

# Topikalni pripravci za liječenje analne fisure

---

Kišan, Maja

Professional thesis / Završni specijalistički

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:313757>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



# Topikalni pripravci za liječenje analne fisure

---

Kišan, Maja

Professional thesis / Završni specijalistički

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:313757>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Maja Kišan  
TOPIKALNI PRIPRAVCI ZA LIJEČENJE ANALNE FISURE  
Specijalistički rad

Zagreb, 2018.

PSS studij: Dermatofarmacija i kozmetologija

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Željka Vanić

Specijalistički rad obranjen je dana 4. lipnja 2018. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Domagojeva 2, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc.dr.sc. Ivana Perković
2. izv.prof.dr.sc. Željka Vanić
3. dr.sc. Marijana Erceg, znanstvena suradnica

Rad ima 90 listova.

## Predgovor

Ovaj specijalistički rad je izrađen pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vanić na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Željela bih zahvaliti izv. prof. dr. sc. Željki Vanić na razumijevanju i strpljenju, podršci i sjajnom mentorstvu tijekom izrade i pisanja rada.

Reološka karakterizacija hidrogelova provedena je u PLIVA d.o.o. Istraživanje i razvoj, te se ovim putem od srca zahvaljujem Dunji Božić, mag. chem. i dr. sc. Petri Golja Gašparović.

## SAŽETAK

### Cilj istraživanja

Trenutno na hrvatskom tržištu ne postoje registrirani topikalni pripravci za liječenje analne fisure, već se terapija provodi magistralnim pripravkom diltiazemklorida koji se izrađuje u obliku komercijalno dostupnog gela hidroksietilceluloze.

Svrha ovog rada bila je evaluacija postojećeg magistralnog pripravka i razvoj inovativne podloge za uklapanje diltiazemklorida – kitozanskog hidrogela.

Provedena su *in vitro* ispitivanja oslobađanja diltiazemklorida iz hidroksietilceluloznog i kitozanskog hidrogela te detaljna reološka karakterizacija postojećeg i inovativnog magistralnog pripravka.

### Materijali i metode

Hidroksietilceluloznom i kitozanskom gelu je izmjeren pH, podešen na  $\text{pH} \approx 5,5$ , te ispitan utjecaj pH gela na njegova reološka svojstva i profil oslobađanja diltiazemklorida. *In vitro* ispitivanja oslobađanja diltiazemklorida iz svih hidrogelova provedena su korištenjem Franz difuzijske ćelije. Reološka ispitivanja uključivala su određivanje profila viskoznosti, testove promjene frekvencije, amplitude, oporavka strukture i adhezivnosti.

### Rezultati

Provedenim istraživanjima i usporedbom rezultata dobivenim s oba tipa hidrogela pokazano je da sastav podloge, tj. tip hidrogela i njegova pH vrijednost utječu na

oslobađanje lijeka i reološka svojstva pripravka. Brzina oslobađanja diltiazemklorida iz oba tipa hidrogela (hidroksietilceluloznog i kitozanskog) je bila u obrnuto proporcionalnom odnosu s viskoznošću hidrogelova. Najbrže oslobađanje diltiazemklorida postignuto je iz izvornog hidroksietilceluloznog gela (pH 4,5), dok se korištenjem kitozanskog hidrogela oslobađanje lijeka usporava, pogotovo iz gela više pH vrijednosti (pH 5,5). Provedeni oscilacijski testovi potvrdili su razlike između hidrogelova. Hidroksietilcelulozni gelovi su imali više izražena viskozna nego elastična svojstva te širi raspon linearnog viskoelastičnog područja, dok je kod kitozanskih gelova modul pohrane  $G'$  bio veći od modula gubitka  $G''$ .

### **Zaključak**

Budući da se kitozanskim hidrogelom (pH $\approx$ 5,5) postiže sporije oslobađanje diltiazemklorida, te imajući u vidu potencijalni antimikrobni učinak i povoljno djelovanje kitozana na zacjeljivanje rana, mišljenje je da bi takav pripravak bio prikladan za lokalnu terapiju analne fisure. Stoga je neophodno provesti daljnja ispitivanja kojima bi se potvrdila djelotvornost inovativnog pripravka.

## **SUMMARY**

### **Objectives**

Currently there are no commercially available topical formulations for the therapy of anal fissure on the Croatian market, and extemporaneously compounded medications are made by incorporating diltiazem hydrochloride in hydroxyethylcellulose gel base. Therefore, the main objective of this study was an evaluation of the aforementioned medication and development of innovative topical formulation based on chitosan hydrogel. All the formulations were assessed for the drug release and rheological properties.

### **Material and Methods**

Hydroxyethylcellulose and chitosan hydrogels were assessed for their pH values, adjusted to achieve gel pH $\approx$ 5.5, and the effect of the gel pH on the drug release profile was examined. *In vitro* release of diltiazem hydrochloride from all the hydrogels was performed by Franz diffusion cell method. In addition, all the hydrogels were rheologically characterized including viscosity, adhesion and structure recovery investigations, as well as amplitude and frequency sweep testing.

### **Results**

The vehicle composition, i.e. type of the hydrogel and its pH value, affected the drug release profile and rheological properties. The release rate of diltiazem hydrochloride from the both types of hydrogels (hydroxyethylcellulose and chitosan) was inversely



proportional to the hydrogel viscosity. The fastest release of the drug was achieved from hydroxyethylcellulose gel (pH 4.5), while the release from chitosan hydrogel was slowed down, especially at higher pH (pH 5.5). The oscillation tests confirmed the differences between the examined hydrogels. Hydroxyethylcellulose gels exhibited more pronounced viscous than elastic properties and a wider range of linear viscoelastic area, while chitosan gel demonstrated greater storage modulus  $G'$  than the loss modulus  $G''$ .

### **Conclusion**

Taking into account sustained release of the drug from chitosan hydrogel (pH $\approx$ 5.5) and potential antimicrobial and wound healing activities of chitosan, it can be assumed that the chitosan-based formulation could be more suitable for the topical treatment of anal fissure. Therefore, further investigations should be carried out to confirm the efficacy of the innovative formulation.

## SADRŽAJ SPECIJALISTIČKOG RADA

<b>1. Uvod i pregled područja istraživanja .....</b>	<b>1</b>
1.1. Fiziološko-anatomska obilježja analnog kanala .....	1
1.2. Analna fisura.....	2
1.2.1. Etiologija i epidemiologija.....	4
1.2.2. Patofiziologija.....	6
1.3. Smjernice u terapiji analne fisure.....	8
1.4. Lijekovi u lokalnoj terapiji analne fisure .....	10
1.4.1. Nitrati: nitroglicerina .....	10
1.4.2. Blokatori kalcijevih kanala .....	12
1.4.2.1. Diltiazem.....	12
1.4.2.2. Nifedipin.....	14
1.5. Hidrogelovi kao podloge za izradu topikalnih pripravaka namijenjenih liječenju analne fisure .....	17
1.5.1. Opće značajke hidrogelova .....	17
1.5.2. Hidroksietilceluloza. ....	18
1.5.3. Kitozan .....	19
1.5.4. Mogućnosti primjene kitozanskih hidrogelova u terapiji analne fisure .....	22

