

UNIVERZITET CRNE GORE  
MEDICINSKI FAKULTET

Gordana Stanojević

**PRIMJENA ODABRANIH TEHNIKA 3D  
ŠTAMPE U IZRADI TABLETA ZA  
PERSONALIZOVANU TERAPIJU**

Doktorska disertacija

Podgorica, 2024. godine

UNIVERSITY OF MONTENEGRO  
FACULTY OF MEDICINE

Gordana Stanojević

**APPLICATION OF SELECTED 3D  
PRINTING TECHNIQUES IN THE  
MANUFACTURE OF TABLETS FOR  
PERSONALIZED THERAPY**

Doctoral Dissertation

Podgorica, 2024.

## **PODACI O DOKTORANDU, MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE**

### **Doktorand**

**Ime i prezime:** Gordana Stanojević

**Datum rođenja:** 27.11.1989. godine

**Naziv završenog studijskog programa i godina završetka:** Farmaceutski fakultet  
Univerziteta Crne Gore, 2013. godine

### **Mentor**

Prof. dr Svetlana Ibrić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet  
(Katedra za Farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju)

### **Komisija za ocjenu podobnosti doktorske teze i kandidata**

Prof. dr Zorica Potpara, vanredni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet  
Podgorica (Studijski program Farmacija)

Prof. dr Jelena Đuriš, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet  
(Katedra za Farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju)

Prof. dr Svetlana Ibrić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet  
(Katedra za Farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju)

### **Komisija za ocjenu i odbranu doktorske disertacije**

Prof. dr Zorica Potpara, vanredni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet  
Podgorica (Studijski program Farmacija)

Prof. dr Svetlana Ibrić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet  
(Katedra za Farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju)

Prof. dr Nataša Duborija Kovačević, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski  
fakultet Podgorica (studijski program Medicina)

### **Datum odbrane:**

11.03.2024. godine

*Izražavam veliku zahvalnost svojoj mentorki prof. dr Svetlani Ibrić na nesebičnoj pomoći, dragocjenim savjetima i idejama i za svu podršku i optimizam koji mi je pružila tokom cijelog toka mog naučno-istraživačkog rada.*

*Dugujem zahvalnost kolegi dr sc. Đorđu Medareviću sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na stručnoj pomoći i korisnim savjetima u ispitivanju uzoraka i tumačenju rezultata primjenom polarizacione mikroskopije i DSC analize.*

*Posebno se zahvaljujem divnoj koleginici mr ph. spec. Ivani Adamov sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na nesebičnoj podršci i pomoći, saradnji i razumijevanju u toku sprovođenja eksperimentalnog rada.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, braći i supruhu za razumijevanje, strpljenje, vjeru, odricanje i svu ljubav i podršku koju su mi pružili. Zato ovu doktorsku disertaciju posvećujem njima.*

*Gordana*



## **PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI**

**Naziv doktorskih studija:** Doktorske akademske studije Univerziteta Crne Gore, Medicinski fakultet, Doktorski studijski program Farmacija

**Naslov doktorske disertacije:** Primjena odabranih tehnika 3D štampe u izradi tableta za personalizovanu terapiju

**Datum prijave doktorske teze:** 12.09.2019. godine.

**Datum sjednice Senata Univerziteta Crne Gore na kojoj je prihvaćena teza:** 12.03.2020. godine

### **Rezime/Izvod iz teze:**

**Uvod:** 3D štampanje je aditivna tehnologija proizvodnje pomoću koje se objekti formiraju od materijala koji se nanose u slojevima, na osnovu digitalnih, kompjuterskih modela. Odsdora, 3D štampanju je pažnju počela da posvećuje i farmaceutska industrija, prevashodno zbog nevjerovatnog potencijala koji ova tehnologija pokazuje u oblastima personalizovane terapije i izrade terapijskih različitih oblika i veličina, sa različitim profilima oslobađanja ljevovite supstance.

**Ciljevi:** Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje mogućnosti primjene tehnika digitalnog projektovanja svjetlosti (DLP) i selektivnog laserskog sinterovanja (SLS) u izradi tableta za personalizovanu terapiju. Cilj prve faze eksperimentalnog rada je ispitivanje pogodnosti različitih fotoinicijatora za izradu tableta DLP tehnikom, i podešavanja procesnih parametara koji će omogućiti uspješno štampanje tableta. Takođe je ispitan uticaj vrste fotoinicijatora na brzinu oslobađanja model ljevovite supstance atomoksetin iz štampanih tableta. Dalje je ispitana mogućnost dobijanja željenog (od trenutnog do produženog) profila brzine oslobađanja atomoksetina primjenom vještačkih neuronskih mreža, kroz modifikaciju debljine tableta i udjela ljevovite supstance. Treća faza eksperimentalnog rada ima za cilj da ispita mogućnost izrade tableta primjenom SLS tehnike 3D štampe, i da se uporede fizičko-hemijske i farmaceutsko-tehnološke karakteristike tableta izrađenih pomoću 3D štampe i metode direktne kompresije primjenom simulatora kompakcije.

**Metode:** Za izradu tableta, korišteni su komercijalno dostupni štampači koji rade na principu digitalnog projektovanja svjetlosti (*Wanhao Duplicator 7* i *Wanhao Duplicator 8*) i selektivnog laserskog sinterovanja (*Sintratec Kit*). Za modelovanje profila oslobađanja lijekovite supstance iz DLP tableta su korišćene dvije različite vrste neuronskih mreža. Prvo su, kao nenadgledana vještačka neuronska mreža, korišćene samoorganizujuće mape (engl. *self-organizing map* (SOM)), u cilju sticanja boljeg uvida u uticaj ulazno promjenljivih na profil oslobađanja lijekovite supstance iz DLP tableta. Za razvoj i vizuelizaciju SOM primijenjen je Peltarion® softver (Synapse, Švedska). U drugom pristupu, za razvoj modela koji bi omogućio predviđanje oslobađanja atomoksetina iz DLP tableta korišćena je generalizovana regresiona neuronska mreža (GRNM). Ova mreža izgrađena je pomoću TIBCO Statistica® softvera, verzija 13.5.0 (StatSoft Inc). Za simulaciju kompresije smješe koja je takođe štampana u tablete primjenom SLS štampača upotrijebljen je simulator kompakcije Gamlen (*Gamlen Tableting*).

**Rezultati:** Rezultati prve faze istraživanja pokazali su printabilnost tableta atomoksetina primjenom DLP 3D štampača. U sastav formulacije su ulazili PEGDA, PEG400 i voda, a kao fotoinicijatori su korišteni difenil fosfin oksid (DPPO) i riboflavin. Na odštampanim tabletama izvršena je analiza dimenzija, mase, sadržaja atomoksetina, kao i brzine oslobađanja. Pokazalo se da se primjenom DPPO kao fotoinicijatora dobijaju tablete pravilnijih dimenzija pri manje zahtjevnim uslovima štampanja, na osnovu čega je napravljen izbor formulacije i procesnih parametara koji su korišteni u drugoj fazi istraživanja. U drugoj fazi istraživanja, pokazano je da je kroz variranje debljine tableta i procentualnog udjela lijekovite supstance moguće postići dobijanje željenog profila brzine oslobađanja lijekovite supstance, od trenutnog do modifikovanog. Izrađene su serije tableta sa rasponom doza od 2.06 mg to 37.48 mg, ukazujući na potencijal dobijanja tableta sa dozom lijeka prilagođenom potrebama pacijenta. Najmanja količina lijekovite supstance inkorporirana u izrađene tablete (2.06 mg) ukazuje na potencijal primjene DLP tehnike za izradu niskodoziranih lijekova. Dodatno, primjenom vještačkih neuronskih mreža razvijen je model za predviđanje profila oslobađanja lijekovite supstance iz tableta dobijenih DLP tehnikom (vrijednosti faktora sličnosti profila oslobađanja iznosile su 51.05, odnosno 70.13, što pokazuje da su profili oslobađanja predviđeni vještačkim neuronskim mrežama slični onima koji su dobijeni eksperimentalnim putem). Rezultati

analiza diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC), difrakcije X zraka na prašku (XRPD) i mikroskopije pokazali su da je atomoksetin ostao u tabletama u kristalnoj formi, dok je Fourier-ova transformaciona infracrvena spektroskopija (FTIR) potvrdila da nije došlo do interakcije između atomoksetina i polimera. Rezultati treće faze istraživanja pokazali su printabilnost tableta atomoksetina SLS tehnikom 3D štampe, uz izbor odgovarajućeg sredstva za dopunjavanje i parametara procesa štampanja, i to temperature komore štampača i brzine lasera. Kako se povećava brzina lasera i smanjuje gustina energije, dolazi do manjeg stepena sinterovanja čestica praška i posljedično do formiranja interčestičnih pora, što je uočeno i na SEM mikrografijama ispitivanih tableta. Rezultati FTIR analize pokazali su da nije došlo do intermolekularnih interakcija u izrađenim tabletama. DSC i XRPD analizom ustanovljeno je da atomoksetin ostaje u izrađenim tabletama u kristalnom obliku. Tablete dobijene pomoću SLS štampača su u pogledu mehaničkih i disolucionih osobina upoređene sa tabletama izrađenim iz iste smjese na simulatoru kompakcije, i na osnovu profila oslobađanja odnosno proračuna faktora sličnosti, dokazana je sličnost profila brzine rastvaranja atomoksetina iz tableta dobijenih pomoću ovih tehnika, ukazujući na mogućnost njihove međusobne zamjenljivosti.

**Zaključak:** DLP i SLS tehnikama 3D štampe moguće je uspješno izraditi tablete atomoksetina sa različitim sadržajem ljekovite supstance i različitim profilima oslobađanja lijeka. Modifikovanjem sastava formulacije, dimenzija tableta i parametara, odnosno uslova štampanja, moguće je izraditi tablete sa različitim sadržajem i profilom oslobađanja ljekovite supstance, te na taj način prilagoditi sadržaj i brzinu oslobađanja lijeka potrebama individualnog pacijenta. Uticaj formulacionih faktora i procesnih parametara na osobine tableta izrađenih DLP i SLS tehnikama 3D štampe je složen i mahom nelinearan. Za svaku formulaciju potrebno je prilagoditi sastav i parametre štampanja, u cilju dobijanja tableta željenih karakteristika.

**Ključne riječi:** trodimenzionalno (3D) štampanje; aditivna proizvodnja; digitalno projektovanje svjetlosti (DLP); selektivno lasersko sinterovanje (SLS); personalizovana terapija; vještačke neuronske mreže.

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija

**UDK broj:**

## **DATA ON THE DOCTORAL DISSERTATION**

**Name of doctoral studies:** Doctoral academic studies at the University of Montenegro, Faculty of Medicine, Doctoral study program Pharmacy

**Doctoral thesis title:** Application of selected 3D printing techniques in the manufacture of tablets for personalized therapy

**Thesis application date:** 12.09.2019.

**Thesis acceptance date (UoM Senate Session):** 12.03.2020.

### **Abstract/Thesis Overview:**

**Introduction:** Three-dimensional (3D) printing is an additive manufacturing technology in which objects are created from materials that are applied in layers, based on digital, computer models. Recently, the pharmaceutical industry has begun to pay attention to 3D printing, primarily because of the revolution this technology introduced in terms of personalized dosing and the development of dosage forms of specific shapes and dimensions, with different release profiles.

**Objectives:** The objective of this doctoral dissertation is to investigate the possibility of applying the techniques of digital light projection (DLP) and selective laser sintering (SLS) in the production of tablets for personalized therapy. The first phase of the experiment aims to test the suitability of different photoinitiators for tablet production using the DLP technique. It also aims to determine the process parameters that will enable successful tablet printing. The influence of the type of photoinitiator on the release rate of the model substance atomoxetine from printed tablets was also examined. Furthermore, using artificial neural networks, the possibility of obtaining a desired (from immediate to prolonged) profile of the release rate of atomoxetine was examined by modifying the tablet's thickness and drug loading. As part of the third phase of the experiment, it will be examined whether the SLS technique of 3D printing can be applied to tablet production; also, the physical, chemical and pharmaceutical-technological characteristics of tablets manufactured using SLS technique and direct compression (using a compaction simulator) will be compared.

**Methods:** Tablets were manufactured using commercially available printers based on digital light projection (*Wanhao Duplicator 7* and *Wanhao Duplicator 8*) and selective laser sintering (*Sintratec Kit*). To model the release profile of the active substance from DLP tablets, two types of neural networks were used. To gain a better understanding of how input variables influence the release profile of drug substances from DLP tablets, we used self-organizing maps (SOM) as an unsupervised artificial neural network. For the development and visualization of the SOM, Peltarion<sup>®</sup> software (*Synapse, Sweden*) was used. A generalized regression neural network (GRNM) was used to develop a model that could predict the release of atomoxetine from DLP tablets in another approach. This network was constructed using the TIBCO Statistica<sup>®</sup> software, version 13.5.0 (*StatSoft Inc*). The Gamlen tablet press was used to simulate the direct compression of the mixture, which was also printed into tablets using an SLS printer.

**Results:** The first phase of the research demonstrated that atomoxetine tablets can be printed using a DLP 3D printer. In addition to PEGDA, PEG400 and water, diphenylphosphine oxide (DPPO) and riboflavin were used as photoinitiators. Following successful printing, the tablets were characterized in terms of their dimensions, mass, drug loading and release rate. By using DPPO as a photoinitiator, tablets of more regular dimensions can be obtained under less demanding printing conditions, which led to the selection of formulation and process parameters for the second phase of the research. During the second phase of the research, it was demonstrated that by varying the thickness of the tablet and drug loading, the desired release profiles of the active substance could be achieved (from immediate to modified). Series of tablets with a dose range from 2.06 mg to 37.48 mg were produced, indicating the potential of obtaining tablets with a dose adjusted to a patient's needs. The smallest amount of active substance incorporated into the manufactured tablets (2.06 mg) indicates the potential of application of the DLP technique in the production of low-dose medicines. Additionally, by applying artificial neural networks, a model for predicting the release profile of the active substance from tablets obtained by the DLP technique was developed (the values of the similarity factor were 51.05 and 70.13, respectively, showing that the release profiles predicted by artificial neural networks are similar to those obtained experimentally). The results of differential scanning calorimetry (DSC), X-ray powder diffraction (XRPD) and microscopy analyses showed that atomoxetine remained in the tablets in crystalline form,

while Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) confirmed that there was no interaction between atomoxetine and polymers. In the third phase of the research, it was found that atomoxetine tablets could be printed using the SLS 3D printing technique by selecting the appropriate matrix components and adjusting the parameters of the printing process, namely the temperature of the printer chamber and the laser speed. According to the results, increasing the laser speed and decreasing the energy density leads to a decrease in the sintering process, resulting in more interparticle pores being created, which was also observed in the SEM micrographs of the examined tablets. Based on the FTIR results, it was concluded that there were no intermolecular interactions in the tested tablets. DSC and XRPD analysis showed that atomoxetine remains in the manufactured tablets in crystalline form. SLS-printed tablets were compared with tablets made from the same mixture on a Gamlen tablet press (simulating direct compression) in terms of mechanical and dissolution properties, as well as in terms of release profiles. As a result of the calculation of the similarity factor, it has been demonstrated that atomoxetine dissolution profiles from tablets manufactured with SLS 3D printer and Gamlen tablet press are similar, indicating the mutual interchangeability of these techniques.

**Conclusion:** By using 3D printing techniques such as DLP and SLS, it is possible to produce atomoxetine tablets with different amount of active substance and release profiles. By modifying the formulation composition, tablet dimensions and parameters, i.e. printing conditions, it is possible to obtain tablets with different amount and release profiles of the active substance, tailored to the needs of the individual patient. The influence of formulation composition and process parameters on the characteristics of 3D printed tablets is complex and mainly non-linear. For each formulation, it is necessary to adjust the composition and printing parameters, in order to obtain tablets with the desired characteristics.

**Keywords:** three-dimensional (3D) printing; additive manufacturing; digital light projection (DLP); selective laser sintering (SLS); personalized therapy; artificial neural networks.

**Scientific field:** Pharmacy

**Narrow scientific field:** Pharmaceutical technology

**UDC number:**

## PREDGOVOR

Svijet se nalazi na pragu četvrte industrijske revolucije, a kao jedan od predvodnika promjena koje ona nosi sa sobom izdvaja se tehnologija aditivne proizvodnje, odnosno trodimenzionalne (3D) štampe. 3D štampa omogućava izradu prilagođenih objekata, kompleksnog oblika i sastava, različitih fizičkih i mehaničkih karakteristika, sloj po sloj, uz uštedu energije i sirovina. Ova tehnologija, nastala 80-ih godina prošlog vijeka, prvenstveno se koristila za proizvodnju prototipova. Danas se koristi u gotovo svim granama industrije, zahvaljujući fleksibilnosti i efikasnosti ovog digitalizovanog koncepta.

Nakon odobrenja prvog 3D štampanog lijeka od strane američke Uprave za hranu i lijekove (Food and Drug Administration, FDA) 2015. godine, tehnologija 3D štampe privukla je pažnju stručne i naučne javnosti, pokazujući potencijal da napravi revolucionarne promjene u oblasti farmacije, odnosno načinu na koji se lijekovi dizajniraju i izrađuju. Poznato je da postoje velike individualne razlike u pogledu odgovora pacijenata na lijekove koje primjenjuju. Cilj koncepta personalizovane terapije jeste da se terapija prilagodi individualnim potrebama pacijenata, zavisno od njegovih osobina, potreba i stanja bolesti, kako bi se postigli željeni terapijski ishodi. Jedan od najvažnijih aspekata personalizovane terapije jeste prilagođavanje doze lijeka pojedinačnom pacijentu. Tradicionalno, tablete se industrijski proizvode u nekoliko jačina, koje su se pokazale pogodnim kod većine pacijenata. Međutim, poznato je da na istu dozu lijeka ne reaguju jednako svi pacijenti, što može biti posledica razlika u genetskom profilu, stanju bolesti, polu, starosnoj dobi, tjelesnoj težini itd. Kao jedna od mogućnosti u ostvarenju personalizovane terapije vidi se upravo tehnologija 3D štampe, na način što će omogućiti proizvodnju malih serija lijekova prilagođenih individualnim karakteristikama i potrebama pacijenata.

U izradi farmaceutskih oblika, do sada su korištene različite tehnike 3D štampe, uključujući modelovanje fuzionim deponovanjem (FDM) zasnovano na ekstruziji materijala, selektivno lasersko sinterovanje (SLS) zasnovano na fuziji čestica praška pod uticajem lasera, kao i fotopolimerizacijom tehnike poput stereolitografije (SLA) i digitalnog projektovanja svjetlosti (DLP). Istraživanje u okviru ove doktorske disertacije obuhvatilo je primjenu DLP i SLS tehnika 3D štampe.

Primjenom DLP tehnike, nakon izbora pogodne formulacije za štampu, dobijene su, osim tableta sa modifikovanim oslobađanjem, tablete sa trenutnim oslobađanjem ljekovite supstance što je po prvi put opisano u literaturi. Primjenom tehnika vještačke inteligencije razvijen je model vještačkih neuronskih mreža za predviđanje profila oslobađanja ljekovite supstance iz tableta dobijenih DLP tehnikom, u zavisnosti od dimenzija tableta i sadržaja ljekovite supstance u njima.

Istraživanje u oblasti SLS tehnike bilo je usmjereno na izbor odgovarajućih parametara formulacije i procesa štampanja koji će omogućiti izradu tableta zadovoljavajućih mehaničkih karakteristika. Izvršena je fizičko-hemijska i farmaceutsko-tehnološka karakterizacija dobijenih SLS tableta. Sa druge strane, primjenom simulatora kompakcije izrađene su tablete istog sastava i njihova mehanička i disoluciona svojstva su upoređena sa karakteristikama tableta dobijenih SLS tehnikom. Dobijeni rezultati govore u prilog činjenici o međusobnoj zamjenljivosti ova dva procesa, od kojih je proces SLS štampanja daleko fleksibilniji što dodatno potvrđuje potencijal koji tehnike 3D štampe imaju u pogledu implementacije koncepta personalizovane terapije.



# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Tehnologija 3D štampe.....	1
1.2 Mogućnosti za primjenu 3D štampe u farmaciji i medicini.....	4
1.2.1 Pretklinički i klinički razvoj lijekova.....	4
1.2.2 Tkivni inženjering.....	6
1.2.3 3D štampa kao osnov za personalizovanu terapiju.....	7
1.2.3.1 Personalizovani terapijski sistemi za topikalnu primjenu.....	9
1.2.3.2 Poboljšanje adherence.....	10
1.2.3.2.1 Poboljšanje adherence kod pedijatrijskih pacijenata.....	10
1.2.3.2.2 Potencijal primjene kod gerijatrijskih pacijenata.....	12
1.2.3.3 Pomoć slabovidim pacijentima.....	14
1.2.3.4 Izrada farmaceutskih oblika kompleksnih geometrija i profila oslobađanja ljekovite supstance.....	15
1.2.3.5 Personalizovana medicinska sredstva i kombinacije lijeka i medicinskog sredstva.....	18
1.3 Izazovi u uvođenju koncepta 3D štampe u rutinsku praksu.....	20
1.4 Podjela tehnika 3D štampe.....	22
1.5 <i>Ink-jet</i> tehnika 3D štampe.....	24
1.5.1 Vrste <i>ink-jet</i> 3D štampe.....	24
1.5.2 Pregled dosadašnjih istraživanja.....	25
1.6 Modelovanje fuzionim deponovanjem (FDM).....	27
1.6.1 Filamenti u FDM 3D štampi.....	28
1.6.2 Pregled dosadašnjih istraživanja.....	30
1.7 Tehnike 3D štampe zasnovane na fotopolimerizaciji.....	36
1.7.1 Polimerizacija i fotopolimerizacija.....	36
1.7.2 Fotoinicijatori.....	38
1.7.3 Materijali za fotopolimerizacione tehnike.....	39
1.7.4 Proces štampanja fotopolimerizacionim tehnikama.....	40
1.7.5 Pregled dosadašnjih istraživanja.....	43
1.8 Selektivno lasersko sinterovanje.....	46
1.8.1 Parametri SLS štampe.....	48
1.8.2 Osobine materijala.....	50

1.8.3	Mehanizmi vezivanja čestica praška .....	50
1.8.4	Pregled dosadašnjih istraživanja .....	52
1.8.5	Prednosti i ograničenja SLS tehnike .....	56
1.9	Vještačke neuronske mreže.....	58
1.9.1	Primjena vještačkih neuronskih mreža u farmaceutskoj tehnologiji.....	61
1.10	Atomoksetin.....	63
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE.....	66
3.	EKSPERIMENTALNI DIO .....	68
3.1	IZBOR ODGOVARAJUĆEG FOTOINICIJATORA ZA DLP 3D ŠTAMPU ....	68
3.1.1	Materijali .....	68
3.1.2	Priprema rastvora fotopolimera.....	69
3.1.3	Štampanje tableta DLP tehnikom.....	69
3.1.4	Karakterizacija tableta.....	71
3.1.4.1	Određivanje fizičkih karakteristika tableta.....	71
3.1.4.2	Određivanje sadržaja atomoksetina u tabletama .....	71
3.1.4.3	Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina iz tableta .....	72
3.1.4.4	Polarizaciona svjetlosna mikroskopija .....	72
3.1.5	REZULTATI I DISKUSIJA .....	73
3.1.5.1	Štampanje tableta.....	73
3.1.5.2	Karakterizacija tableta .....	74
3.1.5.2.1	Fizičke karakteristike tableta i sadržaj atomoksetina.....	74
3.1.5.2.2	Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina iz tableta.....	76
3.1.5.2.3	Polarizaciona svjetlosna mikroskopija.....	78
3.2	POSTIZANJE ŽELJENOG PROFILA BRZINE OSLOBAĐANJA ATOMOKSETINA IZ DLP TABLETA PRIMJENOM VJEŠTAČKIH NEURONSKH MREŽA.....	80
3.2.1	Materijali .....	80
3.2.2	Priprema rastvora fotopolimera.....	80
3.2.3	Štampanje tableta .....	81
3.2.4	Karakterizacija tableta.....	85
3.2.4.1	Određivanje variranja mase i dimenzija .....	85
3.2.4.2	Određivanje mehaničkih karakteristika DLP tableta - test penetracije ...	85
3.2.4.3	Određivanje sadržaja atomoksetina u tabletama .....	85
3.2.4.4	Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina iz DLP tableta.....	86

3.2.4.5 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija .....	87
3.2.4.6 Difrakcija X-zraka na prašku.....	88
3.2.4.7 Polarizaciona svjetlosna mikroskopija .....	89
3.2.4.8 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) .....	89
3.2.4.9 Modelovanje vještačkih neuronskih mreža .....	89
3.2.5 REZULTATI I DISKUSIJA .....	91
3.2.5.1 Štampanje tableta.....	91
3.2.5.2 Izgled, masa, dimenzije tableta i sadržaj atomoksetina.....	92
3.2.5.3 Određivanje mehaničkih karakteristika DLP tableta - test penetracije ...	95
3.2.5.4 Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina iz DLP tableta.....	97
3.2.5.5 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija .....	100
3.2.5.6 Difrakcija X-zraka na prašku.....	102
3.2.5.7 Polarizaciona svjetlosna mikroskopija .....	103
3.2.5.8 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) ...	105
3.2.5.9 Modelovanje vještačkih neuronskih mreža .....	107
3.3 OPTIMIZACIJA IZRADE TABLETA ATOMOKSETINA SLS TEHNIKOM; POREĐENJE TABLETA DOBIJENIH SLS TEHNIKOM SA TABLETAMA IZRAĐENIM DIREKTNOM KOMPRESIJOM POMOĆU SIMULATORA KOMPAKCIJE .....	116
3.3.1 Materijali .....	116
3.3.2 Priprema smješe za izradu tableta .....	117
3.3.3 Izrada tableta primjenom SLS tehnike .....	117
3.3.4 Izrada tableta primjenom simulatora kompakcije .....	119
3.3.5 Ispitivanje karakteristika izrađenih tableta.....	120
3.3.5.1 Određivanje fizičkih i mehaničkih karakteristika.....	120
3.3.5.2 Živina porozimetrija .....	120
3.3.5.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	121
3.3.5.4 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) ...	122
3.3.5.5 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija .....	123
3.3.5.6 Difrakcija X-zraka na prašku.....	123
3.3.5.7 Raspadljivost .....	124
3.3.5.8 Određivanje sadržaja atomoksetina u tabletama .....	125
3.3.5.9 Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina.....	126
3.3.6 REZULTATI I DISKUSIJA .....	127

3.3.6.1 Izrada tableta primjenom SLS tehnike .....	127
3.3.6.2 Izrada tableta primjenom simulatora kompakcije .....	130
3.3.6.3 Određivanje fizičkih i mehaničkih karakteristika tableta .....	132
3.3.6.4 Živina porozimetrija .....	133
3.3.6.5 Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	135
3.3.6.6 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) ...	137
3.3.6.7 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija .....	138
3.3.6.8 Difrakcija X-zraka na prašku.....	140
3.3.6.9 Raspadljivost .....	141
3.3.6.10 Sadržaj atomoksetina u tabletama .....	142
3.3.6.11 Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina.....	142
4. ZAKLJUČCI .....	144
5. LITERATURA .....	146
BIOGRAFIJA.....	161

# 1. UVOD

## 1.1 Tehnologija 3D štampe

Svijet se danas toliko brzo razvija i mijenja da je nemoguće ispratiti sve promjene i postignuća u raznim oblastima. U eri gdje ljudi upravljaju dok roboti rade u fabrikama, sa informacijama koje putuju hiljadama kilometara u djeliću sekunde, gdje možemo komunicirati sa bilo kim na Zemlji u svako doba dana, teško je razumjeti kako su ljudi živjeli prije samo 150 - 200 godina, bez električne energije, sa ručnim alatima kao osnovnim sredstvom za rad i ljudskom snagom kao pokretačkim pogonom. Svaki period u kome je došlo do značajnog napretka u globalnom razvoju ljudske civilizacije bio je usko povezan sa većim stepenom razvoja industrije. Svijet je doživio tri velike industrijske revolucije, pri čemu je svaka od njih promijenila način na koji živimo, radimo i međusobno komuniciramo. Prva industrijska revolucija je otpočela krajem XVIII vijeka, sa pojavom parnih mašina i pretvaranjem manuelnog rada u mehanizovani proces proizvodnje. Za vrijeme druge industrijske revolucije, primjena električne energije omogućila je masovnu proizvodnju, dok je treća bazirana na primjeni elektronike i informacionih tehnologija u cilju automatizacije proizvodnje.

Svijet se trenutno nalazi na pragu četvrte industrijske revolucije, gdje spoj napretka u primjeni tehnologija poput vještačke inteligencije, robotike, trodimenzionalnog (3D) štampanja, *Cloud computing*-a, genetskog inženjeringa i biotehnologije, vodi brisanju granica između fizičkog, biološkog i digitalnog. Može se reći da će za 50 ili 100 godina, svijet izgledati zavisno od načina na koji razmišljamo, koristimo i ulažemo u ove moćne nove tehnologije.

3D štampa je tehnologija proizvodnje u kojoj se predmeti formiraju od materijala koji se nanose u slojevima, pri čemu nastaje 3D objekat u obliku koji je unaprijed kompjuterski definisan (engl. *Computer-aided design*, CAD) (1). Korišćenjem iste opreme, a promjenom digitalnog modela, moguće je štampati neograničen broj raznovrsnih objekata. 3D štampa omogućava izradu objekata kombinovanjem različitih materijala, sa različitim mehaničkim i fizičkim karakteristikama u jednom zaokruženom procesu. Ovaj proces se takođe naziva i aditivna proizvodnja (engl. *Additive manufacturing*, AM), brza

prototipizacija (engl. *Rapid prototyping*, RP) ili tehnologija čvrstog slobodnog oblika (engl. *Solid free-form technology*, SFF).

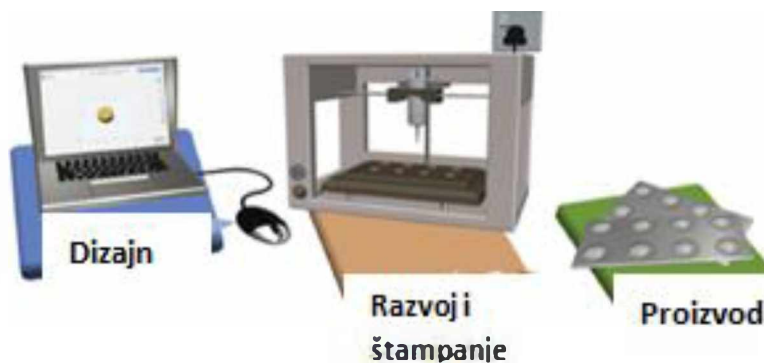
Charles W. Hull razvio je i patentirao 1986. godine prvi aparat za 3D štampu, koji je radio na principu stereolitografije (SLA) (2). Tehnologija koja je razvijena prije više od 30 godina kako bi olakšala kreiranje prototipova, ubrzo je postala standardno oruđe u automobilske, vazduhoplovnoj i granama potrošačke industrije (3).

U poslednjoj deceniji, tehnologija 3D štampe je pridobila pažnju i farmaceutske industrije, naročito nakon što je američka Uprava za hranu i lijekove (*Food and Drug Administration*, FDA) u avgustu 2015. godine odobrila prvi lijek proizveden pomoću 3D štampača (4). Upravo ovaj događaj bio je podsticaj istraživačkim grupama da se bave ispitivanjem pogodnosti primjene tehnologije 3D štampe u personalizovanoj medicini.

Postoji nekoliko različitih tehnika 3D štampe, zavisno od principa njihovog rada i prirode sirovina koje koriste. Međutim, većina je zasnovana na sledećoj, osnovnoj proceduri za proizvodnju čvrstih formi pomoću digitalnog dizajna (Slika 1):

- dizajn proizvoda: crtež proizvoda kreira se korištenjem digitalne tehnologije u 3D formi pomoću CAD softvera, ili u 2D formi, u vidu serija slika koje odgovaraju slojevima koji će se štampati;
- prevođenje dizajna u format koji štampač prepoznaje: 3D crteži se konvertuju u fajl STL. formata, koji opisuje spoljašnju strukturu 3D modela. Programi za 3D štampu isijecaju ove površine u pojedinačne slojeve i prosleđuju instrukcije sloj po sloj štampaču. Za 3D tehnike koje proizvode samostojeće objekte, softver može automatski da sugeriše gdje treba štampati potporni materijal (engl. *scaffold*) za in-procesnu štampu;
- obrada polaznih sirovina: sirovine se mogu prevesti u granule, vlakna, ili rastvore veziva kako bi se olakšao proces štampanja;
- štampanje: sirovine se dodaju i očvršćavaju pomoću automatizovanog procesa, sloj po sloj, kako bi se formirao željeni objekat;
- uklanjanje i naknadna obrada: nakon štampanja, proizvodi mogu zahtijevati sušenje, sinterovanje, poliranje, ili druge postupke obrade. U ovoj fazi, materijal

koji nije korišten za štampanje može se ponovo sakupiti i reciklirati za dalju upotrebu u procesu štampanja (5).



**Slika 1.** Osnovni principi 3D štampanja farmaceutskih oblika za per os primjenu (preuzeto i prilagođeno iz Trenfield i sar., 2018 (13))

U poređenju sa drugim proizvodnim procesima u farmaceutskoj industriji, tehnologija 3D štampe je jedinstvena u pogledu fleksibilnosti i kompleksnosti proizvoda koji se dobija (6). Kompleksnost proizvoda obezbjeđuje proces štampanja koji se odvija sloj po sloj, dok fleksibilnost obezbjeđuje digitalizovani proces koji omogućuje kreiranje proizvoda različitog oblika, dimenzija i sastava.

Iako je potraga za inovativnim tehnologijama u razvoju i proizvodnji lijekova stalna i usmjerena ka tehnikama koje, između ostalog, poboljšavaju fizičko-hemijska svojstva lijekova, njihovu stabilnost i bioraspoloživost te prihvatljivost od strane pacijenata, tradicionalni industrijski procesi proizvodnje koji su uvedeni prije gotovo 200 godina uglavnom se još uvijek koriste, naročito kada je u pitanju proizvodnja čvrstih farmaceutskih oblika. Primjena tehnologije 3D štampe mogla bi da napravi revolucionarni preokret u farmaceutskoj industriji, u načinu razvoja i dizajniranja lijekova, njihovoj proizvodnji i primjeni. Dodatno, iako su konvencionalni procesi isplativiji kada je u pitanju proizvodnja industrijskih razmjera, oni mogu biti dugotrajniji, zahtjevniji u pogledu potrebne proizvodne opreme i osoblja, a zbog proizvodnje velikih serija, nefleksibilni u pogledu proizvedenih doza.

Ipak, uvođenje tehnologije 3D štampe u rutinsku upotrebu neće biti jednostavan proces, iz nekoliko razloga. Prije svega, 3D štampanje nisu optimalno rješenje za proizvodnju velikih serija lijekova, i ne mogu parirati tablet mašinama kada je u pitanju brzina izrade tableta, jer mašine za tabletiranje rade i do 60 puta brže od 3D štampanja (7). Sa druge strane, 3D štampanje se mogu prevazići nedostaci konvencionalnih tehnologija proizvodnje u pogledu izrade individualizovanih serija lijekova i medicinskih sredstava, gdje je svaki proizvod drugačiji i prilagođen potrebama pacijenta, a da cijena njegove izrade bude niska. Tablete su najpopularniji farmaceutski oblici zbog jednostavnog načina proizvodnje, neinvazivnog puta primjene i dobre prihvatljivosti od strane pacijenata. Međutim, ne postoji postupak kojim bi se rutinski mogle proizvoditi personalizovane tablete. Industrijski proces proizvodnje tableta ima mnogo nedostataka i neprikladan je za proizvodnju lijekova namijenjenih za terapiju pojedinačnog pacijenta. (8).

Dodatno, ograničen je izbor materijala koji su na raspolaganju za 3D štampanje, što predstavlja izazov u primjeni ove tehnologije u različitim granama industrije, uključujući i farmaceutsku. Stoga se nameće i potreba za razvojem odgovarajućih materijala koji se mogu koristiti za ovaj način proizvodnje, a dalji rad je također potreban na poboljšanju mehaničkih osobina 3D štampanih objekata (9).

## **1.2 Mogućnosti za primjenu 3D štampe u farmaciji i medicini**

### **1.2.1 Pretklinički i klinički razvoj lijekova**

Pritisak na farmaceutsku industriju da se ubrza razvoj lijekova, i da se poveća broj lijekova koji prođu sve faze ispitivanja i dobiju odobrenje za stavljanje u promet, su veliki. Međutim, proces razvoja značajnog broja lijekova doživi neuspjeh još u ranim fazama istraživanja (10). Stoga je za proizvođače jako važno da što ranije identifikuju pogodne lijekove kandidate, i time izbjegnu velike finansijske gubitke.

Primjena tehnologije 3D štampe mogla bi značajno doprinijeti fazi pretkliničkog razvoja novih lijekova. Cilj sprovođenja pretkliničkih studija je da se ispita bezbjednost, te dobiju preliminarni podaci o efikasnosti i farmakokinetičkim osobinama lijekova kandidata, primjenom eksperimentalnih ili životinjskih modela (11). Prikupljeni podaci su od



ključne važnosti u donošenju odluke koji lijekovi kandidati će se dalje primijeniti u prvoj fazi kliničkih ispitivanja na ljudima, i takođe ukazuju na režim doziranja i profil očekivanih neželjenih dejstava (12). Najčešće korišteni životinjski modeli u pretkliničkim studijama su glodari, zbog niske cijene, jednostavnosti za rukovanje i određene fiziološke sličnosti sa ljudima. Međutim, zbog njihove veličine, u pretkliničkim studijama najčešće se primjenjuju tečne formulacije ili mini-kapsule ili tablete. Zbog velike mogućnosti za manipulacijom dimenzijama, oblikom kao i dozom, tehnologija 3D štampe može se koristiti za prilagođavanje ispitivanih farmaceutskih oblika životinjskim modelima u pretkliničkim studijama.

U ranim fazama razvoja, idealna formulacija bi trebala da pokazuje adekvatnu biološku raspoloživost, fleksibilnost u pogledu doza, da je pogodna za primjenu i da omogući brz prelazak iz jedne faze istraživanja u drugu, sa što manje troškova (13). Međutim, konvencionalni proizvodni procesi obično ne doprinose brzom razvoju, s obzirom da su robustni, dugotrajni i zahtijevaju značajno angažovanje osoblja i opreme. Dodatno, lijekovi dobijeni na ovaj način nisu fleksibilni kada je u pitanju doziranje, odnosno lijek se proizvodi u ograničenom broju jačina. Međutim, tehnologija 3D štampe je krajnje fleksibilan proces koji omogućava jednostavno modifikovanje doze zavisno od potreba studije prostom izmjenom dimenzija ili procenta popunjenosti tableta, pa bi se tako 3D štampači mogli naći u laboratorijama ili na mjestima gdje se odvijaju pretkliničke i kliničke studije. Tehnologijom 3D štampe može se izraditi više različitih formulacije za veoma kratko vrijeme, što pruža mogućnost da se istovremeno pripremi nekoliko proizvoda za testiranje, kao i da se na jednostavan i brz način vrše modifikacije u formulaciji, i time ispita pogodnost i kompatibilnost različitih ekscipijenasa. Na taj način se u ranim fazama razvoja formulacije može dobiti veći broj informacija, čime se smanjuje rizik od odustajanja i neuspjeha u kasnijim fazama razvoja. Dalje, kod kliničkih studija na ljudima, izrada farmaceutskog oblika neposredno prije doziranja smanjuje potrebu za ispitivanjem stabilnosti laboratorijskih serija, što često odlaže i prolongira sami početak ispitivanja (14).

### 1.2.2 Tkivni inženjering

Tkivni inženjering je multidisciplinarna oblast koja je trenutno usmjerena na dva velika cilja: prvi je razvoj novih metoda za regeneraciju i zamjenu oštećenih tkiva i organa, dok se drugi odnosi na razvoj tkivnih modela na kojima bi se *in vitro* mogli ispitivati molekularni mehanizmi koji dovode do nastanka i napredovanja bolesti, te vršiti inicijalni *screening* lijekova kandidata (15). Bioprinting je vrsta 3D štampe, u kojoj se objekti formiraju od živih ćelija, biomaterijala i bioloških molekula (16, 17). Naime, uz pomoć CAD dizajna, omogućeno je formiranje tkiva na osnovu snimaka dobijenih uobičajenim medicinskim tehnikama vizualizacije, poput magnetne rezonance, X-ray i CT skenera. Bioprinting omogućava dobijanje sistema živih ćelija primjenom specifičnog materijala, koji bi mogao biti ekvivalent sastojcima ekstracelularnog matriksa (15). Kod ove tehnike, mora se izraditi nosač odgovarajuće mikroarhitekture, koji će obezbijediti mehaničku stabilnost i podstaći urastanje ćelija, ali pritom vodeći računa o uticaju samog postupka izrade na vitalnost ćelija. Jedan od najvećih izazova jeste očuvati vijabilnost ćelija tokom i nakon procesa štampanja. Dodatni problem je izrada vaskularne mreže tkiva i organa, a procijenjeno je da će biti potrebno manje od 20 godina da se odštampa kompletno srce (18). Na ovaj način, naučnici su uspjeli da odštampaju životinjska i humana tkiva, na kojima se može ispitivati akutna i hronična toksičnost lijeka, kao i metabolizam lijekova. Pojedine kompanije, poput Organova, specijalizovale su se za štampanje modela ljudskih tkiva (poput tkiva bubrega ili jetre) koji se mogu koristiti u medicinskim istraživanjima. Ova tehnika otišla je i korak dalje, pa nisu samo štampani modeli tkiva, već i organa poput pankreasa, želuca i tankog crijeva (19). Time je otvorena mogućnost da se 3D bioprinting koristi za preliminarno toksikološko ispitivanje lijeka, kao i testiranje odgovora na lijek. Na ovaj način se smanjuje broj životinja potrebnih za pretkliničko ispitivanje lijekova, zatim troškovi razvoja a ujedno se skraćuje vrijeme dospijanja lijeka na tržište (20). Od dostupnih tehnika 3D štampe, u oblasti bioprintinga do sada su najbolji rezultati postignuti sa SLA i *ink-jet* tehnikama štampanja. Do sada, 3D bioprintingom uspješno su izrađeni meniskusi koljena, srčani zalisci, vještačko uvo, kao i biodegradabilna traheja koja je čak primijenjena kod novorođenčeta sa traheobronhomalacijom (18).

### 1.2.3 3D štampa kao osnov za personalizovanu terapiju

Tablete i kapsule su najčešće primjenjivani oralni farmaceutski oblici, s obzirom na dobru prihvatljivost od strane pacijenata i pogodnost za industrijsku proizvodnju. Tradicionalno, one se industrijski proizvode u nekoliko različitih jačina, najčešće u dozama koje su se pokazale pogodnim kod većine pacijenata. Međutim, činjenica je da na istu dozu lijeka ne reaguju jednako svi pacijenti, što može biti posljedica razlika u genetskom profilu pacijenta, stanju bolesti, polu, starosnoj dobi, tjelesnoj težini itd. Razumijevanje ovih karakteristika naglašava potrebu za personalizovanom medicinom, koja podrazumijeva prilagođavanje terapije pacijentima u zavisnosti od njihovih individualnih karakteristika i potreba (21). Konvencionalni procesi proizvodnje ne nude mnogo mogućnosti za implementaciju ovog koncepta u praksi, budući da su lijekovi obično proizvedeni u određenom, ograničenom broju jačina, koje ne odgovaraju u potpunosti specifičnostima svakog pojedinačnog pacijenta. To naročito dolazi do izražaja kod čvrstih farmaceutskih oblika, gdje je dijeljenje ili lomljenje tablete jedini način prilagođavanja doze, što može rezultirati neadekvatnim doziranjem ili narušavanjem funkcije film omotača, kada je njegova uloga da modifikuje profil oslobađanja aktivne supstance (22). Primjera radi, za proizvodnju fluoksetina (zaštićeni naziv originalnog lijeka kompanije Eli Lilly je Prozac®), proizvođač je odabrao dozu od 20 mg, jer je ona ispoljila odgovarajući efekat kod 64% ciljanje populacije pacijenata; međutim, kod 54% ispitanika, povoljan efekat se počeo ispoljavati već sa dozom od 5 mg, pri čemu je u ispitivanjima prijavljeno manje neželjenih dejstava i odustajanja od ispitivanja nego kod primjene veće doze fluoksetina (23). Individualni odgovor pacijenata na primijenjenu dozu lijeka jako varira, tako da će ograničen izbor doza na jako heterogenu populaciju pacijenata neminovno rezultirati odgovarajućim terapijskim ishodom kod jednog broja pacijenata, ali i primjenom manjih ili većih doza nego što je potrebno kod ostalih pacijenata, što će izazvati pojavu neželjenih dejstava ili neadekvatan terapijski odgovor. Procjenjuje se da se učestalost neželjenih dejstava kao posledice neprilagođene terapije kreće od 75% do 85%.

Međutim, napredak personalizovane medicine djelimično je ograničen nedostatkom farmaceutskih oblika željene doze, oblika, boje i dr. Prilikom razvoja lijekova, farmaceutska industrija ne uzima u obzir specifičnosti svake individue, već je fokusirana

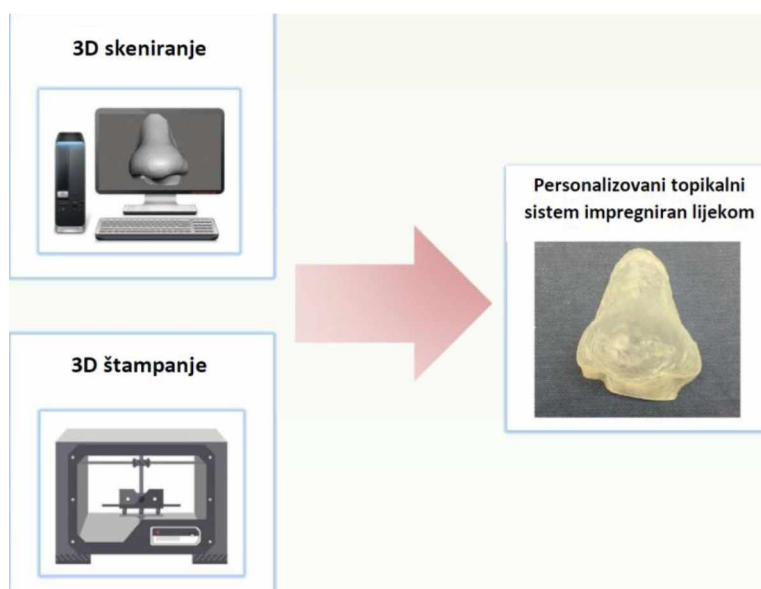
na određeni ciljani profil terapijskog odgovora, gdje taj nedostatak naročito dolazi do izražaja kod pedijatrijske i gerijatrijske populacije. Prilagođavanje doze prema uzrastu, tjelesnoj težini, farmakokinetičkim i farmakogenetskim osobinama je ključno kako se postigao željeni terapijski ishod i poboljšao odnos koristi i rizika od primjene lijeka. Ovo naročito dolazi do izražaja kada su u pitanju lijekovi malog terapijskog indeksa, gdje je primjena odgovarajuće doze od krucijalne važnosti za bezbjednu primjenu lijeka. U odnosu na tradicionalne metode proizvodnje tableta, tehnike 3D štampe nude značajno veću fleksibilnost jer, između ostalog, daju mogućnost jednostavne promjene oblika i dimenzija tableta koje se izrađuju. Tako se može prilagoditi doza jednostavnim podešavanjem veličine modela (tablete) u softveru štampača. Dodatno, aderenza propisanoj terapiji mogla bi se značajno poboljšati promjenom boje, ukusa, veličine ili pak oblika, prevashodno kada su u pitanju čvrsti farmaceutske oblici, kod djece ili starijih (24).

Stoga su sve češći zahtjevi prema farmaceutskoj industriji za razvoj formulacija “skrojenih” prema potrebama pojedinačnih pacijenata, a kao jedna od mogućnosti u ostvarenju tog cilja nameće se tehnologija 3D štampe, koja bi mogla da ubrza primjenu koncepta personalizovane terapije, na način što će omogućiti proizvodnju malih serija lijekova prilagođenih individualnim osobinama i potrebama pacijenata.

U poređenju sa tradicionalnim procesima proizvodnje lijekova, 3D štampanje olakšava primjenu personalizovane terapije, prvenstveno jer je modifikacija digitalnog dizajna lakša od modifikacije industrijske opreme. Takođe, automatsko 3D štampanje u malim serijama može imati zanemarljive operativne troškove. Štampanjem je moguće proizvesti više malih, individualizovanih serija koje su ekonomski prihvatljive. Stoga je ova oblast istraživanja izuzetno aktuelna sa fokusom na identifikovanju prednosti i mana različitih 3D tehnika, radi utvrđivanja koja od njih bi bila najprikladnija i dala najbolje rezultate u personalizovanoj medicini. Sve veća zainteresovanost za predmetnu oblast rezultirala je razvojem različitih 3D tehnika koje pokazuju potencijal za izradu prilagođenih lijekova ili kombinacije lijeka i medicinskog sredstva.

### 1.2.3.1 Personalizovani terapijski sistemi za topikalnu primjenu

Istraživanja u oblasti 3D štampe pokazala su da je moguće proizvesti preparate za topikalnu primjenu impregnirane lijekom, koji su oblikom i dimenzijama prilagođeni pojedinačnom pacijentu (Slika 2). Goyanes i saradnici razvili su maske u obliku nosa, impregnirane salicilnom kisjelinom, namijenjene terapiji akni (25). Naime, nakon skeniranja lica pacijenta, slika je unijeta u *autocad* program, gdje je selektovana samo nazalna regija. Zatim je napravljen 3D model šuplje unutrašnjosti, kako bi se mogao prilagoditi licu pacijenta. Kreirani model je štampan primjenom tehnika stereolitografija (SLA) i modelovanja fuzionim deponovanjem (FDM), kako bi se ispitalo koja od njih je pogodnija, odnosno kojom je moguće dobiti stabilniji proizvod sa zadovoljavajućim profilima oslobađanja ljekovite supstance. U predmetnoj studiji, pokazalo se da SLA tehnika ima prednost u proizvodnji maski za lice zbog bolje rezolucije štampača, mogućnosti impregniranja većih doza lijeka i zbog minimalne degradacije salicilne kisjeline tokom procesa štampanja. Ovo istraživanje je ukazalo na perspektivu koja se ogleda u kombinovanju skenera i 3D štampača u personalizovanom terapijskom pristupu u zavisnosti od potrebne doze lijeka, kao i dimenzija i oblika ciljnog mjesta dejstva preparata.



**Slika 2.** Maska u obliku nosa impregnirana salicilnom kisjelinom, izrađena kombinovanjem 3D skenera i SLA tehnike 3D štampe (preuzeto i prilagođeno iz Goyanes i sar., 2016 (25))

### **1.2.3.2 Poboljšanje adherence**

Adherenca propisanoj terapiji je osnovni preduslov za postizanje uspješnih ishoda liječenja, a ona u velikoj mjeri zavisi od prihvatljivosti farmaceutskog oblika od strane pacijenta. U istraživanju koje su sprovedi Mennella i saradnici (26), kojim je bilo obuhvaćeno 153 djece, pokazalo se da je primarni razlog zbog kojeg dijete odbija da primijeni lijek njegov ukus. S obzirom da mnoge lijekovite supstance imaju neprijatan ukus, akcenat je stavljen na razvoj farmaceutskih oblika kojima će se maskirati neprijatan ukus lijekovite supstance. Dalje, adherenci značajno doprinose boja, oblik, kao i poteškoće sa gutanjem različitih farmaceutskih oblika, slabljenje kognitivnih funkcija kod pacijenata, kao i neželjena dejstva koja nastaju kao posljedica interakcija lijekova. Na koji način tehnologija 3D štampe može pomoći da se prevaziđu navedeni problemi, opisano je u narednim odjeljcima.

#### **1.2.3.2.1 Poboljšanje adherence kod pedijatrijskih pacijenata**

Kod pedijatrijskih pacijenata, oblik, boja i ukus farmaceutskog oblika imaju veliku ulogu u prihvatanju terapije, pa oralni put primjene, iako se generalno smatra najpogodnijim, može postati veoma kompleksan (27). U maskiranju i optimizaciji navedenih osobina, kao i prilagođavanju doze potrebama djeteta, značajno može koristiti tehnologija 3D štampe. Primjenom tradicionalnih tehnologija mogu se izraditi tablete različite boje, međutim, ograničene su mogućnosti za manipulacijom geometrijskim oblikom tablete jer on zavisi od matrica i klipova koji su na raspolaganju. Sa druge strane, primjenom tehnika 3D štampe samo promjenom digitalnog dizajna moguće je dobiti tablete različitih geometrijskih oblika. Primjenom 3D štampe, mogu se kreirati tablete u obliku likova iz popularnih crtanih filmova, što će olakšati i poboljšati njihovu prihvatljivost kod djece.

2019. godine objavljena je prva klinička studija u kojoj je tehnologija 3D štampe (konkretno, tehnika polučvrste ekstruzije) upotrijebljena za pripremu personalizovane terapije u bolničkoj apoteci (28). U predmetnoj studiji, izrađene su tablete za žvakanje koje su sadržale izoleucin, različitih boja i ukusa, namijenjene liječenju djece sa ozbiljnom metaboličkom bolešću urina mirisa javorovog sirupa (engl. *Maple syrup urine disease*, MSUD). 3D štampane formulacije su upoređene sa kapsulama koje su pripremljene, odnosno punjene ručno, zavisno od nivoa izoleucina u krvi i prihvatljivosti

lijeka nakon 6 mjeseci terapije. Pokazalo se da su primjenom 3D štampanih tableta postignute prosječne koncentracije izoleucina u krvi bliže teorijskoj, ciljanoj vrijednosti, i sa manjom varijabilnošću, što je pripisano konzistentnosti u formulaciji u poređenju sa ručno punjenim kapsulama. Dodatno, sve različite boje i ukusi tableta bili su generalno dobro prihvaćeni od strane pacijenata, iako je svaki pacijent imao različite preference.

Slično, Scoutaris i saradnici (29) su primjenom tehnike 3D štampe modelovanja fuzionim deponovanjem (engl. *Fused Deposition Modeling*, FDM) izradili tablete za žvakanje u obliku Starmix<sup>®</sup> Haribo gumenih bombona (Slika 3), sa indometacinom kao aktivnom supstancom, sa ciljem maskiranja njegovog gorkog ukusa i poboljšanja prihvatljivosti i pridržavanja propisanoj terapiji od strane djece.

