

Ivona Pepić

***In vitro* ispitivanja oslobađanja diltiazemklorida
iz liposomskih gelova**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Oblikovanje lijekova, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vanić.

Zahvala:

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Željki Vanić, mojoj mentorici i prije svega divnoj osobi, na strpljenju, potpori i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Beskonačno hvala mojim roditeljima što su mi omogućili ovaj studij te svojom ljubavlju, strpljenjem i savjetima pomogli da ga privedem kraju.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Konvencionalni i propilenglikol liposomi.....	1
1.2. Hidrogelovi.....	3
1.2.1. Celulozni hidrogelovi.....	4
1.2.2. Kitozan.....	5
1.3. Analna fisura.....	6
1.4. Diltiazem.....	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1. Materijali.....	11
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Priprava liposoma.....	12
3.2.1.1. Priprava propilenglikol liposoma s diltiazemkloridom.....	12
3.2.1.2. Priprava konvencionalnih liposoma s diltiazemkloridom.....	12
3.2.2. Mjerenje veličine i indeksa polidisperznosti liposoma.....	13
3.2.3. Mjerenje zeta potencijala.....	13
3.2.4. Određivanje uspješnosti uklapanja diltiazemklorida u liposome.....	13
3.2.5. Priprava kitozanskog gela.....	14
3.2.6. Uklapanje liposoma s diltiazemkloridom u kitozanski hidrogel.....	15
3.2.7. Uklapanje liposoma s diltiazemkloridom u hidroksietilcelulozni hidrogel.....	15
3.2.8. Ispitivanje <i>in vitro</i> oslobađanja diltiazemklorida iz liposoma uklopljenih u kitozanski i hidroksietilcelulozni hidrogel	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4.1. Karakterizacija liposoma s diltiazemkloridom.....	17
4.2. Određivanje uspješnosti uklapanja diltiazemklorida u liposome.....	18

4.3. Ispitivanje <i>in vitro</i> oslobađanja diltiazemklorida iz liposoma u hidrogelu.....	19
5. ZAKLJUČCI.....	24
6. LITERATURA.....	25
7. SAŽETAK/ SUMMARY.....	28

1. UVOD

1.1. Konvencionalni i propilenglikol liposomi

Liposomi su sferične, fosfolipidne tvorevine u kojima je unutarnja, vodena faza obavijena s jednom ili više koncentrično položenih fosfolipidnih membrana. Promjer im se kreće od 20-ak nm do 10-ak μm . Osnovnu građevnu jedinicu liposoma čine molekule fosfolipida. Riječ je o amfipatskim molekulama koje su u ovojnici liposoma složene u obliku dvosloja pri čemu su polarne, hidrofilne „glave“ orijentirane prema vanjskoj i unutarnjoj vodenoj fazi, zaklanjajući nepolarne, lipofilne „repove“ (lanci masnih kiselina) jednog prema drugome. Osim fosfolipida, ovojnica liposoma često sadrži kolesterol koji se ugrađuje unutar dvosloja između lipofilnih „repova“ fosfolipida te povećava njegovu čvrstoću (rigidnost) (Banović i sur., 2011).

Strukturna svojstva liposoma omogućuju uklapanje hidrofilnih, lipofilnih i amfipatskih lijekova te makromolekula poput proteina. Zbog svoje sličnosti s biološkim membranama, neimunogenosti i biorazgradljivosti, u potpunosti su fiziološki prihvatljivi što im osigurava primjenu u različitim terapijskim područjima. Primijenjeni parenteralno liposomi su najviše ispitivani za liječenje tumorskih i infektivnih oboljenja, vakcinaciju te dijagnostiku oboljenja organa u kojima se nakupljaju (jetra, slezena). Veliki dio ispitivanja odnosi se na primjenu liposoma kao terapijskih (nano)sustava za lokalnu primjenu na kožu i sluznice (Vanić, 2012).

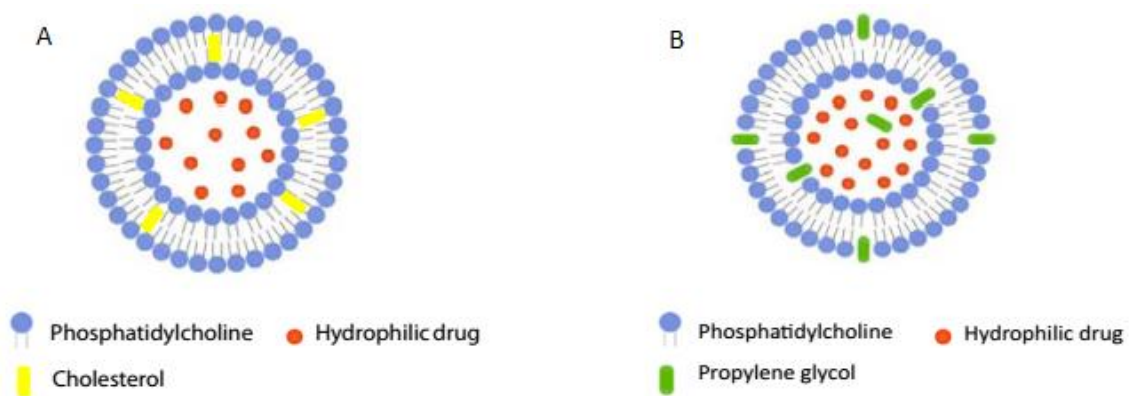
Konvencionalni liposomi (Slika 1A) su prva generacija liposoma (bez modifikacija na površini), a karakterizirani su relativno rigidnim dvoslojevima. Često su ispitivani za lokalnu primjenu lijekova na kožu, no budući je dokazano da se najvećim dijelom zadržavaju na površini rožnatog sloja kože te slabo dostavljaju uklopljeni lijek u niže slojeve epidermisa (Elsayed i sur., 2007), razvijene su novije generacije tzv. elastičnih (deformabilnih) liposoma. Kao što i sam naziv kaže, dvoslojevi elastičnih liposoma su podložni deformaciji zbog prisustva jednolančanih surfaktanata, etanola ili poliola (propilenglikol) u formulaciji (Vanić i sur., 2015).

Deformabilni liposomi, u literaturi poznati i kao Transferosomi[®] (elastični, fleksibilni ili ultrafleksibilni liposomi) su sastavljeni od fosfolipida i rubnog aktivatora (jednolančanog surfaktanta) koji destabilizira dvosloj vezikule povećavajući njegovu elastičnost i permeabilnost. Dizajnirani su kako bi se poboljšala (trans)dermalna dostava lijeka. Dva su mehanizma poboljšane dostave uklopljenog lijeka u/kroz kožu: prolaz intaktnih vezikula i poticanje prolaska lijeka kroz kožu. Prvi mehanizam zahtijeva neokluzivne uvjete i postojanje

osmotskog gradijenta koji nastaje zbog razlike u koncentraciji vode na površini i u dubljim slojevima kože. U takvim uvjetima suspenzija liposoma isparava na koži, a vezikule ostaju djelomično dehidrirane. Da bi zadržale svoj oblik, slijede koncentracijski gradijent koji ih nosi do dubljih, više hidratiziranih dijelova epidermisa, a svojstvo elastičnosti membrane omogućuje da intaktni prođu između stanica rožnatog sloja. Drugi mehanizam pretpostavlja da pri interakciji liposoma s kožom, lipidi iz ovojnice liposoma modificiraju intercelularne lipide rožnatog sloja čime se olakšava prolaz oslobođenim molekulama lijeka kroz kožu.

U usporedbi s odgovarajućim konvencionalnim liposomima, deformabilni liposomi su manjeg promjera i mogu uklopiti manju količinu lijeka.

Značajno manji od konvencionalnih liposoma istog fosfolipidnog sastava su i etosomi, sastavljeni od fosfolipida, vode i etanola (20-40%) koji uzrokuje negativan naboj na površini što smanjuje veličinu vezikule. Budući da etanol povećava fleksibilnost lipidnog dvosloja i topljivost većine lijekova, etosomi posjeduju visoku uspješnost uklapanja lijeka. Potencijalni su nosači lijekova za (trans)dermalnu primjenu, ali u odnosu na Transferosome®, jednako su učinkoviti u okluzivnim i neokluzivnim uvjetima (Banović i sur., 2012).



Slika 1: Shematski prikaz konvencionalnih (A) i propilenglikol liposoma (B) (Vanić, 2015)

Propilenglikol liposomi (Slika 1B) su noviji tip fosfolipidnih vezikula, pripremljeni iz fosfolipida, propilenglikola i vode. Zbog prisutnog propilenglikola poboljšana je uspješnost uklapanja slabije topljivih lijekova u vodi kao rezultat povećane topljivosti tih lijekova u propilenglikolu. Poboljšana je i stabilnost liposoma tijekom uskladištenja. Primjerice, za lokalnu terapiju gljivične infekcije, Elmoslemany i sur. (2012) su pripremili propilenglikol liposome s mikonazolnitratom. U usporedbi s konvencionalnim liposomima istog

fosfolipidnog sastava dokazano je da propilenglikol liposomi imaju bolju uspješnost uklapanja, stabilnost, antifungalnu aktivnost te se bolje odlažu u kožu. Prisustvo propilenglikola u liposomima također je rezultiralo smanjenjem promjera liposoma i indeksa polidisperznosti što upućuje na interakciju propilenglikola s fosfolipidnim dvoslojem, omogućujući njegovu veću fleksibilnost (elastičnost, deformabilnost) i manji promjer (Elmoslemany i sur., 2012).