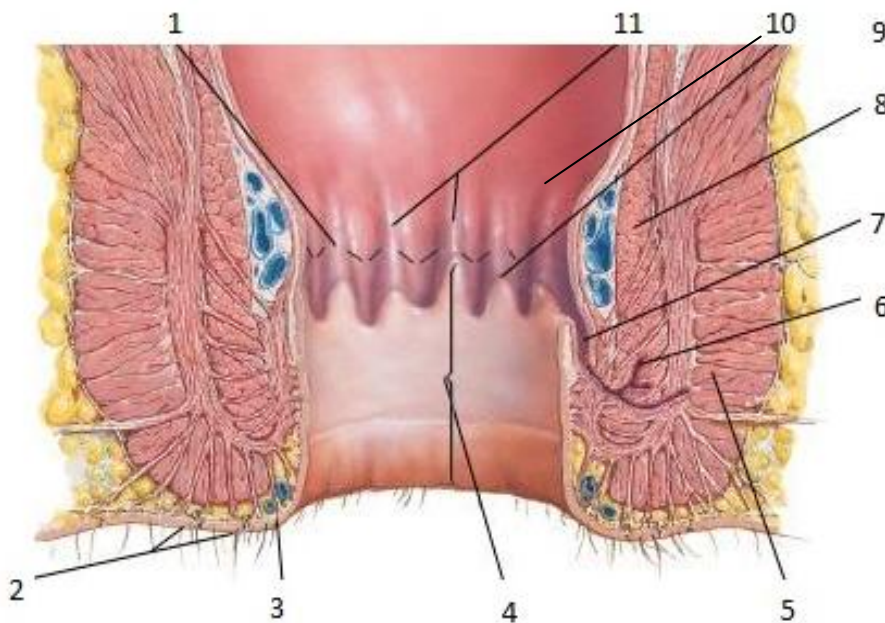
1.6. Ispitivanja topikalnih pripravaka .....	24
1.6.1. <i>In vitro</i> ispitivanja oslobađanja djelatne tvari iz polučvrstih pripravaka primjenom Franz difuzijske ćelije.....	24
1.6.2. Reološka ispitivanja.....	28
1.6.3. Ispitivanje adhezivnosti.....	30
<b>2. Cilj istraživanja.....</b>	<b>33</b>
<b>3. Materijali i metode.....</b>	<b>34</b>
3.1. Materijali.....	34
3.2. Metode .....	35
3.2.1. Izrada hidroksietilceluloznog gela s diltiazemkloridom.....	35
3.2.2. Izrada kitozanskog hidrogela .....	35
3.2.3. Izrada kitozanskog hidrogela s diltiazemkloridom .....	36
3.2.4. Optimiziranje pH vrijednosti hidrogelova .....	36
3.2.5. Izrada kalibracijskog pravca .....	36
3.2.6. Ispitivanje <i>in vitro</i> oslobađanja diltiazemklorida iz hidroksietilceluloznih i kitozanskih gelova.....	37
3.2.7. Određivanje sadržaja diltiazemklorida oslobođenog iz hidrogelova .....	38

3.2.8. Reološka ispitivanja.....	39
3.2.8.1. Određivanje profila viskoznosti.....	39
3.2.8.2. Test promjene amplitude .....	39
3.2.8.3. Test promjene frekvencije .....	39
3.2.8.4. Ispitivanje oporavka strukture hidrogelova.....	40
3.2.8.5. Ispitivanje adhezivnosti.....	40
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>41</b>
4.1. pH vrijednost hidrogelova.....	41
4.2. Oslobođanja diltiazemklorida iz hidrogelova <i>in vitro</i> .....	41
4.3. Profili viskoznosti .....	45
4.4. Test promjene amplitude .....	51
4.5. Test promjene frekvencije .....	55
4.6. Ispitivanje oporavka strukture .....	58
4.7. Ispitivanje adhezivnosti .....	61
<b>5. Rasprava .....</b>	<b>65</b>
<b>6. Zaključci.....</b>	<b>76</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>79</b>
<b>8. Životopis .....</b>	<b>90</b>

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1. Fiziološko-anatomska obilježja analnog kanala

Gastrointestinalni sustav opskrbljuje organizam vodom, elektrolitima, vitaminima i nutrijentima, te vrši eliminaciju neprobavljenih tvari. Anatomski se sastoji od probavne cijevi (usta, jednjak, želudac, tanko i debelo crijevo, crijevni otvor) i probavnih žlijezda (slinovnice, želučane žlijezde, žuč i gušterača). Završni dio probavnog trakta naziva se rektum, a na njega se nastavlja analni kanal, te anus (Slika 1).



**Slika 1.** Anatomija analnog područja: 1-skvamokolumnarni spoj, 2-perianalna koža i kožni adneksi, 3-rub anusa, 4-anoderm, 5-vanjski analni sfinkter, 6-analna žlijezda, 7-analna kripta, 8-unutranji analni sfinkter, 9-vene, 10-nazubljena linija, 11-analni stupovi (1)

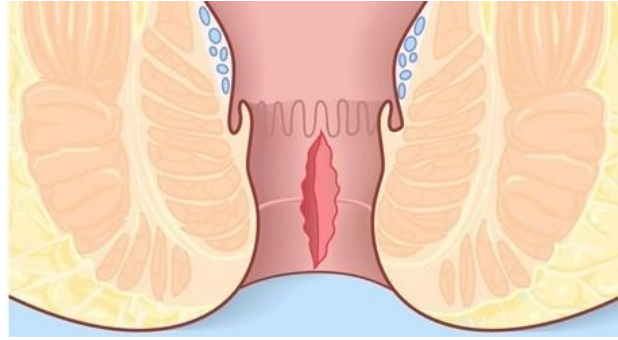
Anus formiraju dvije skupine mišića koji oblikuju unutarnji i vanjski sfinkter. Unutarnji sfinkter je inerviran parasimpatičkim živcima i pod kontrolom je autonomnog (vegetativnog) živčanog sustava. Njegova relaksacija nastaje uslijed pritiska kojeg stvara feces, dok je vanjski sfinkter pod kontrolom somatskog (voljnog) živčanog sustava. Rektum i anus razdvojeni su nazubljenom linijom (*linia dentata*) koja ima analne kripte (udubljenja) i analne papile (izduženja). Upravo ta linija razdvaja na bol izrazito osjetljivu analnu regiju od neosjetljivog rektuma (2).

Analni kanal je građen od tri vrste stanica koje uključuju jednostavni cilindrični epitel, višeslojni cilindrični epitel, te višeslojni pločasti epitel. Zanimljivo je istaknuti da točna struktura epitela analnog kanala još uvijek nije u potpunosti definirana. Naime, svjetlosnim i elektronskim mikroskopom nađena su tri obrasca građe: (i) višeslojni pločasti epitel, (ii) višeslojni cilindrični epitel, te (iii) mješoviti tip višeslojnog pločastog i kubičnog epitela (3).

Koža tzv. perianalne regije, odnosno vanjskog područja koji okružuje anus, je keratinizirana, građena od višeslojnog pločastog epitela, te sadrži brojne melaninske granule i kožne privjeske (dlake, znojne i lojne žlijezde) (3).

## **1.2. Analna fisura**

Analna fisura (*fissura ani*, Slika 2) je uzdužni rascjep u višeslojnom pločastom epitelu distalnog dijela analnog kanala koji se proteže od ruba anusa proksimalno prema nazubljenoj liniji (*linia dentata*) (4, 5).



**Slika 2.** Shematski prikaz nastale analne fisure (6)

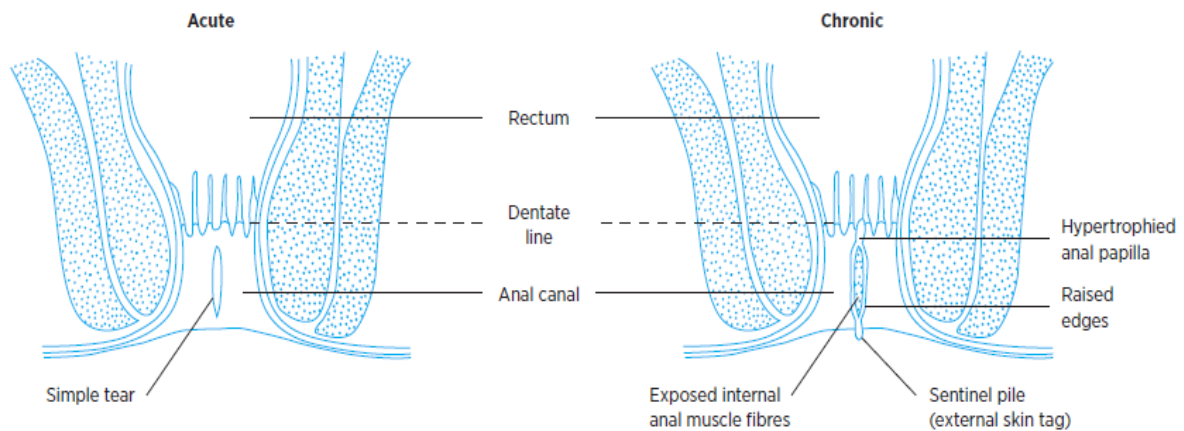
Simptomi analne fisure su veoma jaka bol za vrijeme i nakon defekacije u trajanju od nekoliko minuta do nekoliko sati, krvarenje svijetlo crvene boje, te pojava na dodir bolno osjetljive kvržice veličine graška (5). Nakon nastanka akutne analne fisure (Slika 3), svaka sljedeća defekacija pojačava bolove, a bolovi pojačavaju tonus unutarnjeg sfinktera, te se krug zatvara. Stanje dodatno pogoršava činjenica da pacijenti zbog bolova odgađaju stolicu čime se povećava reapsorpcije vode iz stolice, te u konačnici nastaje konstipacija.