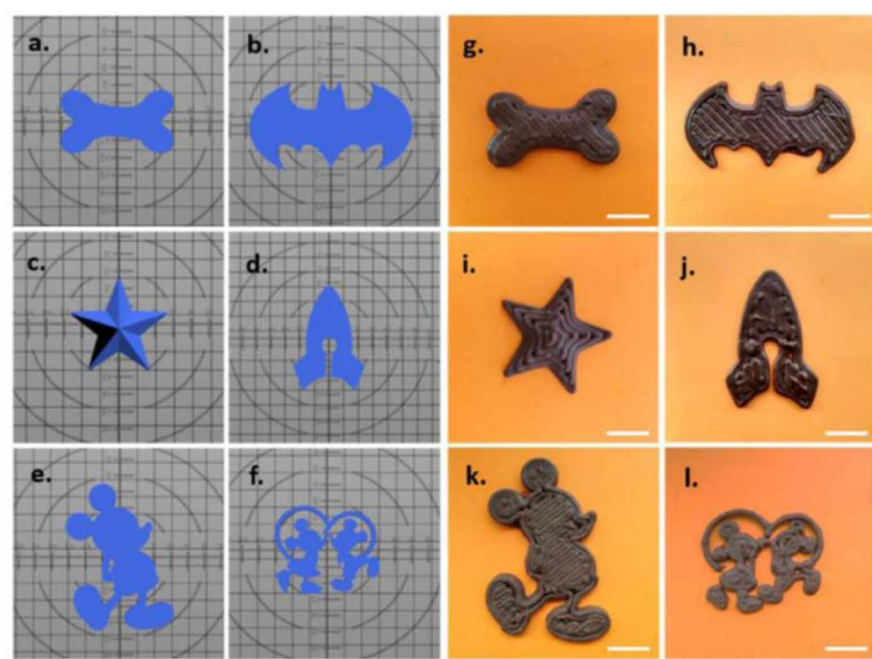


**Slika 3.** Tablete za žvakanje u obliku Starmix<sup>®</sup> Haribo gumenih bombona sa indometacinom, izrađene FDM tehnikom (preuzeto iz Scoutaris i sar., 2018 (29))

Poznato je da gutanje čvrstih farmaceutskih oblika predstavlja veliki problem za primjenu lijekova kod djece, zbog čega su tablete za žvakanje veoma pogodan farmaceutski oblik za pedijatrijsku primjenu, gdje se žvakanjem pomaže raspadanju i gutanju tableta, a mogu se davati djeci starijoj od 2 godine. U izrađenim tabletama aktivna supstanca je inkorporirana u polimerni matriks sačinjen od hipromeloze acetat sukcinata (HPMCAS). Volonteri koji su učestvovali u studiji ocijenili su da je gorak ukus indometacina odlično

maskiran u matriks tabletama izrađenim FDM tehnikom, a da je oblik tableta značajno doprinio njihovoj prihvatljivosti kod djece.

I u drugim radovima predloženi su zanimljivi načini za poboljšanje ukusa i prihvatljivosti lijekova od strane djece, a zahvaljujući raznovrsnim mogućnostima koje pružaju tehnike 3D štampe. Tako su primjenom SSE tehnologije (engl. *semisolid extrusion*, ekstruzija polučvrstog materijala) izrađene tablete sa mastilom za štampu koje je sadržalo tamnu čokoladu kao sredstvo za dopunjavanje i kukuruzni sirup, dodat sa ciljem da se olakša proces štampanja i inkorporiranje hidrofilne (paracetamol), odnosno lipofilne (ibuprofen) lijekovite supstance (30). Tablete za žvakanje dizajnirane su u šest oblika koji podsjećaju na likove iz crtanih filmova (Slika 4).



**Slika 4.** Tablete za žvakanje izrađene SSE tehnikom u obliku likova iz crtanih filmova (preuzeto iz Karavasili i sar., 2020 (30))

#### 1.2.3.2.2 Potencijal primjene kod gerijatrijskih pacijenata

Porast životnog standarda, razvoj i poboljšanje cjelokupne zdravstvene zaštite, kao i mnogobrojne terapijske opcije i inovacije, doprinijele su globalnom produženju životnog vijeka. Međutim, to je praćeno i sve većim opterećenjem starije populacije hroničnim bolestima. Dodatno, svi prisutni komorbiditeti zahtijevaju istovremeno liječenje, što



uzrokuje polifarmaciju. Ne postoji jedinstvena definicija polifarmacije, ali je svim definicijama zajednički sadržalac da ona predstavlja istovremenu primjenu više lijekova (31). Sa povećanjem broja primijenjenih lijekova, raste i rizik od neželjenih i štetnih dejstava, što može biti rezultat brojnih faktora, uključujući interakcije između lijekova, kao i između lijekova i bolesti. Stariji pacijenti su naročito u većem riziku od neželjenih dejstava zbog oslabljene funkcije bubrega i jetre, što rezultira promjenama u farmakokinetici i farmakodinamici lijeka. Najčešća neželjena dejstva su sedacija, nefrotoksičnost, hepatotoksičnost, kardiotoksičnost, konfuzija, vrtoglavica, hipotenzija i hipoglikemija (32).

Da bi se prevazišla primjena velikog broja različitih vrsta tableta i kaspula, i time smanjila kompleksnost terapije, farmaceutske kompanije su razvile tzv. "polipilule", koje u jednoj formulaciji kombinuju više lijekova i/ili doza. Ovdje je važno istaći da konvencionalna proizvodnja polipilula ne podržava personalizovanu terapiju, već koristi masovnu proizvodnju lijekova kako bi se proizvele tzv. fiksne kombinacije lijekovitih supstanci. Međutim, već je publikovan značajan broj radova koji su pokazali potencijal različitih tehnika 3D štampe u proizvodnji 3D štampanih polipilula, koje zahvaljujući svojoj fleksibilnosti, mogu prilagoditi dozu i kombinaciju lijekova potrebama pacijenta (33, 34).

Poznato je da su među hroničnim oboljenjima, kardiovaskularne bolesti najčešći uzrok smrti u evropskim zemljama, sa udjelom od oko 45% u prosjeku (35). Stoga njihov tretman obično zahtijeva kompleksan terapijski režim koji najčešće uključuje kombinaciju antiagregacionih, antihipertenzivnih i lijekova za snižavanje nivoa triglicerida i holesterola u krvi. Neka od postojećih rješenja kojima se poboljšava adherenca i smanjuju greške pri administraciji lijekova jesu upotreba kutija za doziranje lijekova (tzv. dozatori), zatim podešavanje alarma kao podsjetnika za primjenu lijeka ili upotreba aplikacija na pametnim telefonima. Međutim, u praksi sve ove metode su se pokazale djelimično uspješnim, pa bi primjena 3D izrađenih polipilula mogla značajno pojednostaviti režim doziranja lijeka, bez ugrožavanja terapijskog plana. Jedan od primjera opisanih u literaturi jeste kapsularni sistem koji su primjenom FDM tehnike izradili Pereira i saradnici (36). Kao model lijekovite supstance u studiji su upotrijebljeni lizinopril, amlodipin, indapamid i rosuvastatin. Unutrašnjost kapsule bila je podijeljena u 4 odjeljka u kojima su smještene pojedinačno lijekovite supstance, a odjeljci su bili raspoređeni paralelno ili koncentrično, zavisno od toga kakav je ciljani profil oslobađanja

ljekovitih supstanci. Zahvaljujući fizičkoj odvojenosti, smatra se da je izbjegnuta međusobna interakcija ljekovitih supstanci u farmaceutskom obliku. Dodatno, ispitivanje stabilnosti pokazalo je minimalnu migraciju formulacije kroz zidove kapsule, i dokazana je stabilnost u roku od 28 dana.

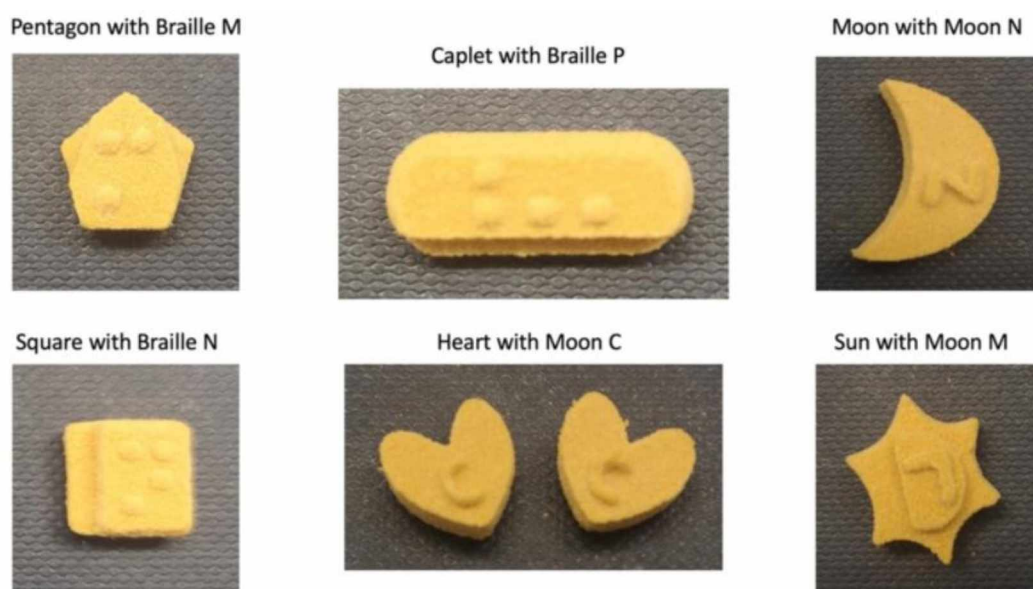
Kod većine gerijatrijskih pacijenata, gutanje tableta postaje problem koji se povećava sa starenjem, što značajno utiče na pridržavanje propisanoj terapiji (37). Ovo se može prevazići primjenom orodisperzibilnih tableta i filmova, za koje je već dokazano da se uspješno mogu izraditi tehnikama 3D štampe (38, 39). Određeni broj ovih pacijenata pati i od demencije, što takođe može uticati na (ne)pridržavanje terapijskom režimu. Ovo se može prevazići primjenom 3D štampanih farmaceutskih oblika sa utisnutim oznakama koje mogu ukazivati na vrijeme primjene, datum ili dan za primjenu, u skladu sa terapijskom šemom za svakog pacijenta.

U istraživanju Fasto i saradnika, ispitivana je percepcija, preference i prihvatljivost 3D štampanih lijekova od strane pacijenata, putem ankete (40). Studija je sprovedena na 8 ispitanika u Zealandu, Danska. Rezultati su pokazali da pacijenti preferiraju oblike slične konvencionalnim lijekovima, a preference prema različitim bojama zavisile su od osobe do osobe. Kada je u pitanju prihvatljivost 3D štampanih tableta, pokazalo se da je ona uglavnom determinisana time kakvo je mišljenje pacijenata o pouzdanosti tehnologije 3D štampe. Istraživači su zaključili da su percepcija i preference pacijenata prema 3D štampanim lijekovima varirale, te da su stavovi pacijenata zavisili od estetskih (izgled), fizioloških (lakoća gutanja), praktičnih (jednostavnost za rukovanje i primjenu), obrazovnih (razumijevanje tehnologije) i psiholoških faktora. Rezultati studije su ukazivali na to da je povjerenje u samu tehnologiju od značaja za prihvatljivost 3D štampanih lijekova kod pacijenata.

### **1.2.3.3 Pomoć slabovidim pacijentima**

Oštećenje vida pogađa gotovo 300 miliona ljudi širom svijeta, što može uticati i na pridržavanje terapiji i terapijske ishode, naročito kod starijih pacijenata koji često uzimaju veći broj lijekova. Primjenom 3D tehnike selektivnog laserskog sinterovanja (SLS), Awad i saradnici su izradili orodisperzibilne tablete prilagođene slabovidim pacijentima (41).

Naime, na površini tableta odštampani su karakteri na Brajevom i Munovom pismu, što je omogućilo pacijentima da po vađenju iz pakovanja identifikuju lijek, što može doprinijeti smanjenju broja medicinskih grešaka do kojih dolazi prilikom liječenja slijepih i slabovidih osoba (Slika 5). Dodatno, odštampane su tablete različitih oblika, kao asocijacija na indikaciju ili režim doziranja.



**Slika 5.** Orodispersibilne tablete različitih oblika izrađene SLS tehnikom sa odštampanim oznakama na Brajevom i Munovom pismu (preuzeto iz Awad i sar., 2020 (41))

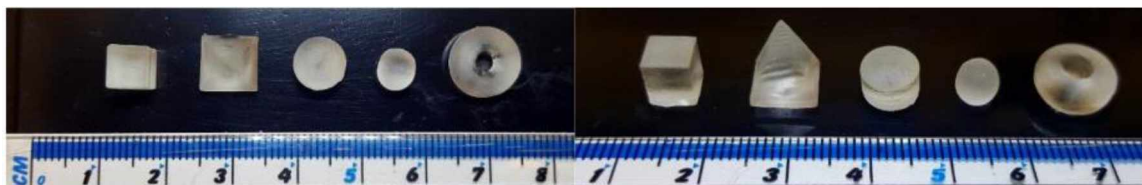
Uprkos prisustvu oznaka na površini, tablete su zadržale adekvatne mehaničke karakteristike i odgovarajuće profile brzine rastvaranja lijeka. Sve tablete raspale su se u roku od 5 sekundi bez potrebe za primjenom vode. Takođe, čitljivost podataka na tabletama potvrđena je od strane slijepe osobe. Ovaj inovativni koncept može doprinijeti adherenci i smanjenju medicinskih grešaka kod slijepih i slabovidih pacijenata.

#### **1.2.3.4 Izrada farmaceutskih oblika kompleksnih geometrija i profila oslobađanja ljekovite supstance**

Podaci dostupni u literaturi pokazuju da se primjenom tehnologije 3D štampe mogu dobiti farmaceutski oblici sa različitim profilima oslobađanja ljekovite supstance, u skladu sa potrebama pacijenata. Jedan od načina na koji se ovo može postići jeste izmjena oblika i unutrašnje strukture farmaceutskog oblika. Tako su primjenom FDM tehnike izrađene

tablete sa trenutnim oslobađanjem sa niskom dozom ljekovite supstance, gdje je zaključeno da se smanjenjem debljine tableta ili kreiranjem šupljina unutar njih, povećava oslobađanje ljekovite supstance, i da je potpuno oslobađanje moguće postići za manje od 5 minuta (42).

U studiji Martinez i saradnika (43), primjenom SLA tehnike izrađene su tablete sa paracetamolom, različitih oblika (kocke, diska, sfere, piramide i torusa) (Slika 6).

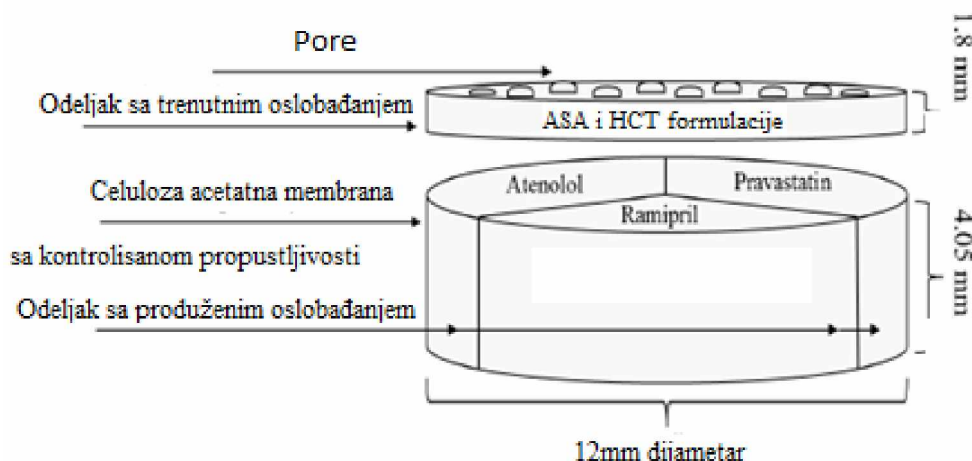


**Slika 6.** Izrađene SLA tablete sa paracetamolom različitog oblika (preuzeto iz Martinez i sar., 2018 (43))

Sadržaj paracetamola u izrađenim tabletama je bio nešto niži od teorijskog, što su autori objasnili kao posljedicu njegove nepotpune ekstrakcije iz matriksa tokom pripreme uzorka za određivanje sadržaja HPLC metodom. Istraživanje je pokazalo da tablete slične površine ne pokazuju sličnost u pogledu profila brzine oslobađanja ljekovite supstance, kao i da odnos površina/zapremine zapravo ima uticaj na brzinu oslobađanja paracetamola iz izrađenih SLA tableta. Torus je izabran kao specifičan oblik jer ga je inače teško dobiti pomoću tradicionalnih metoda u proizvodnji tableta. Pokazalo se da, što je bio veći odnos površina/zapremine, to je veća bila brzina oslobađanja paracetamola iz izrađenih tableta. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da promjena u geometrijskom obliku tablete koju je jednostavno moguće postići 3D štampom, može omogućiti manipulisanje sa brzinom oslobađanja ljekovite supstance, a što je veoma teško ostvariti tradicionalnim tehnikama proizvodnje tableta.

Slično tome, u drugoj studiji ali primjenom FDM tehnike, izrađene su tablete kompleksnog oblika pčelinjeg saća. Veličina ćelija saća varirana je od 0.20 do 1.83 mm, kako bi se postigli različiti profili oslobađanja ljekovite supstance. I ovom studijom pokazano je da se promjenom geometrijskog oblika farmaceutskog oblika, mogu postići različiti profili oslobađanja ljekovite supstance (44).

Khaled i saradnici su pomoću FDM 3D štampača izradili kapsule u kojima se nalazilo 5 razdvojenih ljekovitih supstanci sa 2 nezavisna, kontrolisana i dobro definisana profila oslobađanja (45). Pripremljene kapsule su namijenjene za terapiju kardiovaskularnih oboljenja i izgrađene su od odjeljka sa trenutnim oslobađanjem, u kome se nalaze aspirin i hidrohlortiazid, kao i od tri odjeljka sa produženim oslobađanjem u kojima su se nalazili pravastatin, atenolol i ramipril (Slika 7).



**Slika 7.** Shematski prikaz strukture polipilule; aspirin i hidrohlortiazid se nalaze u odjeljku za trenutno oslobađanje, dok su atenolol, pravastatin i ramipril u odjeljcima sa produženim oslobađanjem (preuzeto i prilagođeno iz Khaled i sar., 2015 (45))

Proces izrade tableta započet je time što su najprije napravljene paste sa ljekovitim supstancama, koje su postavljene u odvojene kertridže za štampanje. Zatim je izvršena ekstruzija hidrofobnog omotača celuloza acetata, nakon čega se atenolol, pravastatin i ramipril miješaju sa hidrofilnim matriksom hidroksipropil metilceluloze (HPMC, hipromeloza) i ekstruduju u odvojene odjeljke celuloza acetatnog omotača. Sloj sa supstancama za trenutno oslobađanje ekstrudira se na površini i prekriva djelove sa produženim oslobađanjem, prije čega su aspirin i hidrohlortiazid pomiješani sa dezintegratorom. Ispitivanje brzine oslobađanja pokazalo je da je više od 75% aspirina i hidrohlortiazida oslobođeno u prvih 30 minuta. Ovakav način oslobađanja se dešava zbog prisustva dezintegratora natrijum skrob glikolata, koji brzo apsorbuje vodu i bubri, što dovodi do brze dezintegracije ovog dijela kapsule i brzog oslobađanja ljekovitih supstanci. Sa druge strane, pokazalo se da atenolol, pravastatin i ramipril imaju produženo oslobađanje u trajanju od 720 minuta sa 69%, 81% i 66% oslobođene supstance. Ovo

djelovanje je u skladu sa efektima brze hidratacije hipromeloze što dovodi do formiranja gela i bubrenja, da bi se formirao hidrofilni matriks koji usporava oslobađanje ljekovite supstance, a takođe i zbog prisustva omotača od celuloza acetata koji na to dodatno utiče.

#### **1.2.3.5 Personalizovana medicinska sredstva i kombinacije lijeka i medicinskog sredstva**

Implantabilni terapijski sistemi predstavljaju sisteme koji, nakon postavljanja u ljudsko tijelo, oslobađaju lijek definisanom brzinom u određenom vremenskom periodu (46). Njihova prednost u odnosu na druge vrste terapijskih sistema ogleda se u tome što mogu ostvariti terapijski efekat sa nižim dozama lijeka (47), tako što omogućavaju postizanje većih koncentracija lijeka na mjestu djelovanja, smanjujući time sistemsku izloženost lijeku i posljedično rizik od pojave neželjenih dejstava (48). Dodatno, implantima se omogućava personalizovana medicina, poboljšanje adherence i produženi efekat terapije koji može trajati danima, mjesecima ili čak godinama (49), zahvaljujući održavanju terapijskih koncentracija lijeka tokom dužeg vremenskog perioda, bez potrebe za čestom upotrebom tableta ili injekcija. Implanti su uglavnom u obliku štapića izrađenih od polimera, kreirani za postavljanje intramuskularno ili subkutano, pomoću igle ili hirurškim putem. Ukoliko se pojave neželjena dejstva usljed kojih je potrebno prekinuti sa primjenom terapije, postavljeni implant moguće je ukloniti. Do sada, implanti su u kliničkoj praksi uglavnom korišteni za kontracepciju i u terapiji karcinoma.

Većina implanata koji su danas u upotrebi, proizvedena je od nerazgradivih polimera (50), zbog čega zahtijevaju hirurško uklanjanje po prestanku dejstva, što može biti nelagodno i stresno za pacijenta. Sa druge strane, biodegradabilni polimeri ne zahtijevaju uklanjanje nakon upotrebe, a svakako se po potrebi mogu ranije ukloniti, što predstavlja značajnu prednost. Naime, oni su dizajnirani tako da se razgrađuju do proizvoda koji se lako mogu eliminisati iz organizma. Biodegradabilni i biokompatibilni polimeri koji se uobičajeno koriste uključuju, između ostalih, polimljičnu kisjelinu (*poly(lactic acid)* (PLA)), poliglikolnu kisjelinu (*poly(glycolic acid)* (PGA)), poli(laktid-ko-glikolid) (*poly(lactic-co-glycolic acid)* (PLGA)) i polikaprolakton (*poly(caprolactone)* (PCL)). Do sada, navedeni polimeri su uspješno primijenjeni u terapijskim sistemima sa nanočesticama i mikročestičnim parenteralnim implantima (51). Sa povećanjem interesovanja i istraživanja u oblasti 3D štampe, otvaraju se i nove tehnološke mogućnosti i rješenja

poput biodegradabilnih implanata, koji predstavljaju jeftino, jednostavno, biokompatibilno sredstvo, sa brzinom oslobađanja lijekovite supstance koja je prilagođena kliničkoj aplikaciji implanta. Stewart i saradnici su primjenom FDM tehnike izradili pet modela implanata koji su se sastojali od PLA i polivinil alkohol (PVA) filamenata, sa metilen plavim, ibuprofen natrijumom i 2-(4-izobutilfenil)propanskom kisjelinom, kao model supstancama (50). U zavisnosti od dizajna implanta i od osobina model supstance, varirala je njena brzina oslobađanja. Dodatno, uspješno je proizvedena membrana za kontrolu brzine oslobađanja lijekovite supstance, pa je time ukazano na potencijal primjene ove vrste sredstava za hronična stanja.

U drugom istraživanju, PCL je primijenjen kao sredstvo za oblaganje implanta koje će omogućiti produženo oslobađanje hidrofilnih lijekovitih supstanci, što predstavlja poseban izazov u formulaciji i do sada su u tom smislu ispitane brojne strategije, uključujući nanočestice, lipozomalne i koloidne sisteme (52). Implanti su izrađeni FDM tehnikom, upotrebom PVA i PLA filamenata, u dimenzijama sličnim komercijalno dostupnim implantima, i obloženi filmom od PCL i PEG 1000 u različitim odnosima, sa ciljem postizanja kontrolisanja brzine oslobađanja lijeka. Nakon inicijalne karakterizacije izrađenih implanata, odabrana formulacija je ispitana testovima *in vitro* disolucije, i pokazalo se da je jednostavno modifikovanjem sastava polimerne obloge moguće postići brzinu oslobađanja lijekovite supstance od 0.01 do 34.09 mg/dan. Navedeni rezultati pokazuju fleksibilnost ove vrste terapijskih sistema i mogućnost da se na ovaj način postigne produženo oslobađanje lijekovitih supstanci.

### 1.3 Izazovi u uvođenju koncepta 3D štampe u rutinsku praksu

Pored brojnih navedenih prednosti, veliki je broj prepreka koje je potrebno prevazići kako bi primjena tehnologije 3D štampe zaživjela u rutinskoj kliničkoj praksi.

Trenutno je u opticaju ograničen broj pomoćnih supstanci koje se mogu koristiti u 3D štampi terapijskih sistema. Naime, mnogi materijali koji su upotrijebljeni u dosadašnjim istraživanjima nisu farmakopejskog kvaliteta, njihov bezbjednosti profil nije u potpunosti poznat ili jednostavno nisu bezbjedni za primjenu kod ljudi. Stoga je, za širu primjenu tehnologije 3D štampe potrebno razviti fizičko-hemijski stabilne, netoksične, biokompatibilne i biodegradabilne ekscipijense. Na tržištu je dostupan izuzetno ograničen broj komercijalno dostupnih materijala koji zadovoljavaju navedene karakteristike. Na primjer, kod tehnika zasnovanih na fotopolimerizaciji, za štampanje se moraju upotrijebiti fotopolimeri. Međutim, relativno je mali broj fotopolimera koji su do sada upotrijebljeni u ispitivanjima i njihovo najveće ograničenje se ogleda u tome što se ne nalaze na tzv. GRAS (engl. *generally recognized as safe*) listi (43). Sa druge strane, kod SLS tehnike neophodna je upotreba termoplastičnih polimera koji moraju imati adekvatnu protočnost i viskozitet. S obzirom da je izvor toplotne energije laserski zrak, čestice praška treba da apsorbuju svjetlost talasne dužine lasera štampača da bi došlo do njihovog sinterovanja. Međutim, polimeri koji su do sada upotrijebljeni ne apsorbuju svjetlost na 445 nm, koja odgovara talasnoj dužini diodnih lasera SLS štampača koji su primjenjivani u dosadašnjim istraživanjima. Iz tog razloga je neophodno dodati sredstvo za poboljšanje apsorpcije, kako bi došlo do procesa sinterovanja.

Dalje, postojeći, komercijalno dostupni 3D štampači nisu prilagođeni farmaceutskim materijalima što može da stvara velike probleme u radu. Tako, prilikom štampe FDM tehnikom često dolazi do zapušavanja mlaznice štampača, dok kod SLS štampača čišćenje predstavlja veliki problem jer nisu jednostavno rasklopivi i veliko je prašenje materijala za štampu. Iz navedenog proizilazi potreba da se 3D štampači modifikuju i prilagode da bi se njihov potencijal za primjenu u farmaciji mogao u potpunosti iskoristiti. Prvi 3D štampač namijenjen konkretno za primjenu u izradi farmaceutskih terapijskih sistema proizvela je kompanija FabRx (London, Velika Britanija), M3DIMAKER™ 2020. godine.



Primjena nove, jeftinije tehnologije mogla bi naročito biti korisna zemljama u razvoju, stvaranjem ujedno i novih poslovnih mogućnosti. Očekuje se da će aktuelna istraživanja rezultirati pronalaskom novih materijala i smješa materijala pogodnih za 3D štampu, što bi omogućilo da proizvođači prošire svoj asortiman i da ponude gotove mješavine za primjenu u 3D štampi terapijskih sistema. Sa druge strane, novi ili unaprijeđeni materijali sa specifičnim fizičko-hemijskim i toksikološkim osobinama mogu uzrokovati povećanje cijena sirovina (53).

Ipak, jedan od najvećih izazova u uvođenju ovog koncepta vezan je za regulatorna pitanja, naročito u odnosu na sigurnosne aspekte jer se kod štampe sa pojedinim tehnikama koriste organski rastvarači i iz razloga što se usljed izlaganja materijala koji se štampa visokim temperaturama ili laserima velike energije mogu pojaviti nepoznati degradacioni proizvodi i nečistoće. Najprije bi bilo potrebno procijeniti i odobriti adekvatan broj termoplastičnih polimera i tečnih rezina koji se koriste u FDM i fotopolimerizacionim tehnikama, ali to može snažno da ograniči eksploataciju 3D tehnologije u proizvodnji lijekova. Dalje, današnje internacionalno prihvaćene smjernice za kvalitet odnose se na serijsku proizvodnju, za koju je karakteristična standardizacija i validirana proizvodnja, te prema tome većina propisanih pravila nije primjenljiva na proizvodnju malih serija lijekova koje zadovoljavaju potrebe individualnog pacijenta. Za sada, FDA je objavila dokument “Tehnička razmatranja medicinskih sredstava dobijenih aditivnom proizvodnjom” (engl. *Technical Considerations for Additive Manufactured Devices*), sa ciljem razmatranja uticaja tehnologije 3D štampe na karakteristike i kvalitet proizvedenih medicinskih sredstava. Zaključeno je da sva sredstva, uključujući i ona proizvedena tehnologijom 3D štampe, treba da ispunjavaju iste uslove kvaliteta i usklađenosti, i da kroz zajednički rad sa proizvođačima treba identifikovati kritične tačke koje treba strogo kontrolisati. U oblasti 3D štampanja lijekova ipak nema konkretnijeg napretka, iz razloga što je 3D štampa kao tehnologija za proizvodnju lijekova veliki izazov za regulatore. Bez obzira da li je lijek proizveden 3D štampom u javnoj, bolničkoj apoteci ili u uslovima industrijske proizvodnje, treba da bude osiguran njegov odgovarajući kvalitet, i moraju se pratiti određeni protokoli. Iz tog razloga sve komponente proizvodnog procesa uključujući hardver, softver, sirovine i njihove dobavljače, operatere i njihove obuke, odgovornosti i kontrolu kvaliteta moraju biti opsežno razrađeni. Osim toga, potrebno je razviti kvalitetne i pouzdane softvere i hardvere prilagođene farmaceutskoj upotrebi.

Sa pojavom novog proizvodnog procesa, nameće se pitanje na koji način osigurati bezbjednost i kvalitet proizvoda koji iz njega nastaje. S tim u vezi, potrebno je razmotriti više aspekata (53). Jedan od njih se odnosi na bezbjednost ekscipijenasa, odnosno na neophodnost razvoja novih ekscipijenasa koji će biti prihvatljivi sa toksikološkog aspekta. Dalje, neophodno je implementirati mjere kojima će se osigurati da je osoba koja rukuje uređajem, bilo da je u pitanju medicinska sestra, farmaceut ili ljekar, adekvatno obučena za izradu 3D štampanih lijekova. Za sada nije definisano ko obezbjeđuje i ko je odgovoran za kvalitet i stabilnost dobijenog proizvoda. Konačno, ostaje otvoreno pitanje ko će proizvoditi i isporučivati 3D štampače i da li će materijali od različitih proizvođača biti kompatibilni sa svim 3D štampačima (53).

## 1.4 Podjela tehnika 3D štampe

Može se reći da je za relativno kratko vrijeme razvijen veći broj tehnika 3D štampe, a u cilju njihove sistematizacije, u skladu sa ISO i ASTM (engl. *American Society for Testing and Materials*) standardima klasifikovane su u sledeće osnovne kategorije:

- Fotopolimerizacija (engl. *Vat photopolymerization*);
- Fuzija praška (engl. *Powder bed fusion*);
- Laminacija folija (engl. *Sheet lamination*);
- Povezivanje kvašenjem (engl. *Binder jetting*);
- Ekstruzija materijala (engl. *Material extrusion*);
- Direktna 3D štampa (engl. *Material jetting*);
- Primjena usmjerene energije (engl. *Direct energy deposition*).

Pregled navedenih kategorija sa načinom na koji se slojevi formiraju i prikazom komercijalnih naziva tehnika dat je u **Tabeli 1**.

**Tabela 1.** Prikaz tehnika 3D štampe po sistematizaciji ISO/ASTM, preuzeto i prilagođeno prema Movrin (54)

Grupa	Način formiranja slojeva	Komercijalni naziv tehnike	Skraćeni naziv
<b>Fotopolimerizacija</b>	laser, projektor glava štampača UV lampa	stereolitografija digitalna projekcija svjetlosti <i>multi laser volume</i> stereolitografija <i>liquid crystal display</i>	SLA DLP MLVS LCD
<b>Fuzija praška</b>	laser	selektivno lasersko sinterovanje selektivno lasersko topljenje direktno lasersko sinterovanje metala	SLS SLM DMLS
	mlaz elektrona	topljenje mlazom elektrona	EBM
<b>Laminacija folija</b>	laser, nož	proizvodnja laminiranih objekata laminacija plastičnih folija	LOM PSL
<b>Povezivanje kvašenjem</b>	glava štampača	vezivna 3D štampa	3DP
<b>Ekstruzija materijala</b>	glava ekstrudera	deponovanje istopljenog filamenta ekstruzija polučvrstog materijala	FDM SSE
<b>Direktna 3D štampa</b>	glava štampača i UV lampa	<i>polyjet, polyjet matrix</i>	PJ
<b>Primjena usmjerene energije</b>	mlaz elektrona	3D lasersko oblaganje direktno taloženje metala	DED

Prva tehnika 3D štampe koja je primijenjena u farmaciji zasnovana je na *ink-jet* tehnologiji, kod koje se rastvor vezivnog sredstva aplikuje na sloj praška, povezujući čestice praška, a proces se ponavlja dok se ne formira zadati objekat. Ovaj prvi uspješni eksperiment izvela je grupa istraživača sa *Massachusetts Institute of Technology*, SAD ranih 90-ih godina. *Ink-jet* tehnologijom izrađen je i Spritam, levetiracetam kompanije Aprelia Pharmaceuticals, koji je ujedno i prvi 3D štampani lijek odobren od strane FDA. 1989. godine Scott Crump je patentirao još jednu tehniku 3D štampe - modelovanje fuzionim deponovanjem (FDM) (55), nakon čega su razvijene i druge tehnike. Najčešće korištene tehnike 3D štampe u razvoju lijekova i terapijskih sistema jesu ekstruzione

tehnike - polučvrsta ekstruzija (engl. *semi-solid extrusion*, SSE) i FDM, stereolitografija (SLA), selektivno lasersko sinterovanje (SLS) i *ink-jet* 3D tehnika.

## 1.5 *Ink-jet* tehnika 3D štampe

Štampanje 3D objekata u farmaciji prvi put je ostvareno pomoću *ink-jet* štampača (56), koji je zapravo nadogradnja na klasičan *ink-jet* štampač, a funkcioniše po principu specifičnog i selektivnog raspršivanja rastvora vezivnog sredstva na sloj supstrata.

Proces štampanja započinje nanošenjem sloja praška na ploču klipa, nakon čega glava štampača preciznom brzinom i pokretima raspršuje rastvor (tačno definisane veličine kapljica) na sloj praška (57, 58). Uloga rastvora jeste da poveže čestice praška na koji je aplikovan. Čestice praška koje se tom prilikom ne povežu, služe kao potporni materijal samostojećim ili poroznim formiranim strukturama. Pritom, rastvor koji se raspršuje može sadržati samo vezivno sredstvo, dok sloj praška sadrži ljekovitu supstancu i ekscipijense. Alternativno, ljekovita supstanca može biti raspršena preko sloja praška u formi rastvora ili suspenzije nanočestica. Mehanizmi očvršćavanja isti su kao kod vlažne granulacije, i zasnivaju se na formiranju veza („tečnih mostova“) između čestica praška.

Klip koji nosi rezerve praška pomjera se naviše, da bi roler ravnomjerno nanio sledeći sloj praška preko klipa na kome se obavlja proces štampanja, a koji se pomjera za sloj niže. Slijedi raspršivanje rastvora, i proces se ponavlja sve dok se ne dobije zadani proizvod. Na ovaj način dobijaju se tablete slične onima proizvedenim procesom kompresije, ali manje čvrstine što im daje prednost brže dezintegracije (59).

### 1.5.1 Vrste *ink-jet* 3D štampe

Postoje dvije vrste *ink-jet* tehnike: kontinuirano *inj-jet* štampanje (*continuous ink-jet printing* (CIJ)) i „*drop-on-demand*“ (DOD) štampanje. Kod kontinuirane tehnike, pumpa visokog pritiska usmjerava tečnost kroz otvor promjera 50 do 80 mikrometara, formirajući kontinuirani protok rastvora. Piezoelektrični kristal izaziva protok rastvora takav da se rasprši u kapljice određene brzine i veličine u pravilnim vremenskim intervalima; zapravo, formirano elektrostatičko polje kontroliše ove parametre, i omogućava usmjeravanje formiranih kapljica na supstrat (60). Kod kontinuirane tehnike,

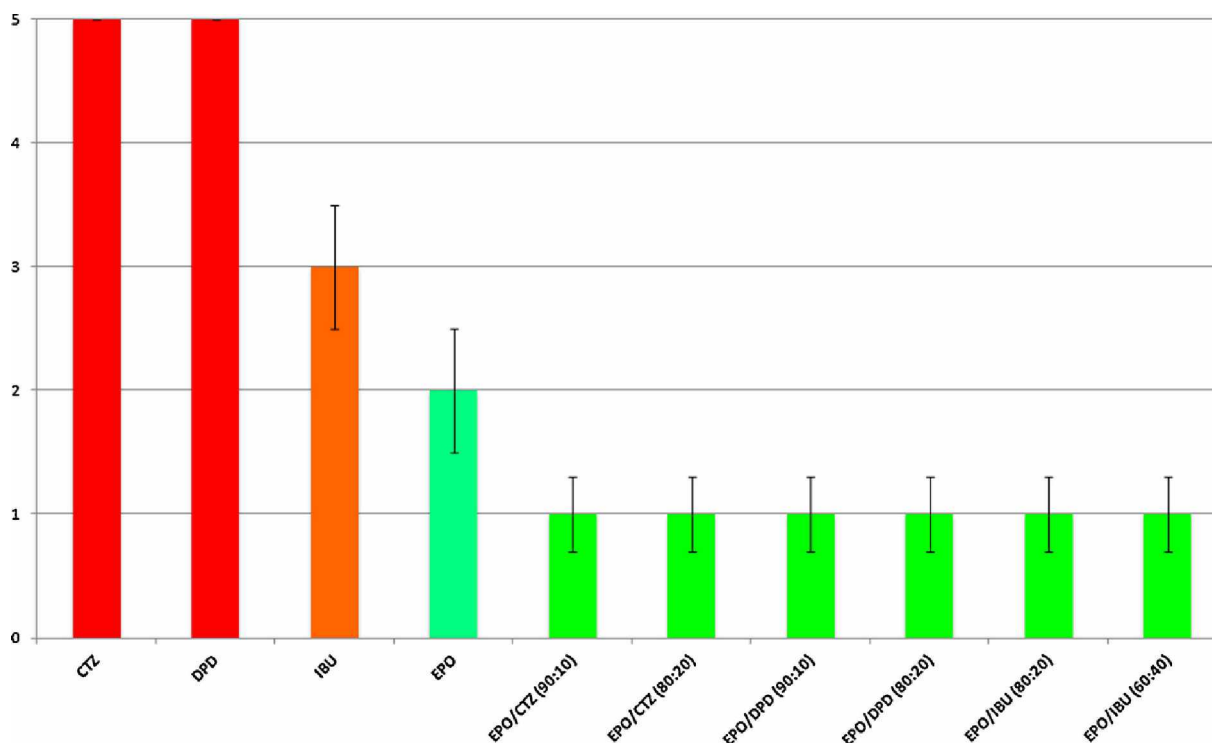
dodatno se koristi mehanizam koji sakuplja kapljice raspršene onda kada to nije potrebno, dok se kod *drop-on-demand* tehnike kapljice raspršuju samo kada se to zahtijeva. DOD sistem se dalje klasifikuje zavisno od mehanizma formiranja kapljica, pa tako razlikujemo termalni mehanizam koji podrazumijeva upotrebu termičkog otpornika koji se brzo zagrijava kako bi omogućio isparavanje rastvora odnosno nastanak mjehurića pare koji rastu i potiskuju kapljice iz glave štampača. Drugi je piezoelektrični mehanizam, gdje se koristi piezoelektrični materijal na koji, kada se primijeni napon, dolazi do njegove mehaničke deformacije što uzrokuje izbacivanje kapljica veziva iz glave štampača (61, 62). Ovaj mehanizam se smatra pogodnijim jer je termalna glava štampača ograničena na primjenu samo kod isparljivih tečnosti, dok se piezoelektrična može primijeniti na širok spektar rastvora (63). Dodatno, temperatura termalne glave dostiže i do 300°C što može izazvati degradaciju ljekovite supstance, što ograničava primjenu ove tehnike u farmaceutske svrhe (64). Pomoću obje tehnike mogu se proizvesti kapljice promjera od 10 do 50 mikrometara, što odgovara zapremini od 1 do 70 pikolitara (60). Ipak, piezoelektričnoj tehnici se daje prednost u smislu pogodnosti za primjenu u razvoju lijekova i terapijskih sistema, zbog mogućnosti rada na sobnoj temperaturi, kao i sa manje isparljivim i biokompatibilnim tečnostima (64). Kod obje tehnike, neophodno je tretirati 3D izrađene objekte toplotom kako bi se uklonili korišteni rastvarači, tako da ne bude zaostalih rezidua i nečistoća. Međutim, najveći nedostatak *ink-jet* tehnike 3D štampe ogleda se u nezadovoljavajućim mehaničkim osobinama proizvedenih objekata, usljed velikog poroziteta i prečnika čestica, što dovodi do stvaranja značajnog praznog prostora između uzastopnih slojeva, čime se takođe objašnjava postojanje neravnina na površini izrađenih proizvoda (54).

### 1.5.2 Pregled dosadašnjih istraživanja

Primjenom *ink-jet* tehnike, Cader i saradnici uspješno su izradili tablete sa polivinil pirolidonom (kao model ekscipijensom) i tiamin hidrohloridom (model ljekovita supstanca). Mastilo za štampu sadržalo je i glicerol, polisorbat 20 i vodu. Mehanizam očvršćavanja slojeva zasnovan je na isparavanju rastvarača (vode) u ambijentalnim uslovima. Sadržaj ljekovite supstance u izrađenim tabletama bio je srazmjeran sadržaju u mastilu za štampu, pri čemu je karakterizacija tableta pokazala da nije došlo do promjene polimorfnog oblika ljekovite supstance, a tablete su pokazale svojstva brzog oslobađanja

ljekovite supstance. Dodatno, budući da je kao rastvarač korištena voda, izbjegnuta je primjena organskih rastvarača, i samim tim potencijalni toksični efekat njihovih rezidua u tabletama. Zaključak ove studije je da bi pripremljeno mastilo potencijalno moglo biti korišteno kao univerzalno mastilo za izradu tableta *ink-jet* tehnikom 3D štampe za sve lijekovite supstance koje su rastvorljive u vodi (61).

Scoutaris i saradnici su pomoću *jet dispensing* tehnike (vrsta *ink-jet* tehnike 3D štampe) izradili oromukozalne filmove za maskiranje gorkog ukusa lijekovitih supstanci, gdje su kao model supstance korišteni cetirizin hidrohlorid (CTZ), difenhidramin hidrohlorid (DPD) i ibuprofen (IBU), za koje je poznato da maskiranje ukusa predstavlja veliki izazov u formulaciji (65). Naime, u eksperimentu je primijenjen etanolni rastvor Eudragita EPO, a odnos polimera i supstance je variran i iznosio je 90:10, 80:20 i 60:40. Kako bi se odštampani filmovi, rastvor je nanošen u paralelnim linijama, a brzina kretanja glave štampača je iznosila 9 mm/s. Površina izrađenih filmova je bila glatka i sjajna, čak i kada je sadržaj lijekovite supstance bio visok, a dodatno je karakterizacija filmova pokazala njihovu uniformnost, što je potvrdilo dobru reproducibilnost ove tehnike. Brzo isparavanje etanola omogućilo je i brzo štampanje filmova, bez potrebe za naknadnom obradom. Istraživanje je takođe pokazalo da je samim prilagođavanjem dimenzija filma moguće postići sadržaj lijekovite supstance koji će odgovarati potrebama svakog pacijenta ponaosob. *In vivo* testiranje uspješnosti maskiranja gorkog ukusa supstanci sprovedeno je na 10 zdravih dobrovoljaca, na način što su filmovi držani u ustima 2 minuta nakon čega su ispljunuti, a dobrovoljci su odmah ocjenjivali gorčinu na skali od 1 do 5. Rezultati su pokazali potpuno maskiranje ukusa za sve aktivne supstance (Slika 8), što je pripisano intermolekularnim interakcijama funkcionalnih grupa lijekovite supstance i polimera.



**Slika 8.** Rezultati *in vivo* testiranja uspješnosti maskiranja gorkog ukusa supstanci filmovima izrađenim *jet dispensing* tehnikom, sprovedeno na 10 zdravih dobrovoljaca (preuzeto iz Scoutaris i sar., 2015 (65))

## 1.6 Modelovanje fuzionim deponovanjem (FDM)

Među komercijalno dostupnim tehnikama 3D štampe, FDM je do sada najviše ispitana u oblasti izrade terapijskih sistema, i pokazala je veliki potencijal za primjenu u farmaciji i medicini (7, 19, 29), kao i implementaciji koncepta digitalnog zdravlja.

FDM tehniku, za koju se u literaturi često koristi i termin proizvodnja fuzionim filamentima (engl. *fused filament fabrication* (FFF)), osmislio je Scott Crump 1988. godine, zahvaljujući pokušaju da napravi igračku svojoj ćerki pomoću jednostavnog pištolja za lijepak. Zapravo, on je zamijenio lijepak sa mješavinom polietilena i voska za svijeće, i upotrijebio ga da tako formira slojeve igračke, nanoseći ih jedan preko drugog. Nakon ovog početnog uspjeha, razvio je automatizovanu verziju i godinu dana kasnije, 1989. patentirao FDM tehnologiju (66).

Kao i ostale tehnike 3D štampe, FDM prati osnovne korake (19):

- a) na početku se primjenom CAD softvera kreira 3D objekat koji se želi štampati, koji se zatim siječe u slojeve i šalje softveru štampača kao stl. fajl;
- b) prethodno razvijen i optimizovan termoplastični filament impregniran lijekom se postavlja u štampač gdje se topi i istiskuje kroz zagrijanu mlaznicu glave štampača; komercijalni FDM štampači omogućavaju podešavanje temperature glave štampača i radne ploče, pa je stoga ova tehnika pogodna za štampanje sa različitim polimerima i mješavinama polimera;
- c) ekstrudirani filamenti se nanose na radnu ploču štampača kretanjem glave štampača u smjeru x-y ose, čime se formira prvi sloj objekta. Po završetku štampanja svakog pojedinačnog sloja, platforma sa pločom za štampanje se pomjera naniže, koliko je potrebno za nanošenje novog sloja. Kako se nanijeti filament hladi, on se povezuje sa prethodnim slojem i očvršćava. Proces se na taj način ponavlja, sve do formiranja zadanog objekta.

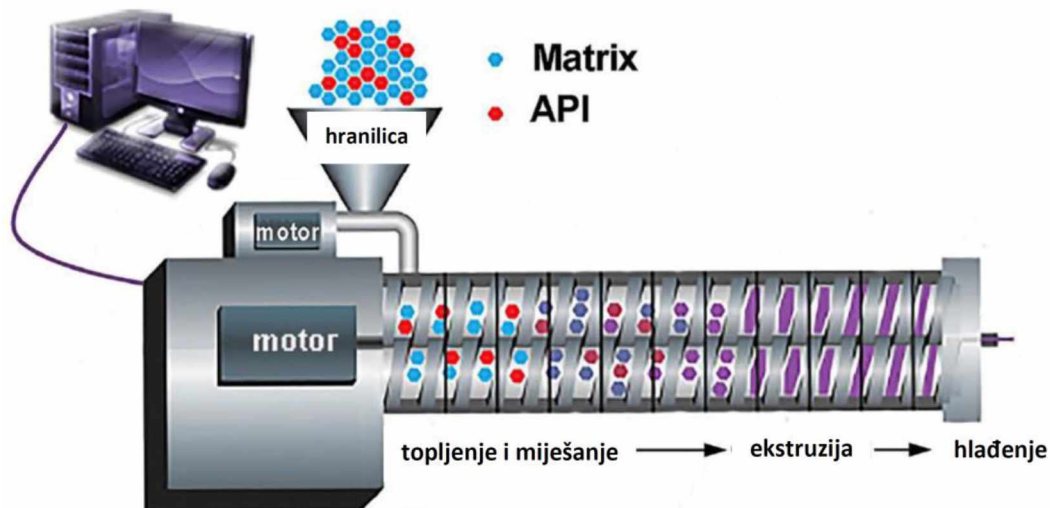
Primjenom FDM tehnike moguće je dobiti složene objekte jedinstvenih karakteristika, prilagođavanjem ili kombinovanjem polimera koji se koriste za štampanje.

### **1.6.1 Filamenti u FDM 3D štampi**

Komercijalni filamenti koji se koriste za FDM štampač uobičajeno su napravljeni od termoplastičnih materijala, poput polivinil alkohola (PVA), polikarbonata (PC), polimljične kiseline (PLA) i akrilonitril butadien stirena (ABS). Međutim, veći dio njih se ne smatra bezbjednim za primjenu kod ljudi. Stoga su istraživanja u oblasti farmacije usmjerena prvenstveno na pronalaženje i optimizaciju sirovina za FDM štampač, što se postiže kroz proces ekstruzije topljenjem (hot melt extrusion (HME)) (67). Ekstruzija topljenjem se široko primjenjuje u farmaceutskoj industriji za proizvodnju čvrstih disperzija ljekovitih supstanci i polimera bezbjednih za primjenu kod ljudi, sa ciljem poboljšanja rastvorljivosti i bioraspoloživosti slabo rastvorljivih ljekovitih supstanci (68). Ovaj proces započinje pripremom smješe praškova koja sadrži polimer i ljekovitu supstancu, a najčešće i jedan ili više ekscipijenasa. Smješa se sipa u hranilicu, kroz koju dospijeva do rezervoara ekstrudera gdje biva izložena kombinovanom uticaju povišenog



pritiska i temperature, što izaziva njeno topljenje. Pomoću rotirajućeg puža, otopljena smješa se potiskuje kroz otvor metalne mlaznice, kroz koji izlazi u formi filamenata (Slika 9). Dobijeni filamenti se ostavljaju da se ohlade i očvrstnu, nakon čega se pakuju i zatvaraju u vakuumskom eksikatoru, kako bi se uklonila eventualno zaostala voda.



**Slika 9.** Oprema za dobijanje filamenata za FDM štampu procesom ekstruzije topljenjem (preuzeto i prilagođeno iz Patil i sar., 2016 (69))

Lijek može biti inkorporiran u filament na dva načina: putem dodavanja u smješu koja će proći proces ekstruzije, ili putem potapanja ekstrudiranog filamenta u rastvor koji sadrži ljekovitu supstancu, što će dovesti do pasivne difuzije lijeka u filament. Metoda impregnacije filamenta putem pasivne difuzije ljekovite supstance primijenjena je u nekoliko istraživanja (70, 71), međutim njen glavni nedostatak je nizak sadržaj supstance koji se postiže (manje od 2%). Sa druge strane, ekstruzijom topljenjem može se postići inkorporiranje visokih doza lijeka (72). Ono što je dodatno prednost jeste što se mogu koristiti isti ekscipijensi za inkorporiranje različitih ljekovitih supstanci (73), za razliku od metode potapanja gdje izbor rastvarača zavisi od karakteristika, prevashodno rastvorljivosti ljekovite supstance.

Da bi ekstrudirani filamenti bili pogodni za štampanje FDM tehnikom, moraju imati određene karakteristike; između ostalog, promjer filamenta mora biti odgovarajući kako bi se uklopio u glavu, tj. mlaznicu štampača. Međutim, neki polimeri pri izlaganju toploti imaju tendenciju da se skupljaju ili šire, pa je u tom slučaju ključno odabrati odgovarajuću

glavu, tj. mlaznicu štampača. Dodatno, kako bi se obezbijedila konzistentnost i neprekidan kontinuitet štampanja, jako je važno osigurati da dijametar filamenta ne varira, pa u tom smislu može pomoći dodavanje lubrikansa koji će smanjiti trenje između ekstrudata i puževa ekstrudera, što će omogućiti glatkiji i uniformniji izlazak filamenta iz ekstrudera (71).

Za proces štampanja FDM tehnikom, krucijalan je balans između čvrstine i krтости, odnosno lomljivosti filamenta (74). Previše čvrsti i kruti filamenti ne mogu se adekvatno namotati, što bi zahtijevalo modifikaciju smješe za ekstruziju. Sa druge strane, može da se javi problem prilikom punjenja previše krhkih filamenata u glavu štampača, a može i da dođe do njihovog lomljenja tokom štampanja, što zaustavlja dalji proces. U tom slučaju, dodatak plastifikatora može doprinijeti većoj fleksibilnosti filamenata. U nekoliko radova opisane su metode za predviđanje pogodnosti filamenata za štampu na osnovu njihovih mehaničkih osobina (75, 76), premda je činjenica da je dobijanje optimalnih filamenata izazovan, ali trenutno i prilično empirijski proces. Naime, na ovaj proces utiču mnoge varijable, uključujući odnos polaznih sirovina, temperaturu ekstruzije i temperaturu štampanja. Međutim, empirijskim pristupom se troši veliko vrijeme i resursi, pa su primjenom tehnika mašinskog učenja, Elbadawi i saradnici razvili softversko rješenje pod nazivom M3DISEEN, koje će pomoći u predviđanju ključnih procesnih parametara (temperatura ekstruzije, mehaničke karakteristike filamenata, temperatura štampanja i printabilnost) kojim će se optimizovati proces štampanja i time ubrzati proizvodnja terapijskih sistema primjenom FDM tehnike (77).

### **1.6.2 Pregled dosadašnjih istraživanja**

Sprovedene su brojne studije u kojima je ispitan i dokazan potencijal izrade različitih farmaceutskih oblika primjenom FDM tehnike, uključujući tablete (78, 79), kapsule (80), orodisperzibilne filmove (81, 82), maske za topikalnu primjenu (25), kao i različitih terapijskih sistema poput vaginalnih prstena sa kontrolisanim oslobađanjem progesterona (83) ili intrauterinih i subkutanih sistema (84).

Zahvaljujući raznovrsnosti polimernih matriksa koji se mogu koristiti, FDM tehnika se pokazala kao veoma sofisticirano rješenje za izradu terapijskih sistema koji omogućavaju

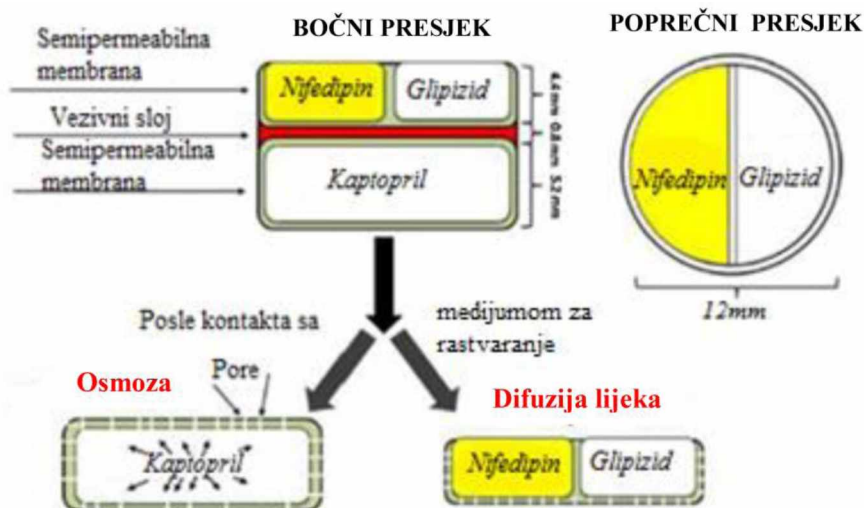
isporuku lijeka u odgovarajuće djelove tijela, što rezultuje većom efikasnošću sa jedne, i smanjenjem sistemskih neželjenih dejstava sa druge strane. Ono što je takođe karakteristično za ovu tehniku jeste sposobnost izrade terapijskih sistema kod kojih profili oslobađanja ljekovite supstance variraju od trenutnog, preko produženog i modifikovanog oslobađanja, a da pritom nije neophodna dodatna obrada, poput oblaganja filmom.