Odabirom fosfolipida, prisustvom kolesterola ili jednolančanih surfaktanata u fosfolipidnom dvosloju i dodatkom suotapala (etanol, propilenglikol) moguće je dobiti liposome odgovarajućih fizičko-kemijskih svojstava za učinkovitu topikalnu dostavu lijekova (Vanić i sur., 2015). Budući da su liposomi tekući oblici, niska viskoznost formulacije može biti ograničavajući parametar njihove topikalne primjene. Odgovarajuću viskoznost liposomskih formulacija za topikalnu primjenu moguće je postići uklapanjem u prikladnu podlogu (*vehikulum*) poput hidrogelova ili krema (Pavelić i sur., 2001; Vanić i sur., 2014; Palac i sur., 2015).

1.2. Hidrogelovi

Hidrogelovi su farmaceutski oblici koji nastaju fizikalnim ili kemijskim umrežavanjem polimernih lanaca u vodi što dovodi do stvaranja porozne trodimenzionalne strukture. Polimerni lanci imaju veliku moć upijanja vode prilikom čega se ne otapaju, nego bubre. To je omogućeno prisustvom hidrofilnih funkcionalnih skupina u njihovoj strukturi kao što su $-OH$, $-COOH$, $-CONH_2$ i $-SO_3H$. Glavne karakteristike hidrogelova koje određuju njihovu primjenu su njihova morfološka i mehanička svojstva te bubrenje. Morfološka svojstva odnose se na njihovu poroznu strukturu. Stupanj bubrenja određuje mehanizam oslobađanja lijeka iz polimernog matriksa, dok mehanička svojstva formirane 3D-mreže određuju postojanost cjelokupnog sustava za dostavu lijeka, ali i kompatibilnost s okolnim tkivom na mjestu primjene (Šoljić Jerbić, 2017).

Sadržaj vode u hidrogelovima je visok (80 do 90%), zbog čega lako podliježu kontaminaciji mikroorganizmima pa se moraju konzervirati. Hidrogelovi često sadrže omekšivače u koncentraciji od 10 do 20% poput glicerola, sorbitola, etilenglikola ili propilenglikola. Te ih tvari štite od isušivanja i poboljšavaju im razmazivost (Senjković, 1994). U farmaciji se

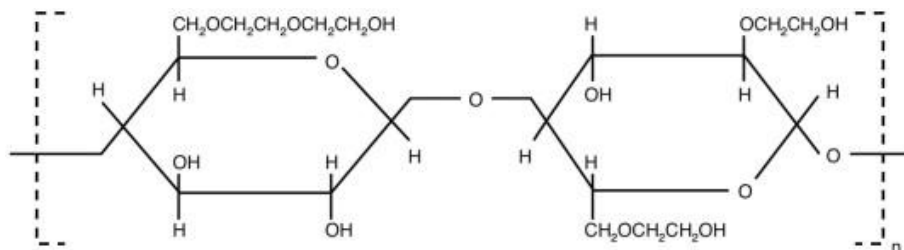
hidrogelovi primjenjuju kao polučvrsti oblici za sistemsku i lokalnu dostavu lijekova. Mogu se primijenjivati oralno, okularno, nazalno, vaginalno i supkutano (Ahmadi i sur., 2015).

Najčešće korišteni polimeri sposobni formirati hidrogelove su sintetski poliakrilati, polikarbofil (Carbopol®), derivati celuloze (hidroksietil-, hidroksimetil- i hidroksipropilmetilceluloza), derivati hijaluronske kiseline, pektin, tragakant, karagenan, alginat te kitozan (Acartürk, 2009).

1.2.1. Celulozni hidrogelovi

Hidrogelovi derivata celuloze nastaju bubrenjem celuloznih etera kao što su metilceluloza (MC), hidroksipropilmetilceluloza (HPMC), etilceluloza (EC), hidroksietilceluloza (HEC) i natrijkarboksimetilceluloza (NaCMC) u vodi. Kompatibilni su sa solima za razliku od polimera poliakrilne kiseline (Carbopol®, Carbomer®) i geliraju u širokom pH području. Uvelike se primjenjuju kao sredstva za zgušnjavanje ili emulgatori u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji zahvaljujući netoksičnosti i niskoj cijeni. Ovisno o upotrijebljenom derivatu celuloze, pri formiranju hidrogelova dodaju se sredstva za umrežavanje i to najčešće epikloridrin, reagensi na bazi aldehida, derivati uree, karbodiimidi i određene karboksilne kiseline poput limunske kiseline (Sannino i sur., 2009).

Hidroksietilceluloza (Slika 2) je u vodi topljiv, neionogeni polimer. Industrijska priprema uključuje obradu čiste celuloze otopinom natrijevog hidroksida pri čemu dolazi do njezinog bubrenja. Nakon što takva celuloza reagira s plinovitim etilenoksidom, slijedi niz reakcija eterifikacije u kojima se vodikovi atomi celuloze zamjenjuju hidroksietilnom skupinom pri čemu nastaje hidroksietilceluloza (Abdel-Halim, 2014).



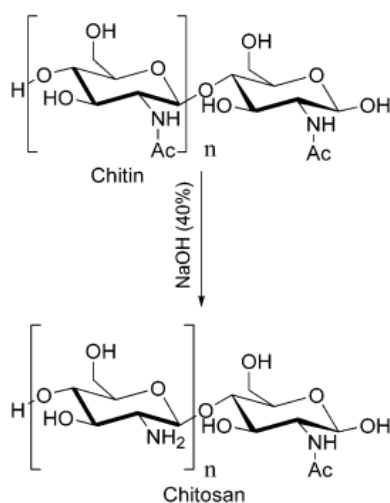
Slika 2: Struktura hidroksietilceluloze (Abdel-Halim, 2014)

Hidroksietilceluloza bubri u vodi i posjeduje dobra mukoadhezivna svojstva. Gelirajuće je sredstvo koje nema kiselih skupina pa bubrenje ne ovisi o ionskoj snazi medija. Hidrogel

pripravljen iz hidroksietilceluloze je matriksni sustav koji omogućuje postupno oslobađanje uklopljenih djelatnih tvari (lijekova) (Acartürk, 2009).

1.2.2. Kitozan

Kitozan je polikationski biopolimer specifične strukture i svojstava. Sadrži više od 5000 glukozaminskih jedinica, a dobiva se iz hitina alkalnom deacetilacijom (Slika 3).



Slika 3: Priprema kitozana iz hitina (Rabea i sur., 2003)

Kitozan je netopljiv u vodi ($\text{pK}_a=6,5$), ali je topljiv u razrijeđenim organskim kiselinama (octena, mravlja, mliječna). Viskoznost otopine kitozana ovisi o stupnju deacetilacije, molekularnoj masi, koncentraciji, ionskoj jakosti, pH i temperaturi (Rabea i sur., 2003).

Zbog prisutnosti amino skupina u molekuli kitozana dolazi do adhezije polimera na negativno nabijenu biološku površinu (sluznice). Time se omogućuje dulje zadržavanje formulacije na mjestu primjene i stvaraju uvjeti za učinkovitu lokalnu dostavu lijeka. Kitozan ima velikog potencijala za oblikovanje različitih farmaceutskih pripravaka zahvaljujući dobroj bioadhezivnosti, biokompatibilnosti i biorazgradljivosti, ali i biološkim učincima: bakteriostatskim, hemostatskim svojstvima te učinkom na zacjeljivanje rana. Naime, pokazalo se da kitozanski gelovi ubrzavaju obnovu vezivnog tkiva i time proces cijeljenja rana (Alsarra, 2009). Pretpostavljeni mehanizam zacjeljivanja je infiltracija upalnih stanica kao što su polimorfonuklearni leukociti, sekrecija upalnih medijatora kao npr. faktora tumorske nekroze alfa ($\text{TNF}\alpha$), migracija makrofaga i porast količine kolagena. Vežanje N-acetil-D-glukozamina, dijela kitozana, na specifične receptore u tijelu povećava aktivaciju makrofaga

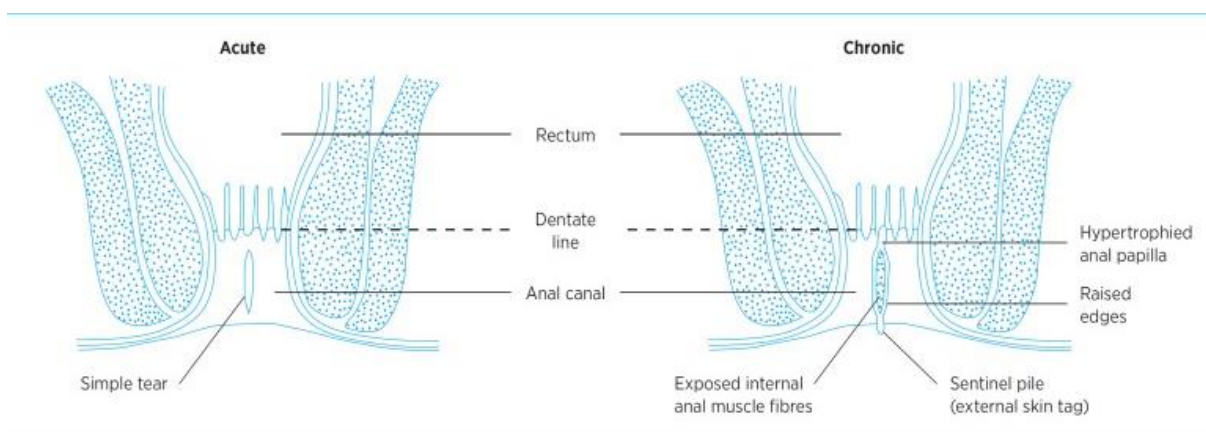
što rezultira otpuštanjem bioloških medijatora. Dodatno, kitozan aktivira sustav komplementa i potiče fibroblaste na otpuštanje interleukina 8 i drugih citokina (Ahmadi i sur., 2015).

