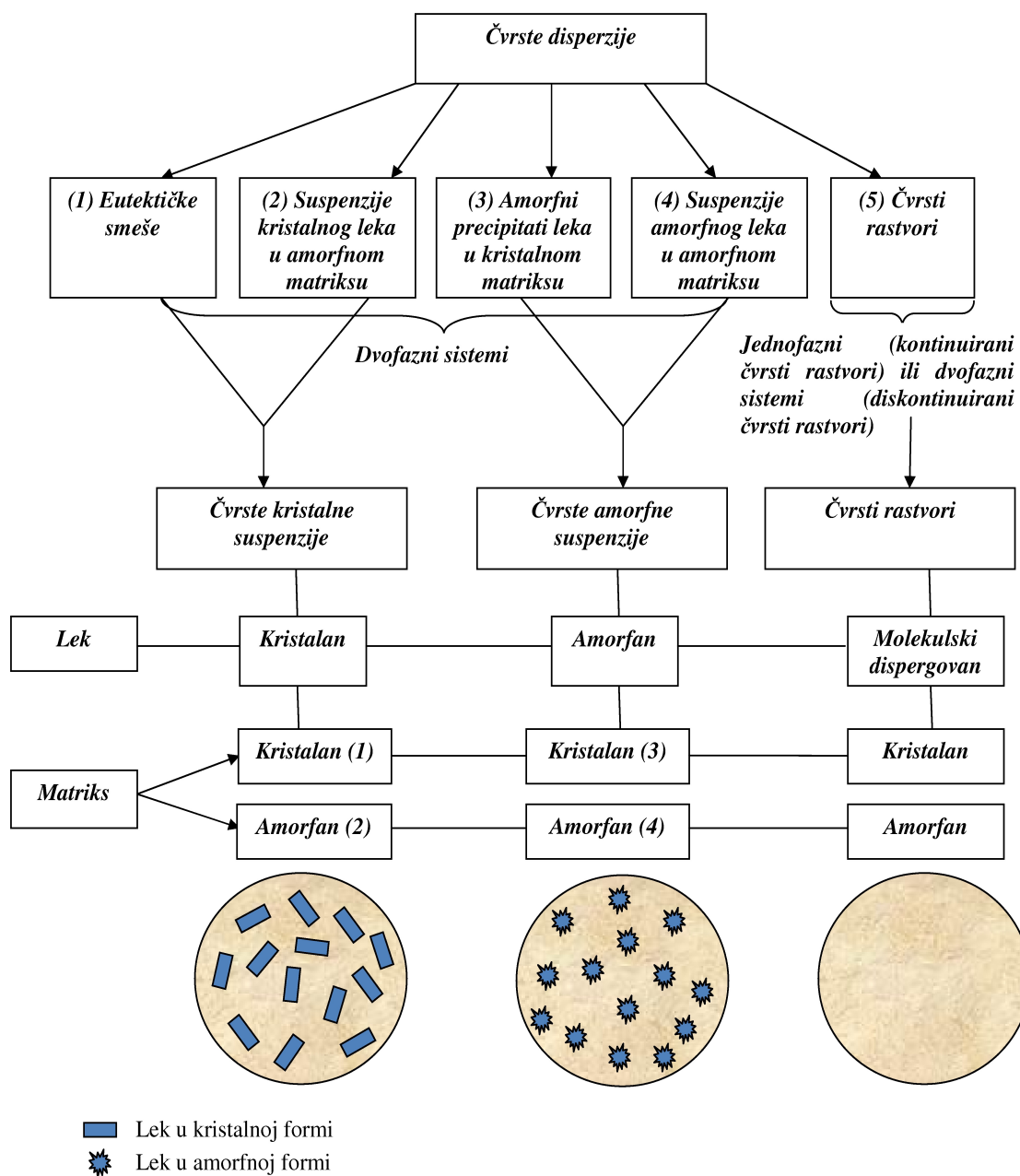
Čvrste disperzije se definišu kao disperzije jedne ili više lekovitih supstanci u inernom nosaču ili matriksu, u čvrstom stanju, dobijene metodom topljenja, metodom rastvaranja ili kombinacijom ova dva metoda (Chiou i Riegelman, 1971). U zavisnosti od fizičkog stanja u kome se nalazi lekovita supstanca (kristalna, amorfn, rastvorena) ili matriks (kristalan, amorfan), čvrste disperzije se mogu klasifikovati u nekoliko grupa.

Eutektička smeša predstavlja smešu dve komponente koje se u potpunosti mešaju u tečnom stanju, a u vrlo ograničenom obimu u čvrstom stanju. Kada se smeša otopljenih komponentata A i B tačno definisanog kvantitativnog sastava podvrgne hlađenju, obe komponente počinju da kristališu istovremeno, dajući smešu koja ima temperaturu topljenja nižu od čistih komponentata (Chiou i Riegelman, 1971; Leuner i Dressman, 2000; Aldhubiab, 2010). U slučaju eutektičke smeše koju čine lekovita supstanca i matriks, matriks dovodi do slabljenja kristalne rešetke lekovite supstance, što se manifestuje kroz sniženje tačke topljenja smeše u odnosu na čistu lekovitu supstancu (Aldhubiab, 2010). Kada se eutektička smeša nađe u kontaktu sa vodenim medijumom, dolazi do rastvaranja hidrofilnog matriksa, dok se lekovita supstanca oslobađa u obliku disperzije finih kristala, koji zahvaljujući većoj slobodnoj površini pokazuju veću brzinu rastvaranja (Chiou i Riegelman, 1971; Leuner i Dressman, 2000). Pored smanjenja veličine kristala, povećanju brzine rastvaranja doprinosi i gore navedeno slabljenje

privlačnih sila u kristalnoj rešetki lekovite supstance, čime se smanjuje energija potrebna za rastvaranje lekovite supstance.

Čvrsti rastvori predstavljaju, najčešće, jednofazne sisteme u kojima je lekovita supstanca dispergovana do molekulskog nivoa. Kako je lekovita supstanca rastvorena u matriksu, brzina rastvaranja supstance u vodenom medijumu određena je brzinom rastvaranja samog matriksa (Leuner i Dressman, 2000). U zavisnosti od stepena u kome se supstanca meša sa matriksom, čvrsti rastvori mogu biti *kontinuirani*, kod kojih se komponente mešaju u svim odnosima i *diskontinuirani*, kod kojih je rastvorljivost jedne komponente u drugoj ograničena. Prema načinu na koji je lekovita supstanca distribuirana u odnosu na matriks, čvrsti rastvori mogu biti supstitucionni, intersticijalni i amorfni. Kod *supstitucionih čvrstih rastvora*, molekuli lekovite supstance zamenjuju molekule matriksa u kristalnoj rešetki, dok kod *intersticijalnih* zauzimaju mesta između molekula matriksa. Veličina molekula lekovite supstance je ključni faktor od koga zavisi koji od prethodna dva tipa čvrstih rastvora će biti zastupljen. Kod *amornih (staklastih) čvrstih rastvora*, molekuli lekovite supstance su nepravilno distribuirani unutar amornog matriksa. Ovaj tip čvrstih rastvora spada u najčešće, pošto je većina polimera koji se koriste u izradi čvrstih disperzija amorfne strukture (Chiou i Riegelman, 1971, Leuner i Dressman, 2000). Kako je rastvorljivost supstanci u matriksu ograničena i često vrlo niska, Goldberg i saradnici su predložili da se termin čvrsti rastvor koristi samo kada rastvorljivost lekovite supstance u matriksu prelazi 5 %. Kod *amornih (staklastih) suspenzija* lekovita supstanca je u svom amornom obliku dispergovana u amornom matriksu. Lekovita supstanca takođe može biti suspendovana u kristalnom obliku unutar amornog matriksa, kada nastaju *kristalne suspenzije u amornom matriksu*. Ukoliko lekovita supstanca precipitira u amornom obliku unutar kristalnog matriksa, nastaju *amorfni precipitati u kristalnom matriksu*, koji se odlikuju većom brzinom rastvaranja u odnosu na disperzije u kojima je lekovita supstanca u kristalnom obliku. Hidrofilni polimeri, kao što je polivinilpirolidon i polietilenglikoli, imaju sposobnost građenja *kompleksa* sa lekovitim supstancama, što može dovesti do povećanja brzine rastvaranja i biološke raspoloživosti lekovitih supstanci, ali je potrebno uzeti u obzir i vrednost konstante disocijacije kompleksa (Chiou i Riegelman, 1971). Kako je za određivanje tačne kategorije čvrstih disperzija često potrebno primeniti veoma složene analitičke tehnike, često se čvrste disperzije klasifikuju samo

na osnovu fizičkog stanja lekovite supstance i to na: čvrste kristalne suspenzije, čvrste amorfne suspenzije i čvrste rastvore. Šematski prikaz klasifikacije čvrstih disperzija dat je na slici 1.



Slika 1. Šematski prikaz klasifikacije čvrstih disperzija

Čvrste disperzije se mogu klasifikovati i na osnovu sastava matriksa u četiri različite generacije. Prva generacija čvrstih disperzija sadrži matriks kristalne prirode, dok je kod čvrstih disperzija druge generacije lekovita supstanca dispergovana ili

rastvorena u matriksu amorfne prirode. Iako je primena amorfnih polimera u formulaciji čvrstih disperzija druge generacije omogućila značajno povećanje brzine rastvaranja lekovite supstance, uočeni su problemi, kao što su precipitacija rastvorene lekovite supstance u gastrointestinalnom traktu i rekristalizacija amorfne lekovite supstance tokom procesa izrade ili čuvanja čvrstih disperzija. Primena površinski aktivnih materija kao komponenti matriksa čvrstih disperzija omogućila je značajan napredak u prevazilaženju ovih problema. Adsorbovanjem na spoljašnjoj površini čestica čvrste faze, kao i formiranjem micela koje omogućavaju solubilizaciju molekula lekovite supstance, površinski aktivne materije poboljšavaju kvašenje čestica hidrofobne lekovite supstance i sprečavaju precipitaciju rastvorene lekovite supstance iz stanja superzasićenja. Pored toga, molekuli amfifilne strukture mogu poboljšati sposobnost mešanja molekula lekovite supstance i komponenti matriksa, čime se povećava stabilnost sistema, odnosno smanjuje brzina rekristalizacije lekovite supstance. Četvrta generacija čvrstih disperzija je osmišljena sa ciljem istovremenog postizanja povećanja rastvorljivosti teško rastvorljivih lekovitih supstanci i produženog oslobađanja lekovite supstance iz tako izrađenih sistema. Dodatak nerastvorljivih polimera i polimera, koji imaju sposobnost bubrenja, omogućava postizanje kontrolisanog oslobađanja lekovite supstance iz čvrstih disperzija (Vo i sar., 2013).

Povećanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz čvrstih disperzija objašnjava se kombinacijom više mehanizama. Ukoliko je lekovita supstanca u disperziji prisutna u amorfnom obliku, ili u obliku čvrstog rastvora, pri procesu rastvaranja ne dolazi do utroška energije na razgradnju kristalne rešetke, što za rezultat ima znatno veću brzinu rastvaranja lekovite supstance (Leuner i Dressman, 2000; Taylor i Zografi, 1997). Iako se amorfni oblici lekovite supstance odlikuju višim vrednostima rastvorljivosti i brzine rastvaranja u poređenju sa kristalnim oblicima, zbog višeg sadržaja energije amorfni oblici su termodinamički nestabilni i pokazuju tendenciju ka rekristalizaciji tokom vremena. Fizička nestabilnost amorfnih oblika lekovite supstance je i glavni razlog koji otežava njihovu širu komercijalnu primenu. Dodatni mehanizmi, odgovorni za povećanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja primenom čvrstih disperzija uključuju smanjenje veličine čestica i smanjenje aglomeracije, poboljšano kvašenje i solubilizaciju lekovite supstance molekulima komponenti matriksa (Chiou i Riegelman, 1971; Craig, 2002).

Oslobađanje lekovite supstance iz čvrstih disperzija može biti kontrolisano lekovitom supstancom ili matriksom. Prilikom kontakta čvrste disperzije sa vodenim medijumom matriks se, ili brzo rastvara, ili apsorbuje vodu i formira koncentrovani sloj oko čestica lekovite supstance. Kod oslobađanja lekovite supstance koje je kontrolisano matriksom, lekovita supstanca se rastvara u matriksnom sloju dovoljno brzo kako bi se sprečilo oslobađanje intaktnih čestica lekovite supstance u medijum. Visok viskozitet matriksnog sloja značajno usporava difuziju molekula lekovite supstance, tako da difuzija molekula matriksnog sloja u okolni rastvor predstavlja ograničavajući faktor za rastvaranje lekovite supstance. U slučaju da se lekovita supstanca ne rastvara, ili se veoma slabo rastvara u matriksnom sloju, dolazi do oslobađanja intaktnih čestica lekovite supstance u okolni medijum i brzina rastvaranja je određena karakteristikama same lekovite supstance (veličina čestica, rastvorljivost, polimorfni oblik). Često oslobađanju lekovite supstance iz čvrstih disperzija istovremeno doprinose oba navedena mehanizma, s obzirom da se lekovita supstanca samo u ograničenom obimu rastvara u matriksnom sloju (Craig, 2002; Vo i sar., 2013). Karavas i saradnici su ustanovili da udeo lekovite supstance u čvrstoj disperziji može dominantno odrediti njen mehanizam oslobađanja. Tako je utvrđeno da je pri nižim udelima lekovite supstance dominantno zastupljen mehanizam difuzijom kontrolisanog oslobađanja, dok je pri višim udelima oslobađanje lekovite supstance kontrolisano procesom njenog rastvaranja (Karavas i sar., 2007). Poznavanje mehanizma koji dominatno kontroliše proces oslobađanja lekovite supstance iz čvrstih disperzija može biti veoma značajno kako bi se postigao optimalan profil oslobađanja lekovite supstance. Brojna istraživanja su pokazala povećanje brzine rastvaranja lekovite supstance sa povećanjem udela polimernih komponenti matriksa, kao posledica homogenijeg dispergovanja lekovite supstance i smanjenja njenog stepena kristaliniteta. Ovo predstavlja primer mehanizma oslobađanja lekovite supstance iz čvrstih disperzija koji je kontrolisan samim osobinama lekovite supstance (Okonogi i sar., 1997). Sa druge strane, u slučaju matriksom kontrolisanog procesa oslobađanja lekovite supstance, povećanje udela matriksnog polimera dovodi do smanjenja brzine rastvaranja lekovite supstance, kao posledica formiranja matriksnog sloja koji predstavlja barijeru procesu difuzije lekovite supstance (Kolašinac i sar., 2012; Vo i sar., 2013).

1.1.3. Metodi za izradu čvrstih disperzija

Čvrste disperzije se mogu izraditi metodom topljenja, metodom rastvaranja ili postupkom koji kombinuje prethodno dva navedena metoda (Chiou i Riegelman, 1971). S obzirom na veliki napredak nauke i tehnike, u poslednjih nekoliko decenija razvijene su brojne moderne tehnike za izradu čvrstih disperzija, ali se većina njih može svrstati u neku od prethodno navedene tri grupe.

1.1.3.1. Metod topljenja

Metod topljenja predstavlja prvu primenjenu tehniku za izradu čvrstih disperzija. Ovaj metod su primenili Sekiguchi i Obi davne 1961. godine za dobijanje eutektičke smeše sulfatiazola i uree (Sekiguchi i Obi, 1961). Metod se sastoji od topljenja smeše lekovite supstance i komponenti matriksa, zatim brzog hlađenja takve smeše, pulverizacije i prosejavanja, čime se dobija praškasti produkt definisane veličine čestica (Leuner i Dressman, 2000). Iako je metod relativno jednostavan, potrebno je obratiti pažnju na brojne faktore koji se mogu odraziti na karakteristike finalnog proizvoda. Temperatura na koju se zagreva smeša zavisi od temperature topljenja (T_f) njenih sastavnih komponenata. Kako lekovite supstance često imaju visoke T_f , zagrevanje do njihovog topljenja može uzrokovati degradaciju matriksa ili same lekovite supstance. Zato se pored metoda topljenja smeše lekovite supstance i matriksa, sve više koristi metod dispergovanja lekovite supstance u otopljenom matriksu, čime se omogućava jednostavna izrada čvrstih disperzija lekovitih supstanci sa visokom tačkom topljenja (Vippagunta i sar., 2007; Li i sar, 2006). Temperatura na koju se smeša hladi, kao i brzina hlađenja, mogu značajno uticati na karakteristike dobijene čvrste disperzije. Brzim hlađenjem se utiče na kinetiku procesa kristalizacije, odnosno skraćuje se vreme koje je raspoloživo za proces nukleacije, čime se postiže da se lekovita supstanca u finalnoj disperziji nalazi u amorfnom obliku, ili u obliku finih kristala. Shah i saradnici su pokazali da temperatura na koju se smeša hladi značajno utiče na brzinu oslobađanja lekovite supstance, pri čemu je brže oslobađanje zabeleženo ako je smeša hlađena do nižih temperatura, što se pripisuje većem udelu lekovite supstance u amorfnom obliku (Shah i sar., 2007). Jedno od ograničenja primene metoda topljenja predstavlja mogućnost razdvajanja faza usled ograničene sposobnosti mešanja lekovite supstance i matriksa u otopljenom stanju. Pored dobijanja nehomogenog proizvoda, ovo se može

negativno odraziti i na stabilnost samog sistema, pošto je kod sistema kod kojih je došlo do razdvajanja faza izražena tendencija ka rekristalizaciji lekovite supstance. Stabilnost lekovitih i pomoćnih supstanci na povišenoj temperaturi takođe znatno ograničava primenu metoda topljenja u izradi čvrstih disperzija (Vo i sar., 2013). U toku poslednjih godina intenzivno se radilo na razvoju tehnika koje omogućavaju prevazilaženje navedenih nedostataka konvencionalnog metoda topljenja.

Osamdesetih godina prošlog veka u izradi čvrstih disperzija počinje da se primenjuje tehnika *ekstruzije topljenjem*, koja se do tada široko primenjivala u industriji plastičnih masa (Leuner i Dressman, 2000). U toku procesa ekstruzije topljenjem smeša lekovite supstance i ekscipijenasa se topi ili razmekšava pod dejstvom povišene temperature i pritiska koji proizvode pokretni elementi koji ovakvu masu pokreću kroz kontejner, primoravajući je da prolazi kroz otvore na kraju uređaja (Crowley i sar., 2007; Kolter i sar., 2011). U zavisnosti od primenjene temperature i svog udela, lekovita supstanca biva otopljena, ili pak rastvorena ili dispergovana u matriksu. Rekristalizacija lekovite supstance nakon hlađenja smeše je otežana zahvaljujući visokom viskozitetu rastopa polimera koji smanjuje pokretljivost molekula i otežava proces nukleacije (Leuner i Dressman, 2000). U zavisnosti od tipa pokretnog elementa ekstruderi mogu biti klipni i pužasti. Pored ekstrudera sa jednim pužastim elementom, razvijeni su i uređaji sa dva ovakva elementa (eng. *twin screw extruders*), koji doprinose boljem mešanju smeše, lakšem dispergovanju lekovite supstance, kao i kraćem vremenu zadržavanja supstanci u kontejneru, čime se smanjuje rizik od pregrevanja i degradacije komponenata smeše. Izrada čvrstih disperzija ekstruzijom topljenjem, pored termoplastičnog polimera koji čini matriks čvrstih disperzija, često zahteva i dodatak plastifikatora koji snižavanjem temperature staklastog prelaza (T_g) polimera omogućavaju odvijanje procesa pri nižim temperaturama. Iako olakšava sam proces izrade čvrstih disperzija, dodatak plastifikatora se može negativno odraziti na stabilnost ovakvih disperzija. Snižavanjem T_g , kao posledica dodatka plastifikatora, povećava se molekularna pokretljivost u sistemu, a samim tim i rizik od rekristalizacije aktivne supstance (Crowley i sar., 2007).

Nedavno je u izradi čvrstih disperzija metodom topljenja primenjena i nova *KinetiSol*[®] tehnika. Ova tehnika omogućava prevazilaženje nekih od nedostataka, kako tradicionalne metode topljenja, tako i ekstruzije topljenjem. *KinetiSol*[®] tehnikom se

pomoću elemenata koji rotiraju velikom brzinom unutar cilindričnog kontejnera omogućava generisanje toplote kombinacijom sila smicanja i trenja. Na ovaj način je omogućen brz porast temperature do željene vrednosti bez upotrebe spoljašnjeg izvora toplote (Hughey i sar., 2011). U toku procesa se pomoću softvera kontinuirano prati brzina okretanja rotirajućih elemenata i temperatura i kada se dostigne željena temperatura masa se automatski prazni iz kontejnera (DiNunzio i sar., 2010a). Ovako zagrejana masa se odmah hladi presovanjem između dve ohlađene ploče, a zatim se ohlađena masa melje (DiNunzio i sar., 2010b). Glavna prednost KinetiSol[®] tehnike u odnosu tradicionalni metod topljenja i ekstruziju topljenjem predstavlja značajno skraćanje vremena izlaganja proizvoda visokoj temperaturi u toku procesa. Dok kod ekstruzije topljenjem vreme zadržavanja materijala u kontejneru iznosi i do 10 minuta, kod KinetiSol[®] tehnike ono iznosi manje od 30 sekundi (DiNunzio i sar., 2010c). Primenom ekstrudera sa dva pužasta elementa omogućeno je vreme zadržavanja materijala od oko 2 minuta (Breitenbach i sar., 2002), što je značajno kraće od konvencionalnih ekstrudera, ali ipak daleko duže u odnosu na KinetiSol[®] tehniku. DiNunzio i saradnici su u nizu publikacija pokazali da se primenom KinetiSol[®] tehnike omogućava izrada homogenih čvrstih disperzija bez dodatka plastifikatora, pri čemu su dobijene disperzije pokazale bolju fizičku stabilnost u odnosu na disperzije dobijene ekstruzijom topljenjem. (DiNunzio i sar., 2010a,b,c).

1.1.3.2. Metod rastvaranja

Druga velika grupa metoda za izradu čvrstih disperzija zasniva se na korišćenju različitih, najčešće organskih rastvarača. Jedna ili više lekovitih supstanci i komponente matriksa (najčešće različite vrste hidrofilnih polimera) se rastvaraju u određenoj zapremini organskog rastvarača, a zatim se rastvarač uklanja primenom tehnika, kao što su uparavanje u vakuumu, uparavanje korišćenjem rotirajućeg evaporatora, sušenje raspršivanjem, sušenje smrzavanjem, ultra brzo zamrzavanje, primena superkritičnog fluida (Vo i sar., 2013). Masa dobijena posle uklanjanja organskog rastvarača se zatim može podvrgnuti pulverizaciji i prosejavanju kako bi se postigla kontrolisana veličina čestica (Vasconcelos i sar., 2007). Kako se u formulacijama čvrstih disperzija najčešće sreću hidrofbne lekovite supstance i hidrofilne komponente matriksa, izbor odgovarajućeg rastvarača može predstavljati problem (Serajuddin, 1999). Najčešće

primenjivani rastvarači su etanol, metanol, aceton, hloroform, dihlormetan, kao i smeše ovih rastvarača, a moguće je i koristiti različite rastvarače za rastvaranje lekovite supstance i komponenata matriksa. Zbog određenih prednosti u odnosu na metod topljenja, metod rastvaranja postaje popularan 70-ih i 80-ih godina prošlog veka. Pošto se u toku procesa nisu koristile visoke temperature, primenom ovog metoda bilo je moguće izraditi čvrste disperzije termolabilnih lekovitih supstanci. Takođe, korišćenjem rastvarača omogućena je izrada matriksa čvrstih disperzija sa komponentama koje imaju visoku T_v , odnosno T_g , kao što je polivinilpirolidon (Leuner i Dressman, 2000). Ipak, primena ovog metoda zahteva velike količine organskih rastvarača, što sa sobom povlači i visoke troškove proizvodnje, dok njihovo uklanjanje iz proizvoda zahteva posebne uslove. Takođe je prisutan i problem zaostatka rezidua u finalnom proizvodu, što može imati štetne posledice na zdravlje pacijenta. Rezidualni rastvarač može takođe delovati i kao plastifikator i snižavanjem T_g disperzije dovesti do razdvajanja faza, kao posledica povećane molekulske pokretljivosti u sistemu (Leuner i Dressman, 2000; Vasconcelos i sar., 2007; Vo i sar., 2013). Takođe, pokazano je da male varijacije u uslovima pod kojima se rastvarač uklanja mogu dovesti do velikih promena u karakteristikama finalnog proizvoda (Taylor i Zografi, 1997). Svi ovi razlozi su doprineli tome da se ekstruzija topljenjem danas smatra metodom izbora za izradu čvrstih disperzija. Ipak, danas su razvijene brojne tehnike koje omogućavaju gotovo potpuno uklanjanje rastvarača prilikom izrade čvrstih disperzija.

Veoma jednostavan način za izradu čvrstih disperzija metodom rastvaranja predstavlja tehnika *koprecipitacije*. Kod ove tehnike lekovita supstanca i komponente matriksa se prvo rastvaraju u organskom rastvaraču, a zatim nakon dodatka rastvarača u kojem se komponente ne rastvaraju (tzv. antirastvarač) dolazi do njihove precipitacije. Dobijena suspenzija se filtrira i ispira kako bi se uklonio zaostali organski rastvarač i nakon sušenja dobija se čvrsta disperzija lekovite supstance u matriksu. U izradi čvrstih disperzija tehnikom koprecipitacije često se koriste polimeri sa pH zavisnom rastvorljivosti, kao što su: polimetilakrilati, polimetilmetakrilati, celuloza acetat ftalat, hidroksipropilmetilceluloza acetat ftalat, hidroksipropilmetilceluloza acetat sukcinat. Zahvaljujući pH zavisnoj rastvorljivosti ovih polimera, kao antirastvarač se najčešće koriste vodeni rastvori odgovarajuće pH vrednosti, čiji dodatak dovodi do istovremene precipitacije lekovite supstance i polimera. Glavna prednost primene tehnike

koprecipitacije predstavlja to što se uklanjanje rastvarača vrši bez primene povišene temperature, koja može značajno uticati na fizičko stanje lekovite supstance u disperziji, kao i stabilnost lekovite i pomoćnih supstanci. Takođe, ova tehnika omogućava primenu rastvarača koji teže isparavaju. Pored primene na laboratorijskom nivou, tehnika koprecipitacije se može primeniti i na industrijskom nivou, kao u slučaju komercijalnog preparata Zelboraf® (Genentech, SAD), koji predstavlja čvrstu disperziju vemurafeniba u polimernom matriksu koji čini hidroksipropilmetilceluloza acetat sukcinat (Vo i sar., 2013; Smithey i sar., 2013).

Tehnika *sušenja raspršivanjem* predstavlja pogodan način za izradu čvrstih disperzija na industrijskom nivou. Sam proces sušenja raspršivanjem se sastoji iz više faza. U prvoj fazi procesa rastvor ili suspenzija se pomoću pumpe dovodi do raspršivača, gde se raspršuje u sitne kapi. Zatim raspršene kapi dolaze u kontakt sa gasom za sušenje, koji je najčešće vazduh, a u nekim slučajevima i azot. Mali dijametar kapi, odnosno veliki odnos površine i zapremine dovodi do brzog uklanjanja rastvarača. Poslednja faza procesa predstavlja odvajanje praškastog produkta sušenja od gasa za sušenje, što se postiže korišćenjem ciklonskih separatora i/ili filterskih vreća. Ciklonski separator omogućava razdvajanje čestica po veličini, pri čemu se veće čestice prikupljaju, dok sitnije čestice napuštaju komoru u struji gasa za sušenje koji se potom filtrira kako bi se sprečilo zagađenje okoline (Paudel i sar., 2013). Tehnika sušenja raspršivanjem uspešno je primenjena za dobijanje preparata čvrstih disperzija Incivek® (Vertex Pharmaceuticals, SAD) i Intelence® (Janssen Pharmaceuticals, SAD) (Smithey i sar., 2013).

Za uklanjanje organskog rastvarača pri izradi čvrstih disperzija može se koristiti i tehnika *superkritičnog fluida*. Iznad kritičnih vrednosti temperature i pritiska (T_c , P_c) superkritični fluid postoji u stanju koje je između gasa i tečnosti, odnosno poseduje gustinu sličnu tečnosti, kompresibilnost i viskozitet kao gasovi, dok je sposobnost difuzije viša nego kod tečnosti. Kao superkritični fluid najčešće se koristi ugljen-dioksid, zbog svoje netoksičnosti, nezapaljivosti, široke dostupnosti i niske vrednosti kritične temperature (Karanth i sar., 2006). Proces se sastoji u rastvaranju lekovite i pomoćnih supstanci u pogodnom rastvaraču i istovremenom raspršivanju rastvora i ugljen-dioksida u komoru uređaja. Kako se rastvor raspršuje u komoru, rastvarač se brzo ekstrahuje superkritičnim fluidom što dovodi do precipitacije čestica čvrste

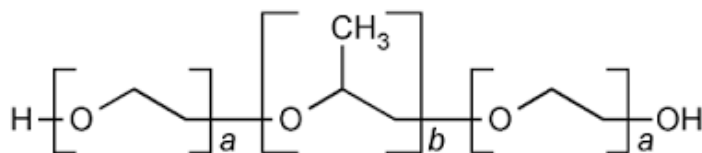
disperzije (Vasconcelos i sar., 2007). Prednosti primene superkritičnog fluida su: visok prinos procesa, mogućnost izrade čvrstih disperzija termolabilnih lekovitih supstanci, nizak sadržaj rezidualnog rastvarača, mogućnost dobijanja željenih karakteristika superkritičnog fluida podešavanjem temperature i pritiska (Vasconcelos i sar., 2007; Karanth i sar., 2006).

Nanošenje rastvora lekovitih supstanci i hidrofilnih polimera na neutralne pelete predstavlja obećavajuću strategiju u poboljšanju biološke raspoloživosti teško rastvorljivih lekovitih supstanci. Tehniku je relativno lako moguće primeniti i na industrijskom nivou, što često predstavlja problem kod tehnika za izradu čvrstih disperzija. Trenutno je komercijalno dostupan preparat Sporano[®] (Janssen Pharmaceuticals, SAD), tvrde želatinske kapsule punjene peletama obloženim rastvorom itakonazola i hidroksipropilmetilceluloze u smeši etanola i dihlormetana. Ovim procesom omogućeno je da se nakon sušenja dobije čvrsti rastvor itakonazola u hidroksipropilmetilcelulozi. Kada se preparat primeni postiže se koncentracija superzasićenja itakonazola u gastrointestinalnom traktu, koja je stabilna dovoljno dugo da bi došlo do apsorpcije (Gilis i sar., 1997). Zhang i saradnici su uspešno primenili tehniku sprej oblaganja na formulaciji čvrste disperzije lansoprazola u polivinilpirolidonu. Pri odnosima lekovita supstanca:polimer od 1:2 i višim dobijena je čvrsta disperzija amorfnog lansoprazola, što je rezultovalo i značajnim porastom brzine rastvaranja ove lekovite supstance (Zhang i sar., 2008).

1.1.4. Najčešće korišćene pomoćne materije u izradi čvrstih disperzija

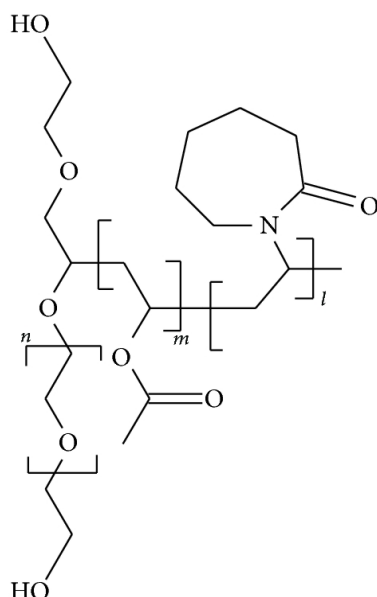
Najčešće korišćene pomoćne materije u izradi čvrstih disperzija koje sačinjavaju njihov matriks su: polietilenglikoli (PEG) i polivinilpirolidoni različite molekulske mase (PVP), polivinil alkohol (PVA), unakrsno vezani polivinilpirolidon, polivinilpirolidon-polivinilacetat kopolimer (PVPVA), poloksameri, derivati celuloze (hidroksipropilmetilceluloza (HPMC), hidroksipropilceluloza (HPC), hidroksipropilmetilceluloza ftalat (HPMCP), hidroksipropilmetilceluloza acetat sukcinat (HPMCAS), karboksimetilceluloza (CMC)), derivati poliakrilne i polimetakrilne kiseline i polioili (sorbitol, manitol) (Leuner i Dressman, 2000). U daljem tekstu navedene su najznačajnije karakteristike polimera koji su odabrani za izradu čvrstih disperzija u istraživanju.

Poloksameri, odnosno hemijski polioksietilen-polioksipropilen triblok kopolimeri, predstavljaju nejonske polimere, sastavljene iz hidrofilnih polioksietilenskih i hidrofobnih polioksipropilenskih segmenata (Slika 2). Često se koriste kao emulgatori ili solubilizatori u farmaceutskoj industriji. Komercijalno su dostupni u više različitih tipova, koji se razlikuju po molekulskoj masi i relativnom udelu hidrofilnih etilenoksidnih i hidrofobnih propilenoksidnih lanaca (Collett, 2009). Visok solubilizacioni kapacitet, niska temperatura topljenja (<60°C) i povoljan bezbednosni profil čine poloksamere naročito pogodnim za izradu čvrstih disperzija metodom topljenja (Newa i sar., 2007), mada je zabeležena i njihova uspešna primena u metodi rastvaranja (Yin i sar., 2005; Qian i sar., 2007). Pokazano je da se formulacijom ibuprofena (Newa i sar., 2007, 2008), bikalutamida (Sancheti i sar., 2008), nifedipina (Chutimaworapan i sar., 2000) i etorikoksiba (Karekar i sar., 2009) u čvrste disperzije sa poloksamerima postiže značajno povećanje brzine rastvaranja lekovite supstance, što se objašnjava poboljšanim kvašenjem i solubilizacijom molekula lekovite supstance, smanjenjem veličine čestica lekovite supstance u čvrstoj disperziji i smanjenjem njihove aglomeracije, a u nekim slučajevima je zabeleženo i formiranje amorfnog oblika lekovite supstance (Newa i sar., 2007; Sancheti i sar., 2008; Karekar i sar., 2009; Shah i sar., 2007; Ghareeb i sar., 2009). Noviji radovi su pokazali da u čvrstim disperzijama lekovite supstance BMS-347070 sa poloksamerima, dobijenim sušenjem raspršivanjem, lekovita supstanca kristališe u obliku nanokristalne faze, što predstavlja posledicu kinetike procesa kristalizacije u disperziji lekovita supstanca-polimer, odnosno ravnoteže između procesa nukleacije i rasta kristala (Yin i sar., 2005; Qian i sar., 2007). Smatra se da su nanokristalni sistemi manje problematični sa aspekta obezbeđenja dugoročne stabilnosti u odnosu na sisteme koji sadrže amorfnu lekovitu supstancu.



Slika 2. Strukturna formula poloksamera (*a*-broj etilenoksidnih jedinica, *b*-broj propilenoksidnih jedinica)

Soluplus[®], odnosno hemijski polietilenglikol-polivinilkaprolaktam-polivinilacetat graft kopolimer (Slika 3) je relativno nov termoplastični polimer amfifilnih osobina, prevashodno razvijen za primenu u izradi čvrstih rastvora teško rastvorljivih lekovitih supstanci. Pored funkcije polimernog matriksa u sastavu čvrstih disperzija, *Soluplus*[®] ima sposobnost solubilizacije lekovite supstance mehanizmom micelarne solubilizacije. Pokazano je da *Soluplus*[®] ispoljava visoku efikasnost solubilizacije za lekovite supstance različite hemijske strukture u širokom opsegu pH vrednosti. Zahvaljujući niskoj temperaturi staklastog prelaza i termostabilnosti, *Soluplus*[®] je naročito pogodan za izradu čvrstih disperzija ekstruzijom topljenjem, pri čemu nije potreban dodatak plastifikatora (Hardung i sar., 2010). Izradom čvrstih disperzija ekstruzijom topljenjem uz korišćenje *Soluplus*[®] polimera postignuto je značajno povećanje brzine rastvaranja više različitih teško rastvorljivih lekovitih supstanci, kao što su karbamazepin, spironolakton, itakonazol (Lim, 2012; Nagy i sar., 2013; Zhang i sar., 2013), a zabeležena je i uspešna primena ovog polimera u metodi rastvaranja (Lust i sar., 2013; Shamma i Basha, 2013). Pokazano je i da se izradom čvrstih disperzija sa *Soluplus*[®] polimerom metodima topljenja i rastvaranja postižu uporedivi rezultati u pogledu povećanja brzine rastvaranja karbamazepina (Lim, 2012).



Slika 3. Strukturna formula *Soluplus*[®] polimera

Kako je broj trenutno dostupnih polimera koji se mogu koristiti za izradu čvrstih disperzija ograničen, često je ih neophodno kombinovati, kako bi se postigle željene osobine čvrste disperzije u odnosu na mogućnost izrade, stabilnost disperzije i brzinu rastvaranja lekovite supstance (Bley i sar., 2010). Prethodno je pokazano da se izradom ternarnih čvrstih disperzija kombinacijom polietilenglikola i polivinilpirolidona (Bley i sar., 2010; Papadimitriou i sar., 2012), polietilenglikola i polivinilpirolidon-vinilacetat kopolimera, polietilenglikola i Eudragit® EPO polimera (Bley i sar., 2010), polietilenglikola i hidroksipropilmetilceluloze (Janssens i sar., 2007, 2008) povećava brzina rastvaranja lekovite supstance i stabilnost dobijenih disperzija u odnosu na binarne lekovita supstanca-polimer čvrste disperzije.

1.1.5. Metodi za karakterizaciju čvrstih disperzija

Karakterizacija čvrstih disperzija zasniva se na komplementarnoj primeni više analitičkih tehnika, od kojih su najvažnije tehnike termalne analize, difrakcija X-zraka, vibraciona spektroskopija (infracrvena i Raman spektroskopija) i ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance (Leuner i Dressman, 2000). Rezultati dobijeni primenom različitih tehnika, često mogu biti kontradiktorni, tako da je za donošenje konačnih zaključaka neophodno prethodno iskustvo, kao i dobro poznavanje fizičko-hemijskih karakteristika komponenata disperzije.

Među tehnikama termalne analize najširu primenu je našla *diferencijalna skenirajuća kalorimetrija* (eng. *Differential scanning calorimetry-DSC*). Ova tehnika omogućava detekciju i kvantifikaciju svih procesa koji zahtevaju energiju, ili dovode do oslobađanja energije. U karakterizaciji čvrstih disperzija diferencijalna skenirajuća kalorimetrija se koristi za ispitivanje fizičkog stanja lekovite supstance u disperziji, kao i za procenu stepena mešanja lekovite supstance sa matriksom, ili rastvorljivosti lekovite supstance u matriksu pri različitim temperaturama. Odsustvo pika koji karakteriše topljenje lekovite supstance na DSC termogramu ukazuje da je supstanca u čvrstoj disperziji prisutna u amorfnoj formi ili u obliku čvrstih rastvora. Pomeranje u poziciji pika topljenja ka višim ili nižim temperaturama može ukazati na postojanje interakcija, odnosno mešanja između lekovite supstance i matriksa. Ipak, prilikom tumačenja rezultata diferencijalne skenirajuće kalorimetrije treba biti obazriv. Ovom tehnikom nije moguće detektovati supstance u kristalnom obliku u masenom udelu

manjem od 2%. Takođe, u toku samog procesa zagrevanja uzorka može doći do rastvaranja kristalne supstance u otopljenom matriksu ispod njene T_f i samim tim nestanka pika topljenja supstance na DSC termogramu, što dovodi do pogrešnog zaključka da se lekovita supstanca u disperziji prethodno nalazi u amorfnom obliku (Leuner i Dressman, 2000, Gibson i sar., 2009).

Mikroskopija na zagrejanoj ploči (hot-stage mikroskopija) predstavlja kombinaciju tehnika mikroskopije i termalne analize. Ovom tehnikom omogućeno je vizuelno praćenje fizičkih karakteristika materijala u funkciji temperature i vremena, što može dodatno pomoći u interpretaciji DSC termograma. Kako većina ovakvih uređaja sadrži polarizacioni mikroskop, lako je moguće otkriti da li je supstanca u kristalnom ili amorfnom obliku. Odsustvo dvojnog prelamanja svetlosti predstavlja dokaz da je supstanca u amorfnom obliku. Mikroskopija na zagrejanoj ploči omogućava ispitivanje polimornih prelaza na osnovu različite kristalne morfologije polimornih oblika i njihove različite T_f . Izdvajanje mehurića gasa iz uzorka pripremljenog uz dodatak mineralnog ulja, ukazuje na prisustvo solvata u uzorku. Ipak, za proučavanje polimorfizma neophodna je komplementarna primena i drugih tehnika, kao što su difrakcija X-zraka i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (Stieger i sar., 2012).

Difrakcija X-zraka na prašku (eng. powder X-ray diffraction-PXRD) predstavlja nezaobilaznu tehniku u karakterizaciji čvrstog stanja, kojom se pouzdano može ustanoviti da li je lekovita supstanca u čvrstoj disperziji prisutna u kristalnom ili amorfnom obliku i identifikovati prisutan polimorni oblik. Na difraktogramu kristalne supstance pokazuju karakteristične pikove, specifične za svaki kristalni oblik pojedinačne supstance, dok amorfne supstance pokazuju takozvani tip "oreol" difraktograma, bez izraženih pikova. Za razliku od diferencijalne skenirajuće kalorimetrije, difrakcijom X-zraka se detektuje fizičko stanje lekovite supstance u čvrstoj disperziji na sobnoj temperaturi i ne postoji bojazan od eventualnog uticaja same tehnike na promenu fizičkog stanja supstance. Ipak, primećena je pojava širenja pikova u slučaju prisustva nanokristalne faze, što često može dovesti do pogrešnih zaključaka o prisustvu amorfne faze. Difrakcijom X-zraka nije moguće pouzdano detektovati kristalne supstance u masenom udelu manjem od 5% (Gibson i sar., 2009).

Primenom *infracrvene spektroskopije* moguće je detektovati određene promene u kristalnoj strukturi molekula. Ipak, ova tehnika nalazi glavnu primenu u otkrivanju

interakcija između lekovite supstance i matriksa u čvrstim disperzijama. Pokazano je da su intermolekulske interakcije lekovite supstance i matriksa od izuzetne važnosti u stabilizaciji čvrstih disperzija amorfne lekovite supstance u matriksu. Pomeranje pikova karakterističnih za funkcionalne grupe ispitivanih supstanci ukazuje na prisustvo intermolekulskih interakcija između lekovite supstance i matriksa (Leuner i Dressman, 2000).

Ispitivanjem brzine rastvaranja lekovite supstance potrebno je pokazati da li je formulacijom čvrstih disperzija postignuto povećanje brzine rastvaranja lekovite supstance i koliko dugo se održava koncentracija superzasićenja u rastvoru. Kako bi se stekao uvid u mehanizam odgovoran za povećanje brzine rastvaranja lekovite supstance, ispitivanje je potrebno izvesti na uzorcima čvrstih disperzija, čiste lekovite supstance i fizičkih smeša lekovite supstance i ekscipijenas. Ukoliko nema značajnih razlika u povećanju brzine rastvaranja lekovite supstance iz čvrstih disperzija u odnosu na fizičke smeše, dominantni su efekti solubilizacije i poboljšanog kvašenja lekovite supstance pod dejstvom komponenata matriksa. Tek ukoliko postoji razlika u brzini rastvaranja između fizičkih smeša i čvrstih disperzija, može se govoriti o stvarnim benefitima od formulacije čvrstih disperzija (Leuner i Dressman, 2000).

1.1.6. Trenutna ograničenja primene čvrstih disperzija

I pored velikog potencijala za primenu čvrstih disperzija, do danas je svega nekoliko preparata koji sadrže čvrste disperzije našlo svoje mesto na tržištu (Tabela 1). Ovo predstavlja posledicu nedostataka čvrstih disperzija i brojnih problema koji se mogu javiti pri njihovoj formulaciji. Najčešći problemi koji prate formulaciju čvrstih disperzija su: visok odnos lekovita supstanca:ekscipijens, koji je često neophodan kako bi se postiglo željeno povećanje brzine rastvaranja lekovite supstance i koji kao takav otežava formulaciju finalnog farmaceutskog oblika; otežan prenos procesa izrade čvrstih disperzija sa laboratorijskog na industrijski nivo; slaba reproduktivnost fizičko-hemijskih karakteristika disperzije usled velikog uticaja parametara procesa izrade na karakteristike dobijenih čvrstih disperzija i problemi vezani za obezbeđenje dugoročne fizičko-hemijske stabilnosti izrađenog preparata. Pored visokog odnosa lekovita supstanca:ekscipijens, formulacija finalnog preparata često je otežana i lepljivom i voskastom konzistencijom izrađenih čvrstih disperzija, koja može

Tabela 1. Preparati čvrstih disperzija dostupni na tržištu (adaptirano prema Vo i sar., 2013)

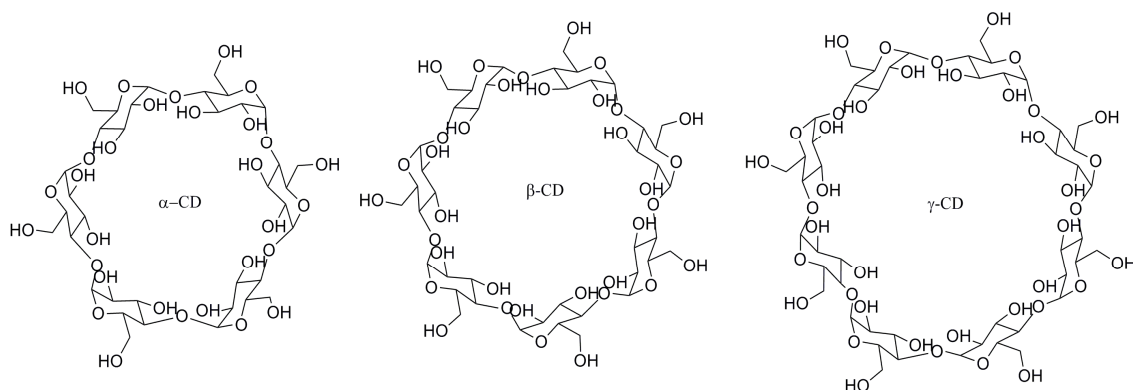
Naziv preparata	Lekovita supstanca	Matriksni polimer	Farmaceutski oblik
Afeditab CR [®]	nifedipin	Poloksamer i PVP	tablete
Certican [®]	everolimus	HPMC	tablete
Cesamet [®]	nabilon	PVP	tablete
Crestor [®]	rosuvastatin	HPMC	tablete
Fenoglide [®]	fenofibrat	PEG	tablete
Gris-PEG [®]	griseofulvin	PEG	tablete
Incivek [®]	telaprevir	HPMCAS	tablete
Intelence [®]	etravirin	HPMC	tablete
Isoptin SR-E [®]	verapamil	HPC/HPMC	tablete
Kaletra [®]	lopinavir, ritonavir	PVPVA	tablete
Nivadil [®]	nivaldipin	HPMC	tablete
Prograf [®]	takrolimus	HPMC	tvrdе kapsule
Rezulin [®]	troglitazon	HPMC	tablete
Sporanox [®]	itrakonazol	HPMC	tvrdе kapsule
Zelboraf [®]	vemurafenib	HPMCAS	tablete

onemogućiti izradu čvrstih farmaceutskih oblika na standardnoj opremi. Značajno ograničenje primene čvrstih disperzija predstavlja i otežan prenos procesa izrade sa laboratorijskog na industrijski nivo. Procesi topljenja i hlađenja mase kod metoda topljenja, odnosno uklanjanje rastvarača kod metoda rastvaranja znatno su otežani kod rada sa većim količinama materijala na industrijskom nivou u poređenju sa radom sa svega nekoliko grama materijala na laboratorijskom nivou. Ovo za posledicu može imati narušavanje stabilnosti preparata i/ili promenu fizičko-hemijskih karakteristika čvrstih disperzija prilikom prenosa procesa izrade na industrijski nivo (Serajuddin, 1999). Poznavanje mikrostrukture čvrstih disperzija neophodan je preduslov za obezbeđenje njihove dugoročne stabilnosti. Zbog toga je u svim fazama razvoja čvrstih disperzija neophodna primena metoda fizičko-hemijske karakterizacije, što znatno povećava cenu razvoja proizvoda. Smatra se da će razvoj i usavršavanje industrijski primenljivih tehnika izrade, kao što su ekstruzija topljenjem, sušenje raspršivanjem i

sprej oblaganje čvrstih disperzija na inertne pelete, uz sve veću dostupnost tehnika za fizičko-hemijsku karakterizaciju, doprineti široj primeni čvrstih disperzija u proizvodnji lekova.

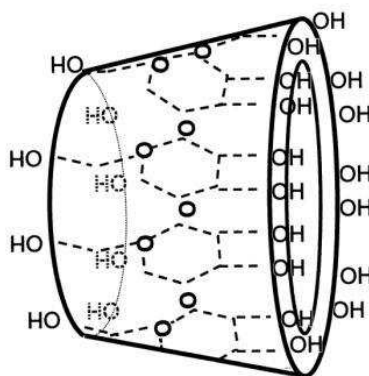
1.2. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini predstavljaju ciklične oligosaharide koji nastaju enzimskom degradacijom skroba pod dejstvom enzima ciklomaltodekstrin glukanotransferaze, koji prirodno luči bakterija *Bacillus macerans*. Kao proizvod ove reakcije dobija se smeša prirodnih ciklodekstrina izgrađenih od šest (α -ciklodekstrin), sedam (β -ciklodekstrin) i osam (γ -ciklodekstrin) glukopiranoznih jedinica povezanih (α -1,4)-glikozidnom vezom u cikličnu strukturu (Slika 4) (Kurkov i Loftsson, 2013). U smeši se u malom udelu mogu naći i ciklodekstrini sa više od osam glukopiranoznih jedinica, koji zbog svoje manje hemijske stabilnosti, visoke cene i slabije sposobnosti kompleksiranja nemaju veću primenu u farmaceutskoj industriji (Brewster i Loftsson, 2007; Loftsson i Brewster, 2010). Molekuli ciklodekstrina zauzimaju karakterističan oblik zarubljene kupe, gde su primarne i sekundarne alkoholne grupe orjentisane ka spoljašnjoj površini, dok su ka unutrašnjoj šupljini kupe orijentisani atomi ugljenika glukopiranoznih jedinica i kiseonika etarskih grupa (Slika 5). Ovakva struktura čini spoljašnju površinu molekula ciklodekstrina hidrofilnom, dok je unutrašnja šupljina lipofilna (Loftsson i Brewster, 2010). I pored hidrofilnih osobina, prirodni ciklodekstrini, a naročito β -ciklodekstrin, se odlikuju niskom rastvorljivošću u vodi. Smatra se da je ovo posledica jakih intramolekulskih vodoničnih veza u kristalnoj rešetki ciklodekstrina. Supstitucijom primarnih i sekundarnih alkoholnih grupa



Slika 4. Prikaz strukture α - (α -CD), β - (β -CD) i γ -ciklodekstrina (γ -CD)

prirodnih ciklodekstrina, čak i lipofilnim supstituentima, dolazi do kidanja intramolekulskih vodoničnih veza, čime se značajno povećava rastvorljivost ciklodekstrina u vodi. Od ovako nastalih derivata za farmaceutsku primenu su najznačajniji: hidroksipropil- β -ciklodekstrin, hidroksipropil- γ -ciklodekstrin, metil- β -ciklodekstrin, sulfobutiletar- β -ciklodekstrin i tzv. razgranati ciklodekstrini kao što je maltozil- β -ciklodekstrin (Loftsson i sar., 2004; Loftsson i Brewster, 2010). Fizičko-hemijske osobine derivata ciklodekstrina zavise ne samo od prirode supstituenata, već i od broja supstituenata i mesta njihovog vezivanja. Zbog toga se za supstituisane ciklodekstrine definiše molarni stepen supstitucije (eng. *molar degree of substitution-MS*), koji predstavlja prosečan broj supstituenata koji reaguju sa jednom glukopiranoznom jedinicom (Loftsson i Brewster, 2010).



Slika 5. Prikaz strukture zarubljene kupe γ -ciklodekstrina

Zahvaljujući specifičnoj prirodi molekula, sa hidrofilnom spoljašnjom površinom i lipofilnom šupljinom, koja omogućava formiranje inkluzionih kompleksa, ciklodekstrini su našli široku primenu u farmaceutskoj, hemijskoj i prehrambenoj industriji. Danas se oni koriste u farmaceutskoj industriji u cilju povećanja rastvorljivosti i biološke raspoloživosti teško rastvorljivih lekovitih supstanci, povećanja stabilnosti lekovitih supstanci, smanjenja iritativnog delovanja lekovite supstance na sluznice, eliminisanja neprijatnog ukusa i/ili mirisa, sprečavanja lek-lek i/ili lek-ekscipijens interakcija i prevođenja tečnih formulacija u formulacije čvrste konzistencije, koje su znatno stabilnije i lakše za manipulaciju. Prvi preparat sa ciklodekstrinima koji se pojavio na tržištu bile su sublingvalne tablete Prostarmon ETM (Ono Pharmaceutical, Japan), koje su sadržale prostaglandin E2 i β -ciklodekstrin. Preparat je registrovan na tržištu Japana

1976. godine (Brewster i Loftsson, 2007). Danas se na tržištu nalazi više od 40 lekova koji sadrže ciklodekstrine i namenjeni su za peroralnu, parenteralnu, bukalnu, nazalnu, rektalnu, oftalmološku i dermalnu primenu (Loftsson i Brewster, 2010). Široka primena ciklodekstrina u farmaceutskoj industriji posledica je i njihovog povoljnog toksikološkog profila. Zbog svoje velike molekulske mase, izrazite hidrofilnosti ($\log P$ najčešće iznosi između -8 i -12) i velikog broja donora i akceptora vodoničnih veza, biološka raspoloživost većine ciklodekstrina nakon oralne primene je veoma niska, tako da se za njih može u pravom smislu reći da vrše funkciju nosača lekovite supstance. γ -ciklodekstrin podleže razgradnji pod dejstvom pankreasne i salivarne amilaze, dok α - i β -ciklodekstrin podležu razgradnji tek pod dejstvom bakterija prisutnih u kolonu. Jedini izuzetak od ovog pravila predstavlja metil- β -ciklodekstrin, koji zbog veće lipofilnosti ($\log P = -2,4$) pokazuje nešto veću biološku raspoloživost, pa je stoga njegova peroralna primena ograničena. Nakon parenteralne primene više od 90% primenjenog ciklodekstrina se izlučuje nepromenjeno preko bubrega. U preparatima za parenteralnu primenu koriste se: α -ciklodekstrin, γ -ciklodekstrin, hidroksipropil- β -ciklodekstrin, hidroksipropil- γ -ciklodekstrin i sulfobutiletar- β -ciklodekstrin. β -ciklodekstrin se ne može koristiti u preparatima za parenteralnu primenu zbog svoje niske rastvorljivosti, nefrotoksičnosti, kao i hemolitičkog dejstva koje je takođe izraženo i kod metil- β -ciklodekstrina i takođe onemogućava njegovu parenteralnu primenu. Zbog potencijalne nefrotoksičnosti, parenteralna primena α -ciklodekstrina je takođe ograničena i on se u parenteralnim preparatima nalazi u veoma niskim koncentracijama (Loftsson i Brewster, 2010). α -, β - i γ -ciklodekstrin se nalaze na tzv. GRAS (eng. *Generally Recognized As Safe*) listi pomoćnih materija Američke uprave za hranu i lekove (FDA). α -, β - i γ -ciklodekstrin, kao i hidroksipropil- β -ciklodekstrin imaju svoje monografije u trenutno važećim izdanjima Evropske i Američke farmakopeje (Kurkov i Loftsson, 2013).

Do formiranja lekovita supstanca-ciklodekstrin kompleksa dolazi usled inkorporiranja celog ili češće samo dela molekula lipofilne lekovite supstance unutar lipofilne šupljine ciklodekstrina. Pokretačke sile za proces kompleksiranja predstavljaju elektrostatičke i Van der Valsove sile, vodonične veze, smanjenje konformacionog naprezanja i proces prenosa elektrona. Procesi formiranja i disocijacije nastalog kompleksa su u dinamičkoj ravnoteži, pri čemu u ovim procesima ne dolazi do formiranja ili raskidanja kovalentnih veza (Liu i Guo, 2002; Kurkov i Loftsson, 2013).