U radu Khaled i saradnika (33) vršeno je ispitivanje tableta dobijenih primjenom FDM tehnike na RegenHU 3D štampaču, u koje su inkorporirane tri ljekovite supstance sa dva različita mehanizma oslobađanja (Slika 10).



**Slika 10.** Prikaz RegenHU 3D štampača i višekomponentnih tableta (preuzeto i prilagođeno iz Khaled i sar., 2015 (33))

Model tableta sadržala je kaptopril u dijelu sa osmotskim mehanizmom, te nifedipin i glipizid u odjeljcima sa produženim oslobađanjem, i potencijalno bi se mogla koristiti za terapiju hipertenzije kod dijabetičara (Slika 11). Izabrana je višesegmentna strategija da bi se obezbijedila razdvojenost ljekovitih supstanci, kako bi mogle da postignu nezavisno kontrolisanu kinetiku oslobađanja. Formulacija preparata kaptoprila sa produženim i modifikovanim oslobađanjem često je izazov zbog njegovog veoma kratkog poluvremena eliminacije, a u konkretnom slučaju to je prevaziđeno putem osmotskog mehanizma koji omogućava kontrolisano oslobađanje lijeka u dužem vremenskom periodu, nezavisno od njegove koncentracije.



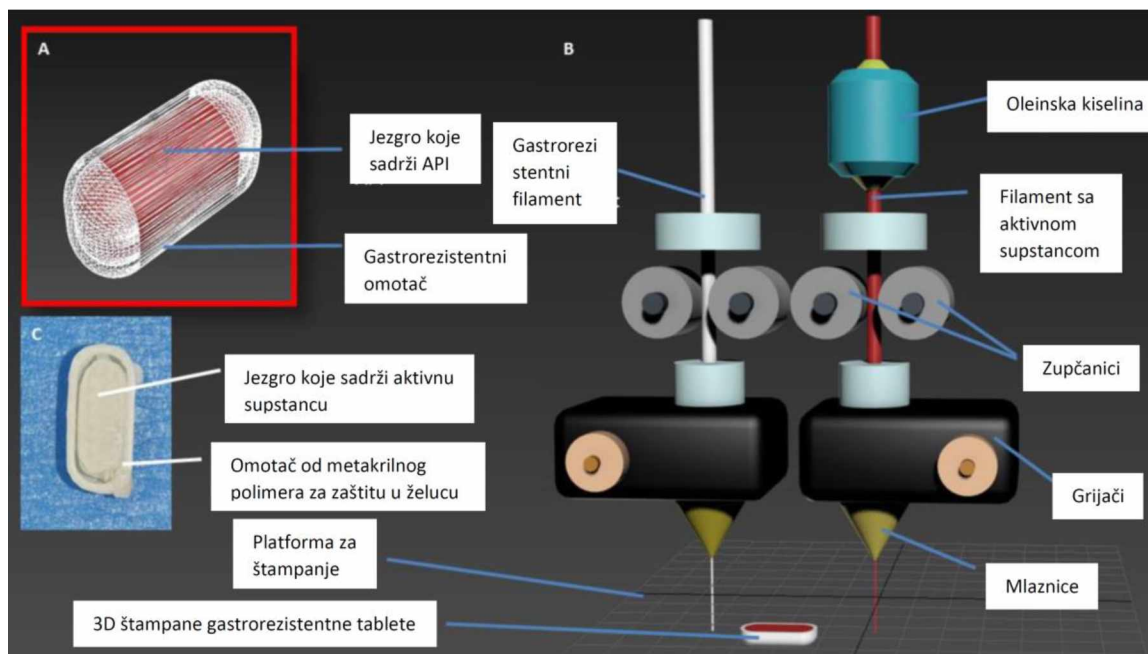
**Slika 11.** Shematski prikaz odjeljka kaptoprila koji se oslobađa osmozom i odjeljaka nifedipina i glipizida koji se oslobađaju mehanizmom difuzije (preuzeto i prilagođeno iz Khaled i sar., 2015 (33))

Za postizanje produženog oslobađanja u odjeljcima sa nifedipinom i glipizidom, korišten je matriksni sistem sa HPMC, uobičajenim farmaceutskim ekscipijensom, koji u kontaktu sa vodom bubri i formira viskozni gel što djeluje kao barijera čime se usporava, tj. produžava oslobađanje lijeka iz polimernog matriksa. Kao vezivno sredstvo za formiranje konzistentnih glatkih pasti korišten je vodeno-alkoholni gel (75% etanola v/v), koji omogućava bolju penetraciju kroz čestice praška, smanjuje površinsku hidrataciju i bubrenje čestica i obezbjeđuje odgovarajuće reološko ponašanje HPMC za štampanje. Ispitivanje brzine oslobađanja je pokazalo da se oslobađanje ljekovitih supstanci vrši difuzijom kroz slojeve gela ili osmozom kroz porozan materijal. Na taj način moguće je modifikovanjem formulacije ili sastava ekscipijenasa uticati na dozu ili profil oslobađanja lijeka.

U radu Okwuosa i saradnika (85), cilj je bio da se napravi gastrozistentna tableta korišćenjem dvije mlaznice u jednom stepenu, pomoću dualnog FDM 3D štampača. Gastrozistentne tablete su izrađene primjenom polivinil pirolidina (PVP) za jezgro, a kopolimera metakrilne kiseline za omotač (Slika 12). Teofilin je izabran kao model ljekovita supstanca zbog njegove termičke stabilnosti, male molekulske mase i visoke rastvorljivosti u vodi. Serijom eksperimanata optimizovan je odnos praškaste smješe koja sadrži polimer (PVP), plastifikator (trietil citrat, TEC), sredstvo za dopunjavanje (talk) ili

trobazni natrijum fosfat (TBP) i lijekovitu supstancu (teofilin). Eudragit L100-55, TEC i talk su pomiješani i ekstrudirani ekstruzijom topljenjem kako bi se pripremio omotač.

Primjenom softvera povezanog sa štampačem, dizajnirane su kaplete (tablete u obliku kapsule). Da bi se procijenio uticaj debljine omotača izgrađeni su brojni dizajni u kojima je povećavana debljina omotača (0,17, 0,35, 0,52, 0,70 ili 0,87 mm).



**Slika 12.** Shematski prikaz proizvodnje 3D kapleta; a) Dizajnirana su dva komplementarna fajla u softveru kako bi se formirala struktura; b) Dva različita filamenta prolaze kroz dvije različite mlaznice: filament za gastrorezistentni omotač (sa Eudragit L polimerom) i filament za jezgro (sa aktivnom supstancom i PVP); c) Slika 30% završene omotač-jezgro printlete (preuzeto i prilagođeno iz Okwuosa i sar., 2017 (85))

Testovi *in vitro* brzine rastvaranja lijekovite supstance iz kapleta pokazali su da debljine omotača 0,17 mm i 0,35 mm dovode do preranog oslobađanja lijeka u kiselom medijumu, što ukazuje da je za ovu debljinu omogućeno štampanje samo 1-2 sloja omotača, što nije bilo dovoljno za kontrolu oslobađanja lijekovite supstance. Kod omotača veće debljine (0,52 mm, 0,7 mm ili 0,87 mm), postignuta je kontrola oslobađanja lijekovite supstance (<3% lijekovite supstance se oslobađa nakon 120 minuta u želudačnom medijumu). Smatra se da je to najvjerovatnije posljedica mogućnosti štampanja većeg broja slojeva omotača (3-5 slojeva) što je od suštinskog značaja za izgradnju barijere otporne na kiseli

želudačni sadržaj. Značajno je otpuštanje lijeka na pH 6,8 koje se sprovodi u dvije faze, prva faza u trajanju od 45 minuta nakon promjene pH vrijednosti, pri čemu je oslobađanje lijekovite supstance usporeno, a druga faza je nakon 45 minuta kada dolazi do bržeg oslobađanja lijekovite supstance. Moguće je da prva faza odražava difuziju lijekovite supstance kroz slojeve omotača, dok se brže oslobađanje lijekovite supstance odvija nakon potpunog rastvaranja omotača, kada i jezgro sačinjeno od PVP počinje da se rastvara.

Razvoj idealne formulacije namijenjene djeci različitih uzrasta povezan je sa brojnim izazovima i ograničenjima. Potrebno je uzeti u obzir veliki broj parametara i faktora kako bi se postigla odgovarajuća bezbjednost i efikasnost lijeka u ciljnoj populaciji. Najveći problemi su povezani sa poteškoćama u žvakanju i gutanju, prilagođavanju doze, medicinskim greškama i izboru pomoćnih supstanci, od kojih neke, iako bezbjedne za adultnu populaciju, mogu predstavljati rizik ukoliko se primijene kod djece (86). Naročito problematično je postići odgovarajuće doziranje, gdje najčešće primjenjivan metod, a to je dijeljenje tablete, može uticati na bezbjednost i efikasnost lijeka, odnosno terapijski ishod. Baklofen, derivat gama-aminobuterne kiseline (GABA) koji se koristi u terapiji spasticiteta kod različitih neuroloških stanja, nije dostupan u formulaciji prilagođenoj djeci, već je jedini način primjene ovog lijeka putem intratekalne injekcije. Pristup da se od tableta sa trenutnim oslobađanjem namijenjenih odraslima priprema oralna suspenzija je danas najviše zastupljen u apotekarskoj praksi. Međutim, u nedavno sprovedenim istraživanjima pokazano je da je navedeni pristup kod 50% - 60% pacijenata doveo do greške, u smislu nemogućnosti da se odmjeri odgovarajuća doza lijeka (87). Dodatno, istraživanja su pokazala da brzo oslobađanje i resorpcija baklofena mogu biti povezani sa određenim simptomima toksičnosti, te bi idealna formulacija ovog lijeka trebala da omogući modifikovano oslobađanje lijekovite supstance, što bi, uz individualizaciju doze, minimiziralo neželjena dejstva lijeka. Palekar i saradnici su primjenom FDM tehnike izradili minitablete oblika kapsule (tzv. kapletu) sa modifikovanim oslobađanjem baklofena uz korištenje filamenata PVA farmaceutskog stepena kvaliteta, u različitim dimenzijama i sa različitim stepenom popunjenosti unutrašnje strukture (engl. *infill*) (88).

Kod konvencionalnih farmaceutskih oblika, brzina oslobađanja lijekovite supstance može se modifikovati kroz modifikaciju sastava, npr. oblaganjem jezgra tablete polimernim filmom koji obezbjeđuje produženo oslobađanje lijekovite supstance, zatim primjenom

matriksnih sistema, tableta sa osmotskim mehanizmom i sl. Međutim, kod tehnologije 3D štampe, nije potrebna promjena sastava, odnosno ekscipijenasa, kako bi se postigao željeni profil oslobađanja ljekovite supstance, već je to moguće postići jednostavnim prilagođavanjem parametara štampanja, dimenzija farmaceutskog oblika ili stepena ispunjenosti unutrašnje strukture. Sa druge strane, tehnologijom 3D štampe zaobilazi se potreba za dodatnim uređajima za tabletiranje i industrijskim postrojenjima. Ona omogućava direktno štampanje tableta željenog oblika, težine, veličine, karakteristika oslobađanja ljekovite supstance iz polimernih filamenata impregniranih lijekom. Najveći problemi trenutno dostupnih tehnologija proizvodnje pedijatrijskih formulacija poput rastvorljivosti, gorkog ukusa, neadekvatne doze, izbora ekscipijenasa i sl., mogu se prevazići izradom 3D štampanih mini kapleta, čime se višestruko smanjuje rizik od medicinskih grešaka i omogućuje brzo štampanje i dostupnost lijekova, naročito u hitnim slučajevima, s obzirom da nije potrebna specijalna oprema.

## 1.7 Tehnike 3D štampe zasnovane na fotopolimerizaciji

Tehnike fotopolimerizacije zasnivaju se na formiranju čvrstih objekata iz tečnog rezina, nakon njegovog izlaganja svjetlosti. Grupu fotopolimerizacionih tehnika čine: stereolitografija (SLA), digitalno projektovanje svjetlosti (DLP) i LCD tehnologija štampe. Ove tehnike se međusobno razlikuju po izvoru svjetlosti i načinu formiranja slike. Fotopolimerizacione tehnike, za koje je karakteristična visoka rezolucija štampe, pogodne su za izradu čvrstih farmaceutskih oblika jer se ljekovita supstanca može pomiješati sa fotopolimerom prije štampanja, da bi se posle štampanja ona našla uklopljena u matriksu koji je očvrsnuo. Za razliku od FDM tehnike, za proces štampanja nije neophodno zagrijavanje, te su stoga tehnike zasnovane na fotopolimerizaciji prikladne za štampu i sa termostabilnim i sa termolabilnim ljekovitim supstancama. Kod ove vrste tehnika, jako je važno uzeti u obzir kakva je rastvorljivost ljekovite supstance u fotopolimeru kao i njenu eventualnu osjetljivost na svjetlost.

### 1.7.1 Polimerizacija i fotopolimerizacija

Termin polimerizacija označava proces stvaranja polimera kroz lančanu reakciju, koja može biti pokrenuta različitim okidačima uključujući svjetlost, temperaturu, snop elektrona, pritisak itd. (89). Kada je okidač za reakciju polimerizacije izlaganje supstrata svjetlosti određene talasne dužine, taj proces se naziva fotopolimerizacija. Za proces fotopolimerizacije neophodne su 3 komponente: fotopolimerizujući monomer ili oligomer, izvor svjetlosti i fotoinicijator. Kako bi se prilagodile osobine rezina, mogu biti dodate i druge supstance poput plastifikatora, sredstava za kvašenje, sredstava za poboljšanje protočnosti, sredstava za dopunjavanje, boje itd. (90).

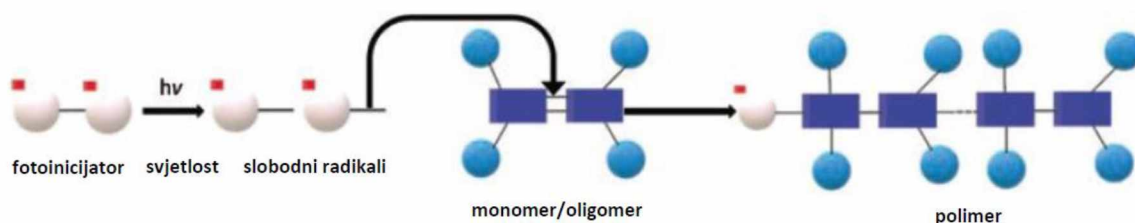
Generalno se proces fotopolimerizacije može podijeliti u tri faze (91):

- 1) inicijacija: usljed izlaganja svijetlu, fotoinicijator podliježe reakciji u kojoj nastaju slobodni radikali, nestabilni molekuli visoke reaktivnosti. Oni djeluju tako što napadaju monomere koji se povezuju sa drugim molekulima monomera ili oligomera;
- 2) propagacija: slobodni radikali propagiraju između monomera čije funkcionalne grupe međusobno reaguju čime se započinje polimerizacija, gdje se molekuli



- monomera povezuju linearno. S obzirom da je u pitanju trodimenzionalan proces, dolazi do ukrštenog povezivanja između polimernih, makromolekulskih lanaca;
- 3) terminacija: dolazi do stvaranja kovalentnih veza između umreženih lanaca makromolekula, čime se proces polimerizacije završava.

Proces polimerizacije prikazan je na Slici 13.



**Slika 13.** Mehanizam fotopolimerizacije

Za proces fotopolimerizacije neophodna je svjetlost. U reakcijama fotopolimerizacije uobičajeno se koristi ultraljubičasta (200 – 400 nm, UVA: 320 – 400 nm, UVB: 290 – 320 nm i UVC: 190 – 290 nm) i vidljiva oblast spektra (400 – 700 nm). Infracrvena svjetlost se vrlo rijetko koristi (92).

Jedna od značajnih fotohemijskih osobina svjetlosti jeste mogućnost prenosa energije, s obzirom da je svjetlost elektromagnetni talas. Kada molekul apsorbira svjetlost, on se ekscitira na viši elektronski energetska nivo, što zatim pokreće reakciju sa drugim molekulima (91). Dakle svjetlosni izvor može da prenosi određenu količinu energije. Izvori energije koji se koriste u fotopolimerizacionim reakcijama uključuju polihromatsku i monohromatsku svjetlost, a neki od primjera su ksenonske lampe, mikrotalasne lampe, živine lampe, LED (engl. *light emitting diodes*) i laseri (90). Laseri su izvori monohromatske svjetlosti, čije se prednosti ogledaju u mogućnosti selekcije širokog opsega specifičnih talasnih dužina, kao i velikoj snazi koncentrovanoj na malom fokusiranom mjestu, te velikoj rezoluciji.

Za reakcije fotopolimerizacije uobičajeno se kao izvor svjetlosti upotrebljavaju laserski zraci, zahvaljujući svojim specifičnim karakteristikama od kojih su najznačajnije:

- velike su mogućnosti u izboru talasnih dužina;
- njima se postiže velika koncentracija energije na maloj površini;

- monohromatska svjetlost (što pruža mogućnost kontrole apsorpcije svjetlosti i zatim fotohemijske reakcije, čime je smanjena vjerovatnoća sporednih reakcija i lokalnog zagrijavanja);
- moguće je postići jednostavno usmjeravanje svjetlosti na određenu tačku, odnosno površinu;
- kratko je vrijeme izloženosti površine, laser poput olovke crta zadani objekat sa velikom preciznošću što za rezultat ima visoku rezoluciju štampe.

### 1.7.2 Fotoinicijatori

Kako apsorpcija svjetlosti od strane monomera i oligomera sama po sebi nije dovoljna da stvori adekvatnu količinu energije za otpočinjanja procesa polimerizacije, neophodno je dodavanje fotoinicijatora (91). Fotoinicijatori su uglavnom organske supstance koje su termostabilne i sposobne za apsorpciju svjetlosti u UV i vidljivoj oblasti spektra (93).

U zavisnosti od prirode primijenjenog fotoinicijatora, reakcije polimerizacije mogu biti radikalske (koje su uglavnom zastupljene) ili jonske (katjonska i anjonska) (93). Postoje dvije vrste fotoinicijatora za polimerizaciju posredovanu slobodnim radikalima, koji se razlikuju po mehanizmu djelovanja. Kod inicijatora tip I vrlo brzo nakon apsorpcije fotona dolazi do raskidanja veza. Sa druge strane, inicijatori tip II stvaraju relativno dugotrajna pobuđena stanja sposobna da podlegnu reakcijama apstrakcije vodonika ili transfera elektrona sa molekulima ko-inicijatora koji se namjerno dodaje monomerima (93).

Fotoinicijatori mogu biti primijenjeni sami, ili u kombinaciji sa fotosenzibilizatorima ili ko-inicijatorima. Fotosenzibilizatori su molekuli koji apsorbuju svjetlost i prenose višak proizvedene energije fotoinicijatoru, dok ko-inicijatori ne apsorbuju svjetlost, već reaguju sa fotoinicijatorom kako bi se proizvele čestice koje iniciraju reakciju. Fotosenzibilizatori djeluju tako što prenose ili energiju ili elektrone, i tu spadaju brojna aromatična jedinjenja uključujući benzo- i acetofenone, pirene, antracene, naftalene (94).

Prednosti radikalskih fotoinicijatora ogledaju se u tome što ne zahtijevaju veliku količinu energije, reakcija se odvija na sobnoj temperaturi i proces je brz. Od radikalskih fotoinicijatora najčešće se primjenjuju aromatični ketoni i acilfosfin oksidi (95).

Da bi bili pogodni za upotrebu, fotoinicijatori treba da budu biokompatibilni, da imaju dobru sposobnost apsorpcije svjetlosti, stabilnost u toku upotrebe, nisku osjetljivost na antioksidanse, da su rastvorljivi i hemijski visoko reaktivni kako bi se proces polimerizacije odigrao brzo. Sa aspekta primjene u postupku izrade 3D štampanih tableta SLA tehnikom, najvažnija karakteristika koju treba da ima fotoinicijator jeste da je bezbjedan za primjenu kod ljudi. Upravo ograničena rastvorljivost u vodi i citotoksičnost predstavljaju najveća ograničenja za primjenu mnogih fotoinicijatora u oblasti biomedicine (96). U istraživanjima u oblasti 3D štampe lijekova, kao efikasni a ujedno i bezbjedni fotoinicijatori u primijenjenim koncentracijama, izdvojili su se riboflavin-trietanolamin, riboflavin-arginin sistem i različite vrste fotoinicijatora zaštićenog naziva Irgacure, među kojima se ističe Irgacure 819 (hemijski difenil(2,4,6-trimetilbenzoil)fosfin oksid) (DPPO). Navedeni fotoinicijatori imaju bolje osobine biokompatibilnosti u odnosu na ostale. Fotoinicijator se može upotrebljavati sam ili u kombinaciji sa jedinjenjima poput takozvanih fotosenzitizatora ili ko-inicijatora. Pod fotosenzitizatorom se podrazumijeva molekul koji ima svojstvo da apsorbuje svjetlost i da prenosi višak generisane energije ili elektrone na fotoinicijator. Sa druge strane, ko-inicijator ne karakteriše apsorpcija svjetlosti, već u njegovoj reakciji sa fotoinicijatorom nastaju inicijatorske grupe. Tu većinom spadaju aromatična jedinjenja poput benzofenona, pirena, acetofenona, trifenilamina, naftalena i antracena.

### **1.7.3 Materijali za fotopolimerizacione tehnike**

Polimeri koji se koriste za izradu terapijskih sistema pomoću fotopolimerizacionih tehnika treba da budu biokompatibilni i bezbjedni za kliničku primjenu, odnosno da nisu toksični te da pokazuju dobru rastvorljivost u vodi (97). Da bi uopšte bili pogodni za primjenu kod ovih tehnika, polimeri treba da imaju funkcionalne grupe koje će omogućiti brzo očvršćavanje posredstvom polimerizacije nakon izlaganja svjetlosti određene talasne dužine. Uobičajeno su u pitanju akrilati ili fumarati (98). Međutim, upravo zahtjev za postojanjem reaktivnih grupa predstavlja i najveću prepreku za primjenu ove tehnike zbog ograničenog broja biokompatibilnih i fotopolimerizujućih polimera koji su biorazgradivi. Iako sami polimeri većinom nisu citotoksični, zaostali monomeri koji nisu polimerizovali i rezidue fotoinicijatora koje su ostale uklopljene u matriks polimera,

mogu biti (99). Stoga je izuzetno važno ukloniti ih do nivoa koji su prihvatljivi, nakon završetka reakcije fotopolimerizacije.

U dosadašnjim istraživanjima u oblasti biomedicine u značajnoj mjeri je sa uspjehom korišten polietilen glikol (PEG), polimer niske toksičnosti i interakcije sa proteinima i ćelijama (100). PEG je takođe, kao materijal koji se dodatkom akrilata ili metakrilata na krajevima može prevesti u molekul koji polimerizuje pod uticajem svjetlosti, odobren od strane FDA za različite medicinske primjene (101).

Poli(etilen glikol) diakrilat (PEDda), akrilovana forma PEG, se često primjenjuje u različitim sferama biomedicine, uključujući između ostalog nosače u tkivnom inženjeringu koji služe kao potpora ćelijskoj enkapsulaciji i proliferaciji, a njegova prednost se ogleda u tome što je biokompatibilan i ima dobre mehaničke osobine. Prilikom izlaganja UV zracima dolazi do raspadanja fotoinicijatora na fragmente do slobodnih radikala, koji iniciraju reakciju polimerizacije tako što napadaju C=C dvostruku vezu koja je prisutna u akrilnoj grupi. Navedena reakcija dovodi do stvaranja trodimenzionalne polimerne mreže, odnosno hidrogela, koji se može upotrebljavati kao matriks za primjenu lijekova i inkapsulaciju bioloških materijala (102).

#### **1.7.4 Proces štampanja fotopolimerizacionim tehnikama**

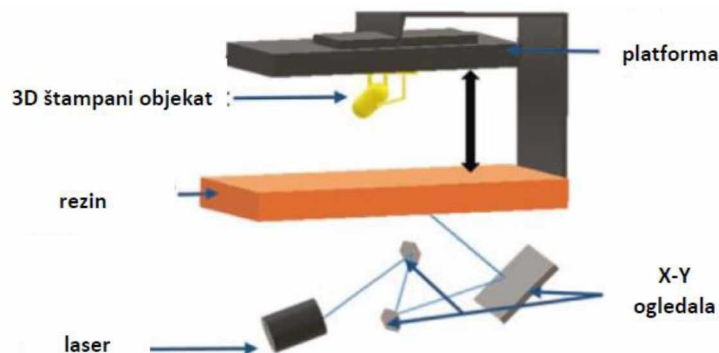
Prvi 3D štampani objekat dobijen je primjenom stereolitografskog aparata, kada je 90-ih godina prošlog vijeka Charles Hull došao na ideju da izlaganjem rastvora fotopolimera UV svjetlosti kreira čvrsti objekat (103). Nakon ovog inicijalnog uspjeha, SLA tehnika doživjela je ekspanziju i primjenjuje se u različitim sferama života i privrede, pri čemu je, za potrebe ovog rada, najvažnije istaći njenu opsežnu primjenu u polju biomedicine i farmacije.

##### **a) Stereolitografija**

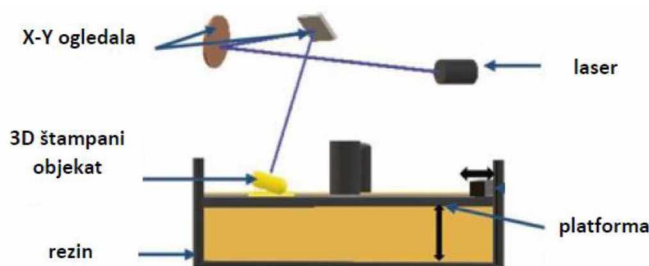
Kod SLA tehnike, proces štampanja se odvija tako što laser, na osnovu zadatog digitalnog modela, „crtā“ željeni objekat sloj po sloj izazivajući njihovo očvršćavanje, i proces se nastavlja dok se ne formira zadani objekat. Postoje dvije vrste SLA sistema, i to „*bottom-up*“ kada je izvor svjetlosti (laser) postavljen na donjem kraju štampača, a platforma za

štampanje na gornjem, i „*bottom-down*“ kod koje je platforma na donjem, a laser na gornjem kraju štampača (Slika 14) (104).

a)



b)



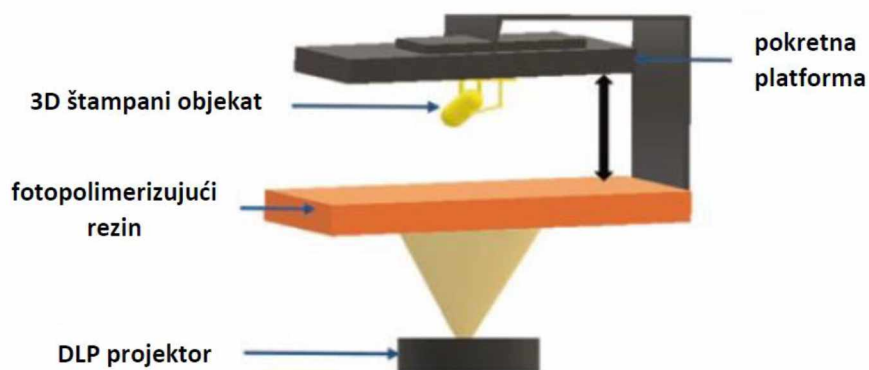
**Slika 14.** Shematski prikaz: a) *Bottom-up*, i b) *Bottom-down* SLA tehnike (preuzeto i prilagođeno iz Robles Martinez i sar., 2018 (104))

Kod *bottom-up* sistema, tokom procesa štampanja snop lasera se pomoću galvo ogledala usmjerava tako da u pravcu X-Y ose crta zadani oblik i izaziva očvršćavanje prvog sloja koji biva pričvršćen na platformu štampača. Nakon fotopolimerizacije i očvršćavanja prvog sloja, platforma se podiže u pravcu Z-ose, na udaljenost koja je jednaka debljini jednog sloja, pod dejstvom lasera dolazi do očvršćavanja novog sloja rezina na površini prvog sloja i postupak se ponavlja sve dok se ne formira zadani čvrsti, trodimenzionalni objekat. Po završetku procesa štampanja, izrađeni objekat se ispira kako bi se uklonio eventualno zaostali rezin koji nije polimerizovao, a zavisno od vrste materijala moguće je vršiti dodatnu obradu predmeta UV svjetlom, s obzirom da konverzija reaktivnih grupa obično nije kompletna (104). Kod *bottom-down* sistema najznačajnija razlika je ta što je platforma štampača uronjena u kadu sa rezinom. Nakon očvršćavanja prvog sloja pod dejstvom lasera, platforma se podiže za visinu jednog sloja, a roler nanosi novi sloj rezina

na površinu očvrstnalog sloja, koji dalje biva izložen dejstvu lasera i postupak se nastavlja do dobijanja zadanog objekta.

#### b) Digitalno projektovanje svjetlosti

Za razliku od SLA tehnike gdje snop lasera crta zadani objekat, kod DLP štampača (Slika 15) izvor svjetlosti je digitalni projektor koji projektuje sliku cijelog sloja, pa je samim tim, budući da je svaki sloj u potpunosti izložen svjetlosti, i proces štampanja brži. Dakle, kod DLP tehnike slojevi se projektuju i očvršćavaju istovremeno. Kod SLA 3D štampača, brzina štampanja zavisi od toga koliko brzo snop lasera crta zadani oblik, ali sa druge strane, velike brzine lasera mogu smanjiti kvalitet štampanog objekta (104). Konačno, LCD tehnika kao izvor svjetlosti upotrebljava LED diode. Svjetlost prolazi kroz LCD displej i osvjetljava cijeli presjek predmeta (105).



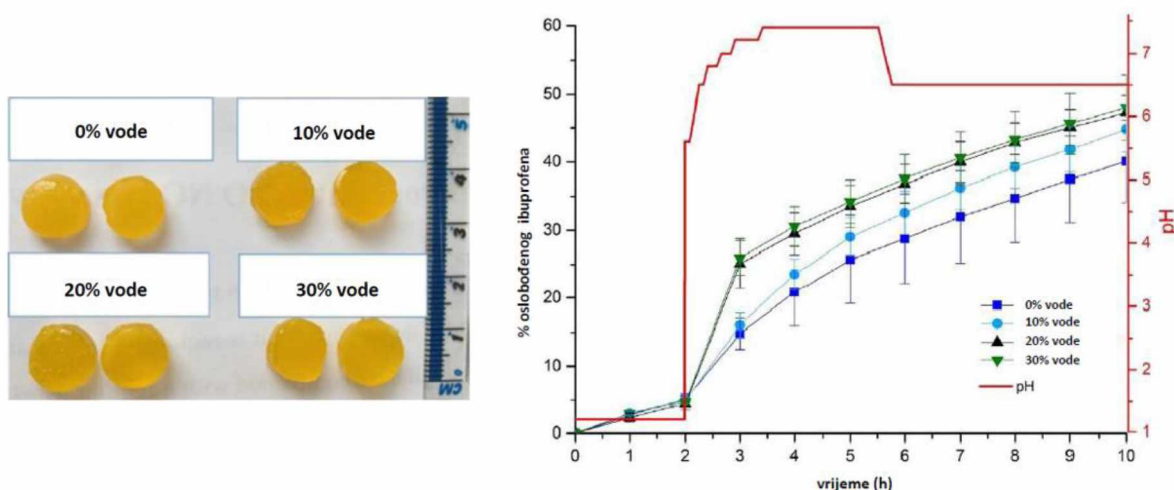
**Slika 15.** Shematski prikaz DLP štampe (preuzeto i prilagođeno iz Robles Martinez i sar., 2018 (104))

U pogledu rezolucije, koja se ogleda u najmanjoj debljini sloja koju je moguće štampati određenom tehnikom, SLA tehnikom moguće je postići debljinu manju od 10  $\mu\text{m}$ , dok je primjenom DLP tehnike moguće štampati slojeve debljine od 30 do 100  $\mu\text{m}$ , što ove štampače čini superiornim u odnosu na ostale vrste 3D štampača (105). U praksi, uobičajeno se koristi debljina sloja od 100  $\mu\text{m}$ , dok je brzina štampanja klasičnih SLA štampača u opsegu od 10 do 20 mm/h. Najznačajniji procesni parametri kod fotopolimerizacionih tehnika su talasna dužina svjetlosti, vrijeme ekspozicije rezina i količina energije. Proizvođač uobičajeno daje uputstvo za podešavanje procesnih parametara za komercijalne rezine, dok je nalaženje optimalnih parametara štampanja

kod formulacija koje se koriste u istraživanjima veliki izazov, i zahtijeva značajan utrošak resursa i vremena da bi se optimizovala printabilnost korištenih formulacija (107).

### **1.7.5 Pregled dosadašnjih istraživanja**

Istraživanja u oblasti primjene fotopolimerizacionih tehnika u izradi personalizovanih terapijskih sistema ukazuju na njihov izuzetan potencijal. Martinez i saradnici su primjenom SLA tehnike prvi izradili hidrogelove sa ibuprofenom (59). Polimerni hidrogelovi se široko primjenjuju kao matriksni sistemi kojima se postiže kontrolisano oslobađanje lijekovite supstance. U ovom istraživanju PEGDA je korišćen kao fotopolimer, a voda (čiji je sadržaj variran od 0-30%) i PEG300 su upotrijebljeni kako bi se podesila gustina hidrogela. Kao fotoinicijator je korišten DPPO ali su dobijene tablete bile nepravilnog oblika i loše rezolucije, dok je štampanje pomoću riboflavin-trietanolamin fotoinicijatorskog sistema bilo uspješno, nezavisno od sadržaja vode u formulaciji. Veći sadržaj vode rezultirao je većim devijacijama u variranju mase, što je obrazloženo time da su štampači podešeni za upotrebu komercijalnih rezina koji su većeg viskoziteta. Dalje, zaključeno je da povećanje sadržaja vode u rezinu utiče u određenoj mjeri na gustinu umrežavanja polimernih lanaca, ali ne i na brzinu oslobađanja ibuprofena iz tableta. Naime, tablete koje su sadržale 20% i 30% vode pakazale su sličnu brzinu oslobađanja ibuprofena, pa se nameće zaključak da je u slučaju niskog sadržaja vode ograničena difuzija lijeka kroz polimerni matriks, ali je nesmetana kada je sadržaj vode u formulaciji 20% (Slika 16). Ljekovita supstanca se iz ovakve vrste terapijskih sistema oslobađa difuzijom iz nabubrelog matriksa, pri čemu je oslobađanje lijekovite supstance u značajnoj mjeri zavisno od vremena koje je potrebno da bi hidrogel nabubrio u dodiru sa medijumom. Istraživači su zaključili da se SLA tehnika može koristiti za dobijanje hidrogelova koji nalaze primjenu u farmaciji, i na čije se karakteristike može uticati smanjenjem koncentracije fotopolimera, odnosno povećanjem koncentracije ostalih komponenti formulacije.



**Slika 16.** SLA 3D štampani hidrogelovi sa različitim sadržajem vode (lijevo) i profili oslobađanja iz štampanih hidrogelova (desno) (preuzeto i prilagođeno iz Martinez i sar., 2017 (59))

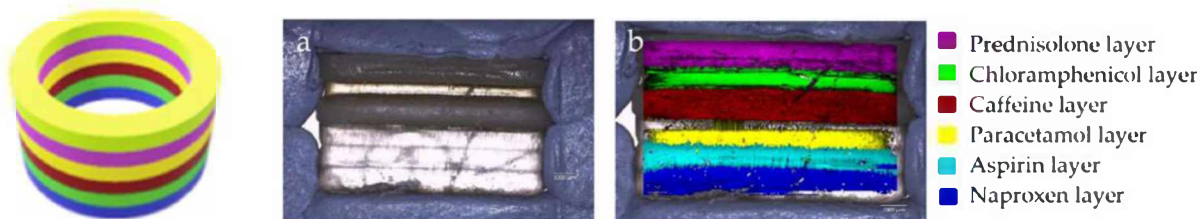
Larush i saradnici su pomoću DLP štampača izradili hidrogelove u kojima su koristili akrilnu kiselinu i PEGda kao monomere (108). Hidrogelovima je postignuta pH-zavisna rastvorljivost model supstance sulforodamina B, čija rastvorljivost inače ne zavisi od pH vrijednosti medijuma. Naime, sa povećanjem pH vrijednosti, rastao je i procenat oslobođene model supstance, pa bi se ovaj pristup mogao iskoristiti za ciljano oslobađanje lijekovitih supstanci u intestinalnom traktu. Dodatno, ispitivanje citotoksičnosti na *CaCo2* ćelijama nije ukazalo na potencijalno citotoksičan efekat 3D štampanih tableta DLP tehnikom.

Intravezikalna instilacija lijekova predstavlja alternativni pristup oralnoj primjeni u liječenju oboljenja mokraćne bešike, omogućavajući visoku koncentraciju lijeka na mjestu primjene uz minimizaciju sporednih, sistemskih neželjenih efekata. Međutim, terapijski efekat često je redukovan zbog kratkog zadržavanja lijeka u bešici i neophodnosti ponavljane instilacije. Xu i saradnici su primjenom SLA tehnike izradili uređaje od elastičnih polimera, koji se putem uretralnog katetera uvode i izvlače iz mokraćne bešike *in situ*, a kojima je postignuto produženo i ciljano djelovanje lidokain hidrohlorida (109). Pripremljene su dvije vrste uređaja, šuplje i ispunjene strukture, i svi su pokazali dobru kompatibilnost sa krvlju, otpornost na primjenu sila istezanja i pritiska, i bili su u stanju da povrate svoj prvobitni oblik po prestanku djelovanja sile. Šuplji uređaji



su imali rezervoar za lijek, debljine zida 0.5 mm, i dvije rupe promjera 1 mm na krajevima kroz koje je omogućeno ubacivanje rastopljenog lijeka i postizanje produženog oslobađanja. Uređaji ispunjene strukture nisu imali nikakvih šupljina i proizvedeni su direktno od rezina impregniranog lijekom. *In vitro* studije ispitivanja brzine oslobađanja lijekovite supstance su pokazale da se iz uređaja šupljeg oblika kompletno oslobađanje lidokaina postiže za 4 dana, dok se iz druge vrste uređaja postiže produženo oslobađanje lijeka do 14 dana. Ovime je predstavljen jedan revolucionaran, personalizovan pristup za intravezikalnu isporuku lijeka, a koji je moguće ostvariti primjenom SLA tehnike 3D štampe.

Značajno je pomenuti da se SLA tehnika pokazala pogodnom za primjenu u polifarmaciji, odnosno za izradu tableta koje sadrže više lijekovitih supstanci. Grupa istraživača na čelu sa Robles-Martinez razvila je SLA metodu pomoću koje su uspjeli da odštampaju tablete sa šest različitih lijekovitih supstanci: prednizolonom, hloramfenikolom, kofeinom, paracetamolom, acetilsalicilnom kiselinom i naproksenom (110) (Slika 17). Proces štampanja je izveden na način što je, po završetku štampanja dijela sa jednom supstancom rad šampača pauziran da bi se tečna formulacija u kadici šampača zamijenila drugom, nakon čega se štampanje nastavljalo. U drugom istraživanju ove grupe naučnika, primjenom istog koncepta izrađene su tablete sa četiri lijeka koja se koriste u terapiji hipertenzije, i to sa atenololom, hidrohlorotiazidom, irbesartanom i amlodipinom (111). Međutim, analiza tableta je pokazala da je došlo do interakcije između fotopolimera i amlodipina. Ovo neočekivano zapažanje ukazalo je na neophodnost provjere kompatibilnosti sastojaka formulacije u tehnikama 3D štampe zasnovanim na fotopolimerizacionim reakcijama.

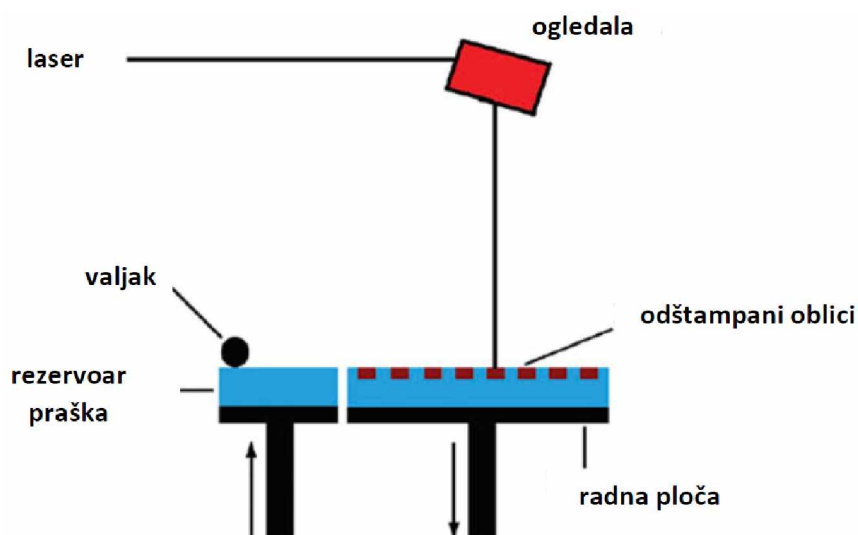


**Slika 17.** 3D dizajn polipilule sa šest različitih lijekovitih supstanci izrađene SLA tehnikom (lijevo) i njen poprečni presjek posmatran: a) optičkim svjetlosnim mikroskopom, i b) pomoću Ramanove spektroskopije (desno) (preuzeto i prilagođeno iz Robles-Martinez i sar., 2019 (110))

## 1.8 Selektivno lasersko sinterovanje

Selektivno lasersko sinterovanje (SLS) je tehnika 3D štampe koja funkcioniše na principu sličnom *ink-jet* štampaču, sa tom razlikom što se, umjesto rastvora vezivnog sredstva, za aglomeraciju čestica praška koristi laser.

Na Slici 18. prikazane su komponente SLS štampača. Za usmjeravanje laserskih zraka na površinu smješe praškova, na osnovu zadatog 3D modela prevedenog u .STL datoteku, koriste se galvanska ogledala. U rezervoar, koji se postavlja u niži položaj u odnosu na radnu ploču, prije početka štampanja se sipa smješa praškova, odnosno formulacija lijeka. Pomoću valjka, prašak se ravnomjerno nanosi na radnu ploču. Tokom procesa štampanja, snop lasera usmjerava se tako da crta određeni, zadani oblik na površinu i sinteruje čestice praška unutar granica predmeta. Energija potrebna za štampanje se obezbjeđuje kombinovanjem sistema za grijanje koji posjeduje štampač sa laserskim zrakom. Nakon što se završi proces na jednom sloju, rezervoar sa praškom se pomjera naviše, dok se radna ploča pomjera naniže i to za rastojanje koje odgovara debljini jednog sloja. Kod štampe svakog sledećeg sloja, valjak nanosi novu količinu praška, i proces traje sve dok se ne formira zadani 3D objekat. Prilikom hlađenja istopljenog dijela praška, on se povezuje horizontalno (formirajući novi sloj) i vertikalno (spajajući se sa ostatkom dijela). Po završetku štampe, preostali prašak može se odstraniti pomoću četke ili drugom odgovarajućom metodom (112). U odnosu na *ink-jet* štampač, ova tehnologija omogućava štampanje objekata većom brzinom, i ne zahtijeva primjenu rastvarača koji nekad traži da odštampani predmet stoji i do 48 sati kako bi rastvarač ispario.



Slika 18. Komponente SLS 3D štampača

Da bi se omogućilo štampanje, neophodno je da se prašak sipa i u rezervoar i u komoru za štampu. Iz toga proizilazi da je za štampu SLS tehnikom potrebna nešto veća količina praška nego što je stvarno potrebno za izradu zadatog objekta. Mogućnost da se neiskorišteni materijal reciklira i upotrijebi ponovo za štampanje je diskutabilna, budući da ponovna upotreba određenih sirovina nije moguća jer izloženost energiji lasera i visokim temperaturama može da izazove fizičke i hemijske promjene praška. Dodatno, problematizuje se mogućnost nastanka sporednih proizvoda koji potencijalno mogu uticati na kvalitet, čistoću ili raspodjelu čestica po veličini, a što se u krajnjem može negativno odraziti na kvalitet i bezbjednost izrađenih proizvoda (113).

U odnosu na druge tehnike 3D štampe, SLS ima određene prednosti:

- za pripremu uzorka i proces štampanja se ne koriste rastvarači, što ovu tehniku čini pogodnom za lijekove koji sadrže supstance podložne hidrolizi;
- nije neophodna prethodna obrada polaznog materijala;
- uglavnom je veća brzina štampanja;
- SLS proizvodi objekte veće rezolucije zbog veće preciznosti lasera;
- pogodna je za kompleksne strukture;
- omogućava dobijanje tableta visokog poroziteta i odgovarajućih mehaničkih osobina;
- moguće je izraditi tablete sa više ljekovitih supstanci koje pokazuju različite profile brzine oslobađanja;
- nije potrebno primijeniti vezivno sredstvo;
- dodatna obrada tableta kao što su sušenje ili očvršćavanje nije neophodna (113).

Međutim, materijali koji se najčešće koriste (sprašene forme plastike, keramike i metalnih legura) zahtijevaju visoku temperaturu i lasere velike energije za sinterovanje. Upravo ovi nezahvalni uslovi štampanja ograničavaju primjenu SLS tehnike u polju farmacije. Dodatno, poznato je da visoka energija lasera može dovesti do degradacije ljekovite supstance, kada se koristi kao polazni materijal. Stoga je primjena SLS tehnike u oblasti medicine uglavnom ograničena na proizvodnju tkivnih nosača (engl. *scaffold*) u tkivnom inženjeringu ili formulacija lijekova sa termostabilnim supstancama (113).

Trenutno, posebno prilagođeni materijali koji bi bili pogodni za štampanje farmaceutskih oblika još uvijek nisu dostupni. U dosadašnjim istraživanjima čiji su rezultati predstavljeni u literaturi, sa ograničenim brojem ekscipijenasa koji se inače koriste u farmaceutskoj industriji ostvareno je uspješno štampanje: Kollicoat® IR, Kollidon® VA 64, Eudragit L100-55, Manitol Parteck i laktoza monohidrat (114, 115, 116). Za praškaste materijale koji se koriste kod SLS tehnike, poželjan je sferni oblik čestica, raspona veličine 58 - 180 µm (117). Uočeno je da, što je debljina sloja koji se štampa tanja, premda je proces štampanja duži, to je više zaglađena površina izrađenog objekta. Debljina jednog sloja je najčešće u opsegu od 0,1 mm do 0,3 mm, stim da se preporučuje da debljina sloja odgovara prosječnoj veličini čestica upotrijebljenog praška.

Kako bi se pomoću SLS tehnike dobio farmaceutski oblik željenih osobina, ključno je razumjeti proces štampanja, od izbora polaznih sirovina do osobina konačnog proizvoda.

### **1.8.1 Parametri SLS štampe**

Osobine proizvoda dobijenih pomoću SLS štampača zavise, kako od karakteristika praška, tako i od parametara štampanja. U nastavku je dat pregled nekih od najznačajnijih parametara koje je potrebno razmotriti za uspješan proces štampanja:

#### **a) Temperatura praška**

Da bi se olakšao proces štampanja, prašak unutar štampača je neophodno zagrijati, a sama temperatura zavisi od toga da li je polimerni materijal u kristalnom ili amorfnom obliku. Za štampanje sa amornim materijalima, temperatura bi trebala da bude bliska njihovoj temperaturi staklastog prelaza ( $T_g$ ). Sa druge strane, za štampanje sa kristalnim materijalima, neophodno je podesiti da temperatura bude za 3°C do 4°C ispod njihove temperature topljenja ( $T_m$ ). Međutim, najveći broj polimera se ponaša kao polu-kristalni materijal koji može imati i  $T_g$  i  $T_m$ . Optimalna temperatura se određuje pomoću sledeće jednačine:

$$\frac{1}{T} = \frac{m_1}{T_m} + \frac{m_2}{T_g}$$

gdje su  $m_1$  i  $m_2$  označene mase za svaku od komponenti smješe. Ako se temperatura praška održava blizu  $T_g$  ili  $T_m$ , potrebna je manja energija lasera da bi se sinterovao objekat (112).

#### b) Tip lasera

Talasna dužina apsorbanice upotrijebljenog materijala je presudna za izbor lasera. Apsorpcija svjetlosti zavisi od više faktora: talasne dužine lasera, oblika čestica praška, osobina materijala koji se sinteruje, temperature unutar komore štampača i tipa gasa u kontrolisanoj atmosferi. Komercijalni SLS štampači uglavnom imaju CO<sub>2</sub> laser (talasna dužina 10,600 nm) ili Nd:YAG laser (Neodimijum Itrijum Aluminijum Granat, talasna dužina 1064 nm) sa jačinom od 50 W do preko 200 W. Nd:YAG laser se dominantno upotrebljava za sinterovanja materijala kao što su keramika i metal, a za rad sa polimernim materijalima pogodniji je CO<sub>2</sub> laser. Što je veća apsorbanca praška, manje energije je potrebno za sinterovanje. Prenos energije lasera može se regulisati kroz podešavanje snage lasera i kroz brzinu skeniranja. Manja brzina skeniranja omogućava veću transmisiju energije.

Sintratec Kit 3D štampač (Sintratec, Švajcarska) koji je do sada dominantno korišten u istraživanjima u sferi medicine i farmacije opremljen je diodnim laserom jačine 2.3 W i talasne dužine 445 nm (112).

#### c) Gustina energije lasera

Za proces sinterovanja neophodna je odgovarajuća energija lasera. Ukoliko energija nije dovoljna, neće doći do fuzije slojeva, dok pri prevelikoj energiji dolazi do odstupanja u odnosu na definisane dimenzije 3D objekta. Zapreminska gustina energije predstavlja onu količinu energije koja se prenosi po jedinici zapremine. S obzirom da njena vrijednost zavisi od snage lasera (SL), brzine skeniranja (BS), debljine sloja (DS) i rastojanja između dva laserska zraka, jedan je od kritičnih parametara procesa štampanja. Njena vrijednost izračunava se preko sledeće jednačine (118):

$$\text{zapreminska gustina energije } \left(\frac{J}{mm^3}\right) = \frac{SL}{BS \times DS \times HS}$$

### 1.8.2 Osobine materijala

#### a) Oblik i veličina čestica

Među najvažnijim parametrima za optimalan proces sinterovanja i samim tim uspješnost štampanja su oblik i veličina čestica. Da bi se to postiglo, poželjan je sferni oblik čestica, promjera 58 - 180  $\mu\text{m}$ , što će omogućiti postizanje dobre protočnosti i homogenu distribuciju energije lasera od površine čestica ka njihovom središtu. Manje čestice (naročito manje od 10  $\mu\text{m}$ ) uticaće loše na protočnost jer se zbog elektrostatičkih sila i povećane kohezivnosti skupljaju u agregate. Sa druge strane, pri djelovanju lasera na čestice veće od 180  $\mu\text{m}$  zagrijava se samo njihova površina, dok jezgro čestica najčešće ostaje nezagrijano. Rezultat je nedovoljna fuzija, pa je potrebno više toplote, odnosno energije lasera radi postizanja sinterovanja čestica. Osim toga, na proces sinterovanja negativan uticaj imaju i čestice praška nepravilnog oblika (112).

#### b) Debljina sloja

Uobičajeno se štampaču zadaje debljina sloja u rasponu 0,1 mm - 0,3 mm. Kada su slojevi tanji, manja je hrapavost površine premda proces štampanja duže traje. Debljinu sloja treba razmatrati u odnosu na veličinu čestica praška; ona ne bi trebalo da bude manja od prosječne veličine čestica (112).

### 1.8.3 Mehanizmi vezivanja čestica praška

U odnosu na mehanizam vezivanja čestica, tehnike sinterovanja mogu se klasifikovati u sledeće četiri kategorije:

#### a) Sinterovanje u čvrstom stanju

Sinterovanje u čvrstom stanju predstavlja termalni proces u kome se ciljane temperatura podešava u opsegu između  $T_m/2$  i  $T_m$ , gdje  $T_m$  predstavlja temperaturu topljenja materijala. Ovaj proces podrazumijeva formiranje mostova između čestica praška putem površinskih veza. S obzirom da unutar strukture ostaje puno praznog prostora, objekti formirani na ovaj način su uvijek porozni. Različiti stepeni poroznosti mogu se postići

podešavanjem parametara sinterovanja. Visoko porozni objekti su lakši i brže se proizvode, ali imaju manju mehaničku čvrstoću (112).

#### b) Sinterovanje tečnom fazom

Sinterovanje tečnom fazom je termalni proces koji se uobičajeno upotrebljava za materijale poput metala ili keramike, odnosno materijale koje karakteriše visoka temperatura topljenja. Umjesto primjene visokih temperatura da bi se postiglo sinterovanje ili djelimično topljenje strukture, smješi praškova se dodaje neko vezivno sredstvo, najčešće metal sa niskom temperaturom topljenja. Čestice vezivnog sredstva su uglavnom mnogo manje od čestica osnovnog materijala, iz razloga što visoka vrijednost odnosa površine prema zapremini pospješuje topljenje. Zahvaljujući malim dimenzijama čestica i niskoj temperaturi topljenja, vezivno sredstvo se topi prije osnovnog strukturnog materijala, raspoređujući se između čestica i na taj način popunjavajući praznine. Nakon procesa sinterovanja i štampanja, ostatak praznog prostora se eliminiše tretiranjem u peći (112).

#### c) Djelimično topljenje

U slučaju djelimičnog topljenja, čestice praška su djelimično otopljene i međusobno čvršće povezane u odnosu na sinterovanje u čvrstom stanju. I pored prisustva određenog praznog prostora, objekti izrađeni na ovaj način imaju bolje mehaničke osobine (112).

#### d) Otapanje u tečnom stanju

Otapanje u tečnom stanju se primjenjuje kod selektivnog laserskog topljenja. Željena temperatura se podešava tako da bude veća od temperature topljenja materijala, pri čemu laser u potpunosti otopa čestice praška. S obzirom na rigorozne uslove štampanja kod ove tehnologije, koja predstavlja visoko energetski proces i gdje se postiže velika razlika u temperaturi između tečnog bazena i okolnog praška, ograničen je izbor materijala, pa se može koristiti samo za određene metale poput aluminijuma, titana i nerđajućeg čelika (112).

#### 1.8.4 Pregled dosadašnjih istraživanja

Prvobitna istraživanja mogućnosti izrade terapijskih sistema sa SLS tehnikom su uglavnom bila zasnovana na naknadnom dodavanju ljekovite supstance u odštampani matriks, s obzirom na to da su komercijalno dostupni štampači bili namijenjeni materijalima poput keramike, metala i sl., te su stoga bili opremljeni laserima velike energije i koristili visoke temperature za sinterovanje. Tek 2007. godine je prvi put uspješno sinterovana smješa polimera i ljekovite supstance u praškastom stanju (119). Polikaprolakton (PCL) je upotrijebljen kao polimer, a boja metilensko plavo kao model ljekovita supstanca. Ispitivanja sinterovanog terapijskog sistema su pokazala ravnomjernu distribuciju metilenskog plavog i njegovo naglo početno oslobađanje koje je potom prešlo u kontinuirano oslobađanje. Promjenom debljine zida koji formira laser postignuta je kontrola brzine oslobađanja. Pokazalo se da se metilensko plavo oslobađa procesom difuzije iz izrađenih terapijskih sistema.