Antimikrobna aktivnost kitozana pretpostavlja tri mehanizma od kojih je najprihvatljiviji ionska interakcija između pozitivno nabijenog kitozana i negativno nabijene membrane bakterijske stanice što rezultira većom permeabilnošću membrane i gubitkom staničnog sadržaja. U pravilu, što je molekulska masa i stupanj deacetilacije kitozana niži, veća je njegova učinkovitost na redukciju rasta i replikacije mikroorganizama (Goy i sur., 2009).

Kitozan se uvelike istražuje za pripremu mikro- i nano- čestica u koje se uklapaju djelatne tvari. Takve čestice bubre u kiselom mediju omogućujući postepeno oslobađanje uklopljenog lijeka (djelatne tvari), a njihova relativno visoka hidrofobnost olakšava intestinalnu apsorpciju (Valle i sur., 2017).

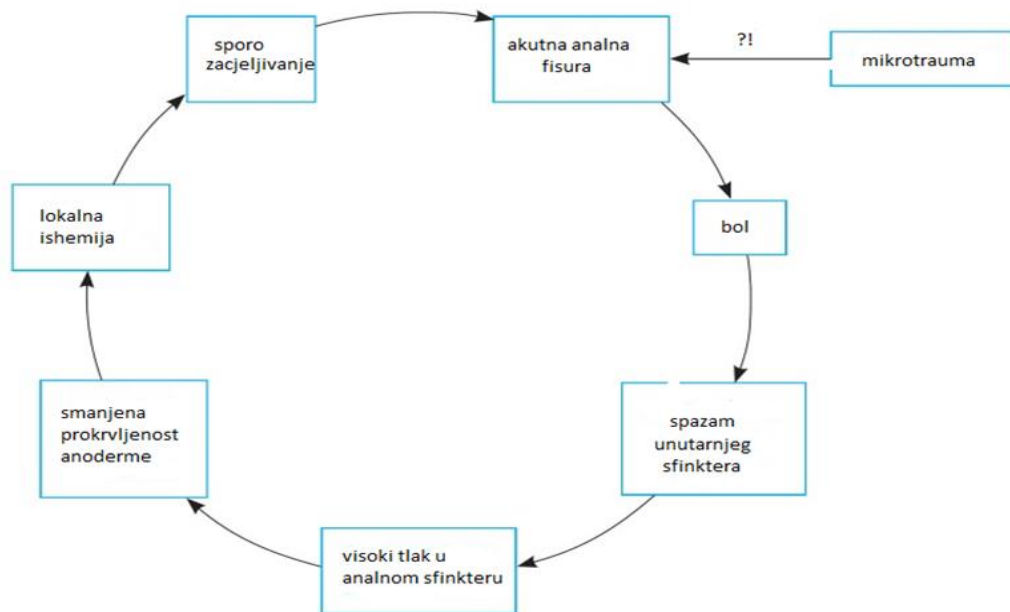
1.3. Analna fisura

Analna fisura (Slika 4) je uzdužni rascjep u epitelu analnog kanala koji se proteže od ruba anusa distalno prema nazubljenoj liniji (*linia dentata*). Karakterizirana je krvarenjem te veoma jakom boli u predjelu rektuma za vrijeme i nakon defekacije. S obzirom na mehanizam nastanka, fisure se dijele na primarne i sekundarne, te mogu biti akutne i kronične (Wald i sur., 2016).



Slika 4: Shematski prikaz analne fisure (Schlichtemeier i sur., 2016)

Patofiziologija analnih fisura (Slika 5) nije u potpunosti razjašnjena. Pretpostavlja se da akutna ozljeda (mikotrauma) dovodi do lokalne boli i spazma unutarnjeg analnog sfinktera. Taj spazam i posljedični visoki tlak u analnom sfinkteru rezultira smanjenim protokom krvi, ishemijom i slabim zacjeljivanjem. Dok se taj ciklus ne prekine, fisura će perzistirati. Stoga je terapija usmjerena na prekidanje zatvorenog kruga, prvenstveno na smanjenje spazma, relaksacijom analnog sfinktera i osiguravanjem boljeg protoka krvi u području fisure čime je moguće njezino zacjeljivanje (Schlichtemeier i sur., 2016).



Slika 5: Patofiziološki ciklus analne fisure (Schlichtemeier i sur., 2016)

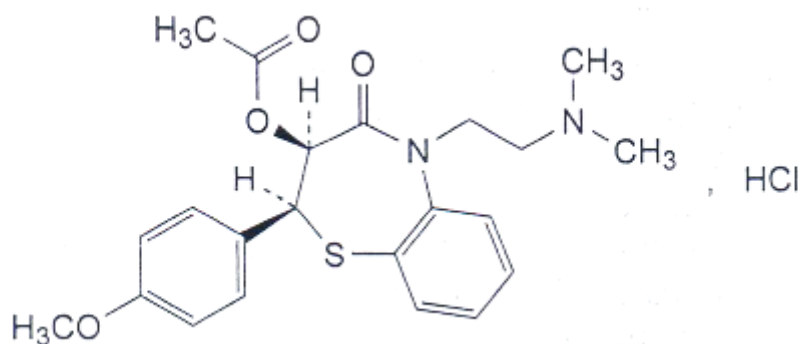
Prva linija liječenja, uz preporučeni pojačani unos vlakana i tople sjedeće kupke, obično uključuje lijekove za topikalnu primjenu. Pripravci koji se koriste u kliničkoj praksi sadrže kao djelatnu tvar gliceriltrinitrat ili blokator kalcijevog kanala. Uobičajena terapija uključuje primjenu 0,2% gliceriltrinitrata u obliku masti ili 2% diltiazemklorida u obliku hidrogela 2 puta dnevno tijekom 6-8 tjedana (Wald i sur., 2014). Glavno ograničenje topikalne primjene gliceriltrinitrata je glavobolja i vrtoglavica uslijed sistemske apsorpcije što rezultira prijevremenim prekidom terapije kod 20-30% pacijenata. Glavobolje se u sličnom postotku pojavljuju i kod pacijenata na lokalnoj terapiji blokatorom kalcijevog kanala, ali s manjom učestalošću pa je terapija podnošljivija (Nelson i sur., 2012).

Drugi topikalni pripravci obično korišteni u kliničkoj praksi sadrže lignokain i hidrokortizon. Međutim, oni imaju niži stupanj izliječenja u odnosu na dijetalna vlakna i tople sjedeće kupke (Jensen, 1986). Postoji još nekoliko lijekova za topikalnu primjenu koji se istražuju u terapiji analnih fisura, kao što su: betanekol, indoramin, minoksidil i sildenafil. Međutim, rezultati ispitivanja djelotvornosti ovih lijekova ne podupiru njihovu primjenu kao što ne podupiru niti oralnu primjenu blokatora kalcijevog kanala (Wald i sur, 2014). U kliničkoj praksi, botulin toksin se koristi kao druga linija liječenja. Dostupni literaturni podaci o botulinu pokazuju da ove injekcije imaju sličan učinak kao i gliceriltrinitrat i blokatori kalcijevih kanala (Nelson i sur, 2012).

Ukoliko topikalna primjena ne rezultira zacjeljenjem i fisura prijeđe u kroničnu, obično je potreban kirurški zahvat (Wald i sur., 2014).

1.4. Diltiazem

Diltiazem (Slika 6) je derivat benzotiazepina. Obično se koristi u obliku hidroklorida. Bijeli je, kristaliničan prah, topljiv u vodi, metanolu i diklormetanu, a slabo topljiv u etanolu (European Pharmacopoeia 8.0., 2014).



Slika 6: Kemijska struktura diltiazemklorida (European Pharmacopoeia 8.0., 2014)

Diltiazem je blokator kalcijevih kanala i vazodilatator. Sprječava dotok ekstracelularnog kalcija kroz spore kanale smještene na staničnoj membrani glatkih mišića. Primarno se koristi u oralnoj terapiji hipertenzije i angine pektoris. Nakon oralne primjene,

diltiazem se gotovo u potpunosti apsorbira. Podliježe ekstenzivnom metabolizmu u jetri, primarno deacetilacijom. Glavni metabolit je dezacetildiltiazem. Izlučuje se uglavnom fecesom i to 2-4% u nepromijenjenom obliku, većina kao metaboliti. Izlučuje se u majčino mlijeko u količinama jednakim onima u serumu pa se primjena diltiazema ne preporučuje tijekom perioda dojenja (<http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-09-02-39.pdf>).

Diltiazem se također primjenjuje topikalno za liječenje analnih fisura kod odraslih pacijenata u obliku 2% kreme/gela, 2 puta dnevno tijekom 8 tjedana. Studije učinkovitosti doze pokazale su da koncentracija od 2% diltiazemklorida u polučvrstoj podlozi uspješno reducira spazam unutarnjeg analnog sfinktera bez značajnijih nuspojava (Knight i sur., 2001).

Prema preporuci *Hertfordshire Medicines Management Committee* (HMMC), diltiazem je treća linija liječenja ukoliko prva linija suportivnim (nefarmakološkim) metodama (pojačani unos vlakana i tople sjedeće kupke) te druga linija s 0,2% gliceriltrinitrata (GTN) u obliku masti nisu učinkovite ili podnošljive (http://www.enhertscg.nhs.uk/sites/default/files/Pharmacy/Local_Decisions/Diltiazem%20for%20anal%20fissures%20201306%20%28HMMC%29.pdf). Nelson i sur. (2012) su u preglednom radu ukazali na prednost topikalno primijenjene masti gliceriltrinitrata pred placebo (50% vs. 36%) u liječenju analne fisure. Jednaku učinkovitost u odnosu na placebo imao je i topikalni pripravak diltiazema, ali s manjom učestalošću nuspojava (glavobolje) nego gliceriltrinitrat, tj. boljom podnošljivošću. Oba lijeka doprinose zacjeljenju fisure zbog opuštanja unutarnjeg analnog sfinktera. Glavne nuspojave zabilježene tijekom primjene 2% diltiazemklorida u obliku kreme su blaga glavobolja, perianalni svrbež i perianalni dermatitis.