**Slika 3.** “Začarani krug” patofiziološkog mehanizma nastanka analne fisure (7)

### 1.2.1. Etiologija i epidemiologija

Ovisno o mehanizmu nastanka, fisure se dijele na primarne i sekundarne, te mogu biti akutne i kronične (Slika 4). Primarne akutne fisure su rascjepi ograničeni na površinski sloj, s rahlim vezivnim tkivom u bazi, dok poprečna mišićna vlakna unutarnjeg sfinktera najčešće nisu vidljiva. Ovakve fisure uzrokuju pojavu svijetlo crvenog krvarenja kod prolaska stolice te bol i spazam u trajanju i do nekoliko sati nakon defekacije (8). Ukoliko fisure nisu zacijelile unutar 8-12 tjedana riječ je o primarnim kroničnim fisurama koje su karakterizirane otvrdnutim, povišenim rubovima te vidljivim horizontalnim vlaknima unutarnjeg sfinktera u bazi fisure, pojavom edema, fibroza i na bol osjetljive kvržice (5, 9, 10).



**Slika 4.** Razlike između akutne i kronične analne fisure (11)

Sekundarne fisure nastaju kao posljedica drugih bolesti: upalne bolesti crijeva (Crohnova bolest), granulomatoznih bolesti (tuberkuloze, sarkoidoze), infektivnih oboljenja (AIDS, sifilis), psorijaze i analnih karcinoma (5). Kod ovakvih se slučajeva (manje od 1% pacijenata), bilježi pojava više od jedne fisure (12).



Fisure većinom nastaju posteriorno unutar analnog kanala, a po svojoj etiologiji su najčešće primarne (8). Atipične fisure su one smještene bilo gdje unutar kanala te se uglavnom radi o sekundarnim fisurama vezanim za ranije navedene komorbiditete. Kod žena koje su nedavno rodile fisure su češće lokalizirane anteriorno i bez prisutnosti povišenog tonusa analnog sfinktera te se smatra da je inicijalni rascjep tkiva nastao zbog naprezanja tijekom poroda, prolaskom djetetove glave kroz porođajni kanal (13).

Uzimanje anamneze i pregled su najčešće dovoljni za postavljanje dijagnoze. U diferencijalnoj dijagnostici primarnih fisura bitno je isključiti hemeroide, analnu fistulu i rektalni ulcer (14).

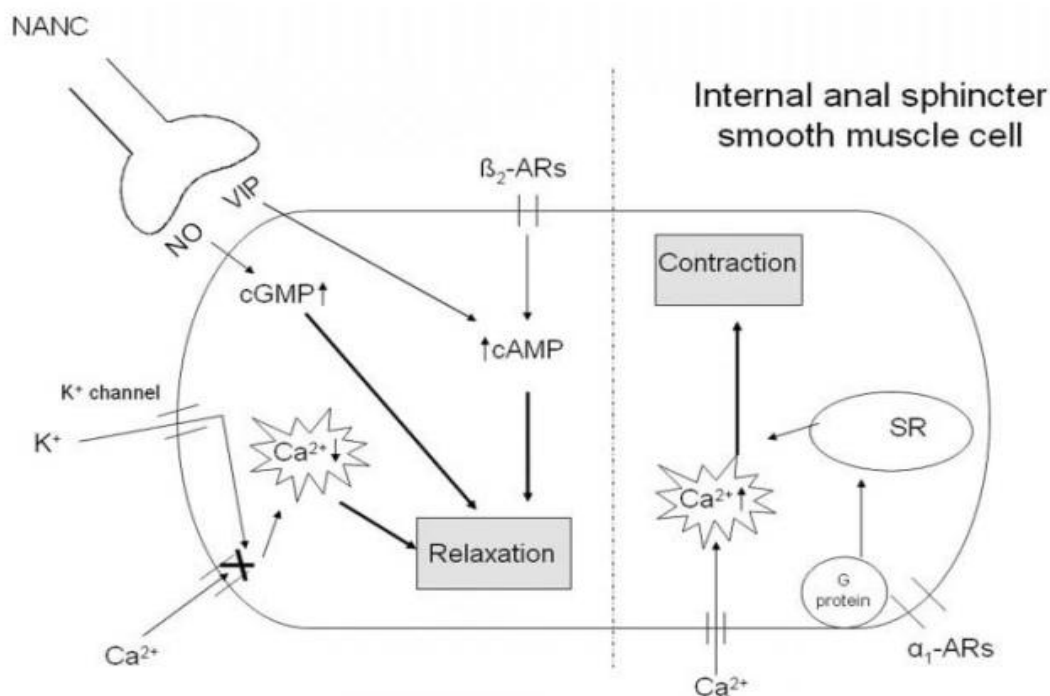
Konzumiranje začinjene i ljute hrane može uzrokovati pogoršanje simptoma (15), no zasad nisu provedena istraživanja utemeljena na znanstvenim dokazima kojima bi se pacijentima pružile precizne smjernice o načinu ishrane. Također je utvrđeno da kod pacijenata s već dokazanom preosjetljivošću na proteine kravljeg mlijeka konzumacijom mlijeka i/ili mliječnih proizvoda dolazi do infiltracije rektalne mukoze proupalnim stanicama, te postoji povišena razina intraepitelnih limfocita i eozinofila u lamini propriji. Kod takvih pacijenata je zabilježeno i povećanje tlaka u analnom sfinkteru (16).

Prevalenciju analne fisure u populaciji je teško odrediti s obzirom na to da se tek manji broj pacijenata javlja na liječnički pregled iako ovo stanje značajno smanjuje kvalitetu života (17). U SAD-u se primjerice bilježi pojavnost od 235000 (18) pa do 342000 (19) novih slučajeva godišnje, od kojih 40% pacijenata opisuje prisutnost

simptoma u trajanju od nekoliko mjeseci pa čak do nekoliko godina. Epidemiološki podaci o učestalosti analnih fisura u Republici Hrvatskoj nisu nađeni.

### **1.2.2. Patofiziologija**

O povezanosti tvrde, obilne stolice s nastankom analne fisure se u znanstvenim medicinskim krugovima polemizira jer tek jedna četvrtina pacijenata s fisurom ima konstipaciju (20). Bitan čimbenik patofiziologije jest povećan tonus analnog sfinktera i posljedična ishemija (13, 20, 21). Naime, ovo područje krvlju opskrbljuju inferiorne rektalne arterije, koje su ogranci unutarnje pudendalne arterije, a prolaze kroz unutarnji analni sfinkter (Slika 1). Kod zdravih ispitanika posteriorno područje analnog kanala je najslabije prokrvljeno (22), što je također potvrđeno i kod pacijenata s analnom fisurom (23). Kada se poveća tlak u mišiću, mišićna vlakna pritiskom na krvne žile uzrokuju smanjenje njihovog promjera, što rezultira smanjenom prokrvljenosti tkiva. Do kontrakcije i povišenja tlaka u stanicama glatkih mišića unutarnjeg analnog sfinktera dolazi uslijed stimulacije  $\alpha_1$  adrenoreceptora ili ulaska kalcija (Slika 5).



**Slika 5.** Mehanizmi relaksacije i kontrakcije unutarnjeg analnog sfinktera. Dušikov oksid (NO) i vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP) oslobođeni iz neadrenergičkih, nekolinergičkih živčanih vlakana (NANC), povećavaju koncentraciju cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP) odnosno cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) uzrokujući relaksaciju sfinktera. Ulazak  $K^+$  iona i blokada ulaska  $Ca^{2+}$  iona dovodi do hiperpolarizacije i relaksacije. Aktivacija  $\beta_2$  adrenoreceptora ( $\beta_2$ -ARs) povećava razinu unutarstaničnog cAMP-a, što rezultira relaksacijom glatkog mišića. Do kontrakcije dolazi nakon ulaska iona kalcija, odnosno njegovog oslobađanja iz sarkoplazmatskog retikuluma (SR) ili uslijed stimulacije  $\alpha_1$  adrenoreceptora ( $\alpha_1$ -ARs)(24).

U nalazima angiografije pacijenata s analnom fisurom zabilježena je deficijencija arteriola kod 85% bolesnika uz kontinuirano povišen bazalni tonus unutarnjeg sfinktera (13). Sukladno dobivenim rezultatima, razvijena je teorija kako iz mikrotraume anoderma može nastati fisura (Slika 3), koja uzrokuje bol i spazam unutarnjeg analnog sfinkera, čime se smanjuje stupanj perfuzije analne regije, a zbog nastale ishemije proces zacjeljivanje fisure je spor, otežan i dugotrajan (19).