U istraživanjima koja su uslijedila, Salmoria i saradnici su pomoću SLS tehnike izradili model terapijski sistem koji predstavlja kombinaciju PCL i progesterona. U jednom tipu terapijskog sistema, progesteron je bio smješten u jezgru (R), dok je u drugom bio inkorporiran i u jezgro i u zid uređaja (R<sup>\*</sup>). Ova smješa materijala uspješno je sinterovana zahvaljujući tome što je talasna dužina apsorpcije PCL bila bliska talasnoj dužini lasera štampača. Iako progesteron nije imao direktan uticaj na koalescenciju čestica praška, uticao je na samo sinterovanja zahvaljujući apsorpciji energije lasera u infracrvenom području. Model sistem R<sup>\*</sup> je oslobodio 13% progesterona za period od 49 dana, dok se iz sistema R oslobodilo 7% progesterona za 79 dana (120). Ista grupa istraživača je 2016. godine pomoću SLS štampača sa CO<sub>2</sub> laserom napravila PCL implant sa ibuprofenom. Ibuprofen je ubrzao sinterovanje polimera zbog efekta prenosa toplote. Ispitivanje brzine oslobađanja pokazalo je da je oko 75% ljekovite supstance oslobođeno nakon 10 sati. Pretpostavljeno je da je oslobađanje postignuto kombinacijom mehanizama difuzije i erozije (121). Takođe, uspješno su napravljeni implantati sa fluorouracilom i PCL pomoću SLS tehnike, gdje je visok procenat sinterovanja ostvaren primjenom čestica manje veličine i uz veću jačinu lasera. Ostvareno je produženo oslobađanje, čime je pokazan potencijal za primjenu sistema u terapiji karcinoma (122).



Istraživačka grupa sa Univerziteta u Londonu je 2017. godine napravila prve tablete za oralnu primjenu pomoću SLS tehnike (123). Po prvi put korišćena su dva polimera koja se uobičajeno koriste u farmaceutskoj industriji, Kollicoat® IR i Eudragit® L100-55, prvi sa trenutnim a drugi sa produženim karakteristikama oslobađanja. Paracetamol je korišten kao model ljekovita supstanca. Udio paracetamola je iznosio 5, 20 i 35% m/m, prije započinjanja procesa štampanja. Podešeno je da temperatura komore bude 110°C, jačina lasera 2.3 W a brzina 90 mm/s. Međutim, štampanje je bilo neuspješno, vjerovatno zato što polimeri i ljekovita supstanca ne apsorbuju svjetlost pa nije došlo do sinterovanja. Sa ciljem povećanja apsorpcije svjetlosti, smješi je dodato 3% boje Candurin® Gold Sheen, ekscipijensa koji se u farmaceutskoj industriji upotrebljava za oblaganje tableta. Tablete su uspješno štampane pri čemu je postignut visok stepen reproduktivnosti štampe. Na slikama poprečnog presjeka izrađenih tableta dobijenim pomoću svjetlosnog elektronskog mikroskopa (SEM) uočeno je da je sa povećanjem sadržaja paracetamola došlo do smanjenja Tg polimera i umjesto potpunog sinterovanja dolazilo je do djelimičnog topljenja. Tablete izrađene sa Kollicoat® IR imale su izrazito veliku čvrstinu, te sila potrebna za lomljenje tableta nije mogla biti detektovana pomoću uređaja za ispitivanje čvrstine. Kod tableta izrađenih sa Eudragit® L100-55, sila potrebna za lomljenje se kretala u interval od 284 N do 414 N. Sve tablete su imale frijabilnost ispod 1%, što ukazuje na činjenicu da su veoma pogodne za rukovanje i pakovanje. Tablete sa 5% paracetamola su bile sinterovane i došlo je do bržeg oslobađanja ljekovite supstance (kompletno oslobađanje postignuto je za 30 min kod tableta sa Kollicoat® IR). Kod tableta sa 20% i 35% paracetamola oslobađanje je bilo sporije (za 2 h i 5 h redom kod Kollicoat® IR tableta) jer je došlo do topljenja smješe, potpunijeg sinterovanja i formiranja manje poroznih tableta. Tablete sa Eudragit®-om su, u skladu sa očekivanjima, pokazale modifikovano oslobađanje. Oslobađanje paracetamola je započelo u kiselom medijumu, i sa povećanjem pH vrijednosti medijuma došlo je do povećanja oslobađanja; dodatno, kod manje poroznih tableta evidentiran je veći procenat oslobođene ljekovite supstance (123).

Fina i saradnici izradili su po prvi put oralno-disperzibilne tablete primjenom SLS tehnike. Ujedno, ispitali su uticaj upotrijebljene brzine lasera na osobine izrađenih tableta. I ovo istraživanje rađeno je sa paracetamolom kao model ljekovitom supstancom. Formulacije su sadržale polimere HPMC E5 i Kollidon® VA64, a za uspješan proces

štampanja dodato je 3% Candurin<sup>®</sup> Gold Sheen sa ciljem poboljšanja apsorpcije energije iz lasera. Temperatura površine praška za tablete sa HPMC E5 bila je podešena na 135°C, dok je kod tableta sa Kollidon<sup>®</sup> VA64 podešena na 100°C. Izrađene tablete su okarakterisane u pogledu morfologije, mehaničkih osobina, SEM, mikro CT, sadržaja lijekovite supstance, raspadljivosti i brzine oslobađanja iz tableta. Značajno zapažanje je da su tablete sa istom formulacijom, ali koje su štampane primjenom različite brzine lasera imale različitu masu. Naime, tablete izrađene pri manjoj brzini lasera imale su veću težinu, što se može objasniti činjenicom da čestice praška primaju više energije kada je brzina lasera niža, što rezultira stvaranjem većeg broja međučestičnih veza u svakom sloju. Ovim se postiže bolje sinterovanje i smanjenje udjela praznog prostora, što tablete čini gušćim i težim, posljedično sa manjim porozitetom. Kada su u pitanju mehaničke karakteristike, kod tableta dobijenih sa manjim brzinama štampača, sila potrebna za njihovo lomljenje iznosila je do 171 N, dok je za tablete štampane primjenom većih brzina ona bila oko 14 N, zbog manjeg broja formiranih međučestičnih veza. Navedeno istraživanje je pokazalo da povećanje brzine lasera može uticati na povećanje poroziteta, kao i na ubrzanje dezintegracije i brzine oslobađanja lijekovite supstance. Određivanje sadržaja je pokazalo da je sadržaj sličan teorijskom, što znači da tokom štampanja nije došlo do degradacije paracetamola. Iz tableta izrađenih sa HPMC E5 pri brzini lasera 100 mm/s, paracetamol se potpuno oslobodio za 4h. Povećanje brzine lasera na 200 mm/s dovelo je do bržeg oslobađanja, pa je potpuno oslobađanje postignuto za 3 h. Potpuno oslobađanje kod tableta koje su izrađene pri brzini lasera od 300 mm/s postignuto je za 2 h. Kod tableta izrađenih sa Kollidon<sup>®</sup> VA 64 i brzinom lasera od 100 mm/s, potpuno oslobađanje lijekovite supstance je postignuto za 60 min. Primjenom brzinam lasera od 200 mm/s i 300 mm/s, do kompletnog oslobađanja došlo je za 10 min. Zanimljivo je da su se tablete koje su sadržale Kollidon<sup>®</sup> VA 64 a koje su izrađene primjenom brzine lasera od 300 mm/s, raspale za 4 s. Pri ovako velikim brzinama lasera sinterovanje nije potpuno, pa se u kontaktu sa medijumom čestice lakše i brže odvajaju, a tablete posljedično brže raspadaju (116).

Awad i saradnici su primjenom SLS tehnike uspjeli da izrade mini tablete prečnika 1 mm i 2 mm, gdje su kod jedne vrste koristili samo paracetamol (5%) kao model lijekovitu supstancu, dok su kod druge vrste dodavali dvije lijekovite supstance, ibuprofen i paracetamol, čiji je udio iznosio 3,5%, odnosno 6,5% (Slika 19). Mini tablete sa dvije

ljekovite supstance štampane su u dvije konfiguracije, i to kao konfiguracija A koja je sadržala paracetamol u smješi sa Kollicoat® IR i ibuprofen u smješi sa etil celulozom. Kod konfiguracije B, raspored ekscipijenasa je bio obrnut. Štampa je bila uspješna uz primjenu brzine lasera od 50 mm/s, odnosno pokazalo se da se pri brzini lasera od 50 mm/s obezbjeđuje dovoljno energije za spajanje slojeva i dobijanje oblika zadatih dimenzija. Ispitivanje brzine rastvaranja ljekovitih supstanci je pokazalo da je postignuto prilagođeno oslobađanje, odnosno da se jedna supstanca oslobađa trenutno iz matriksa sa Kollicoat IR, dok se druga supstanca oslobađa produženo iz matriksa etil celuloze. Predmetnim istraživanjem pokazano je da bi SLS tehnika mogla biti pogodna za izradu višestrukih sistema, s obzirom na to da se proizvodnja odvija u jednom zaokruženom procesu za razliku od tradicionalne metode ekstruzije i sferonizacije, koja se odvija u više koraka i za koju je potrebna složenija oprema (114).



**Slika 19.** SEM slika mini tableta konfiguracije B, gdje zeleni region predstavlja region u kom se nalaze paracetamol i etil celuloza, dok se u plavom regionu nalaze ibuprofen i Kollicoat® IR (preuzeto iz Awad i sar., 2019 (114))

Poznato je da u toku razvoja i optimizacije novog lijeka značajan broj molekula biva eliminisan zbog loše rastvorljivosti u vodi i posljedično niske bioraspoloživosti. Takođe, mnoge aktivne supstance koje su sastojci lijekova imaju lošu rastvorljivost u vodi, odnosno pripadaju BCS klasama II i IV, što znači da je najveća doza lijeka nerastvorljiva u 250 ml simulirane gastrične/intestinalne tečnosti. Kao jednu od mogućnosti za prevazilaženje ovog problema, farmaceutska industrija koristi amorfne čvrste disperzije.

Naime, lijek koji je u amorfnom stanju ima viši hemijski potencijal odnosno veću reaktivnost u poređenju sa kristalnim stanjem, što ih, sa druge strane, čini nestabilnijim jer imaju tendenciju da rekristališu i formiraju solvate i hidrate što može dovesti do degradacije ili smanjenja terapijskog učinka. Stoga, formulacije ili procesi koji dovode do djelimične amorfnе konverzije ili rekristalizacije u biološkim sistemima imaju nepredvidljivo oslobađanje i resorpciju, odnosno bioraspoloživost. Fenomen djelimične amorfnе konverzije kod SLS 3D štampanih farmaceutskih oblika je prethodno opisan u literaturi (123). Davis i saradnici su pomoću SLS tehnike potpuno amorfizovali ritonavir, slabo rastvoljivu lijekovitu supstancu. U studiji su varirani različiti procesni parametri, kako bi se utvrdio njihov uticaj na uspjeh formiranja amorfnih čvrstih disperzija. Potpuna konverzija lijeka iz kristalnog u amorfni oblik potvrđena je primjenom tehnika DSC, XRPD, FTIR, difrakcije X-zraka pod širokim uglom (WAXS) i NMR čvrstog stanja. Zaključeno je da su optimalna kombinacija karakteristika protočnosti praška, temperature površine praška i komore, brzine lasera i rastojanja između dva laserska zraka bile ključne za uspješno formiranje čvrstih disperzija, i da je svako odstupanje rezultiralo ili neuspješnim štampanjem ili samo djelimičnom amorfnom konverzijom (124). Značajan je podatak da je rastvorljivost ritonavira na ovaj način povećana čak 21 put. U drugom istraživanju, primjenom SLS tehnike Hamed i saradnici su izradili amorfne čvrste disperzije lopinavira koristeći polimer Kollicoat® IR (125).

### **1.8.5 Prednosti i ograničenja SLS tehnike**

Zahvaljujući sposobnosti izrade 3D objekata bez spoljnih potpornih materijala, SLS tehnikom se može izraditi široka paleta terapijskih sistema. Takođe, pomoću SLS štampanja mogu se dobiti jako porozni objekti. Za razliku od drugih tehnika, poput FDM i SLA, SLS tehnika ne zahtijeva prethodnu pripremu i obradu polaznih materijala, ili primjenu dodatnih ekscipijenasa koji mogu biti štetni. Kako se ne zahtijeva upotreba rastvarača povećana je zaštita i stabilnost komponenti lijeka koje su podložne hidrolizi. Dodatno, štampani objekti se mogu slagati jedan na drugi, čime se povećava kapacitet platforme za štampu i efikasnost, pa se ova tehnika najviše približila masovnoj proizvodnji. Omogućena je i ponovna upotreba sirovina, čime se smanjuje količina farmaceutskog otpada.

Sa druge strane, dosta je izazova kada je u pitanju rutinska primjena SLS tehnike, među kojima je jedan od najznačajnijih njen uticaj na materijale osjetljive na laser, što znači da nije pogodna za sve ljekovite susptance. Dalje, u pogledu tehničkih zahtjeva, potrebna je velika količina praška odgovarajuće protočnosti kako bi obezbijedio kontinuitet štampe, što je naročito problematično kod skupih i supstanci dostupnih u ograničenim količinama. Iako se nesinterovani prašak može sakupiti i ponovo koristiti, broj ciklusa štampanja sa istim materijalom je ograničen, zbog rizika od fizičko-hemijskih promjena. Naime, u toku štampanja samo dio materijala biva sinterovan i formira zadati objekat. Materijal koji nije sinterovan najčešće se reciklira, odnosno ponovo koristi. To dovodi do duže izloženosti materijala zagrijavanju, što može dovesti do degradacije sastojaka. Oksidativna degradacija može uzrokovati cijepanje lanaca, kao i smanjenje temperature topljenja i viskoziteta. Sa druge strane, terminalne grupe mogu reagovati i dovesti do produženja lanaca, povećanja molekulske mase i viskoziteta. Usljed ponovne upotrebe materijala, oblik i veličina čestica mogu se izmijeniti, kao posljedica aglomeracije. Recikliranje materijala može spriječiti adekvatnu konsolidaciju praška, što posljedično može dovesti do stvaranja neravnih, hrapavih površina objekata, smanjenja gustine i loših mehaničkih osobina. U nekim slučajevima je potrebna i post-procesna obrada (npr. sijanje ili četkanje izrađenih oblika) što može biti vremenski zahtjevno i predstavljati dodatni trošak. Ono što može predstavljati dodatnu prepreku jeste rizik od unakrsne kontaminacije pri štampanju različitih lijekova iz razloga što trenutno dostupni štampači nisu prevashodno namijenjeni za izradu farmaceutskih oblika. Za očekivati je da se u perspektivi dizajniraju nove verzije štampača koje će biti adaptirane na zahtjeve farmaceutske proizvodnje.

## 1.9 Vještačke neuronske mreže

Prilikom razvoja formulacije i procesa proizvodnje, često je potrebno razmotriti efekte dva ili više faktora (nezavisno promjenljivih) na vrijednosti odgovora (zavisno promjenljivih). Nezavisno promjenjljive su najčešće faktori formulacije (količine komponenti formulacije i njihove kvalitativne i kvantitativne osobine) i procesa, dok zavisno promjenjljive obuhvataju odabrane karakteristike proizvoda ili parametre koji ukazuju na performanse proizvodnog procesa. Univarijantni metod, koji podrazumijeva istovremeno variranje samo jednog faktora, uobičajeno zahtijeva izvođenje velikog broja eksperimenata. Sa druge strane, multivarijantni metod podrazumijeva istovremeno variranje većeg broja faktora u cilju utvrđivanja njihovog uticaja na vrijednosti odgovora (126).

Metodologija eksperimentalnog dizajna (engl. *design of experiment*, DoE) predstavlja sistematski način za planiranje, izvođenje i interpretaciju rezultata eksperimenata, a čiji je cilj da se dobije što više informacija uz izvođenje što manjeg broja eksperimenata. Primjenom ovog koncepta, eksperimenti se izvode po eksperimentalnom planu u kom se nezavisno promjenjljive variraju na organizovan način kako bi se odredio njihov uticaj na odgovore koji se prate (zavisno promjenjljive). Na osnovu rezultata eksperimenata, razvijaju se matematički modeli koji opisuju povezanost nezavisno i zavisno promjenljivih (126).

Razvoj lijekovitog preparata predstavlja kompleksan problem, s obzirom da zahtijeva pronalazak optimalnih vrijednosti kako faktora formulacije, tako i parametara procesa proizvodnje. Devedesetih godina prošlog vijeka, u razvoju formulacija i procesa, počinje da se ispituje mogućnost primjene tehnika vještačke inteligencije, koje se odlikuju sposobnošću učenja i donošenja odluka na osnovu prethodno stečenog iskustva. Pa uprkos prednostima DoE koncepta, zavisnost između ispitivanih faktora i odgovora je obično složena i nije je moguće opisati kroz razvoj polinoma određenog reda. Prepoznato je da se primjenom vještačkih neuronskih mreža (engl. *artificial neural networks*, ANN), kao jedne od tehnika vještačke inteligencije, može prevazići najveći broj ograničenja DoE metoda, u slučajevima kada one nisu u mogućnosti da opišu složenu vezu između ispitivanih faktora i odgovora.

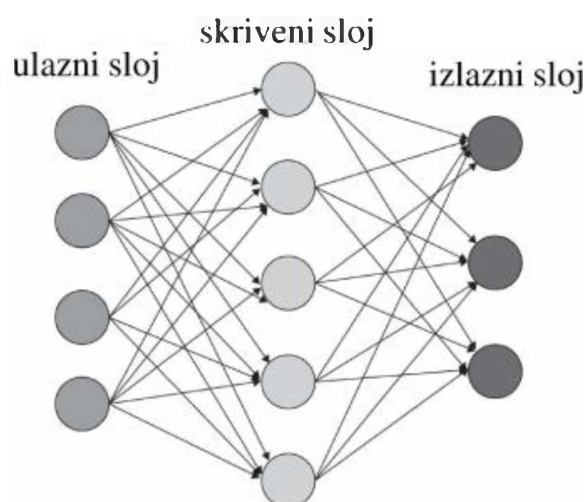
Vještačke neuronske mreže su kompjuterski programi osmišljeni sa ciljem da simuliraju određene funkcije ljudskog mozga, poput učenja, sposobnosti generalizacije i donošenja zaključaka na osnovu prethodno stečenog iskustva. Osnovne karakteristike vještačkih neuronskih mreža, na kojima se uočava analogija sa načinom funkcionisanja ljudskog mozga, su sticanje znanja tokom procesa učenja, kao i čuvanje stečenog znanja u vezama između neurona (tzv. sinaptičke težine). Vještačke neuronske mreže su sastavljene iz više slojeva procesnih jedinica, odnosno neurona, koji su međusobno povezani vezama (sinapsama). One se obučavaju tako što im se prikaže set podataka koji sadrži parove ulaznih i željenih izlaznih podataka, ili samo ulazne podatke. Neuron koristi ulazni podatak, obrađuje ga i formira izlazni podatak koji se dalje prenosi na sledeći neuron (127).

Osnovni parametri kojim se definiše svaki model vještačkih 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 (127). Procesne jedinice (neuroni) koje čine vještačku neuronsku mrežu organizovane su u slojevima. Većina tipova vještačkih 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 promjenljivih. Broj neurona u skrivenom 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 veoma složenih problema. Sa druge strane, izbor optimalnog broja neurona u skrivenom sloju je znatno složeniji 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, zahtijevana preciznost predviđanja itd. Suviše mali broj neurona ima negativan uticaj na sposobnost učenja mreže, dok suviše veliki broj skrivenih neurona može dovesti do toga da je mreža pretrenirana, čime gubi sposobnost za generalizaciju (126).

Najčešće korišćeni tipovi vještačkih neuronskih mreža su: višeslojni perceptron (engl. *Multilayer Perceptron*, *MLP*), neuronske mreže radijalne osnove (engl. *Radial Basis Function Networks*), generalizovane regresione neuronske mreže (engl. *Generalized Regression Neural Networks*), neuronske mreže zasnovane na vjerovatnoći (engl.

*Probabilistic Neural Networks, PNN*), linearne neuronske mreže (engl. *Linear Neural Networks*), Kohonen mreže (128).

Višeslojni perceptron (MLP) predstavlja jednu od najjednostavnijih ANN. On se sastoji od ulaznog sloja, izlaznog sloja i jednog ili više skrivenih slojeva neurona (Slika 20). Neuroni su međusobno povezani putem veza koje karakterišu težinski koeficijenti. Neuroni u ulaznom sloju prenose informaciju neuronima u skrivenom sloju usljed čega dolazi do njihovog pobuđivanja. Neuroni skrivenog sloja imaju esencijalnu funkciju u procesu učenja. U njima se primjenjuje aktivaciona funkcija, kojom se izračunava vrijednost izlaza iz neurona (126).



**Slika 20.** Prikaz strukture vještačke neuronske mreže koju čine po jedan ulazni, izlazni i skriveni sloj neurona

Vještačke neuronske mreže uče na isti način kao ljudski mozak, uzimajući u obzir povratne informacije. Za učenje vještačkih neuronskih mreža najčešće se koristi tzv. *back propagation* algoritam (algoritam povratnog prolaska greške kroz mrežu). On se odvija na način što se u prvom koraku mreži prikazuje trening set podataka i mreža predviđa vrijednost izlaznih promjenljivih. Nakon toga se porede stvarne vrijednosti izlaznih promjenljivih i vrijednosti koje je predvidjela mreža, i na osnovu toga se računa greška predviđanja. Signal greške se zatim prenosi unazad i vrši se prilagođavanje, odnosno ispravljanje težinskih koeficijenata sa ciljem minimiziranja greške predviđanja. Tokom faze učenja, vrijednosti težinskih koeficijenata se koriguju sve dok se na minimum ne



smanji vrijednost kvadrata greške između stvarnih i predviđenih vrijednosti izlaznih podataka.

### **1.9.1 Primjena vještačkih neuronskih mreža u farmaceutskoj tehnologiji**

U dosadašnjim istraživanjima u oblasti 3D štampe lijekova, najčešće je korišten pristup pokušaja i greške koji je, s obzirom na složenost ove tehnologije, često vremenski zahtijevan, karakteriše ga značajan utrošak novca, materijala i resursa, a dobijeni rezultati ne moraju nužno biti zadovoljavajući. U procesu razvoja novog 3D štampanog lijeka potrebno je napraviti mnogo izbora, počevši od odabira tehnike štampe i sastava formulacije do primijenjenih parametara štampe i željenih osobina lijeka. Dodatno, eksperti u oblasti 3D štampe lijekova mahom su angažovani u istraživačkim projektima, što nije slučaj sa kliničkim okruženjem, naročito uzimajući u obzir činjenicu da zahtjevi 3D štampe prevazilaze znanja i vještine zdravstvenih radnika. Štaviše, pristup zasnovan na znanju u 3D štampi nije struktuiran i standardizovan. Zato se smatra da primjena prediktivnih koncepata u razvoju 3D štampanih lijekova može da pomogne u pronalaženju optimalnih rješenja, što može dovesti do ubrzanja uvođenja inovacija i smanjenja troškova i potrebe za resursima (129).

Mašinsko učenje je grana vještačke inteligencije koja ima za cilj da modeluje procese kroz prepoznavanje obrazaca iz složenih skupova podataka (130). Tehnologije 3D štampe i mašinskog učenja su se razvijale nezavisno jedna od druge, ali od 2020. godine počinje objavljivanje prvih istraživačkih radova koji objedinjuju ove dvije tehnologije. Algoritmi mašinskog učenja mogu da rade brzinom koja je daleko veća od ljudskog intelekta, uz mnogo manji rizik od greške, pa u tom smislu mašinsko učenje ima potencijal da, kao i u brojnim savremenim disciplinama i procesima, revolucionarno promijeni pristup istraživanjima u 3D štampi kako u naučnom tako i u kliničkom kontekstu. Gongora i saradnici su zaključili da primjena mašinskog učenja može da smanji broj potrebnih eksperimenata u istraživanjima sa FDM tehnikom za čak 60 puta (131), dok su svojim istraživanjem Ruberu i saradnici utvrdili da optimizacija primjenom mašinskog učenja može redukovati broj eksperimenata u *bioprinting*-u na manje od 50, od mogućih 6.000 do 10.000 (132). Iz ovog proizilazi da će navedeni pristup značajno doprinijeti ubrzanju

istraživanja i omogućiti bržu primjenu koncepta personalizovane medicine kroz 3D štampu (129).

Poznato je da i naizgled beznačajne promjene dizajna formulacije mogu značajno da izmijene osobine lijeka i njegovo ponašanje *in vivo*, pa su stoga u oblasti razvoja farmaceutskih formulacija neophodna specifična ekspertska znanja, gdje koncept personalizovane terapije posredovane 3D štampom nije izuzetak. Prilikom dizajna personalizovane formulacije potrebno je uzeti u obzir mnogo faktora, poput starosti, težine, sposobnosti gutanja, potrebne doze lijeka, potrebne kinetike oslobađanja, prisustva komorbiditeta, itd. Mašinsko učenje ima kapacitet da razmatra sve navedene faktore i da predvidi optimalni dizajn formulacije u skladu sa individualnim zahtjevima (129).

Madžarević i saradnici su koristeći vještačke neuronske mreže ispitali uticaj faktora formulacije na printabilnost i izvršili predviđanje i optimizaciju brzine oslobađanja ibuprofena iz polimernog matriksa tableta štampanih DLP tehnikom. Primijenjen je D-optimalni dizajn smješe u kom su ulazno promjenljive bile: sadržaj PEGDA, PEG 400 i vode, dok je izlazno promjenljivu predstavljao procenat oslobođenog ibuprofena. Međutim, ovim pristupom nije uspostavljen relevantan matematički model koji bi opisao zavisnost među promjenljivim. Da bi se istražila ova kompleksna povezanost između faktora formulacije, parametara procesa i brzine oslobađanja ibuprofena, primijenjene su vještačke neuronske mreže, koje su kreirane pomoću dva komercijalna softvera. Sposobnost predviđanja modela napravljenih pomoću vještačkih neuronskih mreža je ocijenjena na temelju korelacije između eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrijednosti zavisno promjenljivih. Koeficijent determinacije ( $R^2$ ) je iznosio 0,9811 odnosno 0,9960. Izračunavanjem vrijednosti  $f_2$  upoređene su eksperimentalno dobijene vrijednosti brzine oslobađanja ibuprofena sa vrijednostima koje su predviđene neuronskim mrežama. Za neuronsku mrežu 1 dobijena je vrijednost  $f_2=52.15$ , dok je kod neuronske mreže 2 dobijena vrijednost  $f_2= 44.91$ . Na temelju dobijenih podataka zaključeno je da je profil brzine oslobađanja ibuprofena koji je predvidjela neuronska mreža 1 sličan eksperimentalno dobijenom profilu oslobađanja (133).

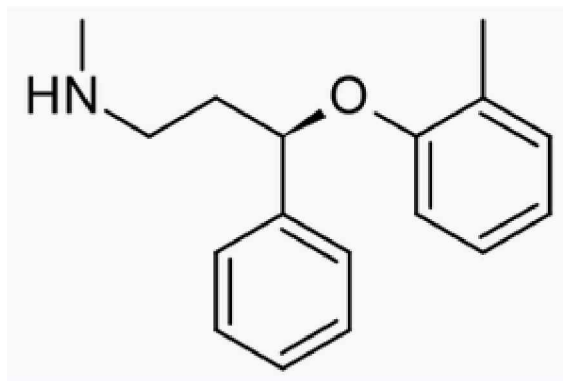
Kod FDM tehnike, izrada filamenata pogodnih za štampu predstavlja veliki izazov, s obzirom da na proces utiču mnogi faktori, između ostalog udio polaznih supstanci, temperatura ekstruzije i temperatura štampe. S obzirom da je broj supstanci koje treba

ispitati veliki, potrebno je jako puno vremena i resursa da bi se razvila formulacija. Elbadawi i saradnici su razvili softver pod nazivom M3DISEEN koji, na osnovu odabranih komponenti formulacije a prije njene pripreme, predviđa printabilnost, temperaturu ekstruzije, mehaničke osobine filamenta i temperaturu štampanja. Naime, ova grupa istraživača je koristila podatke iz publikovanih studija kako bi ispitala mogućnost primjene tehnika mašinskog učenja za modelovanje toka rada FDM tehnike. Temperatura ekstruzije, mehanička svojstva filamenata, temperatura štampanja, mogućnost štampanja i brzina oslobađanja bili su ključni parametri za predviđanje. Najbolja predikcija je ostvarena primjenom vještačkih neuronskih mreža (77).

### 1.10 Atomoksetin

Kao model ljekovita supstanca u istraživanjima sprovedenim u okviru ove doktorske disertacije upotrijebljen je atomoksetin ((3R)-N-metil-3-(2-metilfenoksi)-3-fenilpropan-1-amin (Slika 21). Atomoksetin je bijeli do gotovo bijeli prašak, umjereno rastvorljiv u vodi, rastvorljiv u anhidrovanom etanolu, praktično nerastvorljiv u heptanu. Atomoksetin pokazuje polimorfizam (134). Temperatura topljenja atomoksetina iznosi 161°C - 165°C. Vrijednosti konstante disocijacije i particionog koeficijenta atomoksetina iznose  $pK_a=10.13$  i  $\log P=0.676$  (135).

Atomoksetin je visoko selektivan i potentan inhibitor preuzimanja noradrenalina, što je njegov pretpostavljeni mehanizam dejstva, bez direktnog uticaja na serotoninske ili dopaminske transportere. Ima minimalan afinitet za ostale noradrenergičke receptore ili druge transportere ili receptore neurotransmitera (136).



**Slika 21.** Strukturna formula atomoksetina

Atomoksetin je namijenjen za primjenu kod djece uzrasta 6 godina i starije, adolescenata i odraslih u terapiji poremećaja sa deficitom pažnje i hiperaktivnošću (engl. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, ADHD) u obliku tableta i kapsula u širokom opsegu doza: 10 mg, 18 mg, 25 mg, 40 mg, 60 mg, 80 mg i 100 mg (137). Definicija ADHD je zasnovana na neprilagođeno visokim nivoima impulsivnosti, hiperaktivnosti i nedostatka pažnje, koji se uočavaju pri posmatranju ponašanja djece i odraslih. Impulsivnost se odnosi na nepromišljena i nezrela djela, hiperaktivnost na neumorno kretanje i stalne promjene položaja, a poremećaj pažnje na neorganizovanost i smanjenu sposobnost koncentracije (138).

Doziranje se u različitim populacijama određuje prema sledećoj šemi:

- kod djece (starije od 6 godina) i adolescenata do 70 kg tjelesne težine, liječenje treba otpočeti ukupnom dnevnom dozom od približno 0,5 mg/kg. Početnu dozu treba održavati najmanje 7 dana prije porasta titracije doze, zavisno od kliničkog odgovora i podnošljivosti. Preporučena doza održavanja je otprilike 1,2 mg/kg/dan (zavisno od težine pacijenta i dostupne jačine atomoksetina);
- kod djece (starije od 6 godina) i adolescenata preko 70 kg tjelesne težine, liječenje atomoksetinom treba otpočeti ukupnom dnevnom dozom od 40 mg. Početnu dozu treba održavati najmanje 7 dana prije porasta titracije doze, zavisno od kliničkog odgovora i podnošljivosti. Preporučena doza održavanja je 80 mg. Maksimalna preporučena ukupna dnevna doza je 100 mg;
- kod odraslih, liječenje atomoksetinom treba otpočeti ukupnom dnevnom dozom od 40 mg. Početnu dozu treba održavati najmanje 7 dana prije porasta titracije doze, zavisno od kliničkog odgovora i podnošljivosti. Preporučena dnevna doza održavanja je od 80 mg do 100 mg. Maksimalna preporučena ukupna dnevna doza je 100 mg. Bezbjednost pojedinačnih doza preko 120 mg i ukupnih dnevnih doza iznad 150 mg nije sistematski ispitana (137).

Veoma česta neželjena dejstva (mogu da se jave kod više od 1 na 10 pacijenata) atomoksetina uključuju glavobolju, bol u stomaku, smanjeni apetit, mučninu ili povraćanje, pospanost, povišen krvni pritisak i ubrzan puls. Česta neželjena dejstva (mogu da se jave kod najviše 1 na 10 pacijenata) su razdražljivost ili uznemirenost, problemi sa spavanjem (uključujući rano buđenje), depresija, osjećanje tuge i

beznadežnosti, tjeskobe, tikovi, proširene zjenice (tamno središte oka), zatvor, gubitak apetita, natečenost, crvenilo i svrab kože, osip, letargija, itd. Identifikovana su i sledeća, povremena neželjena dejstva (mogu da se jave kod najviše 1 na 100 pacijenata): nesvjestica, tremor, migrena, zamagljen vid, neobične senzacije na koži, poput peckanja i svraba, trnjenje ili utrnulost u rukama ili nogama, epileptični napadi, produženje QT intervala, kratak dah, pojačano znojenje, itd (136).

Atomoksetin se brzo i gotovo potpuno resorbuje posle *per os* primjene. Prosječnu maksimalnu izmjerenu koncentraciju u plazmi (C<sub>max</sub>) dostiže otprilike 1 - 2 sata posle primjene lijeka. Apsolutna bioraspoloživost atomoksetina posle oralne primjene se kreće u intervalu od 63% do 94%, zavisno od individualnih razlika u umjerenom metabolizmu prvog prolaza. Može se primjenjivati nezavisno od obroka. Atomoksetin prolazi biotransformaciju prvenstveno enzimskim putem preko citohroma P450 2D6 (CYP2D6). Osobe sa smanjenom aktivnošću ovog puta (spori metabolizeri) čine oko 7% populacije bijelaca i imaju veće koncentracije atomoksetina u plazmi u poređenju sa normalnim metabolizerima. Kod sporih metabolizera, površina ispod krive (engl. *Area Under the Curve*, AUC) je približno 10 puta veća, a maksimalna koncentracija (C<sub>ss, max</sub>) je oko 5 puta veća nego kod normalnih metabolizera. Atomoksetin ne inhibira niti indukuje CYP2D6 u terapijskim dozama. Prosječno poluvrijeme eliminacije atomoksetina posle oralne primjene iznosi 3,6 sati kod normalnih metabolizera i 21 sat kod sporih metabolizera (136).

Na tržištu Crne Gore nema registrovanih lijekova koji sadrže atomoksetin.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Opšti cilj istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje mogućnosti primjene tehnika digitalnog projektovanja svjetlosti i selektivnog laserskog sinterovanja u izradi tableta za personalizovanu terapiju.

Navedeni cilj je realizovan kroz sledeće posebne ciljeve:

- ispitivanje pogodnosti različitih fotoinicijatora (riboflavina i DPPO) za izradu tableta atomoksetina DLP tehnikom, i podešavanje procesnih parametara koji će omogućiti uspješno štampanje tableta;
- ispitivanje uticaja vrste fotoinicijatora na brzinu oslobađanja atomoksetina iz izrađenih DLP tableta;
- ispitivanje mogućnosti prilagođavanja brzine oslobađanja ljekovite supstance iz DLP tableta izrađenih sa fotoinicijatorom DPPO od trenutnog ka modifikovanom oslobađanju kroz variranje debljine tableta i procentualnog udjela ljekovite supstance;
- ispitivanje mogućnosti razvoja modela za predviđanje profila oslobađanja ljekovite supstance iz tableta dobijenih DLP tehnikom primjenom vještačkih neuronskih mreža;
- ispitivanje mogućnosti izrade tableta primjenom SLS tehnike, i pronalaženje optimalnog sastava formulacije i parametara procesa štampanja koji će omogućiti dobijanje tableta zadovoljavajućih mehaničkih i farmaceutsko-tehnoloških karakteristika;
- poređenje mehaničkih i disolucionih svojstava tableta izrađenih pomoću SLS štampača i simulatora kompakcije, u cilju donošenja zaključka o mogućnosti međusobne zamjenljivosti ova dva procesa.

Na osnovu navedenih ciljeva, postavljene su sledeće hipoteze:

- primjenom DLP tehnike 3D štampe moguće je ostvariti uspješno štampanje tableta atomoksetina primjenom različitih fotoinicijatora;
- izbor fotoinicijatora za DLP štampanje može uticati na brzinu oslobađanja atomoksetina iz izrađenih DLP tableta;
- kroz variranje parametara poput debljine tablete i procentualnog udjela ljekovite supstance, moguće je ostvariti različite profile brzine oslobađanja atomoksetina iz DLP tableta;
- primjenom vještačkih neuronskih mreža, moguće je razviti model za predviđanje profila oslobađanja atomoksetina iz tableta dobijenih DLP tehnikom;
- primjenom SLS tehnike moguće je izraditi tablete zadovoljavajućih mehaničkih i farmaceutsko-tehnoloških karakteristika, nakon inicijalnog ispitivanja i pronalaženja optimalnih parametara za proces štampanja;
- primjenom SLS tehnike moguće je uspješno izraditi tablete istog sastava i karakteristika kao i tablete proizvedene u industrijskim uslovima procesom direktne kompresije.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1 IZBOR ODGOVARAJUĆEG FOTOINICIJATORA ZA DLP 3D ŠTAMPU**

U prvoj fazi istraživanja je ispitana printabilnost tableta atomoksetina primjenom DLP 3D štampača. U sastav formulacije su ulazili PEGDA, PEG400 i voda, a kao fotoinicijatori su korišteni DPPO i riboflavin. Kao model lijekovita supstancu upotrijebljen je atomoksetin. Najprije je ispitana pogodnost dva različita fotoinicijatora - DPPO i riboflavina za izradu tableta atomoksetina, gdje su pomoću oba, nakon variranja i podešavanja procesnih parametara, uspješno izrađene tablete. Nakon uspješne štampe izvršena je karakterizacija dobijenih tableta u pogledu dimenzija (debljina i prečnik), mase, sadržaja atomoksetina, kao i brzine oslobađanja lijekovite supstance. Rezultati ove faze istraživanja pomogli su u razumijevanju uticaja vrste fotoinicijatora na uspješnost štampe (u pogledu zahtijevanih parametara štampanja) i karakteristike dobijenih tableta, na osnovu čega je napravljen izbor formulacije i procesnih parametara koji su korišteni u drugoj fazi istraživanja.

##### **3.1.1 Materijali**

Kao model lijekovita supstancu za izradu tableta DLP tehnikom korišten je atomoksetin hidrohlorid (Ph. Eur. 11.0, Hemofarm AD Vršac, Srbija), dok su kao pomoćne supstance korišćeni: polietilen glikol srednje molekulske mase 400 (PEG 400, Fagron B.V., Holandija), PEGDA srednje molekulske mase 700 (Sigma-Aldrich, Japan), riboflavin (DSM Nutritional Products Ltd, Švajcarska, donacija kompanije Galenika, Srbija), difenil (2, 4, 6-trimetilbenzoi) fosfin oksid (DPPO) (Sigma-Aldrich, Njemačka) i prečišćena voda (Ph. Eur. 11.0). PEGDA je u navedenoj formulaciji upotrijebljen kao fotopolimer, riboflavin i DPPO imali su ulogu fotoinicijatora, dok su PEG 400 i prečišćena voda modifikatori konzistencije. Sve ostale upotrijebljene hemikalije i reagensi su bili farmakopejskog kvaliteta (Ph. Eur. 11.0).



### 3.1.2 Priprema rastvora fotopolimera

Sastav formulacije u pogledu udjela PEGDA, PEG 400 i vode je definisan na osnovu literaturnih podataka i inicijalnih eksperimenata, i njihova koncentracija kao i udio ljekovite supstance bila je konstantna u formulacijama za štampu. Obje formulacije sadržale su po 0.01% fotoinicijatora. Sastav formulacija prikazan je u Tabeli 2. Formulacije su pripremljene tako što su u jednoj hemijskoj čaši odmjereni PEGDA, PEG 400 i atomoksetin, dok su u drugoj hemijskoj čaši odmjereni riboflavin, odnosno DPPO i voda i nakon miješanja na magnetnoj miješalici dodati u smjesu polimera i atomoksetina. Formulacije su zatim miješane do potpunog rastvaranja komponenti. Tokom pripreme rastvora, hemijske čaše su obložene aluminijumskom folijom radi zaštite od svjetlosti.

**Tabela 2.** Sastav formulacija (% m/m) za DLP 3D štampu tableta

<b>Formulacija</b>	<b>R</b> (% m/m)	<b>D</b> (% m/m)
atomoksetin	5,00	5,00
PEGDA	42,50	42,50
PEG 400	42,49	42,49
voda	10,00	10,00
riboflavin	0,01	-
DPPO	-	0,01

### 3.1.3 Štampanje tableta DLP tehnikom

U *AutodeskFusion* 360 2.0.8809 (Autodesk Inc, SAD) softveru napravljen je 3D model tableta za štampanje. Model tablete su imale cilindrični oblik, dijametar 8,00 mm, a debljinu 2,00 i 3,00 mm. Napravljeni model je zatim preveden u .STL format, kako bi bio „prepoznat“ od strane štampača. Za štampanje tableta je upotrijebljen Wanhao Duplicator 7 3D štampač (Wanhao, Kina) (Slika 22).



**Slika 22.** Wanhao Duplicator 7 3D štampač koji je korišten za štampanje tableta u prvoj fazi eksperimentalnog rada

Parametri štampanja podešeni su u Creation Workshop X 1.2.1.0. softveru. Prilikom štampanja, konstantnim su držani sledeći parametri: debljina sloja od 100  $\mu\text{m}$  sa 10 baznih slojeva i vrijeme ekspozicije od 800 s za bazne slojeve. Vrijeme ekspozicije za ostale slojeve je varirano zavisno od upotrijebljenog fotoinicijatora. Naime, preliminarnim eksperimentima je utvrđeno da je za uspješno štampanje tableta sa formulacijom koja je sadržala DPPO kao fotoinicijator bilo neophodno minimalno vrijeme ekspozicije ostalih slojeva od 250 s, dok je za formulaciju sa riboflavinom bilo potrebno minimalno vrijeme ekspozicije ostalih slojeva od 1 000 s, kako bi fotopolimerizacija uspjela i kako bi se postiglo zadržavanje slojeva na platformi za štampu.

### 3.1.4 Karakterizacija tableta

#### 3.1.4.1 Određivanje fizičkih osobina tableta

Po 10 pojedinačnih tableta odmjereno je na analitičkoj vagi (Sartorius, Njemačka). Digitalnim noniusom (Vogel, Njemačka) izmjereni su debljina i prečnik na po 10 tableta svake formulacije.

#### 3.1.4.2 Određivanje sadržaja atomoksetina u tabletama

Po tri tablete od svake formulacije usitnjene su pomoću pistila u tarioniku. Zatim je masa koja odgovara prosječnoj masi tablete odmjerena na analitičkoj vagi i prenijeta u normalni sud zapremine 10 ml, nakon čega je dodato 5 ml koncentrovanog etanola. Kako bi se pospješila ekstrakcija i rastvorila kompletna količina atomoksetina iz uzoraka, normalni sudovi su stavljeni na ultrazvučno kupatilo Bandelin Sonorex RK102H (Sonorex-Bandelin, Njemačka) tokom 15 minuta, nakon čega su uzorci ostavljeni da se ohlade do sobne temperature. Izvršeno je dopunjavanje etanolom do zapremine od 10 ml, rastvori su filtrirani u hemijsku čašu, i od svakog rastvora je pipetom odmjereno po 1 ml i prenijet u normalni sud zapremine 10 ml koji je potom dopunjen vodom do crte. Na uređaju Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija) (Slika 23.), spektrofotometrijski je određen sadržaj atomoksetina na talasnoj dužini od 270 nm. Metodom standarda iz rastvora poznate koncentracije, odnosno standardnog rastvora, dobijene su vrijednosti koncentracije atomoksetina u ispitivanim formulacijama.



**Slika 23.** Uređaj Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija) pomoću koga je spektrofotometrijski određen sadržaj atomoksetina u DLP izrađenim tabletama

#### **3.1.4.3 Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina iz tableta**

Brzina oslobađanja atomoksetina je ispitana korištenjem USP IV aparature sa protočnom ćelijom (CE7 smart, Sotax, Švajcarska). Aparatura sa protočnom ćelijom je zatvoreni sistem koji omogućava recikliranje konstantne zapremine medijuma. Ćelije su uronjene u vodeno kupatilo, čija je temperatura održavana na  $37 \pm 0,5$  °C. Kao medijum je korištena destilovana voda u zapremini od 250 ml, jer literaturni podaci pokazuju da izbor medijuma (destilovana voda ili 0.1 M HCl) ne utiče na oslobađanje atomoksetina iz 3D štampanih tableta. Brzina protoka bila je podešena na 8 ml/min. Uzorkovanje je vršeno u unaprijed definisanim vremenskim tačkama (izraženo u satima: 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). U navedenim vremenskim tačkama uzorkovano je po 3 ml medijuma, i uzorci su profiltrirani. Na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije atomoksetina (270 nm), spektrofotometrijskom metodom je određen sadržaj atomoksetina pomoću spektrofotometra Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija). Metodom standarda iz rastvora poznate koncentracije, odnosno standardnog rastvora, dobijene su vrijednosti koncentracije atomoksetina u svakoj vremenskoj tački. Ispitivanje je vršeno u triplikatu i dobijene vrijednosti su predstavljene kao srednja vrijednost rastvorene ljekovite supstance (%) sa standardnom devijacijom.

#### **3.1.4.4 Polarizaciona svjetlosna mikroskopija**

Polarizacioni mikroskop (Olympus BX 51P, Olympus, Japan) (Slika 24.) je primijenjen kako bi se vizualizovao poprečni presjek tableta izrađenih DLP tehnikom. Slike poprečnog presjeka tableta prije i posle ispitivanja brzine rastvaranja atomoksetina su dobijene primjenom cellSens Entry Version 1.14 softvera (Olympus, Japan).



**Slika 24.** Polarizacioni mikroskop (Olympus BX 51P, Olympus, Japan) pod kojim je posmatran poprečni presjek DLP izrađenih tableta, prije i posle ispitivanja brzine oslobađanja atomoksetina

### **3.1.5 REZULTATI I DISKUSIJA**

#### **3.1.5.1 Štampanje tableta**

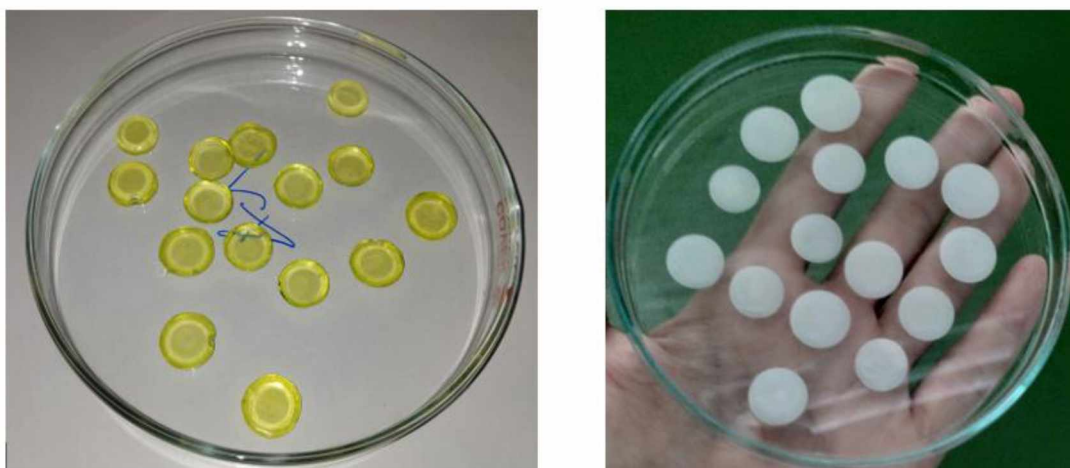
Prilikom razvoja formulacija za štampu DLP tehnikom istraživači su suočeni sa brojnim izazovima, s obzirom da primjena DLP tehnike u oblasti istraživanja i razvoja farmaceutskih oblika predstavlja novi koncept. Kako se radi o potpuno novim formulacijama, različitim od komercijalnih rezina, neophodno je definisati parametre štampe jer najčešće nije moguće ostvariti uspješno štampanje pod uslovima štampe komercijalnih rezina. To se uglavnom postiže kroz veliki broj pokušaja. Dodatno je problematično to što se formulacije u istraživanjima razlikuju po sastavu i osobinama, iz čega proizilazi da je svakoj formulaciji pojedinačno neophodno definisati i prilagoditi parametre štampanja. Navedeni pristup zahtijeva značajan utrošak resursa i vremena.

Da bi se definisali parametri procesa koji će omogućiti uspješno štampanje tableta DLP tehnikom, u prvom dijelu istraživanja vršeno je variranje različitih parametara sa dvije formulacije koje su se razlikovale samo po upotrijebljenom fotoinicijatoru. U ovoj fazi je utvrđeno da je najvažniji parametar za uspješno štampanje vrijeme ekspozicije. U inicijalnim eksperimentima su konstantnim držani sledeći parametri: debljina sloja od 100  $\mu\text{m}$  sa 10 baznih slojeva i vrijeme ekspozicije od 800 s za bazne slojeve. Zatim je sistemom pokušaja i greške varirano vrijeme ekspozicije ostalih slojeva. Najmanje primijenjeno vrijeme ekspozicije iznosilo je 100 s, ali nije postignuto uspješno štampanje. Daljim povećanjem vremena ekspozicije primijećeno je da je za uspješno štampanje formulacije koja je sadržala DPPO kao fotoinicijator bilo potrebno vrijeme ekspozicije od 250 s, dok je za formulaciju sa riboflavinom bilo potrebno vrijeme ekspozicije od 1 000 s. Pri kraćim vremenima ekspozicije, nije dolazilo do očvršćavanja slojeva na radnoj ploči i formiranja zadatih tableta. Na osnovu podataka dobijenih u ovoj fazi, izvršeno je podešavanje procesnih parametara koji su primijenjeni u drugoj fazi istraživanja, kako bi se primijenilo minimalno vrijeme ekspozicije koje dovodi do očvršćavanja slojeva.

### **3.1.5.2 Karakterizacija tableta**

#### **3.1.5.2.1 Fizičke karakteristike tableta i sadržaj atomoksetina**

Primjenom DLP 3D tehnike uspješno su štampane tablete atomoksetina sa različitim fotoinicijatorima. Tablete dobijene na DLP 3D štampaču sa riboflavinom, odnosno DPPO kao fotoinicijatorom, prikazane su na Slici 25.



**Slika 25.** DLP štampane tablete sa riboflavinom (lijevo), odnosno DPPO kao fotoinicijatorom (desno)

Sve izrađene tablete imale su glatku površinu i bile žute boje odnosno transparentne, što je posljedica primjene različitih fotoinicijatora, riboflavina odnosno DPPO. Izmjerena masa tableta, dimenzije kao i sadržaj atomoksetina je prikazan u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Izmjerena masa, dimenzije i sadržaj atomoksetina u tabletama dobijenim DLP tehnikom

formulacija	masa (mg)	prečnik (mm)	debljina (mm)	sadržaj atomoksetina (%)
R2	$180,80 \pm 34,80$	$10,60 \pm 0,62$	$1,92 \pm 0,17$	4.85
R3	$295,30 \pm 15,00$	$14,43 \pm 1,46$	$2,75 \pm 0,20$	4.64
D2	$100,40 \pm 10,00$	$8,00 \pm 0,20$	$1,92 \pm 0,07$	5.01
D3	$170,00 \pm 20,50$	$8,15 \pm 0,25$	$2,90 \pm 0,04$	5.25

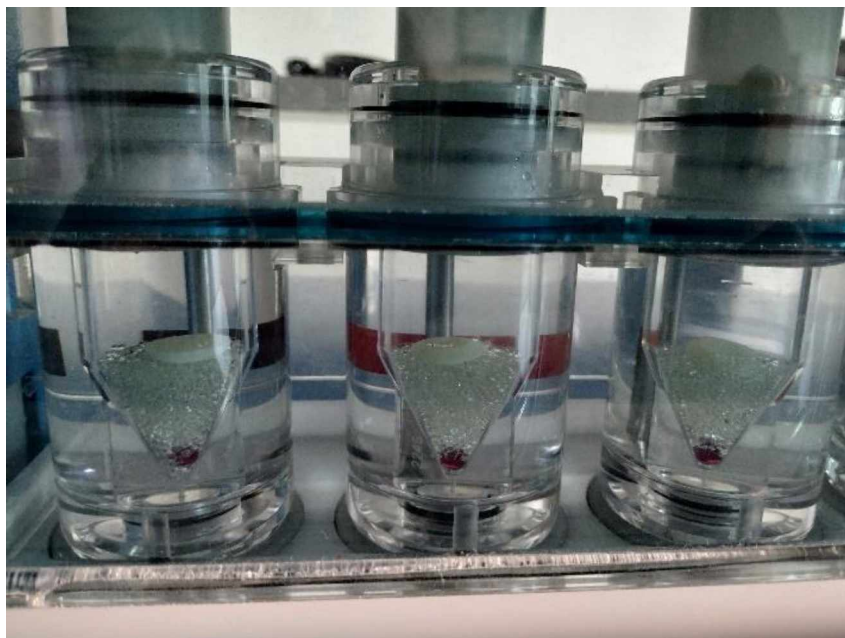
Iz prikazanih podataka da se primijetiti da je prečnik tableta sa riboflavinom širi u odnosu na ciljane vrijednosti ( $10.60 \pm 0.62$  mm za tablete debljine 2 mm i  $14.43 \pm 1.46$  mm za tablete debljine 3 mm), u poređenju sa tabletama koje su sadržale DPPO kao fotoinicijator ( $8.00 \pm 0.20$  mm za tablete debljine 2 mm i  $8.15 \pm 0.25$  mm za tablete debljine 3 mm).

Navedena varijabilnost može se pripisati upotrijebljenom fotoinicijatoru, kao i parametrima procesa štampanja, tj. višestruko dužem vremenu ekspozicije koje je primijenjeno kod tableta sa riboflavinom. Sa druge strane, nije bilo značajne razlike u debljini tableta izrađenih sa različitim fotoinicijatorima. Dobijeni rezultati nisu u skladu sa rezultatima istraživanja Martinez i saradnika, gdje su dimenzije tableta sa riboflavinom bile znatno bliže teorijskim vrijednostima u odnosu na tablete izrađene sa DPPO fotoinicijatorom. Međutim, ova razlika bi se mogla objasniti time što je u radu korišten stereolitografski 3D štampač, formulacije su sadržale ibuprofen kao model ljekovitu supstancu i znatno veći procenat vode (30%) (59). Dodatno, nije poznato koji su parametri procesa primijenjeni. Sadržaj atomoksetina u tabletama sa DPPO je bio u okviru  $\pm 5\%$  u odnosu na teorijski sadržaj, dok je kod tableta sa riboflavinom sadržaj bio u navedenom opsegu za tablete debljine 2 mm. Kod tableta sa riboflavinom prečnika 3 mm, sadržaj je u okviru  $\pm 10\%$  u odnosu na teorijski sadržaj, gdje je moguće da je zbog dužeg vremena ekspozicije i procesa štampanja, došlo do izvjesnog stepena taloženja čestica atomoksetina na dno kadice za štampu.