Reverzibilan proces nastanka lekovita supstanca-ciklodekstrin kompleksa može se predstaviti ravnotežnom reakcijom (1), sa odgovarajućom konstantnom ravnoteže, koja se označava kao konstanta stabilnosti lekovita supstanca-ciklodekstrin kompleksa- K_s (2) (Kurkov i Loftsson, 2013):

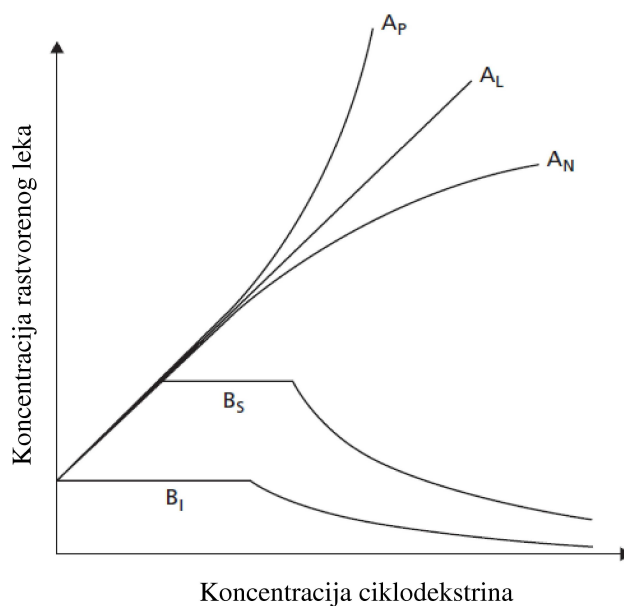


$$K_s = \frac{[L_m CD_n]}{[L]^m \cdot [CD]^n} \quad (2)$$

gde je $[L]$ koncentracija lekovite supstance, $[CD]$ koncentracija ciklodekstrina i $[L_m CD_n]$ koncentracija nastalog lekovita supstanca-ciklodekstrin kompleksa

1.2.1. Analiza fazne rastvorljivosti u sistemu lekovita supstanca-ciklodekstrin

Određivanjem fazne rastvorljivosti u sistemu lekovita supstanca-ciklodekstrin može se izračunati vrednost konstante stabilnosti kompleksa i doći do korisnih informacija u vezi same stehiometrije nastalog kompleksa (Loftsson i Brewster, 2010). Sam metod se zasniva na dodavanju lekovite supstance u višku rastvorima koji sadrže rastuće koncentracije ispitivanog ciklodekstrina. Grafičkim prikazivanjem koncentracije rastvorene lekovite supstance u zavisnosti od koncentracije ciklodekstrina dobija se dijagram fazne rastvorljivosti. Dijagrami fazne rastvorljivosti se na osnovu različitog oblika mogu podeliti u dva osnovna tipa: tip A i tip B (Slika 6). Kod dijagrama tipa A, rastvorljivost lekovite supstance raste sa porastom koncentracije ciklodekstrina. U okviru ovog tipa dijagrama, mogu se razlikovati tri podtipa: tip A_L , koji se odlikuje linearnim rastom rastvorljivosti lekovite supstance, tip A_P , kod koga postoji pozitivno odstupanje od linearnosti (pri višim koncentracijama ciklodekstrina ostvaruje se efikasnija solubilizacija lekovite supstance) i tip A_N , kod koga se uočava negativno odstupanje od linearnosti pri višim koncentracijama ciklodekstrina, odnosno manje efikasna solubilizacija molekula lekovite supstance. A_L tip dijagrama fazne rastvorljivosti ukazuje na formiranje kompleksa prvog reda u odnosu na ciklodekstrin, a prvog ili višeg reda u odnosu na lekovitu supstancu. Ukoliko je nagib dijagrama A_L tipa manji od jedan, može se pretpostaviti da dolazi do formiranja kompleksa lekovita supstanca-ciklodekstrin u stehiometrijskom odnosu 1:1. Kod A_P dijagrama pri višim koncentracijama ciklodekstrina dolazi do formiranja kompleksa višeg reda u odnosu na ciklodekstrin. Stehiometrija ovih kompleksa najjednostavnije se procenjuje analizom



Slika 6. Prikaz osnovnih tipova dijagrama fazne rastvorljivosti

stepena zakrivljenosti dijagrama. Ukoliko se kriva najbolje uklapa u kvadratni matematički model, to ukazuje na formiranje lekovita supstanca-ciklodekstrin kompleksa u stehiometrijskom odnosu 1:2, dok kubni model ukazuje na formiranje kompleksa u odnosu 1:3. Za A_N tip dijagrama se pretpostavlja da je posledica promena koje u rastvaraču nastaju pod uticajem ciklodekstrina, kao i asocijacije molekula ciklodekstrina pri višim koncentracijama. Tip B dijagrama fazne rastvorljivosti ukazuje na formiranje kompleksa ograničene rastvorljivosti (B_S tip), ili nerastvorljivih kompleksa (B_I tip). Tip B dijagrama fazne rastvorljivosti je karakterističan za β -ciklodekstrin, koji se karakteriše niskom rastvorljivošću, dok se primenom supstituisanih derivata ciklodekstrina (hidroksipropil- β -ciklodekstrin i sulfobutiletar- β -ciklodekstrin) dobija tip A dijagrama (Brewster i Loftsson, 2007).

Na osnovu eksperimentalno dobijenog dijagrama fazne rastvorljivosti A_L tipa, može se izračunati vrednost K_s . Ukupna rastvorljivost lekovite supstance $[L_u]$ jednaka je zbiru osnovne rastvorljivosti lekovite supstance u medijumu bez ciklodekstrina $[L_0]$ i koncentracije nastalog lekovita supstanca-ciklodekstrin kompleksa $[L_m CD_n]$ (4) (Brewster i Loftsson, 2007):

$$[L] = [L_0] \quad (3)$$

$$[L_u] = [L_0] + m[L_m CD_n] \quad (4)$$

Analogno se ukupna koncentracija ciklodekstrina u rastvoru može predstaviti jednačinom:

$$[CD_u] = [CD] + n[L_m CD_n] \quad (5)$$

gde je $[CD_u]$ ukupna koncentracija ciklodekstrina, a $[CD]$ koncentracija slobodnog ciklodekstrina u rastvoru. Iz prethodnih jednačina vrednosti za $[L_m CD_n]$ i $[CD]$ se mogu izraziti na sledeći način:

$$[L_m CD_n] = \frac{[L_u] - [L_0]}{m} \quad (6)$$

$$[CD] = [CD_u] - n[L_m CD_n] \quad (7)$$

Zamenom navedenih izraza u izraz za K_s (2), u slučaju kompleksa koji su prvog reda u odnosu na ciklodekstrin ($n = 1$) dobija se:

$$[L_u] = \frac{m \cdot K_s \cdot [L_0]^m \cdot [CD_u]}{1 + K_s \cdot [L_0]^m} + [L_0] \quad (8)$$

Grafičkim prikazivanjem $[L_u]$ u zavisnosti od $[CD_u]$ dobija se prava linija sa odsečkom na y-osi koji je jednak $[L_0]$ i nagibom, koji je definisan jednačinom:

$$nagib = \frac{m \cdot K_s \cdot [L_0]^m}{1 + K_s \cdot [L_0]^m} \quad (9)$$

U slučaju lekovita supstanca-ciklodekstrin kompleksa nastalog u stehiometrijskom odnosu 1:1 ($m = 1$), izraz za K_s se može napisati na sledeći način (Brewster i Loftsson, 2007):

$$K_s = \frac{nagib}{[L_0](1 - nagib)} \quad (10)$$

Iz navedenog izraza vidi se da na izračunatu vrednost K_s veliki uticaj ima vrednost određene rastvorljivosti lekovite supstance $[L_0]$. Iako bi trebalo da vrednost odsečka dijagrama fazne rastvorljivosti bude jednaka $[L_0]$, često se ove vrednosti razlikuju, naročito u slučaju teško rastvorljivih lekovitih supstanci ($[L_0] < 1$ mg/ml). Postoji nekoliko objašnjenja za ovu pojavu. Lekovita supstanca može da formira dimere, trimere ili agregate višeg reda koji su rastvorljivi u vodi, kao i agregate sa korišćenim ekscipijensima prisutnim u medijumu za kompleksiranje. Iako su nastali agregati rastvorljivi u vodi, oni ne mogu da formiraju komplekse sa ciklodekstrinima, već to

mogu samo pojedinačni molekuli lekovite supstance. Neidealna, struktuirana priroda vode kao rastvarača, formiranje inkluzionih i neinkluzionih lekovita supstancaciklodekstrin kompleksa, kao i neprecizno eksperimentalno određivanje $[L_o]$ takođe mogu predstavljati razlog za uočene razlike u vrednosti $[L_o]$ i odsečka dijagrama fazne rastvorljivosti. Zbog svih navedenih faktora, koji mogu dovesti do grešaka u određivanju K_s , uveden je parametar koji se naziva *efikasnost kompleksiranja (CE)*, koji omogućava bolju procenu kako solubilizacionog kapaciteta ciklodekstrina za različite lekovite supstance, tako i uticaja različitih ekscipijensa na solubilizaciju molekula lekovite supstance ciklodekstrinima. CE predstavlja odnos između koncentracije ciklodekstrina u kompleksu i slobodnog ciklodekstrina. CE se računa iz nagiba dijagrama fazne rastvorljivosti i nezavisna je od vrednosti $[L_o]$. U slučaju nastanka lekovita supstancaciklodekstrin kompleksa u stehiometrijskom odnosu 1:1, CE se može izračunati prema sledećoj jednačini (Loftsson i sar., 2005):

$$CE = \frac{[LCD_n]}{[CD]} = [L_o]K_s = \frac{nagib}{1 - nagib} \quad (11)$$

gde je $[LCD_n]$ koncentracija rastvorenog kompleksa, $[CD]$ koncentracija rastvorenog slobodnog ciklodekstrina. Iz vrednosti CE može se izračunati odnos lekovita supstancaciklodekstrin u medijumu za kompleksiranje zasićenim lekovitom supstancom, na osnovu jednačine (Loftsson i sar., 2005):

$$L : CD \text{ molar ni odnos} = 1 : \frac{CE + 1}{CE} \quad (12)$$

Analizom procesa kompleksiranja ciklodekstrina sa različitim lekovitim supstancama, ustanovljena je prosečna vrednost za CE od 0,3, na osnovu čega se može zaključiti da od svaka četiri molekula ciklodekstrina prisutna u medijumu za kompleksiranje, samo jedan gradi kompleks sa lekovitom supstancom. Imajući u vidu relativno visoku molekulsku masu ciklodekstrina i nisku efikasnost kompleksiranja, kompleksiranje lekovitih supstanci sa ciklodekstrinima često za rezultat ima porast mase formulacije iznad prihvatljive granice za peroralnu primenu. Stoga je kompleksiranje sa ciklodekstrinima prihvatljiv način za formulaciju samo visoko do umereno potentnih lekovitih supstanci uz relativno visoku CE. Zbog toga se intezivno radi na razvoju tehnika za povećanje CE. Neke od najčešće primenjivanih tehnika uključuju: dodatak hidrofilnih polimera, jonizaciju molekula lekovite supstance i

građenje soli, dodatak hidroksikarboksilnih kiselina, dodatak isparljivih kiselina i baza i dodatak korastvarača (Loftsson i sar., 2005; Loftsson i Brewster, 2012).

1.3. Simulacija molekularne dinamike (eng. *molecular dynamics simulations*)

1.3.1. Osnovni principi na kojima se zasniva simulacija molekularne dinamike

Već dugo vremena je poznato da su fizičko-hemijske karakteristike materijala na makroskopskom nivo određene fenomenima koji se dešavaju na molekulskom (mikroskopskom) nivou. Kako uspostavljanje veze između makroskopskih karakteristika materijala i fenomena na molekulskom nivou primenom konvencionalnih eksperimentalnih tehnika nije jednostavno, pristupilo se razvoju naprednih kompjuterskih sistema, kojima se u veštački stvorenim uslovima mogu simulirati dešavanja na molekulskom nivou.

Dobro je poznato da nakon dovoljno dugo vremena svi sistemi prelaze u stanje ravnoteže (ekvilibrijuma) u kome pod definisanim termodinamičkim uslovima (temperatura, pritisak i sastav smeše) više ne dolazi do promena makroskopskih karakteristika sistema. Sistemi koji su od značaja za farmaciju se, ili nalaze u stanju ekvilibrijuma (rastvori, kristalni oblici, kokristali, mezofaze, tečni kristali), ili su u procesu ekvibracije (metastabilni polimorfni oblici, amorfni oblici, emulzije, liposomi) sa tendencijom prelaska u stanje ekvilibrijuma. Prema Drugom principu termodinamike, prelaz u stanje ekvilibrijuma uslovljen je porastom entropije, odnosno neuređenosti sistema. Međutim, iako Drugi princip termodinamike daje osnovna objašnjenja faznih prelaza u sistemu, on ne objašnjava fenomene na molekulskom nivou, koji su zapravo uzrok ovakvog ponašanja sistema. Statistička mehanika omogućava povezivanje makroskopskih karakteristika sistema sa mikrostanjima čestica koje čine taj sistem. Kako bi se uspostavila ova veza potrebno je prvo definisati mikrostanja, što uključuje definisanje impulsa i pozicije čestice u prostoru i ako je moguće definisanje rotacionih i konformacionih stanja svake čestice u sistemu. Prema jednom od osnovnih postulata na kojima se zasniva statistička mehanika, svaka makroskopska osobina nekog sistema može se predstaviti kao zbir, ili srednja vrednost osobina čestica koje čine sistem. Statistička mehanika definiše da je u slučaju sistema koji se sastoji od velikog broja

čestica u stanju ekvilibrijuma, verovatnoća da se čestica nađe u energetsom stanju i , definisanom energijom E_i , proporcionalna Bolcmanovom faktoru $e^{-E_i/kT}$ (Cui, 2011):

$$p_i = K e^{-\frac{E_i}{kT}} \quad (13)$$

gde je T temperatura, k Bolcmanova konstanta i K faktor čija se vrednost uzima tako da je $\sum p_i = 1$. Kada distribucija energetskih stanja čestica, definisana Bolcmanovim zakonom, nije postignuta, sistem se nalazi izvan ekvilibrijuma i teži da se nađe u stanju ekvilibrijuma. Dok se mikrostanja pojedinačnih čestica menjaju u vremenu, u zavisnosti od pozicije čestica, impulsa i energije, distribucija čestica u različitim mikrostanjima sledi Bolcmanov zakon i nezavisna je od vremena. Tako se primenom Bolcmanovog zakona uspostavlja veza između vremenski zavisnih mikrostanja pojedinačnih čestica i makroskopskih karakteristika sistema, koje su nezavisne od vremena. Generisanjem ovakvih mikrostanja primenom modela simulacije molekularne dinamike omogućava mehanističko objašnjenje brojnih pojava i osobina sistema na makroskopskom nivou (npr. gustina, mehanička svojstva materijala, viskozitet, električna provodljivost, rastvorljivost, pritisak pare, itd.). Osnov Bolcmanovog zakona zapravo predstavlja Centralna granična teorema, dobro poznata statistička zakonitost prema kojoj suma (ili srednja vrednost) velikog broja nezavisnih i identično raspoređenih slučajnih promenljivih teži normalnoj raspodeli. Imajući u vidu da se sistemi koji se proučavaju na mikroskopskom nivou sastoje od velikog broja molekula sa više stepeni slobode kretanja (tj. veliki broj nezavisnih varijabli), jasno je da će se nakon određenog vremena u sistemu postići normalna distribucija kretanja čestica. Iz svega navedenog se jasno vidi da ekvilibracija sistema nije ništa drugo nego posledica dobro poznatih statističkih zakonitosti na sistemima koji se sastoje od velikog broja čestica (eng. *many body systems*) (Cui, 2011).

1.3.2. Postupak izvođenja simulacije molekularne dinamike

Pre početka izvođenja simulacije molekularne dinamike potrebno je identifikovati komponente (tj. molekule) koje će biti korišćene u simulaciji. Zatim je neophodno definisati interakcije između čestica, što se označava i kao polje sila (eng. *force field*) i zapravo predstavlja potencijalnu energiju u zavisnosti od međučestičnog rastojanja. Ove sile bi trebale da budu odraz specifičnih karakteristika samog sistema koji se ispituje

simulacijom molekularne dinamike. Nakon toga potrebno je konstruisati kompjuterski model koji sadrži ispitivane komponente pod definisanim termodinamičkim uslovima (gustina, pritisak, temperatura). Ovo podrazumeva konstruisanje tzv. ćelije za simulaciju (eng. *simulation box*) odgovarajućeg volumena u koju se smeštaju odabrani molekuli, kojima se dodeljuje početna pozicija u prostoru i brzina kretanja. Pozicija molekula treba da što više odgovara realnom stanju u sistemu. Tako se u slučaju kristala, molekuli postavljaju u odgovarajuću kristalnu rešetku, dok se u slučaju rastvora molekuli rastvorene supstance homogeno disperguju unutar molekula rastvarača. Delovanjem gore navedene sile na čestice dolazi do njihovog kretanja u skladu sa dobro poznatom *Njutnovom jednačinom kretanja* (Meller, 2001; Cui, 2011):

$$\vec{F}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} \quad (14)$$

gde je $\vec{r}_i(t) = (x_i(t), y_i(t), z_i(t))$ vektor položaja čestice i , $\vec{F}_i$ sila koja deluje na česticu i , a m_i masa čestice i . Osnovni zadatak kompjuterskih sistema koji se koriste u simulaciji predstavlja izračunavanje trajektorija čestica, koje predstavljaju promenu vektora položaja $\vec{r}_i(t)$ i vektora brzine $\vec{v}_i(t)$ u vremenu. Vektor $\vec{r}_i(t)$ predstavlja odraz promene položaja svake čestice u prostoru tokom vremena, dok brzina $\vec{v}_i(t)$ predstavlja odraz kinetičke energije i temperature u sistemu. Numeričkom integracijom Njutnove jednačine (14) za svaki vremenski korak simulacije mogu se izračunati vrednosti položaja i brzine čestica. Ova izračunavanja vrše se najčešće korišćenjem *Verletovog algoritma*, koji omogućava izračunavanje položaja čestice u vremenu $(t+\Delta t)$, ako je poznat položaj čestice u vremenu t (pre početka simulacije definisane su početne vrednosti položaja i brzine čestica). Na osnovu dobijenih trajektorija čestica mogu se predvideti makroskopske karakteristike sistema (Meller, 2001; Cui, 2011).

Postizanje stanja ekvilibrijuma u sistemu određuju vrednosti termodinamičkih parametara koji se postavljaju pre izvođenja simulacije i vrednost sile koja deluje na molekule, koja predstavlja odraz fizičko-hemijskih karakteristika samog materijala. Sila interakcije (polje sile) između čestica može se prikazati kao gradijent potencijalne energije duž vektora koji spaja čestice (Cui, 2011):

$$\vec{F}_{ij} = -\frac{d\Phi_{ij}}{d\vec{r}_{ij}} \quad (15)$$

gde su: $\vec{F}_{ij}$ sila interakcije između čestica i i j , Φ_{ij} -potencijal i $\vec{r}_{ij}$ -vektor koji spaja čestice i i j . Sve interakcije između čestica u sistemu potiču od interakcija između elektrona i jezgara, pri čemu su moguće interakcije elektron-elektron, elektron-jezgro i jezgro-jezgro. Ukupni potencijal interakcije između čestica može se predstaviti kao zbir Kolumbovog, polarizacionog, disperzionog i Paulijevog repulzivnog potencijala (Cui, 2011):

$$\Phi_{ij} = A + e^{(-Br_{ij})} - Cr_{ij}^{-6} + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon^0} r_{ij}^{-1} \quad (16)$$

gde su r_{ij} rastojanje između čestica i i j , q_i i q_j naelektrisanja čestica i i j , ϵ^0 dielektrična propustljivost vakuumu, A , B i C parametri koji pokazuju uticaj specifične raspodele naelektrisanja na međučestične interakcije. Za izračunavanje polja sila prema jednačini (16) najčešće se koriste dva metoda. Prema prvom metodu, vrednosti za A , B i C , kao i distribuciju naelektrisanja q se parametrizuju pod pretpostavkom da isti atom koji se nalazi u okruženju istih hemijskih grupa ima istu raspodelu naelektrisanja, a samim tim i istu vrednost polja sila. Drugi metod se zasniva na izračunavanju raspodele elektronske gustine primenom *Teorije funkcionalne gustine* (eng. *Density functional theory-DFT*). Nakon izračunavanja polja sila potrebno je validirati ga prema eksperimentalnim podacima, koji najčešće uključuju energiju sublimacije, strukturne osobine kristalne strukture i spektroskopske podatke, kao što su vibracione frekvencije. Trenutno dostupni kompjuterski programi za izvođenje simulacija molekularne dinamike omogućavaju rad sa različitim poljima sila koja su razvijena na gore navedenim principima. Neka od često korišćenih polja sila su: *CHARMM*, *AMBER*, *COMPASS*, *GROMOS*, *PCFF* i dr. Korišćenje ovih standardnih polja sila omogućava reprodukovanje velikog broja fenomena koji su od značaja za farmaciju. Pri tome treba imati u vidu da neka polja sila mogu koristiti za reprodukovanje nekih fenomena, a nekih ne, o čemu je potrebno prikupiti detaljne literaturne podatke pre izvođenja simulacije. Preporučuje se da se na početku ispitivanja koriste standardna polja sila, a ukoliko ona ne mogu da reprodukuju ispitivani fenomen, koriste se polja sila prilagođena problemu koji se ispituje (eng. *customer-adjusted force field*) (Cui, 2011).

Zahvaljujući velikim mogućnostima tehnike simulacije molekularne dinamike u proučavanju brojnih fenomena na nivou molekula i atoma, ova tehnika nalazi sve širu primenu u razvoju novog leka i proučavanju interakcija biomolekula. Simulacija

molekularne dinamike je do sada uspešno primenjena u proučavanju interakcija lek-receptor (Zhao i Caflisch, 2015) proučavanju konformacionih promena proteinskih molekula (Meller, 2001), predviđanju rastvorljivosti lekovite supstance u različitim medijumima (Huynh i sar., 2008), proučavanju pokretljivosti molekula lekovite supstance dispergovanih unutar matriksa čvrstih disperzija (Xiang i Anderson, 2003), proučavanju lek-ciklodekstrin interakcija (Zhang i sar., 2010) i molekularnih mehanizama povećanja efiksanosti lek-ciklodekstrin kompleksiranja sa dodatkom drugih pomoćnih supstanci (Figueiras i sar., 2010). Ipak, prilikom primene simulacije molekularne dinamike, treba biti svestan i nekih od njenih ograničenja. Smatra se da je najveće ograničenje ove tehnike kratko trajanje same simulacije, koje najčešće iznosi nekoliko nanosekundi (10^{-9} s), a trenutno je ograničeno do maksimalno reda veličine mikrosekundi (10^{-6} s). Ovo može reprodukovati procese koji se u realnom okruženju dešavaju u navedenim vremenskim intervalima. Međutim određeni procesi, kao što su konformacione promene molekula proteina dešavaju se u toku vremenskog perioda koji je znatno duži u odnosu na trajanje simulacije. Brzo kretanje atoma u sistemu ograničava trajanje vremenskog koraka u toku koga će se vršiti gore navedena numerička integracija jednačine kretanja na svega oko jedan femtosekund (10^{-15} s). Iz ovoga je jasno da se proces simulacije sastoji iz miliona ponavljanja ovih pojedinačnih koraka u okviru kojih se vrše pojedinačna izračunavanja (Meller, 2001). Zbog velikog broja izračunavanja koje je potrebno izvesti, simulacije molekularne dinamike se najčešće izvode na tzv. superkompjuterima, koji sadrže desetine paralelno povezanih procesora. Kompleksnost procesa simulacije molekularne dinamike najbolje ilustruje činjenica da čak i korišćenjem kompjuterskih sistema sa paralelnim procesorima, proces simulacije sistema relativno male veličine sa oko 25 000 atoma može trajati i nekoliko meseci (Durrant i McCammon, 2011). Ostala ograničenja simulacije molekularne dinamike predstavljaju zanemarivanje kvantnih efekata u većini slučajeva, mogućnost da polje sila ne odražava realne sile između atoma i mala veličina ćelije u kojoj se odvija simulacija, usled čega je velika mogućnost interakcije komponenata (Meller, 2001; Durrant i McCammon, 2011). Rezultate dobijene simulacijom molekularne dinamike potrebno je, kad god je to moguće, potvrditi odgovarajućim eksperimentalnim rezultatima. Međutim, u mnogim slučajevima primenom trenutno dostupnih eksperimentalnih tehnika nije moguće dobiti informacije koje bi, bilo potvrdile, ili

opovrgle rezultate simulacije molekularne dinamike. Često se simulacija molekularne dinamike upravo i primenjuje kada primenom eksperimentalnih tehnika nije moguće razjasniti određeni fenomen. U takvim slučajevima rezultate simulacije molekularne dinamike treba tretirati kao hipoteze, koje u nedostatku eksperimentalnih rezultata doprinose boljem razumevanju proučavane pojave (Cui, 2011).

1.4. Metodologija eksperimentalnog dizajna

Prilikom razvoja formulacije i proizvodnog procesa, često je potrebno razmotriti efekte dva ili više faktora (nezavisno promenljivih) na vrednosti odgovora (zavisno promenljivih). Nezavisno promenljive su najčešće faktori formulacije (količine komponenti formulacije i njihove kvalitativne i kvantitativne osobine) i procesa, dok zavisno promenljive predstavljaju odabrane karakteristike proizvoda, ili parametre koji ukazuju na performanse proizvodnog procesa (Dejaegher i Heyden, 2011; Đuriš i sar., 2013a). Univarijantni metod, odnosno istovremeno variranje samo jednog faktora (eng. *one-variable-at-a-time-OVAT*), često zahteva izvođenje velikog broja eksperimenata, pri čemu se ispituje samo mali deo eksperimentalnog prostora, a utvrđivanje prisustva faktorskih interakcija nije moguće. Sa druge strane, multivarijantni metod podrazumeva istovremeno variranje većeg broja faktora u cilju utvrđivanja njihovog uticaja na vrednosti odgovora (Dejaegher i Heyden, 2011).

Metodologija eksperimentalnog dizajna predstavlja sistematski način za planiranje, izvođenje i interpretaciju rezultata eksperimenata, sa ciljem dobijanja što većeg broja informacija uz izvođenje što manjeg broja eksperimenata (Lewis i sar., 1999; Đuriš i sar., 2013a). Pored definisanja odgovarajućih nezavisno i zavisno promenljivih, primena tehnika eksperimentalnog dizajna zahteva i definisanje vrednosti (nivoa) faktora u okviru kojih će biti vršeno ispitivanje i to na osnovu rezultata preliminarne eksperimenata, ili literaturno dostupnih podataka. Metodologija eksperimentalnog dizajna se u farmaceutskoj tehnologiji može koristiti u cilju identifikacije faktora koji ispoljavaju značajan uticaj na vrednosti zavisno promenljivih, kvantifikacije faktorskih efekata, optimizacije formulacije i procesa i ispitivanja uticaja udela komponenti formulacije na njene osobine. Na osnovu toga se tehnike eksperimentalnog dizajna mogu podeliti na skrining (eng. *screening*) dizajn, dizajn površine odgovora i dizajn smeše.

Skrining dizajn se koristi kako bi se od većeg broja potencijalnih faktora identifikovali oni koji imaju najveći uticaj na vrednost odabranog odgovora. Kao skringing dizajn najčešće se koriste *frakcioni faktorski dizajn* i *Plackett-Burman dizajn*, koji omogućavaju ispitivanje većeg broja faktora (f), variranjem najčešće na dva nivoa, uz korišćenje relativno malog broja eksperimenata ($N \geq f + 1$). U slučaju da je broj faktora mali, kao skringing dizajn se može koristiti i *pun faktorski dizajn*. Kao skringing tehnike eksperimentalnog dizajna takođe se mogu koristiti i *dizajn kombinovanih nivoa* (eng. *mixed-level design*), *superzasićeni* i *D-optimalni dizajn*. Skringing eksperimentalni dizajn omogućava istovremeno ispitivanje kvalitativnih i kvantitativnih faktora, što ga čini naročito pogodnim za primenu u ranim fazama razvoja formulacije (Dejaegher i Heyden, 2011).

Faktori koji imaju najveći uticaj na ispitivani odgovor, identifikovani primenom skringing dizajna, ili na osnovu prethodnog iskustva, dalje se ispituju primenom *dizajna površine odgovora*. Ova vrsta eksperimentalnog dizajna omogućava kvantifikaciju faktorskih efekata i pronalaženje optimalnih vrednosti faktora pri kojima se postižu ciljne vrednosti odgovora. Metodologija površine odgovora omogućava ispitivanje samo kvantitativnih faktora, pošto se odgovor predstavlja kao funkcija vrednosti ispitivanih faktora. Primena ove vrste eksperimentalnog dizajna omogućava izračunavanje kompleksnih matematičkih modela koji uključuju kvadratne članove, kao i članove koji predstavljaju faktorske interakcije. Dobijena funkcija se zatim predstavlja grafički kao površina odgovora. Dizajnom površine odgovora se ispituju najčešće dva do tri faktora na minimum tri nivoa. Veći broj faktora se retko ispituje, pošto se time znatno povećava broj potrebnih eksperimenata, a i prilikom ispitivanja tri i više faktora moguće je grafički predstaviti samo deo površine odgovora. Dizajn površine odgovora može biti simetričan ili asimetričan, u zavisnosti od oblika eksperimentalnog prostora koji se ispituje. Najčešće korišćeni simetrični tipovi dizajna površine odgovora su: *pun faktorski dizajn na tri nivoa*, *centralni kompozitni dizajn*, *Box-Behnken* i *Doehlert-ov dizajn*. U slučaju kada je eksperimentalni prostor koji se ispituje nepravilnog oblika, preporučuje se primena asimetričnih tipova dizajna površine odgovora, kao što je *D-optimalni dizajn* (Dejaegher i Heyden, 2011).

1.4.1. Eksperimentalni dizajn smeše

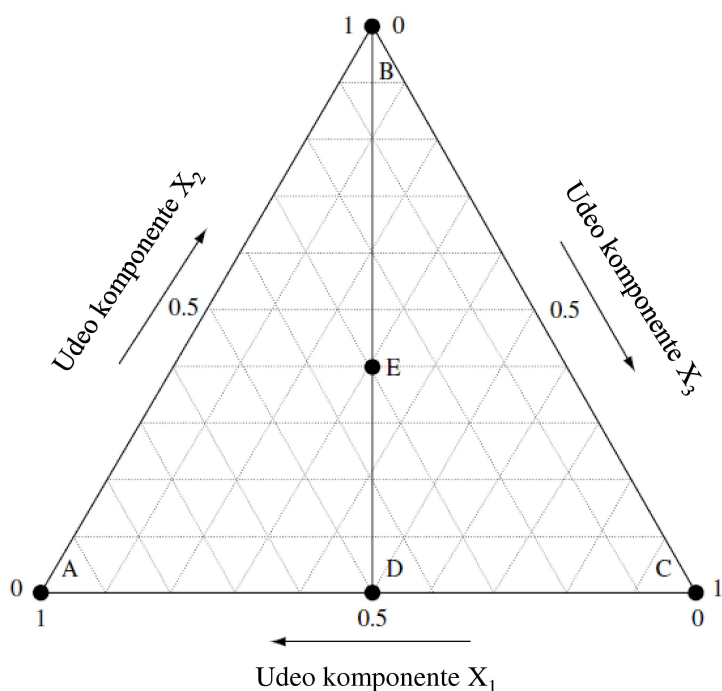
U toku razvoja formulacije, nakon odabira sastavnih komponenti, potrebno je pronaći i optimalni sastav formulacije. Sa tim ciljem, potrebno je ispitati uticaj uдела komponenta formulacije na odgovarajuće osobine formulacije. Primenom gore navedenih tehnika eksperimentalnog dizajna nije moguće istovremeno varirati udele svih komponenta smeše.

Eksperimentalni dizajn smeše predstavlja posebnu tehniku eksperimentalnog dizajna, koja omogućava ispitivanje uticaja sastava formulacije na neke od njenih osobina. Najznačajnija karakteristika ove vrste eksperimentalnog dizajna je da faktori koji se ispituju (udeli komponenta smeše) nisu međusobno nezavisni, pošto je njihov zbir jednak 100%. Tako će promena u udelu jedne komponente smeše dovesti do promene uдела bar još jedne komponente. Takođe, udeli komponenta smeše moraju biti u rasponu između 0 i 100%. Na osnovu prethodno navedenog, farmaceutske formulacije se mogu predstaviti kao smeše sastavljene od q komponenta (aktivna(e) i pomoćna(e) supstanca(e)). Ako se udeli komponenta označe sa $X_1, X_2, \dots, X_q$, onda je:

$$0 \leq X_i \leq 100 \% \quad (17)$$

$$X_1 + X_2 + \dots + X_q = 100\% \quad (18)$$

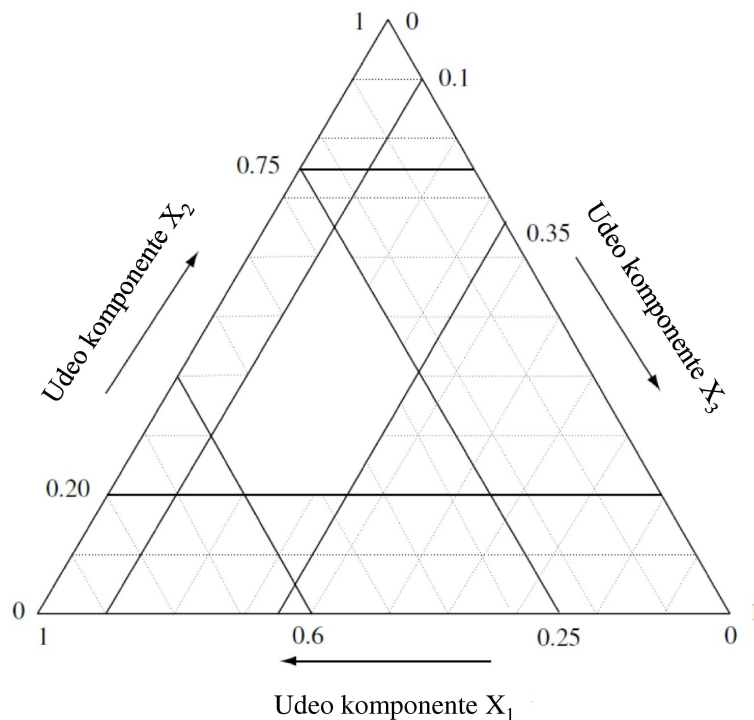
gde je i bilo koji broj od 1 do q . Ukoliko se broj komponenta formulacije označi sa q , faktorski prostor, koji obuhvata sve moguće kombinacije komponenta može se predstaviti kao geometrijska figura sa q temena i $q-1$ dimenzija. Tako se u slučaju dve komponente, svi njihovi udeli u smeši mogu predstaviti pomoću prave linije. U slučaju smeše sa tri komponente, faktorski prostor predstavlja jednakokranični trougao, pri čemu se sastav bilo koje smeše može prikazati kao jedna tačka unutar trougla (Slika 7). Tako temena prikazanog trougla (A, B i C) predstavljaju formulacije koje sadrže samo jednu komponentu. Stranice trougla predstavljaju formulacije koje sadrže dve komponente. Tako tačke koje se nalaze na stranici AC predstavljaju formulacije koje sadrže komponente X_1 i X_3 , pri čemu idući od tačke C (udeo komponente X_3 je 1 (100%)) ka tački A (udeo komponente X_1 je 1 (100%)), udeo komponente X_3 opada, dok udeo komponente X_1 raste. Tačke na pravoj liniji BD predstavljaju formulacije sa jednakim udelima komponenta X_1 i X_3 , pri čemu idući od tačke D ka tački B udeo komponente X_2 raste, a komponenta X_1 i X_3 opada u istom stepenu (Armstrong, 2006).



Slika 7. Ternarni dijagram smeše sastavljene iz komponentata X_1 , X_2 i X_3 (adaptirano prema Armstrong, 2006)

Često je u razvoju formulacije potrebno ograničiti udele pojedinih komponentata u užem rasponu nego između 0 i 100%. Tako, na primer, nema smisla razvijati formulaciju bez lekovite supstance, a takođe su i retke formulacije koje sadrže samo lekovitu supstancu. Takođe, i pomoćne supstance koje ulaze u sastav formulacije moraju biti prisutne u određenoj koncentraciji kako bi vršile svoju funkciju (Lewis i sar., 1999; Armstrong, 2006). Postavljanje donjih granica za udele komponentata formulacije ne dovodi do promene u obliku faktorskog prostora, koji se u slučaju trokomponentnog sistema može predstaviti u obliku trougla (Armstrong, 2006). U takvim slučajevima je, kao i u slučaju sistema gde udeli komponentata nisu ograničeni (osim ograničenja udela između 0 i 100%), takođe moguće koristiti tkzv. simetrične tipove eksperimentalnog dizajna, kao što su *simplex lattice* i *simplex centroid*. (Dejaegher i Heyden, 2011). Postavljanje gornjih ili gornjih i donjih granica za udele komponentata u smeši, dovodi do promene oblika faktorskog prostora, kao što je prikazano na slici 8. U ovom slučaju, gde se postavljanjem granica za udele komponentata dobija faktorski prostor nepravilnog oblika, nije moguće koristiti simetrične tipove eksperimentalnog dizajna, kao što su *simplex lattice* i *simplex centroid*

(Armstrong, 2006; Dejaegher i Heyden, 2011). Primenom ovakvih tipova eksperimentalnog dizajna dobili bi se eksperimentalni planovi koji uključuju eksperimente, koji su izvan postavljenih granica i koje nema smisla izvoditi, ili bi se dobio suviše mali eksperimentalni prostor koji ne pokriva znatan deo eksperimentalnog prostora sa unapred postavljenim granicama (Olsson, 2006). Zbog toga je kod ovakvih sistema neophodno koristiti tkzv. asimetrične tipove eksperimentalnog dizajna, kao što su *D-optimalni* i *Kennard-Stone* dizajn (Dejaegher i Heyden, 2011).



Slika 8. Ternarni dijagram trokomponentne smeše sa postavljenim gornjim i donjim granicama za udele komponenata. Raspoloživi eksperimentalni prostor je predstavljen nešrafiranom površinom (adaptirano prema Armstrong, 2006)

D-optimalni eksperimentalni dizajn predstavlja vrstu eksperimentalnog dizajna koja se zasniva na softverskom algoritmu, koji omogućava da se iz seta tačaka kandidata izabere odgovarajući podset kao kompromis između broja potrebnih eksperimenata i kvaliteta dobijenih informacija (Đuriš i sar., 2013a). Prilikom razvoja *D-optimalnog* eksperimentalnog dizajna potrebno je prvo definisati matematički model i minimalni broj eksperimenata (N_{min}) koje je potrebno izvesti kako bi se izračunali odgovarajući koeficijenti u modelu. Zatim se definiše broj eksperimenata koji će se izvesti

($N \geq N_{min}$). Nakon dobijanja seta tačaka kandidata, vrši se izbor odgovarajućeg podseta na osnovu postavljenog kriterijuma, koji u slučaju D-optimalnog eksperimentalnog dizajna predstavlja maksimizacija informacione determinante $X_T X^1$ (predstavlja meru informacija u nezavisnoj promenljivoj X) za dati set tačaka kandidata i odabrani broj eksperimenata (Dejaegher i Heyden, 2011). Ovakvi algoritmi, koji se primenjuju u konstrukciji D-optimalnog eksperimentalnog dizajna, omogućavaju najprecizniju procenu koeficijenata u modelu (Varshosaz i sar., 2012). Razvoj D-optimalnog eksperimentalnog dizajna izborom tačaka iz unapred definisanog seta tačaka kandidata, čini ga naročito pogodnim za primenu u svim slučajevima gde postoje određene kombinacije faktora koje je nemoguće uključiti u eksperimente, odnosno izvođenje takvih eksperimenata nema nikakvog smisla. Takvi slučajevi su eksperimentalni prostori gde su vrednosti faktora diskretne, ili su unapred postavljena ograničenja za vrednosti faktora u eksperimentalnom prostoru (Olsson, 2006).

Tehnika eksperimentalnog dizajna smeše je uspešno primenjena u formulaciji različitih farmaceutskih oblika, kao što su matriks tablete sa kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance (El-Malah i sar., 2006; Huang i sar., 2004), emulzije za parenteralnu primenu (Jumaa i sar., 1998), kozmetičke U/V emulzije (Đuriš i sar., 2014a), mikroemulzije (Furlanetto i sar., 2011), samoemulgujući sistemi (Holm i sar., 2006; Basalious i sar., 2010) i čvrste disperzije (Rambali i sar., 2003; Đuriš i sar., 2014b).

1.5. Veštačke neuronske mreže

Razvoj lekovitog preparata predstavlja kompleksan problem, pošto zahteva pronalazak optimalnih vrednosti kako faktora formulacije, tako i parametara proizvodnog procesa. Često se u toku razvoja preparata identifikuje veći broj kritičnih faktora formulacije i procesnih parametara, koji značajno utiču na karakteristike dobijenog preparata. Primena metodologije površine odgovora u pronalaženju optimalnih vrednosti identifikovanih kritičnih parametara formulacije i procesa nosi sa sobom brojna ograničenja. Često je zavisnost između ispitivanih faktora i odgovora suviše kompleksna da bi se opisala dobijenim modelom polinoma određenog reda. U takvim slučajevima, primenom dobijenog modela nije moguće pouzdano utvrditi

¹ X_T -transponovana matrica od X

optimalne vrednosti ispitivanih faktora, niti predvideti vrednost odgovora za date vrednosti faktora. Takođe, sa povećanjem broja nezavisno promenljivih, broj koeficijenata u modelu se znatno povećava i samim tim se povećava i broj eksperimenata neophodnih za izračunavanje koeficijenata u modelu. Prilikom razvoja lekovitog preparata gotovo uvek je potrebno ispitati uticaj faktora formulacije i procesa na veći broj karakteristika preparata. U takvim slučajevima je potrebno za svaki odgovor sistema razviti poseban matematički model i tek nakon toga pronaći optimalne vrednosti ispitivanih faktora, pri kojima se ostvaruju željene karakteristike preparata. Takođe, prilikom korišćenja najvećeg broja tipova dizajna površine odgovora nije moguće u analizu uključiti rezultate već izvedenih eksperimenata, koji nisu bili organizovani u skladu sa eksperimentalnim dizajnom (Sun i sar., 2003).

Devedesetih godina prošlog veka, u razvoju formulacija i procesa, počinje da se ispituje mogućnost primene tehnika veštačke inteligencije, koje se odlikuju sposobnošću učenja i donošenja odluka na osnovu prethodno stečenog iskustva. Prepoznato je da se primenom *veštačkih neuronskih mreža*, kao jedne od tehnika veštačke inteligencije, može prevazići najveći broj ograničenja metodologije površine odgovora.

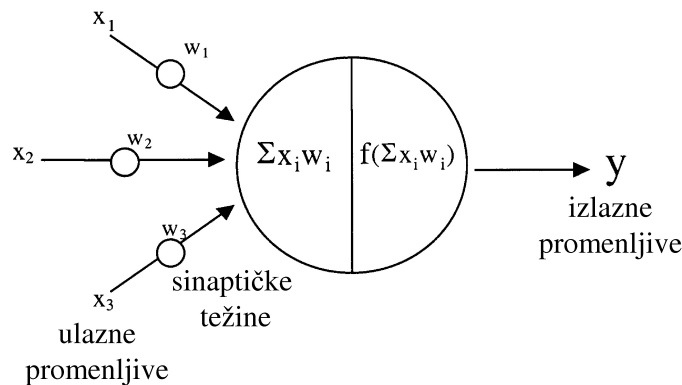
Veštačke neuronske mreže su kompjuterski programi osmišljeni sa ciljem da simuliraju neke od funkcija ljudskog mozga, kao što su učenje, sposobnost generalizacije i donošenja zaključaka na osnovu prethodno stečenog iskustva (Ibrić, 2002a). Osnovne karakteristike veštačkih neuronskih mreža, na kojima se uočava analogija sa načinom funkcionisanja ljudskog mozga, su sticanje znanja tokom procesa učenja, kao i čuvanje stečenog znanja u vezama između neurona (tzv. sinaptičke težine) (Ibrić i sar., 2012). Veštačke neuronske mreže su sastavljene iz više slojeva procesnih jedinica, odnosno neurona, koji su međusobno povezani vezama (sinapsama). Princip funkcionisanja veštačkih neuronskih mreža je da se ulazni podaci pomnoženi vrednostima sinaptičkih težina dovode na ulaz neurona i na njih se zatim primenjuje aktivaciona funkcija koja daje odgovarajući izlaz iz neurona (Slika 9) (Agatonovic-Kustrin i Beresford, 2000). Tako se signal koji stiže na ulaz svakog neurona u sloju q , može prikazati kao linearna kombinacija izlaznih signala x_p iz prethodnog sloja p , pomnoženih vrednostima odgovarajućih sinaptičkih težina w_{pq} :

$$y_q = \sum w_{pq} x_p \quad (19)$$

U neuronima skrivenog sloja na signal y_q se primenjuje aktivaciona funkcija, kojom se izračunava vrednost izlaza iz neurona. Najčešće korišćena aktivaciona funkcija je *sigmoidna (logistička)*, kojom se vrednost izlaza $f(y_q)$ izračunava prema jednačini:

$$f(y_q) = \frac{1}{1 + e^{(-\alpha y_q)}} \quad (20)$$

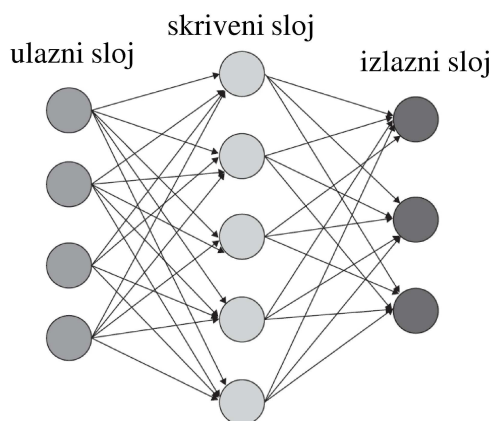
gde je α parametar koji se odnosi na oblik sigmoidne funkcije i sa povećanjem vrednosti ovog parametra povećava se nelinearnost funkcije. Ostale često korišćene aktivacione funkcije su: *linearna, hiperbolička, eksponencijalna, odskočna, softmax, funkcija kvadratnog korena* i dr. Moguće je i da se u različitim slojevima veštačkih neuronskih mreža koriste različite aktivacione funkcije. Aktivaciona funkcija ulaznog sloja je najčešće linearna, pošto se kroz ovaj sloj ulazni podaci samo prenose ka skrivenom sloju, gde se na njih najčešće primenjuje nelinearna aktivaciona funkcija (Đuriš i sar., 2013b).



Slika 9. Šematski prikaz modela veštačkog neurona (adaptirano prema Agatonovic-Kustrin i Beresford, 2000)

Osnovni parametri kojim se definiše svaki model veštačkih neuronskih mreža su arhitektura (topologija) mreže (broj slojeva, broj neurona u svakom sloju i način na koji su neuroni povezani), aktivaciona funkcija i vrsta algoritma za učenje mreže (Ibrić i sar., 2012).

Procesne jedinice (neuroni) koje čine veštačku neuronsku mrežu organizovane su u slojevima (Slika 10). Većina tipova veštačkih neuronskih mreža sadrži ulazni, jedan ili više slojeva skrivenih neurona i izlazni sloj neurona. Broj neurona u ulaznom i izlaznom sloju određen je brojem nezavisnih i zavisnih promenljivih. Broj neurona u skrivenom



Slika 10. Šematski prikaz strukture veštačke neuronske mreže sastavljene iz po jednog ulaznog, izlaznog i skrivenog sloja neurona

sloju, kao i broj samih skrivenih slojeva, može znatno varirati, u zavisnosti od složenosti ispitivanog problema. Smatra se da jedan skriveni sloj omogućava dobijanje adekvatnih modela u većini slučajeva, dok je veći broj skrivenih slojeva potreban samo u slučaju izuzetno složenih problema. Sa druge strane, izbor optimalnog broja neurona u skrivenom sloju je znatno kompleksniji zadatak. Broj neurona u skrivenom sloju zavisi od više faktora, kao što su: složenost ispitivanog problema, broj trening podataka, izabrani algoritam za učenje i aktivaciona funkcija, zahtevana preciznost predviđanja itd. Suviše mali broj neurona negativno se odražava na sposobnost učenja mreže, dok suviše veliki broj skrivenih neurona može dovesti do toga da je mreža pretrenirana, čime gubi sposobnost za generalizaciju (Sun i sar., 2003; Đuriš i sar., 2013b). Do sada je postavljen veći broj teorija koje definišu broj skrivenih neurona u zavisnosti od broja ulaznih promenljivih i trening podataka. Tako su Jadid i Fairbairn definisali gornju granicu za broj skrivenih neurona, prema sledećoj jednačini (Jadid i Fairbairn, 1996):

$$N_h = \frac{N_t}{R + (N_i + N_o)} \quad (21)$$

gde je N_h broj skrivenih neurona, N_t broj parova podataka u trening setu, N_i broj neurona u ulaznom sloju, N_o broj neurona u izlaznom sloju i R konstanta sa vrednošću od 5 do 10.

Carpenter i Hoffman su postavili jednačinu koja povezuje broj neurona u ulaznom (N_i), izlaznom (N_o) i skrivenom sloju (N_h) (Carpenter i Hoffman, 1995):

$$N_h = \frac{\frac{N_t}{\beta - N_o}}{N_i + N_o + 1} \quad (22)$$

Parametar β se označava kao stepen predeterminacije i pri vrednostima ovog parametra iznad 1 očekuje se precizno predviđanje, s obzirom da je broj parova trening podataka veći od broja sinaptičkih težina koje se prilagođavaju u toku učenja mreže. Prema Kolomogorovljevoj teoremi, broj skrivenih neurona koji je dovoljan za izračunavanje bilo koje kontinuirane funkcije jednak je $2i+1$, gde je i broj ulaznih (nezavisnih) promenljivih (Sun i sar., 2003). I pored svih navedenih teorija, optimalan broj skrivenih neurona za ispitivani problem se i dalje najčešće određuje empirijski metodom pokušaja i greške.

Na osnovu načina prenosa signala kroz mrežu veštačke neuronske mreže se mogu podeliti na statičke (nerekurentne) i dinamičke (rekurentne). Kod statičkih veštačkih neuronskih mreža signal se prenosi samo u jednom pravcu od ulaznog, preko skrivenog/skrivenih ka izlaznom sloju, pri čemu ne postoje povratne veze, odnosno informacija iz viših slojeva se ne vraća ka nižim slojevima. Kod dinamičkih neuronskih mreža postoji barem jedan sloj neurona čiji se izlazi vraćaju kao ulazi na drugi, ili isti taj sloj neurona. U tom slučaju izlaz neurona na koji se vraća povratna veza zavisi kako od ulaza koji stižu na taj neuron iz prethodnih slojeva tako i od izlaza neurona sa koga polazi povratna veza. Tako se prošla informacija koristi za predviđanje kako trenutnih tako i budućih stanja sistema (Agatonovic-Kustrin i Beresford, 2000; Petrović, 2010). Postojanje povratnih veza i mogućnost čuvanja i obrade informacija u vremenu čine da dinamički modeli bolje odražavaju funkciju humanog nervnog sistema. Ipak, proces učenja dinamičkih modela veštačkih neuronskih mreža je znatno kompleksniji i traje duže vremena (Sun i sar., 2003).

Veštačke neuronske mreže se obučavaju tako što im se prikaže set podataka koji sadrži parove ulaznih i željenih izlaznih podataka, ili samo ulazne podatke. Na osnovu toga se razlikuju procedure za nadgledano učenje kod kojih se mreži prikazuju i ulazni i željeni izlazni podaci, i procedure za nenadgledano učenje gde se mreži prikazuju samo ulazni podaci (Ibrić i sar., 2012). Osnovni princip procedura za nadgledano učenje neuronskih mreža predstavlja podešavanje vrednosti sinaptičkih težina kako bi se dobio model koji najbolje odražava zavisnost između ispitivanih ulaznih i izlaznih

promenljivih. Na početku procesa učenja vrednosti sinaptičkih težina se randomizovano podešavaju na početne male vrednosti. Zatim se mreži prikazuje set sa ulaznim i izlaznim podacima. Jedan ciklus prikazivanja seta ulaznih i izlaznih podataka se označava kao iteracija (epoha). Mreža predviđa vrednosti izlaznih promenljivih za prikazane vrednosti ulaznih podataka, pri čemu se računa kvadrat greške, odnosno odstupanja predviđenih vrednosti za izlazne podatke od vrednosti izlaznih podataka u prikazanom setu podataka. U toku procesa učenja vrednosti sinaptičkih težina se koriguju sve dok se ne minimizira vrednost kvadrata greške između stvarnih i predviđenih vrednosti izlaznih podataka (SSE) (Đuriš i sar., 2013b):

$$SSE = \frac{1}{N} \sum_{p=1}^N \sum_{i=1}^M (t_{pi} - o_{pi})^2 \quad (23)$$

gde je o_{pi} vrednost izlazne promenljive predviđene na izlaznom neuronu mreže i , t_{pi} stvarna vrednost izlazne promenljive (iz trening seta podataka) na izlaznom neuronu mreže i , N broj trening podataka i M broj izlaznih neurona. Pre početka procesa učenja, set podataka se deli najčešće u tri podseta: set podataka za učenje (trening set), verifikacioni set i test set (validacioni set)². Trening set se koristi u procesu učenja, kako bi se korigovale vrednosti sinaptičkih težina, dok se verifikacioni set koristi kao nezavisna provera procesa učenja mreže. Verifikacioni set se periodično prikazuje mreži kako bi se pratio napredak procesa učenja. U početku procesa učenja SSE za trening set podataka se brzo smanjuje usled učenja zavisnosti između ulaznih i izlaznih podataka, dok dalji pad SSE predstavlja indikator da je mreža pretrenirana, odnosno da je došlo do memorizacije prikazanog trening seta podataka. Ovakvu mrežu karakteriše loša sposobnost generalizacije, odnosno njenom primenom se ne dobijaju precizna predviđanja za prikazane ulazne podatke koji se ne nalaze u trening setu. Sa druge strane, greška na verifikacionom setu podataka opada do određenog vremena, nakon čega počinje da raste, što predstavlja indikator da je mreža pretrenirana i da treba prekinuti proces učenja. Proces učenja neuronskih mreža može trajati određeni broj epoha, ili se može podesiti da se proces prekine kada se dostigne ciljane vrednost greške, ili greška počne da raste. Test set predstavlja eksterni set podataka, koji se koristi za proveru sposobnosti predviđanja mreže. Test set treba da sadrži podatke koji

² Kod različitih komercijalno dostupnih programa može se sresti i drugačije označavanje ova tri seta podataka.

nisu uključeni ni u trening, ni u verifikacioni set, ali se nalaze u granicama vrednosti trening seta podataka. Nakon dokazivanja da mreža daje precizno predviđanje na test setu podataka, dobijeni model veštačkih neuronskih mreža se može koristiti za predviđanje izlaznih podataka za nove ulazne podatke (Statistica Neural Networks, User manual, 1998; Sun i sar., 2003).

Najčešće korišćen algoritam za učenje veštačkih neuronskih mreža predstavlja tzv. *back propagation* algoritam (algoritam povratnog prolaska greške kroz mrežu). U prvom koraku kod *back propagation* algoritma mreži se prikazuje trening set podataka i mreža predviđa vrednost izlaznih promenljivih. Zatim se porede stvarne vrednosti izlaznih promenljivih i vrednosti koje predviđa mreža i računa greška predviđanja. Signal greške se zatim prenosi unazad i vrši se prilagođavanje sinaptičkih težina sa ciljem minimiziranja greške predviđanja. Sinaptičke težine u sloju izlaznih neurona mogu se izračunati prema formuli (Đuriš i sar., 2013b):

$$w_{pq}^o(n+1) = w_{pq}^o(n) + \eta \delta_q^o y_p + \mu (w_{pq}^o(n) - w_{pq}^o(n+1)) \quad (24)$$

dok se za izračunavanje sinaptičkih težina u skrivenom sloju koristi sledeća formula:

$$w_{pq}^h(n+1) = w_{pq}^o(n) + \eta \delta_q^h y_p + \mu (w_{pq}^o(n) - w_{pq}^o(n+1)) \quad (25)$$

gde su w_{pq}^o sinaptičke težine u sloju izlaznih neurona, w_{pq}^h sinaptičke težine u sloju skrivenih neurona, n broj iteracija trening ciklusa, η brzina učenja, a μ *momentum*. Član δ_q^o u jednačini (24) označava grešku u sloju izlaznih neurona i računa se prema sledećem izrazu:

$$\delta_q^o = f'(x_q^o)(t_q^o - y_q^o) \quad (26)$$

gde je $f'(x_q^o)$ prvi izvod aktivacione funkcije izlaznog sloja (zbog toga u slučaju primene *back propagation* algoritma aktivaciona funkcija mora biti diferencijabilna), t_q^o vrednost izlaza u trening setu podataka, a y_q^o vrednost izlaza koji predviđa neuronska mreža. Član δ_q^h u jednačini (25) predstavlja grešku u sloju skrivenih neurona i računa se prema sledećem izrazu:

$$\delta_q^h = f'(x_q^h) \sum \delta_q^o w_{pq}^o \quad (27)$$

gde je $f'(x_q^h)$ prvi izvod aktivacione funkcije u skrivenom sloju (Đuriš i sar., 2013b). Primena *back propagation* algoritma zahteva definisanje vrednosti *brzine učenja* (η) i

momentuma (μ) koji mogu značajno uticati na ishod procesa učenja mreže. Podešavanjem brzine učenja kontroliše se veličina promene sinaptičkih težina koju vrši algoritam za učenje. U slučaju izbora velikih vrednosti za brzinu učenja proces učenja se ubrzava, ali vrednosti sinaptičkih težina između različitih epoha pokazuju velike oscilacije, što otežava pronalazak njihovih optimalnih vrednosti. Sa druge strane, izbor niskih vrednosti za brzinu učenja može dovesti do toga se u toku učenja mreža nađe u lokalnom minimumu površine funkcije greške, umesto globalnog minimuma. Problemi, kao što su lociranje u lokalnom minimumu funkcije greške i velike oscilacije prilikom promene sinaptičkih težina mogu se izbeći izborom odgovarajućih vrednosti za *momentum*. *Momentum* predstavlja udeo promene sinaptičke težine u prethodnoj epohi trening ciklusa koji se dodaje narednoj promeni vrednosti sinaptičke težine (Sun i sar., 2003). *Momentum* dovodi do toga se proces učenja mreže ubrzava, ako prethodne promene sinaptičkih težina prate isti trend (Statistica Neural Networks, User manual, 1998).