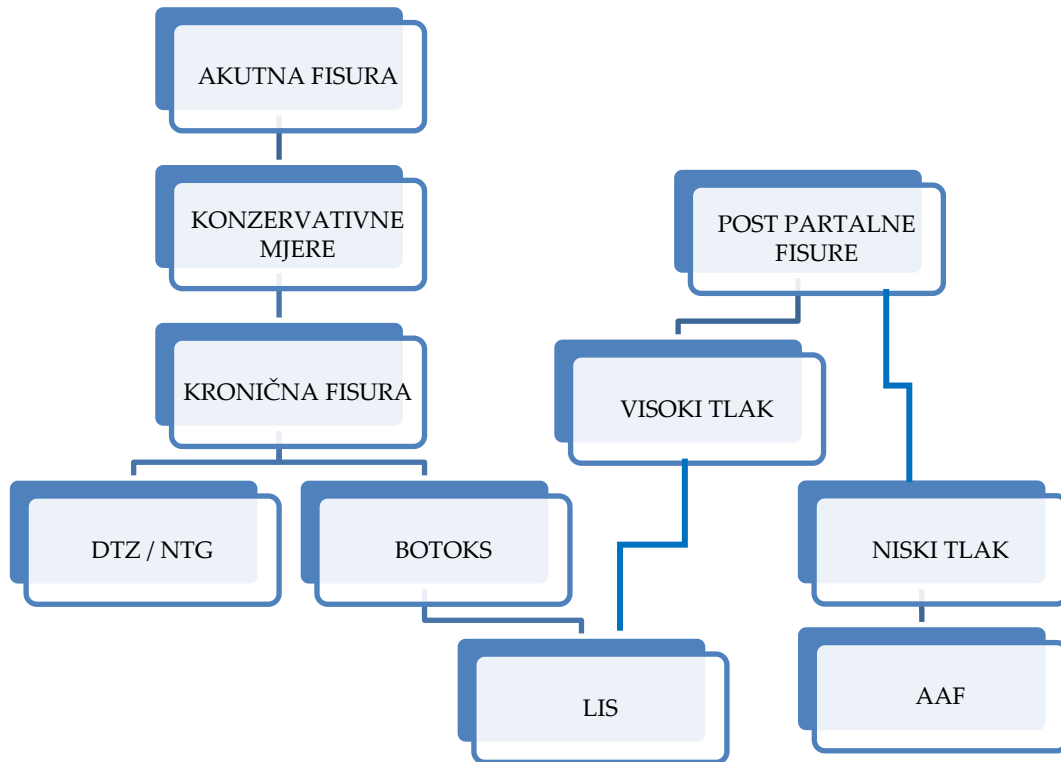
### 1.3. Smjernice u terapiji analne fisure

Različiti su pristupi u liječenju analne fisure, ovisno o stupnju oboljenja i etiologiji (Slika 6). Pacijentima s akutnom analnom fisurom se, prema smjernicama američkog gastroenterološkog društva (5), preporučuje postepeno uvođenje hrane bogate vlaknima i tekućinom, uz primjenu suportivnih (konzervativnih) mjera, čime se postiže spontano zacjeljivanje fisure kod skoro polovice oboljelih (25). Konzervativne mjere uključuju tople sjedeće kupke u trajanju od 10 do 15 minuta nakon svake stolice kako bi se ublažila nelagoda i pružilo privremeno olakšanje aktivacijom somatoanalnog refleksa, te lokalnu primjenu anestetika poput lidokaina. U slučaju jakih bolova nakon defekacije preporučuje se peroralna primjena paracetamola ili ibuprofena. S druge pak strane, slabe opioidne analgetike bi trebalo izbjegavati, budući da je moguća nuspojava konstipacija, koja pogoršava kliničku sliku (26).

Za liječenje kroničnih fisura američke smjernice preporučuju topikalne lijekove iz skupine blokatora kalcijevih kanala ili nitrata. Slične su britanske smjernice, u kojima je prednost dana upotrebi topikalnog diltiazema u odnosu na nitroglicerina zbog manje nuspojave (27) uz obavezan režim doziranja dva puta dnevno tijekom 6-8 tjedana. Ukupna količina pripravka za jednu kuru liječenja (6-8 tjedana) ne bi trebala prelaziti 120 grama 2% diltiazemklorida (28).

Za pacijente kod kojih nema odgovora na farmakološko liječenje savjetuje se davanje injekcije botulinskog toksina u analni sfinkter, odnosno, kao zadnja linija

terapije, preporučuje se kirurški zahvat, tj. unutarnja analna sfinkterotomija ili manualna analna dilatacija (4, 5, 9).



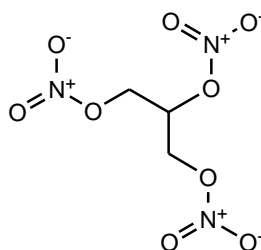
**Slika 6.** Mogućnosti liječenja analne fisure. Konzervativne mjere uključuju korištenje vlakana u prehrani, sjedeće kupke i primjenu analgetika. DTZ, 2% diltiazem; NTG, 0,2% nitroglicerina; LIS, lateralna sfinkterotomija unutarnjeg mišića; AAF, „anal advancement flap“ (vrsta kirurškog zahvata) (4)

## 1.4. Lijekovi u lokalnoj terapiji analne fisure

Lokalna terapija analne fisure se provodi topikalnom primjenom lijekova iz skupine nitrata (nitroglicerina) ili blokatora kalcijevih kanala (najčešće diltiazemom, rjeđe nifedipinom, dok je lerkanidipin još u istraživanjima).

### 1.4.1. Nitrati: nitroglicerina

Primjena nitroglicerina (gliceriltrinitrata) (Slika 7) u lokalnoj terapiji analne fisure temelji se na mehanizmu djelovanja lijeka koji uključuje denitriranje nitroglicerina u stanicama glatkih mišića (djelovanjem enzima glutation S-transferaze) pri čemu se otpušta slobodni nitratni ion, koji se dalje metabolizira u dušikov monoksid.



Slika 7. Struktura molekule nitroglicerina

(prilagođeno prema literaturnom navodu 29)

Svi se tipovi glatkih mišića, u odgovoru na nitroglicerina, relaksiraju (30), te se upravo zbog takvog učinka počela istraživati njegova potencijalna primjena za terapiju analne fisure. Vene reagiraju pri najnižim koncentracijama lijeka, a arterije pri nešto višim koncentracijama. Zahvaljujući ovom učinku, dolazi do povećanog protoka krvi u području fisure i smanjenja pritiska u tkivu analnog kanala čime se

pospješuje proces zacjeljivanja. Primjenom 375 mg 0,4% nitroglicerinske masti, koja odgovara ukupnoj dnevnoj dozi od 3 mg nitroglicerina, najčešća nuspojava koja se javljala u 20-25% pacijenata bila je glavobolja. Međutim, ona je bila manjeg intenziteta nego bol uzrokovana fisurom te su mnogi ispitanici bili spremni prihvatiti ovu nuspojavu kao faktor rizika (31). Prema nekim istraživanjima, topikalna primjena nitroglicerina nema snažne preporuke (5) jer nije nađena značajno veća uspješnost zacjeljivanja u odnosu na placebo skupinu ispitanika. Naime, u obje skupine zacjeljivanje je postignuto u otprilike 50% ispitanika (32, 32). S druge strane, ranija klinička istraživanja su pokazala da je nakon dvomjesečne terapije 0,2% (w/w) nitroglicerinom postignut oporavak u dvije trećine pacijenata, u odnosu na 8% uspješnosti zacjeljivanja u placebo skupini (34). 0,2% nitroglicerina je dostupan kao magistralni pripravak u ljekovitom obliku masti. Preporučena količina apliciranog lijeka iznosi između polovice do veličine jednog zrna graška što je podložno različitim interpretacijama od strane samih ispitanika. Budući da pacijenti sami apliciraju lijek, takvo doziranje posljedično dovodi do varijabilnosti u količini apliciranog lijeka za vremena trajanja terapije i varijabilnosti u učinkovitosti terapije (24, 35).

Uspješnost liječenja i učestalost nuspojava, osim što ovise o količini nanesenog pripravka, također ovise i o mjestu primjene. Naime, aplikacija unutar samog analnog kanala rezultirat će drugačijim opsegom apsorpcije lijeka u odnosu na lijek primijenjen na deblju, keratiniziranu perianalnu površinu kože (24). Dodatni faktor varijabilnosti leži u činjenici da se lijek priprema kao magistralni pripravak, te je u

jednom ispitivanju utvrđeno kako 20,8% analiziranih uzoraka ne udovoljava zahtjevima američke farmakopeje (36).