#### **3.1.5.2.2 Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina iz tableta**

Profili brzine oslobađanja atomoksetina iz izrađenih DLP tableta predstavljeni su na Slici 27. I u ovom istraživanju, kao i u publikovanim studijama u oblasti fotopolimerizacionih tehnika 3D štampe (62, 139), izrađene tablete su ostale nepromijenjene za vrijeme i nakon ispitivanja brzine oslobađanja (Slika 26.).

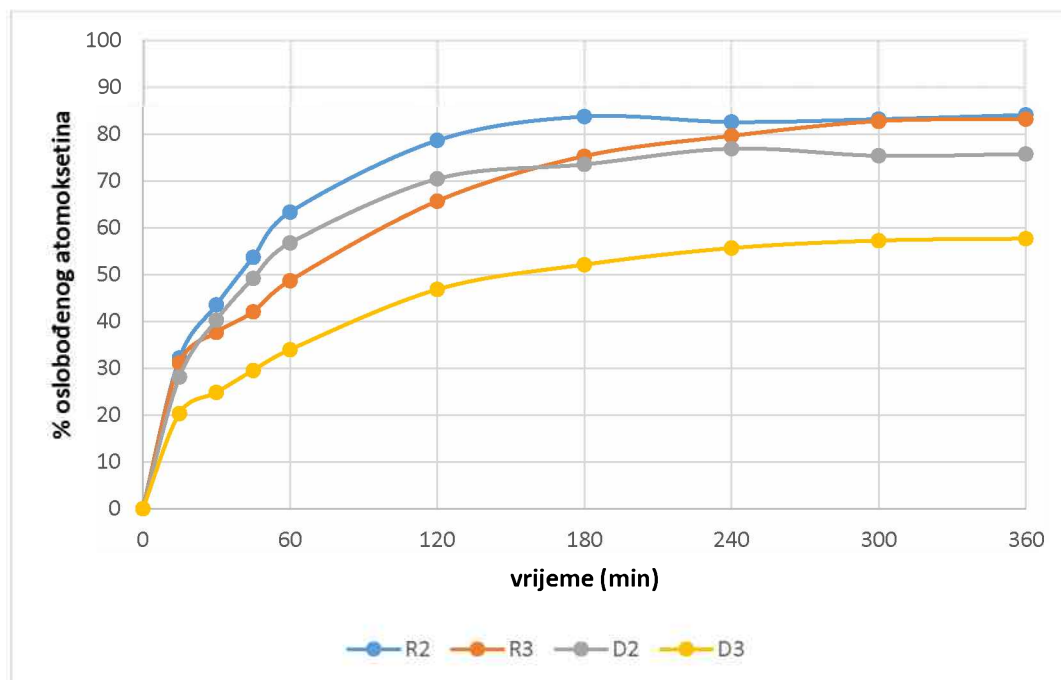




**Slika 26.** Ipitivanje brzine oslobađanja atomoksetina iz tableta dobijenih DLP tehnikom pomoću aparature sa protočnom ćelijom

Oslobađanje atomoksetina je praćeno u periodu od 6 h. Najbrže oslobađanje atomoksetina ostvareno je kod tableta formulacije R2 ( $83.75 \pm 2.55\%$ ) debljine 2 mm, koje su sadržale riboflavin kao fotoinicijator, dok je najsporije oslobađanje atomoksetina uočeno kod tableta formulacije D3 ( $57.25 \pm 1.38\%$ ), sa debljinom od 3 mm i DPPO kao fotoinicijatorom. Dodatno, tablete formulacija R3, iako veće debljine, imale se brže oslobađanje ljekovite supstance nego formulacija D2.

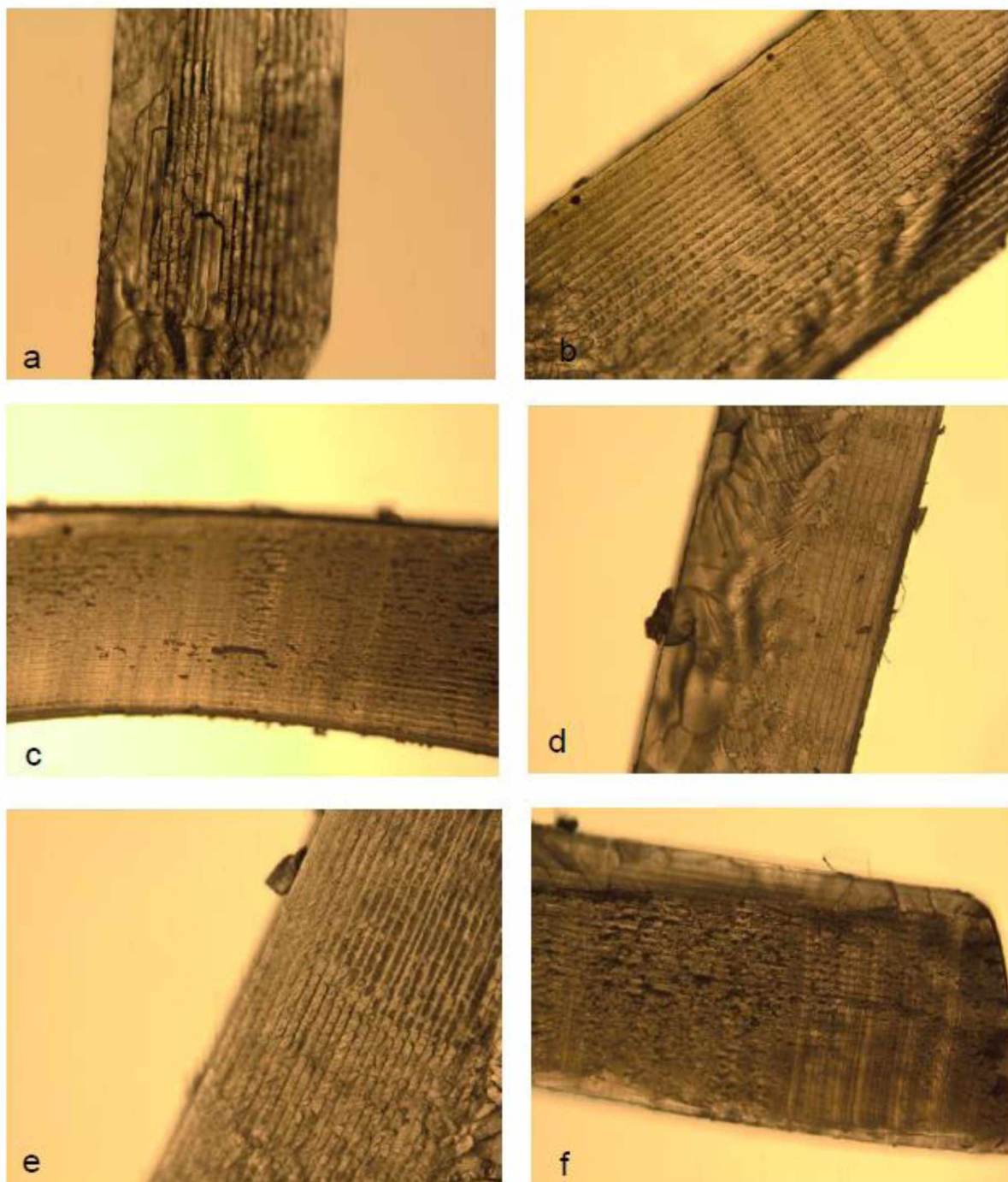
Na osnovu dobijenih profila brzine oslobađanja atomoksetina (Slika 27.) može se zaključiti da izbor fotoinicijatora i debljina tablete imaju značajan uticaj na brzinu oslobađanja iz DLP izrađenih tableta. Brže oslobađanje ljekovite supstance iz formulacija sa riboflavinom može se objasniti jačim i intenzivnijim povezivanjem monomernih jedinica unutar polimernog matriksa, kada se kao fotoinicijator koristi DPPO. Dodatno, oslobađanje ljekovite supstance je bilo brže iz tableta manje debljine, što je bilo i očekivano, zbog većeg odnosa površina/zapremina.



**Slika 27.** Profili brzine oslobađanja atomoksetina iz DLP tableta izrađenih sa riboflavinom (R2 i R3) i DPPO (D2 i D3)

### 3.1.5.2.3 Polarizaciona svjetlosna mikroskopija

Kod svih izrađenih formulacija, posmatranjem poprečnog presjeka tableta prije ispitivanja brzine oslobađanja primjenom polarizacione svjetlosne mikroskopije, uočavaju se pojedinačni slojevi štampe. Takođe je posmatran poprečni presjek tableta nakon ispitivanja brzine oslobađanja atomoksetina. Kao što je prethodno navedeno, tablete su tokom samog ispitivanja ostale intaktne i zadržale su oblik, samo je u izvjesnoj mjeri došlo do smanjenja njihove veličine. To implicira da se oslobađanje atomoksetina odigralo procesom difuzije, što dodatno potvrđuju paralelni snopovi mikrokanala kroz koje je došlo do difuzije lijeka, a koji su vidljivi na poprečnom presjeku tableta posle ispitivanja brzine oslobađanja (Slika 28.).



**Slika 28.** Poprečni presjek DLP tableta prije i posle ispitivanja brzine oslobađanja atomoksetina: a) formulacija R2; b) formulacija R3; c) formulacija R3 nakon ispitivanja brzine oslobađanja; d) formulacija D2; e) formulacija D3; f) formulacija D3 nakon ispitivanja brzine oslobađanja

### **3.2 POSTIZANJE ŽELJENOG PROFILA BRZINE OSLOBAĐANJA ATOMOKSETINA IZ DLP TABLETA PRIMJENOM VJEŠTAČKIH NEURONSKIH MREŽA**

Na osnovu rezultata prve faze istraživanja, odlučeno je da se u daljim eksperimentima sa DLP tehnikom kao fotoinicijator koristi DPPO u koncentraciji od 0.10%. U drugoj fazi istraživanja ispitana je mogućnost prilagođavanja brzine oslobađanja ljekovite supstance od trenutnog ka modifikovanom oslobađanju kroz variranje debljine tableta i procentualnog udjela supstance. Dodatno, cilj je bio da se primjenom vještačkih neuronskih mreža razvije model za predviđanje profila oslobađanja ljekovite supstance iz tableta dobijenih DLP tehnikom, kao ciljnog atributa kvaliteta tableta dobijenih ovom tehnikom.

#### **3.2.1 Materijali**

Atomoksetin hidrohlorid (Ph. Eur. 11.0, Hemofarm AD Vršac, Srbija) je bio model ljekovita supstanca, a upotrijebljene su sledeće pomoćne supstance: PEGDA srednje molekulske mase 700 (Sigma-Aldrich, Japan), polietilen glikol srednje molekulske mase 400 (PEG 400, Fagron B.V., Holandija), difenil (2, 4, 6-trimetilbenzoil) fosfin oksid (DPPO) (Sigma-Aldrich, Njemačka) i prečišćena voda (Ph. Eur. 11.0). PEGDA je u navedenoj formulaciji upotrijebljen kao fotopolimer, PEG 400 i prečišćena voda su imali ulogu modifikatora konzistencije dok je DPPO bio fotoinicijator. Sve ostale upotrijebljene hemikalije i reagensi su bili farmakopejskog kvaliteta (Ph.Eur. 11.0).

#### **3.2.2 Priprema rastvora fotopolimera**

U ovoj fazi istraživanja, pripremljena je serija formulacija u kojima je teorijski sadržaj model ljekovite supstance atomoksetin variran od 5.00% to 20.00% (w/w), dok je odnos PEDGA i PEG 400 bio isti u svim formulacijama i iznosio je 3:1, sa ciljem dobijanja tableta odgovarajućih mehaničkih i karakteristika oslobađanja ljekovite supstance, a na osnovu prethodno publikovanih istraživanja (139). Sve formulacije sadržale su po 10% vode i 0.10% DPPO. Sastav formulacija prikazan je u Tabeli 4. Pripremljeno je po 50 g

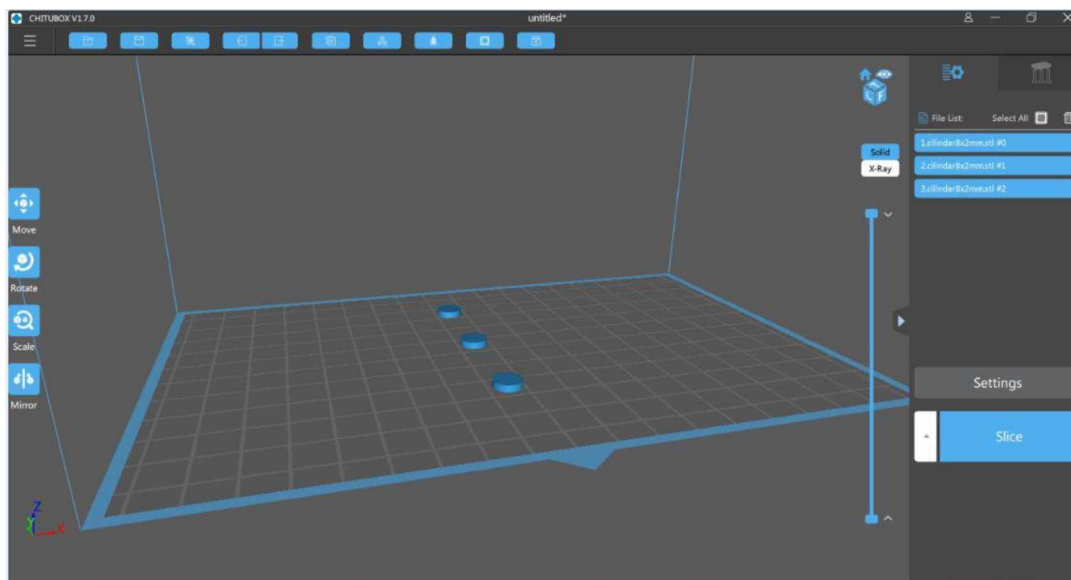
svake formulacije, uz miješanje na magnetnoj miješalici tokom 12 sati kako bi se postiglo potpuno rastvaranje. U toku pripreme formulacija, hemijske čaše su bile obmotane aluminijumskom folijom radi zaštite od svjetlosti. Smješa je zatim bila prenijeta u rezervoar rezina i iniciran je proces štampanja.

**Tabela 4.** Sastavi formulacija (% m/m) za DLP štampu tableta

<b>Formulacija</b>	<b>ATH</b>	<b>PEGDA</b>	<b>PEG 400</b>	<b>Voda</b>	<b>DPPO</b>
D5	5.00	63.70	21.20	10.00	0.10
D7.5	7.50	61.80	20.60	10.00	0.10
D10	10.00	59.93	19.97	10.00	0.10
D12.5	12.50	58.05	19.35	10.00	0.10
D15	15.00	56.18	18.72	10.00	0.10
D20	20.00	52.43	17.47	10.00	0.10

### 3.2.3 Štampanje tableta

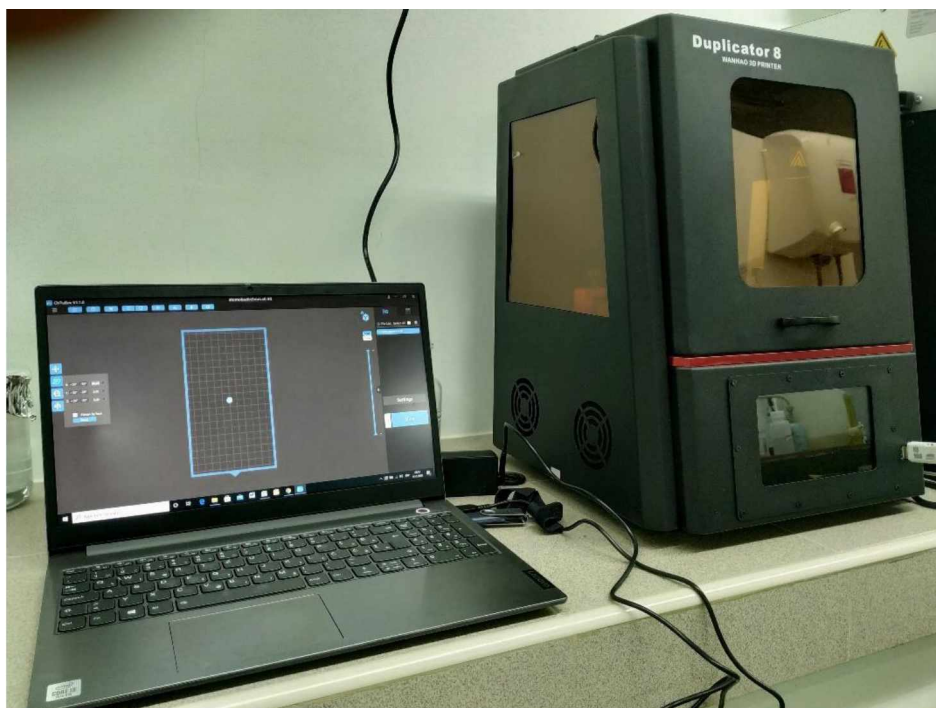
3D model tableta cilindričnog oblika kreiran je u softveru AutodeskFusion 360 2.0.8809 (Autodesk Inc, SAD), preveden u .STL format i eksportovan u softver 3D štampača (Chitubox, version 1.7.0) (Slika 29).



**Slika 29.** Prikaz 3D modela tableta koji su kreirani pomoću AutodeskFusion 360 softvera, nakon čega su konvertovani u .STL format i eksportovani u Chitubox softver Wanhao Duplicator 8 3D štampača

Za štampanje tableta je korišćen Wanhao Duplicator 8 3D štampač (Wanhao, Zhejiang, Kina) (Slika 30). Nakon sprovedenih eksperimenata prve faze, došlo je do kvara Wanhao Duplicator 7 štampača, pa je rad nastavljen na Wanhao Duplicator 8 štampaču, koji je veoma sličan verziji 7, u odnosu na koju ga karakteriše veća površina radne ploče i samim tim veća zapremina rezervoara rezina.





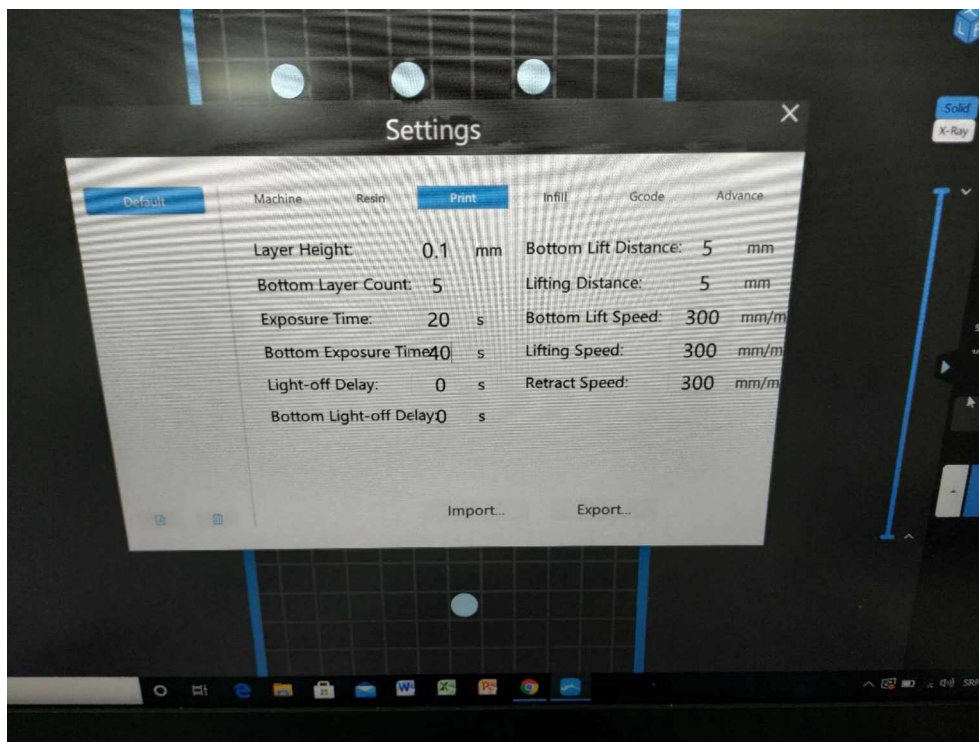
**Slika 30.** Wanhao Duplicator 8 3D štampač povezan na računar na kom je dizajniran 3D model tablete za DLP štampu

Zadani prečnik je bio isti kod svih tableta i iznosio je 8 mm, dok je debljina tableta varirana na način prikazan u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Dimenzije (prečnik i debljina) kreiranih 3D modela tableta

Formulacija	Debljina (mm)	Prečnik (mm)
D5	1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 3.00	8.00
D7.5	2.50	8.00
D10	1.00, 1.25, 1.50, 2.00, 3.00	8.00
D12.5	1.50	8.00
D15	0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00	8.00
D20	0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00	8.00

Sa ciljem optimizacije procesa štampanja, sprovedeni su preliminarni eksperimenti kako bi se utvrdili procesni parametri koji će omogućiti uspješno i brzo štampanje. Na Slici 31. prikazani su parametri koje je moguće podešavati i varirati u softveru štampača, za potrebe štampe različitih oblika i formulacija.



**Slika 31.** Podešavanje parametara u Chitubox softveru Wanhao Duplicator 8 3D štampača

Na osnovu rezultata ovih preliminarnih eksperimenata, sve tablete štampane su primjenom istih vrijednosti procesnih parametara, koji su prikazani u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Parametri štampanja primijenjeni za štampu DLP tableta atomoksetina

Parametar	Vrijednost
Debljina sloja	0.1 mm
Broj baznih slojeva	5
Vrijeme ekspozicije ostalih slojeva	20 s
Vrijeme ekspozicije baznih slojeva	30 s
Udaljenost radne ploče od kadice rezina	5 mm
Distanca podizanja radne ploče	5 mm
Brzina podizanja za bazne slojeve	300 mm/min
Brzina podizanja radne ploče	300 mm/min
Retraktarna brzina	300 mm/min



### **3.2.4 Karakterizacija tableta**

#### **3.2.4.1 Određivanje variranja mase i dimenzija**

3D odštampane tablete su ispirane izopropanolom i prebrisane filter papirom odmah nakon štampanja, kako bi se uklonio eventualno zaostali rezin koji nije polimerizovao sa površine tableta. Pojedinačne tablete (n=10) su odmjerene na analitičkoj vagi (Kern & Sohn, Njemačka). Digitalnim noniusom (Vogel Germany GmbH & Co. KG, Kevelaer, Njemačka) izmjereni su debljina i prečnik na po 10 tableta svake formulacije.

#### **3.2.4.2 Određivanje mehaničkih karakteristika DLP tableta - test penetracije**

U prvoj fazi eksperimentalnog rada nije bilo moguće izvesti ispitivanje otpornosti tableta na lomljenje standardnim testom, jer uređaj nije bio u mogućnosti da slomi pojedine tablete, naročito one manje debljine, već je dolazilo do njihovog savijanja i pomjeranja iz ležišta tokom izvođenja testa. Dodatno, zbog glatke površine i elastičnosti izrađenih tableta, izvođenje konvencionalnog testa frijabilnosti ne bi imalo značaja. Stoga je primijenjen alternativni pristup za kvantitativno opisivanje mehaničkih osobina izrađenih tableta, a to je test penetracije. Ovim testom mjeri se sila koja je potrebna da bi nastavak uređaja penetrirao u uzorak do određene dubine, i upotrijebljen je u cilju utvrđivanja efekta sadržaja lijekovite supstance na mehaničke osobine tableta izrađenih DLP tehnikom. Test je sproveden na uređaju *EZ-LX Compact Table-Top Testing Machine* (Shimadzu, Japan), i to na tabletama čija je teorijska debljina iznosila 1 mm, 2 mm i 3mm, gdje se igla kretala do dubine od 0.5 mm, 1 mm i 2 mm, respektivno. Brzina kretanja igle je iznosila 2 mm/min. Tokom izvođenja testa mjerena je sila (N) u funkciji pomjeraja (mm). Test je sproveden na po tri tablete svake formulacije.

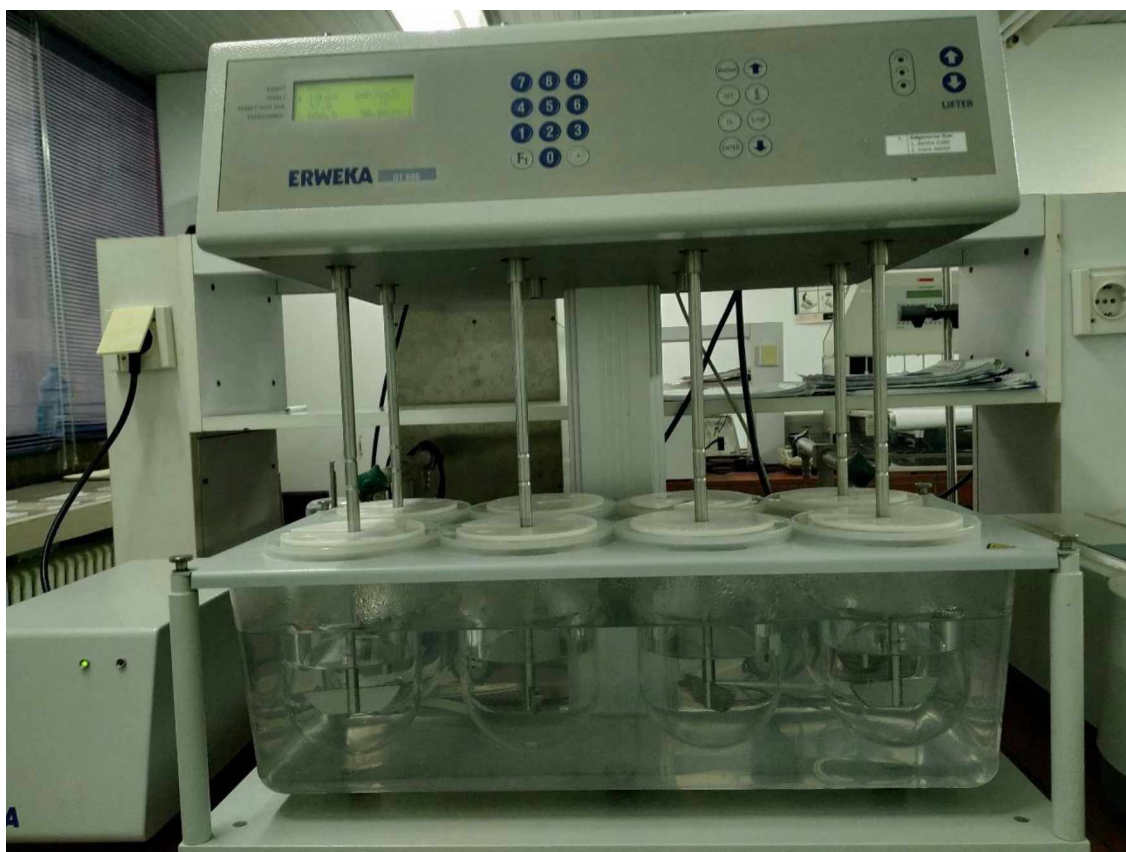
#### **3.2.4.3 Određivanje sadržaja atomoksetina u tabletama**

Sadržaj atomoksetina u izrađenim tabletama određen je spektrofotometrijski na uređaju Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija), na talasnoj dužini od 270 nm. Za pripremu rastvora standarda, 10 mg atomoksetina rastvoreno je u 100 ml destilovane vode, rastvor je promiješan na ultrazvučnom kupatilu Bandelin Sonorex RK102H

(Sonorex-Bandelin, Njemačka) tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi, prohladen i filtriran u hemijsku čašu. Za pripremu rastvora analize, po tri tablete od svake formulacije usitnjene su pomoću pistila u tarioniku. Zatim je masa koja odgovara prosječnoj masi tablete odmjerena na analitičkoj vagi, prenijeta u normalni sud i dopunjena destilovanom vodom do 100 ml. Uzorak je potom podvrgnut istoj proceduri kao i rastvor standarda. Metodom standarda iz rastvora poznate koncentracije, odnosno standardnog rastvora, određene su vrijednosti koncentracije atomoksetina u svim formulacijama.

#### **3.2.4.4 Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina iz DLP tableta**

Brzina oslobađanja atomoksetina iz izrađenih DLP tableta je ispitana korištenjem USP II aparature sa rotirajućom lopaticom Erweka DT600 (Erweka, Njemačka) (Slika 32). Medijum je bila destilovana voda zapremine 500 ml, zagrijana na temperaturu od  $37 \pm 0.5$  °C.



**Slika 32.** Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina iz DLP tableta na uređaju Erweka DT600

Ispitivanje je sprovedeno primjenom brzine obrtaja lopatica od 50 rpm (obrtaja u minuti) u periodu od 8 h. Uzorkovano je po 5 ml medijuma u unaprijed definisanim vremenskim intervalima (15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 i 480 min), nakon čega su uzorci profiltrirani. Sadržaj atomoksetina je određen spektrofotometrijski pomoću uređaja Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija). Metodom standarda iz rastvora poznate koncentracije, odnosno standardnog rastvora, dobijene su vrijednosti koncentracije atomoksetina u svakoj vremenskoj tački. Ispitivanje je rađeno u triplikatu i vrijednosti su predstavljene kao srednja vrijednost rastvorene ljekovite supstance (%) sa standardnom devijacijom. Prema Krkobabić i saradnicima, izbor uređaja (uređaj sa protočnom ćelijom ili rotirajućom lopaticom) i medijuma (0.1 M HCl ili destilovana voda) ne utiče značajno na rezultate ispitivanja brzine oslobađanja atomoksetina iz DLP tableta (139).

#### **3.2.4.5 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija**

Analiza je sprovedena pomoću uređaja DSC1 (Mettler Toledo, Giessen, Njemačka) (Slika 33). Precizno odmjereni uzorci čistog atomoksetina i sprasjenih tableta (5 mg - 10 mg) u aluminijskoj posudi, podvrgnuti su zagrijavanju u temperaturnom intervalu između 25°C i 200°C, pri brzini zagrijavanja od 10°C/min uz konstantan protok azota od 50 ml/min. Vrijednosti temperature i energije su prethodno kalibrisane primjenom indijum standarda, dok je u svim analizama prazna aluminijska posuda korištena kao referentna. Dobijeni podaci dalje su analizirani pomoću STARE softvera (verzija 12.10, Mettler, Toledo).



**Slika 33.** DSC1 (Mettler Toledo, Njemačka) uređaj na kome je vršena DSC analiza izrađenih DLP tableta

#### **3.2.4.6 Difrakcija X-zraka na prašku**

Metoda difrakcije X-zraka na prašku je primijenjena kao tehnika koja sa visokom pouzdanošću omogućava utvrđivanje fizičkog stanja ljekovite supstance u DLP izrađenim tabletama pod ambijentalnim uslovima, čime se izbjegava potencijalna promjena fizičkog stanja ljekovite supstance pod uticajem povišene temperature, kao u slučaju diferencijalne skenirajuće kalorimetrije. Ispitivanja su vršena na Philips PW1050 difraktometru (Philips, Amelo, Holandija) u Bragg-Brentano  $\theta$ - $2\theta$  geometriji, uz korišćenje Cu-K $\alpha$  izvora zračenja ( $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ ) sa nikl filterom. Uzorci su snimani u opsegu  $2\theta$  uglova od  $5$  do  $40^\circ$ , sa veličinom koraka od  $0,05^\circ$  i vremenom zadržavanja od  $4 \text{ s}$  po koraku, primjenom napona od  $40 \text{ kV}$  i jačine struje od  $30 \text{ mA}$ .

#### **3.2.4.7 Polarizaciona svjetlosna mikroskopija**

Olympus BX53-P polarizacioni mikroskop (Olympus, Japan) sa UPLFLN4XP i UPLFLN10XP objektivima je primijenjen sa ciljem vizualizacije poprečnog presjeka unutrašnje strukture tableta dobijenih DLP tehnikom prije i posle izvođenja testova disolucije, kao i za detekciju kristala. Slike su dobijene primjenom cellSens Entry Version 1.14 softvera (Olympus, Tokyo, Japan).

#### **3.2.4.8 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)**

FT-IR spektroskopska analiza je primijenjena sa ciljem otkrivanja eventualno prisutnih interakcija između ljekovite supstance i polimera, koje mogu imati značajan uticaj na stabilnost tableta. FT-IR spektroskopska analiza spršenih tableta, čistog atomoksetina i pojedinačnih ekscipijenasa je vršena na Nicolet iS10 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) uređaju koji je opremljen horizontalnim sistemom za pojedinačnu refleksiju zraka, ATR sistemom (Smart iTR, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) sa ZnSe sočivima. Spektri ispitivanih uzoraka su snimani u intervalu od 4000 do 650  $\text{cm}^{-1}$ , sa rezolucijom od 2  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **3.2.4.9 Modelovanje vještačkih neuronskih mreža**

Za modelovanje vještačkih neuronskih mreža su korištene dvije različite vrste neuronskih mreža. Prvo su, kao nenadgledana vještačka neuronska mreža, korištene samoorganizujuće mape (engl. *self-organizing map* (SOM)), u cilju sticanja boljeg uvida u uticaj ulazno promjenljivih, što su u ovom slučaju bile debljina tablete i procentualni udio ljekovite supstance, na profil oslobađanja atomoksetina iz DLP štampanih tableta. Za razvoj i vizuelizaciju SOM primijenjen je Peltarion® softver (Synapse, Švedska). U drugom pristupu, za razvoj modela koji bi omogućio predviđanje oslobađanja atomoksetina iz DLP tableta korištena je generalizovana regresiona neuronska mreža (GRNM). Ova mreža izgrađena je pomoću TIBCO Statistica® softvera, verzija 13.5.0 (StatSoft Inc).

Za obje mreže, ulazi odnosno nezavisno promjenljive su bile: X1, debljina tableta (koja je varirana u opsegu 0.75 mm do 3 mm) i X2, procentualni udio atomoksetina (koji je

variran u opsegu od 5% do 20%). Izlazi odnosno zavisno promjenljive bile su procenat oslobođene ljekovite supstance nakon 15 min (Y1), 30 min (Y2), 60 min (Y3), 120 min (Y4), 240 min (Y5) i 360 min (Y6).

Uobičajeno je da se set podataka za učenje vještačke neuronske mreže podijeli u tri grupe i to u: podset podataka za trening mreže, zatim za testiranje i validaciju. Setom za trening vrši se podešavanje težina veza i neophodno je obuhvatiti podatke koji pokrivaju cijeli opseg eksperimenta. Prema tome, podaci za trening mreže treba da sadrže sve potrebne informacije i da uključe podatke dobijene primjenom različitih eksperimentalnih uslova, kao i različite sastave formulacija i parametre procesa. Podset podataka za testiranje je nezavistan i on se ne primjenjuje za trening. Koristi se za nezavisnu provjeru ostvarenog procesa učenja, kao i za provjeru arhitekture mreže. Validacioni set podataka se upotrebljava kako bi se osigurala realna veza između ulaza i izlaza. Finalni model se testira setom podataka za validaciju prije treninga za implementaciju.

Podaci iz ukupno 23 eksperimenta podijeljeni su na setove podataka za trening, validaciju i testiranje mreže (17:4:2). Najbolja mreža izabrana je na osnovu najmanje RMS vrijednosti (korijen srednje vrijednosti kvadrata (engl. *Root mean square*, RMS)) za trening, validaciju i test set podataka.

## 3.2.5 REZULTATI I DISKUSIJA

### 3.2.5.1 Štampanje tableta

Tablete cilindričnog oblika konstantnog prečnika i rastuće debljine, u kojima je variran udio atomoksetina, uspješno su štampane pomoću DLP 3D tehnike (Slika 34).



**Slika 34.** Shematski prikaz procesa štampanja DLP tehnikom i dobijene tablete debljine 1 mm, 2 mm i 3 mm

Proces štampanja bio je brz i efikasan i trajao je od 4 min 30 s do 13 min 30 s za štampanje serije od po 20 tableta za svaku formuluaciju, zavisno od zadate vrijednosti debljine tableta. Ovim je pružen još jedan dokaz o prednostima DLP tehnike koje su prepoznate u publikovanim istraživanjima, a u smislu sposobnosti štampanja serija tableta u kratkom vremenskom intervalu na sobnoj temperaturi (139, 140, 141) što će potencijalno omogućiti, zajedno sa ostalim tehnikama 3D štampe, primjenu u apotekama, bolnicama, odnosno kliničkom okruženju u izradi prilagođenih formuluacija lijekova i medicinskih sredstava (142, 143).

Do sada, DLP štampani su upotrijebljeni za izradu tableta i hidrogelova sa različitim ljekovitim supstancama, uključujući atomoksetin (139), teofilin (140), ibuprofen (133), paracetamol (143) i sulforodamin B (108), polimerima i smjesama polimera poput PEGDA, PEG 300 i PEG 400, te različitim fotoinicijatorima. Kada se radi o izradi terapijskih sistema, kao što je prethodno navedeno, za razliku od komercijalnih rezina neophodno je podesiti optimalne procesne parametre za svaku formuluaciju pojedinačno, kako bi se postiglo adekvatno prijanjanje tableta za radnu ploču štampanja i izbjegle

značajne varijacije u dimenzijama tableta a time posljedično i sadržaju ljekovite supstance. Stoga će, za implementaciju ovog koncepta u apotekama ili laboratorijama za štampanje lijekova, biti potrebno modifikovati i prilagoditi postojeće štampače, i naravno ispitati bezbjednost polimera i fotoinicijatora koji imaju svojstvo polimerizacije prilikom izlaganja svjetlosti određene talasne dužine.

#### **3.2.5.2 Izgled, masa, dimenzije tableta i sadržaj atomoksetina**

Sve izrađene tablete su bile glatke površine i uniformnog oblika, u skladu sa zadatim 3D modelima (Slika 35). Tablete su čuvane pod ambijentalnim uslovima i tokom stajanja nisu pokazivale znake promjena u konzistenciji i obliku.



**Slika 35.** DLP izrađene tablete sa 15% atomoksetina, prečnika 8 mm i debljine 2 mm

Izmjerena masa i dimenzije tableta (prečnik i debljina), te sadržaj atomoksetina koji je određen u svim izrađenim formulacijama, prikazani su u Tabeli 7.



**Tabela 7.** Izmjerena masa, prečnik, debljina i sadržaj atomoksetina (srednja vrijednost  $\pm$  SD)

<b>Formulacija</b>	<b>Masa (mg)</b>	<b>Prečnik (mm)</b>	<b>Debljina (mm)</b>	<b>Sadržaj API (mg)</b>
D5-1.00	35.01 $\pm$ 2.90	7.88 $\pm$ 0.22	0.92 $\pm$ 0.10	2.06 $\pm$ 0.04
D5-1.25	54.30 $\pm$ 8.80	7.97 $\pm$ 0.07	1.25 $\pm$ 0.04	2.44 $\pm$ 0.05
D5-1.50	70.50 $\pm$ 5.40	8.02 $\pm$ 0.04	1.48 $\pm$ 0.03	3.14 $\pm$ 0.01
D5-1.75	84.93 $\pm$ 6.50	8.05 $\pm$ 0.06	1.75 $\pm$ 0.02	4.15 $\pm$ 0.20
D5-2.00	110.38 $\pm$ 14.80	8.22 $\pm$ 0.38	1.90 $\pm$ 0.20	4.62 $\pm$ 0.15
D5-3.00	215.80 $\pm$ 15.60	8.62 $\pm$ 0.32	2.93 $\pm$ 0.09	7.76 $\pm$ 0.20
D7.50-2.50	116.22 $\pm$ 6.10	8.14 $\pm$ 0.21	2.43 $\pm$ 0.04	7.16 $\pm$ 0.02
D10-1.00	45.12 $\pm$ 2.00	7.96 $\pm$ 0.11	0.98 $\pm$ 0.03	3.71 $\pm$ 0.03
D10-1.25	65.57 $\pm$ 8.03	8.03 $\pm$ 0.04	1.25 $\pm$ 0.06	5.06 $\pm$ 0.05
D10-1.50	85.97 $\pm$ 10.20	8.10 $\pm$ 0.09	1.50 $\pm$ 0.02	6.41 $\pm$ 0.09
D10-2.00	94.35 $\pm$ 5.80	8.08 $\pm$ 0.10	1.96 $\pm$ 0.08	7.18 $\pm$ 0.06
D10-3.00	188.15 $\pm$ 15.6	8.21 $\pm$ 0.12	2.92 $\pm$ 0.15	12.84 $\pm$ 0.50
D12.50-1.50	78.89 $\pm$ 7.20	8.29 $\pm$ 0.24	1.44 $\pm$ 0.06	8.47 $\pm$ 0.40
D15-0.75	40.11 $\pm$ 6.40	8.04 $\pm$ 0.07	0.77 $\pm$ 0.03	5.20 $\pm$ 0.03
D15-1.00	49.89 $\pm$ 8.10	8.11 $\pm$ 0.11	1.02 $\pm$ 0.09	6.37 $\pm$ 0.03
D15-1.50	95.39 $\pm$ 9.20	8.33 $\pm$ 0.17	1.48 $\pm$ 0.04	11.72 $\pm$ 0.03
D15-2.00	111.84 $\pm$ 14.60	8.30 $\pm$ 0.19	1.96 $\pm$ 0.10	15.15 $\pm$ 0.80
D15-3.00	207.53 $\pm$ 29.20	8.87 $\pm$ 0.31	2.95 $\pm$ 0.08	33.16 $\pm$ 0.75
D20-0.75	48.10 $\pm$ 5.40	8.22 $\pm$ 0.17	0.78 $\pm$ 0.03	8.10 $\pm$ 0.50
D20-1.00	54.29 $\pm$ 5.10	8.02 $\pm$ 0.06	1.01 $\pm$ 0.04	9.05 $\pm$ 0.74
D20-1.50	110.14 $\pm$ 6.80	8.47 $\pm$ 0.09	1.51 $\pm$ 0.06	18.14 $\pm$ 0.23
D20-2.00	118.03 $\pm$ 10.60	8.40 $\pm$ 0.33	1.95 $\pm$ 0.08	21.20 $\pm$ 0.58
D20-3.00	214.35 $\pm$ 18.20	9.02 $\pm$ 0.26	2.94 $\pm$ 0.09	37.48 $\pm$ 1.41

Kako se vidi iz priloženih podataka, najmanja količina ljekovite supstance inkorporirana u izrađene tablete iznosila je 2 mg, što je ukazalo na potencijal primjene ove tehnike u

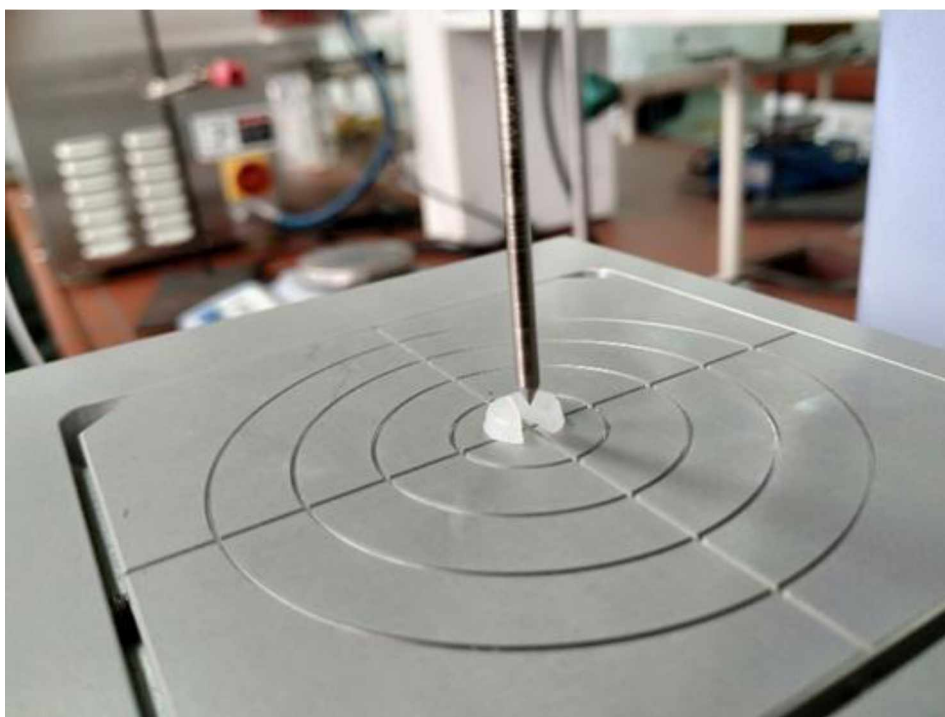
izradi niskodoziranih lijekova. Većina studija koje su imale za cilj da pokažu pogodnost različitih tehnika 3D štampe u izradi farmaceutskih oblika sprovedene su sa klinički irelevantnim količinama lijekovitih supstanci. U istraživanju sprovedenom u okviru ove faze doktorske disertacije, uz variranje debljine tableta i udjela lijekovite supstance u fotoreaktivnim smješama, uspješno su izrađene serije tableta sa sadržajem atomoksetina koji je u okviru njegovog terapijskog opsega. Time je pružen dodatni dokaz nesumnjivom potencijalu primjene DLP tehnike u individualizaciji terapije kroz izradu tableta sa različitim sadržajem lijekovite supstance, što omogućava prilagođavanje doze potrebama konkretnog pacijenta uzimanjem izrađenih tableta pojedinačno ili u kombinaciji.

U istraživanju Bracken i saradnika koje je sprovedeno kod djece uzrasta od 4 do 12 godina, tablete prečnika 8 mm ocijenjene su kao tablete najprihvatljivije veličine; pored toga, kao drugi najvažniji faktor, ukoliko bi morali da uzimaju tablete svakog dana, pacijenti su ocijenili njihov ukus (144). Uzimajući u obzir da su veličina i ukus tableta ključni za mogućnost i voljnost djece da ih progutaju, male tablete koje se mogu izraditi pomoću DLP štampača, a koje sadrže dio potrebne doze, mogu biti potencijalno rješenje za poboljšanje prihvatljivosti i postizanje adekvatnog doziranja. Pitanje maskiranja neprijatnog ukusa može se prevazići putem dodavanja supstanci koje maskiraju ukus ili prirodnih zaslađivača poput manitola, a čija pogodnost za DLP štampu je prethodno već pokazana u istraživanju Krkobabić i saradnika (143).

Iz Tabele 7. se uočava veće variranje u prečniku tableta nego u njihovoj debljini u odnosu na dizajnirani 3D model, naročito sa povećanjem udjela atomoksetina u formulacijama. Ovakvi rezultati se mogu objasniti većom količinom suspendovanih čestica i fenomenom rasipanja svjetlosti iz svjetlosnog izvora (139). Takođe, primjetno je veće variranje u prečniku kod tableta debljine 2 mm i 3 mm u odnosu na dizajnirani 3D model, što se može pripisati dužem vremenu ekspozicije potrebnom za uspješno štampanje. Dakle, produženje vremena ekspozicije ima uticaj na dimenzije tableta, zbog čega je bitno koristiti najkraće vrijeme ekspozicije koje omogućava očvršćavanje i uspješno štampanje kako bi se uticaj na dimenzije tablete sveo na najmanju moguću mjeru i time izbjeglo variranje doze.

### 3.2.5.3 Određivanje mehaničkih karakteristika DLP tableta - test penetracije

S obzirom da do sada nisu objavljene smjernice za procjenu kvaliteta 3D štampanih lijekova i da određene tradicionalne metode nisu u potpunosti pogodne za njihovu kontrolu kvaliteta zbog razlika u konzistenciji i čvrstini u odnosu na konvencionalne čvrste farmaceutske oblike, alternativne, adaptirane metode se moraju razviti kako bi se ispitale i optimizovale 3D štampane tablete. Budući da je odnos PEGDA i PEG 400 bio isti u svim izrađenim formulacijama, da je sadržaj vode i fotoinicijatora bio konstantan te da su sve tablete izrađene primjenom istih procesnih parametara, uređaj EZ-LX Compact Table-Top Testing Machine (Slika 36.) je primijenjen sa ciljem određivanja sile penetracije koja odražava mehanička svojstva tableta, kako bi se ispitao potencijalni uticaj udjela ljekovite supstance na čvrstinu izrađenih tableta.



**Slika 36.** Određivanje mehaničkih osobina izrađenih DLP tableta na uređaju EZ-LX Compact Table-Top Testing Machine

U literaturi nije opisano da je test penetracije korišten u karakterizaciji tableta dobijenih fotopolimerizacionim tehnikama. Za razliku od problema do kojih dolazi pri pokušaju ispitivanja na konvencionalnom uređaju za ispitivanje čvrstine, prilikom izvođenja testa

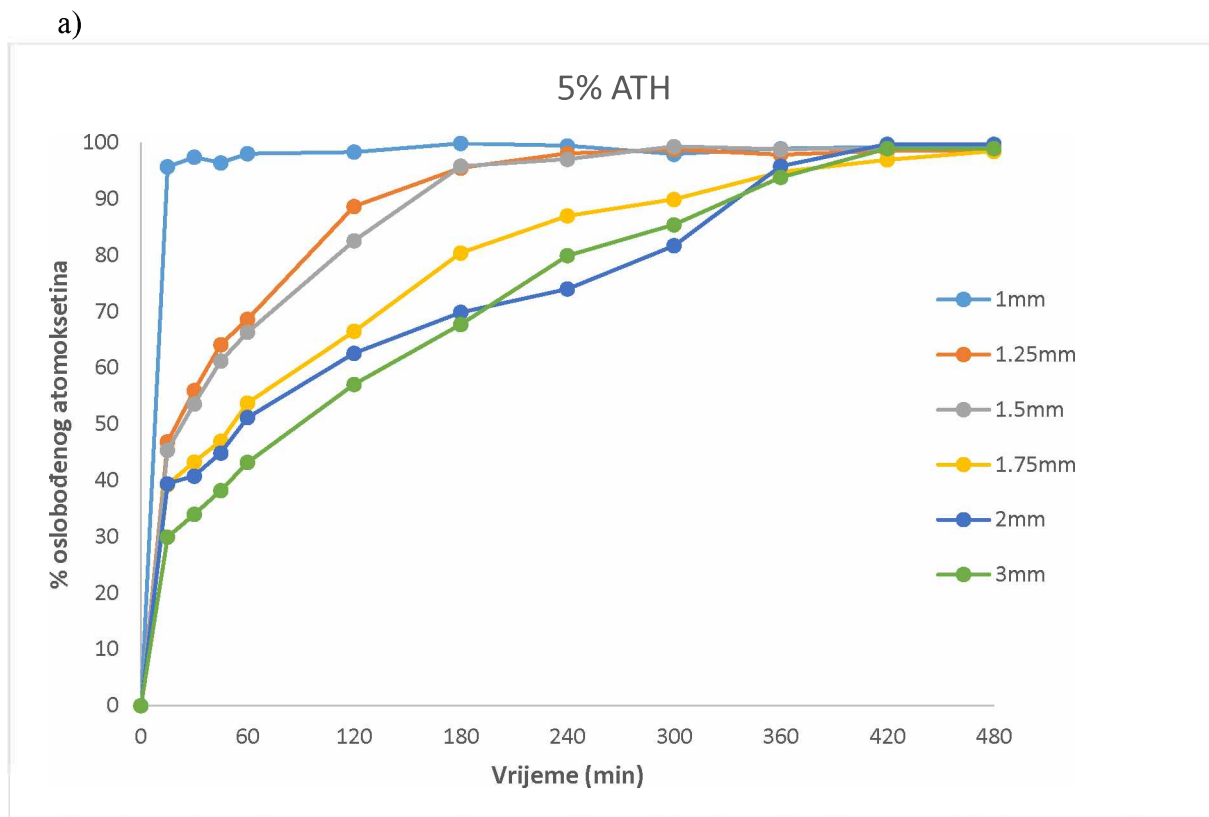
penetracije DLP tablete su stabilne na radnoj ploči i ne dolazi do njihovog savijanja, tako da se registrovanjem ostvarene sile pri penetraciji igle može dobiti uvid u mehaničke osobine ovih tableta. Stoga se za ovaj test može reći da je pogodan za karakterizaciju tableta izrađenih fotopolimerizacionim tehnikama. Rezultati analize su prikazani u Tabeli 8. Uočava se da povećanje udjela atomoksetina kao i povećanje debljine tableta zahtijeva veću silu da iglena sonda penetrira u tabletu, jasno ukazujući na doprinos ljekovite supstance mehaničkim osobinama izrađenih tableta. Ukoliko se uzme u obzir da je čvrstina tableta jedna od karakteristika koje mogu da utiču na brzinu oslobađanja ljekovite supstance, uticaj navedenih faktora dalje je ispitan *in vitro* ispitivanjem brzine rastvaranja atomoksetina iz tableta.