Najčešće korišćeni tipovi statičkih veštačkih neuronskih mreža su: višeslojni perceptron (eng. *Multilayer Perceptron*, *MLP*), neuronske mreže radijalne osnove (eng. *Radial Basis Function Networks*), generalizovane regresione neuronske mreže (eng. *Generalized Regression Neural Networks*), neuronske mreže zasnovane na verovatnoći (eng. *Probabilistic Neural Networks*, *PNN*), linearne neuronske mreže (eng. *Linear Neural Networks*), Kohonen mreže i dr. (Petrović, 2010). Višeslojni perceptron predstavlja jednu od najjednostavnijih, a ujedno i najčešće korišćenih arhitektura veštačkih neuronskih mreža. Ovaj tip veštačkih neuronskih mreža se sastoji iz ulaznog sloja, sloja izlaznih neurona i jednog ili više slojeva skrivenih neurona, pri čemu su svi neuroni u jednom sloju povezani sa svim neuronima u sledećem sloju. Pri tome se signal kroz mrežu prenosi u jednom smeru, od ulaznih ka izlaznim neuronima (Wesolowski i Suchac, 2012). I pored relativno jednostavne arhitekture, primenom veštačkih neuronskih mreža tipa višeslojnog perceptrona moguće je modelovanje veoma kompleksnih nelinearnih zavisnosti između ispitivanih promenljivih.

1.5.1. Primena veštačkih neuronskih mreža u farmaceutskoj tehnologiji

Zahvaljujući velikim mogućnostima koje pruža njihova primena, veštačke neuronske mreže se uspešno koriste u više različitih oblasti u farmaceutskoj tehnologiji

i to, za sada, najvećim delom u istraživačke svrhe. Tako su veštačke neuronske mreže uspešno primenjene u razvoju i optimizaciji različitih farmaceutskih oblika, kao što su tablete sa produženim oslobađanjem lekovite supstance (Ibrić i sar., 2002; Barmapalexis i sar., 2010; Petrovic i sar., 2012), čvrste disperzije (Papadimitriou i sar., 2012; Patel i sar., 2013), mikro- i nanoemulzioni sistemi (Gašperlin i sar., 2000; Amani i sar., 2008; Djekic i sar., 2008), mukoadhezivni terapijski sistemi (Woolfson i sar., 2010) i terapijski sistemi sa osmotski kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance (Zhang i sar., 2011). Veštačke neuronske mreže su takođe primenjene uspostavljanju *in vitro-in vivo* korelacije (Parojčić i sar., 2007), kao i u razvoju i optimizaciji različitih procesa u farmaceutskoj tehnologiji, kao što su granulacija u fluidizirajućem sloju (Petrović i sar., 2011; Đuriš i sar., 2012), sušenje raspršivanjem (Mihajlovic i sar., 2011; Miletic i sar., 2014), roler kompaktacija (Miguélez Morán, 2009) i dr.

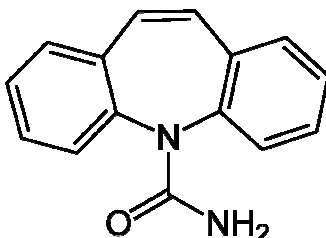
Na osnovu svega navedenog može se steći uvid u prednosti i nedostatke primene tehnika eksperimentalnog dizajna i veštačkih neuronskih mreža u razvoju formulacije i procesa. Tako primena tehnika eksperimentalnog dizajna omogućava da se identifikuju faktori čiji je efekat na vrednost odgovora statistički značajan i da se dobije matematički model koji daje kvantitativnu zavisnost između vrednosti nezavisno i zavisno promenljivih. Takođe, na osnovu dobijenog modela moguće je predvideti vrednosti zavisno promenljivih za date vrednosti nezavisno promenljivih. Nedostaci ovakvog pristupa predstavljaju dobijanje neadekvatnih modela u slučaju izražene nelinearne zavisnosti između promenljivih, u većini slučajeva nemogućnost uključivanja rezultata prethodno, ili naknadno izvedenih eksperimenata u analizu, kao i neophodnost razvijanja posebnog modela za svaku zavisnu promenljivu. Primena veštačkih neuronskih mreža omogućava modelovanje izuzetno kompleksnih zavisnosti između promenljivih, uz mogućnost korićenja nekompletnih setova podataka i uz uključivanje u analizu rezultata prethodno ili naknadno izvedenih eksperimenata. Dobijeni modeli često pokazuju bolju sposobnost predviđanja u odnosu na modele dobijene primenom tehnika eksperimentalnog dizajna. Ipak, značajno ograničenje primene veštačkih neuronskih mreža predstavlja nemogućnost dobijanja matematičkog modela koji omogućava mehanističko razumevanje zavisnosti između promenljivih, kao i nedostatak statističke analize faktorskih efekata. Zbog toga se veštačke neuronske mreže često označavaju kao modeli crne kutije (eng. *black-box models*). Takođe, ekstrapolacijom,

odnosno korišćenjem modela izvan seta trening podataka često se dobijaju veoma neprecizna predviđanja, pa se stoga ekstrapolacija i ne preporučuje. Sam proces učenja mreže može trajati duže vremena, a mogućnost pretreniranja mreže, čime se gubi sposobnost generalizacije, takođe predstavlja jedno od ograničenja veštačkih neuronskih mreža (Sun i sar., 2003; Miguélez Morán, 2009). Uzimajući u obzir prednosti i nedostatke tehnika eksperimentalnog dizajna i veštačkih neuronskih mreža, za potpuno iskorišćavanje potencijala obe tehnike potrebna je njihova kombinovana primena. Tako su tehnike eksperimentalnog dizajna i veštačkih neuronskih mreža uspešno primenjene u kombinaciji u optimizaciji procesa film oblaganja tableta (Plumb i sar., 2002), optimizaciji procesa sušenja raspršivanjem (Mihajlović i sar., 2011; Miletić i sar., 2014), optimizaciji terapijskih sistema sa produženim i kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance (Barmapalexis i sar., 2010; Ivić i sar., 2010), razvoju čvrstih disperzija primenom tehnike sušenja raspršivanjem (Patel i sar., 2013) i optimizaciji procesa granulacije topljenjem u uređaju tipa fluidizirajućeg sistema (Aleksić i sar., 2014).

1.6. Karbamazepin

Karbamazepin (5*H*-dibenzo[b,f]azepin-5-karboksamid) predstavlja triciklični iminostilbenski derivat i jedan je od lekova prve linije u lečenju epilepsije (Perucca i Tomson, 2011) (Slika 11). Pored toga, karbamazepin se primenjuje i u lečenju neuropatskih bolova i bipolarnih poremećaja raspoloženja (Spina i Perugi, 2004). Vrednosti konstante disocijacije i particionog koeficijenta karbamazepina dostupne u literaturi iznose: $pK_a=13,9$ (Jones i sar., 2002) i $\log P=2,45$ (Dal Pozzo i sar., 1989). S obzirom na vrednost pK_a , karbamazepin ne pokazuje pH zavisnu rastvorljivost u opsegu pH vrednosti duž humanog gastrointestinalnog trakta. Zbog svoje niske rastvorljivosti (oko 170 mg/l na 25 °C) (Moneghini i sar., 2002) i visoke intestinalne permeabilnosti (FDA/CDER Guidance, 2000), karbamazepin se svrstava u grupu II Biofarmaceutskog sistema klasifikacije. Kako je apsorpcija karbamazepina nakon peroralne primene usporena, varijabilna i ograničena brzinom rastvaranja, karbamazepin predstavlja idealnog kandidata za primenu tehnika za poboljšanje brzine rastvaranja i biološke raspoloživosti. Brojne tehnike su do sada uspešno primenjene sa ciljem povećanja brzine rastvaranja karbamazepina, kao što su: mikronizacija (Bolten i Türk, 2012), dobijanje nanokristala tehnikom elektroraspršivanja (Wang i sar., 2012),

građenje kokristala (Chieng i sar., 2009), formulacija čvrstih samomikroemulgujućih sistema (Milović i sar., 2012), inkapsulacija u mezoporozne silikatne nosače (Ambrogi i sar., 2008; Van Speybroeck i sar., 2009) i formulacija čvrstih disperzija (Moneghini i sar., 2002; Zerrouk i sar., 2001a; Rane i sar., 2007; Sethia i Squillante, 2002).



Slika 11. Strukturna formula karbamazepina

Veoma značajnu karakteristiku na koju je potrebno obratiti pažnju prilikom formulacije terapijskih sistema sa karbamazepinom kao lekovitom supstancom predstavlja pojava polimorfizma, pri čemu je pokazano da različiti polimorfni oblici ispoljavaju značajne razlike u rastvorljivosti i biološkoj raspoloživosti. Do sada je utvrđeno da karbamazepin može postojati u četiri anhidrovana kristalna oblika (P-monoklinični (oblik III), triklinični (oblik I), trigonalni (oblik II) i C-monoklinični (oblik IV)), kao i u većem broju hidratnih i solvatnih oblika. U svim do sada opisanim anhidrovanim polimorfnim oblicima, karbamazepin je zastupljen u obliku karboksamidnih dimera, pri čemu se polimorfni oblici razlikuju po načinu pakovanja dimera. Stabilnost polimorfnih oblika karbamazepina opada sledećim redosledom: oblik III>oblik I>oblik IV>oblik II, tako da je pod ambijentalnim uslovima termodinamički najstabilniji oblik III (Grzesiak i sar., 2003). U literaturi se najčešće navodi da polimorfni oblik III karbamazepina pokazuje najnižu rastvorljivost, ali su brojna ispitivanja takođe pokazala da se ovaj polimorfni oblik odlikuje najvećom biološkom raspoloživošću. Smatra se da razlike u biološkoj raspoloživosti polimorfa karbamazepina nisu posledica njihove različite rastvorljivosti, nego različite brzine prelaska u dihidratni oblik, koji pokazuje 1,5-1,6 puta nižu rastvorljivost od anhidrovanih polimorfnih oblika karbamazepina (Kobayashi i sar., 2000). Tako je najveća biološka raspoloživost polimorfnog oblika III karbamazepina posledica najmanje brzine njegovog prelaska u dihidratni oblik. Kako pokazuje najveću stabilnost pod ambijentalnim uslovima i najveću biološku raspoloživost, polimorfni oblik III

karbamazepina je jedino prihvatljiv za formulaciju farmaceutskih oblika (Kipouros i sar., 2006). Pokazano da tokom proizvodnih procesa mlevenja i granulacije može doći do prelaska iz anhidrovanog u hidratni oblik karbamazepina (Otsuka i sar., 1997; Murphy i sar., 2002). Tako se na osnovu svega navedenog može zaključiti da je polimorfizam karbamazepina veoma značajan faktor na koji je potrebno obratiti pažnju u svim fazama razvoja formulacije i proizvodnog procesa.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja predstavlja ispitivanje mogućnosti primene binarnih i ternarnih čvrstih disperzija, kao i binarnih lekovita supstanca-ciklodekstrin i ternarnih lekovita supstanca-ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema kao nosača za povećanje brzine rastvaranja teško rastvorljive model lekovite supstance karbamazepina. Navedeni ciljevi su realizovani u okviru tri faze istraživanja

U prvoj fazi istraživanja razmatrana je mogućnost primene binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija sa ciljem povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. Ciljevi ove faze istraživanja predstavljaju ispitivanje uticaja odnosa karbamazepin:poloksamer i tipa poloksamera na brzinu rastvaranja karbamazepina iz izrađenih binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija. Primenom savremenih metoda fizičko-hemijske karakterizacije na uzorcima izrađenih čvrstih disperzija vršeno je ispitivanje fizičkog stanja u kojem se nalazi karbamazepin unutar matriksa čvrste disperzije (kristalno ili amorfno), uz identifikaciju eventualno prisutnih polimorfnih prelaza karbamazepina i na osnovu dobijenih rezultata izvođeni su zaključci o mehanizmima odgovornim za povećanje brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih čvrstih disperzija.

U drugoj fazi istraživanja ispitivana je mogućnost kombinovane primene tehnika eksperimentalnog dizajna smeše i veštačkih neuronskih mreža u razvoju ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija kao nosača za poboljšanje brzine rastvaranja karbamazepina. Osnovni ciljevi ove faze istraživanja predstavljaju dobijanje modela koji će omogućiti sticanje uvida u uticaj udela svih komponenti u ternarnim karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstim disperzijama na odabrane indikatore brzine rastvaranja karbamazepina (količina rastvorenog karbamazepina (%) nakon 10 (Q_{10}) i 20 (Q_{20}) minuta ispitivanja), uz procenu sposobnosti predviđanja parametara Q_{10} i Q_{20} za dati sastav ternarne čvrste disperzije. Sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija uzoraka izrađenih čvrstih disperzija korišćena je sa ciljem utvrđivanja fizičkog stanja karbamazepina (kristalno ili amorfno) u čvrstim

disperzijama i mehanizama koji doprinose povećanju brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih ternarnih čvrstih disperzija.

U trećoj fazi istraživanja ispitivana je mogućnost primene karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin binarnih i karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer ternarnih sistema sa ciljem povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. Ciljevi ove faze istraživanja predstavljaju ispitivanje solubilizacije karbamazepina primenom hidroksipropil- β -ciklodekstrina, kao i ispitivanje mogućnosti povećanja solubilizacionog kapaciteta hidroksipropil- β -ciklodekstrina za karbamazepin dodatkom malih količina hidrofilnih polimera (Soluplus[®], polivinilpirolidon K25-Kollidon[®] 25 i dva tipa hidroksipropilmetilceluloze različitog stepena supstitucije i viskoziteta-Metolose[®] 90SH-100 i Metolose[®] 65SH-1500). Tehnika sušenja raspršivanjem je primenjena sa ciljem dobijanja binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema u obliku praška, formulisanih sa ciljem povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. Kako su interakcije u sistemima lekovita supstanca-ciklodekstrin-hidrofilni polimer još uvek nedovoljno razjašnjenje, primenjene su tehnike molekularnog modelovanja u kombinaciji sa tehnikama fizičko-hemijske karakterizacije sa ciljem sticanja uvida u mehanizme ovih interakcija na molekulskom nivou.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Formulacija i karakterizacija binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija

U ovoj fazi istraživanja ispitivana je mogućnost izrade binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija primenom metoda topljenja, sa ciljem povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. Čvrste disperzije su izrađivane korišćenjem poloksamera 188 i poloksamera 407, u različitim masenim odnosima karbamazepin:poloksamer. Izrađene čvrste disperzije su podvrgnute fizičko-hemijskoj karakterizaciji primenom tehnika za karakterizaciju čvrstog stanja, kao i ispitivanju brzine rastvaranja lekovite supstance sa ciljem utvrđivanja fizičkog stanja karbamazepina u disperziji, eventualnih polimorfnih prelaza i karbamazepin-poloksamer interakcija, kao i uticaja vrste poloksamera i odnosa karbamazepin:poloksamer na brzinu rastvaranja karbamazepina iz izrađenih čvrstih disperzija. U cilju sticanja uvida u mehanizme karbamazepin-poloksamer interakcija na molekulskom nivou primenjena je tehnika simulacije molekularne dinamike.

3.1.1. Materijali

Za izradu binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija korišćena su dva tipa poloksamera u mikroniziranom obliku-poloksamer 188 (KolliphorTM P 188 micro, BASF, Ludwigshafen, Nemačka) i poloksamer 407 (KolliphorTM P 407 micro, BASF, Ludwigshafen, Nemačka). Kao model teško rastvorljive lekovite supstance korišćen je karbamazepin (Ph Eur 7.0, Galenika AD, Beograd, Srbija).

3.1.2. Izrada binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija

Binarne karbamazepin-poloksamer čvrste disperzije izrađivane su metodom topljenja u masenim odnosima karbamazepin:poloksamer 1:1, 1:2 i 1:3. Odgovarajuća količina poloksamera (poloksamer 188 ili poloksamer 407) je prvo otopljena na vodenom kupatilu sa kontrolom temperature zagrevanjem na 70°C. Nakon toga je, uz intenzivno mešanje, u otopljenom poloksameru dispergovan karbamazepin i mešanje je nastavljeno sve do dobijanja smeše homogenog izgleda. Smeša je zatim hlađena na ledenom kupatilu do očvršćavanja i nakon toga pulverizovana na sobnoj temperaturi u

tarioniku uz pomoć pistila. Dobijena disperzija u obliku praška je prosejavana kroz sito 300 μm u cilju postizanja ujednačene veličine čestica.

3.1.3. Fizičko-hemijska karakterizacija binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija

3.1.3.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija je korišćena u cilju procene fizičkog stanja u kojem se karbamazepin nalazi u čvrstoj disperziji (kristalan ili amorfan), detekcije polimorfnih prelaza nastalih u toku izrade čvrstih disperzija, kao i prisustva karbamazepin-poloksamer interakcija. Ispitivanja su vršena korišćenjem DSC 50 diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Između 3 i 5 mg uzorka, precizno odmerenog u aluminijumskoj posudi, podvrgnuto je zagrevanju u temperaturnom intervalu između 25 i 200°C, pri brzini zagrevanja od 10°C/min uz konstantan protok azota od 30 ml/min. Vrednosti temperature i energije su prethodno kalibrisane primenom indijum standarda, dok je u svim analizama prazna aluminijumska posuda korišćena kao referentna.

3.1.3.2. Polarizaciona mikroskopija na zagrejanjoj ploči

Polarizaciona mikroskopija na zagrejanjoj ploči je vršena u cilju vizuelizacije promena u uzorcima podvrgnutim zagrevanju i sticanja boljeg uvida u promene zabeležene na DSC termogramima. Ispitivanje je vršeno korišćenjem polarizacionog mikroskopa PriorLux (Prior Scientific Instruments Ltd, Cambridge, Velika Britanija), opremljenog pločom za zagrevanje uzoraka Linkam TP94 (Linkam Scientific Instrument Ltd, Surrey, Velika Britanija), uz zagrevanje uzorka od 25 do 200°C. Fotomikrografije uzoraka na različitim temperaturama dobijene su korišćenjem ProgRes™ C10 Plus digitalne kamere (Jenoptik AG, Jena, Nemačka) povezane sa polarizacionim mikroskopom.

3.1.3.3. Difrakcija X-zraka na prašku

Difrakcija X-zraka na prašku je primenjena kao tehnika koja sa visokom pouzdanošću omogućava utvrđivanje fizičkog stanja lekovite supstance u čvrstim

disperzijama pod ambijentalnim uslovima, čime se izbegava potencijalna promena fizičkog stanja lekovite supstance pod uticajem povišene temperature, kao u slučaju diferencijalne skenirajuće kalorimetrije. Ispitivanja su vršena na Philips PW1050 difraktometru (Philips, Amelo, Holandija) u Bragg-Brentano θ - 2θ geometriji, uz korišćenje Cu-K α izvora zračenja ($\lambda=1,5418$ Å) sa nikl filterom. Uzorci su snimani u opsegu 2θ uglova od 4 do 45°, sa veličinom koraka od 0,02° i vremenom zadržavanja od 5 s po koraku, pri naponu od 40 kV i jačini struje od 20 mA.

3.1.3.4. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

FT-IR spektroskopija je korišćena u cilju otkrivanja eventualno prisutnih karbamazepin-poloksamer interakcija, koje mogu imati značajan uticaj na stabilnost samog sistema. FT-IR spektroskopska analiza je vršena na Shimadzu IR-Prestige-21 uređaju (Shimadzu Corporation, Japan), opremljenom horizontalnim sistemom za pojedinačnu refleksiju zraka Golden-Gate MKII single ATR system (Specac, Kent, Velika Britanija), sa ZnSe sočivima. Spektri ispitivanih uzoraka su snimani u intervalu od 4000 do 500 cm⁻¹, sa rezolucijom od 4 cm⁻¹, pri čemu je vršeno 32 skeniranja za svaki spektar.

3.1.3.5. Simulacija molekularne dinamike

Simulacija molekularne dinamike vršena je korišćenjem XenoView softvera (Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, SAD), u cilju simulacije karbamazepin-poloksamer interakcija na molekulskom nivou u toku izrade čvrstih disperzija. U ćeliju za simulaciju prvo je postavljan jedan polimerni lanac poloksamera, pakovan na osnovu tzv. modela rotacionih izomernih stanja (eng. *rotational isomeric states-RIS*), koji uzima u obzir statističku raspodelu torzionih uglova, pri čemu se polimerni lanac pakuje u periodičnu ćeliju do postizanja željene gustine (1,06 g/cm³) sa konfiguracijom lanaca koja odgovara verovatnoći rotacionih izomernih stanja. Zatim su sistemu dodeljeni parametri PCFF polja sila i odgovarajuća naelektrisanja i sistem sa lancem poloksamera je podvrgnut ekvilibraciji u toku 50 ps. Nakon toga sistem je podvrgnut simulaciji molekularne dinamike u trajanju od 2 ns, sa veličinom koraka od 1 fs, pri temperaturi od 343 K (temperatura koja je korišćena u izradi čvrstih disperzija) i atmosferskom pritisku od 101,325 kPa. Simulacija je ponovljena nakon dodatka tri molekula karbamazepina u

čeliju slučajnim rasporedom i relaksacije strukture primenom koncepta minimizacije energije. Na osnovu izračunatih trajektorija vršeno je izračunavanje koeficijenta difuzije karbamazepina u poloksameru, kao i koeficijenta difuzije samog poloksamera u prisustvu karbamazepina. Rezultati dobijeni simulacijom molekularne dinamike poređeni su sa rezultatima dobijenim metodama fizičko-hemijske karakterizacije čvrstih disperzija.

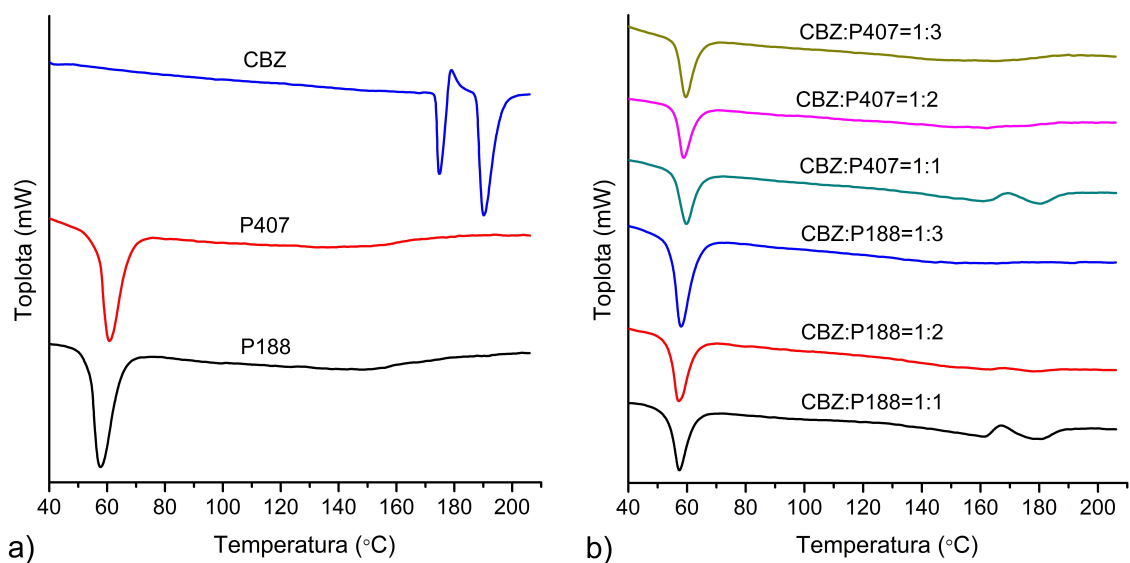
3.1.3.6. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija

In vitro ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih binarnih čvrstih disperzija vršeno je u cilju procene povećanja brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija u odnosu na čist karbamazepin. Ispitivanje je vršeno korišćenjem aparature sa rotirajućom lopaticom (Erweka DT70, Heusenstamm, Nemačka) u 900 ml prečišćene vode kao medijumu, pri brzini okretanja lopatica od 75 o/min (obrtaja u minuti) u trajanju od 1 h. Iako Američka farmakopeja (USP 38-NF 33, 2015) u monografiji tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem propisuje ispitivanje brzine rastvaranja uz korišćenje 1% vodenog rastvora natrijum-laurilsulfata, u ovom ispitivanju je kao medijum korišćena prečišćena voda, pošto je pretpostavljeno da će primena ovog medijuma bolje ukazati na razlike između ispitivanih formulacija. U ispitivanju je korišćena masa uzoraka čvrstih disperzija koja sadrži 200 mg karbamazepina, a ispitivanje je uporedno sprovedeno i na 200 mg čistog karbamazepina. U definisanim vremenskim intervalima (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 45 i 60 minuta) uzorkovano je 4 ml medijuma, a zatim je vršena nadoknada sa istom zapreminom svežeg medijuma. Nakon filtriranja apsorbancija uzoraka je merena na Evolution 300 UV-Vis spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na talasnoj dužini od 285 nm. Iz izmerenih vrednosti apsorbancije, koncentracija karbamazepina u uzorcima je računata na osnovu jednačine kalibracione krive. Rezultati su izražavani kao procenat rastvorenog karbamazepina za određeno vreme u odnosu na deklarirani sadržaj karbamazepina u ispitivanim uzorcima. Ispitivanja su vršena u triplicatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

3.1.4. Rezultati i diskusija

3.1.4.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

DSC termogrami polaznih materijala i izrađenih čvrstih disperzija prikazani su na slici 12. Zabeležene vrednosti temperature topljenja i entalpije topljenja karbamazepina i/ili poloksamera u ispitivanim uzorcima prikazane su u tabeli 2. Na termogramu karbamazepina (Slika 12a) jasno se razlikuju dva endotermna pika na 174,7 i 190,1°C i egzotermni pik na temperaturi od 179°C. Endotermni pik zabeležen na temperaturi od 174,7°C odgovara topljenju polimorfnog oblika III karbamazepina (P-monoklinični oblik). Egzotermni pik koji je zabeležen na 179°C odgovara rekristalizaciji polimorfnog oblika I, koji se zatim topi na 190,1°C, što je zabeleženo endotermnim pikom na termogramu. Dobijeni DSC termogram je u skladu termogramom polimorfnog oblika III karbamazepina, koji su prethodno opisali Grzesiak i saradnici (Grzesiak i sar., 2003). Ipak, prilikom interpretacije DSC termograma karbamazepina treba imati u vidu i činjenicu da se vrednosti temperature topljenja i entalpije topljenja mogu razlikovati u zavisnosti od brzine zagrevanja primenjene u ispitivanju (Rustichelli i sar., 2000). Na osnovu DSC termograma karbamazepina, može se zaključiti da je karbamazepin koji je korišćen u istraživanju sadržao polimorfni oblik III, koji je najstabilniji polimorfni oblik karbamazepina pod ambijentalnim uslovima i kao takav jedino prihvatljiv za formulaciju farmaceutskih oblika (Kipouros i sar., 2006). Endotermni pikovi zabeleženi na 57,6°C na termogramu poloksamera 188 i 60,7°C na termogramu poloksamera 407 (Slika 12a) predstavljaju posledicu topljenja ovih semikristalnih polimera. Pikovi karakteristični za poloksamere su prisutni i na termogramima svih uzoraka čvrstih disperzija, pri čemu se na ovim pikovima uočava malo pomeranje (oko 1°C) ka nižim temperaturama, što može predstavljati pokazatelj da je mala količina karbamazepina rastvorena u rastopljenom polimernom matriksu. Pikovi karakteristični za karbamazepin mogu se uočiti samo na termogramima čvrstih disperzija izrađenih, kako sa poloksamerom 188 tako i sa poloksamerom 407, u masenom odnosu karbamazepin:poloksamer 1:1 (Slika 12b). Može se uočiti da su na ovim termogramima pikovi karakteristični za karbamazepin značajno pomereni (od 10 do 15°C) ka nižim vrednostima na temperaturnoj skali. Pomeranje pikova karakterističnih za lekovitu supstancu često se uzima kao indikator da se lekovita supstanca meša, ili rastvara unutar

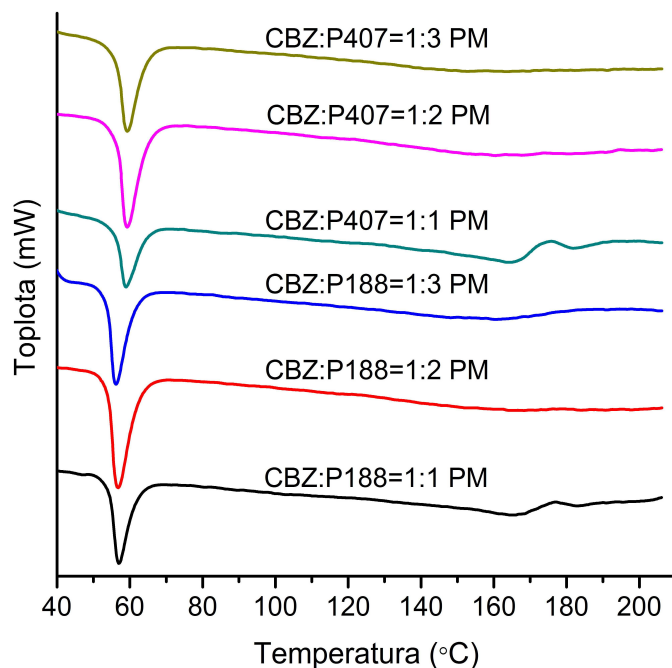


Slika 12. (a) DSC termogrami karbamazepina (CBZ), poloksamera 188 (P188) i poloksamera 407 (P407). (b) DSC termogrami karbamazepin-poloksamer 188 i karbamazepin-poloksamer 407 binarnih čvrstih disperzija

Tabela 2. Vrednosti entalpije topljenja (ΔH_{fus}) i temperature topljenja (T_t) karbamazepina (CBZ), poloksamera 188 (P188) i poloksamera 407 (P407) u uzorcima polaznih materijala i izrađenih čvrstih disperzija

	T_t (CBZ) (°C)	ΔH_{fus} (CBZ) (J/g)	T_t (poloksamer) (°C)	ΔH_{fus} (poloksamer) (J/g)
CBZ	174,8; 190,1	-38,4; -110,4	-	-
P188	-	-	57,6	-156,0
P407	-	-	60,7	-132,0
CBZ:P188=1:1	161,5; 180,9	-28,1; -28,3	57,3	-71,5
CBZ:P188=1:2	0	0	57,2	-97,2
CBZ:P188=1:3	0	0	57,9	-108,1
CBZ:P407=1:1	160,8; 180,6	-11,5; -23,3	59,8	-71,0
CBZ:P407=1:2	0	0	58,9	-79,8
CBZ:P407=1:3	0	0	59,6	-93,4

polimernog matriksa čvrste disperzije (Marsac i sar., 2009). Pikovi karakteristični za karbamazepin ne mogu se uočiti na termogramima čvrstih disperzija izrađenih, kako sa poloksamerom 188 tako i sa poloksamerom 407, u karbamazepin:poloksamer odnosima 1:2 i 1:3. Ovakvi rezultati mogu ukazati da se karbamazepin nalazi u amorfnom obliku, ili da je rastvoren unutar matriksa čvrstih disperzija. Iako se diferencijalna skenirajuća kalorimetrija često koristi za procenu fizičkog stanja u kojem se lekovita supstanca nalazi u čvrstim disperzijama, rezultati ove analize često mogu navesti na pogrešan zaključak. Sam način izvođenja diferencijalne skenirajuće kalorimetrije uz primenu povišene temperature može dovesti do promene fizičkog stanja lekovite supstance i do pogrešnih zaključaka o fizičkom stanju lekovite supstance u čvrstoj disperziji na sobnoj temperaturi. Kako se poloksameri tope na znatno nižoj temperaturi od karbamazepina, postoji mogućnost da sa povišenjem temperature u toku DSC analize dođe do postepenog rastvaranja karbamazepina u otopljenom poloksameru. Tako je moguće da kada temperatura dostigne temperaturu topljenja karbamazepina, više nema dovoljno kristalnog karbamazepina kako bi se detektovao endotermni pik njegovog topljenja. Na ovakav zaključak upućuju i rezultati DSC analize fizičkih smeša, pripremljenih jednostavnim mešanjem karbamazepina i poloksamera u istim odnosima, kao i u slučaju

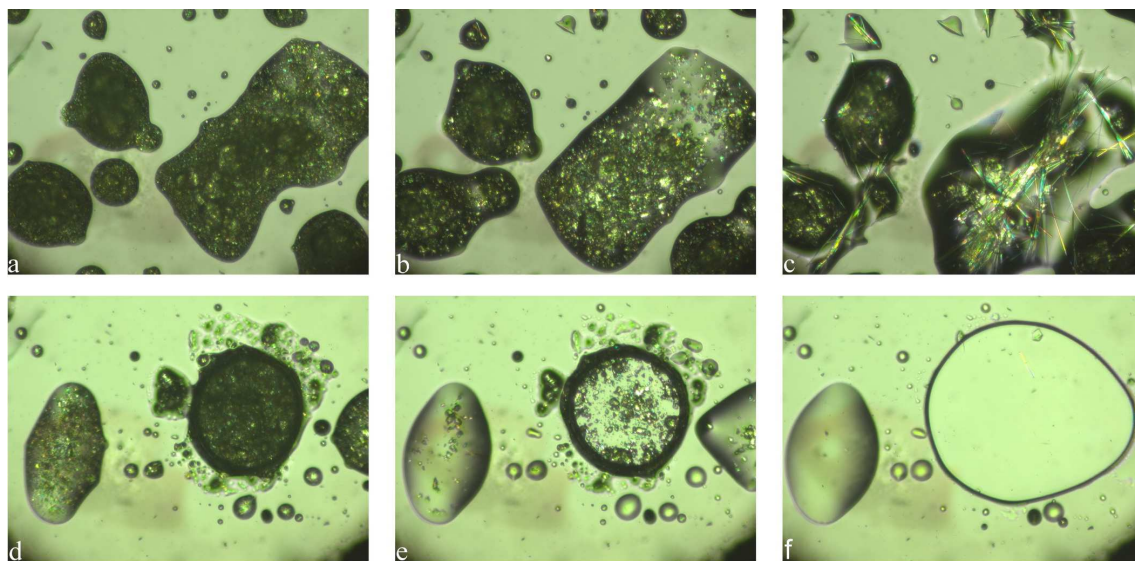


Slika 13. DSC termogrami karbamazepin (CBZ)-poloksamer (P188) i karbamazepin-poloksamer 407 (P407) binarnih fizičkih smeša

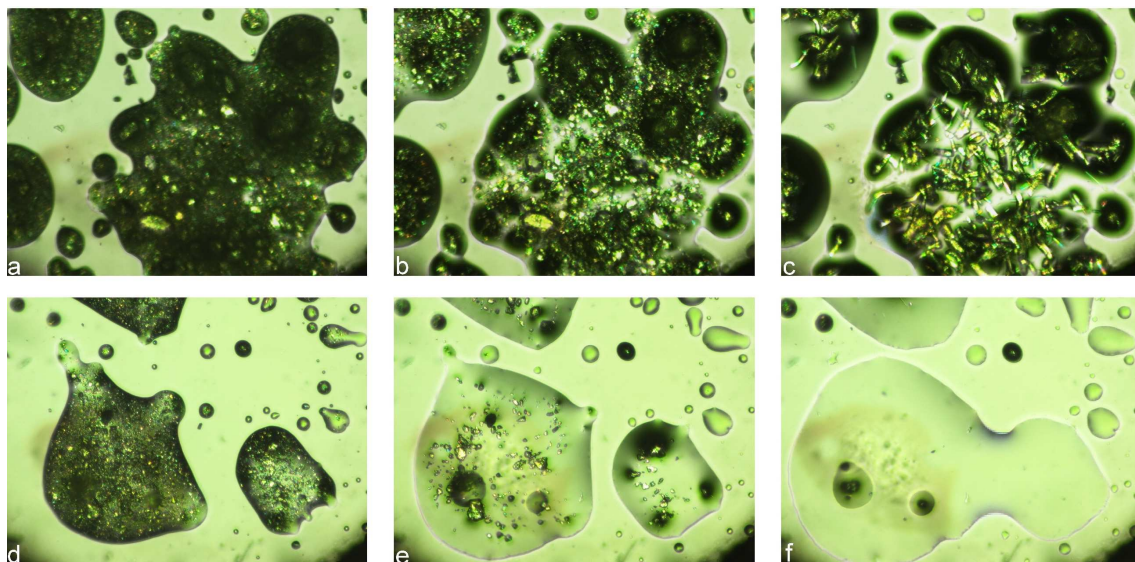
čvrstih disperzija. Dobijeni termogrami fizičkih smeša (Slika 13) su gotovo identični termogramima čvrstih disperzija, tako da se pikovi karakteristični za karbamazepin mogu uočiti samo pri karbamazepin:poloksamer odnosu 1:1. Ovakav rezultat bi mogao navesti na zaključak da se i jednostavnim mešanjem karbamazepina i poloksamera može postići stvaranje amorfnog oblika karbamazepina, što nije realno očekivati. Mnogo je verovatnije da je ovakav rezultat posledica rastvaranja karbamazepina u otopljenom poloksameru tokom DSC analize. Tako su Shah i saradnici prilikom DSC analize rofekoksib-poloksamer 188 čvrstih disperzija pokazali odsustvo pikova karakterističnih za rofekoksib usled rastvaranja rofekoksiba u otopljenom poloksameru (Shah i sar., 2007). Stoga je za sveobuhvatnu fizičko-hemijsku karakterizaciju karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija i nedvosmisleno utvrđivanje fizičkog stanja karbamazepina u disperziji neophodna primena i drugih analitičkih tehnika, kao što su difrakcija X-zraka na prašku i polarizaciona mikroskopija na zagrejanj ploči.

3.1.4.2. Polarizaciona mikroskopija na zagrejanj ploči

Kako je karbamazepin supstanca kristalne prirode, dok su poloksameri semikristalne supstance, njihovo razlikovanje primenom polarizacione mikroskopije moguće je tek nakon topljenja poloksamera. Velika razlika u temperaturama topljenja karbamazepina i poloksamera omogućava analizu karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija primenom polarizacione mikroskopije na zagrejanj ploči. Polarizacionom mikroskopijom na zagrejanj ploči analizirane su samo granične formulacije, odnosno formulacije sa najnižim (odnos karbamazepin:poloksamer 1:3) i najvišim udelima karbamazepina (odnos karbamazepin:poloksamer 1:1). Fotomikrografije uzoraka čvrstih disperzija, izrađenih sa poloksamerom 188 i poloksamerom 407 u karbamazepin:poloksamer masenim odnosima 1:1 i 1:3, na različitim temperaturama prikazane su na slikama 14 i 15. Na fotomikrografijama čvrstih disperzija izrađenih u odnosu karbamazepin-poloksamer 1:1 (Slike 14a-14c i 15a-15c), nakon topljenja poloksamera (60°C) uočava se da je karbamazepin dispergovan u obliku prizmatičnih kristala u otopljenom poloksameru. Daljim povećanjem temperature do 150°C, znatna količina kristalnog karbamazepina se rastvara u otopljenom poloksameru. Već na oko 130°C na mikrografijama počinje da se uočava pojava prvih kristala igličastog oblika, dok se na temperaturama iznad 150°C uočava intenzivna pojava i rast ovakvih kristala.



Slika 14. Fotomikrografije karbamazepin-poloksamer 188 čvrste disperzije izrađene u karbamazepin:poloksamer odnosu 1:1 na (a) 60°C, (b) 127°C i (c) 160°C. Fotomikrografije karbamazepin-poloksamer 188 čvrste disperzije izrađene u karbamazepin:poloksamer odnosu 1:3 na (d) 60°C, (e) 127°C i (f) 160°C



Slika 15. Fotomikrografije karbamazepin-poloksamer 407 čvrste disperzije izrađene u karbamazepin:poloksamer odnosu 1:1 na (a) 60°C, (b) 127°C i (c) 160°C. Fotomikrografije karbamazepin-poloksamer 407 čvrste disperzije izrađene u karbamazepin:poloksamer odnosu 1:3 na (d) 60°C, (e) 127°C i (f) 160°C.

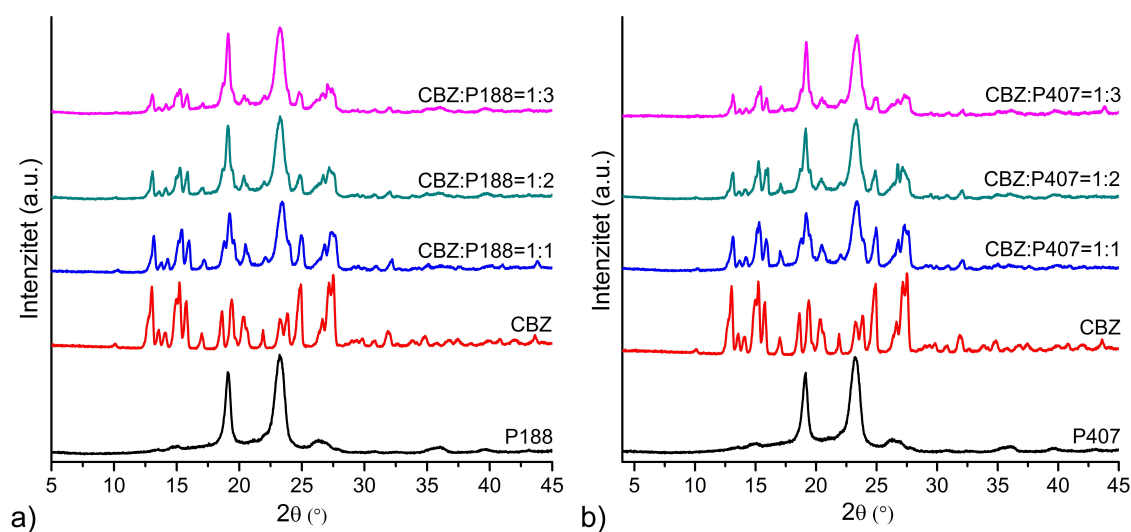
Na oko 180°C uočen je početak topljenja igličastih kristala, sa potpunim topljenjem do oko 190°C (mikrografija nije prikazana). Uočena promena oblika kristala karbamazepina iz prizmatičnog u igličasti pripisuje se prelazu polimorfnog oblika III u polimorfni oblik I. Prethodno su Rustichelli i saradnici (Rustichelli i sar., 2000) i Grzesiak i saradnici (Grzesiak i sar., 2003) analizom uzoraka primenom difrakcije X-zraka na prašku i FT-IR spektroskopije, nakon njihovog zagrevanja tokom termomikroskopije, pokazali da svi polimorfni oblici karbamazepina zagrevanjem prelaze u polimorfni oblik I. Pored kristalizacije igličastih kristala polimorfnog oblika I iz rastopa, uočeno je da deo prizmatičnih kristala polimorfa III prelazi u polimorf I direktno iz čvrstog stanja. Dobijenim fotomikrografijama uzoraka čvrstih disperzija, izrađenih u karbamazepin:poloksamer odnosu 1:1, potvrđene su promene koje su uočene na DSC termogramima ovih uzoraka. Na fotomikrografijama čvrstih disperzija izrađenih u karbamazepin:poloksamer odnosu 1:3 (Slike 14d-14f i 15d-15f), nakon topljenja poloksamera uočava se disperzija kristala karbamazepina u otopljenom matriksu. Ovakav rezultat je u potpunoj suprotnosti sa rezultatima dobijenim DSC analizom, gde se na osnovu odsustva pikova topljenja karbamazepina može steći pogrešan zaključak da karbamazepin u čvrstoj disperziji nije prisutan u kristalnom obliku. Daljim povećanjem temperature dolazi do potpunog rastvaranja kristala karbamazepina u otopljenom poloksameru do 160°C. Lako se može uočiti razlika na fotomikrografijama čvrstih disperzija sa odnosom karbamazepin poloksamer 1:1 u poređenju sa disperzijama izrađenim u odnosu karbamazepin poloksamer 1:3. Dok se kod čvrstih disperzija sa odnosom karbamazepin:poloksamer 1:1 samo mali deo karbamazepina rastvara u otopljenom poloksameru do 160°C, kod disperzija sa odnosom karbamazepin:poloksamer 1:3, celokupna količina karbamazepina se rastvara zagrevanjem do navedene temperature. Razlike koje su uočene u rezultatima diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i polarizacione mikroskopije na zagrejanoj ploči, prethodno su opisali Zerrouk i saradnici (Zerrouk i sar., 2001b) i Nair i saradnici (Nair i sar., 2002) na binarnim disperzijama karbamazepina u polietilenglikolu, koje su po svojim karakteristikama veoma slične karbamazepin-poloksamer čvrstim disperzijama. Rezultati ovih radova su pokazali da je karbamazepin zastupljen u kristalnom obliku u disperzijama i pored odsustva karakterističnih pikova na odgovarajućim DSC termogramima, što je objašnjeno rastvaranjem karbamazepina u

otopljenom polimernom matriksu usled zagrevanja tokom same analize. Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da diferencijalna skenirajuća kalorimetrija nije pogodna tehnika za utvrđivanje fizičkog stanja karbamazepina u binarnim karbamazepin-poloksamer čvrstim disperzijama i da je zbog toga neophodna primena dodatnih analitičkih tehnika.

3.1.4.3. Difrakcija X-zraka na prašku

Iako je primenom polarizacione mikroskopije na zagrejanjoj ploči pokazano da se kod svih uzoraka izrađenih binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija karbamazepin nalazi u kristalnom obliku pod ambijentalnim uslovima, samo na osnovu kristalne morfologije nije moguće pouzdano razlikovati polimorfne oblike karbamazepina. Kako je za karbamazepin do sada dokazano postojanje četiri anhidrovana polimorfna oblika, od kojih je samo jedan (polimorfni oblik III) prihvatljiv za formulaciju farmaceutskih oblika, identifikacija prisutnog polimorfnog oblika predstavlja neophodan korak prilikom razvoja formulacija sa karbamazepinom kao lekovitom supstancom. Iz tog razloga uzorci karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija su analizirani primenom difrakcije X-zraka na prašku. Difraktogrami dobijeni analizom polaznih materijala i izrađenih čvrstih disperzija prikazani su na slici 16. Na difraktogramu poloksamera 188 uočavaju se karakteristični pikovi visokog intenziteta na $19,08^\circ$ i $23,22^\circ$ 2θ , dok se na difraktogramu poloksamera 407 uočavaju karakteristični pikovi na $19,14^\circ$ i $23,22^\circ$ 2θ . Pored toga na difraktogramima poloksamera uočava se i nekoliko širih regiona, tzv. „oreol” difraktograma. Dobijeni difraktogrami poloksamera posledica su karakteristične semikristalne strukture ovih polimera, gde oštri pikovi visokog intenziteta odgovaraju kristalnim regionima polimera, koji su inkorporirani unutar amornog matriksa, koji daje tzv. „oreol” difraktograme (Ali i sar., 2010). Na difraktogramu karbamazepina uočavaju se karakteristični pikovi visokog intenziteta na $13,02^\circ$, $15,22^\circ$, $15,78^\circ$, $19,40^\circ$, $24,92^\circ$, $27,50^\circ$ i $31,86^\circ$ 2θ . Prema položaju karakterističnih pikova, difraktogram karbamazepina odgovara prethodno opisanom difraktogramu polimorfnog oblika III (Rustichelli i sar., 2000). Na difraktogramima svih uzoraka čvrstih disperzija mogu se uočiti karakteristični pikovi karbamazepina na identičnim pozicijama kao i na difraktogramima čistog karbamazepina. Na osnovu toga se može zaključiti da je

karbamazepin u svim uzorcima izrađenih čvrstih disperzija prisutan u svom termodinamički najstabilnijem polimorfnom obliku III. Nastanak amornog oblika lekovite supstance često predstavlja imperativ prilikom formulacije čvrstih disperzija, zbog značajno veće brzine rastvaranja i biološke raspoloživosti u poređenju sa kristalnim oblicima. Ipak, termodinamička nestabilnost amornog oblika ograničava njegovu širu komercijalnu primenu zbog moguće rekristalizacije i posledičnih varijacija u brzini rastvaranja i biološkoj raspoloživosti. Dobijeni rezultati pokazuju da metod topljenja koji je primenjen u izradi binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija nema negativan uticaj na stabilnost karbamazepina, što ovu tehniku čini pogodnom za širu komercijalnu primenu, naravno uz prethodnu optimizaciju procesa i prenos procesa sa laboratorijskog na industrijski nivo. Takođe, zbog kristalne prirode karbamazepina, binarne karbamazepin-poloksamer čvrste disperzije su manje problematične sa aspekta obezbeđenja dugoročne stabilnosti.

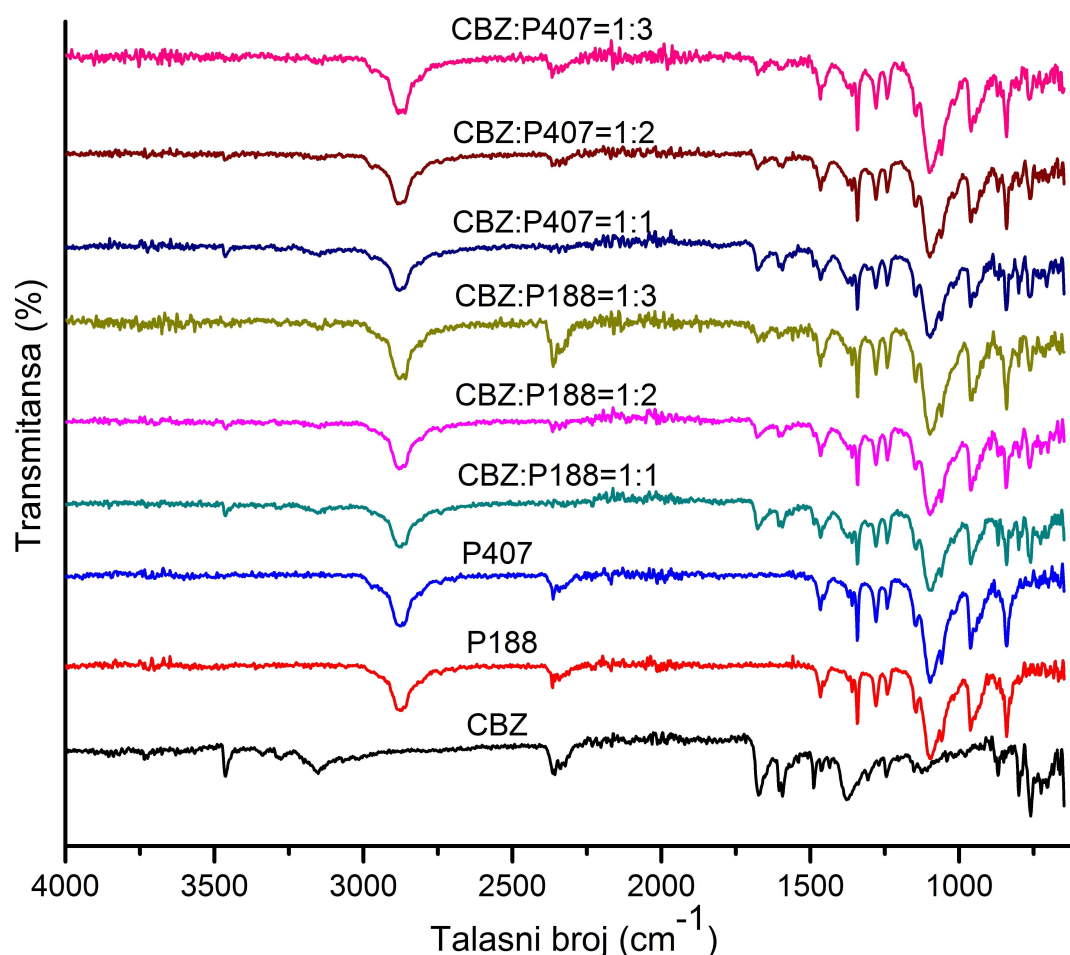


Slika 16. (a) Difraktogrami karbamazepina (CBZ), poloksamera 188 (P188) i karbamazepin-poloksamer 188 binarnih čvrstih disperzija. (b) Difraktogrami karbamazepina (CBZ), poloksamera 407 (P407) i karbamazepin-poloksamer 407 binarnih čvrstih disperzija.

3.1.4.4. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

Intermolekulske interakcije između lekovite supstance i komponenata matriksa predstavljaju značajan faktor koji utiče na stabilnost dobijenih čvrstih disperzija i fizičko stanje lekovite supstance u disperziji. Smatra se da pored visoke T_g polimernog

matriksa, prisustvo intermolekulskih interakcija ima najvažniju ulogu u sprečavanju kristalizacije molekula lekovite supstance iz amornog oblika (Khougaz i Clas, 2000). Primenom FT-IR spektroskopije, pojava intermolekulskih interakcija se može detektovati na osnovu pomeranja frekvencija na kojima dolazi do apsorpcije infracrvenog zračenja od strane funkcionalnih grupa prisutnih u ispitivanim molekulima. FT-IR spektri polaznih materijala i izrađenih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija prikazani su na slici 17. Na FT-IR spektru karbamazepina uočavaju se karakteristične apsorpcione trake na 3462 cm^{-1} (-NH valencione vibracije), 1674 cm^{-1} (-CO-R vibracije), 1593 cm^{-1} i 1605 cm^{-1} (-C=C- i -C=O vibracije i -NH deformacije). Ovakav položaj apsorpcionih traka prethodno je opisan za polimorfni oblik III karbamazepina (Rustichelli i sar., 2000, Grzesiak i sar., 2003). FT-IR spektar

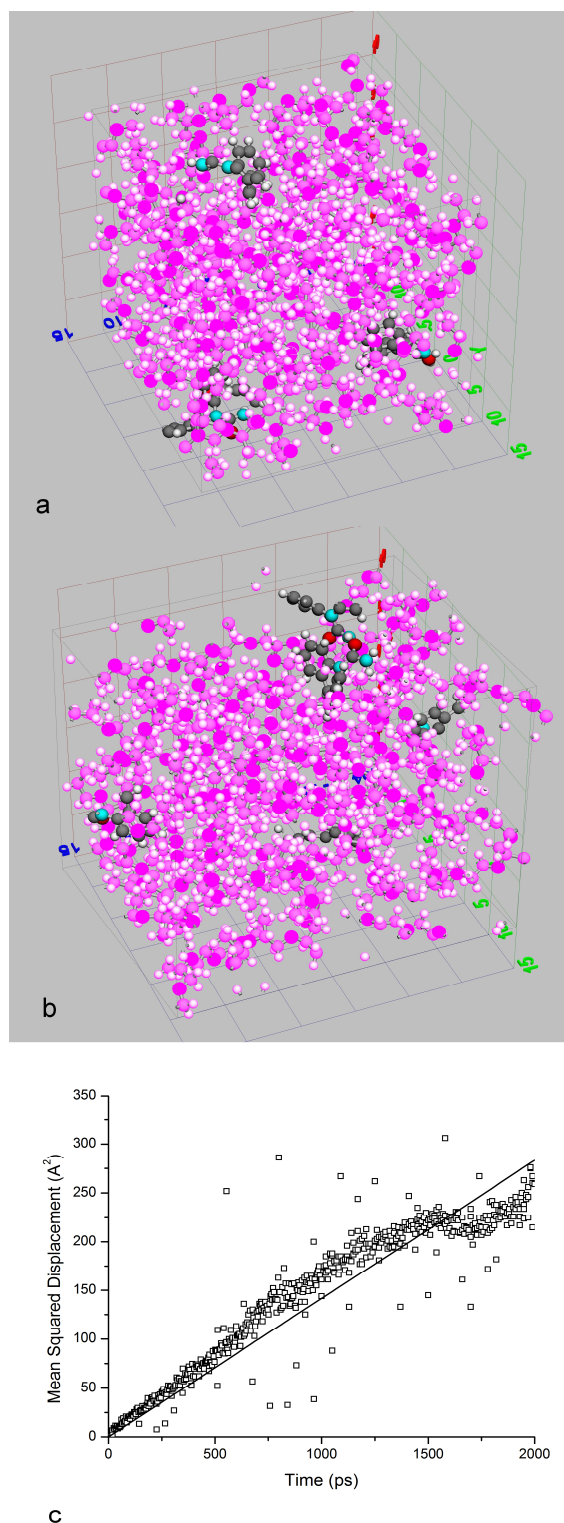


Slika 17. FT-IR spektri karbamazepina (CBZ), poloksamera 188 (P188), poloksamera 407 (P407) i izrađenih čvrstih disperzija

karbamazepina je u skladu sa rezultatima diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i difrakcije X-zraka na prašku, koje su takođe pokazale da je karbamazepin koji je korišćen za izradu čvrstih disperzija sadržao polimorfni oblik III. Svi karakteristični pikovi karbamazepina zabeleženi su na istim frekvencijama i na FT-IR spektrima izrađenih čvrstih disperzija. Odsustvo pomeranja pikova karbamazepina na FT-IR spektrima čvrstih disperzija ukazuje da intermolekulske interakcije između karbamazepina i poloksamera nisu prisutne. Na osnovu prisustva karboksamidne funkcionalne grupe u strukturi karbamazepina i alkoholnih funkcionalnih grupa u polimernom lancu poloksamera očekivana je pojava karbamazepin-poloksamer interakcija, ali one nisu uočene primenom FT-IR spektroskopije. Odsustvo karbamazepin-poloksamer interakcija predstavlja jedan od razloga zbog čega je u svim izrađenim čvrstim disperzijama karbamazepin prisutan u kristalnom obliku. Prilikom dispergovanja karbamazepina u poloksameru, ne dolazi do stvaranja intermolekulskih interakcija između karbamazepina i poloksamera, koje bi sprečile rekristalizaciju karbamazepina. Visok viskozitet rastopa polimera često može da spreči ili značajno uspori rekristalizaciju lekovite supstance. U slučaju binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija, nizak viskozitet rastopa poloksamera ne može sprečiti rekristalizaciju karbamazepina. Zahvaljujući svim navedenim faktorima, karbamazepin je u svim ispitivanim uzorcima izrađenih čvrstih disperzija, bez obzira na maseni odnos karbamazepin:poloksamer, zastupljen u kristalnom obliku.