Na našem tržištu registrirani pripravci diltiazemklorida su dostupni samo u obliku tableta od 60 i 90 mg, a indicirani su za terapiju angine pectoris i hipertenzije (<http://www.halmed.hr/>).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Liječenje analne fisure se većinom provodi topikalnim magistralnim pripravkom 2% diltiazemklorida koji se izrađuje u obliku hidroksietilceluloznog gela. Budući da je kod 20-30% pacijenata koji primjenjuju ovaj pripravak primijećena glavobolja kao posljedica neželjene sistemske apsorpcije lijeka (Nelson i sur., 2012), opravdana je potreba za razvojem topikalne formulacije koja će omogućiti polagano oslobađanje diltiazemklorida iz podloge čime bi se postigao veći lokalni učinak i izbjegle neželjene nuspojave.

Liposomi su pokazali veliki potencijal u poboljšanju topikalne dostave hidrofilnih lijekova na kožu i sluznice (Palac i sur., 2015; Vanić i Škalko-Basnet, 2013). Uklapanjem diltiazemklorida u liposome moglo bi se postići produljeno oslobađanje uklopljenog lijeka, a prikladnu viskoznost za primjenu moguće je postići uklapanjem liposoma u kitozanski hidrogel. Zbog dobre mukoadhezivnosti kitozana osiguralo bi se dulje zadržavanje liposoma s uklopljenim diltiazemkloridom na mjestu primjene, tj. analnoj fisuri. Imajući u vidu patofiziologiju analne fisure (Schlichtemeier i sur., 2016), antimikrobni učinak kitozana (Goy i sur., 2009) te povoljno djelovanje kitozanskog hidrogela na zacjeljivanje rana (Alsarra, 2009), pretpostavlja se da bi se ovim pripravkom značajno poboljšala topikalna terapija analne fisure.

Stoga su istraživanja u ovom radu bila usmjerena na pripravu i karakterizaciju liposoma s diltiazemkloridom uklopljenim u kitozanski hidrogel.

Pripravljena su dva tipa liposoma, konvencionalni i elastični - propilenglikol liposomi te provedena njihova fizikalna karakterizacija: određivanje srednjeg promjera, distribucija veličina liposoma (indeks polidisperznosti) i uspješnosti uklapanja diltiazemklorida u oba tipa liposoma.

Kitozanski hidrogel pripremljen je iz kitozana velike molekulske mase, određen je pH hidrogela te provedeno ispitivanje oslobađanja diltiazemklorida iz liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel. Ispitivanja su također provedena s komercijalno dostupnim hidroksietilceluloznim gelom (određivanje pH, ispitivanje oslobađanja lijeka iz liposoma uklopljenim u hidroksietilcelulozni gel). Rezultati su uspoređeni međusobno i s kontrolom koju je predstavljao diltiazemklorid-u-hidroksietilceluloznom gelu te diltiazemklorid-u-kitozanskom hidrogelu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Instrumenti i pribor:

- polikarbonatni membranski filteri, 400 nm (Lipsofast, Avestin, Kanada)
- ručni mini-ekstruder (LipsoFast Basic[®], Avestin Inc., Avestin, Kanada)
- crijeva za dijalizu (Dialysis Tubing Visking, Medicell International Ltd., London, Velika Britanija, Mw cut-off 12-14 000 Da)
- filteri veličine pora 0,45 µm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka)
- pH metar (Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj (Branson 1210, Emerson, Sjedinjene Američke Države)
- UV/Vis spektrofotometar (Ultrospect Plus, Pharmacia LKB, Cambridge, Velika Britanija)
- Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija)

Kemikalije:

- Lipoid S75, tj. sojin lecitin (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- Phospholipon H (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- diltiazemklorid (Fagron, Barsbüttel, Belgija)
- Hidroksietilcelulozni gel, pH 4,6 (Caelo, Hilden, Njemačka)
- kitozan velike molekulske mase (Fluka, SAD)
- etanol (96%), metanol i propilenglikol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ledena octena kiselina (Alkaloid, Skopje)
- glicerol (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- agaroz (Sigma-Aldrich, SAD)
- fosfatni pufer, pH 6,8

Fosfatni pufer pripremljen je otapanjem 1g KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska), 2,0 g K_2HPO_4 i 8,5 g NaCl u destiliranoj vodi, u tikvici od 1000 ml. Izmjereni pH iznosio je 6,8 te nije bilo potrebno podešavanje pH vrijednosti.

Octena kiselina koncentracije 2,5% (v/v) pripremljena je miješanjem 12,5 ml ledene octene kiseline s destiliranom vodom u tikvici od 500 ml.

2%-tna agarozna dobivena je otapanjem 1g agaroze u 50 ml vruće vode.

3.2. Metode

3.2.1. Priprava liposoma

3.2.1.1. Priprava propilenglikol liposoma s diltiazemkloridom

Elastični liposomi s diltiazemkloridom pripremljeni su metodom razrjeđenja poliola (Pavelić i sur, 2001). Lipoid S75 (250 mg) otopljen je u čašici (25 ml) u 1g propilenglikola miješanjem na magnetskoj mješalici uz blago zagrijavanje (do 50 °C). Nakon toga dodano je 0,5 ml prethodno pripremljene otopine diltiazemklorida (1g/5ml, odmjerna tikvica) uz intenzivno miješanje (600 okretaja/min). Nastala homogena viskozna disperzija je potom postepeno razrjeđivana, kap po kap, s fosfatnim puferom (pH 6,8) uz neprekidno miješanje na magnetskoj mješalici tijekom 30-ak minuta. Konačni volumen liposomske disperzije iznosio je 10 ml.

Nakon potpune hidratacije (3 sata), liposomska disperzija je ekstrudirana 3 puta kroz polikarbonatne membranske filtere promjera pora 400 nm korištenjem ručnog mini-ekstrudera.

Tako pripravljena liposomska disperzija pohranjena je u hladnjak na 4 °C, a prije daljnjih ispitivanja termostatorana je na sobnoj temperaturi.

3.2.1.2. Priprava konvencionalnih liposoma s diltiazemkloridom

Konvencionalni liposomi s diltiazemkloridom pripremljeni su proliposomskom metodom (Pavelić i sur., 2001.). Lipoid S75 (220 mg) i Phospholipon H (30 mg) otopljeni su u čašici (25ml) u 0,5 g koncentriranog etanola miješanjem na magnetskoj mješalici uz blago zagrijavanje (do 50 °C) te je naglo dodano 0,5 ml prethodno pripremljene otopine diltiazemklorida (1g/5ml, odmjerna tikvica) uz intenzivno miješanje (600 okretaja/min).

Proliposomska disperzija je ohlađena na sobnu temperaturu te je postepeno razrjeđivana na magnetskoj mješalici (600 okretaja/min) dokapavanjem 9,5 ml fosfatnog pufera, pH 6,8. Nastala liposomska disperzija je miješana na magnetskoj mješalici tijekom narednih 45 minuta.

Nakon potpune hidratacije (3 sata), liposomska disperzija je homogenizirana ekstrudiranjem (3 puta) kroz polikarbonatne membranske filtere promjera pora 400 nm korištenjem ručnog mini-ekstrudera.

Pripravljena liposomska disperzija pohranjena je u hladnjak na 4 °C, a prije daljnjih ispitivanja termostatorirana je na sobnoj temperaturi.

3.2.2. Mjerenje veličine i indeksa polidisperznosti liposoma

Srednji promjer i indeks polidisperznosti liposoma izmjeren je pri sobnoj temperaturi (25 °C) metodom fotonske korelacijske spektroskopije (PCS) na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija). Uzorak je pripremljen u kiveti razrjeđivanjem 1 kapi (približno 10-20 µl) liposomske disperzije s 1 mM otopinom NaCl prethodno profiltriranom kroz Minisart filter, veličine pora 0,45 µm.

3.2.3. Mjerenje zeta potencijala

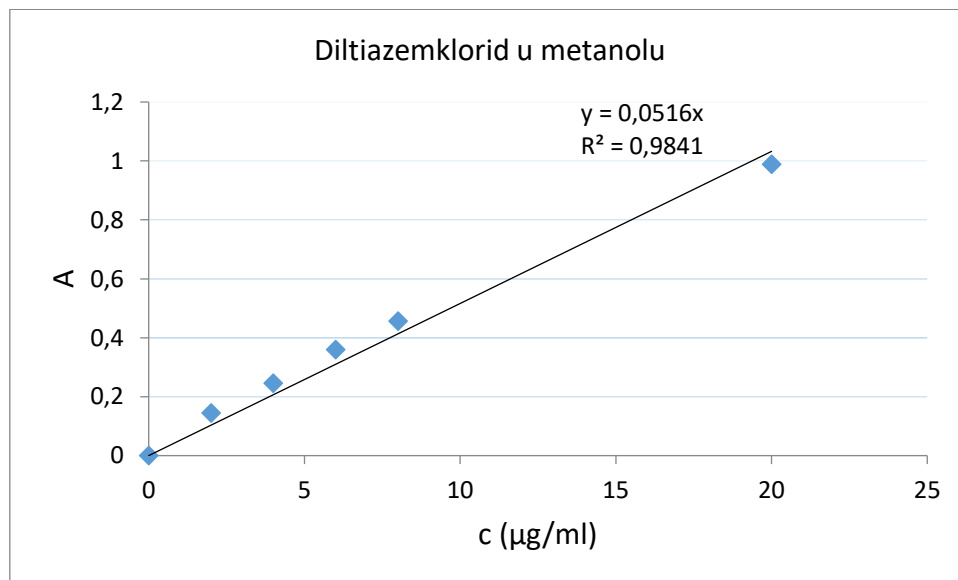
Zeta potencijal izmjeren je pri sobnoj temperaturi na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija). Najprije je provedena kalibracija uređaja mjerenjem zeta potencijala standarda (Malvern, Zeta Potential Standard $-42 \pm 4,2$ mV), a nakon toga izmjeren je uzorak liposoma pripremljen razrjeđivanjem liposomske disperzije s 1 mM otopinom NaCl.