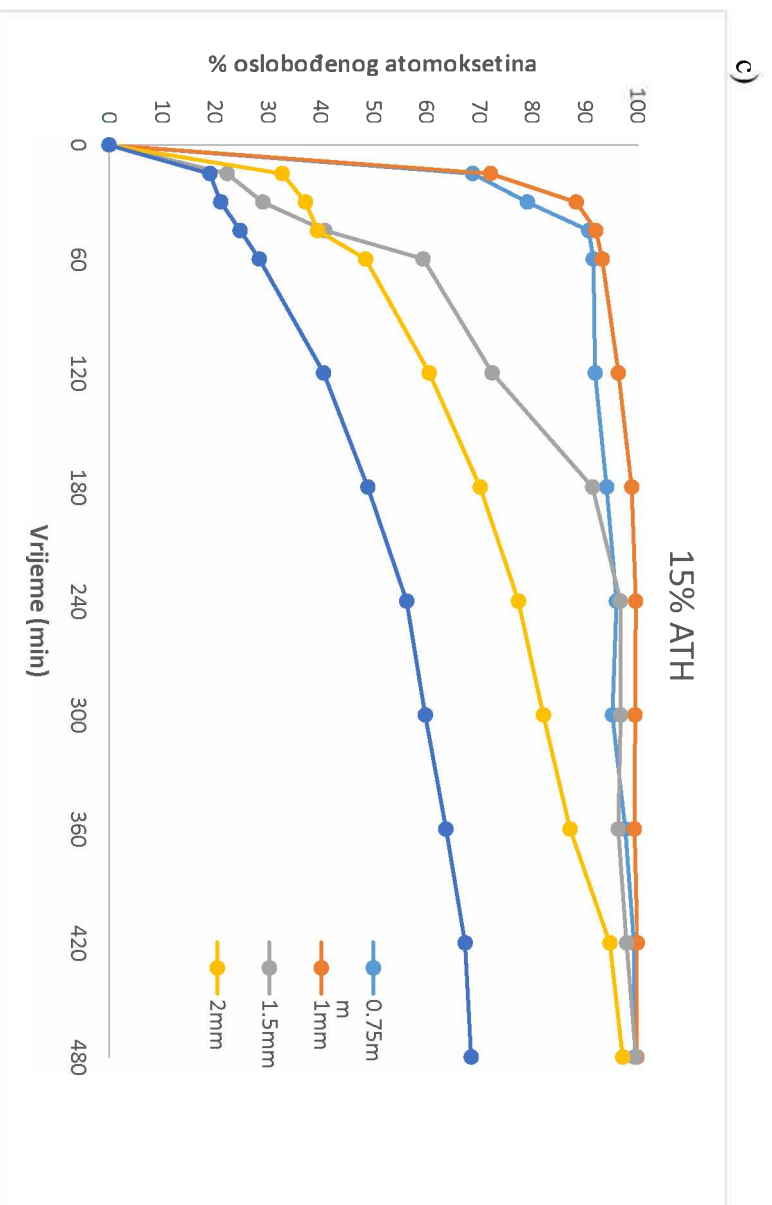
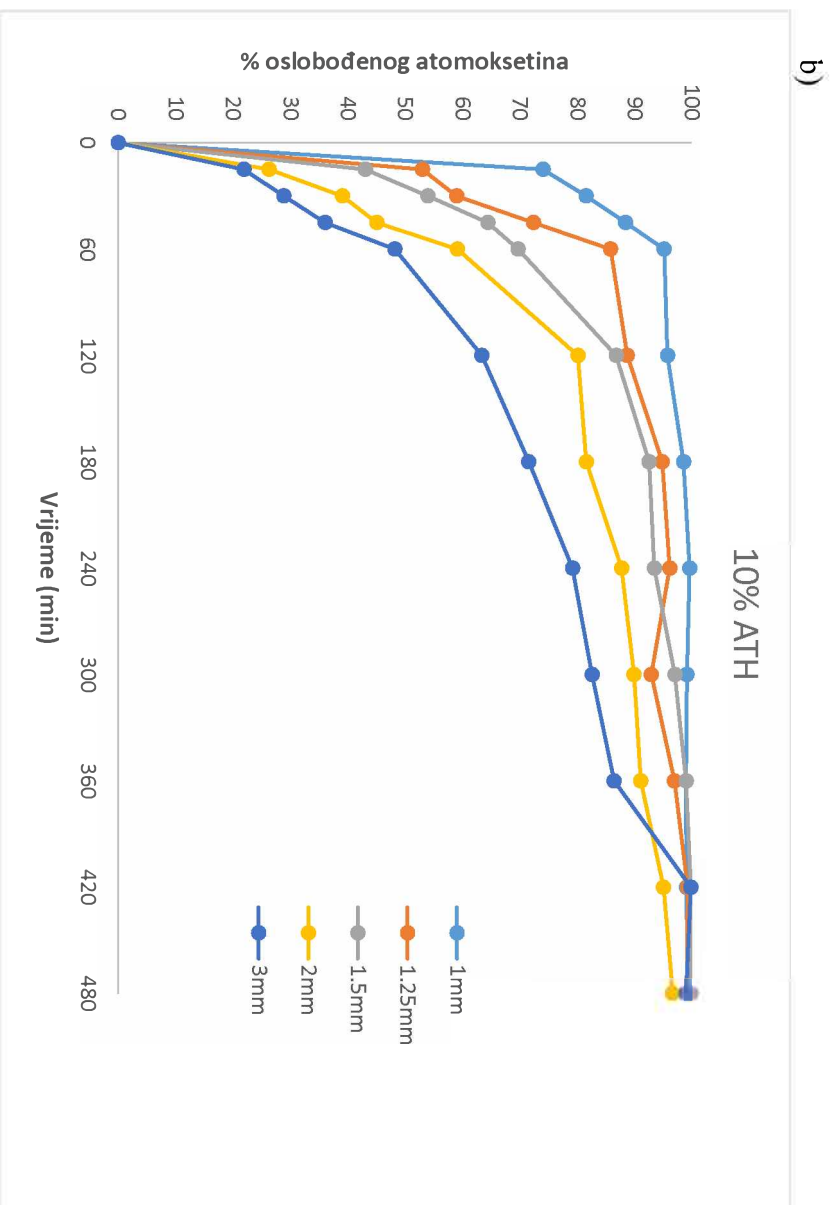
**Tabela 8.** Izmjerena sila penetracije u izrađenim DLP tabletama (srednja vrijednost  $\pm$  SD)

Udio atomoksetina	Debljina tableta	Sila (N)
5%	1.00	1.49 $\pm$ 0.05
	2.00	2.98 $\pm$ 0.12
	3.00	6.00 $\pm$ 0.17
10%	1.00	1.81 $\pm$ 0.07
	2.00	3.35 $\pm$ 0.22
	3.00	7.40 $\pm$ 0.09
15%	1.00	2.27 $\pm$ 0.01
	2.00	5.58 $\pm$ 0.05
	3.00	11.82 $\pm$ 0.25
20%	1.00	3.26 $\pm$ 0.03
	2.00	7.14 $\pm$ 0.08
	3.00	13.55 $\pm$ 0.30

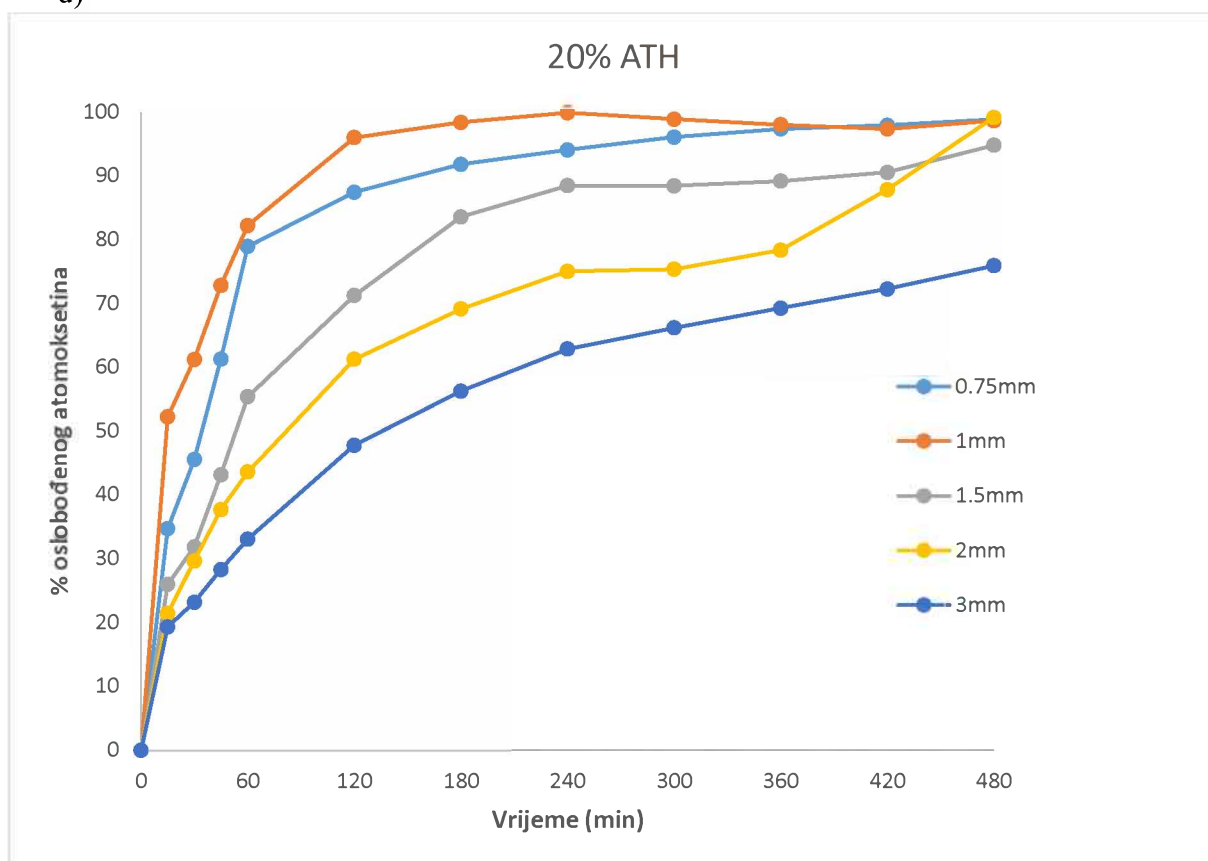
#### 3.2.5.4 Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina iz DLP tableta

Slično kao i u prvoj fazi eksperimentalnog rada, odnosno prethodno publikovanim istraživanjima (139, 142) izrađene DLP tablete su ostale intaktne nakon ispitivanja brzine rastvaranja, bez znakova erozije ili raspadanja. Profili brzine rastvaranja atomoksetina za sve izrađene formulacije prikazani su na Slici 37.





d)



**Slika 37.** Profili brzine oslobađanja atomoksetina iz izrađenih DLP tableta sa: a) 5%; b) 10%; c) 15% i d) 20% atomoksetina

Prema poglavlju 5.17.1. *Recommendation on dissolution testing* Evropske farmakopeje izdanje 11.0, u pogledu definisanja specifikacijskog zahtjeva za farmaceutske oblike sa konvencionalnim profilima oslobađanja ljekovite supstance, kriterijum prihvatljivosti na nivou S1 jeste da je najmanje 80% aktivne supstance oslobođeno u definisanom vremenu, uobičajeno za 45 minuta ili manje. Rezultati ispitivanja brzine oslobađanja atomoksetina iz izrađenih tableta pokazali su da je više od 80% atomoksetina oslobođeno u roku od 45 minuta iz tableta debljine 1 mm sa udjelom ljekovite supstance od 5%, 10% i 15% kao i iz tableta debljine 0.75 mm koje su sadržale 15% atomoksetina. Nije poznato da su do sada primjenom fotopolimerizacionih tehnika izrađene tablete sa trenutnim oslobađanjem ljekovite supstance. U prvom istraživanju kojim je dokazana pogodnost SLA tehnike u izradi oralnih farmaceutskih oblika, dobijene su tablete sa modifikovanim oslobađanjem ljekovite supstance (56). Wang i saradnici pokazali su da veći sadržaj PEGDA usporava

oslobađanje zbog većeg unakrsnog povezivanja monomera i sporije difuzije ljekovite supstance iz polimernog matriksa. U cilju modifikovanja i poboljšanja oslobađanja ljekovite supstance iz tableta dobijenih fotopolimerizacionim tehnikama istraživači su dodavali različite ekscipijense poput vode (59), manitola i natrijum hlorida (143). Osim toga, pokazalo se da je brzinu oslobađanja moguće kontrolisati kroz promjenu geometrijskog oblika tableta ili pravljenje perforacija na tabletama, sa ciljem povećanja odnosa površina/zapremina (139, 145). Mogućnost izrade farmaceutskih oblika sa trenutnim oslobađanjem pomoću DLP 3D tehnike koja je prikazana u ovom istraživanju je jako značajna, zato što je za optimalni terapijski efekat neophodno oslobađanje ljekovite supstance u odgovarajućem vremenskom intervalu. Osim toga, različita klinička stanja zahtijevaju primjenu lijekova sa različitim profilima oslobađanja. U literaturi nije opisano poređenje između konvencionalnih metoda proizvodnje farmaceutskih oblika sa trenutnim oslobađanjem u pogledu efikasnosti oslobađanja ljekovite supstance. Međutim, prednost tehnika 3D štampe je u tome što je moguće izraditi filmove i tablete različitih debljina veoma precizno i brzo.

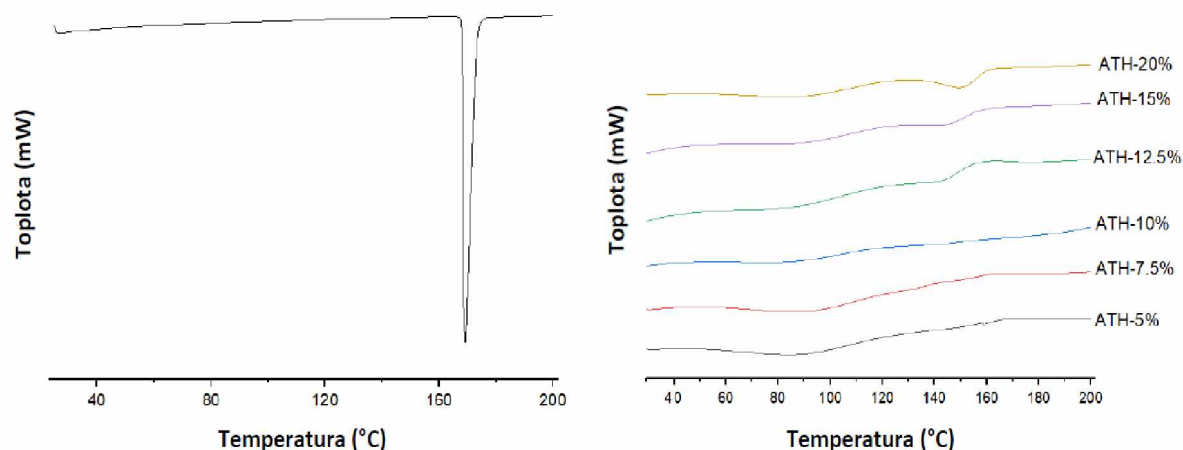
Ostale izrađene tablete su pokazale produženo oslobađanje pri čemu potpuno oslobađanje ljekovite supstance u roku od 8 h nije postignuto iz tableta debljine 3 mm koje su sadržale 15% i 20% atomoksetina, iz kojih se oslobodilo 68.42%, odnosno 72.29% atomoksetina. U navedenim slučajevima sporije oslobađanje lijeka može se objasniti dužim vremenom ekspozicije kojem su tablete bile izložene tokom štampanja, što je dovelo do intenzivnijeg uklapanja lijeka u polimerni matriks i veće čvrstine ovih tableta, kao što je prethodno prikazano. Predstavljeni rezultati ukazuju na uticaj koji dimenzije i mehaničke karakteristike imaju na brzinu oslobađanja lijeka iz izrađenih tableta.

### **3.2.5.5 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija**

DSC analiza atomoksetina i izrađenih tableta urađena je sa ciljem da se ispita da li je ljekovita supstanca dispergovana ili rastvorena u polimernom matriksu. Na DSC termogramu atomoksetina uočava se oštar endotermni pik na temperaturi od 169°C koji odgovara topljenju kristala ljekovite supstance. Na termogramima sprasanih tableta se ne uočava ovaj karakterističan endotermni pik atomoksetina ali se može primijetiti široka



endoterma između 140°C i 160°C tokom zagrijavanja formulacija koje sadrže više od 12.5% atomoksetina (Slika 38).

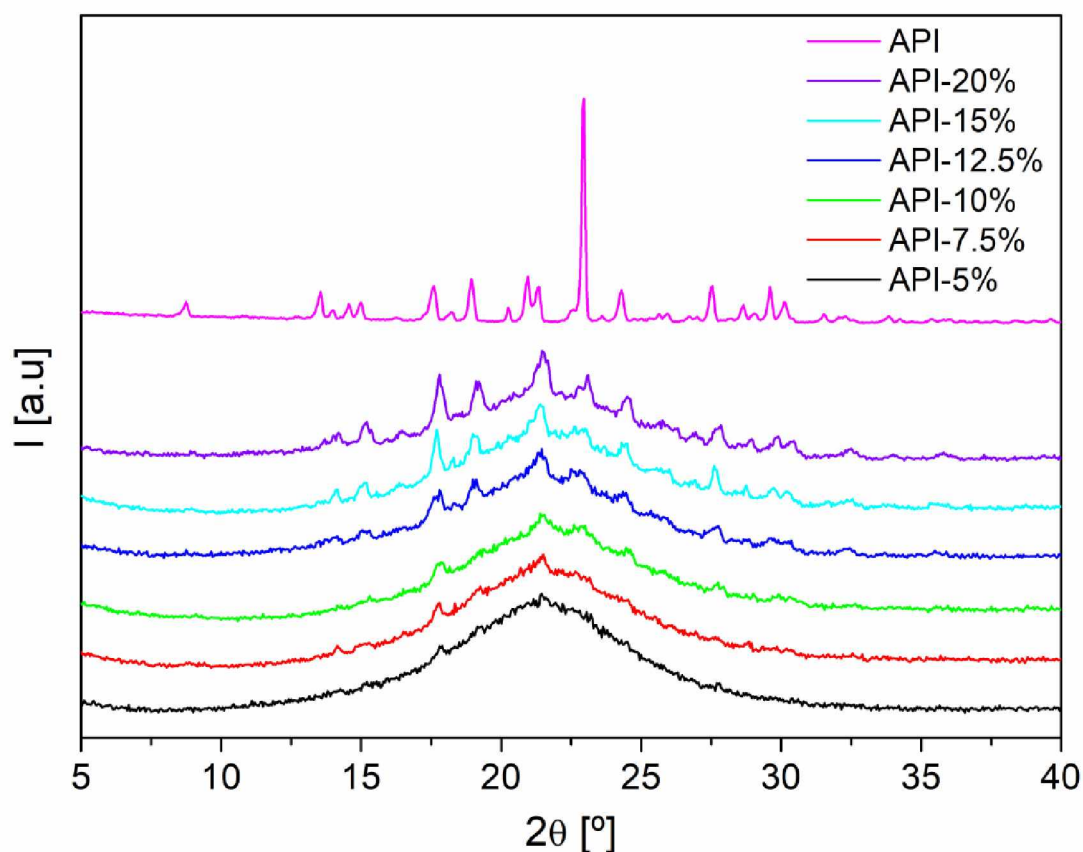


**Slika 38.** DSC termogrami atomoksetina prije štampanja (lijevo) i DLP 3D tableta sa različitim udjelom atomoksetina (desno)

Ove endoterme teško je uočiti na termogramima formulacija sa nižim sadržajem atomoksetina. Odsustvo karakterističnog pika atomoksetina može ukazati na to da je atomoksetin dispergovan u amorfnom obliku ili da je rastvoren unutar polimernog matriksa. Međutim, iako se diferencijalna skenirajuća kalorimetrija često koristi za procjenu fizičkog stanja u kojem se nalazi ljekovita supstanca u formulacijama, rezultati ove analize ipak u određenim slučajevima mogu navesti na pogrešan zaključak. Sam način izvođenja diferencijalne skenirajuće kalorimetrije uz primjenu povišene temperature može dovesti do promjene fizičkog stanja ljekovite supstance i do pogrešnih zaključaka o fizičkom stanju ljekovite supstance u ispitivanim formulacijama na sobnoj temperaturi. Uzorci su stoga dalje analizirani metodom difrakcije X-zraka na prašku i polarizacionom svjetlosnom mikroskopijom.

### 3.2.5.6 Difrakcija X-zraka na prašku

Na difraktogramu atomoksetina se mogu uočiti karakteristični pikovi visokog intenziteta na  $17.6^\circ$ ,  $18.2^\circ$ ,  $18.9^\circ$ ,  $21.3^\circ$ ,  $23^\circ$ ,  $24.3^\circ$  i  $27.5^\circ$   $2\theta$  (Slika 39). Na osnovu položaja karakterističnih pikova, difraktogram atomoksetina odgovara u literaturi opisanom difraktogramu kristalnog oblika ove supstance (146). Na difraktogramima izrađenih DLP tableta uočava se prisustvo pikova karakterističnih za kristalni oblik atomoksetina kod formulacija kod kojih je sadržaj atomoksetina 12.5% i više. Međutim, kod formulacija koje sadrže manje od 12.5% ljekovite supstance došlo je do širenja pikova atomoksetina što ukazuje na to da je došlo do smanjenja udjela kristalne forme supstance. Ipak, na  $17.6^\circ$   $2\theta$  prisutan je pik na difraktogramima formulacija koje sadrže 5%, 7.5% i 10% atomoksetina, dok se dodatno na difraktogramima tableta koje sadrže 7.5% i 10% atomoksetina na  $21.3^\circ$   $2\theta$  može uočiti karakterističan pik atomoksetina. Navedeni rezultati pokazuju da je ljekovita supstanca prisutna u kristalnom obliku u svim izrađenim formulacijama, sa određenim smanjenjem udjela kristalne forme kod formulacija koje sadrže manje od 12.5% atomoksetina. Ovo je takođe potvrđeno kroz rezultate mikroskopskih posmatranja, što je diskutovano u narednom poglavlju.



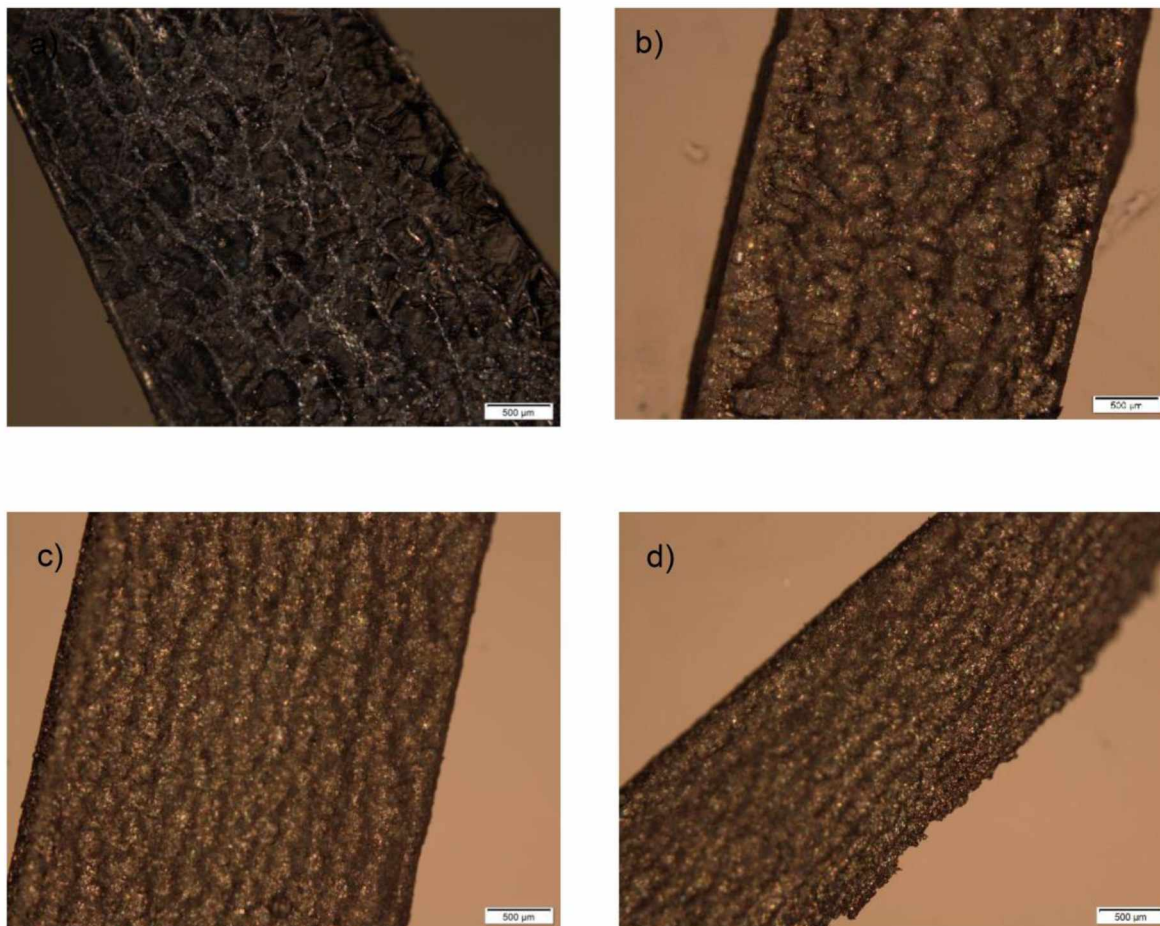
**Slika 39.** Difraktogrami atomoksetina i izrađenih DLP tableta sa različim udjelom lijekovite supstance

U publikovanim istraživanjima iz oblasti SLA i DLP tehnika 3D štampe u kojima je korišćen PAGDA, sledeće aktivne supstance su u PEGDA matriksu bile prisutne u amorfnom obliku: paracetamol i 4-aminosalicilna kiselina (56); atenolol, hidrohloriazid i amlodipin (111); acetilsalicilna kiselina, naproksen i hloramfenikol (110), dok su prednizolon i kofein u PEGDA matriksu bili prisutni u kristalnom obliku, što je opisano u radu Martinez i saradnika (110).

### 3.2.5.7 Polarizaciona svjetlosna mikroskopija

Tehnika polarizacione svjetlosne mikroskopije je upotrijebljena za identifikaciju kristala kao i za posmatranje poprečnog presjeka unutrašnje strukture izrađenih DLP tableta prije i posle izvođenja testa ispitivanja brzine oslobađanja atomoksetina iz tableta.

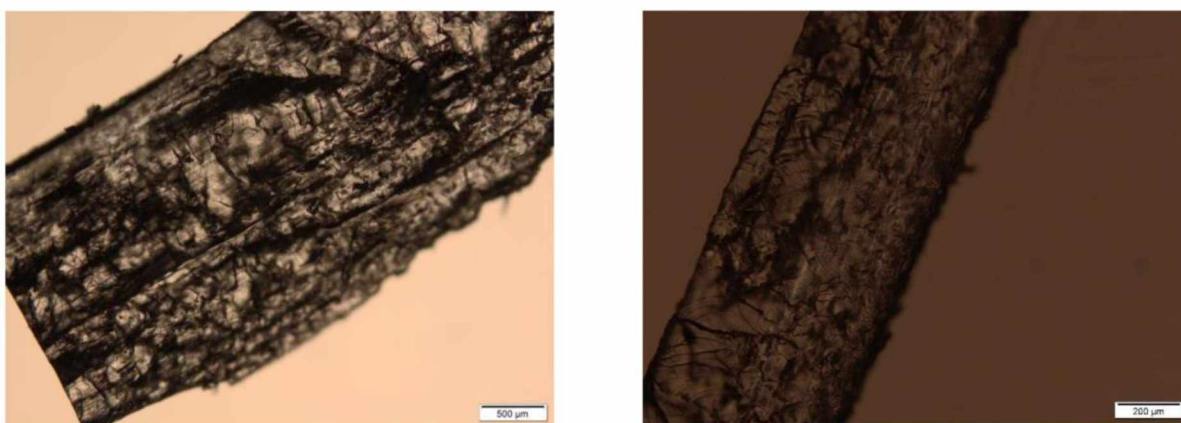
Kao što se vidi na Slici 40., kristali su prisutni na poprečnom presjeku izrađenih tableta sa različitim udjelom atomoksetina (5% - 20%).



**Slika 40.** Poprečni presjek izrađenih DLP tableta koje sadrže: a) 5%; b) 10%; c) 15%; d) 20% atomoksetina, prije ispitivanja brzine oslobađanja atomoksetina iz tableta

Prikazane slike predstavljaju dodatni dokaz da atomoksetin ostaje u tabletama u kristalnom obliku nakon procesa štampanja. Još jedno značajno zapažanje jeste da je distribucija ljekovite supstance unutar polimernog matriksa homogena i ujednačena, čime se sprječava pojava tzv. *dose dumping* fenomena, kod koga relativno velika količina ljekovite supstance kod formulacija sa kontrolisanim oslobađanjem biva naglo oslobođena, što dovodi do dospijevanja potencijalno toksičnih količina ljekovite supstance u sistemsku cirkulaciju. Ovo je naročito opasno kod supstanci snažnog djelovanja, koje imaju uzak terapijski indeks.

Na poprečnom presjeku izrađenih DLP tableta se ne uočavaju paralelni slojevi zbog prisustva kristala ljekovite supstance i fotoinicijatora koji ih pokrivaju. Sa druge strane, na fotomikrografijama poprečnog presjeka tableta nakon ispitivanja brzine oslobađanja ljekovite supstance, u određenim djelovima je moguće uočiti slojeve, kao i pukotine i kanale kroz koje je ljekovita supstanca oslobođena difuzijom (Slika 41). Nakon sprovedenog ispitivanja brzine oslobađanja, tablete su zadržale oblik ali je njihova veličina smanjena, što je dodatni dokaz da je do oslobađanja atomoksetina došlo kroz proces difuzije.

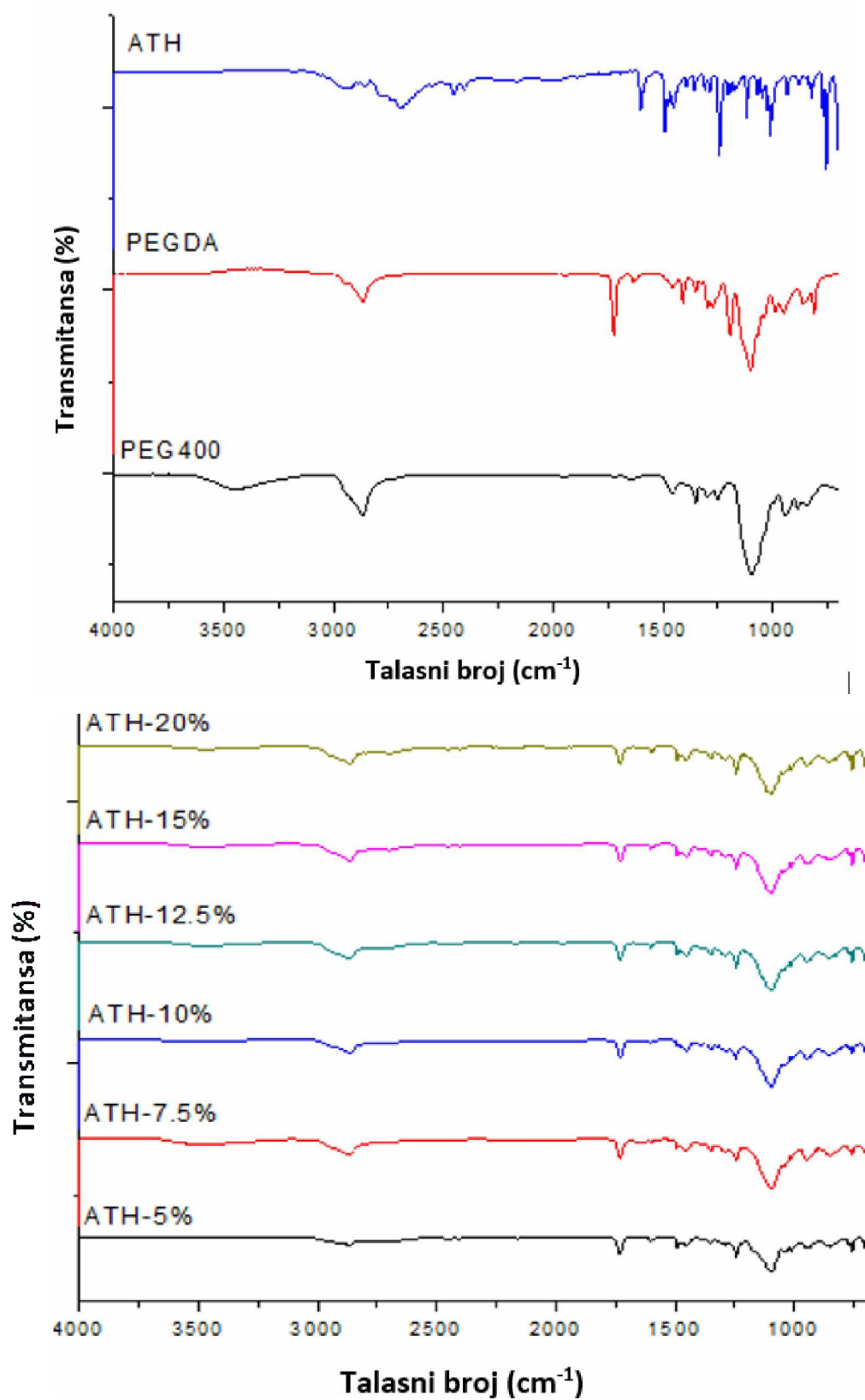


**Slika 41.** Poprečni presjek izrađenih DLP tableta koje sadrže 5% atomoksetina nakon sprovedenog ispitivanja brzine oslobađanja

#### **3.2.5.8 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)**

Intermolekulske interakcije između ljekovite supstance i komponenti matriksa predstavljaju značajan faktor koji utiče na stabilnost dobijenih formulacija i fizičko stanje ljekovite supstance u istim. Primjenom FT-IR spektroskopije, pojava intermolekulskih interakcija se može detektovati na osnovu pomjeranja frekvencija na kojima dolazi do apsorpcije infracrvenog zračenja od strane funkcionalnih grupa prisutnih u ispitivanim molekulima.

FT-IR spektroskopska analiza je primijenjena sa ciljem ispitivanja kompatibilnosti ljekovite supstance i polimera koji su korišteni za formulaciju DLP tableta. FT-IR spektri polaznih materijala (atomoksetin, PEGDA i PEG 400) i izrađenih DLP tableta prikazani su na Slici 42.



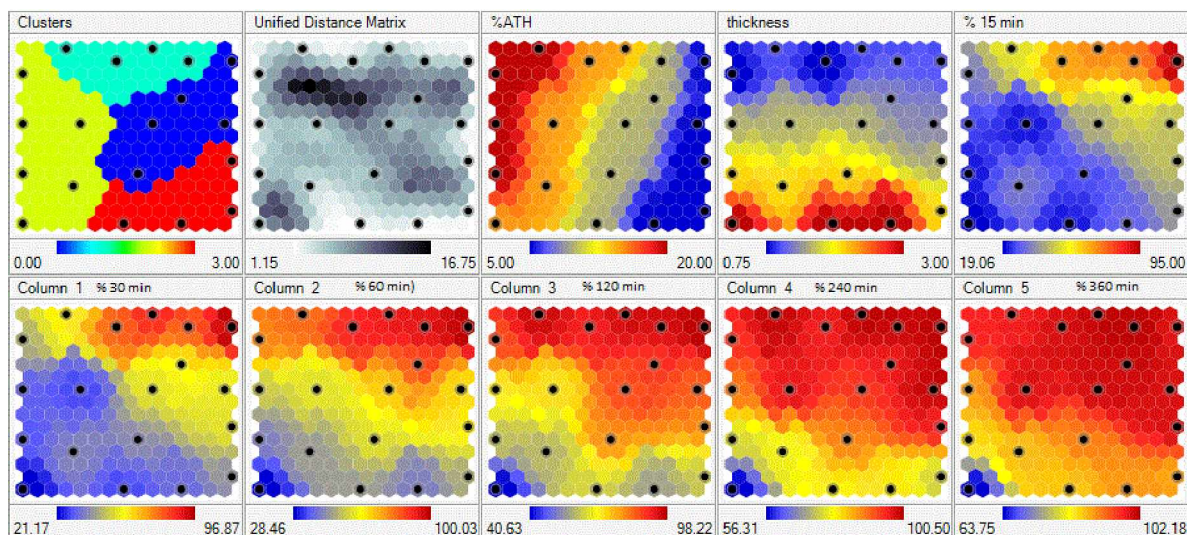
**Slika 42.** FT-IR spektri čistog atomoksetina, pomoćnih supstanci (PEGDA i PEG 400) i izrađenih DLP tableta sa različitim udjelom atomoksetina

Na FT-IR spektru PEG 400 mogu se uočiti karakteristične apsorpcione trake na  $3445\text{ cm}^{-1}$  (O-H istezanje),  $2866\text{ cm}^{-1}$  (C-H istezanje) i  $1096\text{ cm}^{-1}$  (istezanje etarske C-O-C grupe); sličan položaj apsorpcionih traka je opisan u literaturi (143). Apсорpcione trake na  $2866\text{ cm}^{-1}$  i  $1096\text{ cm}^{-1}$  su takođe prisutne na spektrima izrađenih tableta. FT-IR spektar PEGDA prije štampanja i polimerizacije pokazuje karakteristične apsorpcione trake na  $2866\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>3</sub> istezanje),  $1721\text{ cm}^{-1}$  (C=O istezanje) i  $1636\text{ cm}^{-1}$  (istezanje akrilatne C=C grupe) (62, 139). Nakon procesa fotopolimerizacije, nije moguće uočiti traku koja potiče od akrilata na  $1636\text{ cm}^{-1}$  usljed konverzije C=C u C-C veze (147). Svi karakteristični pikovi atomoksetina se mogu uočiti na istim frekvencijama i na FT-IR spektrima čistog atomoksetina i na FT-IR spektrima izrađenih tableta. Budući da nije došlo do pomjeranja karakterističnih pikova, isključena je pojava intermolekulskih interakcija između ljekovite supstance i komponenti matriksa u izrađenim tabletama.

#### **3.2.5.9 Modelovanje vještačkih neuronskih mreža**

Podaci iz ukupno 23 eksperimenta su upotrijebljeni za treniranje, tj. obuku samoorganizujuće mape (SOM) pomoću Kohonenovog pravila, sa brzinom učenja od 0.5. Na Slici 43. prikazane su SOM nakon treniranja. Sve ulazne i izlazne vrijednosti prikazane su kao posebni regioni (mape). Mapa je sastavljena od šestougaoih ćelija, gdje svaka ćelija predstavlja čvor SOM. Čvor je povezan sa onim podacima kojima je najbliži.





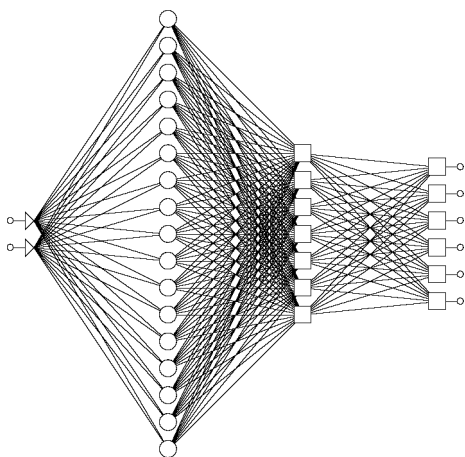
**Slika 43.** Samoorganizujuće mape podataka o brzini oslobađanja atomoksetina; crne tačke predstavljaju osobine istih čvorova

Setovi podataka iz sprovedenih eksperimenata koji su upotrijebljeni za treniranje SOM su prikazani kao crne tačke na mapi. Distribucija podataka kroz region se može lako vizuelizovati na mapama, dok nam skala boje promjenljive pruža informacije o klasterovanju podataka. Primjera radi, crna tačka koja se nalazi u gornjem desnom uglu mapa predstavlja eksperimentalne podatke dobijene od formulacija sa najnižim sadržajem atomoksetina (plavi klaster), sa tabletama debljine 0.75 mm. Za ovaj eksperimentalni set podataka, najveća je brzina oslobađanja ljekovite supstance nakon 15 minuta (crveni klaster u gornjem desnom uglu mape odgovara brzini oslobađanja ljekovite supstance nakon 15 minuta).

Sledeća faza u modelovanju bila je razvoj vještačke neuronske mreže koja bi imala sposobnost da opiše uticaj debljine tableta i sadržaja ljekovite supstance na brzinu oslobađanja atomoksetina iz izrađenih DLP tableta. Setovi podataka iz ukupno 23 eksperimenata su podijeljeni na setove podataka za trening (17), validaciju (4) i testiranje mreže (2). Trenirana je Generalizovana regresiona neuronska mreža (GRNM) (Slika 44). GRNM je imala četiri sloja: ulazni sloj, sloj radijalnih centara, sloj regresionih jedinica i izlazni sloj. Sloj radijalnih jedinica predstavlja centar klastera poznatih podataka za trening mreže. Ovaj sloj je treniran pomoću *K-means* algoritma. Maksimalan broj neurona u ovom sloju jednak je broju setova za trening. Tokom treninga, broj neurona u



drugom sloju je variran i najniža RMS vrijednost za trening i validacioni set podataka je dobijena sa 17 jedinica u drugom sloju. Treći, regresioni sloj ima jednu jedinicu više nego izlazni sloj (7). Regresioni i izlazni sloj su trenirani izuzetno brzo uz pomoć specijalizovanog algoritma (tzv. divizioni algoritam).

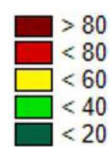
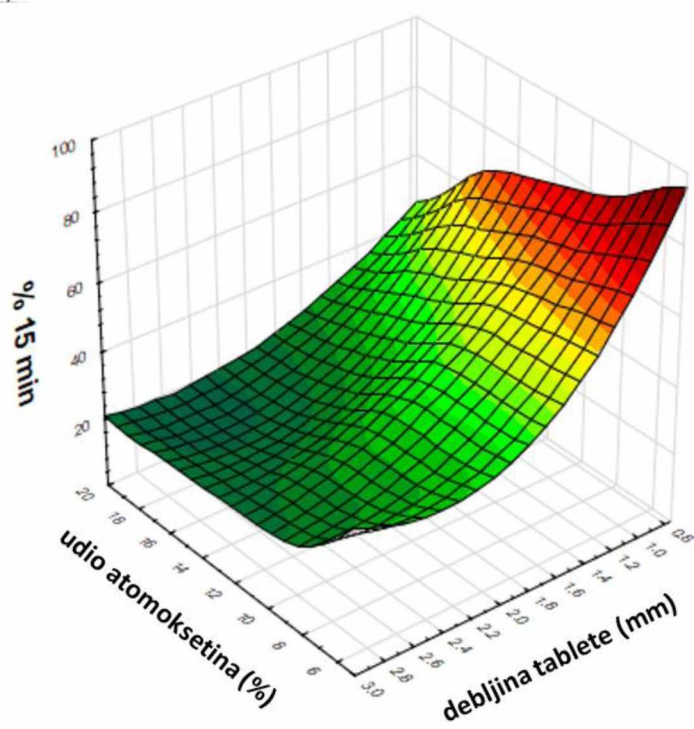


**Slika 44.** Šematski prikaz upotrijebljene GRNM mreže

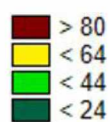
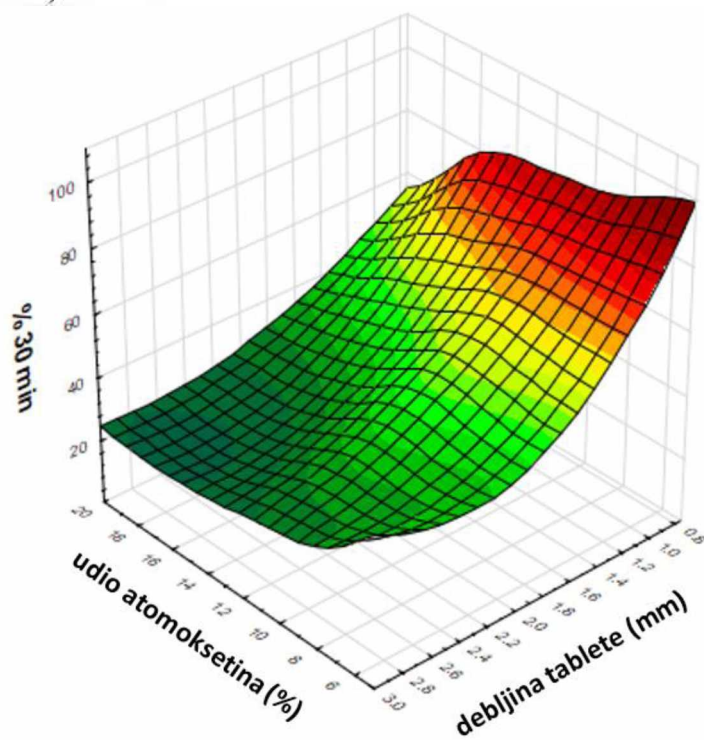
Nakon treninga, vrijednosti RMS greške su iznosile 0.126 za trening set podataka, 0.040 za validacioni set podataka i 0.035 za test set podataka.

Vrijednosti površine odgovora predviđene pomoću GRNM, a koje predstavljaju izlaze (Y1-Y6 procenat oslobođene ljekovite supstance u predefinisanim vremenskim intervalima) u funkciji debljine tableta i sadržaja ljekovite supstance, prikazane su na Slici 45 (a-f). Prikazane površine odgovora jasno pokazuju predviđanje oslobađanja ljekovite supstance od strane GRNM, u funkciji debljine tableta i sadržaja ljekovite supstance.

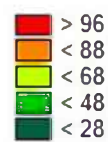
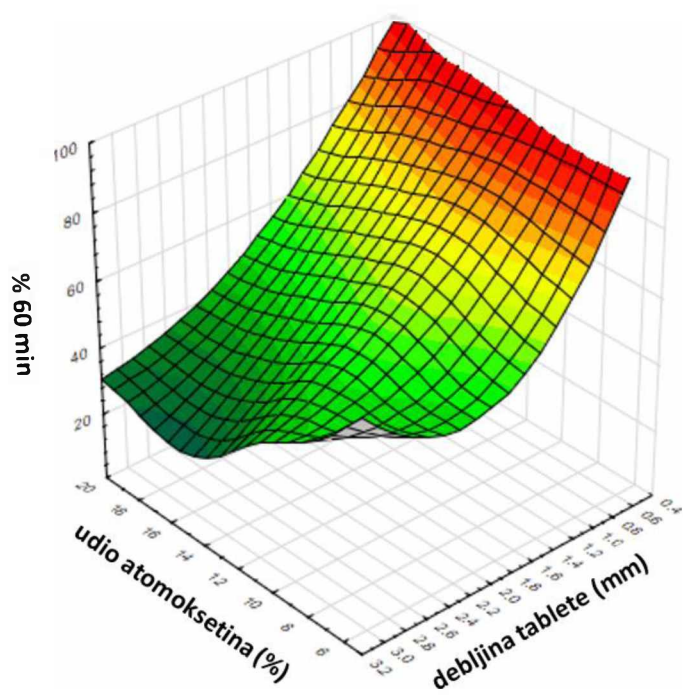
a)



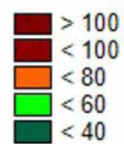
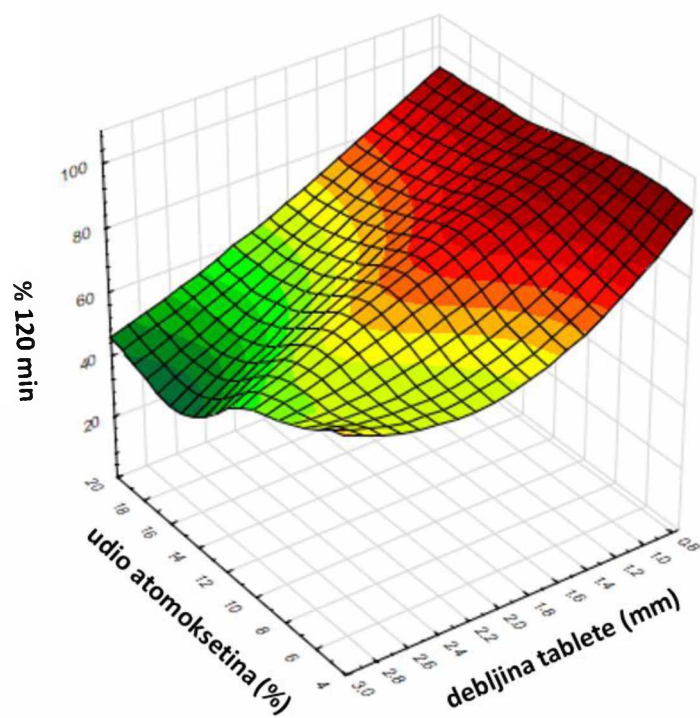
b)



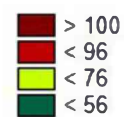
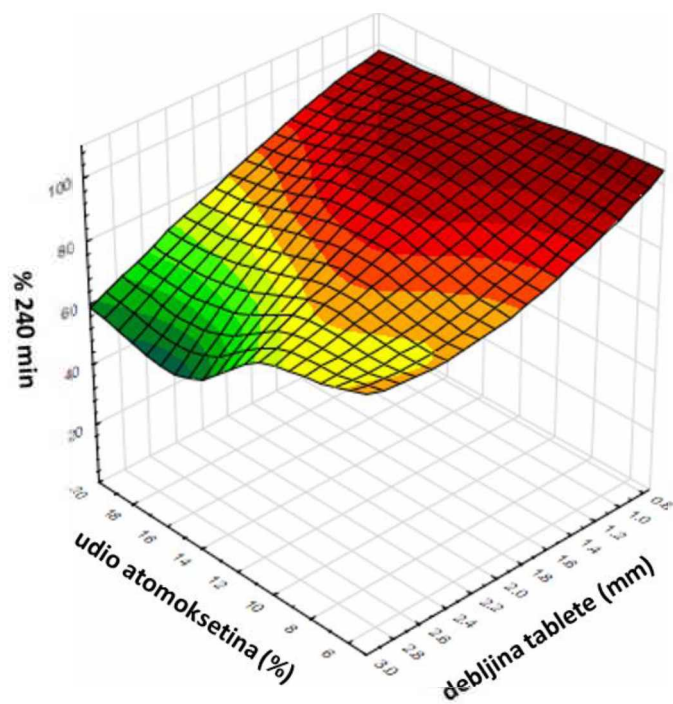
c)



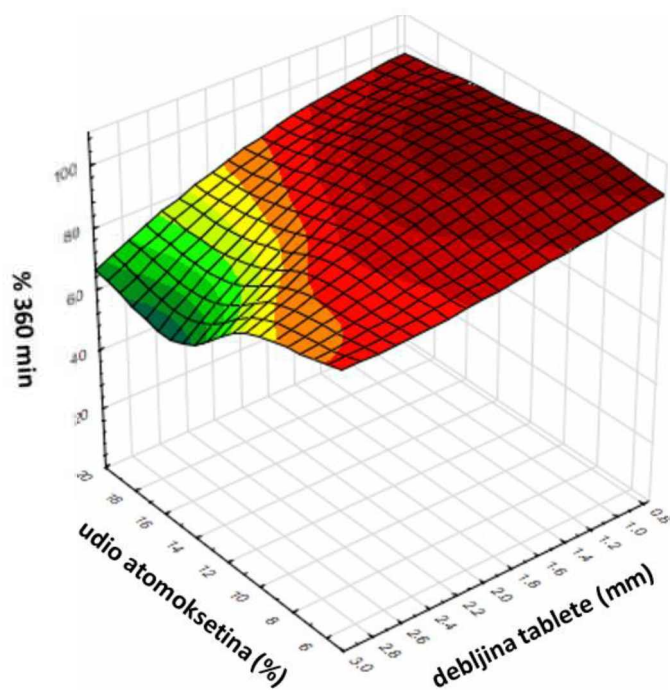
d)



e)



f)



**Slika 45.** Površine odgovora, koje predstavljaju izlaze (Y1-Y6 % oslobođene ljekovite supstance u predefinisanim vremenskim intervalima) u funkciji sadržaja ljekovite supstance (% atomoksetina) i debljine izrađenih DLP tableta

Dodatno, za dvije test formulacije, podaci o profilima brzine oslobađanja atomoksetina dobijeni eksperimentalnim putem, upoređeni su sa predviđenim vrijednostima koje su dobijene primjenom neuronskih mreža. Sposobnost predviđanja je analizirana izračunavanjem faktora sličnosti ( $f_2$ ). Faktor sličnosti se računa prema sledećoj jednačini:

$$f_2 = 50 \times \log_{10} \left[ \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2}{n}}} \right]$$

$n$  - broj tačaka u kojima se vrši mjerenje količine oslobođenog atomoksetina

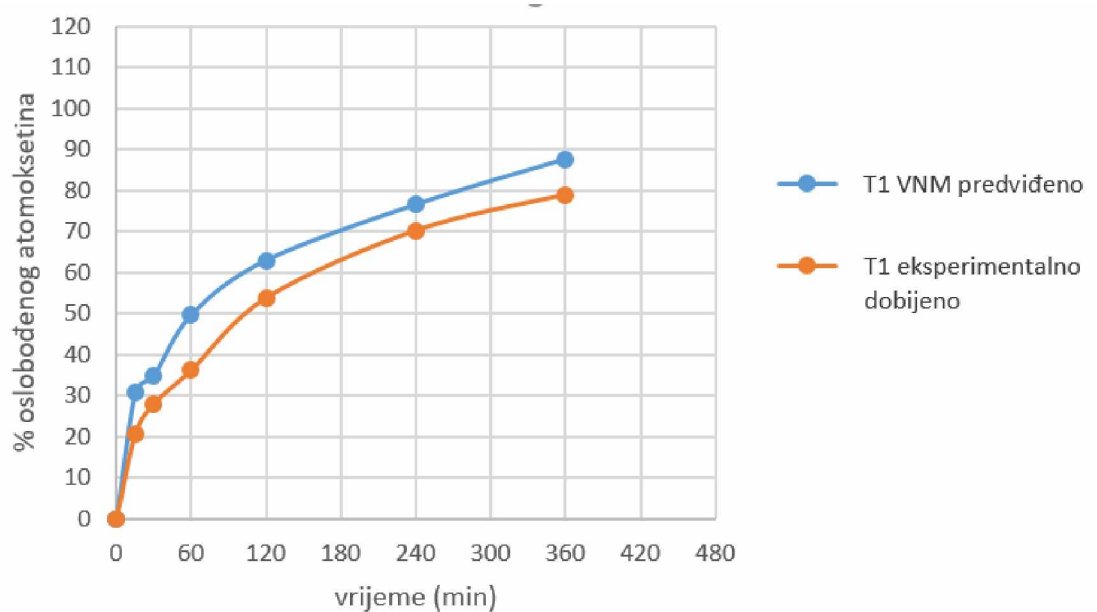
$R_t$  - procenat oslobođenog atomoksetina u određenom vremenskom periodu  $t$

$T_t$  - predviđeni procenat oslobođenog atomoksetina u određenom vremenskom periodu  $t$

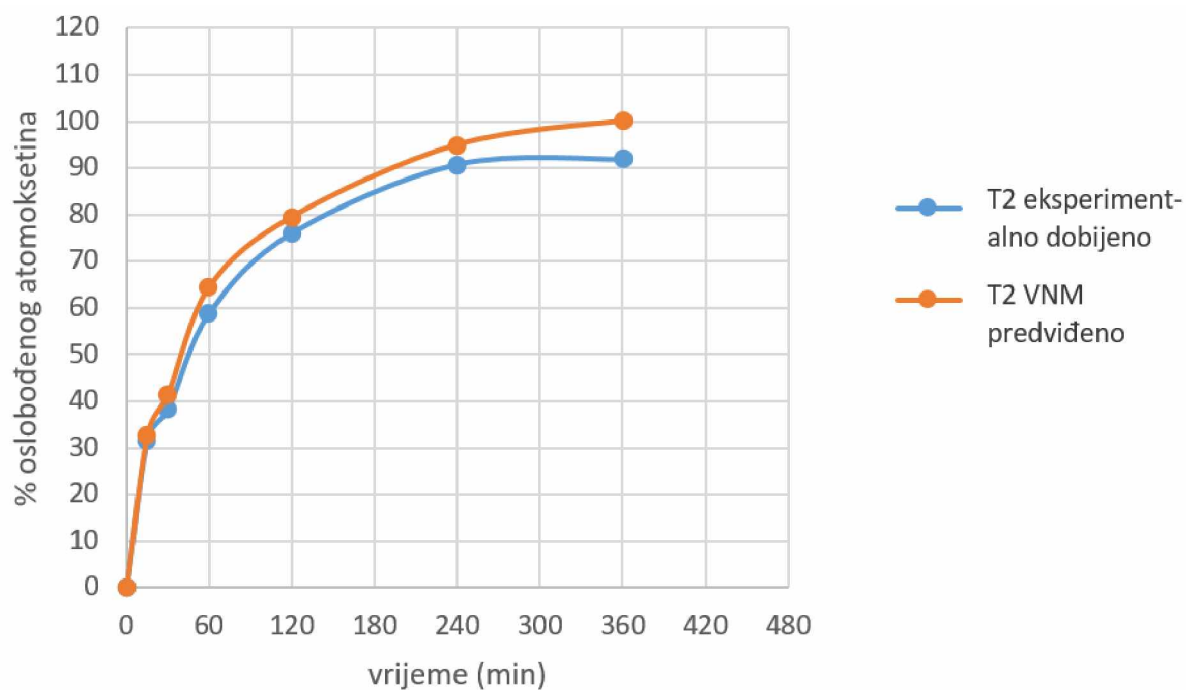
Ukoliko je izračunati faktor sličnosti za eksperimentalne rezultate i rezultate koje je predvidio model veći od 50, zaključak je da su profili slični (148).