3.1.4.5. Simulacija molekularne dinamike

Prikaz ćelije u kojoj je vršena simulacija molekularne dinamike sa jednim molekulom poloksamera i tri molekula karbamazepina dat je na slikama 18a i 18b. Na slici 18c prikazan je dijagram kvadrata srednjeg slobodnog puta čestica (eng. *mean squared displacement*) u zavisnosti od vremena simulacije. Prilikom simulacije uočeno je izvesno povećanje volumena ćelije za simulaciju uz smanjenje stvarne gustine, kao rezultat termalne ekspanzije sistema prilikom povećanja temperature. Na osnovu dijagrama zavisnosti kvadrata srednjeg slobodnog puta čestica od vremena simulacije, računata je vrednost difuzionog koeficijenta karbamazepina u poloksameru. Izračunata vrednost difuzionog koeficijenta karbamazepina od $2,35 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ukazuje da molekuli karbamazepina poseduju dovoljnu pokretljivost da bi se dispergovali u otopljenom

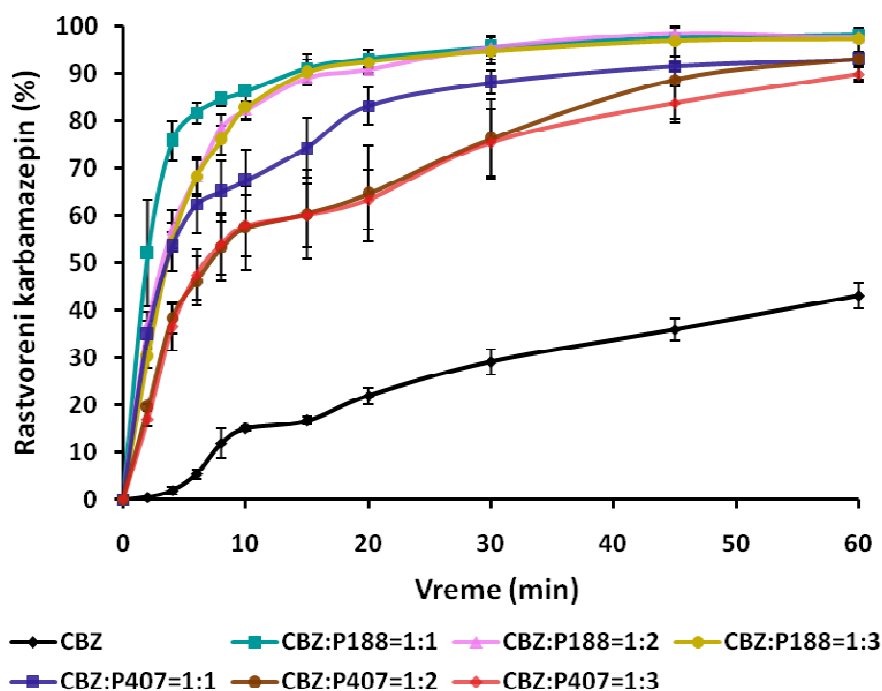


Slika 18. Prikaz ćelije u kojoj je vršena simulacija molekularne dinamike (a) na početku i (b) na kraju simulacije. (c) Dijagram kvadrata srednjeg slobodnog puta (eng. Mean squared displacement) u zavisnosti vremena simulacije. Lanac poloksamera je prikazan ujednačenom bojom kako bi se uočilo prisustvo molekula karbamazepina

poloksameru. Za difuzioni koeficijent samog poloksamera izračunata je vrednost od $1,37 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, dok u prisustvu dispergovanih molekula karbamazepina vrednost difuzionog koeficijenta poloksamera raste do $5,42 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$. Porast difuzionog koeficijenta poloksamera nakon dispergovanja karbamazepina predstavlja posledicu plastifikatorskog efekta molekula karbamazepina na poloksamer, koji dovodi do slabljenja interakcija u polimernom lancu i povećanja pokretljivosti. Tokom trajanja simulacije nije došlo do stvaranja vodoničnih veza između molekula karbamazepina i poloksamera, što je u skladu sa rezultatima dobijenim primenom FT-IR spektroskopije. Sa druge strane, uočeno je da tokom simulacije dolazi do stvaranja vodoničnih veza između atoma vodonika iz amidne N-H grupe jednog molekula karbamazepina i atoma kiseonika iz karbonilne C=O grupe drugog molekula karbamazepina. Dobro je poznato da je u svim do sada opisanim polimorfnim oblicima, karbamazepin zastupljen u obliku cikličnih karboksamidnih dimera koji nastaju građenjem dve vodonične veze između molekula karbamazepina (Grzesiak i sar., 2003). Tokom trajanja simulacije (2 ns) nije uočen nastanak cikličnih dimera, što može biti posledica kratkog trajanja same simulacije, usled čega nije moguće verno reprodukovati sve događaje u realnim sistemima. Ipak, uočeno formiranje vodonične veze između dva molekula karbamazepina ukazuje na tendenciju molekula karbamazepina ka agregaciji, što predstavlja prvi korak ka nukleaciji i rastu kristala. Sami procesi nukleacije i rasta kristala traju znatno duže od samog trajanja simulacije u ovom ispitivanju, pa ne iznenađuje činjenica da nisu uočeni tokom simulacije. I pored toga, primenom simulacije molekularne dinamike dobijene su korisne informacije, koje daju molekularnu osnovu za objašnjenje rezultata dobijenih primenom metoda fizičko-hemijske karakterizacije. Uočena tendencija molekula karbamazepina ka stvaranju intermolekulskih veza i agregaciji predstavlja razumljivo objašnjenje za uočenu kristalnu prirodu karbamazepina u svim uzorcima čvrstih disperzija.

3.1.4.6. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija

Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz uzoraka binarnih čvrstih disperzija u poređenju sa čistim karbamazepinom prikazani su na slici 19, dok je tabelarni prikaz dobijenih rezultata dat u tabeli 3. Sa slike se lako može uočiti da se karbamazepin sporo



Slika 19. Profili brzine rastvaranja karbamazepina (CBZ) iz binarnih čvrstih disperzija sa poloksamerom 188 (P188) i poloksamerom 407 (P407) u poređenju sa profilom brzine rastvaranja čistog karbamazepina

Tabela 3. Količina rastvorenog karbamazepina (%) (srednja vrednost $\pm$ SD) u odnosu na deklarisanu sadržaj karbamazepina iz uzoraka čistog karbamazepina (CBZ) i binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija (CBZ:P188 i CBZ:P407)

Vreme (min)	CBZ	CBZ:P188 (maseni odnos)			CBZ:P407 (maseni odnos)		
		1:1	1:2	1:3	1:1	1:2	1:3
0	0	0	0	0	0	0	0
2	0,5 $\pm$ 0,2	52,0 $\pm$ 11,3	36,7 $\pm$ 2,9	30,1 $\pm$ 2,3	34,8 $\pm$ 2,9	19,5 $\pm$ 0,6	17,1 $\pm$ 1,6
4	1,9 $\pm$ 0,7	75,7 $\pm$ 4,1	57,0 $\pm$ 4,0	54,5 $\pm$ 2,0	53,4 $\pm$ 5,1	38,4 $\pm$ 3,4	36,4 $\pm$ 4,9
6	5,4 $\pm$ 1,1	81,6 $\pm$ 2,2	68,1 $\pm$ 4,0	68,1 $\pm$ 3,5	62,3 $\pm$ 6,3	46,1 $\pm$ 5,1	47,5 $\pm$ 5,4
8	12,0 $\pm$ 3,1	84,5 $\pm$ 1,3	78,5 $\pm$ 2,6	76,0 $\pm$ 3,0	65,0 $\pm$ 6,3	53,2 $\pm$ 7,0	54,0 $\pm$ 6,3
10	15,0 $\pm$ 0,5	86,2 $\pm$ 1,0	82,3 $\pm$ 1,8	82,7 $\pm$ 2,5	67,3 $\pm$ 6,6	57,3 $\pm$ 8,8	57,8 $\pm$ 6,5
15	16,7 $\pm$ 0,8	91,0 $\pm$ 3,0	89,0 $\pm$ 1,1	90,2 $\pm$ 2,7	74,2 $\pm$ 6,3	60,2 $\pm$ 9,3	60,0 $\pm$ 6,6
20	21,9 $\pm$ 1,7	93,1 $\pm$ 2,0	90,7 $\pm$ 0,6	92,4 $\pm$ 2,6	83,1 $\pm$ 3,9	64,5 $\pm$ 10,1	63,3 $\pm$ 6,2
30	29,1 $\pm$ 2,7	95,5 $\pm$ 2,6	95,4 $\pm$ 1,5	94,6 $\pm$ 2,8	88,0 $\pm$ 2,4	76,2 $\pm$ 8,4	75,4 $\pm$ 7,1
45	35,9 $\pm$ 2,2	97,4 $\pm$ 0,5	98,4 $\pm$ 1,2	96,8 $\pm$ 3,2	91,4 $\pm$ 0,8	88,7 $\pm$ 9,0	83,8 $\pm$ 3,5
60	43,0 $\pm$ 2,6	98,2 $\pm$ 0,6	97,5 $\pm$ 0,7	97,1 $\pm$ 2,6	93,0 $\pm$ 1,2	93,1 $\pm$ 4,4	89,8 $\pm$ 1,5

i nekompletno rastvara iz uzoraka čiste lekovite supstance, što je i očekivano imajući u vidu da se radi o slabo rastvorljivoj lekovitoj supstanci. Tokom 1 h ispitivanja svega oko 40% ispitivane količine karbamazepina se rastvorilo u primenjenoj zapremini medijuma. Iz svih formulacija binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija postignuto je značajno brže rastvaranje karbamazepina u odnosu na čist karbamazepin. Tako se može uočiti da se nakon 10 minuta ispitivanja iz čvrstih disperzija izrađenih sa poloksamerom 188 rastvorilo više od 80% karbamazepina, dok se iz čvrstih disperzija izrađenih sa poloksamerom 407 rastvorilo 57-67% karbamazepina. Za isti vremenski period rastvorilo se tek oko 15% karbamazepina iz uzoraka čiste lekovite supstance.

Kako je fizičko-hemijskom karakterizacijom uzoraka binarnih čvrstih disperzija dokazano da je u svim uzorcima karbamazepin prisutan u kristalnom obliku, povećanje brzine rastvaranja karbamazepina nakon formulacije u čvrste disperzije sa poloksamerima može se objasniti poboljšanim kvašenjem i solubilizacijom hidrofobne lekovite supstance, smanjenjem veličine čestica i smanjenjem njihove aglomeracije. Zahvaljujući svojoj hidrofilnoj prirodi i površinskoj aktivnosti, poloksameri smanjuju površinski napon na granici faza između hidrofobne lekovite supstance i medijuma i na taj način olakšavaju rastvaranje lekovite supstance.

Na prikazanim profilima brzine rastvaranja jasno se može uočiti sporije rastvaranje karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa poloksamerom 407, u poređenju sa disperzijama izrađenim korišćenjem poloksamera 188. Dok se kod čvrstih disperzija izrađenih sa poloksamerom 188 za prvih 15 minuta ispitivanja rastvori oko 90% karbamazepina, kod disperzija izrađenih sa poloksamerom 407 ista količina karbamazepina se rastvori tek za oko 60 minuta ispitivanja. Veća efikasnost poloksamera 188 u povećanju brzine rastvaranja karbamazepina može se pripisati hidrofilnijoj prirodi ovog polimera, u poređenju sa poloksamerom 407, što je posledica većeg udela hidrofilnih etilenoksidnih segmenata u polimernom lancu. Hidrofilnije osobine poloksamera 188 pokazuje i HLB vrednost od 29, koja je viša od HLB vrednosti poloksamera 407, koja iznosi 22 (Fusco i sar., 2006). Pažljivim posmatranjem profila brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija sa poloksamerom 407, može se uočiti da nakon brzog rastvaranja karbamazepina u toku prvih 10 minuta, dolazi do usporavanja rastvaranja. Ista pojava se može uočiti i na profilu brzine rastvaranja čistog karbamazepina. Ova pojava je najverovatnije uzrokovana nastankom

dihidratnog oblika karbamazepina, prilikom kontakta sa vodenim medijumom. Poznato je da se dihidratni oblik karbamazepina odlikuje 1,5-1,6 puta nižom rastvorljivošću u poređenju sa anhidrovanim polimorfnim oblicima karbamazepina (Kobayashi i sar., 2000). Kako se na profilima brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa poloksamerom 188 ne uočava ovo smanjenje brzine rastvaranja karbamazepina, može se pretpostaviti da poloksamer 188 deluje protektivno, sprečavajući nastanak dihidratnog oblika.

Povećanje udela polimera obično dovodi do povećanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz čvrstih disperzija. U slučaju binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija dobijeni su potpuno suprotni rezultati i sa povećanjem udela poloksamera došlo je do smanjenja brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih čvrstih disperzija. Najveća brzina rastvaranja karbamazepina postignuta je iz čvrstih disperzija izrađenih u karbamazepin:poloksamer masenom odnosu 1:1, dok su gotovo identični profili brzine rastvaranja karbamazepina dobijeni ispitivanjem čvrstih disperzija koje su sadržale isti tip poloksamera, izrađenih u karbamazepin:poloksamer odnosima 1:2 i 1:3. Smanjenje brzine rastvaranja lekovite supstance sa povećanjem masenog udela poloksamera opisano je prethodno u slučaju čvrstih disperzija bikalutamida (Sancheti i sar., 2008) i albendazola (Castro i sar., 2010) sa poloksamerom 188. Dobro je poznato da rastvori poloksamera ispoljavaju termoreverzibilno gelirajuće osobine, tj. iznad određenih vrednosti temperature i koncentracije poloksamera dolazi do geliranja rastvora (Cabana i sar., 1997, Sharma i Bhatia, 2004, Fusco i sar., 2006, Hsu i sar., 2009, Tian i sar., 2009). U literaturi se mogu naći različite vrednosti za temperature iznad kojih dolazi do geliranja rastvora poloksamera i one su opsegu od 15 do 50°C. Važno je napomenuti da vrednosti temperature geliranja rastvora poloksamera zavise, kako od tipa poloksamera tako i od koncentracije poloksamera, kao i od prisustva drugih pomoćnih supstanci, koje mogu uticati, kako na vrednost temperature geliranja tako i na vreme koje je potrebno za geliranje (Dumortier i sar., 2006, He i sar., 2008, Tian i sar., 2009). Do geliranja dolazi u koncentrovanim rastvorima poloksamera, iznad odgovarajuće koncentracije praga (oko 15% u slučaju poloksamera 407 (Sharma i Bhatia, 2004)). Tako se može pretpostaviti da do formiranja gel sloja dolazi na međupovršini između čestica i medijuma u regionima sa visokom koncentracijom poloksamera. Razlog za smanjenje brzine rastvaranja karbamazepina sa povećanjem udela poloksamera može biti

povećanje debljine i viskoziteta gel sloja, što dovodi do usporenja difuzije molekula karbamazepina u okolni medijum.

Postizanje najveće brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija sa najmanjim udelom poloksamera je veoma značajno sa aspekta formulacije finalnog farmaceutskog oblika. Pošto su za postizanje zadovoljavajućeg stepena povećanja brzine rastvaranja teško rastvorljivih lekovitih supstanci iz čvrstih disperzija često potrebne velike količine polimera, formulacija finalnog farmaceutskog oblika, prihvatljive mase za peroralnu primenu, često može predstavljati veliki problem. Prilikom proizvodnje tableta korišćenjem čvrstih disperzija često se mogu javiti problemi tokom punjenja matrice tablet mašine i komprimovanja usled loše protočnosti i lepljive konzistencije čvrstih disperzija. Loša protočnost takođe može otežati proizvodnju kapsula sa prethodno dobijenim čvrstim disperzijama. Jedan od problema vezanih za formulaciju tableta iz čvrstih disperzija predstavlja i mogućnost usporavanja brzine rastvaranja lekovite supstance usled sporog raspadanja izrađenih tableta (Serajuddin i sar., 1999). Zbog svega navedenog, često je prilikom formulacije finalnog farmaceutskog oblika, potrebno dodati pomoćne materije koje olakšavaju sam proces proizvodnje i omogućavaju željeno oslobađanje lekovite supstance, što dodatno povećava masu konačnog farmaceutskog oblika. Kako je u slučaju ispitivanih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija, najveća brzina rastvaranja karbamazepina postignuta iz disperzija sa relativno visokim udelom lekovite supstance (50%), a uzimajući u obzir i visoku terapijsku dozu karbamazepina, formulacija finalnog farmaceutskog oblika koji ima masu koja je prihvatljiva za oralnu primenu ne bi predstavljala problem. Takođe moguće je u formulaciju konačnog farmaceutskog oblika uključiti i druge pomoćne materije, a da se pritom zadrži masa formulacije koja je prihvatljiva za oralnu primenu.

3.2. Formulacija i karakterizacija ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija

U ovoj fazi istraživanja, ternarne karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrste disperzije formulisane su sa ciljem povećanja brzine rastvaranja teško rastvorljive model lekovite supstance karbamazepina. Tehnike eksperimentalnog dizajna smeše i veštačkih neuronskih mreža su primenjene kako bi se ispitao uticaj udela svih komponenata u navedenim ternarnim čvrstim disperzijama na brzinu rastvaranja karbamazepina. Dobijeni uzorci čvrstih disperzija su podvrgnuti fizičko-hemijskoj karakterizaciji primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije, polarizacione mikroskopije na zagrejanjoj ploči, difrakcije X-zraka na prašku, kao i ispitivanju brzine rastvaranja karbamazepina sa ciljem utvrđivanja fizičkog stanja karbamazepina unutar matriksa čvrstih disperzija, eventualno prisutnih polimorfni prelaza, kao i mehanizama odgovornih za povećanje brzine rastvaranja karbamazepina iz ternarnih čvrstih disperzija.

3.2.1. Materijali

Kao komponente matriksa ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija korišćeni su polietilenglikol-polivinilkaprolaktam-polivinilacetat graft kopolimer (Soluplus®, BASF, Ludwigshafen, Nemačka) i mikronizirani poloksamer 188 (Kolliphor™ P188 micro, BASF, Ludwigshafen, Nemačka). Kao model teško rastvorljive lekovite supstance korišćen je karbamazepin (Ph Eur 8.0, Galenika AD, Beograd, Srbija). Apsolutni etanol (Ph Eur 8.0, Merck, Darmstadt, Nemačka) je korišćen kao rastvarač za izradu čvrstih disperzija.

3.2.2. Izrada ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija

Ternarne karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrste disperzije, sastava definisanog primenom D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše (Tabela 4), izrađene su metodom rastvaranja. Najpre su u apsolutnom etanolu rastvarani Soluplus® i poloksamer 188, mešanjem na magnetnoj mešalici (IKA RCT basic, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemačka). Zatim je u tako pripremljen rastvor dodavana odgovarajuća količina karbamazepina i mešanje nastavljano do njegovog potpunog rastvaranja. Dobijeni rastvori su izlivani na sahatna stakla, postavljena na vodenom

kupatilu, gde je vršena evaporacija etanola zagrevanjem na 60°C. Čvrsta masa zaostala posle evaporacije etanola je uklanjanja sa sahatnih stakala struganjem i nakon toga čuvana u zatvorenim staklenim bočicama 48 h. Nakon tog perioda masa je pulverizovana u tarioniku uz pomoć pistila u cilju dobijanja čvrste disperzije u obliku praška na kojoj su vršena dalja ispitivanja.

Tabela 4. *Sastav ternarnih karbamazepin (CBZ)-Soluplus®-poloksamer 188 (P188) čvrstih disperzija sa dobijenim vrednostima odgovora (zavisno promenljivih)*

	Udeli komponenata (%)			Udeli komponenata u L-pseudo skali			Odgovori	
	CBZ (%)	Soluplus® (%)	P 188 (%)	CBZ	Soluplus®	P 188	Q ₁₀ (%)	Q ₂₀ (%)
F1	50,00	48,92	1,08	0,600	0,378	0,022	44,9	51,1
F2	50,00	39,47	10,53	0,600	0,189	0,211	62,9	77,4
F3	42,99	57,01	0,00	0,460	0,540	0,000	73,0	76,6
F4*	50,00	39,47	10,53	0,600	0,189	0,211	64,3	75,2
F5	26,15	68,82	5,03	0,123	0,776	0,101	81,7	84,5
F6	20,00	80,00	0,00	0,000	1,000	0,000	67,6	74,5
F7	34,53	45,53	19,94	0,291	0,310	0,399	85,7	85,9
F8*	20,00	80,00	0,00	0,000	1,000	0,000	68,2	70,7
F9	27,14	54,54	18,32	0,143	0,491	0,366	84,7	85,9
F10	20,00	63,59	16,41	0,000	0,672	0,328	93,5	91,5
F11	34,72	58,21	7,07	0,294	0,564	0,141	83,5	85,9
F12	41,61	48,30	10,09	0,432	0,366	0,202	75,3	81,1
F13	47,26	32,74	20,00	0,545	0,055	0,400	78,0	90,1
F14*	50,00	48,92	1,08	0,600	0,378	0,022	42,9	47,9
F15*	20,00	63,59	16,41	0,000	0,672	0,328	92,9	94,2
F16*	47,26	32,74	20,00	0,545	0,055	0,400	80,2	91,7
F17	44,33	39,79	15,88	0,487	0,196	0,317	79,9	89,8
F18	34,94	51,99	13,07	0,299	0,440	0,261	91,3	95,7
F19	22,61	66,19	11,20	0,052	0,724	0,224	86,2	91,7
F20	20,00	60,00	20,00	0,000	0,600	0,400	95,5	94,1
F21	42,57	52,44	4,99	0,451	0,449	0,100	70,3	70,8
F22	33,86	62,73	3,41	0,277	0,655	0,068	74,5	80,1
T1	33,57	66,43	0,00	0,271	0,729	0,000	69,2	80,6
T2	47,66	46,68	5,66	0,553	0,334	0,113	55,3	70,6
T3	28,38	58,49	13,13	0,168	0,570	0,263	93,6	95,3

*ponovljeni eksperimenti

Q₁₀ i Q₂₀ - količine rastvorenog karbamazepina (%) nakon 10 i 20 minuta ispitivanja

3.2.3. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija

In vitro ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija vršeno je korišćenjem aparature sa rotirajućom lopaticom u 500 ml prečišćene vode kao medijumu, pri brzini okretanja lopatica od 75 o/min, u trajanju od 2 h. Nakon tačno definisanog vremena (2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 i 120 minuta) uzimano je 4 ml uzorka, nakon čega je vršena nadoknada istom zapreminom svežeg medijuma. Nakon filtriranja uzoraka, merena je apsorbancija na 285 nm na Evolution 300 UV/Vis spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), a koncentracija rastvorenog karbamazepina je izračunavana na osnovu jednačine kalibracione krive. Rezultati su prikazani kao količina rastvorenog karbamazepina (%) za određeno vreme u odnosu na deklarisani sadržaj karbamazepina u uzorcima. Ispitivanja su vršena u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

3.2.4. Ispitivanje uticaja udela komponenata ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija na brzinu rastvaranja karbamazepina

3.2.4.1. Eksperimentalni dizajn smeše

D-optimalni eksperimentalni dizajn smeše je korišćen u cilju procene uticaja udela karbamazepina (A), Soluplus®-a (B) i poloksamera 188 (C) na brzinu rastvaranja karbamazepina. Udeli komponenata su varirani unutar unapred postavljenih granica:

$$20\% \leq A \leq 50\%$$

$$30\% \leq B \leq 80\%$$

$$0\% \leq C \leq 20\%,$$

uzimajući u obzir rezultate preliminarne eksperimenta i pojedinačnu dozu karbamazepina od 200 mg, koja bi trebala da se nađe u masi formulacije koja je prihvatljiva za peroralnu primenu. Postavljanjem navedenih granica za udele komponenata dobijen je eksperimentalni prostor nepravilnog oblika u kome nisu primenljivi tzv. simetrični tipovi eksperimentalnog dizajna smeše, kao što su *simplex lattice* i *simplex centroid*, pa je stoga primenjen D-optimalni eksperimentalni dizajn smeše. Za planiranje eksperimenta i analizu dobijenih rezultata korišćen je Design-

Expert 7.0.0 softverski paket (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, SAD). Za nezavisno promenljive odabrani su udeli karbamazepina (A), Soluplus®-a (B) i poloksamera 188 (C) sa gore navedenim granicama, dok su kao zavisno promenljive odabrane količine rastvorenog karbamazepina (%) (u odnosu na sadržaj karbamazepina u ispitivanom uzorku) nakon 10 (Q_{10}) i 20 (Q_{20}) minuta, s obzirom da je kod izrađenih čvrstih disperzija očekivano trenutno oslobađanje karbamazepina. Postavljanjem definisanih granica primenom navedenog softvera dobijena je šema od ukupno 22 eksperimenata, gde 5 eksperimentalnih proba predstavljaju ponovljene eksperimente koji omogućavaju procenu eksperimentalne greške (Tabela 4). Eksperimentalni podaci su uklapani u linearni (28), kvadratni (29), specijalni kubni (30), i kubni (31) Šefeov (*Scheffe's*) model:

$$Y=b_1A+b_2B+b_3C \quad (28)$$

$$Y=b_1A+b_2B+b_3C+b_{12}AB+b_{13}AC+b_{23}BC \quad (29)$$

$$Y= b_1A+b_2B+b_3C+b_{12}AB+b_{13}AC+b_{23}BC+b_{123}ABC \quad (30)$$

$$Y=b_1A+b_2B+b_3C+b_{12}AB+b_{13}AC+b_{23}BC+b_{123}ABC+\gamma_{12}AB(A-B)+\gamma_{13}AC(A-C)+\gamma_{23}BC(B-C) \quad (31)$$

gde je Y nezavisno promenljiva (Q_{10} ili Q_{20}), A udeo karbamazepina, B udeo Soluplus®-a i C udeo poloksamera 188, dok b_1 - b_{123} i γ_{13} - γ_{23} predstavljaju koeficijente dobijenog matematičkog modela. Model koji najbolje opisuje zavisnost između nezavisno promenljivih i eksperimentalno određenih zavisno promenljivih odabran je na osnovu najviših vrednosti koeficijenta determinacije (R^2), prilagođenog koeficijenta determinacije (eng. *Adjusted R²* - $Adj R^2$), koeficijenta determinacije predviđanja (eng. *Predicted R²* - $Pred R^2$), kao i najnižih vrednosti standardne devijacije (SD) i predviđene rezidualne sume kvadrata (eng. *predicted residual sum of square* - *PRESS*). Koeficijent determinacije (R^2) pokazuje koji deo varijacije u zavisnoj promenljivoj se može objasniti varijacijama nezavisne promenljive. Prilagođeni koeficijent determinacije ($Adj R^2$) predstavlja vrednost koeficijenta determinacije prilagođenog prema broju članova u modelu. Vrednost prilagođenog koeficijenta determinacije opada sa povećanjem članova u modelu, ukoliko ti novi članovi ne doprinose poboljšanju samog modela. Koeficijent determinacije predviđanja ($Pred R^2$) pokazuje koliko dobro model predviđa vrednosti zavisno promenljive. *PRESS* predstavlja pokazatelj koliko dobro se svaka pojedinačna tačka u eksperimentalnom prostoru uklapa u dobijeni matematički model.

Prilikom izračunavanja vrednosti ovog parametra, za dobijanje matematičkog modela koriste se sve tačke osim jedne. Zatim se dobijeni model koristi za predviđanje vrednosti zavisno promenljive u tački koja nije korišćenja za dobijanje modela i nakon toga izračunava razlika između stvarnih (eksperimentalnih) i predviđenih vrednosti zavisno promenljive za datu tačku. Isti postupak se ponavlja za sve tačke, pri čemu *PRESS* predstavlja zbir kvadrata razlike između stvarnih i predviđenih vrednosti za sve pojedinačne tačke (Design-Expert 7.1 User's Guide, 2007).

Koeficijenti u gore navedenim jednačinama računati su nakon prevođenja vrednosti nezavisno promenljivih u L-pseudo skalu prema jednačini:

$$L\text{-Pseudo} = (\text{Maseni udeo komponente} - L_i) / (1 - L) \quad (32)$$

gde je L_i postavljena donja granica za maseni udeo komponente, L zbir svih donjih granica za masene udele komponentenata.

Maseni udeo komponente računat je prema formuli:

$$\text{Maseni udeo komponente} = (\text{Količina pojedinačne komponente} / \text{Zbir količina svih komponentenata}) \quad (33)$$

Nakon odabira odgovarajućeg modela, iz modela su eliminisani članovi za koje je primenom analize varijanse (ANOVA) pokazano da nemaju statistički značajan uticaj na vrednost zavisno promenljive ($p > 0,05$). Rezultati su prikazani i grafički kao konturni grafik, *trace* grafik i dijagram dvokomponentne smeše. Sposobnost predviđanja dobijenog modela procenjivana je korišćenjem tri test formulacije (T1-T3) (Tabela 4) koje nisu korišćene u razvoju samog modela. Slaganje između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti za Q_{10} i Q_{20} kod test formulacija procenjivano je na osnovu izračunate vrednosti koeficijenta determinacije (R^2), a rezultati su prikazani i grafički u vidu korelacionog dijagrama (predviđene vs. eksperimentalne vrednosti).

3.2.4.2. Veštačke neuronske mreže

Za razvoj odgovarajućeg modela veštačkih neuronskih mreža koji opisuje zavisnost između udela karbamazepina, Soluplus[®]-a i poloksamera 188 i Q_{10} i Q_{20} korišćen je Statistica Neural Networks softver (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD). Za potrebe ovog ispitivanja odabrana je arhitektura veštačkih neuronskih mreža tipa višeslojnog perceptrona, sa jednim slojem skrivenih neurona, zbog svoje relativno jednostavne strukture i mogućnosti modelovanja izuzetno kompleksnih zavisnosti između

Tabela 5. Veštačke neuronske mreže (VNM) tipa višeslojnog perceptrona (MLP) sa različitim brojem skrivenih neurona, aktivacionim funkcijama i vrednostima za brzinu učenja i momentum, testirane u ispitivanju

VNM	Skriveni neuroni	Aktivaciona funkcija	Brzina učenja/ <i>Momentum</i> ^a	RMSE Trening set	RMSE Verifikacioni set	RMSE Test set
MLP1	2	Logistička	0,6-0,6/0,3-0,3	0,0691	0,1008	0,1044
MLP2	2	Logistička	0,3-0,3/0,5-0,5	0,0944	0,0864	0,0976
MLP3	2	Logistička	0,3-0,6/0,3/0,3	0,0715	0,1142	0,0962
MLP4	2	Logistička	0,3-0,6/0,6-0,3	0,0827	0,1189	0,0877
MLP5	2	Hiperbolička	0,6-0,6/0,3-0,3	0,0588	0,1215	0,1436
MLP6	2	Hiperbolička	0,3-0,3/0,5-0,5	0,0829	0,1271	0,0928
MLP7	2	Hiperbolička	0,3-0,6/0,3-0,3	0,0598	0,1202	0,1273
MLP8	2	Hiperbolička	0,3-0,6/0,6-0,3	0,0589	0,1190	0,1464
MLP9	3	Logistička	0,6-0,6/0,3-0,3	0,0675	0,1146	0,1008
MLP10	3	Logistička	0,3-0,3/0,5-0,5	0,0726	0,1182	0,0894
MLP11	3	Logistička	0,3-0,6/0,3-0,3	0,0793	0,0996	0,0964
MLP12	3	Logistička	0,3-0,6/0,6-0,3	0,0672	0,1162	0,1037
MLP13	3	Hiperbolička	0,6-0,6/0,3-0,3	0,0555	0,1238	0,0620
MLP14	3	Hiperbolička	0,3-0,3/0,5-0,5	0,0588	0,1202	0,1238
MLP15	3	Hiperbolička	0,3-0,6/0,3-0,3	0,0576	0,1222	0,1405
MLP16	3	Hiperbolička	0,3-0,6/0,6-0,3	0,0752	0,1157	0,0877
MLP17	4	Logistička	0,3-0,6/0,6-0,3	0,0660	0,1079	0,0935
MLP18	4	Logistička	0,6-0,6/0,3-0,3	0,0649	0,1118	0,1075
MLP19	4	Logistička	0,3-0,3/0,5-0,5	0,0810	0,1175	0,0748
MLP20	4	Logistička	0,3-0,6/0,3-0,3	0,0708	0,1145	0,0937
MLP21	4	Hiperbolička	0,6-0,6/0,3-0,3	0,0550	0,1257	0,1668
MLP22	4	Hiperbolička	0,3-0,3/0,5-0,5	0,0615	0,1253	0,1078
MLP23	4	Hiperbolička	0,3-0,6/0,3-0,3	0,0560	0,1226	0,1552
MLP24	4	Hiperbolička	0,3-0,6/0,6-0,3	0,0826	0,1267	0,0788
MLP25	5	Logistička	0,6-0,6/0,3-0,3	0,0674	0,0922	0,0740
MLP26	5	Logistička	0,3-0,3/0,5-0,5	0,0866	0,1136	0,0799
MLP27	5	Logistička	0,3-0,6/0,3-0,3	0,0639	0,1110	0,1114
MLP28	5	Logistička	0,3-0,6/0,6-0,3	0,0646	0,1147	0,1056
MLP29	5	Hiperbolička	0,6-0,6/0,3-0,3	0,0559	0,1133	0,1516
MLP30	5	Hiperbolička	0,3-0,3/0,5-0,5	0,0564	0,1202	0,1525
MLP31	5	Hiperbolička	0,3-0,6/0,3-0,3	0,0571	0,1186	0,1427
MLP32	5	Hiperbolička	0,3-0,6/0,6-0,3	0,0472	0,1192	0,1171

^aBrzina učenja (a-b, gde je *a* brzina učenja na početku, a *b* brzina učenja na kraju procesa obučavanja mreže), *momentum* je označen na isti način

promenljivih. Ispitivane mreže su obučavane primenom *back propagation* algoritma za učenje. U toku razvoja modela varirani su broj neurona u skrivenom sloju, vrednosti za brzinu učenja i *momentum*, a takođe su korišćene i različite aktivacione funkcije (Tabela 5), sa ciljem dobijanja mreže sa najboljom sposobnošću za generalizaciju. Tokom samog procesa učenja mreže podešavanje vrednosti sinaptičkih težina vršeno je korišćenjem trening seta podataka. Verifikacioni set podataka, koji zapravo predstavlja jedan deo trening seta podataka, korišćen je u cilju praćenja procesa učenja mreže na osnovu vrednosti greške izračunate korišćenjem funkcije greške mreže (*RMSE Verifikacioni set*). Kao funkcija greške korišćena je funkcija sume kvadrata (eng. *sum-squared function*). Korišćeni softver izračunatu grešku prikazuje kao koren srednje vrednosti kvadrata (eng. *root mean square error-RMSE*). Test set podataka je sadržao podatke koji nisu korišćeni tokom procesa učenja mreže i kao takav je korišćen za potpuno nezavisnu procenu procesa učenja mreže na osnovu izračunate vrednosti greške (*RMSE Test set*), koja je korišćena za izbor odgovarajuće arhitekture mreže. Sposobnost predviđanja dobijenog modela veštačkih neuronskih mreža je procenjivana na osnovu korelacije eksperimentalnih i predviđenih vrednosti zavisno promenljivih korišćenjem podataka za tri test formulacije (T1-T3). Slaganje između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti za test formulacije procenjivano je na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije (R^2), a rezultati su prikazani i grafički u vidu korelacionog dijagrama (predviđene vs. eksperimentalne vrednosti). Izračunate vrednosti koeficijenata determinacije korišćene su za poređenje sposobnosti predviđanja modela dobijenog primenom eksperimentalnog dizajna smeše i modela dobijenog primenom veštačkih neuronskih mreža.

3.2.5. Fizičko-hemijska karakterizacija odabranih uzoraka ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija

Formulacije na kojima je vršena fizičko-hemijska karakterizacija izabrane su tako da se pokrije ceo eksperimentalni prostor, kako bi se stekao uvid u fizičko stanje karbamazepina u matriksu čvrstih disperzija u zavisnosti od udela komponenata disperzije. Tako su formulacije F1, F2, F5, F6, F7, F12, F13, F20 i F22 odabrane za fizičko-hemijsku karakterizaciju.

3.2.5.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija vršena je u cilju procene fizičkog stanja karbamazepina u disperziji, eventualno prisutnih polimorfnih prelaza i lekovita supstanca-matriks interakcija. Ispitivanje uzoraka ternarnih čvrstih disperzija vršena su korišćenjem DSC 1 diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra (Mettler-Toledo, Giessen, Nemačka). Precizno izmerena masa od 3 do 6 mg uzorka u aluminijumskoj posudi od 40 μ l podvrgnuta je zagrevanju od 20 do 220°C, brzinom od 10°C/min. Nakon toga je vršeno hlađenje do 20°C brzinom od 20°C/min i na kraju ponovno zagrevanje do 220°C brzinom od 10°C/min. Konstantan protok azota od 70 ml/min održavan je tokom svih analiza, a prazna aluminijumska posuda je korišćena kao referentna. Sve analize su vršene u duplikatu.

3.2.5.2. Polarizaciona mikroskopija na zagrejanjoj ploči

Polarizaciona mikroskopija na zagrejanjoj ploči je vršena u cilju vizuelnog praćenja promena u uzorcima tokom zagrevanja i pouzdanije interpretacije promena uočenih na DSC termogramima. Ispitivanje je vršeno korišćenjem polarizacionog mikroskopa Leica DMLB (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka) opremljenog pločom za kontrolisano zagrevanje uzorka Linkam THMS 600 (Linkam Scientific Instrument Ltd, Surrey, Velika Britanija). Uzroci su podvrgnuti zagrevanju od 25 do 200°C. Fotomikrografije uzoraka na različitim temperaturama dobijene su korišćenjem digitalne kamere mikroskopa i Leica Quick Win softvera (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka).

3.2.5.3. Difrakcija X-zraka na prašku

Difrakcija X-zraka na prašku vršena je kako bi se stekao uvid u fizičko stanje karbamazepina u čvrstim disperzijama (kristalno ili amorfno) i detektovale eventualne promene polimorfnih oblika karbamazepina. Ispitivanja su vršena korišćenjem X'Pert Pro MPD difraktometra (Panalytical, Almelo, Holandija). Uzorci su ispitivani u opsegu 2θ uglova od 10 do 50°, korišćenjem Cu K α izvora zračenja ($\lambda=1,5406$ Å), sa veličinom koraka od 0,017° i vremenom zadržavanja od 30 s po koraku, pri naponu od 40 kV i jačini struje od 40 mA. Sva ispitivanja su vršena u duplikatu.

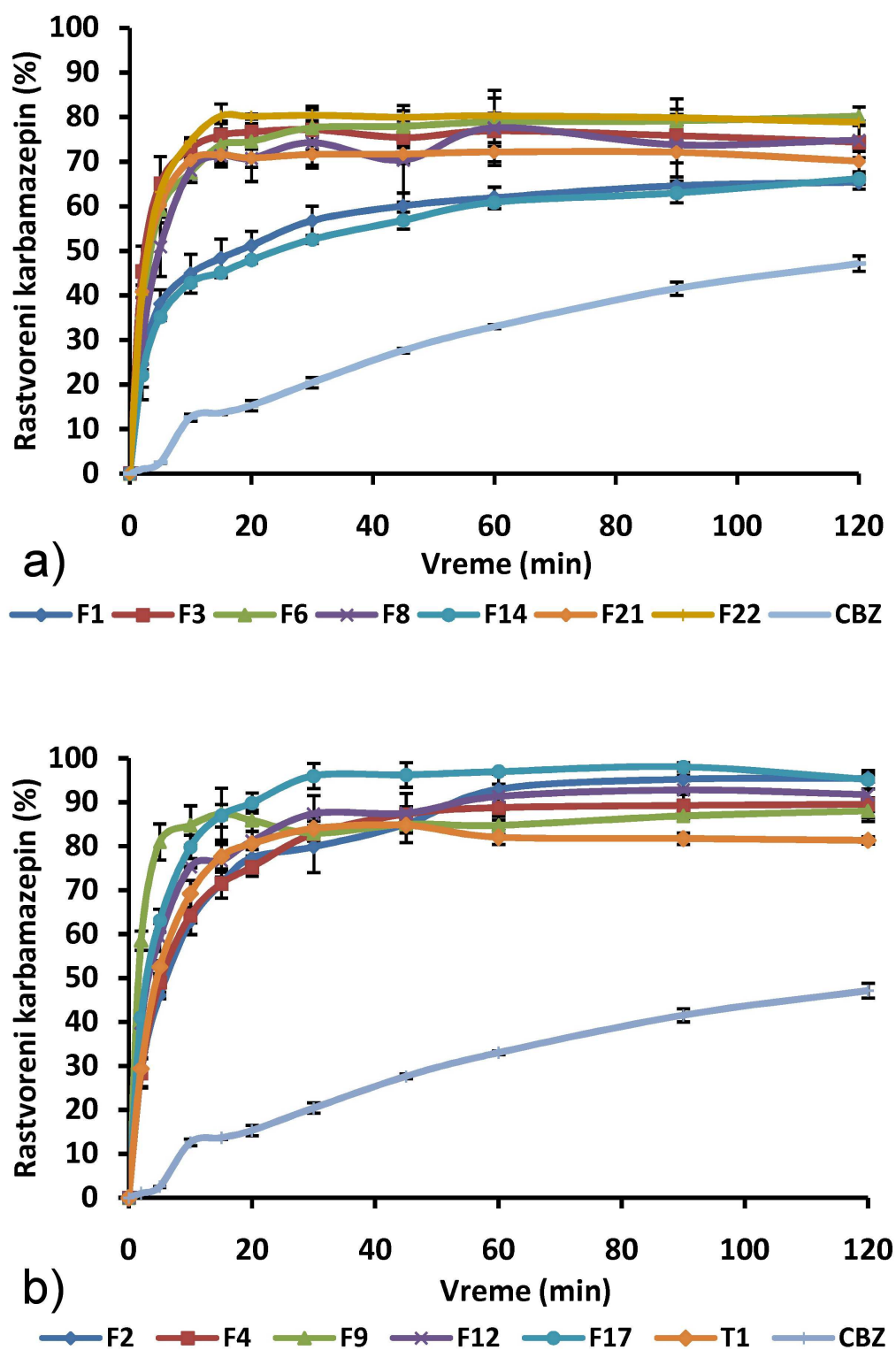
3.2.5.4. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

FT-IR spektroskopija je korišćena za procenu lekovita supstanca-matriks interakcija koje mogu značajno doprineti stabilizaciji amornog oblika lekovite supstance unutar matriksa čvrstih disperzija. Ispitivanja su vršena korišćenjem FT-IR spektrometra Nicolet iS10 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD), opremljenog ATR sistemom (Smart iTR, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD). Spektri ispitivanih uzoraka su snimani u intervalu od 4000 do 650 cm^{-1} , sa rezolucijom od 4 cm^{-1} , pri čemu je vršeno 16 skeniranja za svaki spektar.

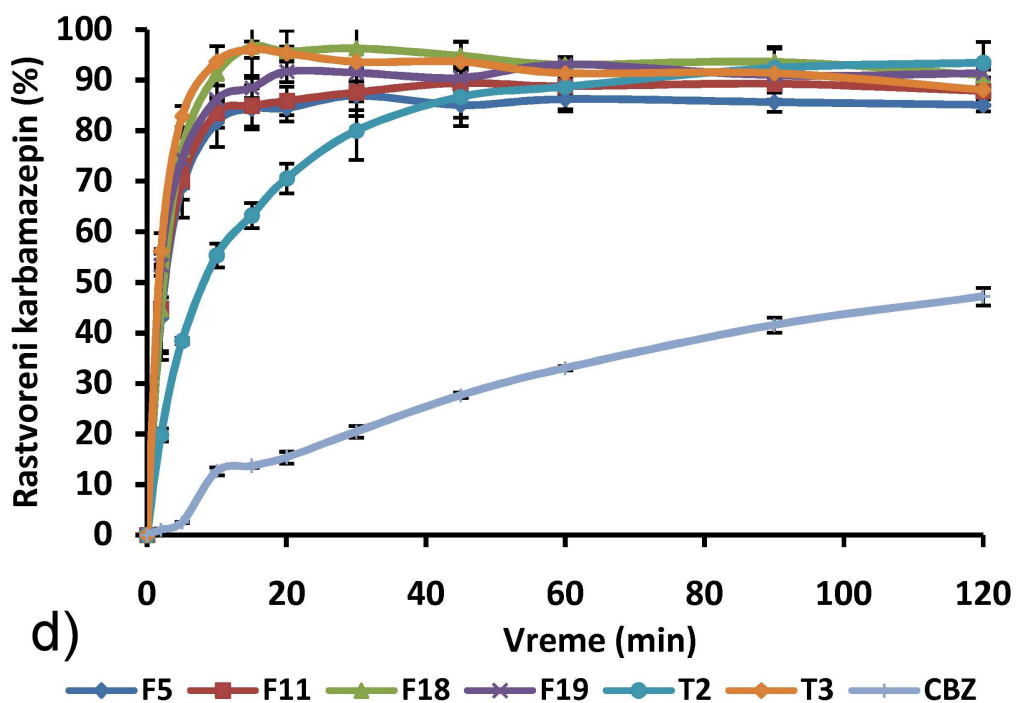
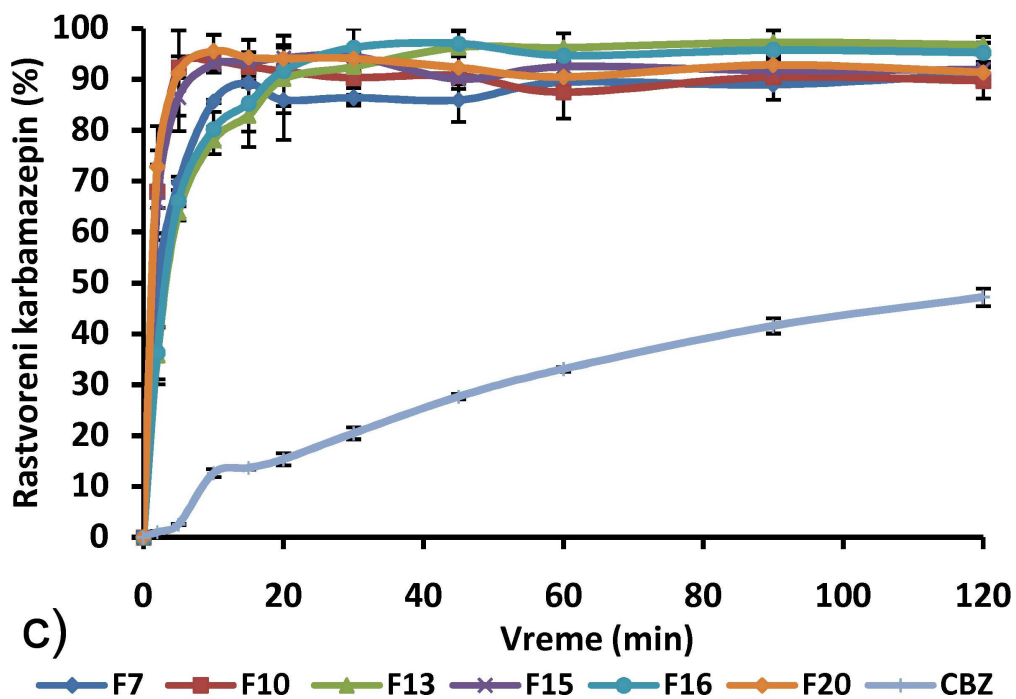
3.2.6. Rezultati i diskusija

3.2.6.1. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija

Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz ternarnih čvrstih disperzija u poređenju sa profilom brzine rastvaranja čistog karbamazepina prikazani su na slici 20, dok je tabelarni prikaz dobijenih rezultata dat u tabeli 6. Sa prikazanih profila brzine rastvaranja jasno se uočava da je iz svih izrađenih formulacija ternarnih čvrstih disperzija postignuto značajno brže oslobađanje karbamazepina u poređenju sa uzorcima čistog karbamazepina. Na profilu brzine rastvaranja karbamazepina uočava se karakteristično sporo i nekompletno rastvaranje, gde se u toku 2 h ispitivanja rastvorilo manje od 50% od ispitivane količine karbamazepina. Tokom samog ispitivanja uočeno je da karbamazepin formira agregate koji zbog svoje hidrofobne prirode plutaju po površini medijuma, što dodatno usporava proces rastvaranja. Na profilu brzine rastvaranja karbamazepina može se uočiti da nakon nekih 10 minuta ispitivanja dolazi do usporavanja procesa rastvaranja. Uzrok ove pojave može biti nastanak dihidratnog oblika karbamazepina pri kontaktu sa vodenim medijumom. Nastanak teško rastvorljivog dihidratnog oblika karbamazepina na granici faza karbamazepin-vodeni medijum može dovesti do dodatnog smanjenja brzine rastvaranja karbamazepina. Rezultati dobijeni ispitivanjem čistog karbamazepina su sasvim očekivani, imajući u vidu nisku rastvorljivost ove lekovite supstance zbog čega je ona i izabrana kao model lekovita supstanca za formulaciju čvrstih disperzija. Dok se u slučaju čistog



Slika 20. Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz karbamazepin-Soluplus® - poloksamer 188 ternarnih čvrstih disperzija u poređenju sa čistim karbamazepinom (CBZ)



Slika 20. Nastavak

Tabela 6. Količina rastvorenog karbamazepina (%) (srednja vrednost $\pm$ SD) u odnosu na deklarisanu sadržaj karbamazepina iz uzoraka ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija (F1-F22, T1-T3), odabranog uzorka fizičkih smeša (F15PM) i čistog karbamazepina (CBZ)

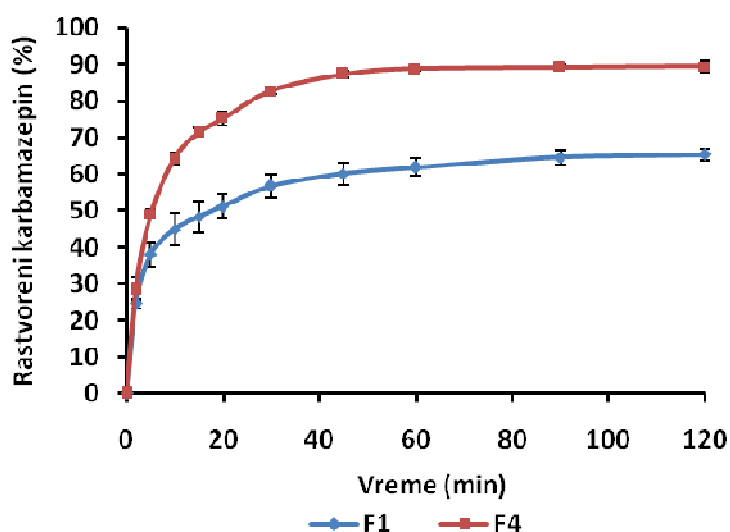
Vreme (min)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	24,5 $\pm$ 1,2	28,6 $\pm$ 3,3	45,3 $\pm$ 5,8	28,4 $\pm$ 3,3	43,0 $\pm$ 8,3	36,1 $\pm$ 5,0	48,7 $\pm$ 5,4	29,5 $\pm$ 12,8
5	38,1 $\pm$ 3,2	46,1 $\pm$ 0,8	65,2 $\pm$ 6,0	49,0 $\pm$ 1,2	68,9 $\pm$ 6,1	59,3 $\pm$ 3,0	69,6 $\pm$ 1,3	50,9 $\pm$ 6,6
10	44,9 $\pm$ 4,4	62,9 $\pm$ 3,0	73,0 $\pm$ 2,0	64,3 $\pm$ 1,7	81,7 $\pm$ 4,9	67,6 $\pm$ 1,3	85,7 $\pm$ 0,3	68,2 $\pm$ 2,8
15	48,3 $\pm$ 4,3	71,5 $\pm$ 3,3	75,9 $\pm$ 3,3	71,4 $\pm$ 1,0	84,4 $\pm$ 4,0	73,7 $\pm$ 4,8	89,2 $\pm$ 0,6	71,4 $\pm$ 1,9
20	51,1 $\pm$ 3,3	77,4 $\pm$ 1,8	76,6 $\pm$ 1,0	75,2 $\pm$ 2,0	84,5 $\pm$ 2,6	74,5 $\pm$ 4,0	85,9 $\pm$ 7,8	70,7 $\pm$ 5,2
30	56,7 $\pm$ 3,3	79,9 $\pm$ 5,8	77,2 $\pm$ 3,1	82,8 $\pm$ 0,8	86,9 $\pm$ 2,8	77,6 $\pm$ 4,9	86,3 $\pm$ 0,7	74,3 $\pm$ 5,0
45	60,1 $\pm$ 2,9	85,0 $\pm$ 4,1	75,4 $\pm$ 3,9	87,3 $\pm$ 1,1	85,0 $\pm$ 2,5	77,9 $\pm$ 4,7	85,9 $\pm$ 4,3	70,3 $\pm$ 9,4
60	61,9 $\pm$ 2,4	93,0 $\pm$ 1,2	76,9 $\pm$ 0,5	88,8 $\pm$ 0,6	86,2 $\pm$ 2,4	78,9 $\pm$ 5,4	89,4 $\pm$ 0,3	77,6 $\pm$ 8,4
90	64,6 $\pm$ 2,0	95,3 $\pm$ 3,4	75,8 $\pm$ 2,2	89,3 $\pm$ 0,5	85,7 $\pm$ 1,9	79,1 $\pm$ 5,0	88,9 $\pm$ 2,9	73,8 $\pm$ 8,0
120	65,4 $\pm$ 1,5	95,5 $\pm$ 0,8	74,4 $\pm$ 1,1	89,5 $\pm$ 1,5	85,1 $\pm$ 1,2	80,2 $\pm$ 2,1	91,0 $\pm$ 1,3	74,8 $\pm$ 3,9
Vreme (min)	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	58,5 $\pm$ 2,2	67,9 $\pm$ 8,1	44,8 $\pm$ 8,8	39,8 $\pm$ 1,5	35,7 $\pm$ 5,6	22,1 $\pm$ 2,6	65,8 $\pm$ 7,4	36,2 $\pm$ 5,2
5	81,0 $\pm$ 4,1	92,4 $\pm$ 2,1	70,2 $\pm$ 3,8	59,3 $\pm$ 3,2	63,8 $\pm$ 1,2	35,2 $\pm$ 0,8	86,4 $\pm$ 6,6	66,1 $\pm$ 3,8
10	84,7 $\pm$ 4,5	93,5 $\pm$ 2,2	83,5 $\pm$ 2,9	75,3 $\pm$ 0,2	78,0 $\pm$ 2,7	42,9 $\pm$ 0,6	92,9 $\pm$ 0,9	80,2 $\pm$ 3,4
15	87,4 $\pm$ 5,9	92,5 $\pm$ 2,8	84,9 $\pm$ 4,0	76,8 $\pm$ 3,7	82,9 $\pm$ 6,1	45,1 $\pm$ 0,5	93,3 $\pm$ 0,6	85,2 $\pm$ 5,5
20	85,9 $\pm$ 2,4	91,5 $\pm$ 0,9	85,9 $\pm$ 2,8	81,1 $\pm$ 4,5	90,1 $\pm$ 6,7	47,9 $\pm$ 0,7	94,2 $\pm$ 2,4	91,7 $\pm$ 6,9
30	82,9 $\pm$ 1,7	90,3 $\pm$ 2,0	87,5 $\pm$ 4,6	87,4 $\pm$ 4,2	92,4 $\pm$ 7,5	52,6 $\pm$ 0,9	94,5 $\pm$ 0,7	96,2 $\pm$ 5,3
45	85,0 $\pm$ 1,9	90,7 $\pm$ 1,7	89,4 $\pm$ 4,4	87,6 $\pm$ 4,5	96,3 $\pm$ 3,8	56,8 $\pm$ 1,9	90,1 $\pm$ 1,9	97,0 $\pm$ 2,5
60	84,8 $\pm$ 2,1	87,5 $\pm$ 5,2	88,8 $\pm$ 4,6	91,3 $\pm$ 5,3	96,2 $\pm$ 2,8	60,9 $\pm$ 0,5	92,5 $\pm$ 0,3	94,7 $\pm$ 1,2
90	86,9 $\pm$ 0,5	90,4 $\pm$ 1,6	89,3 $\pm$ 3,2	92,8 $\pm$ 3,4	97,2 $\pm$ 2,4	63,0 $\pm$ 2,2	91,7 $\pm$ 2,2	95,7 $\pm$ 1,5
120	88,0 $\pm$ 2,4	89,8 $\pm$ 3,5	87,8 $\pm$ 2,8	91,7 $\pm$ 5,2	96,8 $\pm$ 1,6	66,2 $\pm$ 1,3	91,8 $\pm$ 1,6	95,3 $\pm$ 1,9

Tabela 6. (nastavak)

Vreme (min)	F17	F18	F19	F20	F21	F22	T1	T2
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	41,0±5,8	44,6±8,2	53,4±6,3	72,8±8,0	40,8±4,9	40,2±4,3	29,4±4,0	19,8±1,3
5	63,1±2,6	76,3±3,0	74,3±5,6	91,2±8,4	60,3±1,8	63,2±1,6	52,5±1,5	38,4±0,6
10	79,9±2,7	91,3±5,4	86,2±2,8	95,5±3,2	70,3±1,4	74,5±0,9	69,2±3,1	55,3±2,3
15	87,0±2,5	96,6±5,7	88,5±2,0	94,3±3,5	71,5±1,5	80,2±2,8	77,6±3,5	63,2±2,5
20	89,8±2,3	95,7±4,1	91,7±2,0	94,1±2,2	70,8±2,0	80,1±0,6	80,6±2,8	70,6±2,9
30	96,0±2,9	96,3±4,6	91,5±2,5	94,1±1,8	71,6±3,0	80,4±1,3	84,0±2,7	80,0±5,8
45	96,3±2,8	94,8±2,8	90,4±2,8	92,3±2,6	71,7±2,1	79,9±1,5	84,8±1,7	86,7±5,7
60	97,0±0,5	93,1±1,6	93,1±0,9	90,4±2,2	72,2±2,1	80,3±0,6	82,0±1,6	88,7±1,6
90	98,1±1,0	93,6±2,6	91,0±1,7	92,8±2,3	72,1±2,3	79,8±0,8	81,7±1,3	92,4±4,2
120	95,2±2,1	91,0±1,2	91,4±0,9	91,3±1,4	70,1±2,3	78,8±0,3	81,3±0,8	93,5±4,1
Vreme (min)	T3	F15PM	CBZ					
0	0	0	0					
2	56,1±0,5	29,3±1,0	1,0±0,2					
5	82,8±2,1	39,5±0,6	2,5±0,1					
10	93,6±0,1	42,9±1,2	12,6±0,8					
15	96,1±1,6	46,9±0,4	13,6±0,3					
20	95,3±1,4	48,6±0,6	15,3±1,2					
30	93,6±0,1	51,5±1,6	20,4±1,2					
45	93,6±0,9	54,0±1,5	27,7±0,5					
60	91,4±1,5	55,7±2,6	33,0±0,4					
90	91,4±1,1	57,0±3,2	41,6±1,5					
120	88,0±0,1	58,2±2,4	47,2±1,7					

karbamazepina tokom prvih 10 minuta ispitivanja rastvorilo tek oko 12% od ispitivane količine, za isti vremenski period rastvorilo se više od 80% karbamazepina kod 11 od 22 pripremljene formulacije ternarnih čvrstih disperzija. Kako je cilj ispitivanja bila formulacija ternarnih čvrstih disperzija iz kojih će biti postignuto trenutno oslobađanje karbamazepina, za poređenje formulacija odabrana je količina rastvorenog karbamazepina (%) nakon 10 (Q_{10}) i 20 minuta (Q_{20}) u odnosu na deklarisanu sadržaj

karbamazepina u ispitivanim uzorcima čvrstih disperzija. Vrednosti Q_{10} i Q_{20} za sve ispitivane formulacije prikazane su u tabeli 4. Iz dobijenih rezultata može se uočiti da su najviše vrednosti Q_{10} i Q_{20} (iznad 90%) postignute kod formulacija F10, F15, F18, F20 i T3, koje su sadržale najniže udele karbamazepina i najviše udele poloksamera 188. Ternarne čvrste disperzije karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188, izrađene metodom rastvaranja nisu do sada opisane u literaturi. Ipak, za poređenje se mogu uzeti rezultati nedavno objavljenog rada u kome su opisane karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 407 čvrste disperzije izrađene metodom ekstruzije topljenjem. U poređenju sa ovim rezultatima može se zaključiti da je formulacijom ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija postignuto značajno veće povećanje brzine rastvaranja karbamazepina. Ipak, pored osobina same formulacije, jedan od razloga za ovakav rezultat može biti i to što je u prethodnoj studiji (Đuriš i sar., 2014b) ispitivanje brzine rastvaranja vršeno na samim ekstrudatima, a ne na prašku. Tako jedan od razloga za veću brzinu rastvaranja karbamazepina iz karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija može biti i veća specifična površina sistema koja je u kontaktu sa medijumom, što dovodi do bržeg rastvaranja. U nedavnom ispitivanju, pokazano je da se formulacijom binarnih karbamazepin-Soluplus[®] čvrstih disperzija postiže trenutno oslobađanje karbamazepina kod disperzija koje su sadržale do 30% karbamazepina, pri čemu su slični rezultati postignuti kod disperzija izrađenih ekstruzijom topljenjem i metodom rastvaranja (Lim, 2013). Rezultati ovog ispitivanja su pokazali da se dodatkom poloksamera 188 dodatno povećava brzina rastvaranja karbamazepina, čime se omogućava postizanje trenutnog oslobađanja karbamazepina, čak i iz formulacija sa visokim udelom karbamazepina. Tako je kod formulacije F16, koja sadrži relativno visok udeo karbamazepina (47,3%) postignuto trenutno oslobađanje karbamazepina, gde je $Q_{10}=80,2\%$ i $Q_{20}=91,7\%$. Pozitivan efekat dodatka poloksamera 188 na povećanje brzine rastvaranja karbamazepina može se najbolje uočiti kada se porede profili brzine rastvaranja formulacija F1 i F4, koje sadrže po 50% karbamazepina (Slika 21). Dodatak oko 10% poloksamera 188 formulaciji F1, koja je sadržala oko 1% poloksamera, doveo je do značajnog povećanja brzine rastvaranja karbamazepina, pri čemu su vrednosti Q_{10} i Q_{20} povećane za oko 20%. Posmatrajući profile brzine rastvaranja formulacija F1, F3, F6, F8, F14, F21, F22 i T1 (Slike 20a i 20b) može se uočiti sporije i nekompletno rastvaranje karbamazepina. Za sve ove formulacije je



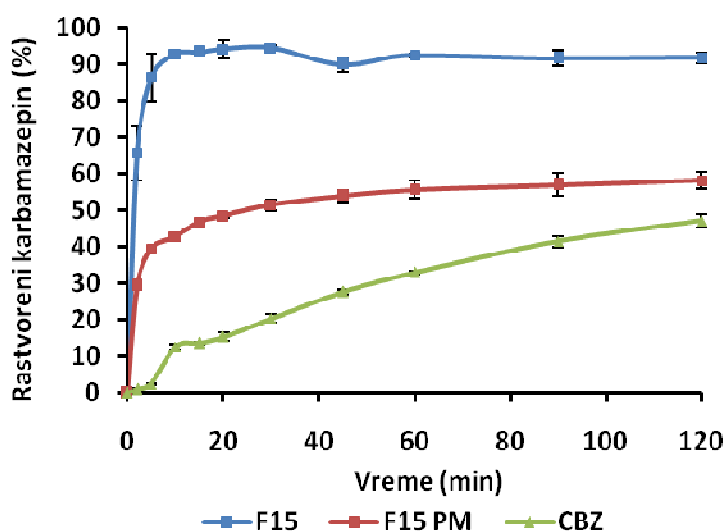
Slika 21. Uporedni prikaz profila brzine rastvaranja karbamazepina iz formulacija F1 i F4

zajedničko da sadrže niske udele poloksamera 188, ili ga uopšte ne sadrže. Ovim je potvrđeno da je dodatak poloksamera 188 neophodan preduslov za postizanje brzog rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija u Soluplus[®] polimeru, što daje jasnu prednost ternarnim karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstim disperzijama u odnosu na binarne karbamazepin-Soluplus[®] čvrste disperzije. Binarne karbamazepin-poloksamer čvrste disperzije ne bilo moguće izraditi korišćenim postupkom izrade uz primenu etanola kao rastvarača, zbog niže temperature topljenja poloksamera u odnosu na temperaturu na kojoj je vršeno uklanjanje rastvarača. Zbog toga izrada binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija opisanim metodom nije razmatrana u ovom istraživanju.