3.2.4. Određivanje uspješnosti uklapanja diltiazemklorida u liposome

Kako bi se odredila uspješnost uklapanja lijeka, neuklopljeni lijek (slobodna frakcija) odijeljena je od liposomske disperzije metodom dijalize. Uzorak liposomske disperzije (4 ml) stavljen je u crijeva za dijalizu, tj. polupropusne membrane koje su zatim uronjene u 800 ml fosfatnog pufera pH 6,8. Dijaliza je provedena tijekom 4 sata uz izmjenu pufera (800 ml) svakih sat vremena te konstantno miješanje na magnetskoj mješalici (50 okretaja/minuti).

Nakon 4 sata sadržaj dijalizacijske vrećice je prenesen u bočicu (izmjereno je volumen). Kako bi se odredio udio diltiazemklorida koji je uklopljen u liposome, uzet je određen alikvot liposoma, kojem je prethodno odijeljena neuklopljena frakcija, stavljen u odmjernu tikvicu te dodan metanol do oznake (metanol se dodaje kako bi se razorila/otopila ovojnica liposoma i oslobodio uklopljeni lijek). Uzorku je izmjerena apsorbancija na $\lambda=237$ nm, metodom UV-Vis spektrofotometrije. Na isti način utvrđen je ukupni diltiazemklorid (slobodni + uklopljeni lijek) u uzorku liposomske disperzije.

Iz izmjerenih apsorbancija, a pomoću baždarnog pravca (Slika 7), izračunate su vrijednosti koncentracija uklopljene i ukupne količine lijeka prema formuli: $c = A / \text{nagib pravca}$.



Slika 7: Baždarni dijagram otopine diltiazemklorida u metanolu, $\lambda=237$ nm

Uspješnost uklapanja (UU, %) diltiazemklorida određena je prema formuli:

$$\text{UU (\%)} = [\text{uklopljeni diltiazemklorid} / (\text{uklopljeni} + \text{slobodni diltiazemklorid})] \times 100$$

3.2.5. Priprava kitozanskog gela

Kitozanski hidrogel pripremljen je korištenjem visokomolekularnog kitozana za kojeg je dokazano da ima najjači epitelizacijski učinak (Alsarra, 2009).

Kitozan (0,44 g) je otopljen (dispergirano) u 6,1 g 2,5% (w/v) octene kiseline uz soniciranje na ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 minuta. Potom je dodano 2 g glicerola, smjesa dobro promiješana te je dodano 11,46 g pročišćene vode. Smjesa je intenzivno miješana staklenim

štapićem i sonicirana tijekom 40 minuta. Polučvrsta masa ostavljena je preko noći na sobnoj temperaturi kako bi se omogućila potpuna hidratacija kitozana. Koncentracija kitozana u gelu, ukupne mase 20 g, iznosila je 2,2 % (w/w).

Pomoću pH-metra s elektrodom za polučvrste pripravke gelu je izmjeren pH koji je iznosio 5,06. Uklopljeni zrak uklonjen je centrifugiranjem na 3000 okretaja/minuti tijekom 3 minute. Uzorak hidrogela pohranjen je u hladnjak na 4 °C.

3.2.6. Uklapanje liposoma s diltiazemkloridom u kitozanski hidrogel

U 2,8 g pripremljenog 2,2% (w/w) kitozanskog hidrogela dodano je 1,2 g liposoma s uklopljenim diltiazemkloridom, kojima je prethodno odijeljena neuklopljena frakcija lijeka. Smjesa je ručno miješana staklenim štapićem 2 minute. Koncentracija liposoma u gelu iznosila je 30% (w/w, liposomi/hidrogel).

Na isti način pripremljen je uzorak kontrolnog gela koji je umjesto liposoma sadržavao otopinu diltiazemklorida u pročišćenoj vodi u istoj masi koliko je iznosio udio liposoma u pripravku liposomi-u-gelu (30%).

3.2.7. Uklapanje liposoma s diltiazemkloridom u hidroksietilcelulozni hidrogel

U 2,1 g komercijalno dostupnog hidroksietilceluloznog hidrogela dodano je 0,9 g liposoma s uklopljenim diltiazemkloridom (prethodno je odijeljena neuklopljena frakcija lijeka). Smjesa je ručno miješana staklenim štapićem 2 minute. Koncentracija liposoma u gelu iznosila je 30% (w/w, liposomi/hidrogel). Izmjereni pH hidroksietilceluloznog gela korištenog u ispitivanjima iznosio je 5,66.

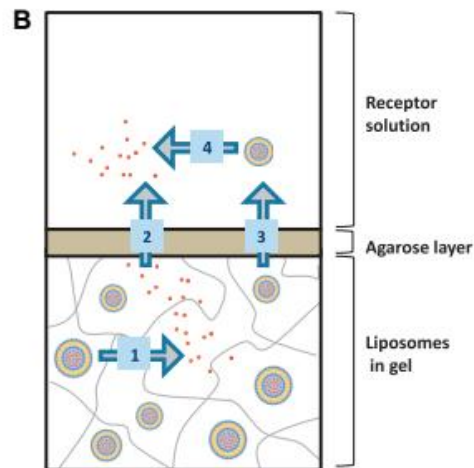
Kontrolni uzorak gela je pripremljen na isti način, a pritom je umjesto liposoma sadržavao otopinu diltiazemklorida u pročišćenoj vodi u istoj masi koliko je iznosio udio liposoma u pripravku liposomi-u-hidroksietilceluloznom gelu (30%, w/w).

3.2.8. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja diltiazemklorida iz liposoma uklopljenih u kitozanski i hidroksietilcelulozni hidrogel

Ispitivanje je provedeno tzv. metodom agaroze koju su izvorno razvili Pesccha i sur. (1998) za praćenje kinetike oslobađanja uklopljenih hidrofilnih tvari iz liposoma, a Pavelić i

sur. (2001) su je prilagodili za ispitivanje oslobađanja uklopljenog lijeka iz liposomskih gelova (Slika 8). Ukratko, uzorak liposoma-u-gelu (4 g) stavljen je u bočice s čepom. Na sloj uzorka nanosena je 2% agarozna (1,5 ml), prethodno prevedena u tekuće stanje grijanjem u mikrovalnoj pećnici. Kada je očvrstnula, na agarozu je nanoseno 5 ml fosfatnog pufera, pH 6,8 (receptorski medij). Bočice su inkubirane na 37 °C, a receptorski medij je u potpunosti zamijenjen svježim puferom u određenim vremenskim intervalima (1, 2, 4, 6 i 24 sata). Količina oslobođenog lijeka u receptorskom mediju određena je spektrofotometrijski, prije i nakon dodatka metanola, kako bi se utvrdio udio oslobođenog diltiazemklorida i udio oslobođenih intaktnih liposoma s diltiazemkloridom.

Kontrolni uzorak gela, koji je umjesto liposoma sadržavao jednaku količinu otopine diltiazemklorida, ispitan je pod istim uvjetima.



Slika 8: Princip tzv. agarozna metode (Vanić i Škalko-Basnet, 2013)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Karakterizacija liposoma s diltiazemkloridom

Propilenglikol liposomi s diltiazemkloridom pripremljeni su metodom razrjeđenja poliola dok su konvencionalni liposomi pripremljeni proliposomskom metodom, opisanima u poglavlju 3.2.2.

Srednji promjer, indeks polidisperznosti (prije i nakon ekstruzije) i zeta potencijal izmjereni su fotonskom korelacijskom spektroskopijom, a rezultati su prikazani Tablicom 1.

Tablica 1. Fizikalna svojstva liposoma s diltiazemkloridom

Parametar	Propilenglikol liposomi		Konvencionalni liposomi	
	Izvorni pripravak	Nakon ekstruzije	Izvorni pripravak	Nakon ekstruzije
Srednji promjer (nm)	448,5 ± 6,6	177,6 ± 1,8	723,3 ± 25,5	196,4 ± 0,8
Indeks polidisperznosti (PDI)	0,469 ± 0,070	0,225 ± 0,025	0,579 ± 0,083	0,285 ± 0,014
Zeta potencijal (mV)	-53,2 ± 0,3		-52,3 ± 0,6	

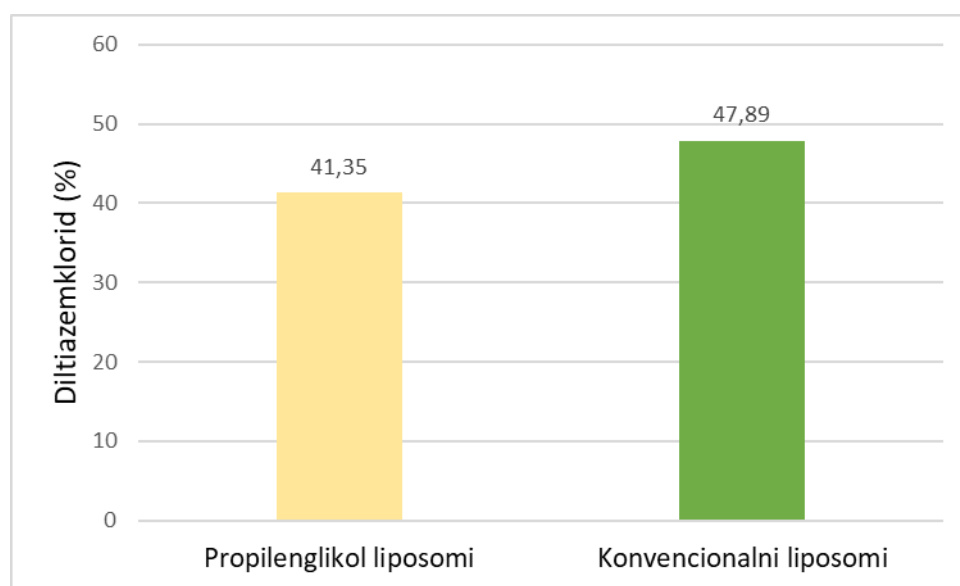
Usporedba veličine izvorno pripremljenih liposoma s diltiazemkloridom pokazuje da su elastični propilenglikol liposomi bili manjeg srednjeg promjera (448 nm) od konvencionalnih liposoma (723 nm). Obje preparacije imale su indeks polidisperznosti veći od 0,45 koji ukazuje na heterogenu distribuciju veličina liposoma. Pritom su veće vrijednosti indeksa polidisperznosti zabilježene kod konvencionalnih liposoma (0,579) u odnosu na elastične liposome (0,469).