Na Slici 46. prikazani su profili brzine oslobađanja atomoksetina dobijeni eksperimentalnim putem i profili koji su predviđeni primjenom vještačkih neuronskih mreža za test formulacije T1 i T2. Na osnovu izračunatih vrijednosti faktora sličnosti koje su iznosile 51.05, odnosno 70.13, zaključeno je da su predviđeni profili disolucije slični onima koji su dobijeni eksperimentalnim putem.

a)



b)



**Slika 46.** Eksperimentalno dobijeni i GRNM predviđeni profili brzine oslobađanja atomoksetina iz formulacija: a) T1 i b) T2

Dobijeni rezultati pokazali su sposobnost treniranih GRNM da predvide profile brzine oslobađanja atomoksetina u okviru definisanih parametara formulacije a to su: debljina tablete između 0.75 i 3.00 mm i udio ljekovite supstance između 5% i 20%.

Dodatno, u okviru definisanih parametara, adekvatnim izborom debljine tablete i sadržaja lijeka, moguće je postići kako trenutno tako i produženo oslobađanje atomoksetina, uz korišćenje iste formulacije i parametara procesa štampanja.

Zbog velikog potencijala vještačkih neuronskih mreža, korist od njihove primjene u formulaciji tableta tehnikama 3D štampe može biti velika i stoga je potrebno temeljno istražiti. Naime, zbog postojanja velikog broja procesnih parametara i faktora formulacije i njihove raznovrsnosti, njihov uticaj na osobine tableta može se opsežno ispitati primjenom ove tehnike vještačke inteligencije. Zbog svoje sposobnosti da pruže razumijevanje odnosa ulaznih i izlaznih parametara, pa prema tome i da pruže bolji uvid u uticaj koji faktori formulacije i procesni parametri imaju na osobine izrađenih tableta, vještačke neuronske mreže mogu biti korisne u optimizaciji procesa formulisanja i štampanja tableta u skladu sa individualnim potrebama pacijenata.

### **3.3 OPTIMIZACIJA IZRADE TABLETA ATOMOKSETINA SLS TEHNIKOM; POREĐENJE TABLETA DOBIJENIH SLS TEHNIKOM SA TABLETAMA IZRAĐENIM DIREKTNOM KOMPRESIJOM POMOĆU SIMULATORA KOMPAKCIJE**

U trećoj fazi istraživanja korištena je SLS tehnika 3D štampe za izradu tableta. Cilj ove faze bio je da se ispita mogućnost izrade tableta atomoksetina pomoću SLS tehnike, i pronalaženje optimalnog sastava formulacije i parametara procesa štampanja koji će omogućiti dobijanje tableta zadovoljavajućih mehaničkih karakteristika. Nakon inicijalnog ispitivanja same mogućnosti dobijanja tableta uz primjenu različitih sredstava za dopunjavanje, izdvojila se formulacija sa kojom su nastavljena ispitivanja. Dalje je vršeno variranje parametra brzine lasera, kako bi se ispitao uticaj ovog parametra na uspješnost štampanja, i kako bi se optimizovao proces štampanja. Potom je sprovedena fizičko-hemijska i farmaceutsko-tehnološka karakterizacija izrađenih SLS tableta. Konačno, primjenom simulatora kompakcije izrađene su tablete istog sastava i njihove mehaničke karakteristike kao i profili brzine oslobađanja ljekovite supstance su upoređeni sa karakteristikama tableta dobijenim SLS tehnikom, u cilju donošenja zaključka o mogućnosti međusobne zamjenljivosti ova dva procesa, od kojih je jedan namijenjen proizvodnji malih prilagođenih serija lijeka, a drugi industrijskoj proizvodnji velikih razmjera.

#### **3.3.1 Materijali**

Kao model ljekovita supstanca korišten je atomoksetin hidrohlorid (Ph. Eur. 11.0, Hemofarm AD Vršac, Srbija), dok je za poboljšanje apsorpcije energije lasera upotrijebljen Candurin® Gold Sheen (Merck, Njemačka). Štampanje formulacija, uz variranje procesnih parametara, isprobano je sa sledećim komponentama matriksa:

- ✓ manitol Parreck® M 200 (Merck, Njemačka);
- ✓ Kollidon® VA 64 Fine (vinilpirolidon-vinil acetat kopolimer, BASF, Njemačka)
- ✓ hidroksipropilmetilceluloza, HPMC (Vivapharm® E3, JRS Pharma, Njemačka);
- ✓ natrijum stearil fumarat (Merck, Njemačka);
- ✓ kroskarmeloza natrijum (Sigma-Aldrich, Njemačka),

te direktno kompresibilnim, koprocesovanim ekscipijensima:



- ✓ MicroceLac<sup>®</sup> 100 (Meggler, Njemačka) koji sadrži 75% laktoze monohidrat i 25% mikrokristalne celuloze;
- ✓ Retalac<sup>®</sup> (Meggler, Njemačka) koji sadrži 50% laktoze monohidrat i 50% HPMC i
- ✓ Starlac<sup>®</sup> (Meggler, Njemačka) koji sadrži 85% laktoze monohidrat i 15% kukuruznog skroba.

### **3.3.2 Priprema smješe za izradu tableta**

Udio atomoksetina u svim formulacijama bio je isti i iznosio je 10%, dok je u skladu sa podacima iz literature, svakoj formulaciji dodato po 3% Candurin<sup>®</sup> Gold Sheen, kako bi se poboljšala apsorpcije energije lasera i time poboljšala printabilnost. Sastavi formulacija sa kojima je isprobana SLS štampa tableta atomoksetina, vrijednosti procesnih parametara kao i uspješnost štampe prikazani su u Tabeli 9. Sve formulacije su pripremljene na način što je izmjereno 100 g smješe ljekovite supstance i ekscipijenasa, nakon čega je smješa izmiješana u mješaču za praškove (Farmalabor, Italija) u trajanju od 10 minuta, pri brzini od 60 obrtaja/min.

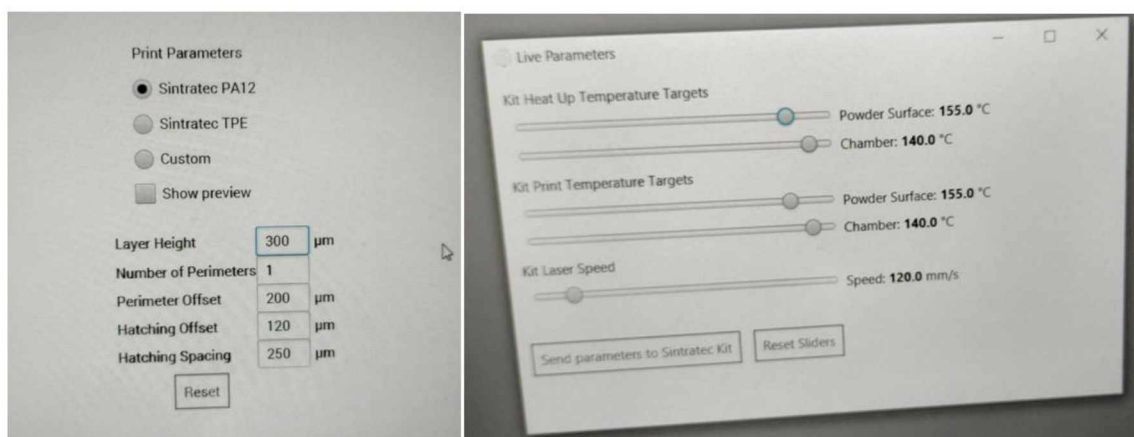
### **3.3.3 Izrada tableta primjenom SLS tehnike**

3D modeli tableta dimenzija 8mm x 3mm i 6mm x 3mm, dizajnirani su u Autodesk Fusion 360 softveru (Autodesk Inc., SAD). Zatim je kreirani 3D model tablete u .STL formatu importovan u softver Sintratec Central (Sintratec, Švajcarska). Za proces štampanja korišten je štampač Sintratec Kit (Sintratec, Švajcarska) (Slika 47).



**Slika 47.** Sintratec Kit (Sintratec, Švajcarska) 3D štampač pomoću kod su izrađene SLS 3D štampane tablete atomoksetina

Bilo je neophodno izvršiti tehničku modifikaciju rezervoara i komore štampača, kako bi se Sintratec Kit SLS štampač prilagodio štampanju tableta. Da bi se smanjila potrebna količina smješe za štampanje, suženi su komora i rezervoar štampača. Za svaki ciklus štampanja korišteno je po 100 g pripremljene smješe. Parametri štampanja su kontrolisani pomoću Sintratec Central softvera (Slika 48).



**Slika 48.** Podešavanje parametara za SLS štampu u Sintratec Central softveru

Za pripremljene formulacije, inicijalno je izvršeno testiranje štampanja tako što su primijenjeni različiti procesni uslovi, odnosno različita temperatura površine praška i temperatura komore, kao i različita brzine lasera, nakon čega su definisani parametri i formulacije kojima je ostvareno uspješno štampanje. Uslovi štampanja varirani su na način prikazan u Tabeli 9. Vrijednost *Heach spacing* je postavljena na 250 µm, dok je debljina jednog sloja držana konstantnom na 100 µm. U skladu sa podacima dostupnim u literaturi, da bi se obezbijedio adekvatan prenos smješe iz rezervoara u komoru za štampanje, temperatura komore je podešena da bude nekoliko stepeni ispod temperature površine (124).

### 3.3.4 Izrada tableta primjenom simulatora kompakcije

Izrada tableta pomoću simulatora kompakcije sprovedena je sa formulacijom koja se, u pogledu uspješnosti štampe i karakteristika dobijenih tableta, izdvojila nakon inicijalnih eksperimenata u kojima je isprobana SLS štampa tableta uz primjenu različitih sredstava za dopunjavanje i variranjem različitih procesnih uslova. Smješa za tabletiranje je komprimovana pomoću simulatora kompakcije Gamlen (Gamlen Tabletting, Velika Britanija) u tablete okruglog oblika, prečnika 6 mm i mase 100 mg. Brzina kompakcije je bila konstantna (60 mm/min). Smješa za tabletiranje je komprimovana koristeći pritisak kompakcije od 300 MPa.

### 3.3.5 Ispitivanje osobina izrađenih tableta

#### 3.3.5.1 Određivanje fizičkih i mehaničkih karakteristika

Po 10 pojedinačnih tableta odmjereno je na analitičkoj vagi (Kern & Sohn, Njemačka). Digitalnim noniusom (Vogel Germany GmbH & Co. KG, Kevelaer, Njemačka) izmjereni su debljina i prečnik na po 10 tableta svake formulacije izrađene pomoću SLS štampača. Otpornost tableta na lomljenje ( $n=10$ ) je ispitana na uređaju za ispitivanje čvrstine tableta Erweka TBH 125D (Erweka, Njemačka) (Slika 49), tako što je mjerena sila koja dovodi do lomljenja ispitivane tablete. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost svih mjerenja sa standardnom devijacijom.



**Slika 49.** Određivanje čvrstine izrađenih SLS tableta na Erweka TBH 125D uređaju

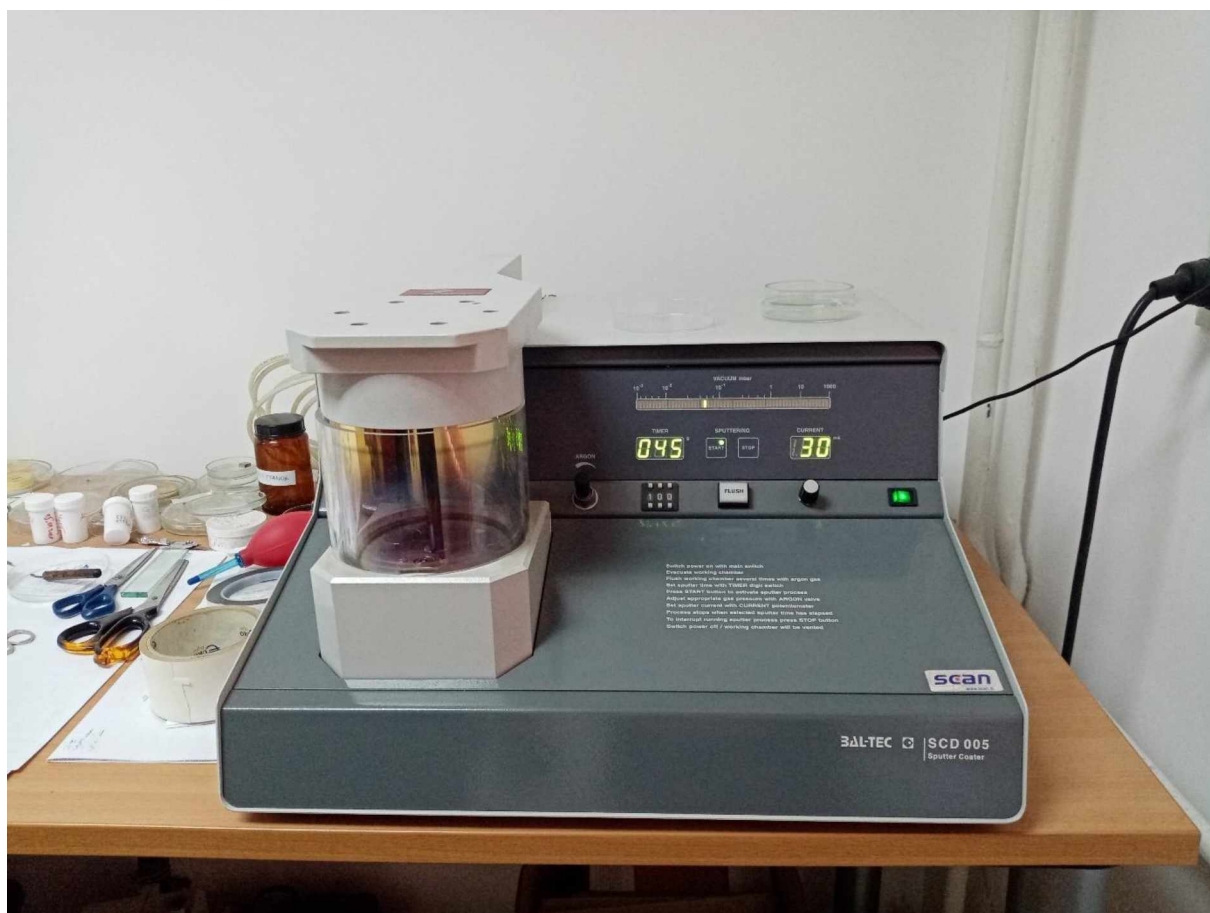
#### 3.3.5.2 Živina porozimetrija

Metoda živine porozimetrije se primjenjuje za određivanje poroznosti i raspodjele veličine pora po prečnicima za makroporozne i mezoporozne čvrste materijale. Zasnovana je na principu utiskivanja žive u pore pod dejstvom pritiska. Najvažnije veličine koje se određuju ovom metodom su: ukupna zapremina pora, specifična površina i poroznost. Mjerenja živine porozimetrije (Mercury Intrusion Porosimetry, MIP) su

sprovedena u automatizovanom konvencionalnom aparatu, Carlo Erba Porosimeter 2000 (Carlo Erba, Italija) koji radi u rasponu pritiska 0,1 - 200 MPa, što odgovara prečniku pora od 7,5 - 15000 nm. Podaci su obrađeni u Milestone Software 200 (Carlo Erba, Italija). Izvršena su dva uzastopna intruzio-ekstruziona testa za svaki uzorak (I i II). Uzorci su evakuisani tokom 2 h u dilatometru postavljenom u Macropores Unit 120.

### 3.3.5.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija

Primjenom skenirajuće elektronske mikroskopije ispitana je morfologija poprečnog presjeka tableta izrađenih pomoću SLS 3D štampača i Gamlenovog simulatora kompakcije. Uzorci su pripremljeni naparavanjem zlatom na 30 mA tokom 100 s primjenom uređaja BAL-TEC SCD 005 (Leica Microsystems, Njemačka) (Slika 50.) sa ciljem poboljšanja njihove provodljivosti tokom snimanja.



**Slika 50.** Priprema uzoraka tableta za SEM analizu na BAL-TEC SCD 005 uređaju

Mikrografije su izrađene primjenom skenirajućeg elektronskog mikroskopa JEOL JSM-6390LV (JEOL, Japan) (Slika 51.) na odgovarajućim uvećanjima.



**Slika 51.** JEOL JSM-6390LV uređaj na kome je vršena SEM analiza

#### **3.3.5.4 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)**

Radi otkrivanja potencijalno prisutnih intermolekulskih interakcija primijenjena je FT-IR spektroskopska analiza. FT-IR spektri pulverizovanih SLS tableta, čistog atomoksetina i pojedinačnih ekscipijenasa su snimljeni na Nicolet iS10 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) uređaju, opremljenom horizontalnim sistemom za pojedinačnu refleksiju zraka, ATR sistemom (Smart iTR, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) sa sočivom

od cink-selenida. Spektri ispitivanih uzoraka snimani su u intervalu od 4000 do 650  $\text{cm}^{-1}$ , sa rezolucijom od 2  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **3.3.5.5 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija**

Metoda diferencijalne skenirajuće kalorimetrije primijenjena je da bi se procijenilo fizičko stanje (kristalno ili amorfno) atomoksetina u pripremljenim fizičkim smješama i izrađenim SLS tabletama. Analiza je sprovedena na uređaju DSC1 (Mettler Toledo, Giessen, Njemačka). Odmjereni uzorci u količini 5 mg - 10 mg čistog atomoksetina i pulverizovanih SLS tableta u aluminijskoj posudi, podvrgnuti su zagrijavanju u temperaturnom intervalu između 25°C i 200°C, pri brzini promjene temperature od 10°C/min uz konstantan protok inertnog gasa azota od 50 ml/min. Vrijednosti temperature i energije su prethodno kalibrisane primjenom indijum standarda, dok je u svim analizama prazna aluminijska posuda korišćena kao referentna. Dobijeni podaci dalje su analizirani pomoću STARe softvera (verzija 12.10, Mettler, Toledo).

#### **3.3.5.6 Difrakcija X-zraka na prašku**

XRPD ispitivanja SLS tableta su vršena na Empyrean, Malvern Panalytical difraktometru (Slika 52.) na sobnoj temperaturi u Bragg-Brentano  $\theta$ -2 $\theta$  geometriji, uz korišćenje Cu-K $\alpha$  izvora zračenja sa nikl filterom. Uzorci su snimani u opsegu 2 $\theta$  uglova od 4 do 70°, sa veličinom koraka od 0,03° i vremenom zadržavanja od 58 s po koraku, pri naponu od 45 kV i jačini struje od 40 mA.



**Slika 52.** Empyrean, Malvern Panalytical difraktometar na kome je urađena XRPD analiza SLS tableta

### **3.3.5.7 Raspadljivost**

Analiza raspadljivosti urađena je na uređaju za ispitivanje raspadljivosti Erweka ZT 52 (Erweka, Njemačka) (Slika 53.) uz primjenu plastičnih diskova.





**Slika 53.** Ispitivanje raspadljivosti tableta na Erweka ZT 52 (Erweka, Njemačka) uređaju

Ispitivanje je vršeno u 800 ml prečišćene vode kao medijumu, zagrijane na  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Određivanje raspadljivosti tableta dobijenih SLS 3D štampom i na Gamlenovom simulatoru kompakcije je sprovedeno na po 6 tableta svake formulacije.

### **3.3.5.8 Određivanje sadržaja atomoksetina u tabletama**

Sadržaj atomoksetina u tabletama izrađenim pomoću SLS 3D štampača i na Gamlenovom simulatoru kompakcije određen je spektrofotometrijski na uređaju Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija), na talasnoj dužini od 270 nm. Za pripremu rastvora standarda, 10 mg atomoksetina rastvoreno je u 100 ml destilovane vode. Rastvor je promiješan na ultrazvučnom kupatilu Bandelin Sonorex RK102H (Sonorex-Bandelin, Njemačka) tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi, prohlađen i filtriran u hemijsku čašu. Za pripremu rastvora analize, po tri tablete od svake formulacije usitnjene su pomoću pistila u tarioniku. Masa koja odgovara prosječnoj masi tablete odmjerena je na analitičkoj vagi, prenijeta u normalni sud i dopunjena destilovanom vodom do 100 ml.

Uzorak je potom podvrgnut istoj proceduri kao i rastvor standarda. Metodom standarda iz rastvora poznate koncentracije, odnosno standardnog rastvora, dobijene su vrijednosti koncentracije atomoksetina u svim formulacijama.

#### **3.3.5.9 Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina**

Brzina oslobađanja atomoksetina iz SLS 3D i tableta izrađenih na Gamlenovom simulatoru kompakcije je ispitivana primjenom USP II aparature sa rotirajućom lopaticom Erweka DT600 (Erweka, Njemačka). Medijum za ispitivanje je bila destilovana voda zagrijana na temperaturu od  $37 \pm 0.5$  °C, zapremine 500 ml. Ispitivanje je sprovedeno pri brzini obrtaja lopatica od 50 rpm (obrtaja u minuti). Uzorkovano je po 5 ml medijuma u unaprijed definisanim vremenskim intervalima (15, 30, 45, 60 min), nakon čega su uzorci profiltrirani. Sadržaj atomoksetina je određen spektrofotometrijski na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije atomoksetina (270 nm) pomoću spektrofotometra Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija). Metodom standarda iz rastvora poznate koncentracije, odnosno standardnog rastvora, dobijene su vrijednosti koncentracije atomoksetina u svakoj vremenskoj tački. Ispitivanje je rađeno u triplikatu i vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost rastvorene ljekovite supstance (%) sa standardnom devijacijom.

### 3.3.6 REZULTATI I DISKUSIJA

#### 3.3.6.1 Izrada tableta primjenom SLS tehnike

U publikovanim istraživanjima uglavnom su dostupni podaci o primijenjenoj temperaturi tokom štampanja tableta, ali sam način odabira primijenjene temperature komore i praška nije opisan. Kod procesa štampanja SLS tehnikom, kao i kod ostalih tehnika 3D štampe, veliki izazov predstavlja pronalaženje i definisanje optimalnih parametara koji će dati uspješan proces štampanja. U literaturi su dostupni podaci da je poželjno da kod SLS tehnike temperatura praška bude najmanje 3°C do 4°C niža od temperature topljenja komponenti smješe ili da je bliska temperaturi staklastog prelaza (112). Osim toga, trebalo bi da temperatura komore bude ispod temperature površine praška (124). Prilikom izrade tableta sa atomoksetinom SLS tehnikom, uticaj parametara na uspješnost štampanja i izbor odgovarajuće formulacije i parametara štampe ispitani su metodom pokušaja i greške. Sastavi formulacija, vrijednosti primijenjenih procesnih parametara i uspješnost štampanja, prikazani su u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Uspješnost SLS štampe tableta pripremljenih od različitih komponenti smješe uz variranje procesnih parametara (temperatura komore, temperatura površine praška, brzina lasera)

Sastav formulacije	Dimenzije tableta (prečnik x debljina)	Temperatura komore (°C) / Temperatura površine (°C)	Brzina lasera (mm/s)	Uspješnost štampanja (+ / -)	Komentar
ATH 10% Candurin 3% Na-stearil fumarat 2% Kroskarmeloza-Na 2% Kollidon® 6% Starlac® 76%	8 x 3	120 / 130 120 / 130 120 / 135 130 / 140 130 / 145 140 / 150 140 / 150	100 150 100 100 150 100 150	- - - - - - -	U svim slučajevima primijenjeni parametri nisu dali uspješno štampanje, prilikom zagrijavanja i štampanja volumen smješe je rastao, pa valjak nije mogao da ravnomjerno nanese novi sloj praška preko prethodno štampanog sloja

ATH 10% Candurin 3% Na-stearil fumarat 2% Kroskarmeloza- Na 2% Kollidon® 6% Retalac® 76%	8 x 3	120 / 130 120 / 130 120 / 135 130 / 140 130 / 145 140 / 150 140 / 150	100 150 100 100 150 100 150	- - - + / - - + / - -	Smješa je postajala manje voluminozna prilikom štampanja u odnosu na Starlac® formulaciju, ali su se u slučaju gdje je ostvareno djelimično uspješno štampanje tablete raspadale prilikom vađenja iz štampača
ATH 10% Candurin 3% Na-stearil fumarat 2% Kroskarmeloza- Na 2% MicroceLac® 83%	8 x 3	120 / 130 120 / 130 120 / 135 130 / 140 130 / 140 140 / 150 140 / 150	100 150 100 100 150 100 150	- - - + / - - + / - -	U odnosu na formulacije sa Starlac® i Retalac®, izostavljen je Kollidon® kako bi se smanjilo povezivanje čestica praška; međutim, veliki udio laktoze monohidrata i dalje je davao dodatni volumen smješi, onemogućavajući adekvatno nanošenje novog sloja i međusobno povezivanje slojeva
ATH 10% Candurin 3% Na-stearil fumarat 2% Manitol Partec 25% HPMC 60%	8 x 3	120 / 130 130 / 140 140 / 150	100 100 100	+ / - + / - +	HPMC se pokazala kao pogodna komponenta matriksa za SLS štampu; tablete najboljih mehaničkih karakteristika dobijene su pri kombinaciji temperature komore i praška 140 / 150°C, ali se povremeno ponovo javljao problem da roler zahvata previše materijala prilikom nanošenja novog sloja, pa je iz formulacije uklonjen lubrikans Na-stearil fumarat

ATH 10% Candurin 3% Manitol Partec 27% HPMC 60%	8 x 3	130 / 140	100	+ / -	Primjenom prikazanih uslova štampanja, uspješno su štampane tablete dimenzija 8 x 3 mm sa brzinom lasera ne većom od 150 mm/s, dok je kod tableta manjih dimenzija 6 x 3 mm ostvareno uspješno štampanje pri većim brzinama lasera
		130 / 140	150	+ / -	
		140 / 150	100	+	
		140 / 150	150	+	
		140 / 150	175	-	
		140 / 150	200	-	
	6 x 3	130 / 140	100	+ / -	
		140 / 150	100	+	
		140 / 150	125	+	
		140 / 150	150	+	
		140 / 150	175	+	
		140 / 150	200	+	

Parametri nisu smatrani adekvatnim u slučajevima da su izrađene tablete imale nepravilan oblik i/ili boju koja odstupa od boje fizičke smješe praškova. Takođe, parametri štampanja su smatrani neadekvatnim u slučajevima gdje bi se dobijene tablete po vađenju iz komore krunile ili raspadale. Na Slici 53. prikazani su neki od neuspješnih pokušaja štampanja.



**Slika 53.** Primjeri neuspješnih pokušaja štampanja tableta SLS 3D tehnikom

Kod formulacija sa koprocesovanim ekscipijensima MicroceLac® 100, Retalac® i Starlac®, smješe se nisu mogle smatrati printabilnim budući da u određenim slučajevima nije bilo moguće dobiti tabletu, dok su se u drugim dobijene SLS tablete usljed neadekvatnih mehaničkih karakteristika raspadale u toku vađenja iz komore po završetku štampanja. Dodatno, same smješe su tokom štampanja dobijale na voluminoznosti, što bi se moglo objasniti prisustvom hidrata laktoze u svakom od navedenih koprocesovanih ekscipijenasa, gdje je usljed visokih temperatura u komori dolazilo do isparavanja vezane vode što je ometalo sinterovanje čestica smješe praškova. Dalje je upotrijebljen HPMC

kao pomoćna supstanca čija je temperatura topljenja ( $160^{\circ}\text{C}$ ) u radnom opsegu temperature SLS štampača. Ispostavilo se da se radi o pomoćnoj supstanci koja je pogodna za SLS štampu, budući da su uspješno odštampane tablete, pa su dalji pokušaju bili usmjereni na pronalaženje optimalnih parametara štampe, tj. brzine lasera i temperature komore.

Eksperimenti su pokazali da su najprikladniji uslovi štampanja za ovu formuluaciju kada se podese konstantna temperatura komore od  $140^{\circ}\text{C}$  i temperatura površine praška od  $150^{\circ}\text{C}$ . Dalje je varirana brzina lasera, pa je zaključeno da su tablete dimenzija  $6\times 3\text{mm}$  uspješno štampane pri brzinama lasera od 100, 125, 150, 175 i  $200\text{ mm/s}$ , dok su tablete dimenzija  $8\times 3\text{mm}$  uspješno štampane pri brzinama lasera manjim od  $150\text{ mm/s}$ . Veće brzine lasera nisu dale uspješnu štampu, vjerovatno iz razloga što je sa povećanjem dimenzija tableta potrebna i veća energija za sinterovanje, što znači da u ovom slučaju tablete nisu primile dovoljno energije primjenom lasera veće brzine. Nakon pronalaženja uspješnih parametara štampanja, pristupilo se štampanju tableta. Na Slici 54. prikazane su tablete atomoksetina izrađene SLS tehnikom, dimenzija  $8\text{mm} \times 3\text{mm}$ . Tokom jednog ciklusa, štampano je po 10 tableta, a vrijeme potrebno za štampanje po ciklusu je iznosilo, zavisno od dimenzija tableta i zadane brzine lasera, od 10 do 20 minuta.

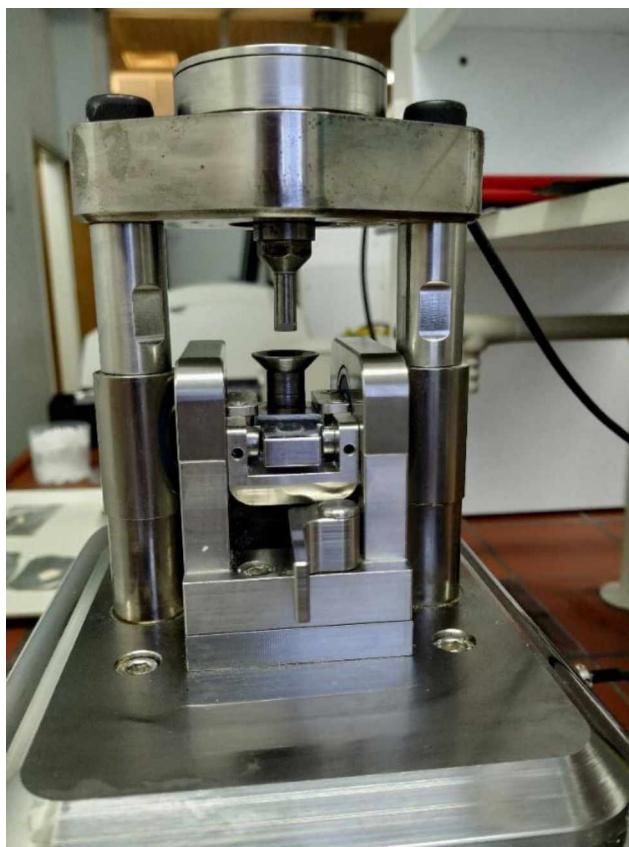


**Slika 54.** Izrađene SLS tablete atomoksetina dimenzija  $8\text{mm} \times 3\text{mm}$

#### **3.3.6.2 Izrada tableta primjenom simulatora kompakcije**

Nakon preliminarnih eksperimenata pomoću kojih su definisani sastav formulacije i parametri procesa štampe kojima se postiže uspješno SLS štampanje, iz iste smješe koja

sadrži 10% atomoksetina, 27% manitola, 3% Candurin® Gold Sheen i 60% HPMC, izrađene su tableta primjenom Gamlenovog simulatora kompakcije (Slika 55.).



**Slika 55.** Izrada tableta iz iste smješe kojom su štampane tablete na SLS štampaču, primjenom Gamlenovog simulatora kompakcije

Izrađene tablete su bile okuglog oblika, prečnika 6 mm i prosječne mase 100 mg (Slika 56.).



**Slika 56.** Tablete izrađene pomoću simulatora kompakcije iz iste fizičke smješe iz koje su štampane tablete SLS tehnikom

### 3.3.6.3 Određivanje fizičkih i mehaničkih karakteristika tableta

Fizičke i mehaničke karakteristike tableta atomoksetina izrađenih SLS tehnikom kao i tableta dobijenih na simulatoru kompakcije prikazane su u Tabeli 10. Iz prikazanih vrijednosti uočava se da tablete štampane pri manjoj brzini lasera imaju veću masu. Naime, u toku štampanja primijenjena je veća gustina energije, što dovodi do smanjenja praznog prostora između čestica praška pa se povećava broj čestica praška koje mogu da se sinteruju (116). Izmjereni prečnik i debljina su bili bliski teorijskim vrijednostima, odnosno različiti parametri štampanja nisu uticali na dimenzije izrađenih tableta. Čvrstina izrađenih SLS tableta i vrijeme dezintegracije su u direktnoj korelaciji sa primijenjenom brzinom lasera, odnosno sa povećanjem brzine lasera dobijaju se tablete manje čvrstine i posljedično brže dezintegracije, usljed manje gustine energije i nešto slabijeg sinterovanja čestica praška. Tablete izrađene na Gamlenovom simulatoru kompakcije su pokazale mehaničke osobine najpribližnije SLS tabletama štampanim pri brzini lasera od 150 mm/s.



**Tabela 10.** Fizičke i mehaničke osobine SLS i Gamlen izrađenih tableta

Formulacija	Masa $\pm$ SD (mg)	Prečnik $\pm$ SD (mm)	Debljina $\pm$ SD (mm)	Čvrstina $\pm$ SD (N)	Vrijeme dezintegracije (s)	Sadržaj API (%)
F8-100	103 $\pm$ 0.91	7.97 $\pm$ 0.1	3.16 $\pm$ 0.1	45.5 $\pm$ 4.8	420	10.19
F8-150	98.8 $\pm$ 0.74	7.99 $\pm$ 0.1	3.09 $\pm$ 0.1	22.6 $\pm$ 7.9	320	10.10
F6-100	61.4 $\pm$ 0.15	5.91 $\pm$ 0.1	3.16 $\pm$ 0.1	64.0 $\pm$ 7.6	380	9.85
F6-125	53.56 $\pm$ 0.11	5.93 $\pm$ 0.1	3.15 $\pm$ 0.1	48.2 $\pm$ 6.0	260	9.98
F6-150	47.93 $\pm$ 0.01	5.94 $\pm$ 0.1	3.16 $\pm$ 0.1	26.7 $\pm$ 5.6	200	9.90
F6-175	42.27 $\pm$ 0.05	5.89 $\pm$ 0.1	3.12 $\pm$ 0.1	18.3 $\pm$ 2.5	90	9.82
F6-200	41.6 $\pm$ 0.04	5.88 $\pm$ 0.1	3.11 $\pm$ 0.1	14.5 $\pm$ 3.2	60	10.26
Gamlen	99.8 $\pm$ 0.4	6.00	3.00	24	360	10.00

### 3.3.6.4 Živina porozimetrija

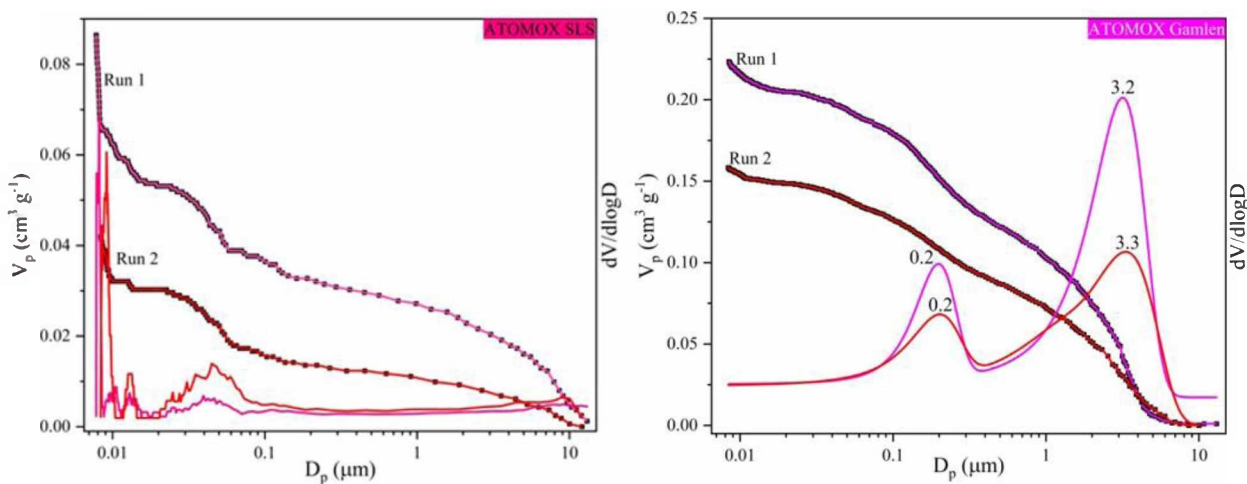
Rezultati mjerenja živine porozimetrije (ukupna zapremina pora, specifična površina, bulk gustina i porozitet) SLS i tableta atomoksetina izrađenih na simulatoru kompakcije (n=3) prikazani su u Tabeli 11., dok je raspodjela veličine pora (PSD) prikazana na Slici 57. Ukupna zapremina pora za uzorak tableta izrađenih na Gamlen simulatoru iznosila je 0.23 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> dok je za uzorak SLS tableta iznosila 0.09 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>, dakle za oko 60% manje. U prvom ciklusu, živa ispunjava prostor i interčestičnih i intračestičnih pora, dok u drugom ciklusu mjerenja, živa može da ispuni samo prostor dostupnih, intračestičnih pora. Za obje grupe uzoraka u drugom ciklusu ukupna zapremina pora je bila niža, i to za uzorke sa Gamlena za 30% i uzorke sa SLS štampača 56%. Navedeno smanjenje upućuje na prisustvo specifičnog oblika pora kao i na međučestičnu poroznost. Niska specifična površina (između 10.5 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> i 16.5 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) koja je određena MIP mjerenjima pokazuje da analizirani uzorci pripadaju grupi mezo- i makroporoznih, odnosno neporoznih materijala. Ukupan porozitet uzoraka sa Gamlenovog simulatora je bio oko 23% u prvom ciklusu, dok je u drugom ciklusu porozitet smanjen za 30%. Sa druge strane, SLS uzorci

pripadaju grupi nedovoljno poroznih ili neporoznih materijala, sa porozitetom od oko 11% u prvom ciklusu mjerenja, koji je u drugom ciklusu smanjen za oko 52%. Iz navedenog se može zaključiti da je više međučestičnih pora prisutno u SLS nego u Gamlen izrađenim tabletama. Treba napomenuti i da bi se smanjenje poroziteta uzorka u drugom ciklusu mjerenja moglo pripisati specifičnom tipu pora koje su ispunjene živom u prvom ciklusu i ne mogu biti adekvatno ispražnjene i dostupne za drugi intruzioni ciklus.

**Tabela 11.** MIP mjerenja SLS i Gamlen izrađenih tableta

Uzorak	Run	$V_{tot}^1$ (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	$S_{Hg}^2$ (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	$D_{av}^3$ (μm)	$BD^4$ (g cm <sup>-3</sup> )	$p^5$ (%)
<b>ATOMOX</b>	I	0.22	10.5	3.25	1.00	22.3
	II	0.16	6.6	3.29	1.00	15.8
<b>Gamlen</b>	I	0.09	16.5	0.01	1.28	11.1
<b>ATOMOX SLS</b>	II	0.04	6.5	0.01	1.28	5.4

<sup>1</sup>Ukupna zapremina pora, <sup>2</sup>Specifična površina, <sup>3</sup>Srednja vrijednost prečnika pora, <sup>4</sup>Bulk gustina, <sup>5</sup>Porozitet.

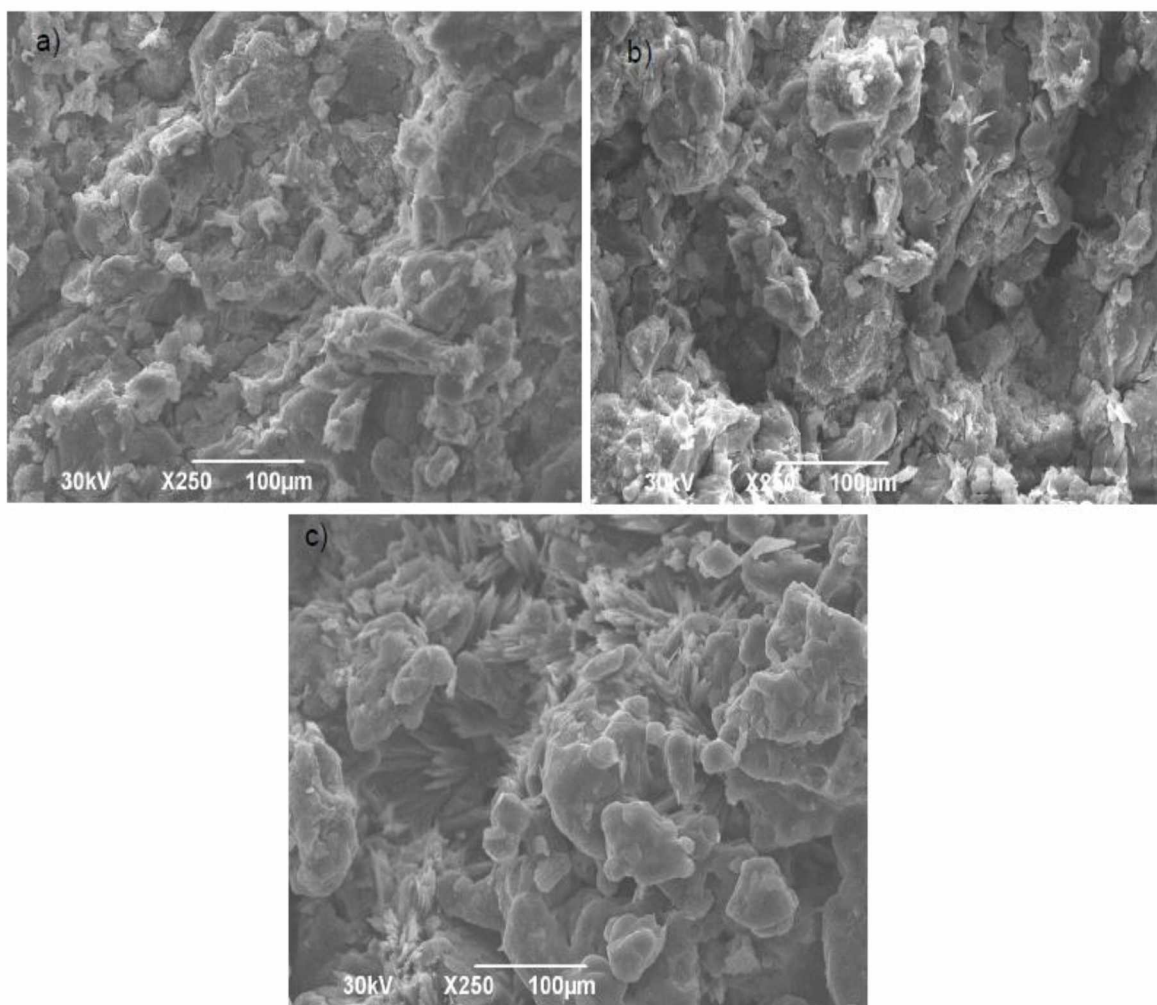


**Slika 57.** Raspodjela veličine pora (PSD) kod tableta izrađenih SLS štampom (lijevo) i na Gamlenovom simulatoru kompakcije (desno)

Na Slici 57. se uočavaju razlike u raspodjeli veličina pora (PSD) kod uzoraka sa SLS i Gamlen tabletama. Kod uzoraka sa Gamlenovog simulatora, kriva PSD je bimodalna sa prečnikom pora od oko 0.2  $\mu\text{m}$  i između 3.2 i 3.3  $\mu\text{m}$ , što ukazuje na prisustvo pora srednjeg i velikog prečnika. U poređenju sa SLS uzorcima, uzorci sa Gamlena imaju prave pore i mrežu pora u mezo- i makroporoznim regionima, dok su SLS uzorci slabo porozni. To je potvrđeno i kroz mjerenja u drugom ciklusu.

#### **3.3.6.5 Skenirajuća elektronska mikroskopija**

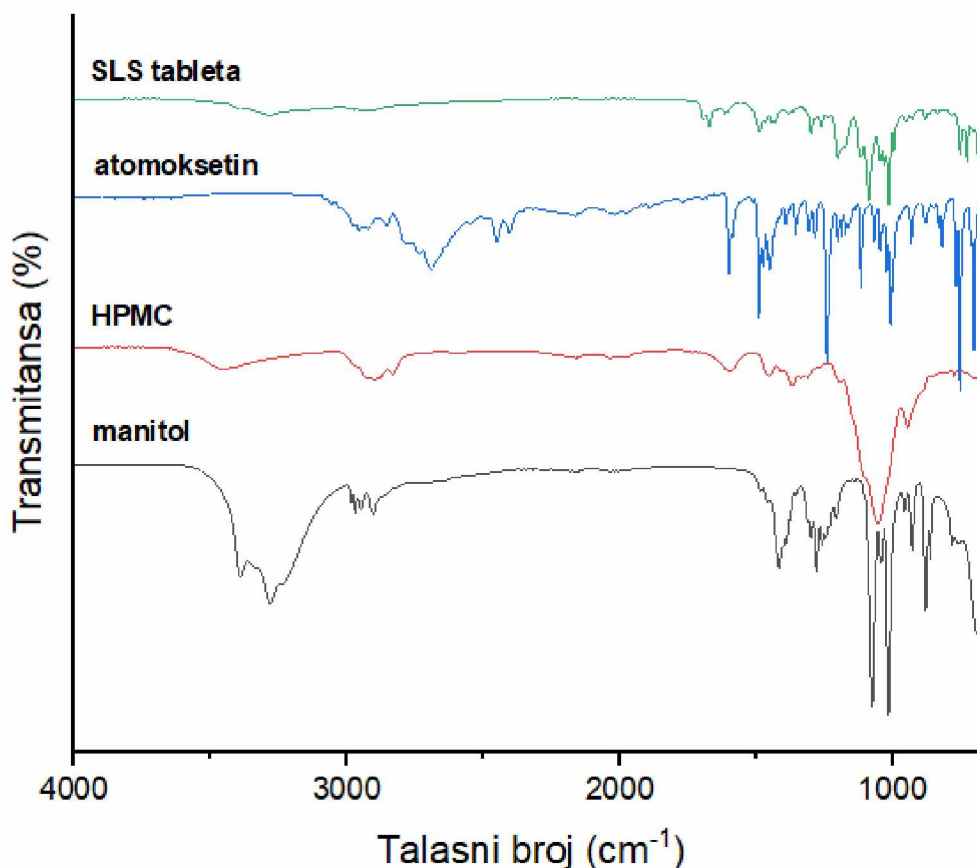
Na SEM mikrografijama prikazane su morfološke karakteristike presjeka tableta izrađenih pomoću SLS 3D štampača i Gamlenovog simulatora kompakcije (Slika 58.). Na mikrografijama SLS tableta vidljivo je da su određeni segmenti tableta sinterovani dok drugi nisu već su ostali u praškastom obliku, naročito kod tableta izrađenih uz primjenu brzine lasera od 200 mm/s. Dobijene tablete imaju interčestične pore, koje omogućavaju brzi prodor tečnosti, što dovodi do bržeg raspadanja tablete. Navedeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, prema kojima sa povećanjem brzine lasera i smanjenjem gustine energije dolazi do smanjenja proseca sinterovanja pa se sa većim udjelom formiraju interčestične pore (116). SEM mikrografije tableta izrađenih na Gamlenovom simulatoru kompakcije ukazuju na prisustvo mezo- i makropora, što korelira sa rezultatima mjerenja živine porozimetrije.



**Slika 58.** SEM mikrofije poprečnog presjeka tableta atomoksetina izrađenih primjenom: a) SLS tehnike pri brzini lasera 100 mm/s; b) SLS tehnike pri brzini lasera 200 mm/s; c) Gamlen simulatora kompakcije

### 3.3.6.6 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

FT-IR spektri polaznih materijala (atomoksetin, HPMC, manitol) i izrađenih SLS tableta prikazani su na Slici 59.



**Slika 59.** FT-IR spektri atomoksetina, pomoćnih supstanci i izrađenih SLS tableta

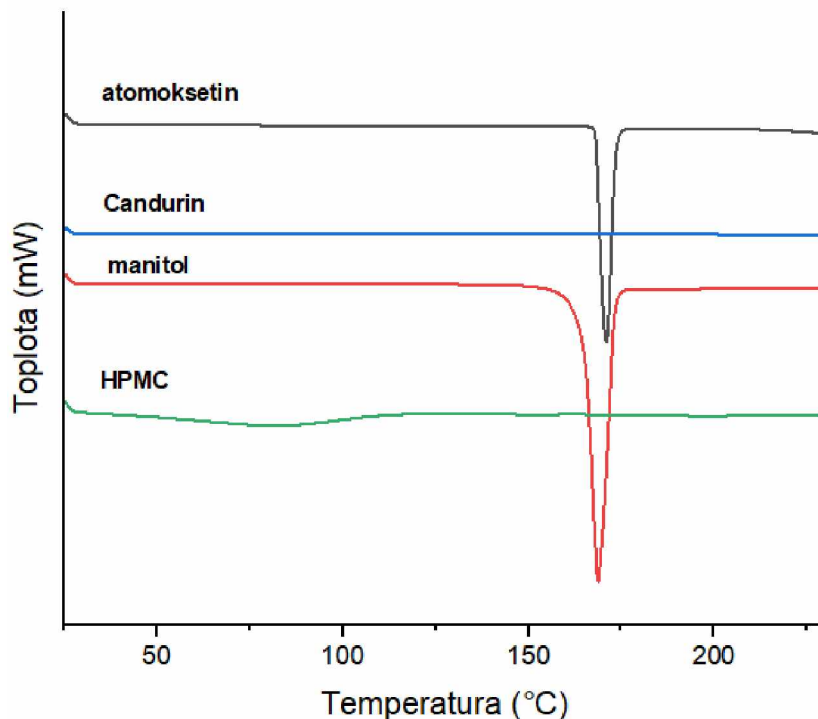
Spektar HPMC pokazuje apsorpcione trake na  $3450\text{ cm}^{-1}$  (istezanje OH grupe) i  $2960\text{ cm}^{-1}$  (C-H istezanje) (149). Intenzivna apsorpciona traka na  $1060\text{ cm}^{-1}$  označava vanfazne vibracije koje su povezane sa alkil supstituisanim cikličnim prstenom koji sadrži etarske veze (150, 151). Spektar manitola pokazao je karakteristične apsorpcione trake na  $3400\text{ cm}^{-1}$  (istezanje OH grupe),  $2947\text{ cm}^{-1}$  (C-H istezanje),  $1053\text{ cm}^{-1}$  i  $1070\text{ cm}^{-1}$  (C-O istezanje), što je u skladu sa literaturnim podacima (152). Karakteristični apsorpcioni pikovi atomoksetina na  $1730\text{ cm}^{-1}$ ,  $1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1490\text{ cm}^{-1}$ ,  $1475\text{ cm}^{-1}$ ,  $1452\text{ cm}^{-1}$ ,  $1356\text{ cm}^{-1}$ ,  $1241\text{ cm}^{-1}$ ,  $1202\text{ cm}^{-1}$ ,  $1174\text{ cm}^{-1}$ ,  $1062\text{ cm}^{-1}$ ,  $1043\text{ cm}^{-1}$ ,  $1008\text{ cm}^{-1}$ ,  $991\text{ cm}^{-1}$ ,  $820\text{ cm}^{-1}$ ,  $768\text{ cm}^{-1}$ ,  $754\text{ cm}^{-1}$  i  $703\text{ cm}^{-1}$  se mogu uočiti na istim frekvencijama i na FT-IR

spektrima čistog atomoksetina i na FT-IR spektrima izrađenih tableta. Kako nije došlo do pomjeranja ovih karakterističnih pikova, može se zaključiti da nije došlo do intermolekulskih interakcija između ljekovite supstance i ekscipijenasa u izrađenim tabletama.

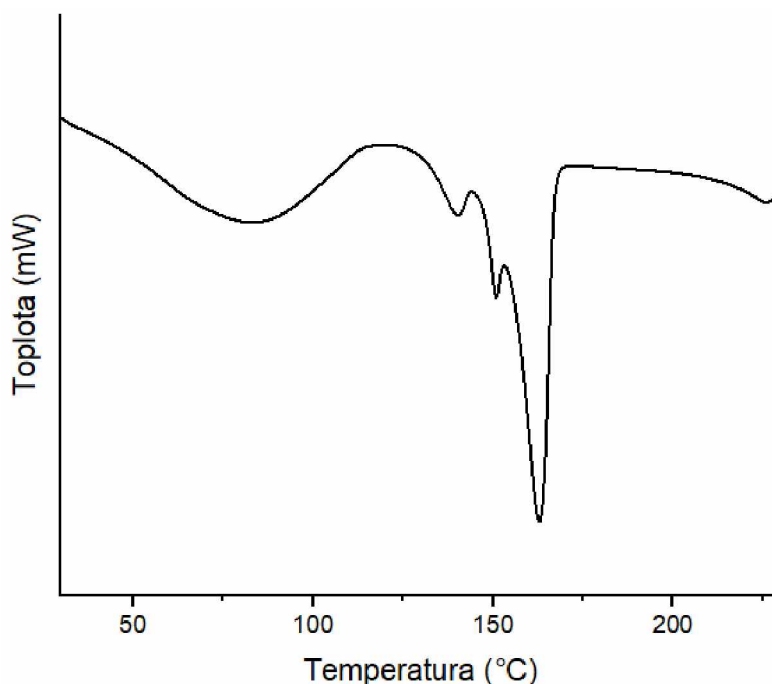
### 3.3.6.7 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Svrha DSC analize bila je da se ispita da li je tokom izrade SLS tableta, odnosno pod uticajem povišene temperature i energije lasera došlo do promjene fizičkog stanja ljekovite supstance. DSC termogrami polaznih materijala i dobijenih SLS 3D tableta prikazani su na Slici 60. Na DSC termogramu čistog atomoksetina uočava se oštar endotermni pik na temperaturi od 169°C koji odgovara topljenju kristala ljekovite supstance. Dodatno, na temperaturi od 168°C uočava se oštar endotermni pik koji odgovara temperaturi topljenja manitola.

a)



b)

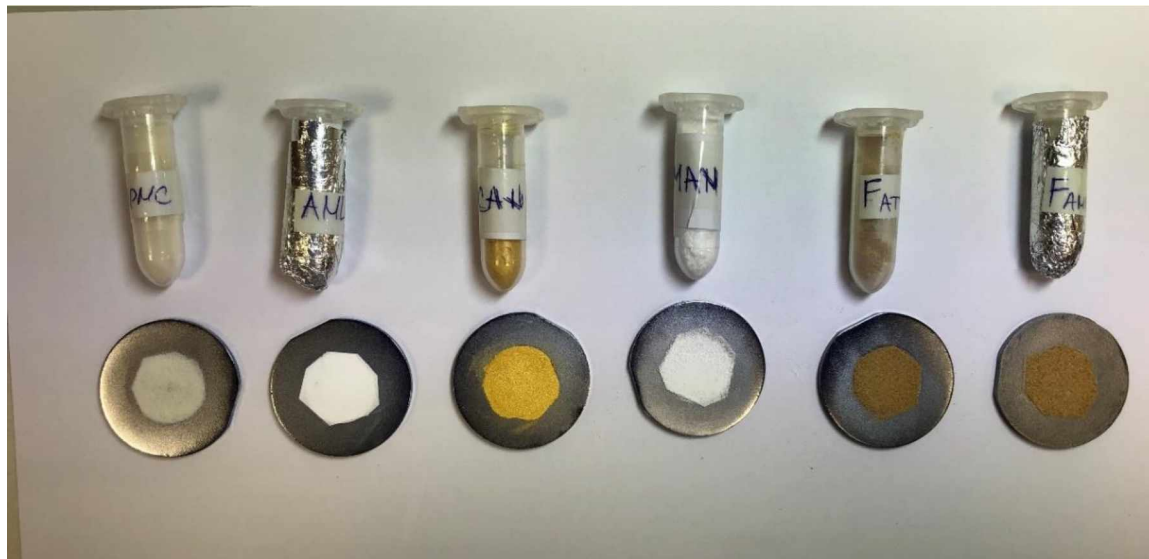


**Slika 60.** DSC termogrami: a) komponenti formulacije prije štampanja i b) 3D tableta izrađenih na SLS štampaču

Na termogramu tableta izrađenih SLS tehnikom, takođe se uočavaju karakteristični endotermni pikovi atomoksetina i manitola, što ukazuje na to da su supstance, uprkos izlaganju povišenoj temperaturi i energiji lasera, ostale u kristalnom stanju. Na termogramu HPMC u intervalu od 50°C - 80°C uočava se široka endoterma koja odgovara isparavanju slabo vezane ili apsorbovane vode. Isparavanje vode je bilo i očekivano kod sirove supstance, zbog velike površine čestica. U istom temperaturnom intervalu, na termogramu SLS štampanih tableta, uočava se takođe endotermni pik, što i dalje ukazuje na značajno isparavanje vode prilikom zagrijavanja tokom samog ispitivanja, što se može objasniti kompleksnom unutrašnjom strukturom 3D štampanih objekata. Uzorci su dalje analizirani metodom difrakcije X-zraka na prašku, u cilju potvrđivanja rezultata DSC analize.