Iako se na profilima brzine rastvaranja svih formulacija jasno uočava pojava platoa nakon 30 minuta, ispitivanja su vršena tokom 2 h, kako bi se detektovala pojava precipitacije karbamazepina iz superzasićenog rastvora, ukoliko je prisutna. Poznato je da se formulacijom čvrstih disperzija, usled brzog rastvaranja lekovite supstance, postiže stanje superzasićenja, čime se značajno može povećati brzina i obim resorpcije lekovite supstance. Ipak, precipitacija molekula lekovite supstance iz superzasićenog rastvora može značajno umanjiti stvarnu korist od formulacije čvrstih disperzija i onemogućiti dostizanje krajnjeg cilja-povećanja biološke raspoloživosti lekovite supstance. Iako je kod ternarnih čvrstih disperzija sa najvećom brzinom

rastvaranja karbamazepina postignut stepen superzasićenja od oko 2,5 puta (u odnosu na rastvorljivost karbamazepina od 160 µg/ml, određenu u preliminarnim eksperimentima), precipitacija karbamazepina nije uočena ni kod jedne od ispitivanih formulacija. Odsustvo precipitacije tokom ispitivanja brzine rastvaranja pokazuje da Soluplus® i poloksamer 188, mogu inhibirati precipitaciju karbamazepina iz superzasićenog rastvora.

U cilju sticanja boljeg uvida u mehanizme koji doprinose povećanju brzine rastvaranja karbamazepina iz ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija, potrebno je sprovesti uporedno ispitivanje brzine rastvaranja iz čvrstih disperzija i fizičkih smeša ekvivalentnog sastava. Uporedni profili brzine rastvaranja formulacije čvrstih disperzija F15, fizičke smeše istovetnog sastava F15PM i čistog karbamazepina prikazani su na slici 22. Na prikazanim profilima jasno se uočava razlika između ternarnih čvrstih disperzija i fizičkih smeša, pri čemu se karbamazepin brzo i kompletno rastvara jedino iz uzoraka čvrstih disperzija. Na profilu brzine rastvaranja fizičke smeše F15PM uočava se da nakon inicijalnog brzog rastvaranja karbamazepina, dolazi do naglog usporavanja rastvaranja karbamazepina, usled mogućeg nastanka dihidratnog oblika karbamazepina. Ova pojava se ne može uočiti na profilima brzine rastvaranja ternarnih čvrstih disperzija, izuzev dve formulacije istovetnog sastava F1



Slika 22. Uporedni prikaz profila brzine rastvaranja karbamazepina iz formulacije čvrstih disperzija F15, fizičke smeše identičnog sastava F15PM i čistog karbamazepina (CBZ)

i F14, koje sadrže visoki udeo karbamazepina (50%) i nizak udelo poloksamera 188 (oko 1%). Tako inhibicija nastanka dihidratnog oblika karbamazepina predstavlja jedan od mogućih mehanizama povećanja brzine rastvaranja karbamazepina iz ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija. Odsustvo ovog efekta kod fizičke smeše može se objasniti time da se jedino formulacijom čvrstih disperzija omogućava blizak kontakt Soluplus®-a i poloksamera 188 sa česticama karbamazepina, čime se sprečava formiranje dihidratnog oblika na granici faza karbamazepin-vodeni medijum. Kako se formulacija ternarnih čvrstih disperzija pokazala kao znatno efikasniji način za povećanje brzine rastvaranja karbamazepina u odnosu na fizičke smeše, dodatni mehanizmi pored micelarne solubilizacije lekovite supstance doprinose povećanju brzine rastvaranja karbamazepina. U cilju sticanja potpunog uvida u mehanizme koji doprinose povećanju brzine rastvaranja karbamazepina iz ternarnih čvrstih disperzija neophodno je sprovesti sveobuhvatnu fizičko-hemijsku karakterizaciju uzoraka čvrstih disperzija, kao što je i prikazano u drugom delu ove faze ispitivanja. Na osnovu rezultata *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih ternarnih čvrstih disperzija može se zaključiti da je formulacija ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija izuzetno uspešan način za povećanje brzine rastvaranja karbamazepina, pri čemu se formulacijom ovih sistema može postići izuzetno brzo rastvaranje ove teško rastvorljive lekovite supstance od čak preko 90% rastvorenog karbamazepina tokom prvih 10 minuta ispitivanja.

3.2.6.2. Ispitivanje uticaja udela komponenata ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija na brzinu rastvaranja karbamazepina

3.2.6.2.1. Eksperimentalni dizajn smeše

Na osnovu posmatranja profila brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih ternarnih čvrstih disperzija može se doći samo do grube procene uticaja udela pojedinačnih komponenata na brzinu rastvaranja karbamazepina iz ternarnih čvrstih disperzija. U cilju dobijanja detaljnog uvida u uticaj faktora (udeli komponenata čvrstih disperzija) na brzinu rastvaranja karbamazepina iz ternarnih čvrstih disperzija, kvantifikacije faktorskih efekata i faktorskih interakcija, vršena je analiza primenom eksperimentalnog dizajna smeše. Veliki raspon u vrednostima odabranih zavisno

Tabela 7. Vrednosti statističkih parametara dobijenih nakon uklapanja eksperimentalnih rezultata u različite matematičke modele

Zavisna promenljiva - Q_{10}					
Model	SD	R^2	Adj R^2	Pred R^2	PRESS
<i>Linearni</i>	7,21	0,762	0,737	0,678	1338,29
<i>Kvadratni</i>	5,27	0,893	0,860	0,776	930,90
<i>Specijalni kubni</i>	4,16	0,938	0,913	0,852	617,45
<i>Kubni</i>	3,21	0,970	0,948	0,871	537,36
Zavisna promenljiva - Q_{20}					
Model	SD	R^2	Adj R^2	Pred R^2	PRESS
<i>Linearni</i>	7,52	0,689	0,656	0,576	1465,70
<i>Kvadratni</i>	5,75	0,847	0,799	0,670	1139,42
<i>Specijalni kubni</i>	4,47	0,913	0,879	0,787	735,39
<i>Kubni</i>	3,29	0,962	0,934	0,811	653,13

promenljivih (Q_{10} i Q_{20}) između različitih formulacija pokazuje da se na brzinu rastvaranja karbamazepina iz izrađenih ternarnih čvrstih disperzija može uticati promenom udela komponenata čvrstih disperzija. Ovo opravdava primenu eksperimentalnog dizajna smeše u cilju dobijanja matematičkih modela koji definišu kvantitativnu zavisnost između udela karbamazepina, Soluplus[®]-a i poloksamera 188 sa jedne strane i Q_{10} i Q_{20} sa druge strane. Na osnovu vrednosti statističkih parametara (R^2 , Adj R^2 , Pred R^2 , SD i PRESS), datih u tabeli 7, kubni model je izabran kao model koji najbolje opisuje zavisnost između udela komponenata ternarnih čvrstih disperzija i obe zavisne promenljive (Q_{10} i Q_{20}). Statističkom analizom dobijenih rezultata primenom analize varijanse (ANOVA) utvrđen je statistički značajan uticaj udela svih komponenata ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija, kao i njihovih međusobnih interakcija. Nakon eliminacije članova matematičkih modela za koje primenom analize varijanse nije ustanovljen statistički značajan uticaj na vrednosti Q_{10} i Q_{20} , dobijeni su matematički modeli koji opisuju zavisnost između udela karbamazepina, Soluplus[®]-a i poloksamera 188 i Q_{10} i Q_{20} , prikazani u odnosu na L-pseudo skalu (34 i 36) i stvarne vrednosti ispitivanih faktora (35 i 37):

$$Q_{10} = - 93,91A_p + 67,72B_p - 294,73C_p + 303,74A_pB_p + 1055,29A_pC_p + 806,34B_pC_p - 1302,84A_pB_pC_p - 443,85B_pC_p(B_p - C_p) \quad (34)$$

$$Q_{10} = - 4,825A - 0,3773B - 43,417C + 0,1215AB + 0,8413AC + 0,8506BC - 0,01042ABC - 0,003551BC(B-C) \quad (35)$$

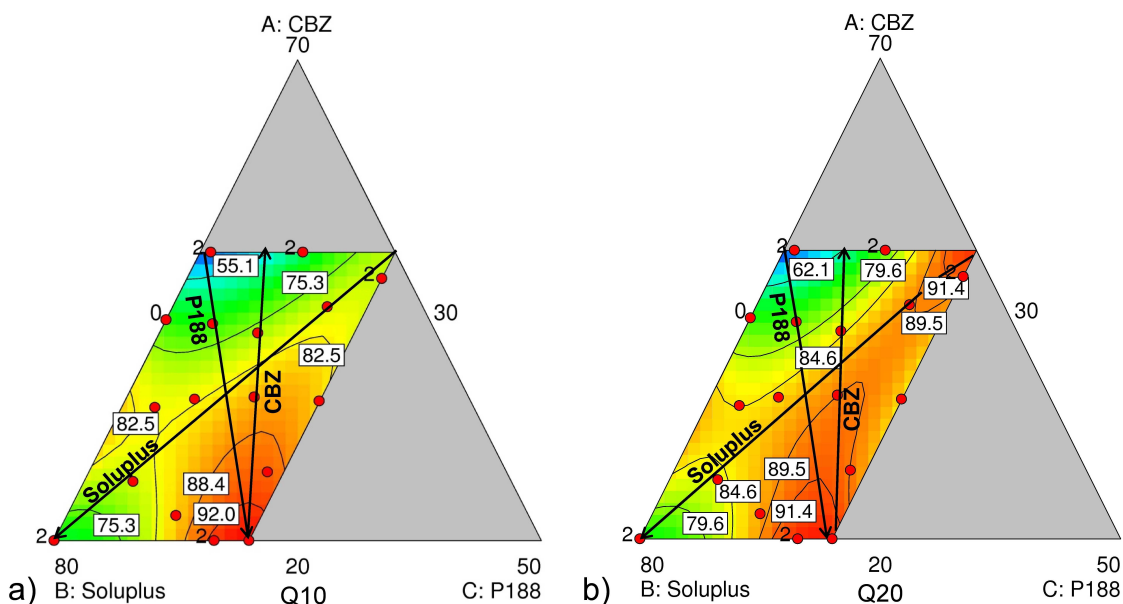
$$(SD=3,19, R^2=0,9658, Adj R^2=0,9487, Pred R^2=0,9125, PRESS=364,03, p<0,0001)$$

$$Q_{20} = - 79,54A_p + 72,70B_p - 376,17C_p + 277,82A_pB_p + 1219,53A_pC_p + 930,40B_pC_p - 1432,64A_pB_pC_p - 483,44B_pC_p(B_p - C_p) \quad (36)$$

$$Q_{20} = - 4,376A - 0,2198B - 49,856C + 0,1111AB + 0,9477AC + 0,9495BC - 0,01146ABC - 0,003867BC(B-C) \quad (37)$$

$$(SD=3,39, R^2=0,9535, Adj R^2=0,9302, Pred R^2=0,8747, PRESS=432,59, p<0,0001),$$

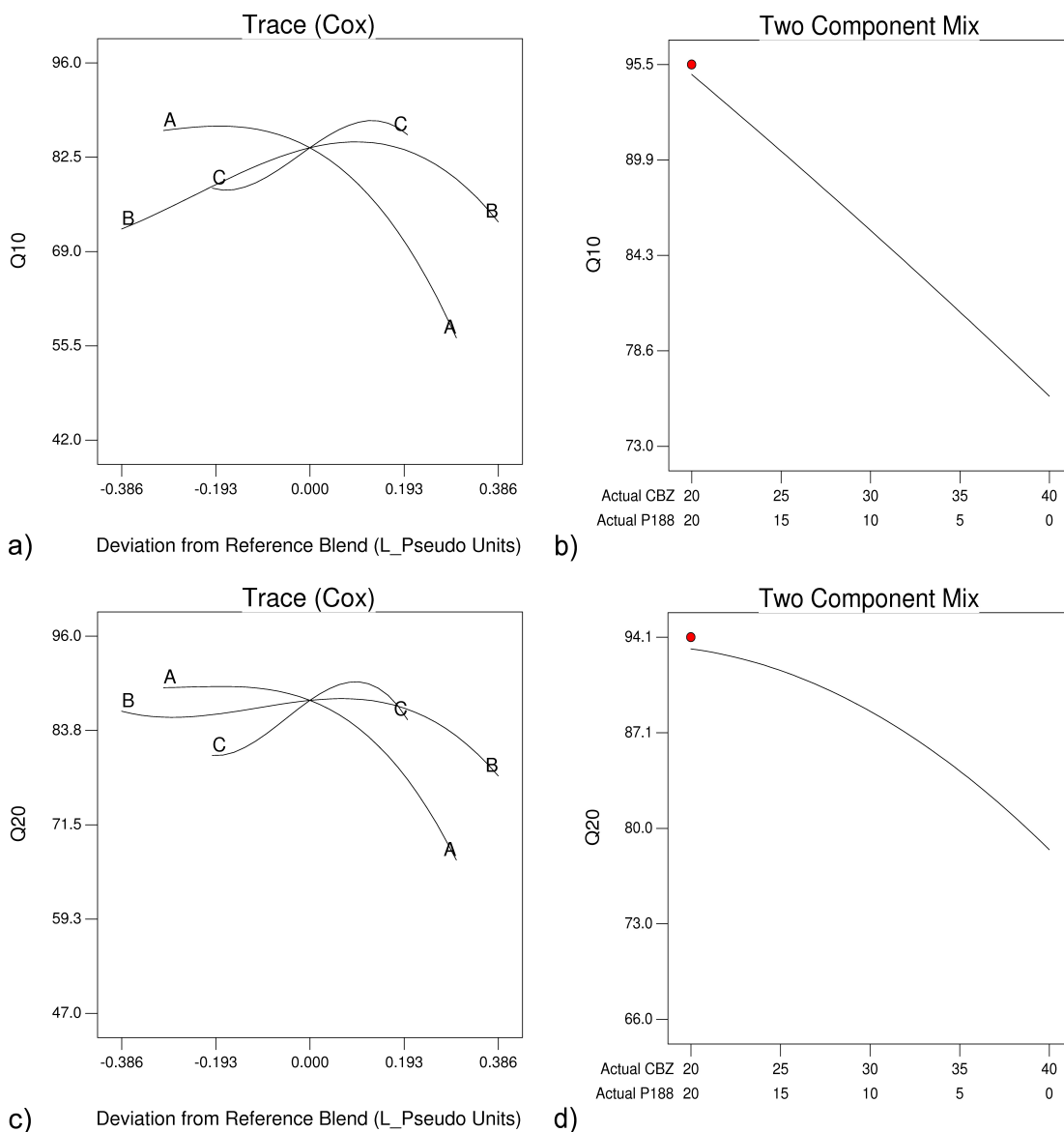
gde su Q_{10} i Q_{20} količine rastvorenog karbamazepina (%) iz čvrstih disperzija nakon 10 i 20 minuta u odnosu na deklarirani sadržaj karbamazepina u čvrstim disperzijama, A stvarni udeo karbamazepina (%) u čvrstim disperzijama, B stvarni udeo Soluplus®-a (%) u čvrstim disperzijama, C stvarni udeo poloksamera 188 (%) u čvrstim disperzijama, dok su A_p , B_p i C_p udeli karbamazepina Soluplus®-a i poloksamera 188 u L-pseudo skali. Na osnovu dobijenih vrednosti statističkih parametara (R^2 , $Adj R^2$, $Pred R^2$, $PRESS$ i SD) može se zaključiti da dobijeni modeli verno opisuju zavisnost između udela karbamazepina, Soluplus®-a i poloksamera 188 sa jedne strane i Q_{10} i Q_{20} sa druge strane. U cilju lakše interpretacije dobijenih faktorskih efekata, rezultati su prikazani i grafički kao konturni grafik, *trace* grafik i dijagram dvokomponentne smeše (Slike 23 i 24). Na ovim graphicima moguće je uočiti promenu u vrednostima odabranih indikatora brzine rastvaranja karbamazepina (Q_{10} i Q_{20}) sa promenom udela komponenata čvrstih disperzija. Na prikazanim konturnim graphicima (Slike 23a i 23b) uočava se da se najviše vrednosti Q_{10} postižu pri najvišim udelima poloksamera 188 i najnižim udelima karbamazepina (region predstavljen crvenom bojom na grafiku). U slučaju drugog ispitivanog parametra, Q_{20} , najviše vrednosti su zabeležene pri najvišim udelima poloksamera, bez obzira na udeo karbamazepina. Na osnovu ovako prikazanih rezultata može se izvesti jasan zaključak o pozitivnom efektu poloksamera 188 na



Slika 23. Konturni grafik uticaja promene udela karbamazepina (CBZ), Soluplus[®]-a i poloksamera 188 (P188) u ternarnim čvrstim disperzijama na (a) Q_{10} i (b) Q_{20} , predviđenog modelom dobijenim eksperimentalnim dizajnom smeše

povećanje brzine rastvaranja karbamazepina. Dok se u ranoj fazi procesa rastvaranja ispoljava značajan efekat udela karbamazepina na brzinu rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija, kasnije taj efekat postaje manje izražen, tako da se više ne uočavaju razlike u količini rastvorenog karbamazepina između čvrstih disperzija sa visokim i niskim udelima karbamazepina. Ovo predstavlja veoma značajnu činjenicu i pokazuje da je formulacijom ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija moguće postići brzo oslobađanje karbamazepina, čak i pri njegovim relativno visokim udelima. Tako je vrednost Q_{20} od preko 90% postignuta i pri udelima karbamazepina od oko 50%. *Trace* graphicima (Slike 24a i 24c) prikazana je promena u vrednostima zavisno promenljive kao posledica promena udela jedne komponente, dok se odnos udela drugih komponenata održava konstantnim. Prikazivanjem rezultata na ovakvom tipu grafika može se steći slika o uticaju udela pojedinačnih komponenata na vrednost praćenih zavisnih promenljivih. Na prikazanim *trace* graphicima uočava se da udeo karbamazepina ispoljava najveći uticaj na oba praćena parametra brzine rastvaranja karbamazepina iz ternarnih čvrstih disperzija (Q_{10} i Q_{20}). Pri tome se sa povećanjem udela karbamazepina smanjuje vrednost i Q_{10} i Q_{20} . Na *trace* graphicima se uočava i tendencija porasta vrednosti Q_{10} i Q_{20} sa porastom udela poloksamera 188, pri

čemu se pri najvišim udelima poloksamera uočava pojava platoa krive. Kriva koja pokazuje uticaj udela Soluplus®-a na vrednost Q_{10} i Q_{20} pokazuje karakterističan parabolični oblik, sa inicijalnim porastom, a zatim padom vrednosti Q_{10} i Q_{20} pri



Slika 24. (a) Trace grafik i (b) dijagram dvokomponentne smeše uticaja promene udela karbamazepina (CBZ), Soluplus®-a i poloksamera 188 (P188) u ternarnim čvrstim disperzijama na Q_{10} , predviđenog modelom dobijenim eksperimentalnim dizajnom smeše. (c) Trace grafik i (d) dijagram dvokomponentne smeše uticaja promene udela karbamazepina (CBZ), Soluplus®-a i poloksamera 188 (P188) u ternarnim čvrstim disperzijama na Q_{20} , predviđenog modelom dobijenim eksperimentalnim dizajnom smeše

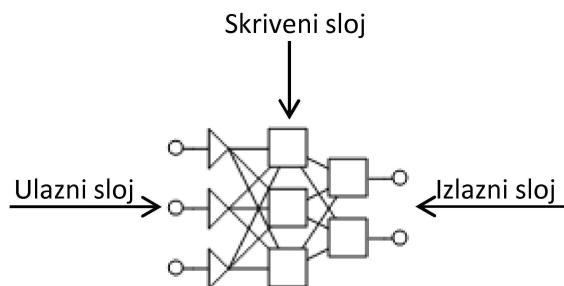
povećanju udela Soluplus[®]-a. Parabolični oblik svih krivih na *trace* graficima ukazuje na nelinearnu zavisnost između udela svih komponenata u ternarnim karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstim disperzijama i vrednosti Q_{10} i Q_{20} , kao i na značajan uticaj faktorskih interakcija, kao što je prethodno potvrđeno primenom analize varijanse. Dijagrami dvokomponentne smeše pokazuju promenu vrednosti Q_{10} (Slika 24b) i Q_{20} (Slika 24d) kao posledica promene udela dve komponente, dok se udeo treće komponentne održava konstantnim. Sa prikazanih dijagrama dvokomponentne smeše može se uočiti da dodatak poloksamera 188 binarnim karbamazepin-Soluplus[®] sistemima dovodi do porasta vrednosti, kako parametra Q_{10} tako i parametra Q_{20} . Pri tome se dodatkom poloksamera 188 binarnim karbamazepin-Soluplus[®] sistemima ostvaruje linearan rast vrednosti parametra Q_{10} . Dijagrami dvokomponentne smeše pokazuju da se najviše vrednosti Q_{10} i Q_{20} postižu pri relativnim odnosima karbamazepina i poloksamera 188 od 1:1.

Na osnovu rezultata dobijenih primenom eksperimentalnog dizajna smeše može se steći uvid u uticaj sastava ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija na brzinu rastvaranja karbamazepina. Jasno je pokazan značaj dodatka poloksamera 188 u cilju postizanja željenog povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. U prethodnim radovima, Đuriš i saradnici (Đuriš i sar., 2014b) i Tawde i saradnici (Tawde i sar., 2012) su pokazali sinergistički uticaj Soluplus[®]-a i poloksamera na povećanje brzine rastvaranja karbamazepina i simvastatina iz izrađenih ternarnih čvrstih disperzija. Park i saradnici su u nedavno objavljenom istraživanju pokazali da je dodatak poloksamera 407 neophodan uslov za postizanje željenog povećanja brzine rastvaranja repamipida iz čvrstih disperzija izrađenih sa PVP-VA 64 kopolimerom. Pokazano je da se dodatkom poloksamera 407 omogućava stvaranje hidrofilnog okruženja unutar matriksa čvrste disperzije koje omogućava brže rastvaranje, dok PVP-VA 64 omogućava sprečavanje rekristalizacije rastvorene lekovite supstance iz superzasićenog rastvora (Park i sar., 2013). U slučaju filmova sa poli-ε-kaprolaktonom koji su sadržali čvrstu disperziju teško rastvorljive lekovite supstance, pokazano da je da se nakon inkorporiranja poloksamera 188 u sistem, u toku procesa rastvaranja uočava stvaranje velikog broj pora u matriksu kao posledica brzog rastvaranja hidrofilnog poloksamera 188 (Shen i sar., 2013). Tako se i slučaju ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija povećanje brzine

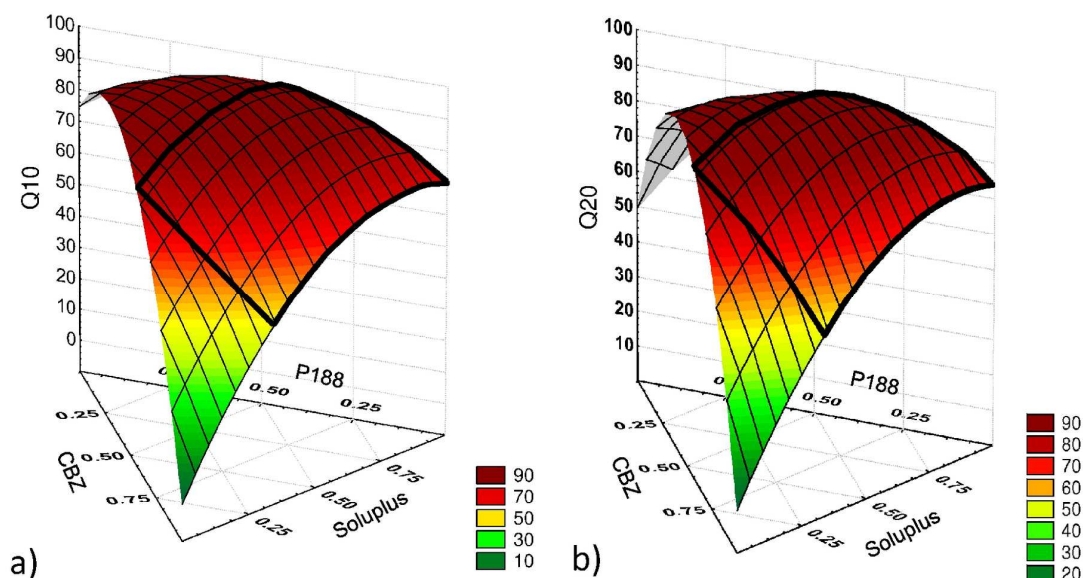
rastvaranja karbamazepina sa dodatkom poloksamera 188 može objasniti hidrofilnom prirodom i brzim rastvaranjem ovog polimera što za posledicu ima stvaranje velikog broja pora u matriksu čvrstih disperzija. Stvaranje pora i kanala usled brzog rastvaranja poloksamera 188 olakšava penetraciju vodenog medijuma i difuziju rastvorene lekovite supstance u okolni medijum. Na osnovu rezultata ovog i prethodnih istraživanja može se zaključiti da je u slučaju formulacije čvrstih disperzija teško rastvorljivih lekovitih supstanci sa amorfnim polimerima (PVP, Soluplus[®], HPMC...) potrebno razmotriti dodatak brzo rastvorljivih hidrofilnih polimera (poloksameri, PEG) u cilju postizanja željenog povećanja brzine rastvaranja lekovite supstance.

3.2.6.2.2. Veštačke neuronske mreže

U cilju dobijanja modela koji daje zavisnost između udela komponenata u ternarnim karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstim disperzijama i Q_{10} i Q_{20} , pored eksperimentalnog dizajna smeše, korišćene su i veštačke neuronske mreže tipa višeslojnog perceptrona. Na osnovu vrednosti greške na trening i test setu podataka (Tabela 5), kao odgovarajuća mreža odabrana je veštačka neuronska mreža MLP 13, koja je prikazana na slici 25. Odabrana mreža sadržala je tri neurona u skrivenom sloju, dok je kao aktivaciona funkcija korišćena hiperbolična funkcija. Vrednosti za brzinu učenja od 0,6 i *momentum* od 0,3 pokazale su se kao optimalne. Trodimenzionalni ternarni grafici kojima je predstavljena zavisnost između udela karbamazepina, Soluplus[®]-a i poloksamera 188 u ternarnim čvrstim disperzijama i Q_{10} i Q_{20} , predviđena modelom veštačkih neuronskih mreža tipa višeslojnog perceptrona MLP 13, prikazani su na slici 26. Sa prikazanih grafika jasno se može uočiti da se vrednosti Q_{10} i Q_{20} značajno menjaju sa promenom udela svake pojedinačne komponente čvrste disperzije. Na graficima se može uočiti da vrednosti Q_{10} i Q_{20} rastu sa smanjenjem udela



Slika 25. Šematski prikaz odabranog modela veštačkih neuronskih mreža MLP 13



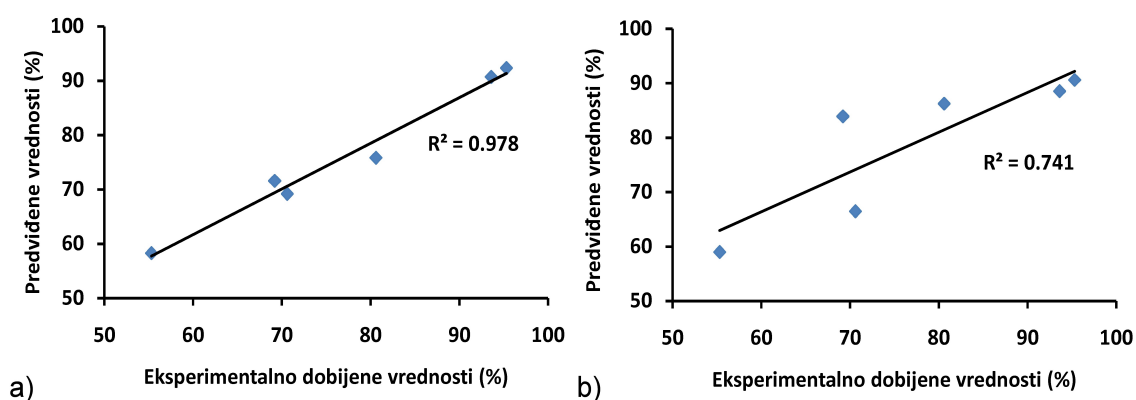
Slika 26. Trodimenzionalni grafik površine odgovora uticaja promene udela karbamazepina (CBZ), Soluplus®-a i poloksamera 188 (P188) u ternarnim čvrstim disperzijama na (a) Q_{10} i (b) Q_{20} , predviđenog modelom veštačkih neuronskih mreža

karbamazepina i povećanjem udela, kako Soluplus®-a, tako i poloksamera 188, što je u saglasnosti sa prethodno navedenim rezultatima dobijenim primenom eksperimentalnog dizajna smeše. Na osnovu izračunatih vrednosti koeficijenta determinacije (eksperimentalne vs. predviđene vrednosti zavisno promenljive) od 0,958 (Q_{10}) i 0,915 (Q_{20}) na trening setu podataka može se zaključiti da dobijeni model dobro opisuje zavisnost između udela komponenata u ternarnim karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstim disperzijama i Q_{10} i Q_{20} . Dobijene vrednosti koeficijenata determinacije su neznatno niže od onih koje su dobijene za modele koju su razvijeni korišćenjem eksperimentalnog dizajna smeše. Ipak, vrednosti koeficijenata determinacije izračunatih na trening setu podataka ne mogu se uzeti kao pouzdan indikator kvaliteta dobijenog modela, jer se sam model razvija upravo na način da se minimizira greška u predviđanju vrednosti zavisno promenljivih u trening setu podataka. Zbog toga dobijene visoke vrednosti koeficijenata determinacije na trening setu podataka mogu zapravo biti artefakt samog procesa učenja mreže i pokazatelj dobijanja preučene mreže. Zato je za procenu sposobnosti predviđanja dobijenih modela korišćen test set podataka koji nije korišćen u razvoju modela. Vrednosti Q_{10} i Q_{20} predviđene korišćenjem modela eksperimentalnog dizajna smeše i veštačkih neuronskih mreža na test setu podataka

Tabela 8. Eksperimentalne i predviđene vrednosti Q_{10} i Q_{20} korišćenjem modela dobijenih primenom veštačkih neuronskih mreža (VNM model) i eksperimentalnog dizajna smeše

Zavisna promenljiva - Q_{10}			
	Eksperimentalne vrednosti (%)	Predviđene vrednosti (VNM model) (%)	Predviđene vrednosti (Eksperimentalni dizajn smeše) (%)
T1	69,2	71,6	83,9
T2	55,3	58,3	59,0
T3	93,6	90,7	88,5

Zavisna promenljiva - Q_{20}			
	Eksperimentalne vrednosti (%)	Predviđene vrednosti (VNM model) (%)	Predviđene vrednosti (Eksperimentalni dizajn smeše) (%)
T1	80,6	75,8	86,3
T2	70,6	69,2	66,5
T3	95,3	92,3	90,6

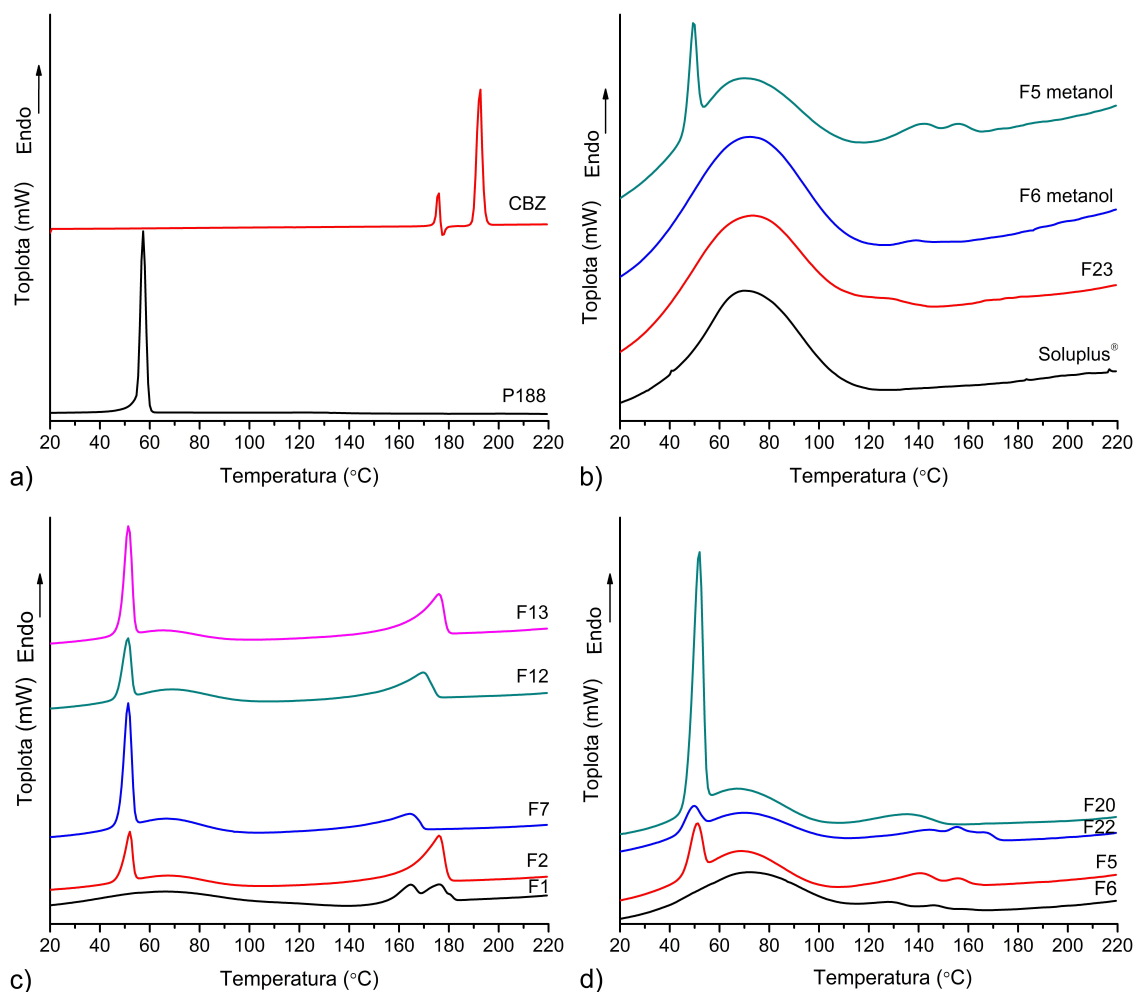


Slika 27. Grafički prikaz korelacije između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti za Q_{10} i Q_{20} (a) modelom veštačkih neuronskih mreža i (b) modelom dobijenim primenom eksperimentalnog dizajna smeše

prikazane su u tabeli 8. Na osnovu grafički prikazanog slaganja eksperimentalno dobijenih vrednosti Q_{10} i Q_{20} (Slika 27) i vrednosti ovih parametara predviđenih korišćenjem navedenih modela (Tabela 8), može se zaključiti da nešto bolju sposobnost predviđanja pokazuje model dobijen primenom veštačkih neuronskih mreža. Dobijene vrednosti koeficijenta determinacije od 0,978 (model veštačkih neuronskih mreža) i 0,741 (modeli dobijen primenom eksperimentalnog dizajna smeše) su pokazale da oba modela dobro opisuju zavisnost između ispitivanih promenljivih, pri čemu model veštačkih neuronskih mreža pokazuje bolju sposobnost predviđanja, što može ukazati na nelinearnu zavisnost između ispitivanih promenljivih. Kako se i primenom eksperimentalnog dizajna smeše dobijaju brojne korisne informacije, koje se ne mogu dobiti primenom veštačkih neuronskih mreža (statistička analiza faktorskih efekata, grafički prikaz uticaja promene udela pojedinačnih komponenata smeše i udela sastava dvokomponentne smeše na vrednosti zavisno promenljivih), kombinacija obe tehnike predstavlja racionalno rešenje u cilju postizanja najboljih rezultata.

3.2.6.3. Fizičko-hemijska karakterizacija odabranih uzoraka ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija

DSC termogrami polaznih supstanci i izrađenih ternarnih čvrstih disperzija prikazani su na slici 28. Na termogramu karbamazepina (Slika 28a) uočavaju se tri karakteristična pika, dva endotermna i jedan egzotermni, što je u skladu sa termogramom polimornog oblika III, koji su prethodno opisali Grzesiak i saradnici (Grzesiak i sar., 2003). Endotermni pik uočen na 175,4°C odgovara topljenju polimornog oblika III karbamazepina i praćen je egzotermnim pikom na 177,2°C usled rekristalizacije polimornog oblika I. Nastali polimorfni oblik I se zatim topi na 191°C, što se manifestuje pojavom endoternog pika na DSC termogramu karbamazepina. Dobro je poznata činjenica da karbamazepin ispoljava enantiotropni polimorfizam, odnosno da postoji određena temperatura prelaza, ispod temperature topljenja polimorfa, na kojoj oba polimorfa imaju istu vrednost slobodne energije. U slučaju karbamazepina temperatura prelaza iznosi 71°C (Behme i Brooke, 1991). Pri temperaturama ispod temperature prelaza stabilniji je polimorfni oblik III, dok je pri temperaturama iznad temperature prelaza, zbog niže vrednosti slobodne energije, stabilniji polimorfni oblik I. Na DSC termogramu poloksamera 188 (Slika 28a) može se



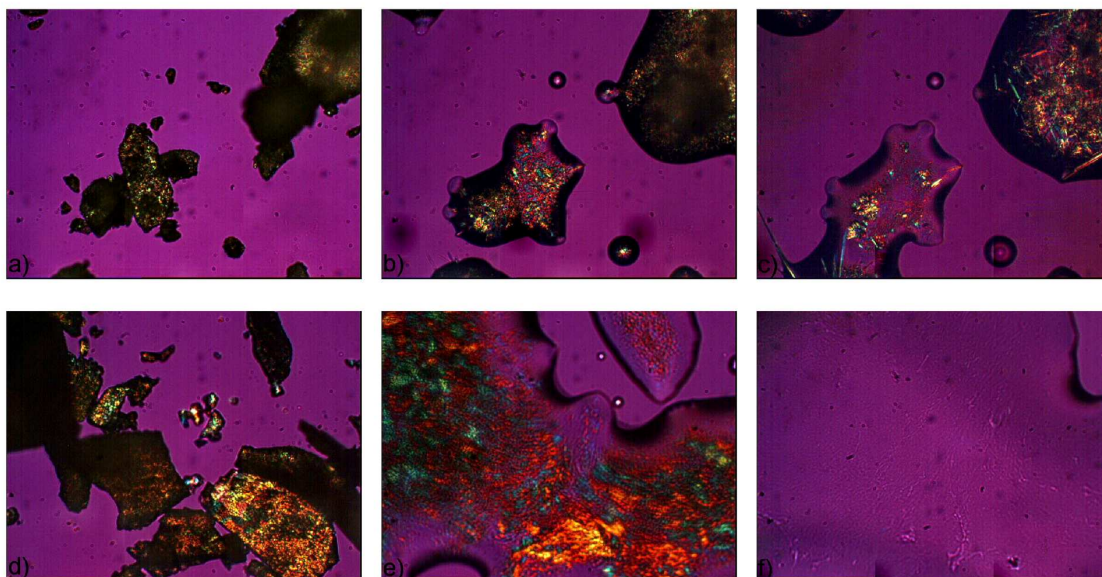
Slika 28 (a-d). DSC termogrami karbamazepina (CBZ), Soluplus[®]-a, poloksamera 188 (P188) i izrađenih čvrstih disperzija

uočiti karakteristični endotermni pik na 56,5°C, koji nastaje kao posledica topljenja ovog semikristalnog polimera. Na DSC termogramu Soluplus[®]-a (Slika 28b) uočava se široka endoterma u temperaturnom intervalu od 43,8 do 130,7°C. Nakon hlađenja, u drugom ciklusu zagrevanja uočena je temperatura staklastog prelaza (T_g) na 61,3°C, dok se široka endoterma iz prvog ciklusa zagrevanja više nije mogla uočiti na termogramu (termogram nije prikazan). Nestanak ove endoterme sa termograma Soluplus[®]-a ukazuje da je njen nastanak posledica uklanjanja vode prisutne u polimeru³, ili relaksacije polimera tokom zagrevanja. Na termogramima svih izrađenih čvrstih disperzija (Slike 28c i 28d) mogu se uočiti endotermni pikovi, koji potiču od topljenja karbamazepina, što ukazuje na kristalnu prirodu karbamazepina u izrađenim čvrstim

³ Prema specifikaciji Soluplus[®] sadrži do 5% vlage

disperzijama. Pikovi koji potiču od topljenja poloksamera 188 uočljivi su na termogramima svih uzoraka čvrstih disperzija, izuzev formulacije F1, koja uopšte ne sadrži poloksamer 188 i formulacije F6, koja sadrži svega oko 1% poloksamera 188. Položaj pikova topljenja karbamazepina na DSC termogramima čvrstih disperzija ukazuje da je u izrađenim čvrstim disperzijama karbamazepin prisutan u termodinamički najstabilnijem polimorfnom obliku III. Na termogramima formulacija koje sadrže niže udele karbamazepina (F1, F5, F6, F7, F20 i F22) može se uočiti da su pikovi topljenja karbamazepina pomereni ka nižim temperaturama, što može ukazati na nizak stepen mešanja karbamazepina sa Soluplus®-om i poloksamerom 188.

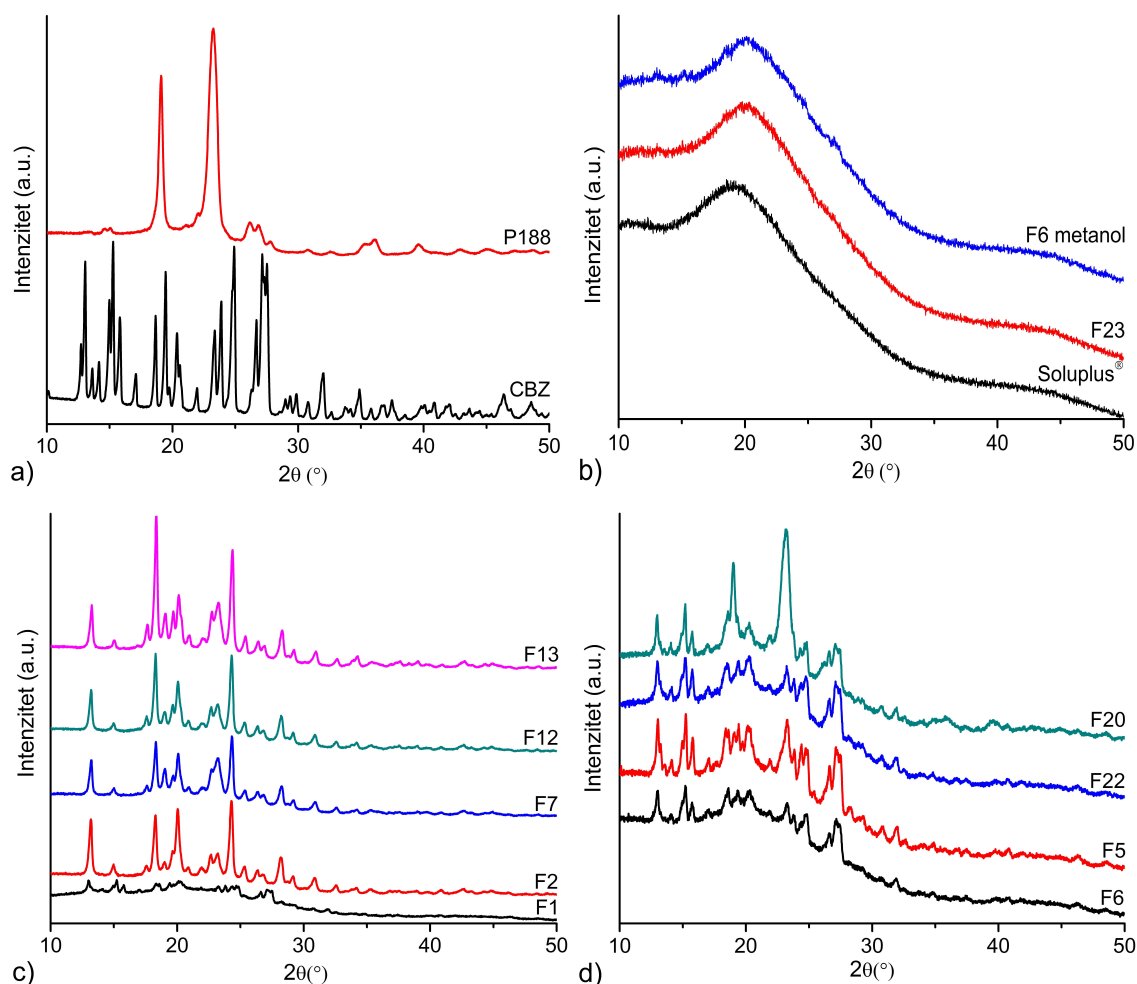
Primenom polarizacione mikroskopije na zagrejanoj ploči, nakon topljenja poloksamera 188, uočena je disperzija kristala karbamazepina unutar amornog matriksa čvrste disperzije. Kako je ova pojava uočena kod svih ispitivanih uzoraka čvrstih disperzija, radi preglednosti prikazane su samo fotomikrografije formulacija F1 (50% karbamazepina, 48,92% Soluplus®-a, 1,08% poloksamera 188) i F7 (34,53% karbamazepina, 45,53% Soluplus®-a, 19,94% poloksamera 188) (Slika 29). Ovim je potvrđeno da je u svim uzorcima čvrstih disperzija karbamazepin prisutan u kristalnom obliku. Na fotomikrografiji formulacije F1, tokom zagrevanja na oko 180°C se uočava pojava igličastih kristala. Ova promena oblika kristala iz prizmatičnog u igličasti može



Slika 29. Fotomikrografije formulacije F1 na (a) 120°C, (b) 170°C i (c) 180°C i formulacije F7 na (d) 120°C, (e) 170°C i (f) 180°C

se pripisati nastanku polimornog oblika I tokom zagrevanja. Prethodno je u literaturi opisano da svi polimorfni oblici karbamazepina prelaze u oblik I tokom zagrevanja (Grzesiak i sar., 2003). Na fotomikrografiji formulacije F7, koja sadrži niži udeo karbamazepina u poređenju sa formulacijom F1, nije uočen nastanak igličastih kristala karbamazepina, već se celokupna količina karbamazepina otopila, ili rastvorila do 180°C.

Na difraktogramu čistog karbamazepina (Slika 30a) mogu se uočiti karakteristični pikovi na 13,04°, 15,26°, 18,64°, 19,46°, 20,34°, 24,89°, 26,64° i 27,18° 2θ , što odgovara prethodno opisanom difraktogramu polimornog oblika III (Grzesiak i sar., 2003). Ovo ukazuje da je karbamazepin koji je korišćen za izradu čvrstih disperzija sadržao polimorfni oblik III. Karakteristični pikovi visokog intenziteta na 19,09° i 23,25° 2θ



Slika 30 (a-d). Difraktogrami karbamazepina (CBZ), Soluplus[®]-a, poloksamera 188 (P188) i izrađenih čvrstih disperzija

mogu se uočiti na difraktogramu poloksamera 188 (Slika 30a). Uočeni oštri pikovi na difraktogramu poloksamera 188 predstavljaju pokazatelj kristalnih domena koji su inkorporirani unutar amornog matriksa poloksamera. Ispitivanjem Soluplus[®] polimera dobijen je tkzv. oreol tip difraktograma, bez oštih pikova (Slika 30b). Ovakav tip difraktograma predstavlja posledicu amorfne strukture Soluplus[®] polimera. Na difraktogramima uzoraka čvrstih disperzija (Slike 30c i 30d) uočavaju se gotovo svi pikovi koji su prethodno zabeleženi na difraktogramu čistog karbamazepina, što predstavlja dokaz kristalne prirode karbamazepina u svim ispitivanim uzorcima čvrstih disperzija. Nepromenjena pozicija pikova karbamazepina na difraktogramima čvrstih disperzija ukazuje da tokom izrade čvrstih disperzija nije došlo do polimorfnih prelaza karbamazepina.