Ekstruzijom liposomskih disperzija kroz polikarbonantne membrane (400 nm, 3 ciklusa) dobivene su disperzije liposoma homogenije distribucije veličina i značajno nižih srednjih promjera. Elastični liposomi bili su nešto manji (177 nm, PDI 0,225) od konvencionalnih liposoma (196 nm; PDI 0,285). Dobiveni rezultati u suglasnosti su s literaturnim saznanjima. Naime, brojne studije pokazale su manji promjer elastičnih liposoma u odnosu na konvencionalne liposome istog fosfolipidnog sastava (Palac i sur., 2014; Vanić i sur., 2014; Elmoslemany i sur., 2012).

Izmjereni zeta potencijali oba tipa liposoma imali su slične, visoke negativne vrijednosti (> -50 mV) što ukazuje na postojanje fizički stabilnih liposomskih disperzija. Negativni naboj na površini liposoma mogao bi biti povoljan za dermalnu aplikaciju budući da je istraživanje utjecaja naboja na površini liposoma na penetraciju lijeka u kožu pokazalo da negativno nabijeni liposomi povećavaju prodiranje lijeka u kožu u većoj mjeri nego pozitivno nabijeni i neutralni liposomi (Gillet i sur., 2011).

4.2. Određivanje uspješnosti uklapanja diltiazemklorida u liposome

Kako bi se odredila uspješnost uklapanja diltiazemklorida u liposome, neuklopljeni lijek se mora odvojiti od liposoma. Neuklopljeni lijek odijeljen je postupkom dijalize liposomskih disperzija, a sadržaj određen spektrofotometrijski na način opisan u poglavlju 3.2.4.



Slika 9: Grafički prikaz uspješnosti uklapanja diltiazemklorida (DTZ) u liposome

Rezultati prikazani Slikom 9 pokazuju podjednako dobro uklapanje diltiazemklorida u oba tipa liposoma ($> 40\%$), premda je nešto više uklopljenog lijeka bilo u konvencionalnim liposomima (47%, u odnosu na 41% za propilenglikol liposome). Iako je u literaturi pokazano da je uspješnost uklapanja uvijek bolja s propilenglikol liposomima u odnosu na konvencionalne (Elmoslemany i sur., 2012; Palac i sur., 2014; Pavelić i sur., 2001), u našim

ispitivanjima pokazalo se suprotno. Razlog tomu mogla bi biti veća permeabilnost membrane propilenglikol liposoma te da je zbog istih uvjeta dijalize (za oba tipa liposoma) došlo do oslobađanja početno uklopljenog diltiazemklorida iz propilenglikol liposoma (uzorak propilenglikol liposoma je „predijaliziran“).

4.3. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja diltiazemklorida iz liposoma-u-hidrogelu

Kako bi se postigla prikladna konzistencija liposoma za topikalnu primjenu, liposomi s diltiazemkloridom su ručno umiješani u hidrogel odgovarajućih svojstava prikladnih za aplikaciju na analnu fisuru.

Kontrolirano i polagano oslobađanje lijeka iz liposoma-u-gelu je važna značajka koja utječe na učinkovitost topikalne terapije. U tu svrhu provedeno je *in vitro* ispitivanje oslobađanja diltiazemklorida iz konvencionalnih i propilenglikol liposoma uklopljenih u dvije vrste gela, kitozanski i hidroksietilcelulozni. Paralelno, pod istim uvjetima, provedena su i kontrolna ispitivanja s istim gelovima koji su umjesto liposoma sadržavali ekvivalentnu količinu vodene otopine diltiazemklorida.

Rezultati su prikazani Tablicama 2 i 3 (hidroksietilcelulozni gel) te Tablicama 4 i 5 (kitozanski hidrogel).

Tablica 2: Propilenglikol liposomi u hidroksietilceluloznom gelu

t (h)	Oslobodeni DTZ (%)	Ukupni DTZ (%)	Intaktni liposomi (%)	Kontrola (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	8,87	13,56	4,69	16,27
2	19,49	25,23	5,74	29,06
4	32,34	41,91	9,57	44,94
6	39,11	54,52	15,42	55,48
24	72,35	91,98	19,63	99,82

DTZ, diltiazemklorid

Tablica 3: Konvencionalni liposomi u hidroksietilceluloznom gelu

t (h)	Oslobodeni DTZ (%)	Ukupni DTZ (%)	Intaktni liposomi (%)	Kontrola (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	7,9	8,96	1,06	16,27
2	14,9	16,92	2,02	29,06
4	23,85	29,15	5,30	44,94
6	30,12	37,60	7,48	55,48
24	55,61	70,03	14,42	99,82

DTZ, diltiazemklorid

Vrijednosti u 2. stupcu Tablica 2-4 pokazuju udio oslobođenog diltiazemklorida u receptorskom mediju (fosfatni pufer, pH 6,8) tijekom 24 h inkubiranja liposomskih preparacija u hidroksietilceluloznom ili kitozanskm hidrogelu na 37 °C. Korišteni *in vitro* model za ispitivanje oslobađanja lijeka iz liposomskih gelova (agarozni matriks) omogućuje difuziju oslobođenog lijeka iz liposoma-u-gelu u receptorski odjeljak, ali i određivanje udjela oslobođenih intaktnih liposoma iz gela, što nije moguće odrediti korištenjem standardnih metoda (Franz-difuzijska ćelija). Naime, nakon dodatka metanola u receptorski medij došlo je do razaranja oslobođenih intaktnih liposoma u receptorskom mediju čime je određena ukupna količina oslobođenog lijeka. Iz razlike izmjerenih vrijednosti i udjela oslobođenog lijeka određen je udio intaktnih liposoma.

Usporedbom vrijednosti prikazanih u Tablicama 2 i 3, vidljivo je da je pripravak hidroksietilceluloznog gela s elastičnim propilenglikol liposomima u odnosu na konvencionalne liposome, u svakom satu i ukupno gledajući, u većem postotku otpuštao kako oslobođeni lijek, tako i intaktne liposome. U odnosu na kontrolni gel, s oba tipa liposoma postignut je sporiji profil oslobađanja diltiazemklorida.

Rezultati oslobađanja diltiazemklorida iz elastičnih propilenglikol i konvencionalnih liposoma uklopljenih u kitozanski gel prikazani su Tablicama 4 i 5.

Tablica 4: Propilenglikol liposomi u kitozanskom hidrogelu

t (h)	Oslobođeni DTZ (%)	Ukupni DTZ (%)	Intaktni liposomi (%)	Kontrola (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	2,38	4,43	2,05	5,62
2	4,62	10,03	5,41	15,66
4	8,77	17,39	8,62	27,72
6	13,25	24,41	11,16	37,26
24	25,65	36,72	11,07	73,15