### 3.3.6.8 Difrakcija X-zraka na prašku

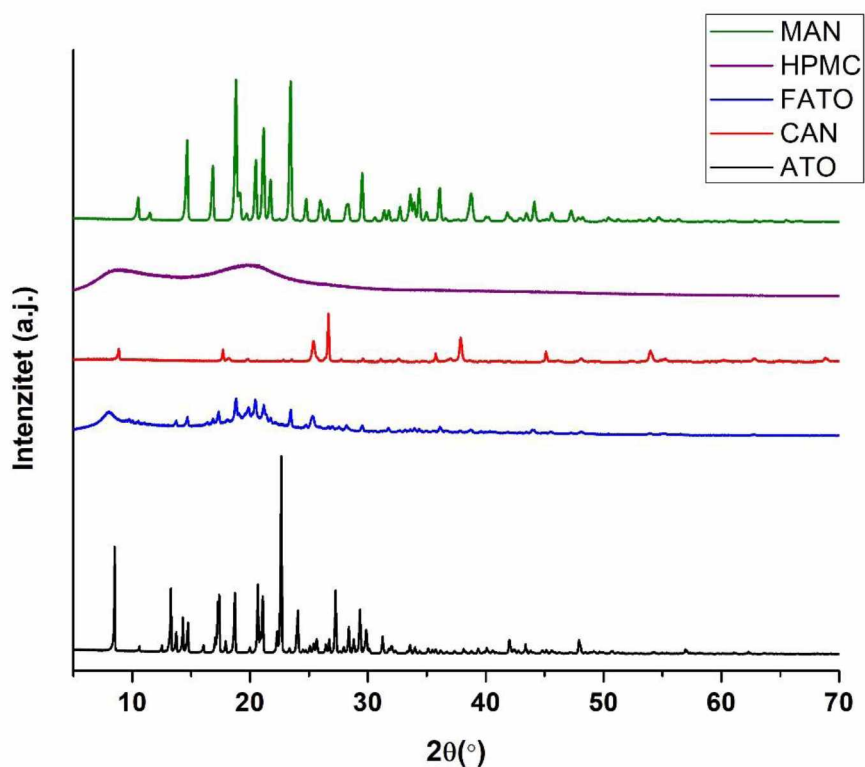
XRPD analiza je sprovedena sa ciljem dobijanja detaljnijeg uvida i za potvrdu fizičkog stanja ljekovite supstance u izrađenim SLS 3D tabletama. Na Slici 61. prikazana je priprema uzoraka za XRPD analizu.



**Slika 61.** Priprema uzoraka pojedinačnih komponenti smješe i izrađenih SLS tableta za XRPD analizu na Empyrean, Malvern Panalytical difraktometru

Difraktogrami dobijeni analizom atomoksetina, manitola, HPMC i Candurin Glod Sheen, te odabranih SLS 3D tableta prikazani su na Slici 62. X-ray difraktogram atomoksetina ima izgled karakterističnog spektra kristalnih supstanci s obzirom na veliki broj oštih i intenzivnih pikova. Na difraktogramu atomoksetina uočavaju se karakteristični pikovi visokog intenziteta na  $17.6^\circ$ ,  $18.2^\circ$ ,  $18.9^\circ$ ,  $21.3^\circ$ ,  $23^\circ$ ,  $24.3^\circ$  i  $27.5^\circ$   $2\theta$ . Na osnovu položaja karakterističnih pikova, difraktogram atomoksetina odgovara difraktogramu njegovog kristalnog oblika koji je opisan u literaturi (146). Na difraktogramu izrađenih SLS tableta takođe se uočava prisustvo navedenih karakterističnih pikova. Time je potvrđeno da je ljekovita supstanca prisutna u kristalnom obliku u izrađenim SLS tabletama, što korelira sa rezultatima DSC analize.





**Slika 62.** Difraktogrami komponenti formulacije i SLS 3D tableta atomoksetina izrađenih primjenom brzine lasera 150 mm/s

### 3.3.6.9 Raspadljivost

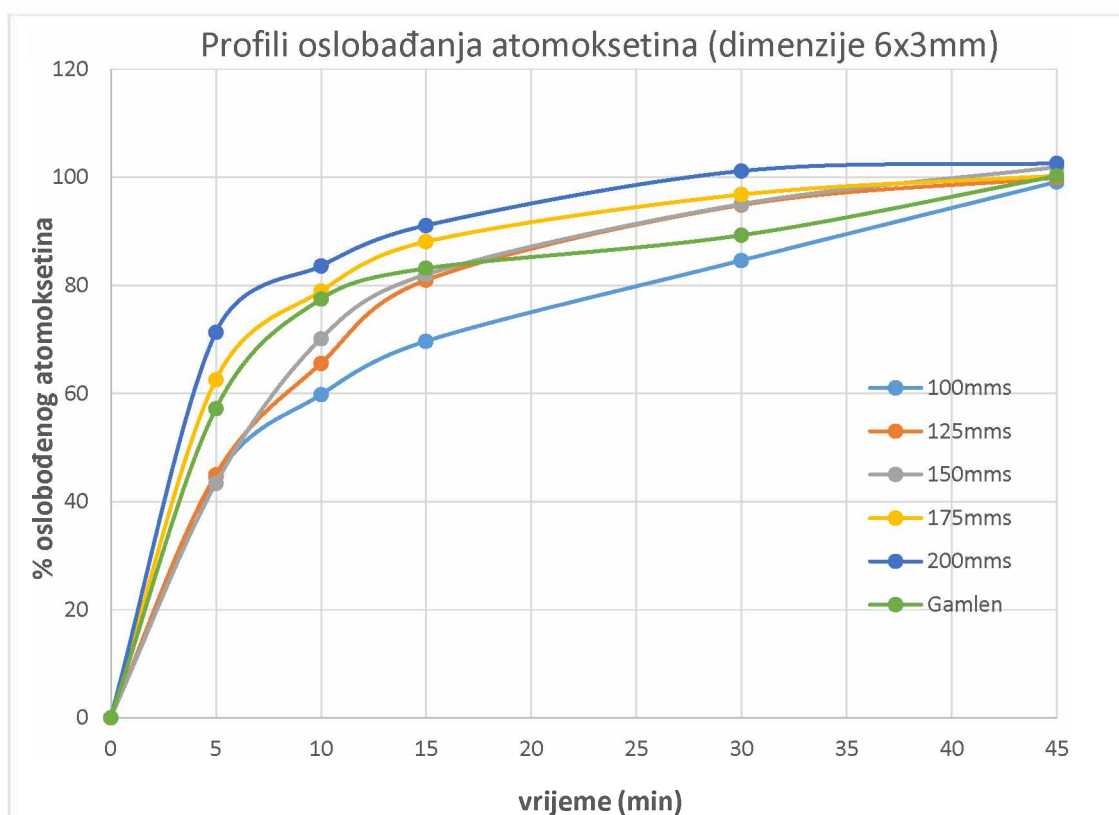
Vrijeme raspadanja SLS 3D tableta je iznosilo od 60 do 420 s, u zavisnosti od dimenzija i primijenjene brzine lasera pri štampanju, dok je za tablete izrađeno na Gamlenovom simulatoru kompakcije vrijeme raspadanja iznosilo 360 s (Tabela 10). Karakteristično je da se uočava pozitivan uticaj gustine energije na vrijeme raspadanja. Naime, kako se brzina lasera tokom štampanja povećava to je proces sinterovanja manje intenzivan, zbog čega dolazi do lakšeg odvajanja čestica u tabletama i posljedično bržeg raspadanja tableta (116). Mohamed i saradnici su, ispitivanjem raspadljivosti SLS tableta sa klindamicinom uočili sličan obrazac ponašanja (153). Vrijeme raspadanja kako za SLS tako i za tablete izrađene na Gamlenovom simulatoru kompakcije iznosilo je manje od 15 minuta, što odgovara zahtjevu testa Raspadljivost Ph. Eur. 11.0 za neobložene tablete.

### 3.3.6.10 Sadržaj atomoksetina u tabletama

Sadržaj atomoksetina u svim tabletama, kako onim izrađenim primjenom SLS štampača tako i na Gamlenovom simulatoru kompakcije, je bio između 95 % i 105 % u poređenju sa teorijskim sadržajem što govori da prilikom štampanja nije došlo do degradacije ljekovite supstance, odnosno kompakcije (Tabela 10).

### 3.3.6.11 Ispitivanje brzine oslobađanja atomoksetina

Na Slici 63. prikazani su profili brzine oslobađanja atomoksetina iz tableta izrađenih SLS štampačem i na simulatoru kompakcije, pri čemu je kod SLS tableta varirana brzina lasera.



**Slika 63.** Grafički prikaz brzine oslobađanja atomoksetina iz tableta dimenzija 6mm x 3mm, dobijenih pomoću SLS štampača primjenom različite brzine lasera i tableta izrađenih na Gamlenovom simulatoru kompakcije

Iz prikazanih rezultata zaključuje se da je kod svih tableta, kako kod SLS 3D tableta izrađenih primjenom različite brzine lasera, tako i kod tableta izrađenih na Gamlenovom simulatoru kompakcije, postignuto kompletno i potpuno oslobađanje atomoksetina u roku od 45 minuta. Time je ispunjen zahtjev poglavlja 5.17.1. *Recommendation on dissolution testing* Evropske farmakopeje izdanje 11.0, u pogledu zahtjeva za farmaceutske oblike sa konvencionalnim oslobađanjem lijekovite supstance, gdje je kriterijum prihvatljivosti na nivou S1 da je najmanje 80% lijekovite supstance oslobođeno u definisanom vremenu, uobičajeno za 45 minuta ili manje. Dodatno, kod SLS tableta izrađenih pri brzini lasera od 175 mm/s i 200 mm/s, postignuto je ultra brzo oslobađanje atomoksetina, budući da je više od 85% supstance oslobođeno u roku od 15 minuta. Kao što je prethodno navedeno, sa povećanjem brzine lasera prilikom štampanja smanjuje se intenzitet procesa sinterovanja, tako da se čestice u tabletama lakše odvajaju jedna od druge, što za posljedicu ima i brže raspadanje tableta, brži kontakt sa disolucionim medijumom i samim tim brže rastvaranje lijekovite supstance. Kako su tablete izrađene na Gamlenovom simulatoru kompakcije ispoljile mehaničke osobine najbližnje SLS tabletama štampanim pri brzini lasera od 150 mm/s, profili disolucije ove dvije vrste tableta upoređeni su na osnovu proračuna faktora sličnosti ( $f_2$ ). Izračunata vrijednost faktora sličnosti iznosila je 80.17, odnosno veća je od 50, pa je zaključak da su profili brzine oslobađanja atomoksetina iz SLS tableta štampanih pri brzini lasera od 150 mm/s i tableta izrađenih iz iste smjese na Gamlenovom simulatoru kompakcije slični.

## 4. ZAKLJUČCI

U okviru ove doktorske disertacije sprovedena su istraživanja koja su za cilj imala ispitivanje mogućnosti primjene tehnika digitalnog projektovanja svjetlosti i selektivnog laserskog sinterovanja u izradi tableta za personalizovanu terapiju. Rezultati istraživanja doveli su do sledećih zaključaka:

- ✓ primjenom DLP tehnike 3D štampe moguće je ostvariti uspješno štampanje tableta atomoksetina primjenom različitih fotoinicijatora. Najvažniji parametar za uspješno štampanje je vrijeme ekspozicije, gdje se minimalno vrijeme ekspozicije potrebno za uspješno štampanje značajno razlikuje u zavisnosti od toga koji je fotoinicijator upotrijebljen. Povećanje vremena ekspozicije utiče na dimenzije tableta i posljedično na sadržaj aktivne supstance, zbog čega je važno koristiti najmanje vrijeme ekspozicije za uspješno štampanje;
- ✓ izbor fotoinicijatora za DLP štampanje ima uticaj na brzinu oslobađanja atomoksetina iz izrađenih DLP tableta, što je od velikog značaja za izbor sastava formulacije kojom će se postići željeni profil oslobađanja ljekovite supstance;
- ✓ kroz variranje parametara kao što su debljina tableta i procentualni udio ljekovite supstance, moguće je postići različite profile brzine oslobađanja atomoksetina iz DLP tableta, od trenutnog ka modifikovanom/produženom. Do sada su u literaturi opisani primjeri tableta sa isključivo modifikovanim/produženim oslobađanjem, izrađene primjenom fotopolimerizacionih tehnika. Mogućnost izrade farmaceutskih oblika sa trenutnim oslobađanjem pomoću DLP 3D tehnike koja je prikazana u ovom radu je jako značajna, zato što je za optimalni terapijski efekat neophodno oslobađanje ljekovite supstance u odgovarajućem vremenskom intervalu. Osim toga, različita klinička stanja zahtijevaju primjenu lijekova sa različitim profilima oslobađanja;
- ✓ primjenom vještačkih neuronskih mreža, moguće je razviti model za predviđanje profila oslobađanja atomoksetina iz tableta dobijenih DLP tehnikom; zbog svoje sposobnosti da pruže razumijevanje odnosa ulaznih i izlaznih parametara, pa prema tome i da pruže bolji uvid u uticaj formulacije i procesnih parametara na osobine izrađenih tableta, vještačke neuronske mreže mogu biti korisne u

optimizaciji procesa formulisanja i štampanja tableta u skladu sa individualnim potrebama pacijenata;

- ✓ primjenom SLS tehnike moguće je izraditi tablete zadovoljavajućih mehaničkih i farmaceutsko-tehnoloških karakteristika, nakon inicijalnog ispitivanja i pronalaženja optimalnih parametara za proces štampanja;
- ✓ primjenom SLS tehnike i HPMC kao glavnog polimera u formulaciji, moguće je uspješno izraditi tablete istog sastava i karakteristika kao i tablete proizvedene u industrijskim uslovima procesom direktne kompresije, kojima se postiže potpuno oslobađanjem lijeka za manje od 45 minuta. Dobijeni rezultati ukazuju na potencijal SLS štampe u proizvodnji tableta, i predstavljaju korak bliže ka razumijevanju i optimizaciji procesa SLS štampanja.

U konačnom, DLP i SLS tehnikama 3D štampe moguće je uspješno izraditi tablete atomoksetina sa različitim sadržajem ljekovite supstance i različitim profilima oslobađanja lijeka. Modifikovanjem sastava formulacije, dimenzija tableta i procesnih parametara, moguće je postići različit sadržaj i profil oslobađanja lijeka, i prilagoditi ih potrebama individualnog pacijenta. Uticaj faktora formulacije i procesnih parametara na osobine 3D štampanih tableta je složen i uglavnom nelinearan. Za svaku formulaciju potrebno je prilagoditi sastav i parametre štampanja, u cilju dobijanja tableta željenih karakteristika.

## 5. LITERATURA

1. Alomari, M.; Mohamed, F.H.; Basit, A.W.; Gaisford, S. Personalised dosing: printing a dose of one's own medicine. *Int. J. Pharm.* 2015, 494, 568–577.
2. Vithani, K.; Goyanes, A.; Jannin, V.; Basit, A.W.; Gaisford, S.; Boyd, B.J. An Overview of 3D Printing Technologies for Soft Materials and Potential Opportunities for Lipid-based Drug Delivery Systems. *Pharm. Res.* 2018, 36, 4–24.
3. Gross, B.C.; Erkal, J.L.; Lockwood, S.Y.; Chen, C.; Spence, D.M. Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences, *Anal. Chem.* 2014, 86, 3240–3253.
4. United States Food and Drug Administration, Highlights of Prescribing Information — Spritam, 2015 Available from: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2015/207958s000lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/207958s000lbl.pdf); datum pristupa 18.02.2023. godine.
5. Gibson, I.; Rosen, D.; Stucker, B. *Additive Manufacturing Technologies: 3D Printing, Rapid Prototyping, and Direct Digital Manufacturing*, second ed. Springer, New York, 2015.
6. Norman, J.; Madurawe, D.R.; Moore, M.V. C.; Khan, A.M.; Khairuzzaman, A. A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017, 108, 39–50.
7. Hsiao, W.K.; Lorber, B.; Reitsamer, H.; Khinast, J. 3D printing of oral drugs: A new reality or hype? *Expert Opin. Drug Deliv.* 2018, 15, 1–4.
8. Khaled, S.A.; Burley, J.C.; Alexander, M.R.; Roberts, C.J. Desktop 3D printing of controlled release pharmaceutical bilayer tablets. *Int. Journal of Pharm.* 2014, 461(1-2), 105-111.
9. Ngo, T.D.; Kashani, A.; Imbalzano, G.; Nguyen, K.T.; Hui, D. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B: Engineering.* 2018, 143, 172-196.
10. Hay, M.; Thomas, D.W.; Craighead, J.L.; Economides, C.; Rosenthal, J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat. Biotechnol.* 2014, 32, 40–51.

11. Gao, Y.; Gesenberg, C.; Zheng, W. Chapter 17 - Oral Formulations for Preclinical Studies: Principle, Design, and Development Considerations A2 - Qiu, Yihong, in: Y. Chen, G.G.Z. Zhang, L. Yu, R.V. Mantri (Eds.), *Developing Solid Oral Dosage Forms*, Second Edition., Academic Press, Boston, 2017, 455–495.
12. Dorato, M.A.; Engelhardt, J.A.; The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: use, issues, and definition(s), *Regul. Toxicol. Pharm.* 2005, 42 (3), 265–274.
13. Trenfield S.J.; Awad A.; Goyanes A.; Gaisford S.; Basit A.W. 3D Printing Pharmaceuticals: Drug Development to Frontline Care. *Trends in Pharmacol. Sci.* 2018, 39, 440–451.
14. Kwong, E. *Oral Formulation Roadmap from Early Drug Discovery To Development*, John Wiley&Sons, Hoboken, NJ, USA, 2017.
15. Ji, S.; Guvendiren, M. Recent advances in bioink design for 3D bioprinting of tissues and organs. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2017, 5, 23.
16. Murphy, S.V.; Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* 2014, 32, 773–785.
17. Moroni, L.; Boland, T.; Burdick, J.A.; DeMaria, C.; Derby, B.; Forgacs, G.; Groll, J.; Li, Q.; Malda, J.; Mironov, V.A.; et al. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends Biotechnol.* 2018, 36, 384–402.
18. Ventola, C.L. Medical applications for 3D printing: Current and projected uses. *Pharm. Ther.* 2014, 39, 704.
19. Costello, C.M.; Phillipsen, M.B.; Hartmanis, L.M.; Kwasnica, M.A.; Chen, V.; Hackam, D. et al. Microscale bioreactors for in situ characterization of GI epithelial cell physiology. *Sci. Rep.* 2017, 7, 12515.
20. Hatton, G.B.; Yadav, V.; Basit, A.W.; Merchant, H.A. Animal farm: considerations in animal gastrointestinal physiology and relevance to drug delivery in humans. *J. Pharm. Sci.* 2015, 104, 2747–2776.
21. Redekop, W.; Mladi, D. The faces of personalized medicine: a framework for understanding its meaning and scope. *Value Health.* 2013, 16, S4–9.
22. Okwuosa, T.C.; Pereira, B.C.; Arafat, B.; Cieszyńska, M.; Isreb, A.; Alhnan, M.A. Fabricating a shell-core delayed release tablet using dual FDM 3D printing for patient-centred therapy. *Pharm. Res.* 2017, 34, 427–437.

23. Cohen JS. Ways to minimize adverse drug reactions. Individualized doses and common sense are key. *Postgrad Med.* 1999, 106(3), 163.
24. Preis, M.; Öblom, H. 3D-printed drugs for children - Are we ready yet? *AAPS PharmSciTech.* 2017, 18, 303–308.
25. Goyanes, A.; Det-Amornrat, U.; Wang, J.; Basit, A.W.; Gaisford, S. 3D scanning and 3D printing as innovative technologies for fabricating personalized topical drug delivery systems. *J Control Release.* 2016, 234, 41–8.
26. Mennella, J.A.; Roberts, K.M.; Mathew, P.S.; Reed, D.R. Children's perceptions about medicines: individual differences and taste. *BMC Pediatr.* 2015, 15, 130.
27. Zajicek, A.; Fossler, M.J.; Barrett, J.S.; Worthington, J.H.; Ternik, R.; Charkoftaki, G. et al. A report from the pediatric formulations task force: perspectives on the state of child-friendly oral dosage forms. *AAPS J.* 2013, 15(4), 1072–81.
28. Goyanes, A.; Madla, C.M.; Umerji, A.; Duran Piñeiro, G.; Giraldez Montero, J.M.; Lamas Diaz, M.J. et al. Automated therapy preparation of isoleucine formulations using 3D printing for the treatment of MSUD: First single-centre, prospective, crossover study in patients, *Int. J. Pharm.* 2019, 567, 118497.
29. Scoutaris, N.; Ross, S.A.; Douroumis, D. 3D Printed “Starmix” Drug Loaded Dosage Forms for Paediatric Applications. *Pharm. Res.* 2018, 35, 34.
30. Karavasili, C.; Gkaragkounis, A.; Moschakis, T.; Ritzoulis, C.; Fatouros, D.G. Pediatric-friendly chocolate-based dosage forms for the oral administration of both hydrophilic and lipophilic drugs fabricated with extrusion-based 3D printing, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2020, 147, 105291.
31. Wastesson, J.W.; Morin, L.; Tan, E. C.K.; Johnell, K. An update on the clinical consequences of polypharmacy in older adults: a narrative review, *Expert Opinion on Drug Safety.* 2018, 17:12, 1185-1196.
32. Cantlay, A.; Glyn, T.; Barton, N. Polypharmacy in the elderly. *InnovAiT.* 2016, 92, 69–77.
33. Khaled, S.A.; Burley, J.C.; Alexander, M.R.; Yang, J.; Roberts, C.J. 3D printing of tablets containing multiple drugs with defined release profiles, *Int. J. Pharm.* 2015, 494 (2), 643–650.



34. Goyanes, A.; Wang, J.; Buanz, A.; Martinez-Pacheco, R.; Telford, R.; Gaisford, S. et al. 3D printing of medicines: engineering novel oral devices with unique design and drug release characteristics, *Mol. Pharm.* 2015, 12 (11), 4077–4084.
35. Timmis, A.; Townsend, N.; Gale, C.P.; Torbica, A.; Lettino, M.; Petersen, S.E.; Mossialos, E.A.; Maggioni, A.P.; Kazakiewicz, D.; May, H.T.; et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur. Heart J.* 2020, 41, 12–85.
36. Pereira, B.C.; Isreb, A.; Isreb, M.; Forbes, R.T.; Oga, E.F.; Alhnan, M.A. Additive manufacturing of a point-of-care “polypill:” fabrication of concept capsules of complex geometry with bespoke release against cardiovascular disease, *Adv. Healthc. Mater.* 2020, 9 (13), 2000236.
37. Boateng J. Drug delivery innovations to address global health challenges for pediatric and geriatric populations (through improvements in patient compliance). *J Pharm Sci.* 2017, 106(11), 3188–3198.
38. Thabet, Y.; Lunter, D.; Breitreutz, J. Continuous inkjet printing of enalapril maleate onto orodispersible film formulations. *Int J Pharm.* 2018, 546(1–2), 180–187.
39. Kurek, M.; Ewelina, Ł.; Szafraniec, J.; Knapik-kowalczyk, J.; Paluch, M.; Jachowicz, R. 3D printed orodispersible films with aripiprazole. *Int J Pharm.* 2017, 533(2), 413–420.
40. Fastø, M.M.; Genina, N.; Kaae, S.; Källemark Sporrøng, S. Perceptions, preferences and acceptability of patient designed 3D printed medicine by polypharmacy patients: a pilot study. *Int J Clin Pharm.* 2019, 41(5), 1290–1298.
41. Awad, A.; Yao, A.; Trenfield, S.J.; Goyanes, A.; Gaisford, S.; Basit, A.W. 3D printed tablets (Printlets) with braille and moon patterns for visually impaired patients. *Pharmaceutics.* 2020, 12(2), 172–186.
42. Gültekin, H.E.; Tort, S.; Acartürk, F. An effective technology for the development of immediate release solid dosage forms containing low-dose drug: fused deposition modeling 3D printing. *Pharm Res.* 2019, 36(9), 128–141.
43. Martinez, P.R.; Goyanes, A.; Basit, A.W.; Gaisford, S. Influence of geometry on the drug release profiles of stereolithographic (SLA) 3D-printed tablets. *AAPS PharmSciTech.* 2018, 19(8), 3355–61.

44. Kyobula, M.; Adedeji, A.; Alexander, M.R.; Saleh, E.; Wildman, R.; Ashcroft, I. et al. 3D inkjet printing of tablets exploiting bespoke complex geometries for controlled and tuneable drug release. *J Control Release*. 2017, 261, 207–215.
45. Khaled, S. A.; Burley, J.C.; Alexander, M.R.; Yang, J.; Roberts, C.J. 3D printing of five-in-one dose combination polypill with defined immediate and sustained release profiles. *Journal of controlled release*, 2015, 217, 308-314.
46. Stewart, S.A.; Domínguez-Robles, J.; McIlorum, V.J.; Mancuso, E.; Lamprou, D.A.; Donnelly, R.F.; Larrañeta, E. Development of a Biodegradable Subcutaneous Implant for Prolonged Drug Delivery Using 3D Printing. *Pharmaceutics*. 2020, 12, 105.
47. Rajgor, N.; Bhaskar, V.; Patel, M. Implantable drug delivery systems: An overview. *Syst. Rev. Pharm.* 2011, 2, 91.
48. Wang, Y.; Sun, L.; Mei, Z.; Zhang, F.; He, M.; Fletcher, C.; Wang, F.; Yang, J.; Bi, D.; Jiang, Y.; et al. 3D printed biodegradable implants as an individualized drug delivery system for local chemotherapy of osteosarcoma. *Mater. Des.* 2020, 186, 108336.
49. Meng, E.; Hoang, T. Micro- and nano-fabricated implantable drug-delivery systems. *Ther. Deliv.* 2012, 3, 1457–1467.
50. Stewart, S.; Domínguez-Robles, J.; Donnelly, R.; Larrañeta, E. Implantable polymeric drug delivery devices: Classification, manufacture, materials, and clinical Applications. *Polymers (Basel)*. 2018, 10, 1379.
51. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010, 75, 1–18.
52. Stewart, S.A.; Domínguez-Robles, J.; McIlorum, V.J.; Gonzalez, Z.; Utomo, E.; Mancuso, E.; Lamprou, D.A.; Donnelly, R.F.; Larrañeta, E. Poly(caprolactone)-Based Coatings on 3D-Printed Biodegradable Implants: A Novel Strategy to Prolong Delivery of Hydrophilic Drugs. *Mol. Pharm.* 2020, 17, 3487-3500.
53. Preis, M.; Öblom, H. 3D-Printed Drugs for Children—Are We Ready Yet? *AAPS PharmSciTech*. 2017, 18, 303–308.
54. Movrin, D., 2017. Optimizacija parametara postprocesiranja u tehnologiji vezivne 3D štampe, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu.

55. Prasad, L.K.; Smyth, H. 3D printing technologies for drug delivery: A review. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2016, 42, 1019–1031.
56. Wang, J.; Goyanes, A.; Gaisford, S.; Basit, A. Stereolithographic (SLA) 3D printing of oral modified-release dosage forms. *Int. J. Pharm.* 2016, 503, 207–212.
57. Kastr, W.E. Fabrication of complex oral delivery forms by three dimensional printing™, Dissertation in Materials Science and Engineering, Massachusetts Institute of Technology, 2001.
58. Lipson, H.; Kurman, M. *Fabricated: The New World of 3D Printing*, John Wiley & Sons, Inc., Indianapolis, IN, 2013.
59. Martinez, P.R.; Goyanes, A.; Basit, A.W.; Gaisford, S. Fabrication of drug-loaded hydrogels with stereolithographic 3D printing. *Int. J. Pharm.* 2017, 532, 313–317.
60. Kolakovic, R.; Viitala, T.; Ihalainen, P.; Genina, N.; Peltonen, J.; Sandler, N. Printing technologies in fabrication of drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2013, 10, 1711–1723.
61. Cader, H.K.; Rance, G.A.; Alexander, M.R.; Gonçalves, A.D.; Roberts, C.J.; Tuck, C.J.; Wildman, R.D. Water-based 3D inkjet printing of an oral pharmaceutical dosage form. *Int. J. Pharm.* 2019, 564, 359–368.
62. Clark, E.A.; Alexander, M.R.; Irvine, D.J.; Roberts, C.J.; Wallace, M.J.; Sharpe, S. 3D printing of tablets using inkjet with UV photoinitiation. *Int. J. Pharm.* 2017, 529, 523–530.
63. Jonathan, G.; Karim, A. 3D printing in pharmaceuticals: A new tool for designing customized drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 2016, 499, 376–394.
64. Acosta-Vélez, G.F.; Wu, B.M. 3D pharming: Direct printing of personalized pharmaceutical tablets. *Polym. Sci.* 2016, 2:1.
65. Scoutaris, N.; Snowden, M.; Douroumis, D. Taste masked thin films printed by jet dispensing. *Int. J. Pharm.* 2015, 494, 619–622.
66. The invention of FDM Technology. <https://www.stratasys.com/3dprinters/technologies/fdm-technology/> (pristupljeno 23.10.2022.).
67. Sandler, N.; Salmela, I.; Fallarero, A.; Rosling, A.; Khajeheian, M.; Kolakovic, R.; Genina, N.; Nyman, J.; Vuorela, P. Towards fabrication of 3D printed medical devices to prevent biofilm formation. *Int. J. Pharm.* 2014, 459, 62–64.

68. Tian, Y.; Jacobs, E.; Jones, D.S.; McCoy, C.P.; Wu, H.; Andrews, G.P. The design and development of high drug loading amorphous solid dispersion for hot-melt extrusion platform. *Int. J. Pharm.* 2020, 586, 119545.
69. Patil, H.; Tiwari, R.V.; Repka, M.A. Hot-melt extrusion: from theory to application in pharmaceutical formulation. *AAPS PharmSciTech.* 2016, 17(1), 20–42.
70. Goyanes, A.; Buanz, A.B.; Basit, A.W.; Gaisford, S. Fused-filament 3D printing (3DP) for fabrication of tablets. *Int. J. Pharm.* 2014, 476, 88–92.
71. Goyanes, A.; Buanz, A.B.; Hatton, G.B.; Gaisford, S.; Basit, A.W. 3D printing of modified-release aminosalicylate (4-ASA and 5-ASA) tablets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015, 89, 157–162.
72. Verstraete, G.; Samaro, A.; Grymonpré, W.; Vanhoorne, V.; Van Snick, B.; Boone, M.N.; Hellemans, T.; Van Hoorebeke, L.; Remon, J.P.; Vervaet, C. 3D printing of high drug loaded dosage forms using thermoplastic polyurethanes. *Int. J. Pharm.* 2018, 536, 318–325.
73. Sadia, M.; Sosnicka, A.; Arafat, B.; Isreb, A.; Ahmed, W.; Kellarakis, A.; Alhnan, M.A. Adaptation of pharmaceutical excipients to FDM 3D printing for the fabrication of patient-tailored immediate release tablets. *Int. J. Pharm.* 2016, 513, 659–668.
74. Korte, C.; Quodbach, J. Formulation development and process analysis of drugloaded filaments manufactured via hot-melt extrusion for 3D-printing of medicines. *Pharm. Dev. Technol.* 2018, 23:10, 1117-1127.
75. Fuenmayor, E.; Forde, M.; Healy, V.A.; Devine, M.D.; Lyons, G.J.; McConville, C.; Major, I. Material considerations for fused-filament fabrication of solid dosage forms. *Pharmaceutics*, 2018, 10(2), 44.
76. Nasereddin, J.M.; Wellner, N.; Alhijaj, M.; Belton, P.; Qi, S. Development of a simple mechanical screening method for predicting the feedability of a pharmaceutical FDM 3D printing filament. *Pharm. Res.* 2018, 35, 151.
77. Elbadawi, M.; Castro, B.M.; Gavins, F.K.; Ong, J.J.; Gaisford, S.; Pérez, G.; Basit, A.W.; Cabalar, P.; Goyanes, Á. M3diseen: A novel machine learning approach for predicting the 3d printability of medicines. *Int. J. Pharm.* 2020, 590, 119837.

78. Zhao, J.; Xu, X.; Wang, M.; Wang, L. A new model of a 3D-printed shell with convex drug release profile. *Dissolut. Technol.* 2018, 25, 24–28.
79. Goyanes, A.; Fina, F.; Martorana, A.; Sedough, D.; Gaisford, S.; Basit, A.W. Development of modified release 3D printed tablets (printlets) with pharmaceutical excipients using additive manufacturing. *Int. J. Pharm.* 2017, 527, 21–30.
80. Melocchi, A.; Parietti, F.; Maccagnan, S.; Ortenzi, M.A.; Antenucci, S.; Briatico-Vangosa, F.; Maroni, A.; Gazzaniga, A.; Zema, L. Industrial development of a 3D-printed nutraceutical delivery platform in the form of a multicompartiment HPC capsule. *AAPS PharmSciTech.* 2018, 19, 3343-3354.
81. Jamróz, W.; Kurek, M.; Łyszczarz, E.; Szafraniec, J.; Knapik-Kowalczyk, J.; Syrek, K.; Paluch, M.; Jachowicz, R. 3D printed orodispersible films with Aripiprazole. *Int. J. Pharm.* 2017, 533, 413–420.
82. Ehtezazi, T.; Algellay, M.; Islam, Y.; Roberts, M.; Dempster, N.M.; Sarker, S.D. The application of 3D printing in the formulation of multilayered fast dissolving oral films. *J. Pharm. Sci.* 2018, 107, 1076–1085.
83. Fu, J.; Yu, X.; Jin, Y. 3D printing of vaginal rings with personalized shapes for controlled release of progesterone. *Int. J. Pharm.* 2018, 539, 75–82.
84. Genina, N.; Holländer, J.; Jukarainen, H.; Mäkilä, E.; Salonen, J.; Sandler, N. Ethylene vinyl acetate (EVA) as a new drug carrier for 3D printed medical drug delivery devices. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2016, 90, 53–63.
85. Okwuosa, T.C.; Pereira, B.C.; Arafat, B.; Cieszynska, M.; Isreb, A.; Alhnan, M.A. Fabricating a shell-core delayed release tablet using dual FDM 3D printing for patient-centred therapy. *Pharm. Res.* 2017, 34, 427-437.
86. Waller, D. Off-label and unlicensed prescribing for children: have we made any progress? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2007, 64, 1–2.
87. Lopez, F.L.; Ernest, T.B.; Tuleu, C.; Gul, M.O. Formulation approaches to pediatric oral drug delivery: benefits and limitations of current platforms. *Exp. Opin. Drug Deliv.* 2015, 12, 1727–1740.
88. Palekar, S.; Nukala, P.K.; Mishra, S.M.; Kipping, T.; Patel, K. Application of 3D printing technology and quality by design approach for development of age-appropriate pediatric formulation of baclofen. *Int. J. Pharm.* 2019, 556, 106-116.

89. Tehfe, M.; Louradour, F.; Lalevée, J.; Fouassier, J.P. Photopolymerization reactions: on the way to a green and sustainable chemistry. *Appl Sci.* 2013, 3, 490–514.
90. Fouassier, J.P.; Lalevée, J. Photoinitiators for Polymer Synthesis: Scope, Reactivity, and Efficiency. John Wiley & Sons: Weinheim, Germany. 2012., 3–9.
91. Raman, R.; Bashir, R. Stereolithographic 3D bioprinting for biomedical applications. *Essentials of 3D biofabrication and translation*: Elsevier, San Diego. 2015, 89-121.
92. Fiedor, P.; Pilch, M.; Szymaszek, P.; Chachaj-Brekiesz, A.; Galek, M.; Ortyl, J. Photochemical Study of a New Bimolecular Photoinitiating System for Vat Photopolymerization 3D Printing Techniques under Visible Light. *Catalysts.* 2020, 10(3), 284.
93. Schnabel, W. *Polymers and light: fundamentals and technical applications*. Wiley-VCH: Hoboken, NJ, USA. 2007.
94. Ravve, A. *Light-associated reactions of synthetic polymers*. Springer: New York, NY, USA. 2006, 23–122.
95. Colley, C.S.; Grills, D.C.; Besley, N.A.; Jockusch, S.; Matousek, P.; Parker, A.W.; Towrie, M.; Turro, N.J.; Gill, P.M.W.; George, M.W. Probing the reactivity of photoinitiators for free radical polymerization: Time-resolved infrared spectroscopic study of benzoyl radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 14952–14958.
96. Tseng, S.J.; Chien, C.C.; Liao, Z.H.; Chen, H.H.; Kang, Y.D.; Wang, C.L.; Hwu, Y.; Margaritondo, G. Controlled hydrogel photopolymerization inside live systems by X-ray irradiation. *Soft Matter.* 2012; 8, 1420–1427.
97. Grund, S.; Bauer, M.; Fischer, D. Polymers in drug delivery-state of the art and future trends. *Adv Eng Mater.* 2011, 13, 61–87.
98. Chia, H.N.; Wu, B.M. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J Biol Eng.* 2015, 9, 4.
99. Oskui, S.M.; Diamante, G.; Liao, C.; Shi, W.; Gan, J.; Schlenk, D.; Grover, W. Assessing and reducing the toxicity of 3D-printed parts. *Environ Sci Technol Lett.* 2016, 3, 1–6.

100. Wang, N.; Dong, A.; Tang, H.; Van Kirk, E.A.; Johnson, P.A.; Murdoch, W.J.; Radosz, M.; Shen, Y. Synthesis of degradable functional poly(ethylene glycol) analogs as versatile drug delivery carriers. *Macromol Biosci.* 2007, 7, 1187–1198.
101. Yu, J.; Xu, X.; Yao, F.; Luo, Z.; Jin, L.; Xie, B.; Shi, S.; Ma, H.; Li, X.; Chen, H. In situ covalently cross-linked PEG hydrogel for ocular drug delivery applications. *Int J Pharm.* 2014, 470, 151–157.
102. Nguyen, A.K.; Gittard, S.D.; Koroleva, A.; Schlie, S.; Gaidukeviciute, A.; Chichov, B.; Narayan, R.J. Two-photon polymerization of polyethylene glycol diacrylate scaffolds with riboflavin and triethanolamine used as a water-soluble photoinitiator. *Regen Med.* 2013, 8, 725–738.
103. European Patent Office. Charles W. Hull (USA). <https://www.epo.org/learningevents/european-inventor/finalists/2014/hull.html> (pristupljeno 26.02.2022.)
104. Robles Martinez, P.; Basit, A.W.; Gaisford, S. The History, Developments and Opportunities of Stereolithography. In: *3D Printing of Pharmaceuticals*. Springer International Publishing. 2018., 55-79.
105. Quan, H.; Zhang, T.; Xu, H.; Luo, S.; Nie, J.; Zhu, X. Photo-curing 3D printing technique and its challenges. *Bioact. Mater.* 2020, 5, 110–115.
106. Stansbury, J.W.; Idacavage, M.J. 3D printing with polymers: challenges among expanding options and opportunities. *Dent Mater.* 2016, 32, 54–64.
107. Gardan, J. Additive manufacturing technologies: state of the art and trends. *Int J Prod Res.* 2016, 54, 3118-3132.
108. Larush, L.; Kaner, I.; Fluksman, A.; Tamsut, A.; Pawar, A.A. 3D printing of responsive hydrogels for drug-delivery systems. *J 3D Print Med.* 2017, 1, 219–229.
109. Xu, X.; Goyanes, A.; Trenfield, S.J.; Diaz-Gomez, L.; Alvarez-Lorenzo, C.; Gaisford, S.; Basit, A.W. Stereolithography (SLA) 3D Printing of a Bladder Device for Intravesical Drug Delivery. *Mater. Sci. Eng. C.* 2021, 120, 111773.
110. Robles-Martinez, P.; Xu, X.; Trenfield, S.J.; Awad, A.; Goyanes, A. 3D-Printing of a Multi-Layered Polypill containing Six Drugs using a Novel Stereolithographic Method. *Pharmaceutics.* 2019, 11, 274-290.

111. Xu, X.; Robles-Martinez, P.; Madla, C.M.; Joubert, F.; Goyanes, A.; Basit, A.W.; Gaisford, S. Stereolithography (SLA) 3D printing of an antihypertensive polyprintlet: Case study of an unexpected photopolymer-drug reaction. *Addit. Manuf.* 2020, 33, 101071.
112. Basit, A.W.; Gaisford, S. 3D Printing of Pharmaceuticals, AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series 31. Springer, 2018.
113. Charoo, N.A.; Barakh Ali, S.F.; Mohamed, E.M.; Kuttolamadam, M.A.; Ozkan, T.; Khan, M.A.; Rahman, Z. Selective laser sintering 3D printing—an overview of the technology and pharmaceutical applications. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2020, 46, 869–877.
114. Awad, A.; Fina, F.; Trenfield, S.J.; Patel, P.; Goyanes, A.; Gaisford, S.; Basit, A.W. 3D printed pellets (Miniprintlets): A novel, multi-drug, controlled release platform technology. *Pharmaceutics*. 2019, 11(4), 148-165.
115. Barakh Ali, S.F.; Mohamed, E.M.; Ozkan, T.; Kuttolamadam, M.A.; Khan, M.A.; Asadi, A.; Rahman, Z. Understanding the effects of formulation and process variables on the printlets quality manufactured by selective laser sintering 3D printing. *Int. J. Pharm.* 2019, 570, 118651-60.
116. Fina, F.; Madla, C.M.; Goyanes, A.; Zhang, J.; Gaisford, S.; Basit, A.W. Fabricating 3D printed orally disintegrating printlets using selective laser sintering. *Int. J. Pharm.* 2018, 541, 101–107.
117. Leong, K.F.; Chua, C.K.; Gui, W.S.; Verani, Building porous biopolymeric microstructures for controlled drug delivery devices using selective laser sintering. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 2006, 31, 483–489.
118. Gueche, Y.A.; Sanchez-ballester, N.M.; Cailleaux, S.; Bataille, B.; Soulairol, I.; Selective Laser Sintering ( SLS ), a New Chapter in the Production of Solid Oral Forms (SOFs) by 3D Printing. *Pharmaceutics*. 2021, 13(8), 1212-1238.
119. Leong, K.F.; Wiria, F.E.; Chua, C.K.; Li, S.H. Characterization of a poly-epsilon-caprolactone polymeric drug delivery device built by selective laser sintering. *Biomed Mater Eng.* 2007, 17, 147-157.
120. Salmoria, G.V.; Klauss, P.; Zepon, K.; Kanis, L.A.; Roesler, C.R.M.; Vieira, L.F. Development of functionally-graded reservoir of PCL/PG by selective laser sintering for drug delivery devices. *Virtual Phys Prototyp.* 2012, 7(2), 107–115.



121. Salmoria, G.V.; Klauss, P.; Zepon, K.M.; Kanis, L.A. The effects of laser energy density and particle size in the selective laser sintering of polycaprolactone/progesterone specimens: morphology and drug release. *Int J Adv Manuf Technol.* 2012, 66(5–8), 1113–1118.
122. Salmoria, G.V.; Vieira, F.E.; Ghizoni, G.B.; Marques, M.S.; Kanis, L.A. 3D Printing of PCL Fluorouracil tablets by selective laser sintering: Properties of implantable drug delivery for cartilage cancer treatment. *Rheumatol Orthop Med.* 2017, 2(3): 1-7.
123. Fina, F.; Goyanes, A.; Gaisford, S.; Basit, A.W. Selective laser sintering (SLS) 3D printing of medicines. *Int J Pharm.* 2017, 529(1), 285–293.
124. Davis, D.A.; Thakkar, R.; Su, Y.; Williams, R.O.; Maniruzzaman, M. Selective Laser Sintering 3-Dimensional Printing as a Single Step Process to Prepare Amorphous Solid Dispersion Dosage Forms for Improved Solubility and Dissolution Rate. *J. Pharm. Sci.* 2021, 110, 1432–1443.
125. Hamed, R.; Mohamed, E.M.; Rahman, Z.; Khan, M.A. 3D-printing of lopinavir printlets by selective laser sintering and quantification of crystalline fraction by XRPD-chemometric models. *Int. J. Pharm.* 2021, 592, 120059-71.
126. Djuris, J.; Ibric, S.; Djuric, Z. Neural computing in pharmaceutical products and process development, in: *Computer-Aided Applications in Pharmaceutical Technology*. Woodhead Publishing, Cambridge, UK. 2013, 91–175.
127. Ibrić, S., Djuriš, J., Parojčić, J., Djurić, Z. Artificial Neural Networks in Evaluation and Optimization of Modified Release Solid Dosage Forms. *Pharmaceutics.* 2012, 4, 531–550.
128. Medarević, D. Karakterizacija i optimizacija binarnih i ternarnih čvrstih disperzija i ciklodekstrin-polimer sistema kao nosača u cilju poboljšanja brzine rastvaranja teško rastvorljive lekovite supstance, doktorksa disertacija. 2015. Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet.
129. Elbadawi, M.; McCoubrey, L.E.; Gavins, F.K.H.; Ong, J.J.; Goyanes, A.; Gaisford, S.; Basit, A.W. Harnessing artificial intelligence for the next generation of 3D printed medicines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021, 175, 113805-19.

130. Bannigan, P.; Aldeghi, M.; Bao, Z.; Häse, F.; Aspuru-Guzik, A.; Allen, C. Machine learning directed drug formulation development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021, 175, 113806-16.
131. Gongora, A.E.; Xu, B.; Perry, W.; Okoye, C.; Riley, P.; Reyes, K.G.; Morgan, E.F.; Brown, K.A. A Bayesian experimental autonomous researcher for mechanical design. *Sci. Adv.* 2020, 6, 1-6.
132. Ruberu, K.; Senadeera, M.; Rana, S.; Gupta, S.; Chung, J.; Yue, Z.; Venkatesh, S.; Wallace, G. Coupling machine learning with 3D bioprinting to fast track optimisation of extrusion printing. *Appl. Mater. Today.* 2021, 22, 100914.
133. Madzarevic, M.; Medarevic, D.; Vulovic, A.; Sustersic, T.; Djuris, J.; Filipovic, N.; Ibric, S. Optimization and Prediction of Ibuprofen Release from 3D DLP Printlets Using Artificial Neural Networks. *Pharmaceutics.* 2019, 11(10), 544.
134. European Pharmacopoeia. Ed. 11.0. Strasbourg: EDQM Council of Europe; 2023. Atomoxetine hydrochloride; p. 2009.
135. Compound summary Atomoxetine hydrochloride <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atomoxetine#section=Dissociation-Constants> (datum pristupa 19.03.2023.)
136. Odobreni sažetak karateristika lijeka; <https://www.halmed.hr/en/Lijekovi/Baza-lijekova/Attoxem-18-mg-tvrde-kapsule/16161/> (datum pristupa 15.03.2023.)
137. Sweetman, S.C. Martindale, 36th ed.; Pharmaceutical Press: London, UK, 2009.
138. National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance. Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Diagnosis and Management of ADHD in Children, Young People and Adults. National Collaborating Centre for Mental Health (UK). Leicester: British Psychological Society, 2018.
139. Krkobabić, M.; Medarević, D.; Pešić, N.; Vasiljević, D.; Ivković, B.; Ibrić, S. Digital Light Processing (DLP) 3D Printing of Atomoxetine Hydrochloride Tablets Using Photoreactive Suspensions. *Pharmaceutics*, 2020, 12, 833.
140. Kadry, H.; Wadnap, S.; Xu, C.; Ahsan, F. Digital light processing (DLP) 3D-printing technology and photoreactive polymers in fabrication of modified-release tablets. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2019, 135, 60–67.

141. Pelras, T.; Glass, S.; Scherzer, T.; Elsner, C.; Schulze, A.; Abel, B. Transparent low molecular weight poly(ethylene glycol) diacrylate-based hydrogels as film media for photoswitchable drugs. *Polymers (Basel)*. 2017, 9, 639-653.
142. Fernández-García, R.; Prada, M.; Bolás-Fernández, F.; Ballesteros, M.P.; Serrano, D.R. Oral fixed-dose combination pharmaceutical products: Industrial manufacturing versus personalized 3D printing. *Pharm. Res.* 2020, 37, 1-22.
143. Krkobabić, M.; Medarević, D.; Cvijić, S.; Grujić, B.; Ibrić, S. Hydrophilic excipients in digital light processing (DLP) printing of sustained release tablets: Impact on internal structure and drug dissolution rate. *Int. J. Pharm.* 2019, 572, 118790.
144. Bracken, L.; McDonough, E.; Ashleigh, S.; Wilson, F.; Shakeshaft, J.; Ohia, U.; Mistry, P.; Jones, H.; Kanji, N.; Liu, F. Can children swallow tablets? Outcome data from a feasibility study to assess the acceptability of different-sized placebo tablets in children (creating acceptable tablets (CAT)). *BMJ Open*. 2020, 10, e036508.
145. Healy, A.V.; Fuenmayor, E.; Doran, P.; Geever, L.M.; Higginbotham, C.L.; Lyons, J.G. Additive Manufacturing of Personalized Pharmaceutical Dosage Forms via Stereolithography. *Pharmaceutics*. 2019, 11, 645-665.
146. Stephenson, G.A.; Liang, C.; Structural determination of the stable and meta-stable forms of atomoxetine HCl using single crystal and powder X-ray diffraction methods. *J. Pharm. Sci.* 2006, 95, 1677–1683.
147. Banerjee, A.; Blasiak, B.; Pasquier, E.; Tomanek, B.; Trudel, S. Synthesis, characterization, and evaluation of PEGylated first-row transition metal ferrite nanoparticles as T2 contrast agents for high-field MRI. *RSC Adv.* 2017, 7, 38125–38134.
148. Diaz, D.A.; Colgan, S.T.; Langer, C.S.; Bandi, N.; Likar, M.D.; Van Alstine, L. Erratum to: Dissolution Similarity Requirements: How Similar or Dissimilar Are the Global Regulatory Expectations? *AAPS J.* 2016, 18, 15-22.
149. Franca, C.A.; Etcheverry, S.B.; Diez, R.P.; Williams, P.A.M. Irbesartan: FTIR and Raman spectra. Density functional study on vibrational and NMR spectra. *J. Raman Spectrosc.* 2006, 40, 1296–1300.

150. Akinosho, H.; Hawkins, S.; Wicker, L. Hydroxypropyl methylcellulose substituent analysis and rheological properties. *Carbohydr. Polym.* 2013, 98, 276–281.
151. Bashir, S.; Zafar, N.; Lebaz, N.; Mahmood, A.; Elaissari, A. Hydroxypropyl methylcellulose-based hydrogel copolymeric for controlled delivery of galantamine hydrobromide in Dementia. *Processes* 2020, 8, 1–21.
152. Rajbanshi, K.; Bajracharya, R.; Shrestha, A.; Thapa, P. Dissolution enhancement of aceclofenac tablet by solid dispersion technique. *Int. J. Pharma Sci. Res.* 2014, 5, 127–139.
153. Mohamed, E.M.; Barakh Ali, S.F.; Rahman, Z.; Dharani, S.; Ozkan, T.; Kuttolamadam, M.A.; Khan, M.A. Formulation Optimization of Selective Laser Sintering 3D-Printed Tablets of Clindamycin Palmitate Hydrochloride by Response Surface Methodology. *AAPS PharmSciTech.* 2020, 21, 232-247.

## BIOGRAFIJA

Gordana Stanojević (djevojačko Boljević) je rođena 27.11.1989. godine u Podgorici, gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju kao dobitnik diplome Luča I. Farmaceutski fakultet u Podgorici upisala je 2008. godine i diplomirala u roku sa prosječnom ocjenom 9,99. Kao student bila je dobitnik više nagrada i stipendija, među kojima se izdvajaju Studentska nagrada glavnog grada Podgorice za najbolje studente 2010. godine, te stipendija Ministarstva prosvjete i nauke za talentovane studente.

Nakon obavljenog pripravničkog staža zasniva radni odnos u apoteci, a od 2015. godine zaposlena je u Institutu za lijekove i medicinska sredstva, gdje je od oktobra 2021. godine rukovoditeljka Centra za odobravanje lijekova.

U periodu od 2013. do 2023. godine bila je angažovana kao saradnik u nastavi na Medicinskom fakultetu u Podgorici, na studijskom programu Farmacija, gdje je učestvovala u izvođenju praktične nastave na predmetima Farmaceutska tehnologija I, II i III i Osnovi industrijske farmacije.

Član je Komisije Ministarstva zdravlja za polaganje stručnog ispita za farmaceute i predstavnik Crne Gore u Komisiji Evropske farmakopeje pri Evropskom direktoratu za kvalitet lijekova (EDQM).

**Prilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisana: Gordana Stanojević

Broj indeksa/upisa: 11117

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom

“Primjena odabranih tehnika 3D štampe u izradi tableta za personalizovanu terapiju”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija ni u cjelini ni u djelovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih ustanova visokog obrazovanja, da su rezultati korektno navedeni, i
- da nijesam povrijedila autorska i druga prava intelektualne svojine koja pripadaju trećim licima.

U Podgorici, 07.03.2024.

Potpis doktoranda

Gordana Stanojević

Prilog 2.

**Izjava o istovjetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

**Ime i prezime autora:** Gordana Stanojević

**Broj indeksa/upisa:** 111/17

**Studijski program:** Doktorski studijski program Farmacija (Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore)

**Naslov rada:** "Primjena odabranih tehnika 3D štampe u izradi tableta za personalizovanu terapiju"

**Mentor:** prof. dr Svetlana Ibrić

**Potpisana:** Gordana Stanojević

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore.

Istovremeno izjavljujem da dozvoljavam objavljivanje mojih ličnih podataka u vezi sa dobijanjem akademskog naziva doktora nauka kao što su ime i prezime, godina i mjesto rođenja, naziv disertacije i datum odbrane rada.

U Podgorici, 07.03.2024.

Potpis doktoranda

*Gordana Stanojević*

### Prilog 3.

#### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku da u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore pohrani moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**Primjena odabranih tehnika 3D štampe u izradi tableta za personalizovanu terapiju**

koja je moje autorsko djelo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom format pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
- ☒ 2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

U Podgorici, 07.03.2024.

Potpis doktoranda