Zbog nehomogenosti i varijabilnosti doza u magistralnom pripravku nitroglicerina, razmatrana je mogućnost korištenja transdermalnih flastera. Primjena nitroglicerinskih flastera u koncentraciji 10 mg/24 h, koji se učvršćuju na kožu ispod pupka i mijenjaju jednom dnevno tijekom 8 tjedana, pokazala se jednako učinkovitom kao i magistralni pripravak (35). Premda je pacijentima jednostavnije i prihvatljivije korištenje flastera u odnosu polučvrsti pripravak, zbog sistemske apsorpcije nitroglicerinski flasteri nisu odobreni za liječenje analne fisure.

#### **1.4.2. Blokatori kalcijevih kanala**

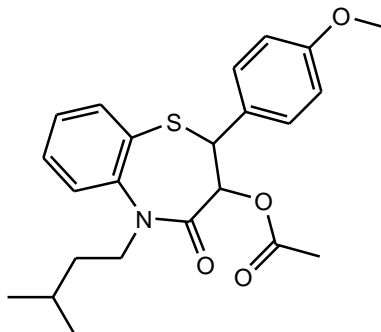
Učinak na zacjeljivanje fisure pokazuju lijekovi iz benzotiazepinske (diltiazem) i dihidropiridinske skupine (nifedipin, lerkanidipin) (5, 37, 38).

##### **1.4.2.1. Diltiazem**

Diltiazem (Slika 8) svoj učinak na relaksaciju tonusa sfinktera ostvaruje sprečavanjem ulaska kalcijevih iona u stanicu čime se smanjuje vezanje kalcija s kalmodulinom te je posljedično smanjena aktivacija miozinskih lakih lanaca i time oslabljena kontrakcija. Uz relaksaciju unutarnjeg analnog sfinktera, također dolazi do širenja krvnih žila anoderma, čime se povećava protok krvi, veći je dotok kisika i hranjivih tvari, te je na taj način pospješeno zacjeljivanje fisura (39). Diltiazem se



obično koristi u obliku diltiazemklorida, koji je zbog veličine (451 Da) i koeficijenta razdjeljenja ( $\log P=2.7$ ) (40) posve prikladan i za topikalnu primjenu.



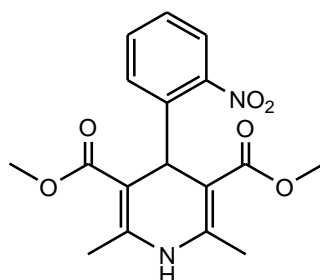
**Slika 8.** Struktura molekule diltiazema (prilagođeno prema literaturnom navodu 40)

Liječenje analne fisure diltiazemom provodi se primjenom topikalnog pripravka 2% diltiazemklorida u ljekovitom obliku hidrogela dva puta na dan tijekom 6-8 tjedana. Ovakav režim doziranja rezultira značajnim smanjenjem bolova i krvarenja (17, 41). Međutim, dostupni podaci o uspješnosti izlječenja se jako razlikuju, te iznose od 49% (41), 67% (42), 77% (43), do 89% (39). Ukupna količina hidrogela za jednu kuru liječenja u trajanju od dva mjeseca iznosi 60 g (28). No, ukoliko nije došlo do potpunog cijeljenja fisure, terapija se može nastaviti korištenjem pripravka jednom dnevno tako da ukupna količina pripravka za jedan ciklus liječenja može iznositi do 120 g gela 2% diltiazemklorida. U usporedbi s drugim najčešće propisivanim topikalnim lijekom gliceriltrinitratom (nitroglicerinom), diltiazem ima podjednaku uspješnost izlječenja (44), no smjernice za liječenje analne fisure, prednost daju diltiazemu zbog značajno manje učestalosti pojave glavobolje (44, 45, 46) uslijed neželjene sistemske apsorpcije lijeka. Druge moguće nuspojave uključuju

abdominalne bolove, mučninu, povraćanje, svrbež (44), te rijetko kontaktne alergijske reakcije (28, 47).

#### 1.4.2.2. Nifedipin

Nifedipin (Slika 9) je predstavnik dihidropiridinskih lijekova unutar skupine blokatora kalcijevih kanala. Svoj učinak postiže vezanjem za  $\alpha_1$  podjedinicu L-tipa voltažnih kalcijevih kanala glatkih mišića, dovodeći do značajno smanjene transmembranske struje kalcija i posljedično, dugotrajne mišićne relaksacije (48).



**Slika 9.** Struktura molekule nifedipina (prilagođeno prema literaturnom navodu 49)

Za sada ne postoji preporučena standardizirana koncentracija nifedipina u topikalnom pripravku za liječenje analne fisure kao niti režim doziranja ili duljina trajanja terapije. Dosadašnja ispitivanja uključivala su primjenu 0,2% nifedipina u masnoj podlozi dva puta dnevno tijekom 3 tjedna (50) i 0,5% nifedipina (mast) tri puta dnevno tijekom 2 mjeseca (51). Nanošenje 0,5% nifedipina u emulzijskoj podlozi (krema) dva puta na dan kroz 4 tjedana u tankom sloju na području 1 cm oko anusa dovelo je do zacjeljivanja fisure u 70% ispitanika u odnosu na 12% ispitanika kontrolne skupine (38). U drugom istraživanju, u kojem je primjenjivan 0,3%

nifedipin u obliku masti u istom režimu doziranja, nakon 6 tjedana primjene, zacjeljivanje je potvrđeno kod 94,5% ispitanika u odnosu na 16,4% ispitanika u kontrolnoj skupini (52). Uz smanjenje boli i zacjeljivanje, nifedipin ima još dva specifična učinka. On, naime, modulira mikrocirkulaciju (53) i djeluje protuupalno (54).

Nedostaci u lokalnoj terapiji analne fisure nifedipinom su slični kao i kod diltiazema. Naime, na tržištu ne postoji gotovi lijek, već se u ljekarnama izrađuje magistralni pripravak umješavanjem 100 mg nifedipina u 20 g žutog vazelina (51) što može prouzročiti varijabilnosti u kvaliteti pripravka, ujednačenosti doza i stabilnosti tijekom skladištenja. Najčešća nuspojava koja se javlja u 5% slučajeva je glavobolja, no nju se može prevenirati uzimanjem paracetamola prije nanošenja lijeka (51).

Nedostatke vezane za varijabilnost i kvalitetu magistralno izrađenog lijeka, te neujednačenost doze, trenutno je moguće spriječiti jedino davanjem lijeka u peroralnom obliku, no ovaj način primjene lijeka ima svoje nedostatke. Uobičajeni režim uzimanja nifedipina oralno u dozi od 20 mg dva puta dnevno, pokazuje uspješnost u liječenju fisura u 60% slučajeva (55, 56, 57, 58), što je slabiji učinak u odnosu na topikalno liječenje, i praćeno je većom učestalosti nuspojave. Brzi početak djelovanja nifedipina, lijeka prve generacije dihidropiridina, može dovesti do naglog pada arterijskog tlaka s posljedičnom simpatičkom aktivacijom i refleksnom tahikardijom, što može biti opasno za koronarne bolesnike. Nuspojave poput

crvenila lica, glavobolje i perifernog edema javljaju se kod 10% pacijenata koji su uzimali oralnu terapiju (58).

Svi opisani lijekovi, nitroglicerina, nifedipin i diltiazem, pokazuju inhibiciju mišićnog tonusa unutarnjeg sfinktera ovisnu o koncentraciji, s time da je u ispitivanjima potentnosti diltiazem pokazao najveću potentnost, a slijede ga nitroglicerina, te potom nifedipin (59).