DTZ, diltiazemklorid

Tablica 5: Konvencionalni liposomi u kitozanskom hidrogelu

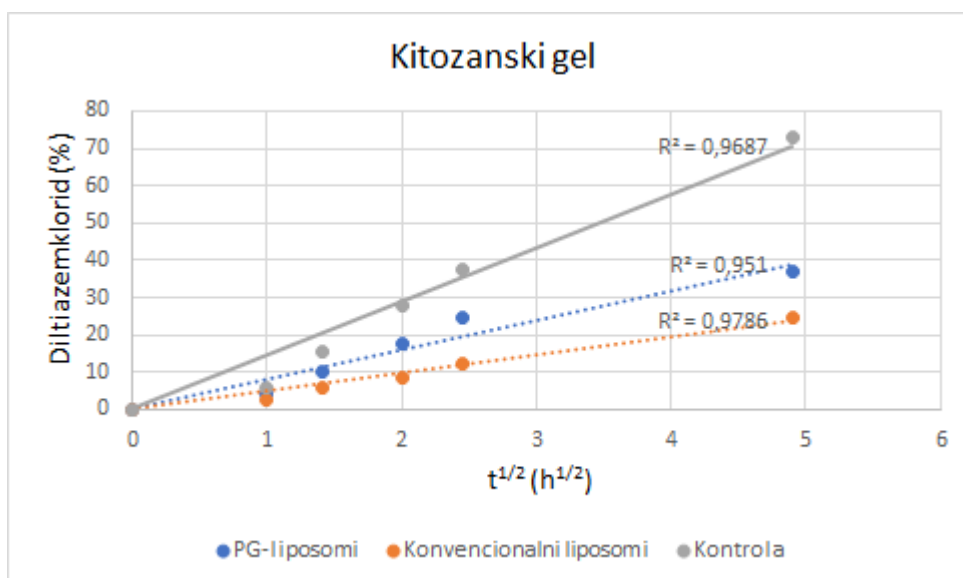
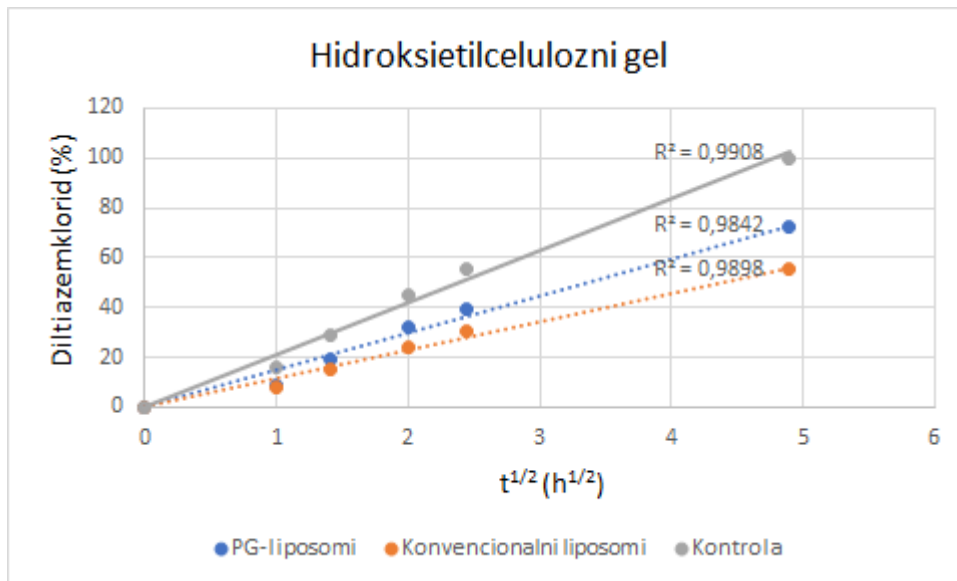
t (h)	Oslobođeni DTZ (%)	Ukupni DTZ (%)	Intaktni liposomi (%)	Kontrola (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	1,13	2,55	1,42	5,62
2	2,24	5,74	3,05	15,66
4	4,30	8,73	4,43	27,72
6	6,68	12,20	5,52	37,26
24	19,27	24,61	5,34	73,15

DTZ, diltiazemklorid

Rezultati ispitivanja oslobađanja diltiazemklorida iz kitozanskih hidrogelova, prikazani Tablicama 4 i 5, pokazuju brže oslobađanje lijeka (36,72%, nakon 24 sata) iz propilenglikol liposoma uklopljenih u kitozanski gel nego iz konvencionalnih liposoma (24,61%, nakon 24 sata). Udio oslobođenih intaktnih liposoma bio je manji kod uzorka s konvencionalnim liposomima u odnosu na propilenglikol liposome, vjerojatno zbog bolje elastičnosti lipidnih dvoslojeva koja doprinosi nešto boljoj difuziji intaktnih liposoma kroz gel u receptorski medij

(Palac i sur., 2014). Slično kao i kod uzoraka s hidroksietilceluloznim gelom, u odnosu na kontrolni kitozanski gel, uklapanjem u liposome značajno se usporava oslobađanje diltiazemklorida.

Profili oslobađanja diltiazemklorida iz liposoma-u-gelu te iz kontrolnih uzoraka prikazani su prema Higuchijevom modelu (Slika 10).



Slika 10. Grafički prikaz oslobađanja diltiazemklorida iz liposoma uklopljenih u hidroksietilcelulozni i kitozanski hidrogel prema Higuchijevom modelu

Usporedbom postotka ukupno oslobođenog lijeka, vidljiv je veći udio oslobođenog diltiazemklorida iz elastičnih liposoma. Takvi rezultati su najvjerojatnije posljedica prisutnog propilenglikola u fosfolipidnom dvosloju koji doprinosi većoj permeabilnosti dvosloja za uklopljeni sadržaj. Također se može uočiti da je oslobađanje bilo sporije iz kitozanskog hidrogela što se može objasniti čvršćom konzistencijom kitozanskog hidrogela u odnosu na hidroksietilcelulozni gel. Rezultati ispitivanja provedeni s uzorcima kontrolnih gelova potvrđuju da se primjenom liposoma postiže sporije oslobađanje diltiazemklorida.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenih ispitivanja moguće je izvesti sljedeće zaključke:

- Proliposomska i metoda razrjeđenja poliola su prikladan izbor metoda pripreme konvencionalnih i elastičnih liposoma s hidrofilnim lijekom.
- Ekstruzijom liposomskih disperzija kroz polikarbonatne membranske filtere dobiveni su liposomi srednjeg promjera manjeg od 200 nm i značajno manjeg indeksa polidisperznosti koji ukazuje na homogenu distribuciju veličina liposoma.
- Izrazito negativni zeta potencijali (-50 mV) kod oba tipa liposoma ukazuju na postojanje fizički stabilnih liposomskih disperzija.
- Uspješnost uklapanja diltiazemklorida bila je nešto bolja s konvencionalnim nego s propilenglikol liposomima.
- Ispitivanja oslobađanja diltiazemklorida iz hidroksietilceluloznog i kitozanskog gela pokazala su sporije oslobađanje lijeka uklapanjem u liposome u odnosu na otopinu lijeka u gelu.
- Usporedba profila oslobađanja diltiazemklorida iz različitih hidrogelova pokazala je brži trend oslobađanja lijeka iz hidroksietilceluloznog u odnosu na kitozanski hidrogel.
- Usporedba profila oslobađanja diltiazemklorida iz propilenglikol i konvencionalnih liposoma potvrdila je polaganije oslobađanje diltiazemklorida iz konvencionalnih liposoma, neovisno o tipu hidrogela.
- Korišteni *in vitro* model pružio je uvid u oslobađanje intaktnih liposoma u receptorski medij, pri čemu je bio veći udio oslobođenih propilenglikol nego konvencionalnih liposoma i to pogotovo iz hidroksietilceluloznog gela.
- Primjenom kitozanskog gela s liposomima mogla bi se pospješiti lokalna terapija analne fisure zbog mukoadhezivnih svojstava, polaganog oslobađanja diltiazemklorida iz hidrogela, povoljnog učinka same podloge (kitozanskog hidrogela) na proces zacjeljivanja fisure te antimikrobnog učinka kitozana. Prednosti korištenja kitozanskih gelova s liposomima trebalo bi potvrditi daljnjim ispitivanjima.

6. LITERATURA

- Abdel-Halim E.S. Chemical modification of cellulose extracted from sugarcane bagasse: Preparation of hydroxyethyl cellulose. *Arabian Journal of Chemistry*, 2014; 7(3):362–371.
- Acartürk F. Mucoadhesive vaginal drug delivery systems. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2009;3:193-205
- Ahmadi F., Oveisi Z., Mohammadi Samani S., Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2015;10(1):1–16
- Alsarra I.A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009;45(1):16-21
- Banović J., Bego M., Cuković N., Vanić Ž. Lipidne vezikule za (trans)dermalnu primjenu lijekova. *Farmaceutski glasnik*, 2011;67: 229-244
- Baza lijekova, dostupno na <http://www.halmed.hr/>, pristup 23.10.2017.
- Elmoslemany R.M., Abdallah O., El-Khordagui L.K., Khalafallah N.M. Propylene glycol liposomes as a topical delivery system for miconazole nitrate: comparison with conventional liposomes. *AAPS PharmSciTech*, 2012;13(2):723–731
- Elsayed M.M., Abdallah O.Y., Naggar V.F., Khalafallah N.M. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007;332:1–16
- European Pharmacopoeia 8.0. Strasbourg, Council of Europe, 2014., str. 2062
- Gillet A., Compère P., Lecomte F., Hubert P., Ducat E., Evrard B., Piel G. Liposome surface charge influence on skin penetration behavior. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011;411:223–31.
- Goy R.C., Britto D., Assis O.B.G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 2009;19(3):241-247
- Hertfordshire Medicines Management Committee: Diltiazem 2% topical cream for the treatment of chronic anal fissures- recommended for use in line with the treatment pathway for anal fissures. Dostupno na:

[http://hertsvalleysccg.nhs.uk/uploads/file/Pharmacy/Local%20Decisions/Diltiazem%20for%20anal%20fissures%20201306%20\(HMMC\).pdf](http://hertsvalleysccg.nhs.uk/uploads/file/Pharmacy/Local%20Decisions/Diltiazem%20for%20anal%20fissures%20201306%20(HMMC).pdf), pristup 14.11.2017.