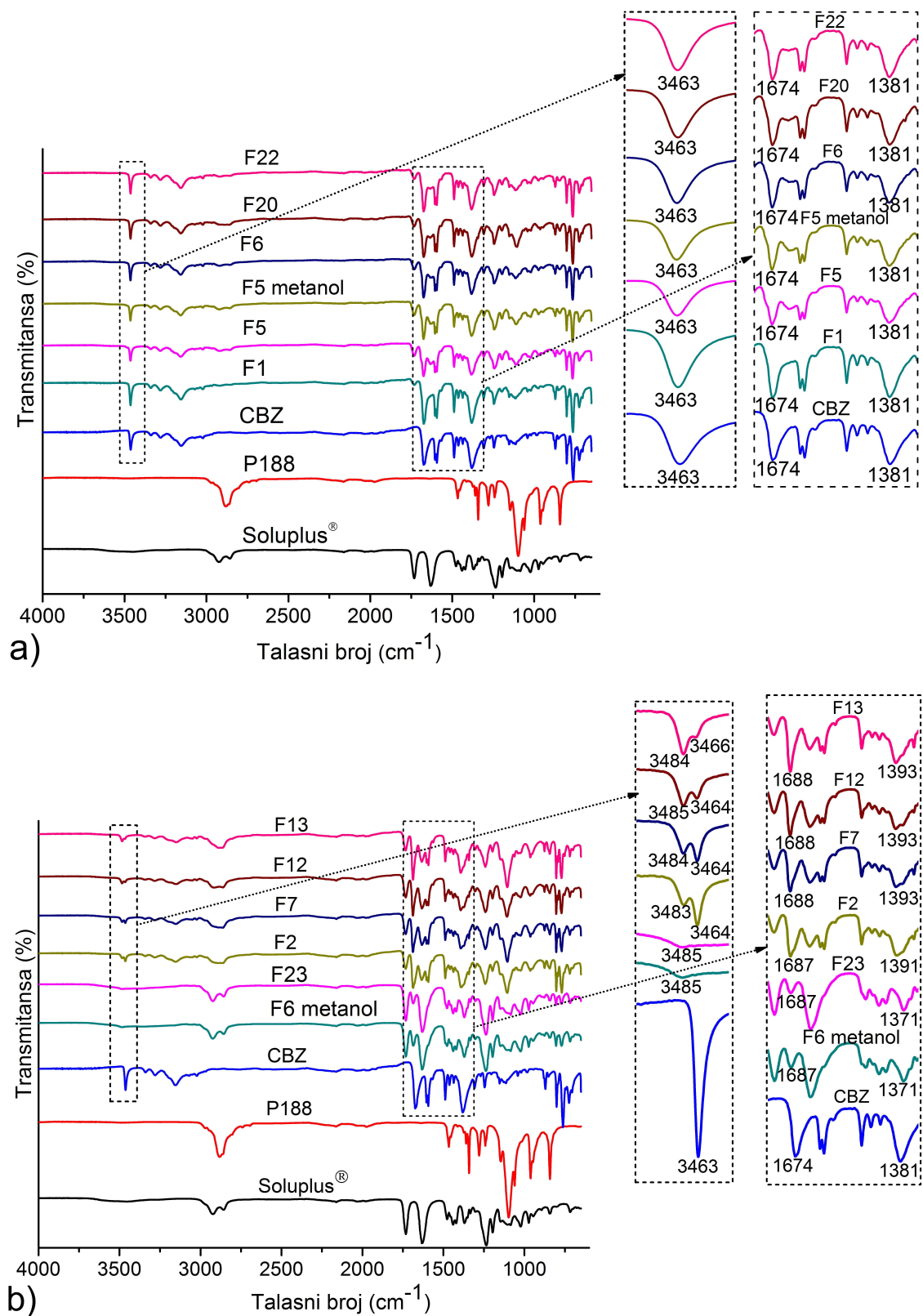
Na osnovu rezultata diferencijalne skenirajuće kalorimetrije, difrakcije X-zraka na prašku i polarizacione mikroskopije na zagrejanoj ploči može se zaključiti da je u svim ispitivanim uzorcima čvrstih disperzija karbamazepin zastupljen u kristalnom, ili je barem delimično prisutan u kristalnom obliku. Dobijeni rezultati ukazuju da tokom uparavanja etanolnih rastvora prilikom izrade čvrstih disperzija dolazi do kristalizacije karbamazepina i poloksamera 188. U prethodnom ispitivanju (Lim i sar., 2012) pokazano je da se prilikom formulacije binarnih karbamazepin-Soluplus[®] čvrstih disperzija, potpuno amorfne čvrste disperzije mogu dobiti pri udelima karbamazepina do 25%, pri čemu su navedene binarne čvrste disperzije izrađivane uparavanjem metanolnih rastvora. Ipak, u nedavno sprovedenom ispitivanju, Đuriš i saradnici su zaključili da u slučaju ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 407 čvrstih disperzija izrađenih ekstruzijom topljenjem, svega do 5% karbamazepina može biti rastvoreno unutar matriksa čvrstih disperzija (Đuriš i sar., 2014b). Kako je u svim izrađenim ternarnim karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstim disperzijama zabeleženo prisustvo kristalnog karbamazepina, na ovaj način nije moguće odrediti najvišu koncentraciju karbamazepina, pri kojoj se mogu dobiti čvrste disperzije u kojima je lekovita supstanca zastupljena u amornom obliku. Jedino je sigurno da je ta koncentracija ispod 20%. Kako bi se utvrdila najviša koncentracija karbamazepina, pri kojoj je moguće dobiti amorfne čvrste disperzije, primenom prethodno opisanog postupka izrađena je formulacija F23, koja je sadržala 15% karbamazepina i 85% Soluplus[®]-a. Dobijeni uzorci su zatim podvrgnuti fizičko-hemijskoj karakterizaciji

primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i difrakcije X-zraka na prašku, kako bi se utvrdilo fizičko stanje karbamazepina u čvrstoj disperziji. Odsustvo pikova topljenja karbamazepina na DSC termogramu uz odsustvo pikova karbamazepina na odgovarajućem difraktogramu izrađene formulacije (Slike 28b i 30b) pokazuje da je u izrađenoj formulaciji karbamazepin zastupljen u amorfnom obliku u matriksu čvrstih disperzija. Na osnovu ovoga se može reći da do oko 15% karbamazepina može biti dispergovano u amorfnom obliku unutar matriksa čvrste disperzije koji sadrži amorfni Soluplus[®] polimer. Uključivanjem poloksamera 188 u sastav čvrstih disperzija može dodatno ubrzati tendenciju karbamazepina ka kristalizaciji. Naime kristali poloksamera 188 mogu delovati kao jezgra, koja ubrzavaju nukleaciju i posledičnu kristalizaciju karbamazepina. Takođe, sam poloksamer 188 deluje kao plastifikator povećavajući slobodnu zapreminu između polimernih lanaca Soluplus[®]-a, čime se snižava temperatura staklastog prelaza ovog polimera i olakšava rekristalizacija karbamazepina tokom izrade čvrstih disperzija.

Izbor rastvarača koji se koristi u izradi čvrstih disperzija može veoma uticati na strukturu dobijenih disperzija. Poznato je da se primenom etanola ostvaruje sporije uparavanje rastvarača u odnosu na metanol, što se može zaključiti na osnovu znatno niže vrednosti pritiska pare etanola (59 hPa) u odnosu na metanol (128 hPa). Kako bi se ispitao uticaj vrste rastvarača na strukturu izrađenih čvrstih disperzija, izrađena je formulacija F6_{metanol} istog kvalitativnog i kvantitativnog sastava kao i formulacija F6 (20% karbamazepin, 80% Soluplus[®]), uz korišćenje metanola kao rastvarača. Kako je za uparavanje metanola dovoljna i niža temperatura, uparavanje je vršeno na 50°C. Na osnovu odsustva pikova topljenja karbamazepina na DSC termogramu i odsustva karakterističnih pikova karbamazepina na difraktogramu izrađene formulacije (Slike 28b i 30b) može se izvesti zaključak da je u izrađenoj formulaciji karbamazepin prisutan u amorfnom obliku. Kako bi se ispitala mogućnost izrade amorfnih ternarnih čvrstih disperzija karbamazepina sa Soluplus[®]-om i poloksamerom 188, uz korišćenje metanola kao rastvarača, izrađena je formulacija F5_{metanol}. Ova formulacija je izrađena u istom kvalitativnom i kvantitativnom sastavu, kao i formulacija F5, uz korišćenje metanola kao rastvarača i uparavanje na temperaturi od 50°C. Primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i difrakcije X-zraka pokazano je da je u izrađenoj formulaciji karbamazepin prisutan u kristalnom obliku (Slike 28b i 30b). Ipak, zabeleženi niži

intenziteti pikova na difraktogramima ove formulacije ukazuju na niži stepen kristaliniteta karbamazepina u disperziji izrađenoj korišćenjem metanola, u poređenju sa disperzijom istog sastava izrađenom korišćenjem etanola. Na osnovu dobijenih rezultata može se izvesti zaključak da izbor rastvarača znatno utiče na strukturu izrađenih binarnih karbamazepin-Soluplus[®] i ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija. Primena metanola omogućava izradu amorfnih čvrstih disperzija sa višim sadržajem lekovite supstance, usled bržeg isparavanja metanola, čime se skraćuje vreme raspoloživo za kristalizaciju lekovite supstance.

Dobro je poznato da lek-polimer interakcije mogu imati značajan uticaj na stabilizaciju amorfnog oblika lekovite supstance u matriksu čvrste disperzije. Kako bi se utvrdilo postojanje lek-polimer interakcija u izrađenim ternarnim čvrstim disperzijama, vršeno je ispitivanje uzoraka primenom FT-IR spektroskopije i dobijeni spektri polaznih materijala i izrađenih čvrstih disperzija prikazani su na slici 31. Na spektru karbamazepina se mogu uočiti karakteristične apsorpcione trake na 3463 cm^{-1} (-NH valencione vibracije), 1674 cm^{-1} (-CO-R vibracije), 1593 i 1605 cm^{-1} (-C=C- i -C=O vibracije i -NH deformacije), 1381 i 1245 cm^{-1} . Dobijeni spektar u potpunosti odgovara prethodno opisanom spektru polimorfnog oblika III karbamazepina, koji su prethodno opisali Rustichelli i saradnici (Rustichelli i sar., 2000). Ovim su potvrđeni rezultati diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i difrakcije X-zraka na prašku da je karbamazepin koji je korišćen u ispitivanju sadržao polimorfni oblik III. Na FT-IR spektru Soluplus[®]-a uočava se široka traka na oko 3500 cm^{-1} (O-H istezanje), 2924 cm^{-1} (istezanje alifatične -C-H grupe), 1732 i 1632 cm^{-1} (-C=O istezanje), 1235 i 1196 cm^{-1} (istezanje -C-O estarske grupe) (Shamma i Basha, 2013), dok se na spektru poloksamera 188 uočavaju karakteristične apsorpcione trake na 2883 cm^{-1} (-C-H istezanje) i 1096 cm^{-1} (-C-O istezanje) (Shah i sar., 2007). Svi karakteristični pikovi karbamazepina se mogu uočiti na istim pozicijama na spektrima formulacija F1, F5, F5_{metanol}, F6, F20 i F22 (Slika 31a), što ukazuje na odsustvo lekovita supstanca-matriks interakcija kod ovih formulacija. Karakterističan pik karbamazepina na 3463 cm^{-1} je teško uočljiv na FT-IR spektrima formulacija F6_{metanol} i F23 (za koje je prethodno pokazano da sadrže karbamazepin u amorfnom obliku) usled preklapanja sa širokom apsorpcionom trakom Soluplus[®]-a na oko 3500 cm^{-1} (Slika 31b). I pored toga,



Slika 31 (a-b). FT-IR spektri karbamazepina (CBZ), Soluplus®-a, poloksamera 188 (P188) i izrađenih čvrstih disperzija

može se uočiti pomeranje ovog pika sa 3463 na 3485 cm^{-1} . Na spektrima navedene dve formulacije takođe se može uočiti pomeranje pikova karbamazepina sa 1674 i 1381 cm^{-1} na 1687 i 1371 cm^{-1} . Na spektrima formulacija F2, F7, F12, F13 (Slika 31b) može se uočiti da je pik karbamazepina na 3463 cm^{-1} podeljen na dva pika koji od kojih se prvi nalazi u intervalu od 3464-3466 cm^{-1} , a drugi u intervalu od 3483-3485 cm^{-1} . Na ovim spektrima se takođe mogu uočiti pomeranja pikova karbamazepina sa 1674 i 1381 cm^{-1} na 1687-1688 cm^{-1} i 1391-1393 cm^{-1} . Uočena pomeranja pikova ukazuju na postojanje intermolekulskih interakcija između karbamazepina i polimera korišćenih u izradi čvrstih disperzija. Kako su uočena pomeranja pikova karbamazepina, koji su karakteristični za amidnu funkcionalnu grupu, može se pretpostaviti da dolazi do formiranja vodoničnih veza između karbamazepina i komponenti matriksa čvrstih disperzija. Kako u slučaju formulacija F6_{metanol} i F23 nije došlo do kristalizacije karbamazepina, može se pretpostaviti da intermolekulske interakcije između karbamazepina i komponenti matriksa čvrstih disperzija mogu stabilizovati amorfni oblik lekovite supstance u čvrstim disperzijama. Ipak, i pored prisustva intermolekulskih interakcija, kod formulacija F2, F7, F12, F13 došlo je do kristalizacije karbamazepina, što ukazuje da intermolekulske interakcije same po sebi ne mogu biti presudan faktor koji može da spreči kristalizaciju karbamazepina prilikom izrade ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija.

Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz ternarnih čvrstih disperzija zajedno sa rezultatima fizičko-hemijske karakterizacije potvrdili su da nastanak amornog oblika karbamazepina nije neophodan preduslov za povećanje brzine rastvaranja iz izrađenih ternarnih čvrstih disperzija. Uprkos tome što je kod svih uzoraka čvrstih disperzija, na kojima je vršeno ispitivanje brzine rastvaranja, karbamazepin bio zastupljen u kristalnom obliku, postignuto je značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina. Stoga nije moguće uspostaviti korelaciju između fizičkog stanja karbamazepina i njegove brzine rastvaranja iz izrađenih ternarnih čvrstih disperzija. Tako se povećanje brzine rastvaranja karbamazepina koje se postiže formulacijom navedenih ternarnih čvrstih disperzija može objasniti smanjenjem veličine kristala karbamazepina prilikom rekristalizacije iz etanolnih rastvora, smanjenjem aglomeracije čestica karbamazepina usled njihove homogene raspodele unutar matriksa čvrstih disperzija, poboljšanim kvašenjem i solubilizacijom molekula lekovite supstance

molekulima primenjenih površinski aktivnih supstanci (Soluplus[®], poloksamer 188). Kako je uporednim ispitivanjem brzine rastvaranja formulacije čvrstih disperzija i fizičke smeše identičnog sastava zabeleženo znatno brže oslobađanje karbamazepina iz formulacije čvrstih disperzija (Slika 22), može se zaključiti da su i drugi mehanizmi, pored poboljšanog kvašenja i solubilizacije lekovite supstance značajni za povećanje brzine rastvaranja karbamazepina. Može se pretpostaviti da tokom uparavanja etanolnih rastvora dolazi do kristalizacije karbamazepina u obliku kristala manje veličine, pošto viskozni polimeri koji čine matriks čvrstih disperzija mogu usporiti rast kristala. Izradom čvrstih disperzija omogućava se blizak kontakt između hidrofilnih polimera i čestica karbamazepina, što nije moguće postići jednostavnim mešanjem komponenata. Na taj način se površina hidrofobnih čestica karbamazepina čini više hidrofilnom, čime se povećava brzina rastvaranja. Kod samo dve izrađene formulacije ternarnih čvrstih disperzija uočen je inicijalni pad brzine rastvaranja karbamazepina, koji može predstavljati posledicu nastanka teško rastvorljivog dihidratnog oblika karbamazepina. Tako inhibicija prelaska anhidrovanog u dihidratni oblik karbamazepina može predstavljati još jedan od mehanizama kojima se objašnjava povećanje brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija.

3.3. Formulacija i karakterizacija binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema

U ovoj fazi istraživanja ispitivana je mogućnost primene karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin binarnih i karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer ternarnih sistema u cilju povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. U prvom delu istraživanja vršena je procena solubilizacionog kapaciteta hidroksipropil- β -ciklodekstrina za karbamazepin i mogućnosti povećanja solubilizacionog kapaciteta i efikasnosti kompleksiranja u sistemu karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin dodatkom malih količina hidrofilnih polimera (Soluplus[®], polivinilpirolidon K25-Kollidon[®] 25 i dva tipa hidroksipropilmetilceluloze različitog stepena supstitucije i viskoziteta-Metolose[®] 90SH-100 i Metolose[®] 65SH-1500). Simulacija molekularnog vezivanja karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina, u kombinaciji sa simulacijom molekularne dinamike korišćena je kako bi se stekao bolji uvid u interakcije između karbamazepina, hidroksipropil- β -ciklodekstrina i hidrofilnih polimera na molekulskom nivou. Nakon sprovedenih navedenih preformulacionih istraživanja, binarni karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarni karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistemi su izrađivani tehnikom sušenja raspršivanjem iz vodenih rastvora. Na dobijenim uzorcima vršena je fizičko-hemijska karakterizacija primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije, polarizacije mikroskopije na zagrejanoj ploči, difrakcije X-zraka na prašku, FT-IR spektroskopije i skenirajuće elektronske mikroskopije u cilju procene promene fizičko-hemijskih karakteristika karbamazepina usled interakcija sa hidroksipropil- β -ciklodekstrinom i/ili hidrofilnim polimerom. Pored toga, na dobijenim uzorcima vršeno je i ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina. Sve metode karakterizacije uporedno su sprovedene i na fizičkim smešama istovetnog sastava.

3.3.1. Materijali

Za izradu binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema korišćeni su karbamazepin (Ph Eur 8.0, Galenika AD, Beograd, Srbija), kao model teško rastvorljive lekovite supstance, hidroksipropil- β -ciklodekstrin, molarnog stepena supstitucije 4,8

(Nihon Shokuhin Kako Co., LTD, Tokyo, Japan), polietilenglikol-polivinilkaprolaktam-polivinilacetat graft kopolimer (Soluplus[®], BASF, Ludwigshafen, Nemačka), polivinilpirolidon K25 (Kollidon[®] 25, BASF, Ludwigshafen, Nemačka) i dva tipa hidroksipropilmetilceluloze različitog stepena supstitucije i viskoziteta-Metolose[®] 90SH-100, viskoziteta 100 mPa·s i Metolose[®] 65SH-1500, viskoziteta 1500 mPa·s (Shi-Etsu Chemical Co. Ltd, Tokyo, Japan).

3.3.2. Ispitivanje fazne rastvorljivosti

Ispitivanje fazne rastvorljivosti je vršeno sa ciljem procene efikasnosti solubilizacije karbamazepina sa dodatkom hidroksipropil- β -ciklodekstrina, procene stehiometrije kompleksa i efikasnosti kompleksiranja u karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin sistemu, kao i uticaja dodatka male količine hidrofilnog polimera na solubilizaciju karbamazepina hidroksipropil- β -ciklodekstrinom i efikasnost kompleksiranja. Ispitivanje fazne rastvorljivosti vršeno je po metodi koju su opisali Higuchi i Connors (Higuchi i Connors, 1965). Višak karbamazepina je dodavan vodenim rastvorima koji su sadržali rastuće koncentracije hidroksipropil- β -ciklodekstrina (0-40% m/V) i nakon 48 h mešanja na mešalici (IKA KS 260 basic, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemačka), uzorci su filtrirani i njihova apsorbancija je merena na Evolution 300 UV-Vis spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na talasnoj dužini od 285 nm. Koncentracija rastvorenog karbamazepina računata je iz prethodno određene jednačine kalibracione krive. Ispitivanje fazne rastvorljivosti je na isti način vršeno i u vodenim rastvorima sa 0,1-1,0% (m/V) hidrofilnih polimera (Soluplus[®], Kollidon[®] 25, Metolose[®] 90SH-100 i Metolose[®] 65SH-1500), kao i u 10% (m/V) rastvoru hidroksipropil- β -ciklodekstrina uz dodatak 0,1-1,0% (m/V) ispitivanih hidrofilnih polimera. Nakon odabira odgovarajuće koncentracije hidrofilnog polimera, koja dovodi do optimalnog povećanja solubilizacionog kapaciteta hidroksipropil- β -ciklodekstrina za karbamazepin, ispitivanje fazne rastvorljivosti je sprovedeno u vodenim rastvorima sa 0-40% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina uz dodatak odabrane koncentracije hidrofilnog polimera. Dijagramom fazne rastvorljivosti grafički je predstavljena promena rastvorljivosti karbamazepina sa porastom koncentracije hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Sva ispitivanja su vršena u duplikatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Na osnovu vrednosti nagiba

dijagrama fazne rastvorljivosti vršena je procena stehiometrije karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin kompleksa. Konstanta stabilnosti (K_s) nastalog kompleksa, efikasnost kompleksiranja (CE) u sistemu karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer računati su korišćenjem jednačina (10) i (11) navedenih u uvodnom delu rada.

3.3.3. Molekularno modelovanje

3.3.3.1. Simulacija molekularnog vezivanja karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina (eng. *molecular docking simulation*)

Simulacija molekularnog vezivanja karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina vršena je korišćenjem AutoDock Vina softvera koji se zasniva na korišćenju gradijentnog optimizacionog algoritma u cilju predviđanja konformacije molekula u vezanom stanju i slobodne energije vezivanja (Trott i Olson, 2010). Početne koordinate koje odgovaraju kristalnoj strukturi karbamazepina preuzete su iz baze podataka *Cambridge Structural Database (CSD)* (CSD Ref CBMZPN10). Pošto je zbog velikog broja izomera supstituisanih ciklodekstrina praktično nemoguće simulirati interakciju karbamazepina sa svim mogućim izomerima hidroksipropil- β -ciklodekstrina, za simulaciju je odabran jedan izomer hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Odabrani izomer sadrži sedam 2-hidroksipropil supstituenata, od kojih su četiri vezana za O6 atom kiseonika, koji predstavlja najreaktivnije mesto u molekulu, dok su preostala tri supstituenta vezana za O2 atom kiseonika, koji predstavlja drugo najreaktivnije mesto u molekulu (Gramera i Caimi, 1969). Početna geometrija svih struktura je optimizovana pre izvođenja simulacije korišćenjem AMMP polja sile, modula koji je u sklopu VegaZZ programskog paketa za molekularno modelovanje (Pedretti i sar., 2002). Zatim su spojeni nepolarni atomi vodonika, dodeljena Kolmanova naelektrisanja objedinjenog atoma⁴ i solvatacioni parametri uz pomoć *AutoDock tools* softvera (Morris i sar., 1998). Stabilnost nastalih kompleksa je procenjivana na osnovu vrednosti konstante vezivanja između karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina, kao i energije interakcije, raščlanjene na komponente koje potiču od nevezivnih i elektrostatičkih interakcija. Za

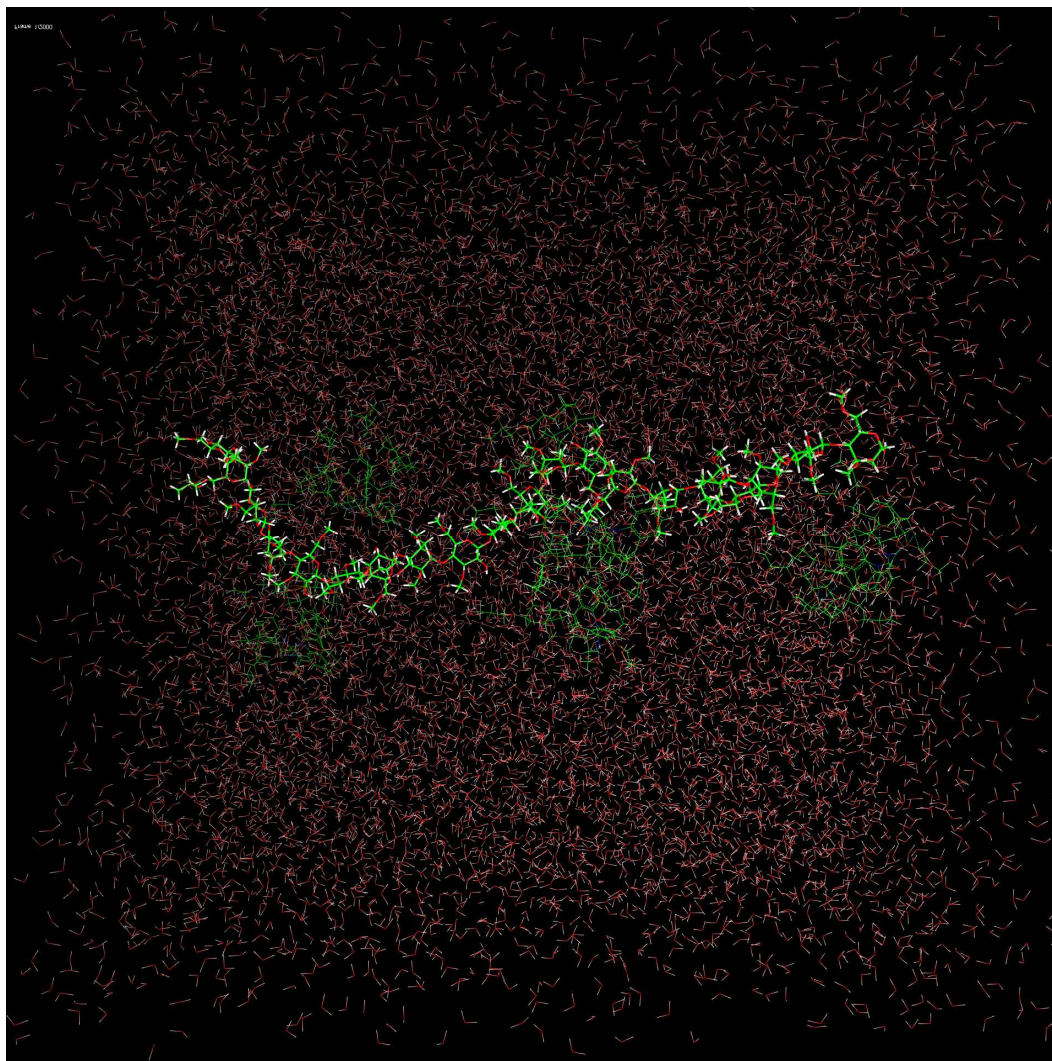
⁴ Objedinjeni atom (često se naziva i pseudo atom) predstavlja aproksimativnu česticu koju čini grupa atoma i kojom se aproksimiraju molekularno mehaničke osobine ove grupe atoma na supraatomskom nivou.

procenu stabilnosti nastalih kompleksa korišćen je i parametar *Molecular Lipophilicity Potential Interaction score (MLPIs)*, koji odslikava intermolekulske sile odgovorne za lipofilne osobine molekula na konformaciono zavistan način (Gaillard et al., 1994).

3.3.3.2. Simulacija molekularne dinamike

Simulacija molekularne dinamike je primenjena kako bi se stekao bolji uvid u mehanizam interakcija između karbamazepina, hidroksipropil- β -ciklodekstrina i hidroksipropilmetilceluloze na molekularnom nivou. U ćeliju za simulaciju kubnog oblika sa vodom, dužine stranice 80 Å, smešten je oligomer hidroksipropilmetilceluloze sastavljen od 20 monomera, koji je okružen sa pet karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin kompleksa, koji su identifikovani kao najstabilniji tokom simulacije molekularnog vezivanja između karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina (Slika 32).

Pre izvođenja simulacije sistem je prvo podvrgnut zagrevanju do 300 K, u intervalima od 100 K na svakih 5 ps i zatim je izvršena ekvilibracija sistema tokom 50 ps. Nakon toga je vršena simulacija molekularne dinamike, pri konstantnoj zapremini i temperaturi, u trajanju od 2 ns, sa veličinom koraka od 1 fs za kovalentne interakcije, 2 fs za Van der Waalsove interakcije i 4 fs za elektrostatičke interakcije između atoma. Modifikovani impulsni metod (MOLLY metod) je primenjen kako bi se smanjila rezonanca X-H veze, u kombinaciji sa SHAKE algoritmom, koji omogućava održavanje konstantne O-H veze na osnovu r-RESPA metoda (Tuckerman i sar., 1992). Za izračunavanje energija interakcija u sistemu korišćeni su CHARMM parametri polja sile u kombinaciji sa *Gasteiger* naelektrisanjima atoma (Momany i Rone, 1992). Za izračunavanje elektrostatičkih interakcija korišćen je *Particle-Mesh Ewald* (PME) metod sa veličinom čestične mreže od 80x80x80 Å. Različite konformacije molekula su konstruisane pomoću VegaZZ programskog paketa za molekularno modelovanje (Pedretti i sar., 2002), dok je hidratisana ćelija za simulaciju konstruisana uz pomoć Packmol softvera, a sama simulacija molekularne dinamike je vršena korišćenjem NAMD softvera (Phillips i sar., 2005). VMD softver je korišćen za evaluaciju trajektorija čestica dobijenih primenom simulacije molekularne dinamike (Humphrey i sar., 1996).



Slika 32. Početna konfiguracija ćelije za simulaciju molekularne dinamike dimenzija $80 \times 80 \times 80$ Å sa karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin kompleksima i oligomerom hidroksipropilmetilceluloze

3.3.4. Izrada binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema

Binarni karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarni karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistemi izrađivani su sušenjem raspršivanjem, prema sastavu koji je odabran na osnovu rezultata ispitivanja fazne rastvorljivosti (Tabela 9). Svi rastvori koji su podvrgnuti sušenju raspršivanjem sadržali su 10% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina, uz dodatak odabrane koncentracije hidrofilnog polimera. Sušenje raspršivanjem pripremljenih vodenih rastvora vršeno je na uređaju Büchi Minispray Dryer B-191 (Büchi Labortechnik AG, Flawil,

Švajcarska), pri sledećim vrednostima procesnih parametara, definisanim u preliminarnim eksperimentima: temperatura ulaznog vazduha 135°C, temperatura izlaznog vazduha 83-84°C, brzina protoka vazduha 600 L/h, aspirator 100% i brzina pumpe 15% (4,32 ml/min). U cilju poređenja fizičko-hemijskih karakteristika, fizičke smeše (CD1PM-CD4PM), istovetnog sastava kao formulacije izrađene sušenjem raspršivanjem, izrađene su mešanjem sastavnih komponenata u tarioniku uz pomoć pistila.

Tabela 9. Kvalitativni i kvantitativni sastav binarnih i ternarnih formulacija izrađenih sušenjem raspršivanjem (karbamazepin-CBZ, hidroksipropil- β -ciklodekstrin-HPBCD)

Formulacija	CBZ:HPBCD:hidrofilni polimer (maseni odnos)	Hidrofilni polimer
CD1	1,35:16:0,15	Soluplus [®]
CD2	1,35:16:0,30	Metolose [®] 90SH-100
CD3	1,35:16:0,30	Metolose [®] 65SH-1500
CD4	0,9:16	Bez dodatka hidrofilnog polimera

3.3.5. Fizičko-hemijska karakterizacija izrađenih binarnih i ternarnih sistema

Fizičko-hemijska karakterizacija izrađenih binarnih i ternarnih sistema vršena je sa ciljem praćenja promena fizičko-hemijskih karakteristika karbamazepina usled interakcija sa hidroksipropil- β -ciklodekstrinom i/ili hidrofilnim polimerom u izrađenim binarnim i ternarnim sistemima.

3.3.5.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija ispitivanih uzoraka je vršena na uređaju DSC 1 (Mettler-Toledo, Giessen, Nemačka). Precizno odmerena masa uzorka između 3 i 6 mg, u aluminijskoj posudi zapremine 40 μ l, podvrgnuta je zagrevanju od 20 do 220°C, brzinom od 10°C/min. Zatim je vršeno hlađenje do 20°C, brzinom od 20°C/min i na kraju ponovno zagrevanje do 220°C, brzinom od 10°C/min. U toku svih analiza, održavan je konstantan protok azota od 70 ml/min, a prazna aluminijska posuda je korišćena kao referentna. Sve analize su vršene u duplikatu.

3.3.5.2. Difrakcija X-zraka na prašku

Difrakcija X-zraka na prašku vršena je sa ciljem procene fizičkog stanja karbamazepina u izrađenim binarnim i ternarnim sistemima. Za ispitivanja uzoraka korišćen je X'Pert Pro MPD difraktometar (Panalytical, Almelo, Holandija). Uzorci su snimani u opsegu 2θ uglova od 10 do 50° korišćenjem Cu K α izvora zračenja ($\lambda=1,5406$ Å), sa veličinom koraka od 0,017° i vremenom zadržavanja od 30 s po koraku, pri naponu od 40 kV i jačini struje od 40 mA. Sva ispitivanja su vršena u duplikatu.

3.3.5.3. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

FT-IR spektroskopijom je procenjivano prisustvo intermolekulskih interakcija između molekula karbamazepina, hidroksipropil- β -ciklodekstrina i eventualno dodatih hidrofilnih polimera. Za ispitivanja je korišćen FT-IR spektrometar Nicolet iS10 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD), opremljen ATR sistemom (Smart iTR, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD). Spektri ispitivanih uzoraka su snimani u intervalu od 4000 do 650 cm⁻¹, sa rezolucijom od 4 cm⁻¹, pri čemu je vršeno 16 skeniranja za svaki spektar.

3.3.5.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Oblik, veličina i površinska morfologija čestica polaznih materijala, fizičkih smeša i binarnih i ternarnih sistema dobijenih sušenjem raspršivanjem ispitivani su primenom skenirajuće elektronske mikroskopije na uređaju Phenom G2 Pro (Phenom-World BV, Holandija), pri naponu od 5 kV. Uzorci su fiksirani na nosač uz pomoć dvostruko lepljive adhezivne trake i fotomikrografije su beležene pri uvećanjima od 520-11500 puta.

3.3.5.5. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz binarnih i ternarnih sistema

In vitro ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina vršeno je korišćenjem aparature sa rotirajućim lopaticama (Erweka DT600, Heusenstamm, Nemačka), u toku 1 h, pri brzini okretanja lopatica od 75 o/min. Kao medijum za ispitivanje korišćeno je 900 ml prečišćene vode. U prethodno definisanim vremenskim intervalima (5, 10, 15,

20, 30, 45 i 60 minuta) uzimano je 4 ml uzorka, nakon čega je vršena nadoknada istom zapreminom svežeg medijuma. Nakon filtriranja, merena je apsorbancija uzoraka na 285 nm na Evolution 300 UV/Vis spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), a koncentracija rastvorenog karbamazepina je izračunavana na osnovu jednačine kalibracione krive. Rezultati su prikazani kao procenat rastvorenog karbamazepina, u odnosu na deklarisan sadržaj karbamazepina u uzorcima u toku vremena ispitivanja. Ispitivanja su vršena u triplicatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

3.4. Rezultati i diskusija

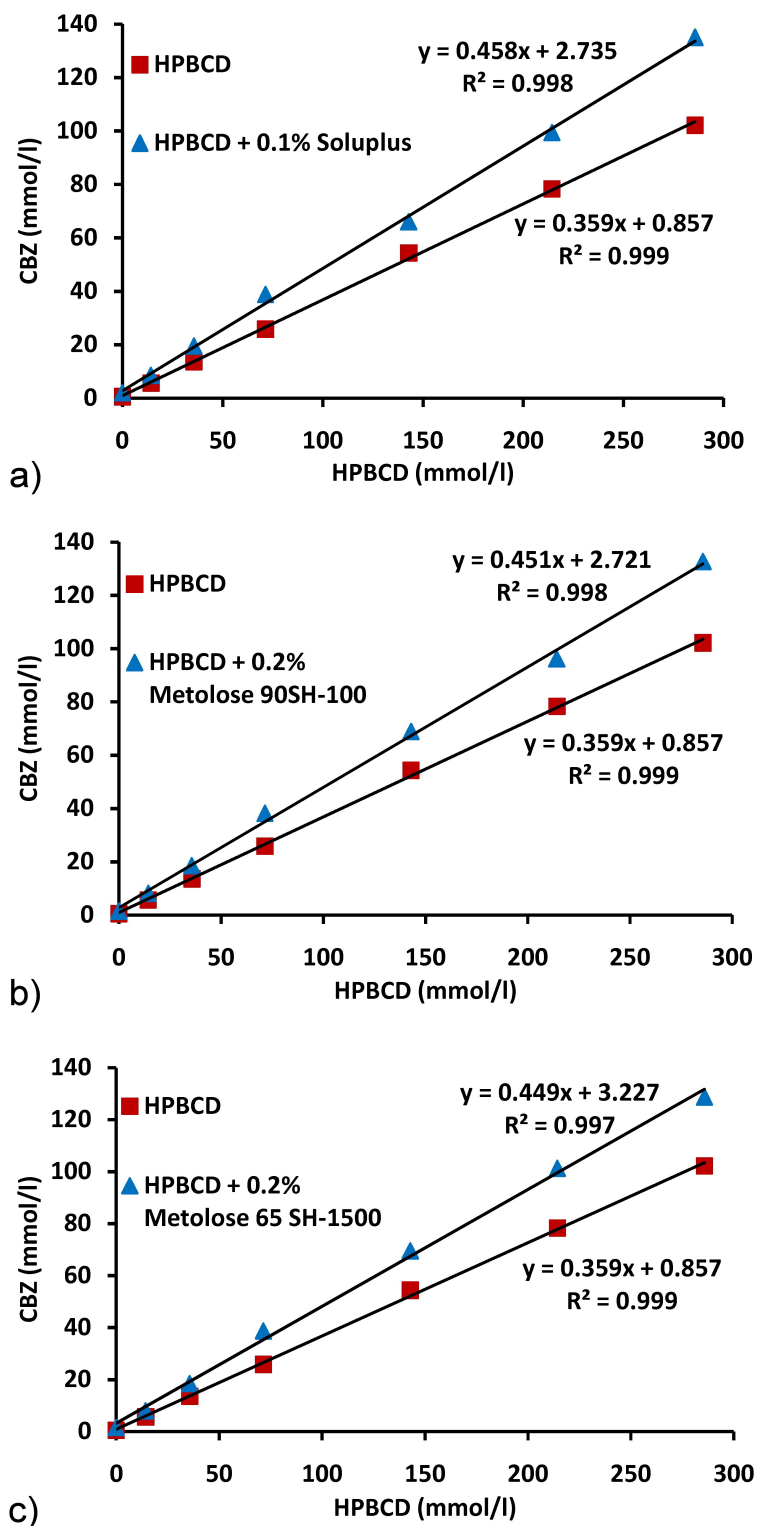
3.4.1. Ispitivanje fazne rastvorljivosti

Dobijeni rezultati ispitivanja fazne rastvorljivosti pokazali su da je primena hidroksipropil- β -ciklodekstrina efikasan način za povećanje rastvorljivosti karbamazepina. Pri rasponu koncentracija od 0 do 40% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina, zabeležen je porast rastvorljivosti karbamazepina od 0,56 do 102,20 mmol/l (Tabela 10). Tako je dodatak 2% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina doveo do porasta rastvorljivosti karbamazepina od oko 10 puta u odnosu na vodeni medijum, dok je dodatkom 40% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina ostvaren porast rastvorljivosti karbamazepina od čak 180 puta u odnosu na rastvorljivost u vodi. Na osnovu rezultata ispitivanja fazne rastvorljivosti, konstruisan je dijagram fazne rastvorljivosti (Slika 33) sa koga se može uočiti da rastvorljivost karbamazepina linearno raste sa porastom koncentracije hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Ovako dobijeni linearni dijagram fazne rastvorljivosti ($R^2=0,999$) može se klasifikovati kao A_L tip dijagrama (Higuchi i Connors, 1965) i on ukazuje na formiranje kompleksa između karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina koji su prvog reda u odnosu na ciklodekstrin. Kako je nagib dobijenog dijagrama manji od 1, može se pretpostaviti da dolazi do formiranja karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin kompleksa u stehiometrijskom odnosu 1:1. Kou i saradnici su prethodno takođe zabeležili da karbamazepin i hidroksipropil- β -ciklodekstrin grade kompleks u stehiometrijskom odnosu 1:1 (Kou i sar., 2011). Ipak, važno je napomenuti da dijagram fazne rastvorljivosti opisuje samo uticaj porasta koncentracije ciklodekstrina na rastvorljivost

Tabela 10. Rastvorljivost karbamazepina (mmol/l) (srednja vrednost $\pm$ SD) u rastvorima sa 0-40% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HPBCD)

HPBCD (% m/V)	Rastvorljivost karbamazepina (mmol/l)
0	0,56 $\pm$ 0,03
2	5,66 $\pm$ 0,03
5	13,57 $\pm$ 0,21
10	25,82 $\pm$ 0,40
20	54,37 $\pm$ 0,75
30	78,32 $\pm$ 0,96
40	102,2 $\pm$ 0,22

lekovite supstance, pri čemu ovom tehnikom nije moguće potvrditi da li dolazi do nastanka inkluzionih kompleksa između lekovite supstance i ciklodekstrina. Dobro je poznato da pored formiranja inkluzionih kompleksa brojni drugi mehanizmi (formiranje neinkluzionih kompleksa i agregata ciklodekstrina i/ili lekovita supstancu-ciklodekstrin kompleksa koji mogu da solubilizuju lekovitu supstancu mehanizmom micelarne solubilizacije) doprinose povećanju rastvorljivosti lekovite supstance sa dodatkom ciklodekstrina (Loftsson i sar., 2002, 2004). Stoga se dijagram fazne rastvorljivosti može koristiti samo za procenu stehiometrije kompleksa, dok se pouzdanije informacije mogu dobiti primenom tehnika kao što je nuklearna magnetna rezonanca (NMR). Vrednost konstante stabilnosti kompleksa (K_s) često se koristi kao jedan od parametara za procenu solubilizacionog potencijala ciklodekstrina za odgovarajuću lekovitu supstancu. Iz samog izraza za izračunavanje K_s (10), može se uočiti da izračunata vrednost K_s umnogome zavisi od vrednosti rastvorljivosti lekovite supstance u medijumu bez dodatka ciklodekstrina $[L_0]$. Značajne razlike u izračunatim vrednostima K_s mogu se dobiti u zavisnosti da li je u izrazu za izračunavanje (10) korišćena eksperimentalno određena vrednost za $[L_0]$, ili je korišćena vrednost dobijena kao odsečak dijagrama fazne rastvorljivosti. Takođe, sama greška pri eksperimentalnom određivanju $[L_0]$ može značajno uticati na izračunatu vrednost K_s . Ova greška je naročito značajna kod teško rastvorljivih lekovitih supstanci, sa osnovnom rastvorljivošću nižom od 1 mg/ml, kod kojih se uglavnom i primenjuju ciklodekstrini sa



Slika 33. Dijagrami fazne rastvorljivosti karbamazepina (CBZ) u rastvorima hidroksipril- β -ciklodekstrina (HPBCD), sa i bez dodatka hidrofilnih polimera ((a) Soluplus[®], (b) Metolose[®] 90SH-100, (c) Metolose[®] 65SH-1500)

ciljem povećanja rastvorljivosti. Na osnovu rezultata ispitivanja fazne rastvorljivosti, izračunata je vrednost K_s od $1003,65 \text{ M}^{-1}$, korišćenjem eksperimentalno određene vrednosti $[L_o]$ i $653,71 \text{ M}^{-1}$, korišćenjem vrednosti $[L_o]$ izračunate kao odsečak dijagrama fazne rastvorljivosti. Prema Loftsonu i saradnicima, korišćenjem eksperimentalno određene vrednosti $[L_o]$ najčešće se dobijaju više vrednosti K_s , u odnosu na vrednosti izračunate korišćenjem odsečka dijagrama fazne rastvorljivosti (Loftsson i sar., 2005). Dobijeni rezultati su u skladu sa ovom činjenicom. Zbog prethodno navedenih razloga, efikasnost kompleksiranja (CE) se sve češće koristi kao bolji pokazatelj solubilizacionog kapaciteta ciklodekstrina za ispitivanu lekovitu supstancu. Na osnovu jednačine (11), izračunata je vrednost CE od 0,56, za sistem karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, uz pretpostavku da hidroksipropil- β -ciklodekstrin gradi kompleks sa karbamazepinom u stehiometrijskom odnosu 1:1. U poređenju sa literaturnom vrednošću za CE od 0,679 (Loftsson i sar., 2005), može se uočiti da je dobijena vrednost CE od 0,56 nešto niža, što se može pripisati različitoj metodologiji prilikom određivanja fazne rastvorljivosti i različitom stepenu supstitucije ciklodekstrina korišćenih u ovim ispitivanjima. Korišćenjem izračunate vrednosti CE, na osnovu jednačine (12) izračunat je molarni odnos između karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina od 1:2,78, što znači da od svaka tri molekula hidroksipropil- β -ciklodekstrina, samo jedan molekul gradi kompleks sa karbamazepinom, uz pretpostavku da dolazi do formiranja kompleksa u stehiometrijskom odnosu 1:1. Izračunate vrednosti za CE i odnos karbamazepin:hidroksipropil- β -ciklodekstrin opravdavaju primenu drugih pomoćnih supstanci sa ciljem povećanja efikasnosti kompleksiranja u sistemu karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin. Zbog toga se i pristupilo ispitivanju uticaja dodatka niskih koncentracija hidrofilnih polimera (Soluplus[®], Metolose[®] 90SH-100, Metolose[®] 65SH-1500 i Kollidon[®] 25) na efikasnost kompleksiranja u sistemu karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 11, može se zaključiti da dodatak Soluplus[®]-a i oba ispitivana tipa hidroksipropilmetilceluloze (Metolose[®] 90SH-100, Metolose[®] 65SH-1500) dovode do značajnog povećanja rastvorljivosti karbamazepina u rastvorima sa 10% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina i da to povećanje rastvorljivosti iznosi oko 1,5 puta. Na osnovu dobijenih vrednosti rastvorljivosti karbamazepina u rastvoru sa 10% (m/V) hidroksipropil- β -

Tabela 11. Rastvorljivost karbamazepina (CBZ) (mmol/l) (srednja vrednost $\pm$ SD) u vodenim rastvorima sa 0,1-1,0% (m/V) hidrofilnog polimera (Soluplus[®], Metolose[®] 90SH-1500, Metolose[®] 65SH-1500 i Kollidon[®] 25) i u vodenim rastvorima sa 10% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HPBCD) i 0,1-1,0% (m/V) dodatog hidrofilnog polimera

Soluplus [®] (% m/V)				
	0,1	0,2	0,5	1,0
Voda	2,02$\pm$0,04	2,31 $\pm$ 0,05	2,51 $\pm$ 0,02	3,23 $\pm$ 0,08
10% (m/V) HPBCD	38,82$\pm$0,70	37,74 $\pm$ 0,63	38,93 $\pm$ 0,25	38,63 $\pm$ 0,20
Metolose [®] 90SH-100 (% m/V)				
	0,1	0,2	0,5	1,0
Voda	1,51 $\pm$ 0,03	1,47$\pm$0,04	1,49 $\pm$ 0,04	1,44 $\pm$ 0,08
10% (m/V) HPBCD	37,96 $\pm$ 0,23	38,29$\pm$0,04	37,02 $\pm$ 0,44	33,44 $\pm$ 0,47
Metolose [®] 65SH-1500 (% m/V)				
	0,1	0,2	0,5	1,0
Voda	1,54 $\pm$ 0,06	1,59$\pm$0,01	1,54 $\pm$ 0,06	1,55 $\pm$ 0,03
10% (m/V) HPBCD	38,00 $\pm$ 0,09	38,72$\pm$0,21	34,09 $\pm$ 1,12	35,54 $\pm$ 1,53
Kollidon [®] 25 (% m/V)				
	0,1	0,2	0,5	1,0
Voda	0,70 $\pm$ 0,009	0,70 $\pm$ 0,006	0,77 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,02
10% (m/V) HPBCD	27,49 $\pm$ 0,69	28,21 $\pm$ 0,02	27,66 $\pm$ 0,05	27,03 $\pm$ 0,78

ciklodekstrina, vodenim rastvorima sa 0,1-1,0% (m/V) ispitivanih hidrofilnih polimera i rastvorima sa 10% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina sa dodatkom 0,1-1,0% (m/V) hidrofilnog polimera (Tabele 10 i 11), može se zaključiti da ispitivani hidrofilni polimeri i hidroksipropil- β -ciklodekstrin ispoljavaju sinergistički efekat na solubilizaciju karbamazepina. Iako je zabeležen izvestan porast rastvorljivosti karbamazepina u vodenim rastvorima Soluplus[®]-a sa porastom koncentracije ovog polimera, u binarnim sistemima hidroksipropil- β -ciklodekstrin-Soluplus[®], zabeležena je

slična vrednost rastvorljivosti karbamazepina, bez obzira na dodatnu koncentraciju Soluplus®-a. Na osnovu toga se može zaključiti da je efekat Soluplus®-a na rastvorljivost karbamazepina u vodenim rastvorima, koji sadrže hidroksipropil- β -ciklodekstrin i Soluplus®, nezavisan od koncentracije, pa je stoga za dalje ispitivanje odabrana najniža ispitivana koncentracija Soluplus®-a od 0,1% (m/V). U slučaju oba ispitivana tipa hidroksipropilmetilceluloze (Metolose® 90SH-100, Metolose® 65SH-1500), najviša rastvorljivost karbamazepina u vodenim rastvorima, koji sadrže hidroksipropil- β -ciklodekstrin i Metolose® 90SH-100, odnosno hidroksipropil- β -ciklodekstrin i Metolose® 65SH-1500, zabeležena je pri koncentracijama navedenih polimera od 0,2% (m/V), a zatim je zabeležen izvestan pad rastvorljivosti karbamazepina pri višim koncentracijama polimera. Ovaj izvestan pad rastvorljivosti karbamazepina, pri višim koncentracijama navedenih polimera, može biti uzrokovan nešto višim viskozitetom ovih rastvora, što usporava difuziju lekovite supstance u okolni rastvor i dovodi do smanjenja rastvorljivosti. Iz dobijenih rezultata se može uočiti da nema razlike u uticaju na rastvorljivost karbamazepina između dva ispitivana tipa hidroksipropilmetilceluloze, kako u vodenim rastvorima tako i u rastvorima sa 10% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina, bez obzira na razlike u viskozitetu rastvora ovih polimera. Na osnovu dobijenih rezultata za dalje ispitivanje je izabrana koncentracija od 0,2% (m/V) polimera Metolose® 90SH-100 i Metolose® 65SH-1500. Kollidon® 25 nije doveo do značajnog porasta rastvorljivosti karbamazepina, kako u vodenim rastvorima ovog polimera tako i u rastvorima sa 10% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Iz toga razloga ovaj polimer nije korišćen u daljem ispitivanju.

Dodatkom prethodno definisanih koncentracija hidrofilnih polimera (Soluplus®, Metolose® 90SH-100 i Metolose® 65SH-1500) rastvorima sa 0-40% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina, postignuto je značajno povećanje rastvorljivosti karbamazepina u odnosu na rastvore koji su sadržali samo hidroksipropil- β -ciklodekstrin (Slike 33a-33c, Tabela 12). Jasno se uočava da dodatak navedenih hidrofilnih polimera nije doveo do promene tipa dijagrama fazne rastvorljivosti (A_L tip), ali je došlo do značajnog povećanja vrednosti nagiba ovog dijagrama. Uočeno smanjenje vrednosti K_s (Tabela 13) može se objasniti povećanjem vrednosti rastvorljivosti karbamazepina u vodenim rastvorima ovih polimera bez dodatka ciklodekstrina ($[L_0]$), koja se potom koristi prilikom izračunavanja K_s . Kako vrednost

Tabela 12. Rastvorljivost karbamazepina (mmol/l) (srednja vrednost $\pm$ SD) u rastvorima sa 0-40% (m/V) hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HPBCD) uz dodatak hidrofilnih polimera (Soluplus[®], Metolose[®] 90SH-100 i Metolose[®] 65SH-1500) u odabranim koncentracijama

HPBCD (% m/V)	0,1% (m/V) Soluplus [®]	0,2% (m/V) Metolose [®] 90SH-100	0,2% (m/V) Metolose [®] 65SH-1500
0	2,02 $\pm$ 0,04	1,47 $\pm$ 0,04	1,59 $\pm$ 0,02
2	8,56 $\pm$ 0,15	8,12 $\pm$ 0,63	7,95 $\pm$ 0,27
5	19,50 $\pm$ 0,28	18,60 $\pm$ 0,60	18,41 $\pm$ 0,80
10	38,82 $\pm$ 0,69	38,29 $\pm$ 0,04	38,71 $\pm$ 0,23
20	66,01 $\pm$ 2,57	68,95 $\pm$ 1,20	69,53 $\pm$ 1,25
30	99,47 $\pm$ 2,72	96,18 $\pm$ 0,47	101,26 $\pm$ 0,24
40	135,04 $\pm$ 1,26	132,73 $\pm$ 1,31	128,66 $\pm$ 6,45

Tabela 13. Izračunate vrednosti konstante stabilnosti kompleksa (K_s) i efikasnosti kompleksiranja (CE) u binarnim karbamazepin (CBZ)-hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HPBCD) i ternarnim karbamazepin (CBZ)-hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HPBCD)-hidrofilni polimer sistemima

	K_s (M ⁻¹)		CE
	Izračunato korišćenjem S_0	Izračunato korišćenjem odsečka	
CBZ:HPBCD	1004,57	653,85	0,56
CBZ:HPBCD:Soluplus[®]	417,80	309,24	0,85
CBZ:HPBCD:Metolose[®] 90SH-100	561,79	302,82	0,82
CBZ:HPBCD:Metolose[®] 65SH-1500	513,54	253,01	0,82

K_s u velikoj meri zavisi od vrednosti $[L_0]$, kao što je gore objašnjeno, za procenu povećanja solubilizacionog kapaciteta hidroksipropil- β -ciklodekstrina sa dodatkom hidrofilnih polimera, korišćene su izračunate vrednosti za CE. Tako je dodatak Soluplus[®]-a binarnom karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin sistemu doveo do porasta vrednosti CE sa 0,56 na 0,85, dok je dodatkom druga dva ispitivana polimera

(Metolose[®] 90SH-100 i Metolose[®] 65SH-1500) u oba slučaja postignuta vrednost za CE od 0,82. Zabeleženi porast efikasnosti kompleksiranja od približno 1,5 puta u ternarnim karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistemima u odnosu na binarne karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin sisteme potvrdio je da je dodatak hidrofilnih polimera veoma efikasna metoda za povećanje efikasnosti kompleksiranja u sistemima lekovita supstanca-ciklodekstrin. Brojna prethodna istraživanja su potvrdila da se dodatkom hidrofilnih polimera ostvaruje značajno povećanje efikasnosti kompleksiranja ciklodekstrina za različite lekovite supstance (Mura i sar., 2001, Ribeiro i sar., 2003, Smith i sar., 2005, Mady i sar., 2010, Kou i sar., 2011). Tako je pokazano da se dodatkom hidroksipropilmetilceluloze hidroksipropil β -ciklodekstrinu (Kou i sar., 2011) i sulfobutiletar- β -ciklodekstrinu (Smith i sar., 2005) ostvaruje sinergistički efekat na povećanje rastvorljivosti karbamazepina. Takođe, Kou i saradnici su pokazali da se primenom polivinilpirolidona ne postiže značajno povećanje rastvorljivosti karbamazepina u vodenim rastvorima hidroksipropil β -ciklodekstrina (Kou i sar., 2011).

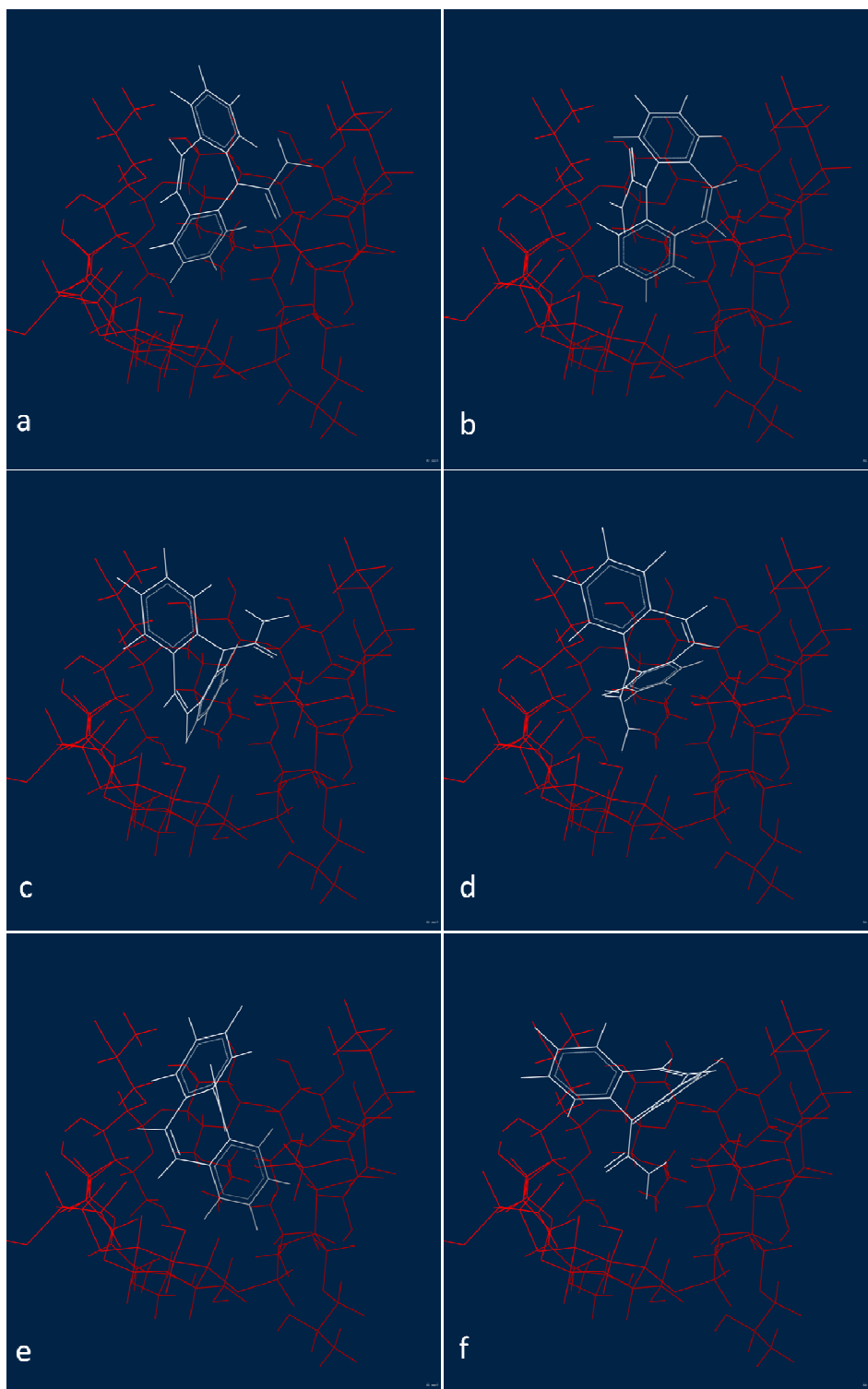
I pored brojnih sprovedenih studija, tačan mehanizam kojim se može objasniti povećanje rastvorljivosti lekovitih supstanci u rastvorima ciklodekstrina pri dodatku hidrofilnih polimera još uvek nije poznat. Veoma je važno naglasiti da je efekat dodatka hidrofilnih polimera različit u različitim sistemima lekovita supstanca-ciklodekstrin i da u nekim slučajevima ne dolazi do povećanja efikasnosti kompleksiranja. Ovo navodi na zaključak da su specifične interakcije između lekovite supstance i primenjenog polimera značajne za objašnjenje navedenog fenomena. Moguće je da se specifičnim interakcijama lekovite supstance i polimera sprečava precipitacija molekula lekovite supstance koji disociraju iz lekovita supstanca-ciklodekstrin kompleksa. Zbog svega navedenog, uticaj dodatka hidrofilnih polimera na efikasnost kompleksiranja potrebno procenjivati za svaki sistem lekovita supstanca-ciklodekstrin ponaosob. Poznato je da hidrofilni polimeri koji su primenjivani u ispitivanju imaju sposobnost micelarne solubilizacije lekovite supstance, ali ovaj efekat nije od velikog značaja, imajući u vidu da samo slobodni molekuli lekovite supstance mogu da formiraju komplekse sa molekulima ciklodekstrina. Veoma značajna može biti činjenica da korišćeni hidrofilni polimeri mogu da stabilizuju strukture nastale asocijacijom molekula ciklodekstrina i/ili lekovita supstanca-ciklodekstrin kompleksa i da na taj način povećavaju solubilizacioni potencijal ciklodekstrina (Loftsson i Brewster, 2012). Kako bi se stekao bolji uvid u

mehanizme koji doprinose povećanju solubilizacionog potencijala hidroksipropil- β -ciklodekstrina za karbamazepin sa dodatkom hidrofilnih polimera, u daljem toku istraživanja primenjene su tehnike molekularnog modelovanja i fizičko-hemijske karakterizacije.