## **1.5. Hidrogelovi kao podloge za izradu topikalnih pripravaka namijenjenih liječenju analne fisure**

### **1.5.1. Opće značajke hidrogelova**

Hidrogelovi su polučvrsti farmaceutski oblici namijenjeni primjeni lijekova na kožu i/ili sluznicu. Sastavljeni od hidrofilne tekuće faze (disperzno sredstvo, do 90%) koja je imobilizirana u trodimenzionalnoj mreži polimera (gelirajućeg sredstva, disperzna faza). U kontaktu s vodom ili smjesom vode i alkohola (hidroalkohola) čestice čvrstih polimera bubre i nastaje trodimenzionalna struktura uslijed stvaranja fizikalnih, reverzibilnih veza (vodikove veze, van der Waalsove interakcije) ili kemijskih, ireverzibilnih veza (kovalentne veze) između otapala i gelirajućeg sredstva. Zavisno o prirodi gelirajuće tvari i tekuće faze, hidrogelovi mogu biti prozirni ili neprozirni. Hidrogelovi uobičajeno sadrže 10-20% omekšivača (glicerol, propilenglikol) koji pružaju zaštitu od isušivanja, povećavaju razmazivost pripravka, a mogu doprinijeti i povećavanju topljivosti lijeka. Zbog visokog udjela vode, hidrogelove je nužno konzervirati prikladnim konzervansima (parabeni, klorheksidin). U izradi se nakon potpune hidratacije gelirajuće tvari (polimer) primješavaju ostali sastojci gela, dok se mirisi i boje dodaju zadnji u pripravak (60).

Kao gelirajuće tvari u hidrogelovima se koriste prirodni i polusintetski polimeri poput derivata celuloze (metilceluloza, hidroksietilceluloza, natrijkarboksimetilceluloza), hitin, kitozan, alginat, hijaluronska kiselina ili sintetski

polimeri kao što su derivati poliakrilne kiseline, polivinilpirolidon, polietilenglikol (60).

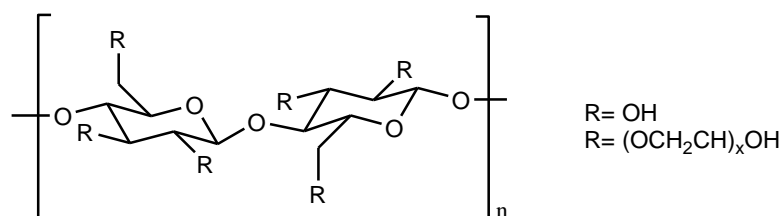
### 1.5.2. Hidroksietilceluloza

Hidroksietilceluloza (Slika 10) spada u neionske polisaharide. Ishodna molekula za dobivanje ovog spoja je celuloza koju grade u vodi netopljivi  $\beta$ -D-(1,4)-glukoza monosaharidi. Uz dodatak natrijevog hidroksida dolazi do aktivacije i bubrenja celuloze. Ovakva alkalna celuloza u prisutnosti plinovitog etilenoksida prolazi niz eterifikacija u kojima se vodikovi atomi hidroksilne skupine celuloze zamjenjuju hidroksietilnom grupom uz nastanak u vodi topljivog derivata - hidroksietilceluloze (61, 62).

Dobiveni eteri se razlikuju prema stupnju supstitucije (eng. *degree of substitution*) koji je definiran prosječnim brojem supstituiranih hidroksilnih skupina po molekuli glukoze. Budući da svaka molekula glukoze ima tri hidroksilne skupine za reakciju eterifikacije, maksimalna vrijednost stupnja supstitucije je tri. Drugi parametar po kojem se razlikuju je molarna supstitucija (eng. *molar substitution*), odnosno prosječan broj mola supstituenata po molekuli glukoze. Ovaj broj teoretski nije ograničen budući da svaka hidroksietilna skupina može ulaziti u daljnje reakcije eterifikacije (63).

Hidroksietilceluloza je najhidrofilniji spoj iz skupine celuloznih etera, a topljivost molekule povezana je sa stupnjem molarne supstitucije. Stupanj molarne

supstitucije komercijalno dostupne hidroksietilceluloze iznosi oko 1,2 (63). Zbog navedenog svojstva, hidroksietilceluloza se široko koristi u farmaceutskoj industriji u izradi filmova koji se primjenjuju na sluznice, kao gelirajući agens u hidrogelovima te za povećanje viskoznosti tekućih pripravaka poput sirupa i suspenzija (61).



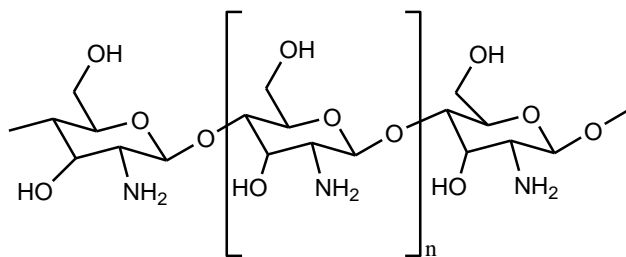
**Slika 10.** Struktura hidroksietilceluloze (prilagođeno prema literaturnom navodu 61)

Hidroksietilceluloza je komercijalno dostupna kao bijeli do svijetlo žuti prah bez okusa i mirisa. U obliku praha je higroskopna, dok je u obliku vodenih otopina stabilna pri širokom rasponu pH (2-12), te ne mijenja viskoznost dodatkom soli ili površinski aktivnih tvari. Gelove hidroksietilceluloze je potrebno konzervirati kako bi se izbjegla razgradnja u prisutnosti enzima iz bakterija i gljivica (64). Postojale su sumnje oko sigurnosti korištenja etoksiliranih spojeva u proizvodima namijenjenim osobnoj higijeni zbog štetnosti ostatnog etilenoksida, no one su odbačene jer je potvrđeno da ne uzrokuju nuspojave niti štetnosti u organizmu (65).

### 1.5.3. Kitozan

Kitozan je biorazgradljiv, nisko toksičan, kationski filmogeni polimer kojeg je otkrio Henri Braconnot 1811. godine (66). Molekulu grade linearno vezane  $\beta$ -(1-4) N-acetil-D-glukozaminske (GlcNAc) i D-glukozaminske (GlcN) jedinice (Slika 11). O

omjeru ovih dviju skupina ovisi hoće li molekula u kiselom pH biti amfolit ili polielektrolit (67). Kitozan je jedini prirodno prisutan pozitivno nabijeni polisaharid. U navedenom obliku u prirodi se nalazi tek u manjim količinama, npr. kao dio staničnog zida gljiva vrste *Mucor*.



**Slika 11.** Struktura kitozana (prilagođeno prema literaturnom navodu 68)

U većim količinama kitozan se dobiva parcijalnom deacetilacijom hitina, koji je nakon celuloze najrašireniji biopolimer (69). Ovaj postupak izvodi se u jako lužnatom mediju (natrijev ili kalijev hidroksid) i pri povišenoj temperaturi (100°C), uslijed čega nastaju parcijalno deacetilirani polimeri *N*-acetilglukozamina. Stupanj deacetilacije predstavlja omjer *D*-glukozaminskih jedinica i zbroja *D*-glukozamina i *N*-acetil-*D*-glukozaminskih jedinica duž polimernog lanca. Kitozan mora imati najmanje 60% *D*-glukozaminskih jedinica, što odgovara stupnju deacetilacije 60. Budući da je teško postići unaprijed definirana, ciljana svojstva kitozana prije same deacetilacije hitina, današnji pristup u proizvodnji kitozana temelji se na analizi nastalog produkta, njegove viskoznosti, molekulske mase i stupnja deacetilacije. Stoga je iznimno bitno provesti odgovarajuću karakterizaciju kitozana koristeći validirane analitičke metode. Kao i kod drugih prirodnih sirovina, u uzorcima je moguća prisutnost organskih i anorganskih onečišćenja, visoka varijabilnost ishodne



sirovine, što uz slabu topljivost dodatno otežava određivanje stupnja deacetilacije (71). Stupanj postignute deacetilacije značajno utječe na fizičko-kemijska i biološka svojstva kitozana (71), a može se utvrditi spektroskopski (IR,  $^1\text{H}$  NMR, UV), pH-potenciometrijskim titracijama, enzimatskom razgradnjom (72) i diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (73). Druga važna karakteristika kitozana je njegova molekulska masa koja se određuje reološkim (viskozimetar) ili kromatografskim metodama (74).

Primarne amino skupine karakteristične za kitozan imaju pKa oko 6.5 (75). U pH okruženju nižem od navedenog, amino skupine su protonirane, čime kitozan postaje topljivi kationski polielektrolit, dok su u okruženju višeg pH amino skupine deprotonirane čime se pokreće precipitacija polimernih lanaca, te je stoga topljivost kitozana ovisna o pH. Protonirane amino skupine mogu stvarati ionske komplekse s brojnim anionskim makromolekulama poput lipida, proteina, DNA, a također mogu ući u interakcije s drugim molekulama zbog čega dolazi do acetilacije, kvarternizacije, reakcije s aldehidima, ketonima i kelacije metala. Također, primarne amino skupine omogućuju različite kemijske modifikacije kovalentnim vezanjem drugih funkcionalnih skupina na izvornu molekulu kitozana. Takvim kemijskim modifikacijama se mogu podesiti svojstva kitozana prema točno određenim namjenama (76). Hidroksilne skupine također pridonose reaktivnosti jer omogućuju stvaranje vodikovih veza s polarnim atomima susjednih molekula, reakcije eterifikacije i reakcije esterifikacije (77).