- Jensen S.L. Treatment of first episodes of acute anal fissure: prospective randomised study of lignocaine ointment versus hydrocortisone ointment or warm sitz baths plus bran. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 1986;292:1167-9
- Knight J.S, Birks M., Farouk R. Topical diltiazem ointment in the treatment of chronic anal fissure. *British Journal of Surgery*, 2001;88:553-556
- Nelson R.L., Thomas K., Morgan J., Jones A. Non surgical therapy for anal fissure. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012;2
- Palac Z., Engesland A., Flaten G.E., Škalko-Basnet N., Filipović-Grčić J., Vanić Ž. Liposomes for (trans)dermal drug delivery: the skin PVPA as a novel in vitro stratum corneum model in formulation development. *Journal of Liposome Research*, 2014; 24(4):313-322
- Palac Z., Hurler J., Škalko-Basnet N., Filipović-Grčić J., Vanić, Ž. Elastic liposomes-in-vehicle formulations destined for skin therapy: the synergy between type of liposomes and vehicle, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2015;41:1247–1253.
- Pavelić Ž., Škalko-Basnet N., Schubert R. Liposomal gels for vaginal drug delivery *International Journal of Pharmaceutics*, 2001;219:139–149
- Rabea E., Badawy M., Stevens V.C., Smagghe G., Steurbault W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 2003;4(6):1457-1465
- Sannino A., Demitri C., Madaghiele M. Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications. *Materials*, 2009;2(2):353-373
- Sažetak opisa svojstava lijeka, dostupno na: <http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-09-02-39.pdf>, pristup 13.12.2017
- Schlichtemeier S., Engel A., Clinical academic and Associate professor. Anal fissure. *Austin Prescriber*, 2016;39(1):14–17
- Senjković R. Osnove oblikovanja lijekova. Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 112

- Šoljić Jerbić I. Primjena polimera u farmaceutskoj industriji. *Kemija u industriji*, 2017;66 (9-10):505–518
- del Valle J.L., Díaz A., Puiggali J. Hydrogels for biomedical applications: cellulose, chitosan, and protein/peptide derivatives. *Gels*, 2017;3:27
- Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija. *Farmaceutski glasnik*, 2012;68:391-400
- Vanić Ž., Škalko-Basnet N. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: Can they deliver? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013;50:29-41
- Vanić Ž., Hurler J., Ferderber K., Golja Gašparović P., Škalko-Basnet N., Filipović-Grčić J. Novel vaginal drug delivery system: Deformable propylene glycol liposomes-in-hydrogel. *Journal of Liposome Research*, 2014;24:27-36.
- Vanić Ž. Phospholipid vesicles for enhanced drug delivery in dermatology. *Journal of Drug Discovery, Development and Delivery*, 2015;2(1):1010
- Vanić Ž., Holsæter A.M., Škalko-Basnet N. (Phospho)lipid-based nanosystems for skin administration. *Current Pharmaceutical Design*, 2015;21:4174-4192
- Wald A., Bharucha A.E, Cosman B.C., Whitehead W.E. ACG clinical guideline: management of benign anorectal disorders. *The American Journal of Gastroenterology* 2014;109:1141-1157.

7. SAŽETAK

Kitozan je trenutno jedan od najperspektivnijih polimera u razvoju suvremenih farmaceutskih oblika zbog dobrih mukoadhezivnih svojstava i povoljnih bioloških učinaka.

Svrha ovoga rada bila je priprava kitozanskog gela prikladnog za uklapanje liposoma s diltiazemkloridom te ispitivanje oslobađanja lijeka iz liposoma-u-gelu namijenjenog lokalnoj terapiji analnih fisura. Zbog dokazanog najjačeg epitelizacijskog učinka, odabran je visokomolekularni kitozan te je pripremljen 2,2%-tni hidrogel. Konvencionalni i propilenglikol liposomi s diltiazemkloridom uklopljeni su u kitozanski gel te u komercijalno dostupni hidroksietilcelulozni gel. Oba tipa liposoma bila su manja od 200 nm, pri čemu je nešto bolje uklapanje postignuto s konvencionalnim liposomima. *In vitro* ispitivanja oslobađanja diltiazemklorida iz liposoma-u-gelu provedena su tzv. metodom agaroze tijekom 24 sata u puferu pH 6,8. Uklapanjem liposoma u hidrogel postignuto je polagano oslobađanje uklopljenog lijeka. Rezultati ispitivanja su pokazali da tip liposoma i vrsta gela utječu na brzinu i udio oslobođenog lijeka. Diltiazemklorid se u nešto manjem udjelu oslobađao iz konvencionalnih u odnosu na elastične propilenglikol liposome, neovisno o korištenom hidrogelu. Usporedba dvaju gelova pokazala je sporije oslobađanje oba tipa liposoma iz kitozanskog hidrogela.

Korištenjem kitozanskog hidrogela s uklopljenim liposomima moglo bi se osigurati dostatno zadržavanje diltiazemklorida na mjestu primjene i značajno poboljšati lokalna terapija analne fisure zbog povoljnog učinka kitozana na zacjeljivanje rana.

SUMMARY

Chitosan is currently one of the most promising polymers in development of new drug delivery systems due to its biodegradability, biocompatibility, good mucoadhesive properties and positive biological effects.

The aim of this study was to prepare chitosan hydrogel suitable for incorporation of liposomes with diltiazem chloride and to evaluate release of the drug from liposome-in-gel formulation destined for topical anal fissure therapy. Because of its superior wound healing properties, high molecular weight chitosan was chosen to prepare 2.2% (w/w) hydrogel. Conventional and propylene glycol liposomes with diltiazem chloride were incorporated into the chitosan gel and marketed hydroxyethyl cellulose gel as well. Both types of liposomes were smaller than 200 nm, while conventional liposomes were able to incorporate higher amount of the drug. *In vitro* release studies of diltiazem chloride from liposomes-in-hydrogel formulation were performed using so-called agarose method during 24 hours, in phosphate buffer pH 6.8. Incorporation of liposomes into the both types of hydrogel prolonged release of the drug in comparison to control hydrogels. The results showed that type of both liposomes and hydrogel affected the rate and amount of the released drug. Diltiazem chloride release from the conventional liposomes was less than from elastic propylene glycol liposomes, regardless of the type of hydrogel vehicle used. Both type of liposomes sustained the drug release, particularly when incorporated into the chitosan hydrogel.

Administration of diltiazem chloride liposomes-in-chitosan hydrogel could provide sufficient retention time of diltiazem chloride at the site of application and additionally improve local therapy of anal fissure as a result of chitosan favorable wound healing properties.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

IN VITRO ISPITIVANJA OSLOBAĐANJA DILTIAZEMKLORIDA IZ LIPOSOMSKIH GELOVA

Ivona Pepić

SAŽETAK

Kitozan je trenutno jedan od najperspektivnijih polimera u razvoju suvremenih farmaceutskih oblika zbog dobrih mukoadezivnih svojstava i povoljnih bioloških učinaka.

Svrha ovoga rada bila je priprava kitozanskog gela prikladnog za uklapanje liposoma s diltiazemkloridom te ispitivanje oslobađanja lijeka iz liposoma-u-gelu namijenjenog lokalnoj terapiji analnih fisura. Zbog dokazanog najjačeg epitelizacijskog učinka, odabran je visokomolekularni kitozan te je pripremljen 2,2%-tni hidrogel. Konvencionalni i propilenglikol liposomi s diltiazemkloridom uklopljeni su u kitozanski gel te u komercijalno dostupni hidroksietilcelulozni gel. Oba tipa liposoma bila su manja od 200 nm, pri čemu je nešto bolje uklapanje postignuto s konvencionalnim liposomima. In vitro ispitivanja oslobađanja diltiazemklorida iz liposoma-u-gelu provedena su tzv. metodom agaroze tijekom 24 sata u puferu pH 6,8. Uklapanjem liposoma u hidrogel postignuto je polagano oslobađanje uklopljenog lijeka. Rezultati ispitivanja su pokazali da tip liposoma i vrsta gela utječu na brzinu i udio oslobođenog lijeka. Diltiazemklorid se u nešto manjem udjelu oslobađao iz konvencionalnih u odnosu na elastične propilenglikol liposome, neovisno o korištenom hidrogelu. Usporedba dvaju gelova pokazala je sporije oslobađanje oba tipa liposoma iz kitozanskog hidrogela.

Korištenjem kitozanskog hidrogela s uklopljenim liposomima moglo bi se osigurati dostatno zadržavanje diltiazemklorida na mjestu primjene i značajno poboljšati lokalna terapija analne fisure zbog povoljnog učinka kitozana na zacjeljivanje rana.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 29 stranica, 10 grafičkih prikaza, 5 tablica i 31 literaturni navodak. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: liposomi, diltiazemklorid, kitozan, hidrogel, *in vitro* oslobađanje, analna fisura

Mentor: **Dr. sc. Željka Vanić**, *izvanredna profesorica Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, *izvanredna profesorica, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet*

Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić, *Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet*

Dr. sc. Lidija Bach Rojecky, *izvanredna profesorica, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet*

Rad prihvaćen: prosinac 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

IN VITRO RELEASE STUDIES OF DILTIAZEM CHLORIDE FROM LIPOSOMAL GELS

Ivona Pepić

SUMMARY

Chitosan is currently one of the most promising polymers in development of new drug delivery systems due to its biodegradability, biocompatibility, good mucoadhesive properties and positive biological effects. The aim of this study was to prepare chitosan hydrogel suitable for incorporation of liposomes with diltiazem chloride, and to evaluate release of the drug from liposome-in-gel formulation destined for topical anal fissure therapy. Because of its superior wound healing properties, high molecular weight chitosan was chosen to prepare 2.2% (w/w) hydrogel. Conventional and propylene glycol liposomes with diltiazem chloride were incorporated into the chitosan gel and marketed hydroxyethyl cellulose gel as well. Both types of liposomes were smaller than 200 nm, while conventional liposomes were able to incorporate higher amount of the drug. *In vitro* release studies of diltiazem chloride from liposomes-in-hydrogel formulation were performed using so-called agarose method during 24 hours, in phosphate buffer pH 6.8. Incorporation of liposomes into the both types of hydrogel prolonged release of the drug in comparison to control hydrogels. The results showed that type of both liposomes and hydrogel affected the rate and amount of the released drug. Diltiazem chloride release from the conventional liposomes was less than from elastic propylene glycol liposomes, regardless of the type of hydrogel vehicle used. Both type of liposomes sustained the drug release, particularly when incorporated into the chitosan hydrogel. Administration of diltiazem chloride liposomes-in-chitosan hydrogel could provide sufficient retention time of diltiazem chloride at the site of application and additionally improve local therapy of anal fissure as a result of chitosan favorable wound healing properties.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 29 pages, 10 figures, 5 tables and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: liposomes, diltiazem chloride, chitosan, hydrogel, *in vitro* release, anal fissure

Mentor: **Željka Vanić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željka Vanić, Ph.D.**, Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Amidžić Klarić, Ph.D., University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach Rojceky, Ph.D., Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: December 2017.