3.4.2. Simulacija interakcija u sistemu karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer tehnikama molekularnog modelovanja

Strukture šest karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin kompleksa, identifikovanih kao najstabilniji, prikazane su na slici 34, dok su dobijene vrednosti konstanti vezivanja i energije interakcije, raščlanjene na nevezivne i elektrostatičke interakcije, prikazane u tabeli 14. Negativne vrednosti energija ukazuju na interakcije koje stabilizuju sistem, dok pozitivne vrednosti ukazuju na destabilizujuće interakcije. Sa prikazanih struktura kompleksa, koji su primenom korišćenog softvera identifikovani kao najstabilniji, uočava se pojava vodoničnih veza između N-H i C=O grupa iz karboksamidne grupe karbamazepina i O-H grupe iz hidroksipropil grupe u bočnom lancu hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Takođe se uočava da dolazi do inkluzije manje polarnog dela molekula karbamazepina, dibenzoazepinskog prstena, unutar hidrofobne šupljine hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Nasuprot ustaljenoj tvrdnji da hidrofobne interakcije igraju najznačajniju ulogu u formiranju inkluzionih kompleksa sa ciklodekstrinima, rezultati simulacije vezivanja karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina pokazali su da i interakcije između polarnih grupa u strukturi lekovite supstance i ciklodekstrina takođe imaju veoma značajnu ulogu u nastanku inkluzionih kompleksa.

Dobijene vrednosti energija (nevezivne i elektrostatičke), izračunate korišćenjem CHARMM polja sila i *Gasteiger* naelektrisanja ukazuju na nešto drugačiji redosled karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin kompleksa u pogledu stabilnosti, u odnosu na redosled procenjen na osnovu dobijenih vrednosti konstanti vezivanja. Na osnovu izračunatih vrednosti energija interakcije, kao najstabilniji je identifikovan kompleks 1 (Slika 34a), kod koga je dobijena i najviša vrednost konstante vezivanja, koja takođe ukazuje na najveću stabilnost ovog kompleksa. Kod ovog kompleksa je zabeležena najniža vrednost za energiju nevezivnih interakcija, što stabilizuje sistem, dok komponenta energije elektrostatičkih interakcija ima pozitivnu, ali veoma nisku



Slika 34 (a-f). Strukture šest karbamazepin- hidroksipropil- β -ciklodekstrin kompleksa koji su primenom simulacije vezivanja karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina identifikovani kao najstabilniji

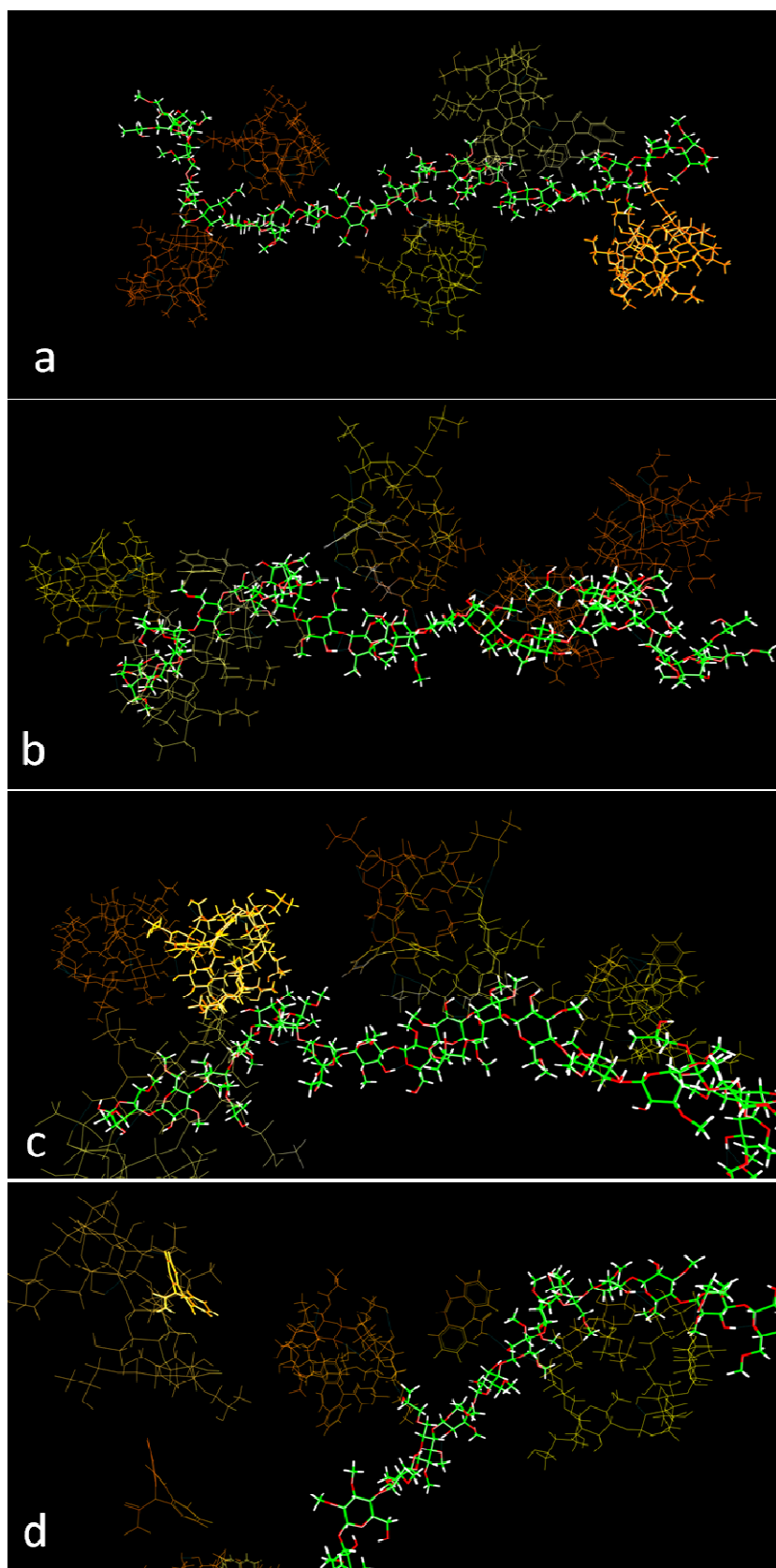
Tabela 14. Vrednosti konstante vezivanja, energije interakcije rasčlanjene na nevezivne i elektrostatičke interakcije, i parametra *Molecular Lipophilicity Potential Interaction score* (MLPIs) za šest karbamazepin (CBZ)-hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HPBCD) kompleksa koji su predviđeni kao najstabilniji

CBZ- HPBCD kompleks	Konstanta vezivanja (kcal/mol)	Nevezivne interakcije (kcal/mol)	Elektrostatičke interakcije (kcal/mol)	MLPIs parametar
Kompleks 1	-7,1	-18,05	0,723	4,43
Kompleks 2	-7,0	4,21	0,545	5,04
Kompleks 3	-6,9	-9,00	1,205	4,43
Kompleks 4	-6,8	123,89	2,113	4,46
Kompleks 5	-6,8	9,96	5,090	4,91
Kompleks 6	-6,2	-0,002	-0,417	5,01

vrednost i tek neznatno doprinosi destabilizaciji sistema. Kao drugi najstabilniji kompleks identifikovan je kompleks broj 3, prikazan na slici 34c, kod koga komponenta energije nevezivnih interakcija doprinosi stabilizaciji kompleksa, ali komponenta elektrostatičkih interakcija ima pozitivnu vrednost, što ukazuje na sile odbijanja između karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina, odnosno destabilizaciju sistema. Kod kompleksa koji je na osnovu vrednosti konstante vezivanja svrstan kao šesti prema opadajućoj stabilnosti (Slika 34f) uočava se neznatna negativna vrednost za energiju nevezivnih interakcija uz negativnu vrednost za energiju elektrostatičkih interakcija, tako da obe vrste interakcija doprinose stabilizaciji kompleksa. Kod svih ostalih kompleksa izračunate su pozitivne vrednosti i za energije nevezivnih i elektrostatičkih interakcija, što sve zajedno ukazuje na destabilizaciju sistema. Pozitivna vrednost parametra *Molecular Lipophilicity Potential Interaction score* (MLPIs), zabeležena kod svih šest kompleksa, ukazuje na pojavu odbojnih sila između molekula hidroksipropil- β -ciklodekstrina i karbamazepina. Različit redosled u stabilnosti kompleksa, dobijen na osnovu vrednosti konstante vezivanja i energija izračunatih korišćenjem CHARMM polja sila i *Gasteiger* naelektrisanja nije iznenađujući i predstavlja posledicu vrednosti parametara u korišćenim softverima, odabranog polja sila i elektrostatičkog modela. Dodatni razlog za uočene razlike predstavlja činjenica da se prilikom izvođenja simulacije vezivanja lekovita supstanca-ciklodekstrin (*docking* simulacija) ne uzima u

obzir prisustvo molekula vode i eventualno prisutnih vodoničnih veza između molekula lekovite supstance i vode. Ipak, može se uočiti da je kod tri kompleksa, koji su na osnovu vrednosti izračunatih energija rangirani kao najstabilniji, karbonilna grupa karbamazepina orijentisana prema hidrofobnoj šupljini ciklodekstrina, što ukazuje da ova interakcija ima značajnu ulogu u stabilizaciji nastalog kompleksa. Ovo je u suprotnosti sa očekivanjem da hidrofobne interakcije između aromatičnih prstenova karbamazepina i hidrofobne šupljine ciklodekstrina igraju najvažniju ulogu u stabilizaciji nastalih inkluzionih kompleksa. Moguće objašnjenje za uočenu pojavu predstavlja to da se inkluzijom polarnih grupa karbamazepina unutar hidrofobne šupljine ciklodekstrina smanjuje jačina interakcija između molekula karbamazepina i molekula vode, što favorizuje nastanak kompleksa.

Simulacija molekularne dinamike je primenjena kako bi se stekao uvid u interakcije između karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin kompleksa i hidroksipropilmetilceluloze u vodenom rastvoru. Prilikom interpretacije dobijenih rezultata važno je imati u vidu da vreme trajanja simulacije od 2 ns omogućava samo sticanje uvida u trenutno stanje u sistemu, pošto u sistemu kontinuirano dolazi do formiranja i disocijacije karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin kompleksa. Posmatranjem dobijenih trajektorija (Slika 35) uočava se da tokom trajanja simulacije dolazi do disocijacije različitih kompleksa, pri čemu kompleksi označeni brojevima 1 i 3 (Tabela 14, Slika 34a i 34c) najduže perzistiraju. Može se uočiti da se tokom simulacije molekuli hidroksipropil- β -ciklodekstrina vezuju za molekule hidroksipropilmetilceluloze, zahvaljujući vodoničnim vezama i disperzionim silama između metil grupa. Sa prikazanih trajektorija može se uočiti da dolazi do interakcija između molekula karbamazepina, koji disosuju iz karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin kompleksa i molekula hidroksipropilmetilceluloze. Na osnovu prikazanih rezultata može se pretpostaviti da molekuli hidroksipropilmetilceluloze stupaju u interakciju sa slobodnim molekulima karbamazepina u rastvoru (molekulima koji nisu vezani u komplekse) i na taj način sprečavaju nastanak dimera karbamazepina, što predstavlja početnu fazu u kristalizaciji karbamazepina. Uočena pojava na mikroskopskom nivou odgovara smanjenju difuzionog koeficijenta karbamazepina na makroskopskom nivou u rastvorima koji sadrže hidroksipropilmetilcelulozu. Kako difuzija u osnovi predstavlja proces prenosa mase koji je neophodan za početak kristalizacije, može se zaključiti da



Slika 35 (a-d). Prikaz trajektorija molekularne dinamike u različitim trenucima tokom trajanja simulacije

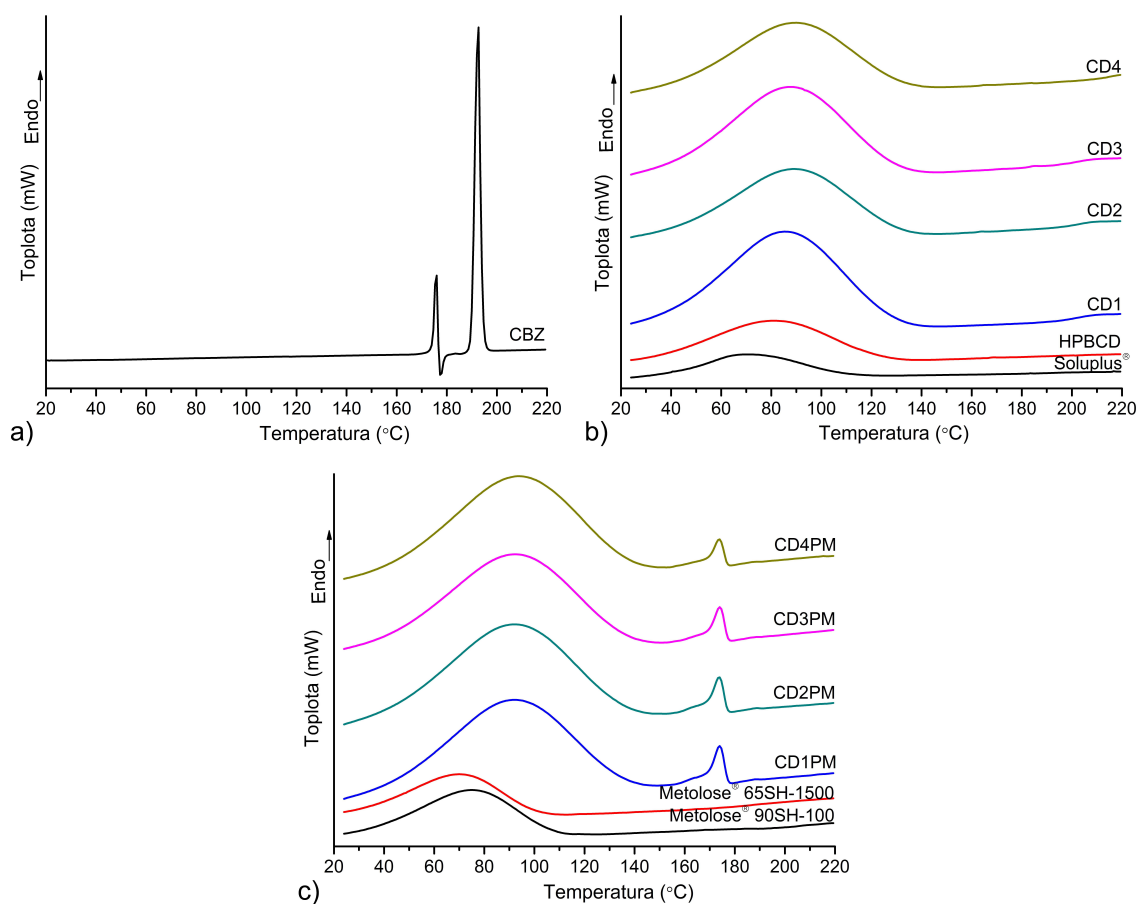
se dodatkom hidroksipropilmetilceluloze usporava kristalizacija molekula karbamazepina iz rastvora. Iako se dobijeni rezultati ne mogu uzeti kao nepobitni dokazi, oni predstavljaju korisno objašnjenje za pozitivan uticaj dodatka hidroksipropilmetilceluloze na solubilizaciju karbamazepina hidroksipropil- β -ciklodekstrinom. Može se pretpostaviti da se efekat Soluplus[®]-a može objasniti sličnim mehanizmom, odnosno u ovim sistemima se takođe očekuje pojava interakcija između molekula karbamazepina i Soluplus[®]-a, koje doprinose solubilizaciji molekula karbamazepina. Kako izvođenje simulacije sa molekulom veličine poput Soluplus[®]-a zbog velikog broja potrebnih izračunavanja zahteva kompjuterske sisteme visokih performansi i traje dugo vremena, simulacija interakcija u karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-Soluplus[®] sistemu nije vršena u ovom istraživanju.

3.4.3. Fizičko-hemijska karakterizacija binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin hidrofilni polimer sistema

3.4.3.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

DSC termogrami polaznih materijala, binarnih i ternarnih sistema izrađenih sušenjem raspršivanjem i fizičkih smeša istovetnog kvalitativnog i kvantitativnog sastava prikazani su na Slici 36. Na DSC termogramu karbamazepina (Slika 36a) uočava se endotermni pik na 175°C usled topljenja polimorfnog oblika III, nakon čega se uočava egzotermni pik na 177°C, koji odgovara kristalizaciji polimorfnog oblika I, koji se zatim topi na 191°C, što se manifestuje egzotermnim pikom. Dobijeni termogram odgovara prethodno opisanom termogramu polimorfnog oblika III karbamazepina (Grzesiak i sar., 2003), što pokazuje da je karbamazepin korišćen u ovom ispitivanju sadržao polimorfni oblik III, kao najstabilniji polimorfni oblik supstance pod ambijentalnim uslovima. Na DSC termogramima korišćenih pomoćnih supstanci (hidroksipropil- β -ciklodekstrin, Soluplus[®], Metolose[®] 90SH-100 i Metolose[®] 65SH-1500) (Slike 36b i 36c) uočava se široka endoterma koja nije bila uočljiva u drugom ciklusu zagrevanja uzoraka. Pojava ove široke endoterme predstavlja posledicu gubitka vode koju sadrže polimeri i/ili relaksacije polimera tokom zagrevanja. Na termogramima izrađenih fizičkih smeša (Slike 36c) može se uočiti pik topljenja

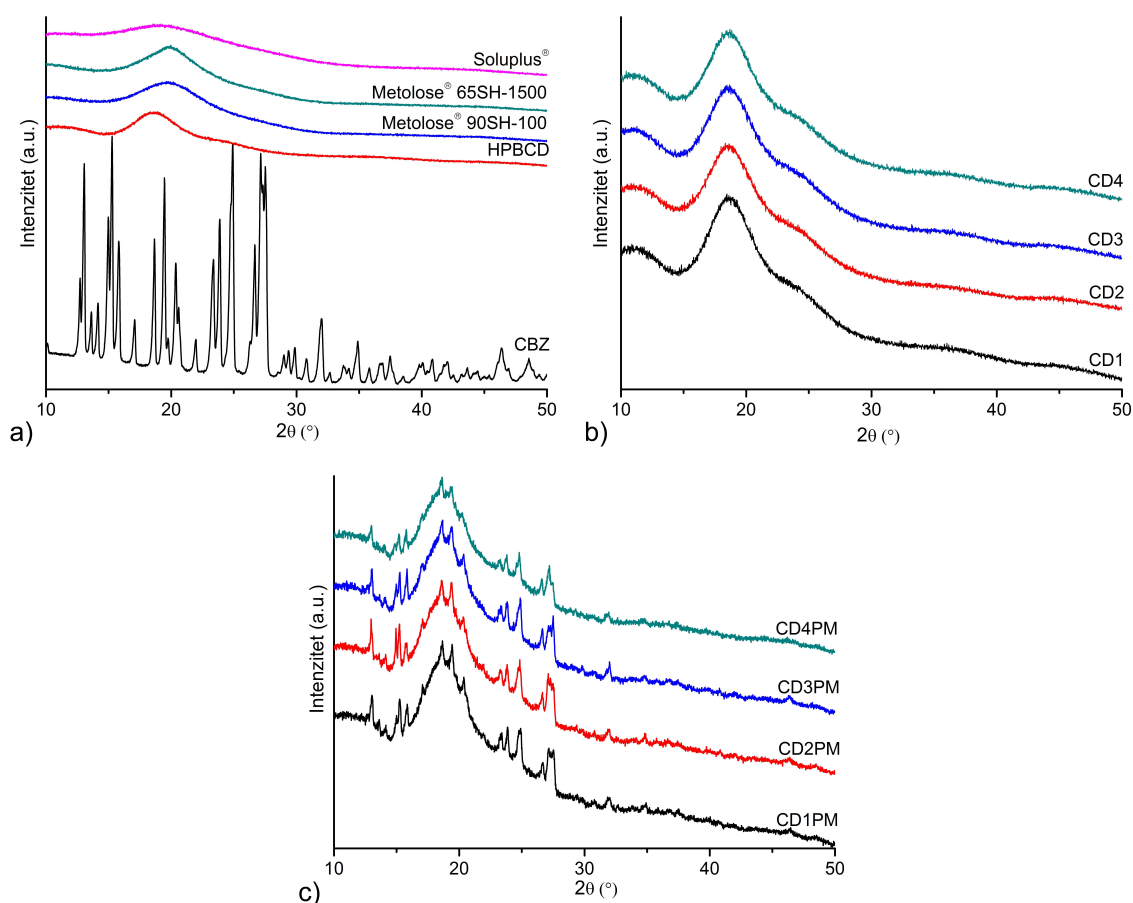
karbamazepina, što ukazuje na njegovo prisustvo u kristalnom obliku. Ovakav rezultat pokazuje da jednostavnim mešanjem karbamazepina, hidroksipropil- β -ciklodekstrina i eventualno dodatog hidrofilnog polimera ne dolazi do formiranja inkluzionih kompleksa, što predstavlja očekivani rezultat. Sa druge strane ni kod binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, niti kod ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema nisu uočeni pikovi topljenja karbamazepina na DSC termogramima (Slika 36b). Ovo može ukazati da je došlo do inkapsulacije karbamazepina unutar šupljine ciklodekstrina, odnosno da je došlo do nastanka inkluzionih kompleksa.



Slika 36 (a-c). DSC termogrami polaznih materijala (karbamazepin-CBZ, hidroksipropil- β -ciklodekstrin-HPBCD), formulacija dobijenih sušenjem raspršivanjem (CD1-CD4) i odgovarajućih fizičkih smeša (CD1PM-CD4PM)

3.4.3.2. Difrakcija X-zraka na prašku

Na difraktogramu karbamazepina (Slika 37a) mogu se uočiti karakteristični pikovi visokog intenziteta na $13,04^\circ$, $15,26^\circ$, $18,64^\circ$, $19,46^\circ$, $20,34^\circ$, $24,89^\circ$, $26,64^\circ$ i $27,18^\circ$ 2θ , što odgovara prethodno opisanom difraktogramu polimorfnog oblika III karbamazepina (Grzesiak i sar., 2003). Ovim je potvrđen rezultat dobijen DSC analizom da je karbamazepin, korišćen u ispitivanju sadržao polimorfni oblik III. Ispitivanjem hidroksipropil- β -ciklodekstrina i korišćenih hidrofilnih polimera (Soluplus[®], Metolose[®] 90SH-100 i Metolose[®] 65SH-1500) (Slika 37a) dobijen je tkzv. tip oreol difraktograma, bez pojave izrazitih pikova, što predstavlja karakteristiku amornih polimera. Na difraktogramima uzoraka fizičkih smeša (Slika 37c), uočava se prisustvo karakterističnih pikova karbamazepina nešto nižeg intenziteta usled niskog sadržaja karbamazepina u ovim uzorcima. Ovim su potvrđeni rezultati diferencijalne skenirajuće

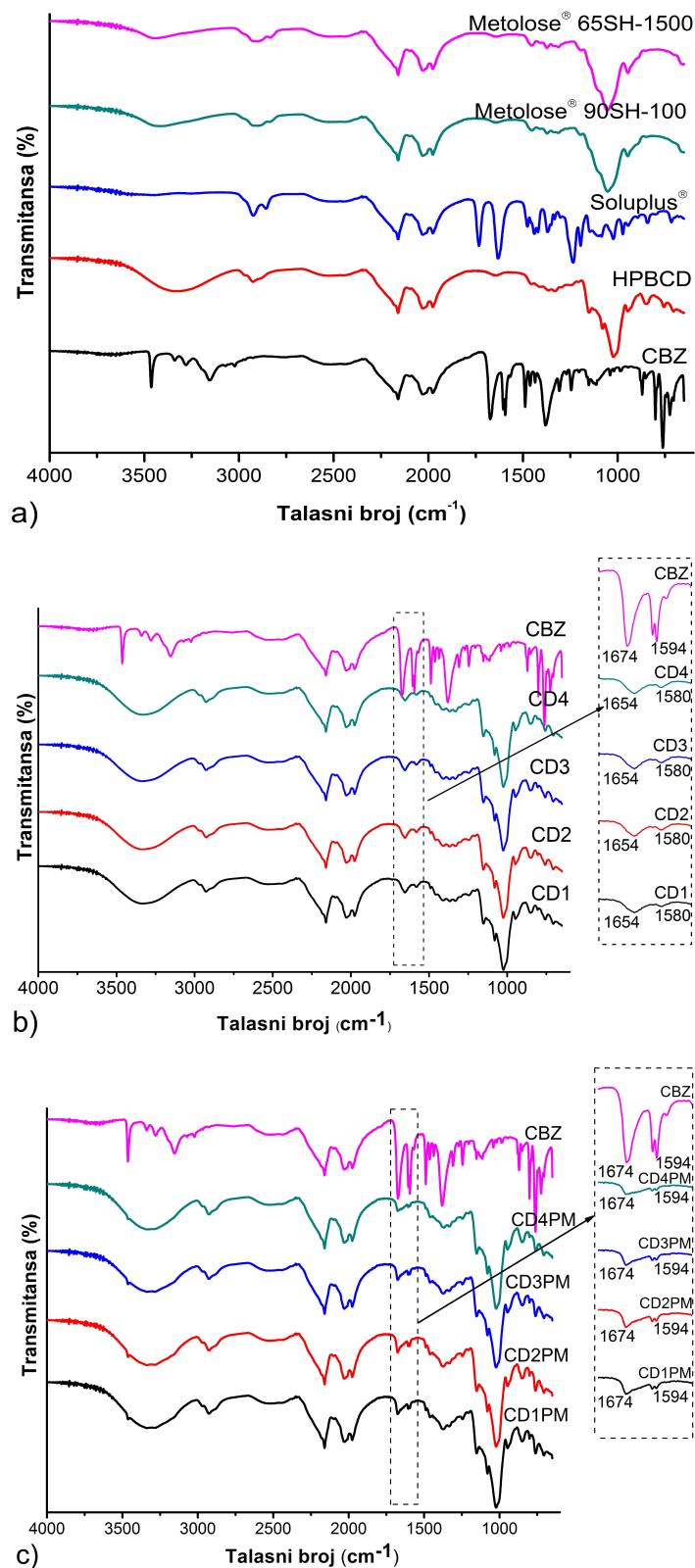


Slika 37. Difraktogrami (a) polaznih materijala (karbamazepin-CBZ, hidroksipropil- β -ciklodekstrin-HPBCD), (b) formulacija dobijenih sušenjem raspršivanjem (CD1-CD4) i (c) odgovarajućih fizičkih smeša (CD1PM-CD4PM)

kalorimetrije da jednostavnim mešanjem ne dolazi do formiranja inkluzionih kompleksa, kako u binarnim karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin tako i u ternarnim karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistemima. Ovakav rezultat u slučaju binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer fizičkih smeša prethodno su opisali Kou i saradnici (Kou i sar., 2011). Na difraktogramima binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema, dobijenih sušenjem raspršivanjem (Slika 37b), uočeno je odsustvo pikova karakterističnih za karbamazepin. Ovo ukazuje da se u ovim sistemima karbamazepin nalazi u amorfnom obliku, verovatno usled inkluzije u šupljinu hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Dodatak hidrofilnih polimera nije doveo do promena u difraktogramima u odnosu na binarne karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin sisteme, ali je postignuto formiranje amorfnog oblika karbamazepina, pri njegovim višim masenim udelima, u odnosu na binarne karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin sisteme.

3.4.3.3. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

Na FT-IR spektru karbamazepina (Slika 38a) mogu se uočiti pikovi na 3463 cm^{-1} (-NH valencione vibracije), 1674 cm^{-1} (-CO-R vibracije), 1593 cm^{-1} i 1605 cm^{-1} (-C=C- i -C=O vibracije i -NH deformacije), karakteristični za polimorfni oblik III karbamazepina (Rustichelli i sar., 2000). Ispitivanjem hidroksipropil- β -ciklodekstrina (Slika 38a) uočeni su pikovi na 3331 cm^{-1} (-O-H istezanje), 2926 cm^{-1} (-C-H istezanje), 1151 cm^{-1} i 1080 cm^{-1} (-C-H i -C-O istezanje) (Jun i sar., 2007). Poređenjem FT-IR spektara, binarnih i ternarnih sistema izrađenih sušenjem raspršivanjem, kao i odgovarajućih fizičkih smeša (Slike 38b i 38c), može se uočiti da dodatak hidrofilnih polimera nije doveo do uočljivih promena u spektrima ternarnih sistema u odnosu na binarne sisteme. Karakteristični pikovi karbamazepina na 1594 i 1674 cm^{-1} uočljivi su na spektrima fizičkih smeša (Slika 38c), bez ikakvih pomeranja. Pik karbamazepina na 3463 cm^{-1} je teško uočljiv na spektrima fizičkih smeša, usled preklapanja sa širokom apsorpcionom trakom hidroksipropil- β -ciklodekstrina na oko 3330 cm^{-1} , ali se i pored toga može uočiti da kod ovog pika takođe ne dolazi ni do kakvih pomeranja u odnosu na spektar čistog karbamazepina. Odsustvo pomeranja pikova karbamazepina na

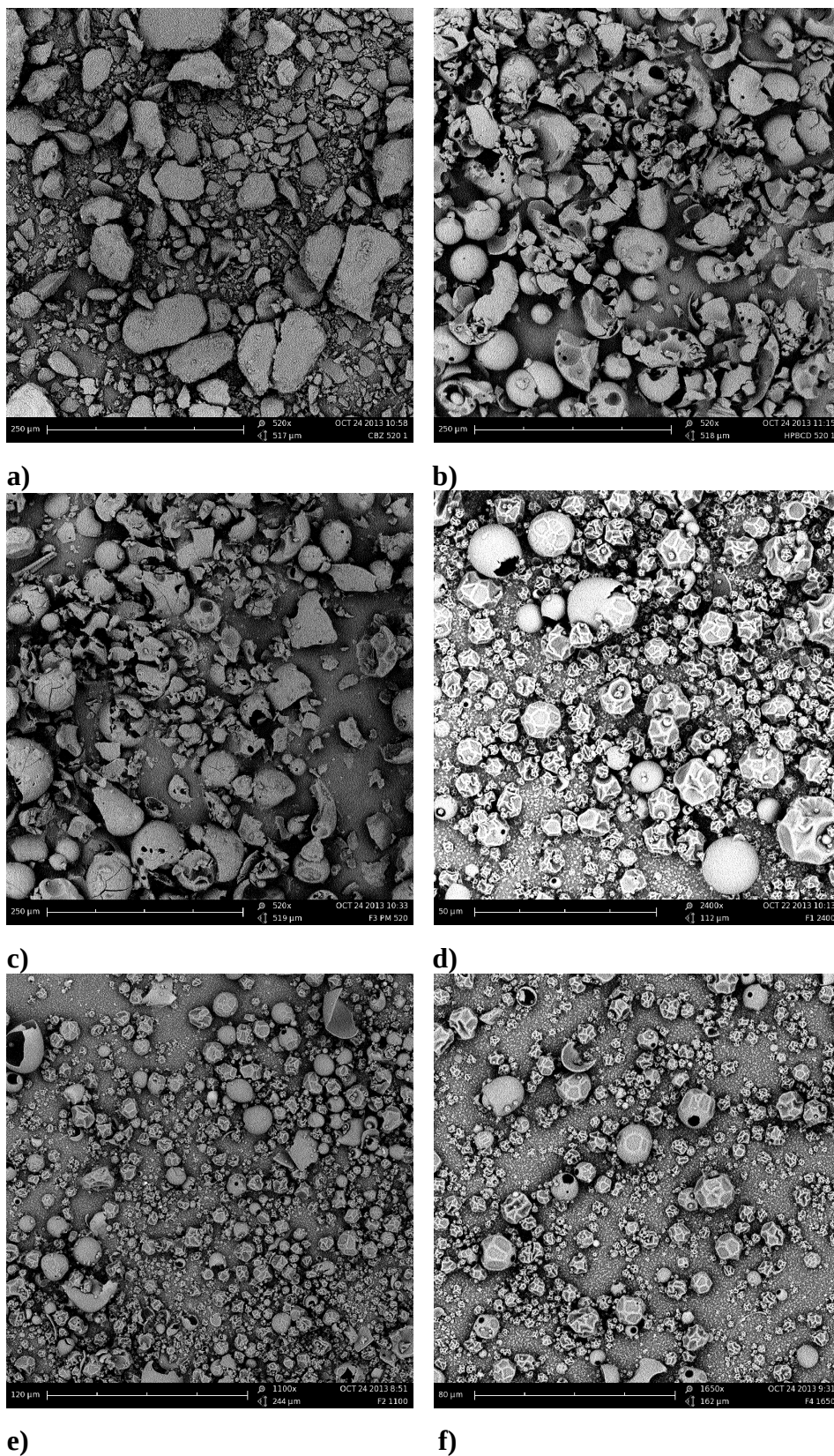


Slika 38. FT-IR spektri (a) polaznih materijala (karbamazepin-CBZ, hidroksipropil- β -ciklodekstrin-HPBCD), (b) formulacija dobijenih sušenjem raspršivanjem (CD1-CD4) i (c) odgovarajućih fizičkih smeša (CD1PM-CD4PM)

spektrima fizičkih smeša pokazuje da mešanjem komponenata ne dolazi do nastanka bilo kakvih hemijskih interakcija između komponenata. Na spektrima formulacija izrađenih sušenjem raspršivanjem (Slika 38b) uočava se potpuno odsustvo pika, koji je u spektru čistog karbamazepina prisutan na 3463 cm^{-1} . Na spektrima ovih formulacija takođe se može uočiti da su pikovi, koji se u spektru čistog karbamazepina nalaze na 1674 i 1594 cm^{-1} pomereni na 1654 i 1580 cm^{-1} . Pomeranje pikova karakterističnih za karboksamidnu funkcionalnu grupu karbamazepina ukazuje da intermolekulske interakcije između karboksamidne funkcionalne grupe karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina igraju značajnu ulogu u formiranju i stabilizaciji karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin inkluzionih kompleksa. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima dostupnim u literaturi, u kojima je na sistemu karbamazepin- β -ciklodekstrin pokazano da vodonične veze između molekula karbamazepina i β -ciklodekstrina igraju najznačajniju ulogu u nastanku inkluzionih kompleksa (Prabhu i sar., 2010). Kao što je prethodno navedeno, rezultati dobijeni primenom simulacije vezivanja molekula karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina takođe su ukazali na formiranje vodoničnih veza između karboksamidne grupe karbamazepina i OH grupa u bočnom lancu hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Rezultati simulacije molekularne dinamike ukazali su na inkluziju polarnog dela molekula karbamazepina unutar relativno nepolarne šupljine hidroksipropil- β -ciklodekstrina, gde takođe može doći do interakcija između karboksamidne grupe karbamazepina i etarskih grupa hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Iz svega navedenog, može se zaključiti da su rezultati dobijeni primenom tehnika molekularnog modelovanja u visokom stepenu u saglasnosti sa rezultatima dobijenim primenom tehnika za fizičko-hemijsku karakterizaciju čvrstog stanja.

3.4.3.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skenirajuća elektronska mikroskopija je primenjena u cilju sticanja uvida u promene morfoloških karakteristika materijala nakon primenjenih tehnika mešanja i sušenja raspršivanjem. Dobijene mikrografije uzoraka karbamazepina, hidroksipropil- β -ciklodekstrina i odabranih formulacija fizičkih smeša (CD3PM) i formulacija dobijenih sušenjem raspršivanjem (CD1, CD2 i CD4) prikazane su na slici 39. Na SEM mikrografiji karbamazepina (Slika 39a) mogu se uočiti čestice prizmatičnog i

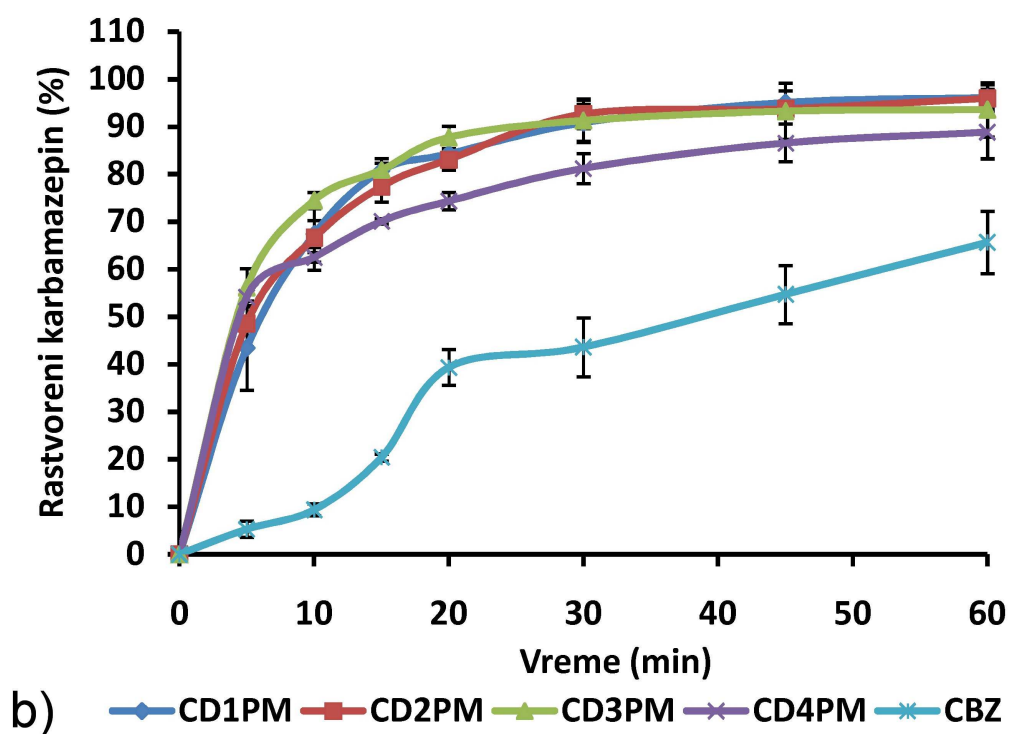
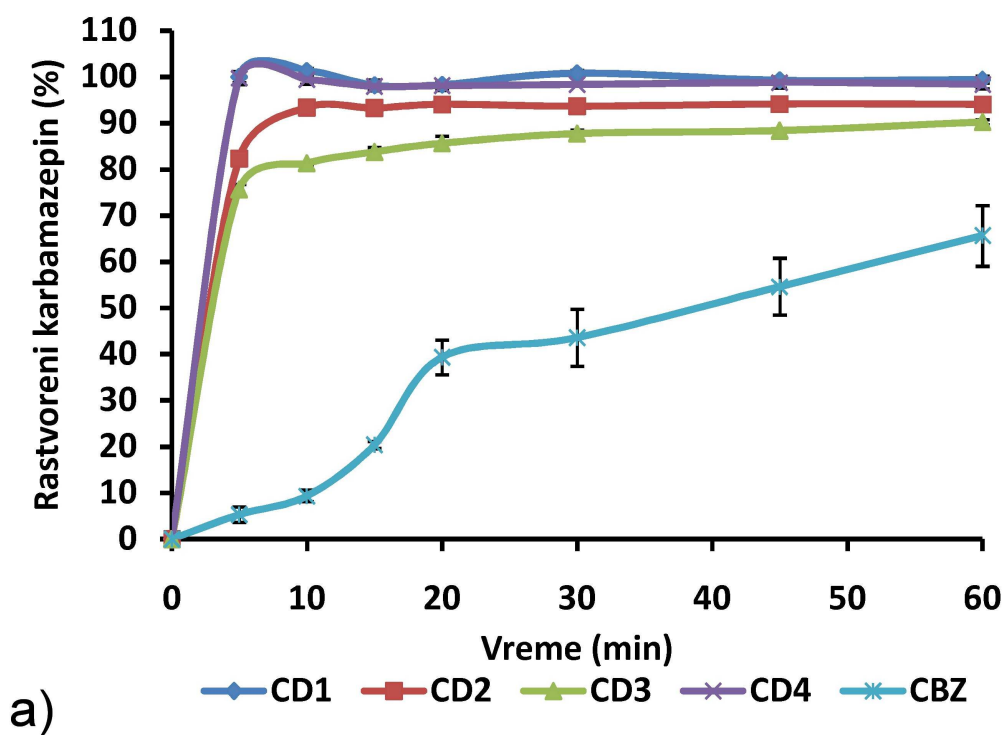


Slika 39. SEM mikrofografije (a) karbamazepina (CBZ), (b) hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HPBCD), (c) fizičke smeše CD3PM i formulacija (d) CD1, (e) CD2 i (f) CD4, dobijenih sušenjem raspršivanjem

nepravilnog oblika, veoma različite po svojoj veličini (20-100 μm), usled kohezivne prirode karbamazepina i izražene tendencije čestica ka agregaciji. Na SEM mikrografiji hidroksipropil- β -ciklodekstrina (Slika 39b) uočavaju se čestice sfernog oblika i glatke površine, sa velikim brojem fragmenata ovih čestica, pri čemu je veličina najvećeg broja čestica u rasponu od 30 do 60 μm . Čestice polaznih materijala mogu se lako identifikovati na prikazanoj SEM mikrografiji fizičke smeše (Slika 39c), bez bilo kakve promene u morfologiji i veličini čestica, što potvrđuje da tokom mešanja nije došlo do značajnih promena u morfološkim karakteristikama polaznih materijala. Sa druge strane, na SEM mikrografijama, kako binarnih, tako i ternarnih formulacija dobijenih sušenjem raspršivanjem (Slike 39d-39f) nije moguće identifikovati čestice polaznih materijala. Na prikazanim mikrografijama odabranih formulacija uočavaju se čestice sfernog oblika sa karakterističnim otvorom na površini i veliki broj smežuranih čestica. Čestice sa otvorom na površini su karakteristične za proces sušenja raspršivanjem. U početnim fazama procesa dolazi do uklanjanja rastvarača, pri čemu se na površini čestica formira omotač, dok unutar čestice još uvek zaostaje izvesna količina rastvarača. Kako proces teče, sa povećanjem temperature dolazi do povećanja pritiska unutar čestice usled isparavanja zaostalog rastvarača i u određenom trenutku dolazi do pucanja omotača na površini čestice i nastanka otvora. Veoma je značajno i da je veličina nastalih čestica značajno manja, kako u odnosu na polazne materijale, tako i u odnosu na fizičke smeše i iznosi do 10 μm . Velike promene u veličini i morfologiji čestica kod formulacija dobijenih sušenjem raspršivanjem binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer vodenih rastvora, u odnosu na polazne komponente, ukazuju na nastanak nove čvrste faze u sistemu. Takođe se može uočiti da je sistem homogenog izgleda, odnosno da nije došlo do razdvajanja na polazne komponente. Iako rezultati dobijeni skenirajućom elektronskom mikroskopijom ne mogu predstavljati nedvosmislen dokaz nastanka inkluzionih kompleksa, ovi rezultati, zajedno sa rezultatim ostalih tehnika fizičko-hemijske karakterizacije i tehnika molekularnog modelovanja, predstavljaju značajne dokaze za formiranje inkluzionih kompleksa između karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina.

3.4.3.5. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz binarnih i ternarnih sistema

Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz formulacija dobijenih sušenjem raspršivanjem (CD1-CD4) i odgovarajućih fizičkih smeša (CD1PM-CD4PM), u poređenju sa čistim karbamazepinom, prikazani su na slikama 40a i 40b, dok je tabelarni prikaz rezultata dat u tabeli 15. Na profilu brzine rastvaranja čistog karbamazepina uočava se usporeno i nepotpuno rastvaranje, sa oko 60% rastvorene količine karbamazepina u toku 1 h ispitivanja. Uočene fluktuacije u profilu brzine rastvaranja karbamazepina mogu se pripisati prelasku anhidrovanog karbamazepina u dihidratni oblik, koji pokazuje nižu rastvorljivost i brzinu rastvaranja. Na prikazanim profilima brzine rastvaranja lako se može uočiti da se primenom, kako formulacija dobijenih sušenjem raspršivanjem tako i fizičkih smeša, ostvaruje značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina. Najveća brzina rastvaranja karbamazepina postignuta je iz binarnog karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin (CD4) i ternarnog karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-Soluplus[®] sistema (CD1) dobijenog sušenjem raspršivanjem, gde je celokupna količina karbamazepina rastvorena tokom prvih 5 minuta ispitivanja. U toku istog vremenskog intervala iz uzoraka čistog karbamazepina rastvoreno je tek negde oko 5% ove lekovite supstance, što jasno pokazuje prednost ovih formulacija. Nešto sporije oslobađanje karbamazepina postignuto je iz formulacija dobijenih sušenjem raspršivanjem koje su sadržale hidroksipropilmetilcelulozu (CD2 i CD3). Ova pojava se može pripisati povećanju viskoziteta pod dejstvom hidroksipropilmetilceluloze, što dovodi do usporavanja difuzije i rastvaranja lekovite supstance. Pored usporenog rastvaranja karbamazepina, za ove dve formulacije je karakteristično i nepotpuno rastvaranje karbamazepina, što je naročito izraženo kod formulacije CD3, koja sadrži tip hidroksipropilmetilceluloze Metolose[®] 65SH-1500, koji daje rastvore većeg viskoziteta. Može se zaključiti da je od svih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer ternarnih sistema dobijenih sušenjem raspršivanjem najveće povećanje brzine rastvaranja karbamazepina postignuto primenom karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-Soluplus[®] sistema, kod kojih nije zabeležena nikakva razlika u brzini rastvaranja karbamazepina u odnosu na binarne karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin sisteme, iako je ternarni sistem sadržao viši udeo karbamazepina. Povećanje brzine rastvaranja karbamazepina iz



Slika 40. Uporedni prikaz profila brzine rastvaranja karbamazepina iz uzoraka čiste lekovite supstance (CBZ), (a) formulacija dobijenih sušenjem raspršivanjem (CD1-CD4) i (b) odgovarajućih fizičkih smeša (CD1PM-CD4PM)

Tabela 15. Uporedni prikaz količine rastvorenog karbamazepina (%) (srednja vrednost $\pm$ SD) u odnosu na deklarirani sadržaj karbamazepina iz uzoraka čistog karbamazepina (CBZ), binarnih i ternarnih formulacija izrađenih sušenjem raspršivanjem (CD1-CD4) i odgovarajućih fizičkih smeša (CD1PM-CD4PM)

Vreme (min)	CBZ	CD1	CD2	CD3	CD4
0	0	0	0	0	0
5	5,3 $\pm$ 1,7	100,0 $\pm$ 1,2	82,4 $\pm$ 0,7	75,6 $\pm$ 1,1	99,8 $\pm$ 1,4
10	9,4 $\pm$ 1,2	101,3 $\pm$ 0,5	93,3 $\pm$ 1,4	81,3 $\pm$ 0,3	99,4 $\pm$ 1,0
15	20,4 $\pm$ 0,8	98,2 $\pm$ 1,1	93,3 $\pm$ 0,8	83,7 $\pm$ 1,0	98,0 $\pm$ 1,0
20	39,4 $\pm$ 3,7	98,3 $\pm$ 0,4	94,1 $\pm$ 0,6	85,6 $\pm$ 1,5	98,1 $\pm$ 1,0
30	43,6 $\pm$ 6,2	100,8 $\pm$ 0,7	93,6 $\pm$ 1,1	87,7 $\pm$ 0,8	98,4 $\pm$ 0,3
45	54,7 $\pm$ 6,1	99,3 $\pm$ 0,4	94,2 $\pm$ 0,6	88,4 $\pm$ 0,4	98,8 $\pm$ 1,2
60	65,6 $\pm$ 6,6	99,4 $\pm$ 0,7	94,1 $\pm$ 0,8	90,2 $\pm$ 0,5	98,4 $\pm$ 0,9
Vreme (min)	CBZ	CD1PM	CD2PM	CD3PM	CD4PM
0	0	0	0	0	0
5	5,3 $\pm$ 1,7	43,4 $\pm$ 8,9	48,5 $\pm$ 4,8	56,1 $\pm$ 4,0	54,2 $\pm$ 0,9
10	9,4 $\pm$ 1,2	67,4 $\pm$ 2,8	66,6 $\pm$ 6,8	74,5 $\pm$ 1,7	62,5 $\pm$ 1,0
15	20,4 $\pm$ 0,8	80,7 $\pm$ 1,5	77,4 $\pm$ 3,3	80,9 $\pm$ 2,4	70,1 $\pm$ 0,5
20	39,4 $\pm$ 3,7	84,3 $\pm$ 2,4	83,1 $\pm$ 2,3	87,7 $\pm$ 2,4	74,3 $\pm$ 1,8
30	43,6 $\pm$ 6,2	90,8 $\pm$ 3,9	92,6 $\pm$ 3,0	91,3 $\pm$ 4,5	81,2 $\pm$ 3,2
45	54,7 $\pm$ 6,1	95,1 $\pm$ 2,5	93,7 $\pm$ 0,6	93,2 $\pm$ 5,9	86,6 $\pm$ 4,0
60	65,6 $\pm$ 6,6	96,0 $\pm$ 2,8	95,9 $\pm$ 2,0	93,6 $\pm$ 5,7	88,8 $\pm$ 5,6

binarnih i ternarnih formulacija može se objasniti formiranjem amorfnih inkluzionih kompleksa, poboljšanjem kvašenja i solubilizacijom lekovite supstance hidroksipropil- β -ciklodekstrinom, kao i smanjenjem veličine čestica, što je potvrđeno skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Iz pripremljenih fizičkih smeša takođe je postignuto značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina, u poređenju sa čistim karbamazepinom (Slika 40b). Ipak, u početnoj fazi, tokom prvih 20 minuta ispitivanja, jasno se uočava brže rastvaranje karbamazepina iz formulacija izrađenih sušenjem

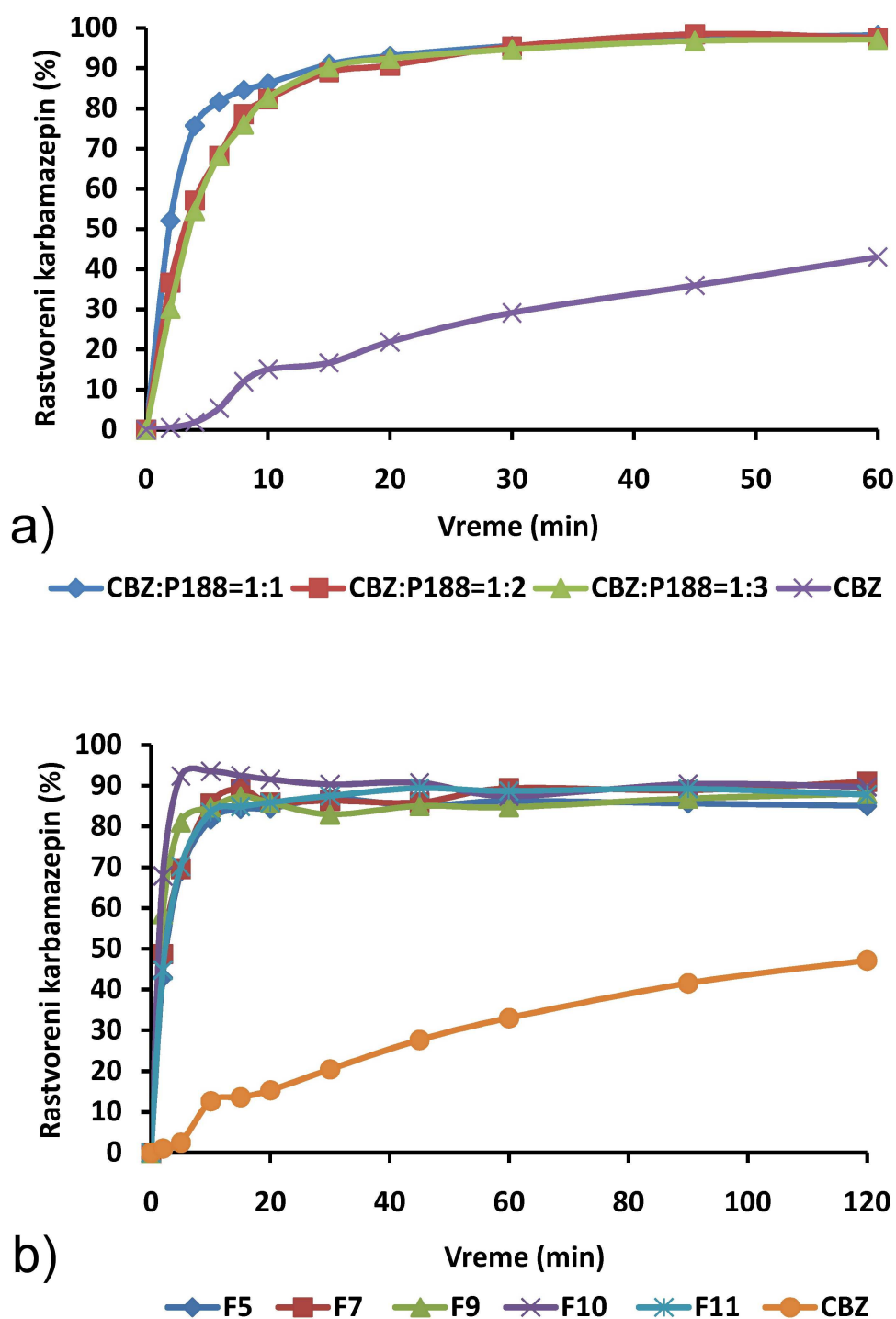
raspršivanjem. Takođe je uočljivo nepotpuno rastvaranje karbamazepina iz formulacija fizičkih smeša. Povećanje brzine rastvaranja karbamazepina iz formulacija fizičkih smeša, u odnosu na čist karbamazepin, može se pripisati površinski aktivnim karakteristikama hidroksipropil- β -ciklodekstrina, zbog čega dolazi do smanjenja površinskog napona između hidrofobnih čestica karbamazepina i okolnog vodenog medijuma, što dovodi do povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. Takođe, poznato je da tokom rastvaranja fizičkih smeša dolazi do *in situ* formiranja kompleksa između lekovite supstance i ciklodekstrina (Corrigan i Stanley, 1982). Ovo može biti razlog za sporije rastvaranje karbamazepina u početnoj fazi ispitivanja, pošto je prvo potrebno da dođe do rastvaranja hidroksipropil- β -ciklodekstrina da bi nakon toga bilo moguće formiranje karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin inkluzionih kompleksa.

4. KRITIČKI OSVRT NA DOBIJENE REZULTATE ISTRAŽIVANJA

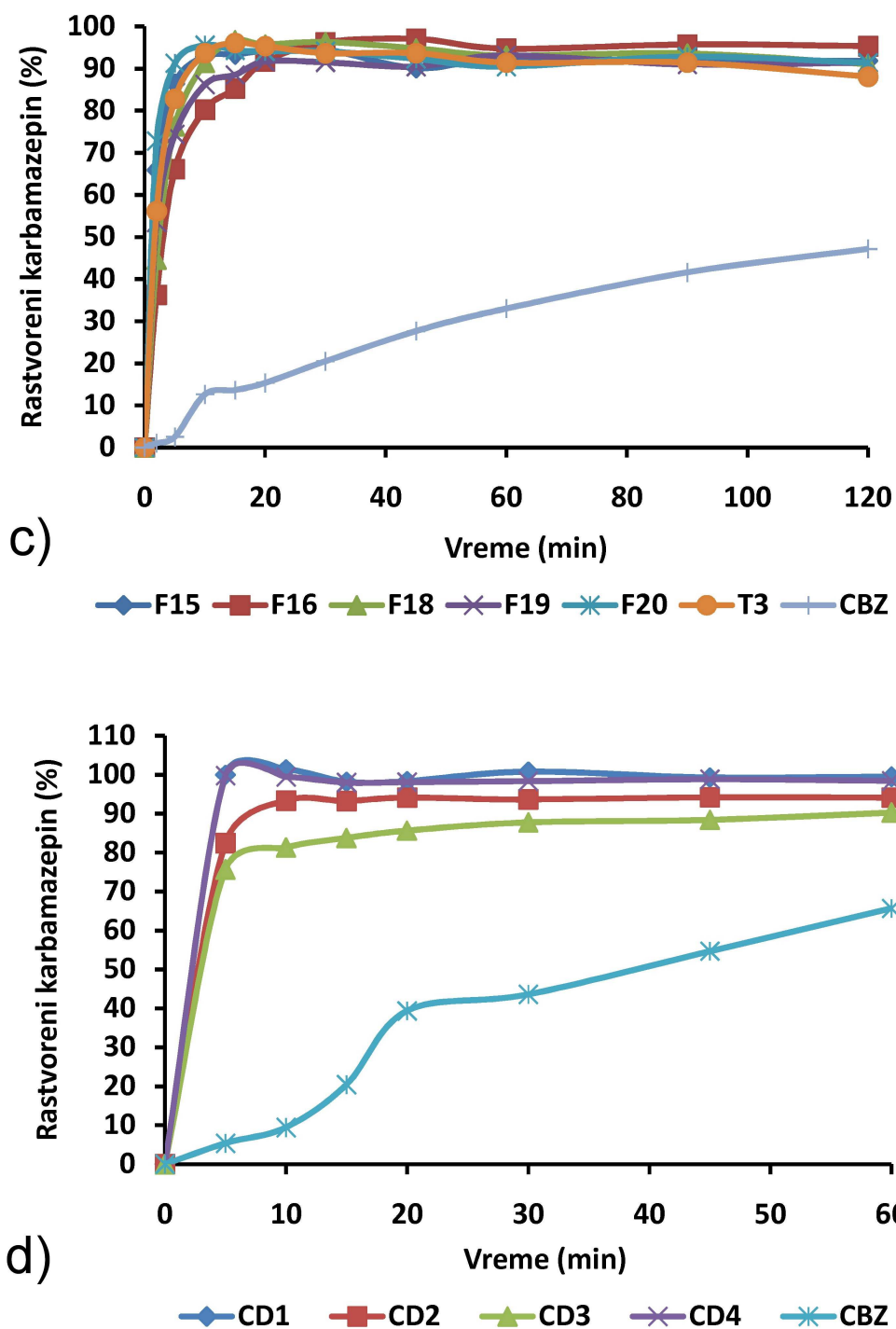
Rezultati tri faze istraživanja pokazuju da se binarne i ternarne čvrste disperzije, kao i sistemi lekovita supstanca-ciklodekstrin i lekovita supstanca-ciklodekstrin-hidrofilni polimer mogu uspešno primeniti u cilju povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. Uporedni prikaz profila brzine rastvaranja formulacija iz kojih je postignuto najbrže rastvaranje karbamazepina (više od 80% rastvorenog karbamazepina tokom prvih 10 minuta ispitivanja), a dobijene su primenom navedenih formulacionih pristupa dat je na slici 41. Prilikom tumačenja dobijenih rezultata treba imati u vidu da uzorci korišćeni za ispitivanje brzine rastvaranja, dobijeni primenom gore navedenih različitih formulacionih pristupa, nisu sadržali istu količinu karbamazepina. Ova razlika je naročito izražena u slučaju formulacija izrađenih uz korišćenje hidroksipropil- β -ciklodekstrina, gde zbog visokog masenog odnosa hidroksipropil- β -ciklodekstrin: karbamazepin nije bilo moguće ispitivanje uzoraka koji sadrže ekvivalentnu količinu karbamazepina.