Kitozan je biorazgradljiv polimer pri čemu nastaju netoksični oligosaharidi različite duljine (78). Pritom se kitozani manje molekulske mase brže razgrađuju djelovanjem proteaza i lizozima (79).

Kitozan se uvelike istražuje u farmaceutskoj tehnologiji pri oblikovanju terapijskih makro-, mikro- i nano-sustava (80, 81, 82). Prisutnost amino skupina u molekuli kitozana omogućuje adheziju polimera na negativno nabijenu biološku površinu (sluznice). Time se omogućuje dulje zadržavanje formulacije na mjestu primjene i stvaraju uvjeti za učinkovitu lokalnu dostavu lijeka (83).

#### **1.5.4. Mogućnosti primjene kitozanskih hidrogelova u terapiji analne fisure**

Zbog visokog udjela vode, hidrogelovi su se pokazali izrazito prikladnim podlogama za primjenu hidrofилnih lijekova na sluznice i kožu. Imajući u vidu povoljan učinak hidrogela na oštećenoj (peri)analnoj regiji, hidrogelovi su izvrsna podloga za izradu topikalnih pripravka namijenjenih liječenju analne fisure. Dodatni čimbenik je činjenica što ne ostavljaju tragove na različitim tkaninama što doprinosi boljoj suradljivosti od strane pacijenata (84).

Kitozan daje veliku mogućnost za oblikovanje različitih farmaceutskih pripravaka, posebice hidrogelova (80, 85), 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 a time i proces cijeljenja rana

(86). 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 molekule kitozana, na specifične receptore povećava aktivaciju makrofaga što rezultira otpuštanjem bioloških medijatora. Dodatno, kitozan aktivira sustav komplementa i potiče fibroblaste na otpuštanje interleukina 8 i drugih citokina (83).

Antimikrobni učinak prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama (87, 88) te gljivicama (89) važno je biološko svojstvo kitozana. Točan mehanizam antimikrobnog djelovanja kitozana nije poznat, no smatra se da nije isti za Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije zbog razlika u građi njihove površine. Pri pH nižem od vrijednosti  $\text{pK}_a$ , kitozan je polikation koji ulazi u elektrostatske interakcije s anionskim strukturama poput lipopolisaharida i proteina na površini Gram-negativnih bakterija (87). Kitozan također kelira metale u tragovima, koji se nalaze u staničnom zidu čime se narušava integritet membrane mikroorganizma (90). Gram-pozitivne bakterije u svojoj stijenci sadrže negativno nabijene grupe (poput teikoične kiseline) s kojom pozitivno nabijene molekule kitozana stupaju u interakcije mijenjajući permeabilnost stijenke, što uzrokuje gubitak esencijalnih tvari iz bakterijske stanice. Dodatni predloženi mehanizam antibakterijskog učinka uključuje vežanje kitozana za bakterijsku DNA pomoću njegovih protoniranih amino skupina i posljedično inhibiciju sinteze RNA (91). Antifungalni učinak kitozana temelji se na supresiji sporulacije i germinacije spora (91). Inhibitorni učinak na bakterije i gljivice

izraženiji je u kiselom (87), budući da je u lužnatom kitozan slabo topljiv, a njegove amino skupine nisu nabijene (93). Osim povišenja pH, na antimikrobnu aktivnost negativno utječu povišena temperatura i stajanje (94).

Istraživanja utjecaja molekulske mase kitozana na proces cijeljenja rana su pokazala da kitozan velike molekulske mase s većim stupnjem deacetilacije pokazuje bolji učinak na zacjeljivanje rana od kitozana male i srednje molekulske mase (86).

## **1.6. Ispitivanja topikalnih pripravaka**

Ispitivanja svih polučvrstih pripravaka obuhvaćaju ispitivanja kvalitete (identifikacija, određivanje sadržaja, onečišćenja, fizikalno-kemijska svojstva uključujući pH, viskoznost, topljivost, homogenost, reološke karakteristike, sadržaj vode, mikrobiološka čistoća, sadržaj konzervansa i antioksidansa), te ispitivanja oslobađanje djelatne tvari (lijeka) (95).

### **1.6.1. *In vitro* ispitivanja oslobađanja djelatne tvari iz polučvrstih pripravaka primjenom Franz difuzijske ćelije**

Za postizanje željenog učinka lijeka potrebno je postići optimalnu koncentraciju djelatne tvari na mjestu djelovanja, te sukladno tome, prilikom podnošenja zahtjeva za registraciju lijeka namijenjenog primjeni na kožu, regulatorne agencije zahtijevaju farmakokinetičke podatke o lijeku. Na području Europske unije ovi su zahtjevi obuhvaćeni Direktivom 2001/83/EC, (96) te se kontinuirano

dopunjavaju kroz različite smjernice. Za procjenu biorasploživosti lijeka nakon dermalne primjene koriste se *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* testovi. *In vitro* ispitivanja su jednostavnija, ekonomski prihvatljivija te nije potrebno ishođenje dozvole nadležnih etičkih povjerenstava za njihovo provođenje. Poseban značaj ovakvih testova je u: (i) fazi razvoja lijeka prilikom optimizacije formulacije, (ii) proizvodnji generičkih lijekova prilikom uspoređivanja oslobađanja djelatne tvari iz ispitivane formulacije u odnosu na referentnu, (iii) nakon dobivanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet, te (iv) osiguranju kvalitete svake proizvedene serije ili prilikom promjene mjesta proizvodnje lijeka, odnosno promjena unutar proizvodnog pogona i reformuliranja (budući da podloga i druge pomoćne tvari imaju značajan utjecaj na stabilnost i otpuštanje aktivne tvari). *In vitro* testovi oslobađanja djelatne tvari (lijeka) se ne mogu koristiti kao zamjena za *in vivo* procjene biorasploživosti. Ispitivanje oslobađanje djelatne tvari može se ispitati vertikalnom difuzijskom ćelijom (Franz difuzijskom ćelijom), imerzijskom (Enhancer) ili protočnom ćelijom (USP aparatura 4) (97, 98).

Franz difuzijska ćelija je jednostavan, reproducibilan test u kojem se upotrebljava vertikalna ćelija. Aparaturu čine dva dijela: donorski i receptorski, međusobno odijeljeni inertnom, polupropusnom sintetskom membranom (Slika 12). Uzorak se u tankom sloju nanosi na membranu, te se u točno definiranim vremenskim intervalima uzimaju uzorci receptorskog medija i određuje se količina oslobođene djelatne tvari. Receptorski odjeljak se nadopunjuje ekvivalentnim volumenom svježeg termostatiranog receptorskog medija. Temperatura sustava

održava se na  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  što je uobičajena temperatura kože, te vlažnosti 30-70% (99).

Za pripravke koji se primjenjuju na sluznice (npr. rektalna, vaginalna) sustav se termostatira na  $37^\circ\text{C}$ .



**Slika 12.** Franz difuzijska ćelija (100)

Duljina provođenja ispitivanja mora biti prilagođena ispitivanom lijeku, te je u nekim slučajevima potreban 24-satni ili dulji period za adekvatnu karakterizaciju (pripravci kod kojih se očekuje produljeno oslobađanje djelatne tvari iz formulacije). Važno je obratiti pozornost na očuvanost integriteta membrane u periodu ispitivanja. Također moraju biti definirani i drugi čimbenici koji utječu na rezultate kao npr. sastav receptorske faze, primijenjena količina (masa) ispitivanog polučvrstog pripravka, te vrsta membrane (99). Primijenjena količina lijeka mora oponašati količinu (dozu) koja bi odgovarala realnim uvjetima što znači  $1-5 \text{ mg/cm}^2$  za čvrste i do  $10 \text{ } \mu\text{l/cm}^2$  za tekuće ljekovite oblike (99).

Receptorski medij mora imati točno definiran sastav. Za hidrofobne (lipofilne) tvari to je vodeni medij uz dodatak tvari za povećanje topljivosti, a za hidrofilne lijekove receptorski medij su otopine pufera. Nužan preduvjet je prikladna topljivost ispitivane tvari kako medij ne bi djelovao kao barijera za apsorpciju, niti utjecao na integritet korištene membrane (99). Sukladno Europskoj farmakopeji, uvjeti osigurane topljivosti postignuti su kada je postignuta koncentracija ispitivane tvari u receptorskom mediju barem tri puta manja od koncentracije zasićene otopine lijeka. Receptorska tekućina u statičnim sustavima kao što je Franz difuzijska ćelija mora biti kontinuirano miješana (99).