Brojni su faktori koje je potrebno razmotriti prilikom odabira odgovarajućeg formulacionog pristupa za povećanje brzine rastvaranja lekovite supstance. Sa prikazanih profila može se uočiti da je iz svih odabranih formulacija postignuto veoma brzo rastvaranje karbamazepina, gde je više od 90% karbamazepina rastvoreno tokom prvih 15 minuta ispitivanja. U slučaju formulacija F10 i F20 (ternarne karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrste disperzije), CD1 (ternarni karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-Soluplus[®] sistem) i CD4 (binarni karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin sistem) zabeleženo je da se više od 90% karbamazepina rastvara već tokom prvih 5 minuta ispitivanja. Na osnovu samih profila brzine rastvaranja nije moguće napraviti izbor između korišćenih pristupa za povećanje brzine rastvaranja karbamazepina.

Veoma važan faktor koji treba imati u vidu prilikom odabira odgovarajućeg formulacionog pristupa sigurno predstavlja i količina pomoćnih materija koja je potrebna kako bi se postiglo željeno povećanje brzine rastvaranja lekovite supstance. Ovo može naročito predstavljati problem kod formulacije farmaceutskih oblika sa visokodoziranim lekovitim supstancama, u koje spada i sam karbamazepin (inicijalna



Slika 41. Profili brzine rastvaranja odabranih formulacija (a) binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija, (b) i (c) ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija i (d) karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin binarnih i karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer ternarnih sistema



Slika 41. Nastavak

doza 100-200 mg, uobičajena doza održavanja 0,8-1,2 g, podeljeno u 2-4 doze (Martindale 36th ed., 2009)). U slučaju binarnih karbamazepin-poloksamer i ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija postignuto je brzo

rastvaranje karbamazepina, čak i kod formulacija koje su sadržale oko 50% karbamazepina (formulacija binarnih karbamazepin-poloksamer 188 čvrstih disperzija u masenom odnosu 1:1 i formulacija F16 ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija), što ove sisteme čini pogodnim za formulaciju farmaceutskih oblika za peroralnu primenu sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina. Ipak, pre formulacije finalnih farmaceutskih oblika neophodno je razmotriti i protočne i kompresibilne osobine dobijenih uzoraka i eventualni dodatak pomoćnih materija u cilju poboljšanja ovih osobina. Iako je kod binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-Soluplus® sistema postignuto izuzetno brzo rastvaranje karbamazepina, značajno ograničenje njihove primene predstavlja nizak udeo karbamazepina u formulacijama koji se nalazi u rasponu od 5,3 do 7,7% (m/m). Ovo u velikoj meri ograničava primenu dobijenih binarnih i ternarnih sistema za formulaciju farmaceutskih oblika za peroralnu primenu koji sadrže terapijski relevantnu količinu karbamazepina. Navedeno ograničenje ne umanjuje značaj samog istraživanja, pošto dobijeni rezultati predstavljaju korisnu osnovu za razvoj formulacija sa hidroksipropil- β -ciklodekstrinom i niskodoziranih lekovitih supstancama slične hemijske strukture kao karbamazepin, sa ili bez dodatka hidrofilnih polimera.

Osobine same tehnike koja se primenjuje za izradu formulacija namenjenih za povećanje brzine rastvaranja lekovite supstance takođe predstavljaju značajan faktor za odabir odgovarajućeg formulacionog pristupa. Veoma je važno da sama tehnika izrade bude lako primenljiva, kako na laboratorijskom nivou, omogućavajući razvoj preparata, tako i na industrijskom nivou, pri proizvodnji velike količine preparata. U prikazanom istraživanju za izradu binarnih i ternarnih čvrstih disperzija primenjene su tehnike koje su pogodne za primenu na laboratorijskom nivou u ranim fazama razvoja preparata. Iako do sada nisu poznate ekvivalentne tehnike koje se primenjuju na industrijskom nivou, njihov razvoj nije nemoguć i može se očekivati u slučaju da farmaceutska industrija pronađe ekonomski interes za to. Sa druge strane, tehnika sušenja raspršivanjem, koja je primenjena za izradu binarnih i ternarnih sistema sa hidroksipropil- β -ciklodekstrinom, predstavlja dobro poznat proces, kako u farmaceutskoj tako i u drugim oblastima industrije. I pored velikog broja procesnih parametara koji utiču na karakteristike finalnog proizvoda, tokom dugo godina primene

ove tehnike akumuliralo se dosta informacija, koje u velikoj meri olakšavaju optimizaciju samog procesa. Dostupnost uređaja različite veličine omogućava primenu ove tehnike, kako na laboratorijskom tako i na industrijskom nivou. Izbor odgovarajućeg rastvarača, koji je često neophodan prilikom izrade čvrstih disperzija i lekovita supstanca-ciklodekstrin sistema takođe predstavlja veoma značajan faktor pri ovakvim razmatranjima. Primena organskih rastvarača, iako često neophodna, nosi sa sobom probleme vezane za obezbeđenje odgovarajućih bezbednosnih uslova u proizvodnji, mogućnost zaostatka rezidua u proizvodu, kao i visoku cenu samih rastvarača. Sa te strane metod topljenja, primenjen u izradi karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija i tehnika sušenja raspršivanjem primenjena u izradi binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema predstavljaju pogodne opcije, imajući u vidu da ne zahtevaju primenu organskih rastvarača. Izrada ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija zahteva primenu organskih rastvarača, što predstavlja nedostatak ove tehnike. Ipak izborom etanola kao rastvarača koji se prema ICHQ3 (ICH Q3 guideline, 2011) smernici svrstava u klasu 3 organskih rastvarača (organski rastvarači sa niskim toksičnim potencijalom) značajno je smanjen rizik vezan za mogućnost štetnih uticaja na zdravlje pacijenata i operatera u proizvodnji.

Nakon svega navedenog teško je doneti zaključak o izboru optimalnog formulacionog pristupa sa ciljem povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. Zbog visoke doze u kojoj se primenjuje karbamazepin, prednost treba dati formulaciji binarnih i ternarnih čvrstih disperzija, dok binarni lekovita supstanca-ciklodekstrin i ternarni lekovita supstanca-ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistemi predstavljaju dobro rešenje za niskodozirane teško rastvorljive lekovite supstance. Prilikom razvoja proizvodnog procesa na industrijskom nivou, izbor optimalnog formulacionog pristupa dominantno mogu odrediti i raspoloživa oprema i proizvodni kapaciteti.

5. ZAKLJUČAK

U prvoj fazi istraživanja, poloksamer 188 i poloksamer 407 su uspešno primenjeni u formulaciji binarnih čvrstih disperzija sa teško rastvorljivom lekovitom supstancom karbamazepinom. U izradi čvrstih disperzija primenjen je postupak dispergovanja karbamazepina u otopljenom poloksameru. U svim izrađenim uzorcima binarnih čvrstih disperzija, bez obzira na odnos karbamazepin:poloksamer, zabeleženo je prisustvo karbamazepina u kristalnom obliku. Veoma je značajna činjenica da je u svim uzorcima čvrstih disperzija karbamazepin bio prisutan u polimorfnom obliku III (monoklinični oblik), koji predstavlja termodinamički najstabilniji polimorfni oblik karbamazepina pod ambijentalnim uslovima i koji je kao takav prema Evropskoj farmakopeji jedino prihvatljiv za formulaciju farmaceutskih oblika. Na osnovu rezultata fizičko-hemijske karakterizacije može se zaključiti i da diferencijalna skenirajuća kalorimetrija nije pogodna metoda za otkrivanje fizičkog stanja karbamazepina u binarnim karbamazepin-poloksamer čvrstim disperzijama, usled promene fizičkog stanja karbamazepina pod uticajem povišene temperature primenjene tokom ispitivanja. Primenom simulacije molekularne dinamike uočena je težnja molekula karbamazepina ka stvaranju intermolekulskih interakcija i agregaciji, što zajedno sa odsustvom karbamazepin-poloksamer interakcija, zabeleženim primenom FT-IR spektroskopije, predstavlja moguće objašnjenje za uočenu kristalnu prirodu karbamazepina u čvrstim disperzijama. Formulacijom binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija postignuto je značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina u poređenju sa čistim karbamazepinom. Tako se za 10 minuta ispitivanja rastvorilo više od 80% karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa poloksamerom 188 i 57-67% karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa poloksamerom 407, dok se iz uzoraka čistog karbamazepina rastvorilo tek oko 15% ove lekovite supstance. Primenom poloksamera 188 postignuto je brže rastvaranje karbamazepina u odnosu na čvrste disperzije izrađene sa poloksamerom 407, pri čemu je za rastvaranje 90% od ukupne količine karbamazepina u uzorcima bilo potrebno oko 15 minuta u slučaju karbamazepin-poloksamer 188 čvrstih disperzija, a do 60 minuta u slučaju karbamazepin-poloksamer 407 čvrstih disperzija. Sa povećanjem udela poloksamera zabeleženo je smanjenje brzine rastvaranja karbamazepina, što može biti posledica

gelirajućih osobina poloksamera i stvaranja gel sloja oko čestica karbamazepina. Veoma je značajno da je najveći stepen povećanja brzine rastvaranja karbamazepina postignut pri relativno visokim masenim udelima karbamazepina (50%), čime je olakšana formulacija konačnih farmaceutskih oblika pogodnih za peroralnu primenu. Zbog prisustva karbamazepina u termodinamički najstabilnijem kristalnom obliku, ne očekuju se problemi u obezbeđivanju dugoročne stabilnosti binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija, što često ograničava širu komercijalnu primenu čvrstih disperzija.

U drugoj fazi istraživanja, tehnike D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše i veštačkih neuronskih mreža tipa višeslojnog perceptrona prvi put su primenjene u kombinaciji u razvoju čvrstih disperzija i to na primeru ternarnih karbamazepin-Soluplus[®]-poloksamer 188 čvrstih disperzija. Iz izrađenih ternarnih čvrstih disperzija postignuto je značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina, u poređenju sa čistim karbamazepinom i odabranim uzorkom fizičkih smeša. Tako se kod 11 od 22 pripremljene formulacije u toku prvih 10 minuta ispitivanja rastvorilo više od 80% od ukupne količine karbamazepina u uzorcima. Željeno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina postignuto je i kod ternarnih čvrstih disperzija sa relativno visokim udelima karbamazepina od oko 50%. Primenom eksperimentalnog dizajna smeše i veštačkih neuronskih mreža razvijeni su modeli koji pokazuju zavisnost između udela komponenata u ispitivanim ternarnim čvrstim disperzijama i količine rastvorenog karbamazepina (%) nakon 10 (Q_{10}) i 20 minuta (Q_{20}) ispitivanja. Primenom D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše utvrđeno je da kubni model najbolje opisuje zavisnost između ispitivanih promenljivih, dok je u slučaju modela veštačkih neuronskih mreža tipa višeslojnog perceptrona, kao model koji najbolje opisuje zavisnost između ispitivanih promenljivih identifikovana mreža sa tri neurona u skrivenom sloju, hiperboličnom aktivacionom funkcijom i vrednostima za brzinu učenja od 0,6 i *momentum* od 0,3. Pokazano je da na odabrane parametre (Q_{10} i Q_{20}) najveći uticaj imaju udeli karbamazepina i poloksamera 188. Na osnovu vrednosti koeficijenata determinacije (eksperimentalne vs. predviđene vrednosti) iznad 0,95, pokazano je da dobijeni modeli dobro opisuju zavisnost između ispitivanih promenljivih. Model veštačkih neuronskih mreža pokazao je bolju sposobnost predviđanja na test setu podataka, što pokazuje viša vrednost izračunatog koeficijenta determinacije na test setu

podataka za model veštačkih neuronskih mreža ($R^2=0,978$) u odnosu na model dobijen primenom eksperimentalnog dizajna smeše ($R^2=0,741$). Fizičko-hemijskom karakterizacijom odabranih uzoraka ternarnih čvrstih disperzija pokazano je da je u svim uzorcima karbamazepin prisutan u kristalnom obliku i to u termodinamički najstabilnijem polimorfnom obliku III. Vrsta rastvarača korišćenog u izradi čvrstih disperzija pokazala je značajan uticaj na strukturu dobijenih disperzija, pri čemu je primenom metanola omogućen nastanak čvrste disperzije sa amorfnim karbamazepinom u kojima je udeo karbamazepina viši nego što je to moguće postići primenom etanola. Takođe, pokazano je da se dodatkom poloksamera 188 olakšava kristalizacija karbamazepina u ternarnim čvrstim disperzijama.

Primenom hidroksipropil- β -ciklodekstrina postignuto je značajno povećanje rastvorljivosti karbamazepina, pri čemu je postignut linearan rast rastvorljivosti karbamazepina (0,56-102,20 mmol/l) sa porastom koncentracije hidroksipropil- β -ciklodekstrina (0-40% m/v). Na osnovu dobijenog dijagrama fazne rastvorljivosti može se pretpostaviti da karbamazepin i hidroksipropil- β -ciklodekstrin grade inkluzioni kompleks u stehiometrijskom odnosu 1:1. Dodatak hidrofilnih polimera (Soluplus[®], Metolose[®] 90SH-100 i Metolose[®] 65SH-1500) doveo je do porasta rastvorljivosti karbamazepina u rastvorima hidroksipropil- β -ciklodekstrina od oko 1,5 puta, u odnosu na same vodene rastvore hidroksipropil- β -ciklodekstrina, dok dodatak Kollidon[®]-a 25 nije imao značajnog uticaja na rastvorljivost karbamazepina u rastvorima hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je dodatak hidrofilnih polimera (Soluplus[®], Metolose[®] 90SH-100 i Metolose[®] 65SH-1500) efikasan način za povećanje efikasnosti kompleksiranja u sistemu karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, pri čemu je postignuto povećanje efikasnosti kompleksiranja od 1,5 puta u odnosu na binarne karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin sisteme. Simulacijom molekularne dinamike u ternarnom karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidroksipropilmetilceluloza sistemu pokazano je su specifične interakcije između molekula hidroksipropilmetilceluloze i molekula karbamazepina koji disosuju iz kompleksa sa hidroksipropil- β -ciklodekstrinom odgovorne za povećanje rastvorljivosti karbamazepina u ternarnom sistemu u odnosu na binarni karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin sistem. Uočene interakcije

najverovatnije sprečavaju formiranje dimera karbamazepina, što je prvi korak u procesima nukleacije i rasta kristala. Tehnikom sušenja raspršivanjem iz vodenih rastvora dobijeni su binarni karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarni karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistemi u obliku praška. Iz dobijenih binarnih i ternarnih sistema postignuto je značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina, kako u odnosu na čistu lekovitu supstancu tako i u odnosu na odgovarajuće fizičke smeše. Najveća brzina rastvaranja karbamazepina postignuta je iz formulacija binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-Soluplus[®] sistema, gde je celokupna količina karbamazepina rastvorena već nakon 5 minuta ispitivanja. Kod formulacija izrađenih sa oba tipa hidroksipropilmetilceluloze (Metolose[®] 90SH-100 i Metolose[®] 65SH-1500) zabeleženo nešto sporije i nepotpuno rastvaranje karbamazepina i to naročito kod formulacije izrađene sa tipom hidroksipropilmetilceluloze koji daje rastvore većeg viskoziteta (Metolose[®] 65SH-1500), gde je za rastvaranje više od 90% karbamazepina bilo potrebno oko 60 minuta. Fizičko-hemijskom karakterizacijom dobijenih uzoraka pokazano je da je u svim formulacijama dobijenim sušenjem raspršivanjem, karbamazepin prisutan u amorfnom obliku, što može ukazati na formiranje inkluzionih kompleksa sa hidroksipropil- β -ciklodekstrinom. Uočeno je da između karbamazepina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina dolazi do hemijskih interakcija koje mogu imati značajnu ulogu u nastanku i stabilizaciji karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin inkluzionih kompleksa. Na osnovu dobijenih rezultata teško je izvesti definitivni zaključak o mehanizmu kojim ispitivani hidrofilni polimeri povećavaju solubilizacioni kapacitet hidroksipropil- β -ciklodekstrina za karbamazepin. Rezultati simulacije molekularne dinamike ukazuju na interakciju između karbamazepina koji disosuje iz karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin kompleksa i hidroksipropilmetilceluloze, što sprečava kristalizaciju rastvorenog karbamazepina. Iako se dobijeni rezultati simulacije molekularne dinamike ne mogu uzeti kao nepobitni dokaz kojim se objašnjava ispitivani fenomen, oni svakako doprinose boljem razumevanju ispitivanog fenomena i predstavljaju korisnu dopunu rezultatima eksperimentalnih tehnika.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se formulacija binarnih karbamazepin-poloksamer čvrstih disperzija, ternarnih karbamazepin-Soluplus®-poloksamer 188 čvrstih disperzija, kao i binarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i ternarnih karbamazepin-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema mogu koristiti kao formulacioni pristupi za povećanje brzine rastvaranja teško rastvorljive lekovite supstance karbamazepina. Primenom ovih formulacionih pristupa postignuto je značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina, pri čemu se zbog relativno visoke doze u kojoj se primenjuje karbamazepin prednost može dati formulaciji binarnih i ternarnih čvrstih disperzija, kod kojih se željeno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina postiže i pri relativno visokim udelima karbamazepina od oko 50%. Formulacija binarnih lekovita supstanca-ciklodekstrin i ternarnih lekovita supstanca-ciklodekstrin-hidrofilni polimer sistema predstavljaju pogodne formulacione pristupe za povećanje brzine rastvaranja niskodoziranih lekovitih supstanci.

6. LITERATURA

1. Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharm Biomed Anal.* 2000; 22(5):717-727.
2. Aldhubiab B. Prediction of melting point lowering in eutectic mixtures. PhD Thesis. The University of Arizona, Arizona, SAD, 2010.
3. Aleksić I, Duriš J, Ilić I, Ibrić S, Parojčić J, Srčić S. In silico modeling of in situ fluidized bed melt granulation. *Int J Pharm.* 2014; 466(1-2):21-30.
4. Ali W, Williams AC, Rawlinson CF. Stochiometrically governed molecular interactions in drug: poloxamer solid dispersions. *Int J Pharm.* 2010; 391(1-2):162-168.
5. Amani A, York P, Chrystyn H, Clark BJ, Do DQ. Determination of factors controlling the particle size in nanoemulsions using Artificial Neural Networks. *Eur J Pharm Sci.* 2008; 35(1-2):42-51.
6. Ambrogi V, Perioli L, Marmottini F, Accorsi O, Pagano C, Ricci M, Rossi C. Role of mesoporous silicates on carbamazepine dissolution rate enhancement. *Micropor Mesopor Mater.* 2008; 113(1-3):445-452.
7. Armstrong NA. *Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation*, Second Edition. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006.
8. Barmpalexis P, Kanaze FI, Kachrimanis K, Georgarakis E. Artificial neural networks in the optimization of a nimodipine controlled release tablet formulation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010; 74(2):316-323.
9. Basalious EB, Shawky N, Badr-Eldin SM. SNEDDS containing bioenhancers for improvement of dissolution and oral absorption of lacidipine. I: development and optimization. *Int J Pharm.* 2010; 391(1-2):203-211.

10. Behme RJ, Brooke D. Heat of fusion measurement of a low melting polymorph of carbamazepine that undergoes multiple-phase changes during differential scanning calorimetry analysis. *J Pharm Sci* 1991; 80(10):986-990.
11. Bley H, Fussnegger B, Bodmeier R. Characterization and stability of solid dispersions based on PEG/polymer blends. *Int J Pharm.* 2010; 390(2):165-173.
12. Bolten D, Türk M. Micronisation of carbamazepine through rapid expansion of supercritical solution. *J Supercrit Fluid.* 2012; 66:389-397.
13. Breitenbach J. Melt extrusion: from process to drug delivery technology. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002; 54(2):107-117.
14. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59(7):645-666.
15. Cabana A, Aït-Kadi A, Juhász J. Study of the gelation process of polyethylene oxide(a)-polypropylene oxide(b)-polyethylene oxide, copolymer (poloxamer 407) aqueous solutions. *J Colloid Interf Sci.* 1997; 190(2):307-312.
16. Carpenter JC, Hoffman ME. Understanding neural network approximations and polynomial approximations helps neural network performance. *AI Expert.* 1995; 10:31-33.
17. Castro SG, Bruni SS, Lanusse CE, Allemandi DA, Palma SD. Improved Albendazole Dissolution Rate in Pluronic 188 Solid Dispersions. *AAPS PharmSciTech.* 2010; 11(4):1518-1525.
18. Chieng N, Hubert M, Saville D, Rades R, Aaltonen J. Formation Kinetics and Stability of Carbamazepine-Nicotinamide Cocrystals Prepared by Mechanical Activation. *Cryst Growth Des.* 2009; 9(5):2377-2386.
19. Chiou WL, Riegelman S. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *J Pharm Sci.* 1971; 60(9):1281-1302.

20. Chutimaworapan S, Ritthidej GC, Yonemochi E, Oguchi T, Yamamoto K. Effect of Water-Soluble Carriers on Dissolution Characteristics of Nifedipine Solid Dispersions. *Drug Dev Ind Pharm.* 2000; 26(11):1141–1150.
21. Collett JH. Poloxamer. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, eds. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. sixth ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London, Chicago, 2009.
22. Corrigan OI, Stanley CT. Mechanism of drug dissolution rate enhancement from beta-cyclodextrin-drug systems. *J Pharm Pharmacol.* 1982; 34(10):621-626.
23. Craig DQM. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. *Int J Pharm.* 2002; 231(2):131-144.
24. Crowley MM, Zhang F, Repka MA, Thumma S, Upadhye SB, Battu SK, McGinity JW, Martin C. Pharmaceutical applications of hot-melt extrusion: Part I. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007; 33(9):909-926.
25. Cui Y. Using molecular simulations to probe pharmaceutical materials. *J Pharm Sci.* 2011; 100(6):2000-2019.
26. Dal Pozzo A, Donzelli G, Rodriguez L, Tajana A. “In vitro” model for the evaluation of drug distribution and plasma protein-binding relationships. *Int J Pharm.* 1989; 50(2):97-101.
27. Dejaegher B, Heyden YV. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 56(2):141-158.
28. Design-Expert 7.1 User’s Guide. Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA, 2007.
29. DiNunzio JC, Brough C, Hughey JR, Miller DA, Williams RO, McGinity JW. Production of advanced solid dispersions for enhanced bioavailability of itraconazole using KinetiSol[®] Dispersing. *Drug Dev Ind Pharm.* 2010a; 36(9):1064-1078.

30. DiNunzio JC, Brough C, Hughey JR, Miller DA, Williams RO, McGinity JW. Applications of KinetiSol[®] Dispersing for the production of plasticizer free amorphous solid dispersions. *Eur J Pharm Sci.* 2010b; 40(3):179-187.
31. DiNunzio JC, Brough C, Hughey JR, Miller DA, Williams RO, McGinity JW. Fusion production of solid dispersions containing a heat-sensitive active ingredient by hot melt extrusion and Kinetisol[®] dispersing. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010c; 74(2):340-351.
32. Djekic L, Ibric S, Primorac M. The application of artificial neural networks in the prediction of microemulsion phase boundaries in PEG-8 caprylic/capric glycerides based systems. *Int J Pharm.* 2008; 361(1-2):41-46.
33. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res.* 2006; 23(12):2709-2728.
34. Đuris J, Ibric S, Djuric Z. Experimental design application and interpretation in pharmaceutical technology. In: Đuris J, ed. *Computer-aided applications in pharmaceutical technology*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 2013a.
35. Đuris J, Ibric S, Djuric Z. Neural computing in pharmaceutical products and process development. In: Đuris J, ed. *Computer-aided applications in pharmaceutical technology*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 2013b.
36. Đuris J, Ioannis N, Ibric S, Djuric Z, Kachrimanis K. Effect of composition in the development of carbamazepine hot-melt extruded solid dispersions by application of mixture experimental design. *J Pharm Pharmacol.* 2014b; 66(2):232-243.
37. Đuriš J, Medarević Đ, Krstić M, Vasiljević I, Mašić I, Ibrić S. Design space approach in optimization of fluid bed granulation and tablets compression process. *ScientificWorldJournal.* 2012; 2012:185085.
38. Đuris J, Vasiljevic D, Jokic S, Ibric S. Application of D-optimal experimental design method to optimize the formulation of O/W cosmetic emulsions. *Int J Cosmet Sci.* 2014a; 36(1):79-87.

39. Durrant JD, McCammon JA. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol.* 2011; 9:71.
40. El-Malah Y, Nazzal S, Khanfar NM. D-Optimal Mixture Design: Optimization of Ternary Matrix Blends for Controlled Zero-Order Drug Release From Oral Dosage Forms. *Drug Dev Ind Pharm.* 2006; 32(10):1207-1218.
41. FDA/CDER Guidance for industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, MD, 2000.
42. Figueiras A, Sarraguca JMG, Pais ACC, Carvalho RA, Veiga JF. The role of L-arginine in the inclusion complexes of omeprazole with cyclodextrin. *AAPS PharmSciTech.* 2010; 11(1):233-240.
43. Furlanetto S, Cirri M, Piepel G, Mennini N, Mura P. Mixture experiment methods in the development and optimization of microemulsion formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 55(4):610-617.
44. Fusco S, Borzacchiello A, Netti PA. Perspectives on: PEO-PPO-PEO triblock copolymers and their biomedical applications. *J Bioact Compat Pol* 2006; 21(2):149-164.
45. Gaillard P, Carrupt PA, Testa B, Boudon A. Molecular lipophilicity potential, a tool in 3D QSAR: method and applications. *J Comput Aided Mol Design.* 1994; 8(2):83-96.
46. Gasperlin M, Tusar L, Tusar M, Smid-Korbar J, Zupan J, Kristl J. Viscosity prediction of lipophilic semisolid emulsion systems by neural network modelling. *Int J Pharm.* 2000; 196(1):37-50.
47. Ghareeb MM, Abdulrasool AA, Hussein AA, Noordin MI. Kneading Technique for Preparation of Binary Solid Dispersion of Meloxicam with Poloxamer 188. *AAPS PharmSciTech.* 2009; 10(4):1206-1215.

48. Gibson M, ed. Pharmaceutical preformulation and formulation: A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form, 2nd edition. Informa Healthcare USA, Inc. New York, 2009.
49. Gilis PA, De Conde V, Vandecruys R, inventors. Beads having a core coated with an antifungal and a polymer. Janssen Pharmaceutica NV. US patent 5 633 015, 1997.
50. Gramera RE, Caimi RJ. Cyclodextrin polyethers and their production. US Patent 3 459 731, 1969.
51. Grzesiak AL, Lang M, Kim K, Matzger AJ. Comparison of the four anhydrous polymorphs of carbamazepine and the crystal structure of form I. J Pharm Sci. 2003; 92(11):2260-2271.
52. Hardung H, Djuric D, Ali S. Combining HME & solubilization: Soluplus[®]-the solid solution. Drug Deliv Technol. 2010; 10(3).
53. He C, Kim SW, Lee DS. In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. J Control Release. 2008; 127(3):189-207.
54. Higuchi T, Connors KA. Phase-solubility techniques. Adv Anal Chem Instrum. 1965; 4:117-212.
55. Holm R, Jensen IH, Sonnergaard J. Optimization of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) using a D-optimal design and the desirability function. Drug Dev Ind Pharm. 2006; 32(9):1025-1032.
56. Hörter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. Adv Drug Deliv Rev. 2001; 46(1-3):75-87.
57. Hsu SH, Leu YL, Hu JW, Fang JY. Physicochemical characterization and drug release of thermosensitive hydrogels composed of a hyaluronic acid/pluronic F127 graft. Chem Pharm Bull. 2009; 57(5):453-458.

58. Huang YB, Tsai YH, Yang WC, Chang JS, Wu PC, Takayama K. Once-daily propranolol extended-release tablet dosage form: formulation design and in vitro/in vivo investigation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 58(3):607-614.
59. Hughey JR, Keen JM, Brough C, Saeger S, McGinity JW. Thermal processing of a poorly water-soluble drug substance exhibiting a high melting point: The utility of KinetiSol® Dispersing. *Int J Pharm.* 2011; 419(1-2):222-230.
60. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD-Visual Molecular Dynamics. *J Molec Graphics.* 1996; 14(1):33-38.
61. Huynh L, Grant J, Leroux JC, Delmas P, Allen C. Predicting the solubility of the anti-cancer agent docetaxel in small molecule excipients using computational methods. *Pharm Res.* 2008; 25(1):147-157.
62. Ibrić S, Djuriš J, Parojčić J, Djurić Z. Artificial Neural Networks in Evaluation and Optimization of Modified Release Solid Dosage Forms. *Pharmaceutics.* 2012; 4(4):531-550.
63. Ibrić S, Jovanović M, Djurić Z, Parojčić J, Solomun L. 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 Release.* 2002b; 82(2-3):213-222.
64. Ibrić S. Primena veštačkih neuronskih mreža u formulaciji tableta sa kontrolisanim oslobađanjem acetilsalicilne kiseline, doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, 2002a.
65. ICHQ3(R5), Impurities guideline for residual solvents, International Conference on Harmonisation, Geneva, 2011.
66. Ivić B, Ibrić S, Cvetković N, Petrović A, Trajković S, Djurić Z. Application of design of experiments and multilayer perceptrons neural network in the optimization of diclofenac sodium extended release tablets with Carbopol 71G. *Chem Pharm Bull.* 2010; 58(7):947-949.

67. Jadid MN, Fairbairn DR. Predicting moment-curvature parameters from experimental data. *Eng Appl Artif Intell*. 1996; 9(3):303-319.
68. Janssens S, De Armas HN, Roberts C, Van den Mooter G. Characterization of Ternary Solid Dispersions of Itraconazole, PEG 6000, and HPMC 2910 E5. *J Pharm Sci*. 2008a; 97(6):2110-2120.
69. Janssens S, Roberts C, Smith EF, Van den Mooter G. Physical stability of ternary solid dispersions of itraconazole in polyethyleneglycol 6000/hydroxypropylmethylcellulose 2910 E5 blends. *Int J Pharm*. 2008b; 355(1-2):100-107.
70. Jones OA, Voulvoulis N, Lester JN. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res*. 2002; 36(20):5013-5022.
71. Jumaa M, Kleinebudde P, Müller BW. Mixture experiments with the oil phase of parenteral emulsions. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998; 46(2):161-167.
72. Jun SW, Kim MS, Kim JS, Park HJ, Lee S, Woo JS, Hwang SJ. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007; 66(3):413-421.
73. Karanth H, Shenoy VS, Murthy RR. Industrially Feasible Alternative Approaches in the Manufacture of Solid Dispersions: A Technical Report. *AAPS PharmSciTech* 2006; 7(4): E31–E38.
74. Karavas E, Georgarakis E, Sigalas MP, Avgoustakis K, Bikiaris D. Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug-polymer interactions. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007; 66(3):334-347.
75. Karekar P, Vyas V, Shah M, Sancheti P, Pore Y. Physicochemical investigation of the solid dispersion systems of etoricoxib with poloxamer 188. *Pharm Dev Techn*. 2009; 14(4): 373-379.

76. Khougaz K, Clas SD. Crystallization Inhibition in Solid Dispersions of MK-0591 and Poly(vinylpyrrolidone) Polymers. *J Pharm Sci* 2000; 89(10):1325-1334.
77. Kipouros K, Kachrimanis K, Nikolakakis I, Tserki V, Malamataris S. Simultaneous Quantification of Carbamazepine Crystal Forms in Ternary Mixtures (I, III and IV) by Diffuse Reflectance FTIR Spectroscopy (DRIFTS) and Multivariate Calibration. *J Pharm Sci.* 2006; 95(11):2419-2431.
78. Kobayashi Y, Ito S, Itai S, Yamamoto K. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate. *Int J Pharm* 2000; 193(2):137-146.
79. Kolašinac N, Kachrimanis K, Homšek I, Grujić B, Djuric Z, Ibrić S. Solubility enhancement of desloratadine by solid dispersion in poloxamers. *Int J Pharm.* 2012; 436(1-2):161-170.
80. Kolter K, Karl M, Nalawade S, Rottmann N. Hot-Melt Extrusion with BASF Pharma Polymers-Extrusion Compendium, 2nd edition. BASF SE, 2011.
81. Kou W, Cai C, Xu S, Wang H, Liu J, Yang D, Zhang T. In vitro and in vivo evaluation of novel immediate release carbamazepine tablets: complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the presence of HPMC. *Int J Pharm.* 2011; 409(1-2):75-80.
82. Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharm.* 2013; 453(1):167-180.
83. Leuner C, Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000; 50(1):47-60.
84. Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. *Pharmaceutical Experimental Design*. Marcel Dekker, New York, Basel, 1999.
85. Li FQ, Hu JH, Deng JX, Su H, Xu S, Liu JY. In vitro controlled release of sodium ferulate from Compritol 888 ATO-based matrix tablets. *Int J Pharm.* 2006; 324:152-157.

86. Lim H. Dissolution and Solubility Enhancement of the Poorly Water Soluble Drug by Forming Solid Dispersion with a Novel Polymeric Solubilizer (Soluplus[®]). PhD Thesis. University of Maryland, Baltimor, SAD, 2012.
87. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 46(1-3):3-26.
88. Liu L, Guo QX. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2002; 42(1-2):1-14.
89. Loftsson T, Brewster ME, Másson M. Role of Cyclodextrins in Improving Oral Drug Delivery. *Am J Drug Deliv.* 2004; 2(4):261-275.
90. Loftsson T, Brewster ME. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. *J Pharm Sci.* 2012; 101(9):3019-3032.
91. Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J Pharm Pharmacol.* 2010; 62(11):1607-1621.
92. Loftsson T, Hreinsdóttir D, Másson M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm.* 2005; 302(1-2):18-28.
93. Loftsson T, Magnúsdóttir A, Másson M, Sigurjónsdóttir JF. Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs. *J Pharm Sci.* 2002; 91(11):2307-2316.
94. Loftsson T, Másson M, Brewster ME. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J Pharm Sci.* 2004; 93(5):1091-1099.
95. Lust A, Laidmäe I, Palo M, Meos A, Aaltonen J, Veski P, Heinämäki J, Kogermann K. Solid-state dependent dissolution and oral bioavailability of piroxicam in rats. *Eur J Pharm Sci.* 2013; 48(1-2):47-54.
96. Mady FM, Abou-Taleb AE, Khaled KA, Yamasaki K, Iohara D, Ishiguro T, Hirayama F, Uekama K, Otagiri M. Enhancement of the aqueous solubility and masking

the bitter taste of famotidine using drug/SBE-beta-CyD/povidone K30 complexation approach. *J Pharm Sci.* 2010; 99(10):4285-4294.

97. Marsac PJ, Li T, Taylor LS. Estimation of drug-polymer miscibility and solubility in amorphous solid dispersions using experimentally determined interaction parameters. *Pharm Res* 2009; 26(1):139-151.

98. Martindale: The Complete Drug Reference, Thirty-sixth edition. Pharmaceutical Press. London, Chicago, 2009.

99. Meller J. Molecular Dynamics. Encyclopedia of life sciences (eLS), Wiley, 2001.

100. Miguélez Morán AM. Roller compaction of pharmaceutical ingredients: on the understanding of the compaction and the use of knowledge based applications in the formulation of tablets. PhD Thesis. Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany, 2009.

101. Mihajlovic T, Ibric S, Mladenovic A. Application of design of experiments and multilayer perceptron neural network in the optimization of spray drying process. *Dry Technol.* 2011; 29(14):1638-1647.

102. Miletić T, Ibrić S, Durić Z. Combined Application of Experimental Design and Artificial Neural Networks in Modeling and Characterization of Spray Drying Drug: Cyclodextrin Complexes. *Dry Technol.* 2014; 32(2):167-179.

103. Milović M, Djuriš J, Djekić Lj, Vasiljević D, Ibrić S. Characterization and evaluation of solid self-microemulsifying drug delivery systems with porous carriers as systems for improved carbamazepine release. *Int J Pharm.* 2012; 436(1-2):58-65.

104. Momany F, Rone R. Validation of the general purpose QUANTA[®]/CHARMm[®] force field. *J Comput Chem.* 1992; 13(7):888-900.

105. Moneghini M, Voinovich D, Perissutti B, Princivale F. Action of Carriers on Carbamazepine Dissolution. *Pharm Dev Technol.* 2002; 7(3):289-296.

106. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem.* 1998; 19(14):1639-1662.
107. Mura P, Faucci MT, Bettinetti GP. The influence of polyvinylpyrrolidone on naproxen complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Eur J Pharm Sci.* 2001; 13(2):187-194.
108. Murphy D, Rodríguez-Cintrón F, Langevin B, Kelly RC, Rodríguez-Hornedo N. Solution-mediated phase transformation of anhydrous to dihydrate carbamazepine and the effect of lattice disorder. *Int J Pharm.* 2002; 246(1-2):121-134.
109. Nagy ZK, Balogh A, Vajna B, Farkas A, Patyi G, Kramarics A, Marosi G. Comparison of electrospun and extruded Soluplus[®]-based solid dosage forms of improved dissolution. *J Pharm Sci.* 2012; 101(1):322-332.
110. Nair R, Gonen S, Hoag SW. Influence of polyethylene glycol and povidone on the polymorphic transformation and solubility of carbamazepine. *Int J Pharm.* 2002; 240(1-2):11-22.
111. Newa M, Bhandari KH, Li DX, Kwon TH, Kim JA, Yoo BK, Woo JS, Lyoo WS, Yong CS, Choi HG. Preparation, characterization and in vivo evaluation of ibuprofen binary solid dispersions with poloxamer 188. *Int J Pharm.* 2007; 343(1-2):228-237.
112. Newa M, Bhandari KH, Oh DH, Kim YR, Sung JH, Kim JO, Woo JS, Choi HG, Yong CS. Enhanced Dissolution of Ibuprofen Using Solid Dispersion with Poloxamer 407. *Arch Pharm Res.* 2008; 31(11):1497-1507.
113. Okonogi S, Oguchi T, Yonemochi E, Puttipipatkachorn S, Yamamoto K. Improved dissolution of ofloxacin via solid dispersion. *Int J Pharm.* 1997; 156(2):175-180.
114. Olsson IM. Experimental Designs at the Crossroads of Drug Discovery. PhD Thesis. Umeå University, Umeå, Švedska, 2006.

115. Otsuka M, Hasegawa H, Matsuda Y. Effect of polymorphic transformation during the extrusion-granulation process on the pharmaceutical properties of carbamazepine granules. *Chem Pharm Bull.* 1997; 45(5):894-898.
116. Papadimitriou SA, Barmapalexis P, Karavas E, Bikiaris DN. Optimizing the ability of PVP/PEG mixtures to be used as appropriate carriers for the preparation of drug solid dispersions by melt mixing technique using artificial neural networks: I. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012; 82(1):175-186.
117. Park CW, Tung NT, Rhee YS, Kim JY, Oh TO, Ha JM, Chi SC, Park ES. Physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluations of novel ternary solid dispersion of rebamipide with poloxamer 407. *Drug Dev Ind Pharm* 2013; 39(6):836-844.
118. Parojčić J, Ibrić S, Djurić Z, Jovanović M, Corrigan OI. 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.* 2007; 30(3-4):264-272.
119. Patel AD, Agrawal A, Dave RH. Development of polyvinylpyrrolidone-based spray-dried solid dispersions using response surface model and ensemble artificial neural network. *J Pharm Sci.* 2013; 102(6):1847-1858.
120. Paudel A, Worku ZA, Meeus J, Guns S, Van den Mooter G. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. *Int J Pharm.* 2013; 453(1):253-284.
121. Pedretti A, Villa L, Vistoli G. VEGA: A versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. *J Mol Graph.* 2002; 21(1):47-49.
122. Perucca E, Tomson T. The pharmacological treatment of epilepsy in adults. *Lancet Neurol.* 2011; 10(5):446-456.
123. Petrović J, Chansanroj K, Meier B, Ibrić S, Betz G. Analysis of fluidized bed granulation process using conventional and novel modeling techniques. *Eur J Pharm Sci.* 2011; 44(3):227-234.

124. Petrović J, Ibrić S, Betz G, Đurić Z. Optimization of matrix tablets controlled drug release using Elman dynamic neural networks and decision trees. *Int J Pharm.* 2012; 428(1-2):57-67.
125. Petrović J. Karakterizacija hidrofilnih i lipidnih matriks tableta sa kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance primenom *in silico* metoda, doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, 2010.
126. Phillips J, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel R, Kale L, Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 2005; 26(16):1781-1802.
127. Prabhu AA, Venkatesh G, Rajendiran N. Unusual spectral shifts of imipramine and carbamazepine drugs. *J Fluoresc.* 2010; 20(6):1199-1210.
128. Qian F, Tao J, Desikan S, Hussain M, Smith RL. Mechanistic Investigation of Pluronic[®] Based Nano-crystalline Drug-polymer Solid Dispersions. *Pharm Res.* 2007; 24(8):1551-1560.
129. Rambali B, Verreck G, Baert L, Massart DL. Itraconazole Formulation Studies of the Melt-Extrusion Process with Mixture Design. *Drug Dev Ind Pharm.* 2003; 29(6):641-652.
130. Rane Y, Mashru R, Sankalia M, Sankalia J. Effect of Hydrophilic Swellable Polymers on Dissolution Enhancement of Carbamazepine Solid Dispersions Studied Using Response Surface Methodology. *AAPS PharmSciTech.* 2007; 8(2):E1-E11.
131. Ribeiro L, Loftsson T, Ferreira D, Veiga F. Investigation and physicochemical characterization of vinpocetine-sulfobutyl ether beta-cyclodextrin binary and ternary complexes. *Chem Pharm Bull.* 2003; 51(8):914-922.
132. Rustichelli C, Gamberini G, Ferioli V, Gamberini M. C, Ficarra R, Tommasini S. Solid-state study of polymorphic drugs: carbamazepine. *J Pharm Biomed Anal.* 2000; 23(1):41-54.

133. Sancheti PP, Vyas VM, Shah M, Karekar P, Pore YV. Development and characterization of bicalutamide-poloxamer F68 solid dispersion systems. *Pharmazie*. 2008; 63(8):571-575.
134. Sekiguchi K, Obi N. Studies on absorption of eutectic mixtures. I. A comparison of the behavior of eutectic mixtures of sulphathiazole and that of ordinary sulphathiazole in man. *Chem. Pharm. Bull.* 1961; 9:866-872.
135. Serajuddin AT. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *J Pharm Sci.* 1999; 88(10):1058-1066.
136. Sethia S, Squillante E. Physicochemical Characterization of Solid Dispersions of Carbamazepine Formulated by Supercritical Carbon Dioxide and Conventional Solvent Evaporation Method. *J Pharm Sci.* 2002; 91(9):1948-1957.
137. Shah T, Amin AF, Parikh JR, Parikh RH. Process Optimization and Characterization of Poloxamer Solid Dispersions of a Poorly Water-soluble Drug. *AAPS PharmSciTech.* 2007; 8(2):E1-E7
138. Shamma RN, Basha M. Soluplus[®]: A novel polymeric solubilizer for optimization of Carvedilol solid dispersions: Formulation design and effect of method of preparation. *Powder Technol.* 2013; 237:406-414.
139. Sharma PK, Bhatia SR. Effect of anti-inflammatories on Pluronic[®] F127: micellar assembly, gelation and partitioning. *Int J Pharm.* 2004; 278(2):361-377.
140. Shen Y, Lu F, Hou J, Shen Y, Guo S. Incorporation of paclitaxel solid dispersions with poloxamer 188 or polyethylene glycol to tune drug release from poly(ϵ -caprolactone) films. *Drug Dev Ind Pharm* 2013; 39(8):1187-1196.
141. Smith JS, MacRae RJ, Snowden MJ. Effect of SBE-7- β -cyclodextrin complexation on carbamazepine release from sustained release beads. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005; 60(1):73-80.

142. Smithey D, Gao P, Taylor L. Amorphous solid dispersions: an enabling formulation technology for oral delivery of poorly water soluble drugs. *AAPS Newsmag*. 2013; 16:11-14.
143. Spina E, Perugi G. Antiepileptic drugs: indications other than epilepsy. *Epileptic Disord*. 2004; 6(2):57-75.
144. Statistica Neural Networks User manual, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD, 1998.
145. Stieger N, Aucamp M, Zhang SW, De Villiers MM. Hot-stage Optical Microscopy as an Analytical Tool to Understand Solid-state Changes in Pharmaceutical Materials. *American Pharmaceutical Review*, 2012.
146. Sun Y, Peng Y, Chen Y, Shukla AJ. Application of artificial neural networks in the design of controlled release drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 55(9):1201-1215.
147. Takagi T, Ramachandran C, Bermejo M, Yamashita S, Yu LX, Amidon GL. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Mol Pharmaceut*. 2006; 3(6):631-643.
148. Tawde V, Chivate A, Potnis V, Mahajan N, Schmeller T. Solubility Enhancement of Simvastatin with Use of Novel Polymeric Solubilizer Soluplus[®]. 39th CRS Annual Meeting, July 15-18, 2012, Quebec City, Canada, 2012.
149. Taylor LS, Zografi G. Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions. *Pharm Res*. 1997; 14(12):1691-1698.
150. Tian JL, Zhao YZ, Jin Z, Lu CT, Tang QQ, Xiang Q, Sun CZ, Zhang L, Xu YY, Gao HS, Zhou ZC, Li XK, Zhang Y. Synthesis and characterization of Poloxamer 188-grafted heparin copolymer. *Drug Dev Ind Pharm*. 2010; 36(7):832-838.
151. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem*. 2010; 31(2):455-461.

152. Tuckerman M, Berne BJ, Martyna GJ. Reversible multiple time scale molecular dynamics. *J Chem Phys.* 1992; 97(3):1990-200.
153. The United States Pharmacopeia 38-National Formulary 33 (USP 38-NF 33). The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, SAD, 2015.
154. Van Speybroeck M, Barillaro V, Do Thi T, Mellaerts R, Martens J, Van Humbeeck J, Vermant J, Annaert P, Van Den Mooter G, Augustijns P. Ordered Mesoporous Silica Material SBA-15: A Broad-Spectrum Formulation Platform for Poorly Soluble Drugs. *J Pharm Sci.* 2009; 98(8):2648-2658.
155. Varshosaz J, Ghaffari S, Khoshayand MR, Atyabi F, Dehkordi AJ, Kobarfard F. Optimization of freeze-drying condition of amikacin solid lipid nanoparticles using D-optimal experimental design. *Pharm Dev Technol.* 2012; 17(2):187-194.
156. Vasconcelos T, Sarmento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov Today.* 2007; 12(23-24):1068-1075.
157. Vipagunta SR, Wang Z, Hornung S, Krill SL. Factors affecting the formation of eutectic solid dispersions and their dissolution behavior. *J Pharm Sci.* 2007; 96(2):294-304.
158. Vo CL, Park C, Lee BJ. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013; 85(3):799-813.
159. Wang M, Rutledge GC, Myerson AS, Trout BT. Production and Characterization of Carbamazepine Nanocrystals by Electrospraying for Continuous Pharmaceutical Manufacturing. *J Pharm Sci.* 2012; 101(3):1178-1188.
160. Wesolowski M, Suchacz B. Artificial Neural Networks: Theoretical Background and Pharmaceutical Applications: A Review. *J AOAC Int.* 2012; 95(3):652-668.
161. Woolfson AD, Umrethia ML, Kett VL, Malcolm RK. Freeze-dried, mucoadhesive system for vaginal delivery of the HIV microbicide, dapivirine: optimisation by an artificial neural network. *Int J Pharm.* 2010; 388(1-2):136-143.

162. Xiang TX, Anderson BD. A molecular dynamics simulation of reactant mobility in an amorphous formulation of a peptide in poly(vinylpyrrolidone). *J Pharm Sci.* 2003; 93(4):855-876.
163. Yin SX, Franchini M, Chen J, Hsieh A, Jen S, Lee T, Hussain M, Smith R. Bioavailability enhancement of a COX-2 inhibitor, BMS-347070, from a nanocrystalline dispersion prepared by spray-drying. *J Pharm Sci.* 2005; 94(7):1598-1607.
164. Zerrouk N, Chemtob C, Arnaud P, Toscani S, Dugue J. In vitro and in vivo evaluation of carbamazepine-PEG 6000 solid dispersions. *Int J Pharm.* 2001a; 225(1-2):59-62.
165. Zerrouk N, Toscani S, Gines-Dorado JM, Chemtob C, Ceólin R, Dugué J. Interactions between carbamazepine and polyethylene glycol (PEG) 6000: characterisations of the physical, solid dispersed and eutectic mixtures. *Eur J Pharm Sci.* 2001b; 12(4):395-404.
166. Zhang HY, Feng W, Li C, Tan TW. Investigation of the inclusions of puerarin and daidzin with β -cyclodextrin by molecular dynamics simulation. *J Phys Chem B.* 2010; 114(14):4876-4883.
167. Zhang K, Yu H, Luo Q, Yang S, Lin X, Zhang Y, Tian B, Tang X. Increased dissolution and oral absorption of itraconazole/Soluplus extrudate compared with itraconazole nanosuspension. *Eur J Pharm Sci.* 2013; 85(3):1285-1292.
168. Zhang X, Sun N, Wu B, Lu Y, Guan T, Wu W. Physical characterization of lansoprazole/PVP solid dispersion prepared by fluid-bed coating technique. *Powder Technol.* 2008; 182:480-485.
169. Zhang ZH, Dong HY, Peng B, Liu HF, Li CL, Liang M, Pan WS. Design of an expert system for the development and formulation of push-pull osmotic pump tablets containing poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm.* 2011; 410(1-2):41-47.
170. Zhao H, Caflisch A. Molecular dynamics in drug design. *Eur J Med Chem.* 2015; 91:4-14.

7. PRILOZI

7.1. Spisak publikovanih radova i saopštenja koji čine deo doktorske disertacije

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)

1. Medarević Dj, Kachrimanis K, Djurić Z, Ibrić S. Influence of hydrophilic polymers on the complexation of carbamazepine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Eur J Pharm Sci.* 2015; 78:273-285. (M21) *IF 3,350/2014*

Radovi u međunarodnim časopisima (M23)

1. Medarević Dj, Kachrimanis K, Mitrić M, Djuriš J, Djurić Z, Ibrić S. Dissolution rate enhancement and physicochemical characterization of carbamazepine-poloxamer solid dispersions. *Pharm Dev Technol.* 2015; *in press*, doi:10.3109/10837450.2014.996899 (M23) *IF 1,202/2014*

2. Medarević DP, Kleinebudde P, Djuriš J, Djurić Z, Ibrić S. Combined application of mixture experimental design and artificial neural networks in the solid dispersion development. *Drug Dev Ind Pharm.* 2015; *in press*, doi:10.3109/03639045.2015.1054831 (M23) *IF 2,101/2014*

Rad u naučnom časopisu (M53)

1. Medarević Đ, Ibrić S, Đuriš J, Đurić Z. Primena čvrstih disperzija u farmaceutskoj tehnologiji: postupci izrade i metode karakterizacije. *Arh. farm.* 2013; 63:473-493.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

1. Medarević Dj, Kachrimanis K, Mitrić M, Ibrić M. Preparation and characterization of carbamazepine-poloxamer solid dispersions. 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisbon/Portugal, March 31-April 3, 2014.

2. Medarević Đ, Kleinebudde P, Bekčić K, Đurić Z, Ibrić S. Application of mixture experimental design and artificial neural networks in the development of ternary carbamazepine-Soluplus[®]-poloxamer 188 solid dispersions. 10th Central European

Symposium on Pharmaceutical Technology, Portorož/Slovenia, September 18 – 20, 2014. Farm vest. 2014; 65:63-65. (rad izložen u obliku usmene prezentacije)

3. Medarević Đ, Kleinebudde P, Djuris J, Đurić Z, Ibrić S. Physicochemical characterization of ternary carbamazepine-Soluplus[®]-poloxamer 188 solid dispersions. 10th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Portorož/Slovenia, September 18 – 20, 2014. Farm vestn. 2014; 65:166-168.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

1. Medarević Đ, Ibrić S, Đurić Z. Uticaj dodatka hidrofilnih polimera na solubilizaciju karbamazepina hidroksipropil- β -ciklodekstrinom i efikasnost kompleksiranja. VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem Beograd, 15-19. oktobar 2014. Zbornik sažetaka, 383-385. (nagrađen rad u okviru poster sesije)

7.2. Biografija autora

Dorđe Medarević je rođen 14.10.1987. godine u Novom Pazaru. Osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera završio je u Raški, kao nosilac Vukove diplome i učenik generacije Gimnazije Raška. Školske 2006/07. godine upisao je integrisane akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i iste završio 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,82. Školske 2011/12. godine upisao je doktorske akademske studije, modul Farmaceutska tehnologija na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Položio je sve ispite predviđene programom navedenog modula doktorskih akademskih studija, sa prosečnom ocenom 9,85. Od novembra 2011. godine, zaposlen je na realizaciji nacionalnog projekta TR 34007: „Razvoj proizvoda i tehnologija koje obezbeđuju željeno oslobađanje lekovitih supstanci iz čvrstih farmaceutskih oblika”, prvo u zvanju istraživač pripravnik, a zatim u zvanju istraživač saradnik. Učestvovao je i u realizaciji dva međunarodna projekta i to: bilateralnog projekta između Republike Srbije i SR Nemačke: „Primena mašinskog učenja u razvoju prostora za dizajn u razvoju čvrstih farmaceutskih oblika”, kao i projekta „Linking Industry and Academia in Teaching Pharmaceutical Development and Manufacture” (LIAT-Ph), finansiranog od strane Evropske unije. Do sada je u dva navrata boravio na stručnom usavršavanju u inostranstvu: 2012. godine na Institutu za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutskog fakulteta Aristotelovog Univerziteta u Solunu, Grčka, kod prof. dr Kirjakosa Kahrmanisa i 2013. godine na Institutu za farmaciju i biofarmaciju Farmaceutskog fakulteta, Hajnrih Hajne Univerziteta u Dizeldorfu, SR Nemačka, kod prof. dr Pitera Klajnebudea. Autor je i koautor 3 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 5 radova u međunarodnim časopisima (M23), 2 rada u naučnim časopisima (M53), 6 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u celini (M33), od čega jedno usmeno izlaganje i 3 saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampanih u izvodu (M64). Dobitnik je druge nagrade za poster prezentaciju u okviru sesije „Uticaj dizajna formulacije na efekte aktivnih supstanci” na VI Kongresu farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, održanom u Beogradu od 15-19.10.2014. godine. Nakon obavljenog pripravničkog staža, 2014. godine je položio stručni ispit za magistre farmacije. Učestvuje u izvođenju praktične nastave iz više predmeta na integrisanim akademskim, doktorskim akademskim i specijalističkim studijama na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Ђорђе Медаревић

број индекса 4/11

Изјављујем

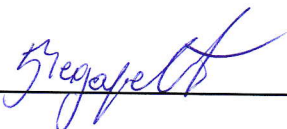
да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација и оптимизација бинарних и тернарних чврстих дисперзија и циклодекстрин-полимер система као носача у циљу побољшања брзине растварања тешко растворљиве лековите супстанце

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

Потпис докторанда

У Београду, 2.9.2015. године



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: Ђорђе Медаревић

Број индекса: 4/11

Студијски програм: Докторске академске студије, модул: Фармацеутска технологија

Наслов рада: **Карактеризација и оптимизација бинарних и тернарних чврстих дисперзија и циклодекстрин-полимер система као носача у циљу побољшања брзине растварања тешко растворљиве лековите супстанце**

Ментор: проф. др. Светлана Ибрић

Потписани: Ђорђе Медаревић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 2.9.2015. године



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Карактеризација и оптимизација бинарних и тернарних чврстих дисперзија и циклодекстрин-полимер система као носача у циљу побољшања брзине растварања тешко растворљиве лековите супстанце

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 2.9.2015. године