### 1.6.2. Reološka ispitivanja

Reološka ispitivanja su nezaobilazna ispitivanja tijekom razvoja i praćenja kvalitete polučvrstih pripravaka. Reologija je znanost koja proučava promjene u obliku i tečenju tvari, a naziv su osmislili njeni utemeljitelji, profesori Marcus Reiner i Eugene Bingham prema grčkim riječima „*rheo*“ (tečenje, teći) i „*logos*“ (znanost) (101). U reologiji se tvari (materijali) klasificiraju u viskozne, elastične i viskoelastične fluide. Idealni viskozni fluidi pod djelovanjem vanjskog stresa, ne zadržavaju energiju, već se ireverzibilno deformiraju i nastavljaju teći, a energija se pretvara u toplinu. Idealni elastični materijali zadržavaju svu primljenu vanjsku energiju, a prestankom djelovanja vanjske sile, vraćaju se u početno stanje. Viskoelastični materijali pokazuju osobinu koja je kombinacija ranije navedenih; dio energije zadržavaju u svojoj strukturi (opisuje se modulom pohrane  $G'$ ), a dio energije se gubi tečenjem (opisuje se modulom gubitka  $G''$ ). Njihovo ponašanje je između onog idealnih fluida (viskoznost) i idealnih krutina (elastičnost) (102).

Hidrogelovi najčešće pokazuju ne-Newtonovske pseudoplastične karakteristike tečenja (103). Pseudoplastični sustavi pokazuju smanjenje prividne viskoznosti povećanjem smičnog naprezanja što je rezultat mikrostrukturnih preslagivanja do kojih dolazi u sustavu zbog djelovanja vanjske sile. Kod manjih smičnih brzina pseudoplastični sustav ima konstantnu viskoznost, tzv. nultu smičnu viskoznost ( $\eta_0$ ), neuređene je strukture i postoje brojne međumolekulske interakcije, a lanci polimera su međusobno umreženi u klupko. Ukoliko se povećava vanjska



sila, viskoznost ovih fluida se smanjuje te u trenu postizanja kritične vrijednosti smične brzine ili smičnog naprezanja dolazi do naglog pada viskoznosti. Pad viskoznosti je posljedica uređivanja strukture budući da zbog utjecaja vanjske sile dolazi do pucanja međumolekulskih interakcija, odmotavanja i slaganja lanaca polimera u paralelne snopove, te tečenja fluida. Viskoznost je najmanja kada je postignut maksimalni stupanj orijentacije molekula unutar sustava. Navedeno svojstvo omogućuje da se gel, primjenom vanjske sile, lako razmazuje po površini, dok se prestankom djelovanja vanjske sile, formulacija prestaje gibati te se zadržava na mjestu primjene (104).

Postoje brojni testovi za ispitivanje reoloških svojstava materijala. U farmaceutskoj industriji takva su mjerenja iznimno bitna za: (i) određivanje strukture i sastava sirovina, (ii) praćenja promjena u formulaciji u fazi razvoja (miješanje, emulgiranje, dispergiranje, oslobađanje lijeka iz podloge), (iii) praćenja utjecaja reoloških svojstava na kakvoću gotovog pripravka, (iv) punjenja lijeka u primarni spremnik (istjecanje kroz grla boca, tečenje prašaka, doziranje kapsula), te (v) praćenja utjecaja čuvanja i skladištenja (105, 106). Cilj reoloških mjerenja je da se, oponašanjem gradijenta brzine smicanja koji se javlja kod proizvodnje i primjene lijeka, utvrde željena svojstva i stabilnost formulacije (103).

Reološka karakterizacija uzorka obuhvaća: određivanje profila viskoznosti (mjerenje viskoznosti uz definirane brzine smicanja), oscilacijske testove kao što su testovi promjene amplitude i testovi promjene frekvencije, te ispitivanje oporavka strukture.

Testom promjene amplitude određuje se područje u kojem su  $G'$  i  $G''$  konstantni, odnosno linearno viskoelastično područje (LVE). Povećanjem naprezanja dolazi do pada vrijednosti oba modula; vršna vrijednost  $G'$  iz LVE područja je mjera rigidnosti uzorka, a vršna vrijednost  $G''$  je mjera viskoznosti uzorka. Omjer  $G':G''$  daje informaciju o karakteristikama uzorka, odnosno kada je  $G'>G''$  uzorak će se ponašati više kao viskoelastična krutina, a kada je  $G'<G''$  uzorak se ponaša više kao viskoelastična tekućina (102).

Testom promjene frekvencije se ispituje ovisnost viskoelastičnih modula pohrane  $G'$  i gubitka  $G''$  o frekvenciji odnosno, kakva je unutarnja struktura gela pri različitim frekvencijama, uz konstantnu amplitudu (102).

Testom oporavka strukture se nastoji oponašati uvjete kojima bi ispitivani uzorak bio izložen nakon stavljanja na tržište: stajanje, istiskivanje iz ambalaže te razmazivanje. Iz tog razloga ispitivanje se provodi kombiniranjem oscilacijskih i rotacijskih mjerenja prikladnih amplituda, frekvencija i brzina smicanja u definiranim vremenskim intervalima (107).

### **1.6.3. Ispitivanje adhezivnosti**

Adhezija je proces prijanjanja dviju molekula ili dviju površina jedne uz drugu. Kada se ovaj proces odvija na biološkim odnosno mukoznim membranama, naziva se bio/mukoadhezija (108). Mukozne membrane (sluznice) su vlažne membrane na vanjskim površinama tjelesnih šupljina gastrointestinalnog, dišnog i

urogenitalnog sustava. Građene su od vezivnog tkiva u bazi (lat. *lamina propria*) iznad kojeg je sloj epitelnih stanica i sluzi (lat. *mucus*). Epitel može graditi jedan (u bronhijima, želucu, tankom i debelom crijevu) ili nekoliko slojeva stanica (rožnica, jednjak, vagina). Kod jednoslojnog epitela sluz izlučuju sekretorne stanice izravno na površinu epitela, a kod višeslojnog epitela tu funkciju imaju vrčaste stanice. Njen sastav čini voda (95%), visokomolekulski glikoproteini mucini (0,5-5%), anorganske soli (1%), lipidi i mukopolisaharidi koji se pri neutralnom pH ponašaju kao anionski polielektroliti (109). Sastav sluzi varira ovisno o mjestu sekrecije, ulozi, ali i (pato)fiziološkom statusu organizma. Glavna funkcija je stvaranje zaštitnog sloja koji sprječava prodor patogena, podmazuje i hidratizira epitelne stanice te propušta hranjive tvari i kisik. U sekretornim stanicama, zahvaljujući ionima kalcija koji neutraliziraju negativan naboj mucina, mucin je pohranjen u kompaktnu strukturu. Otpuštanjem iona kalcija u lumen, nastaju elektrostatske repulzije unutar molekule, te dolazi do njenog „odmotavanja“ čime se duljina molekule povećava i do 400 puta. Ovako izduljeni lanci mucina u prisutnosti vode tvore viskoelastični mukozni gel (108).

Mukoadhezivni pripravci su od velikog značaja u medicini i farmaciji. Primjenom takvih pripravaka na sluznice (bukalna, nazalna, vaginalna, rektalna itd.) postiže se dulje zadržavanje pripravka/formulacije na mjestu aplikacije, a dizajnom formulacije može se osigurati polagano kontrolirano oslobađanje djelatne tvari/lijeka, izbjeci prvi prolaz lijeka kroz jetru te povećati bioraspoloživost lijekova/molekula podložnih razgradnji kao što su proteini ili oligonukleotidi (110).

Postoji nekoliko teorija kojima se objašnjava fenomen (bio)adhezivnosti: adsorpcijska, elektronska, teorija difuzije, močenja i loma; no najčešće je bioadhezivnost posljedica sinergističkog djelovanja nekoliko različitih mehanizama (111).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Trenutno na hrvatskom tržištu ne postoje registrirani topikalni pripravci za liječenje analne fisure, već se terapija provodi magistralnim pripravkom diltiazemklorida koji se izrađuje u obliku gela hidroksietilceluloze. Budući da u literaturi ne postoje podaci o reološkim svojstvima i profilu oslobađanja lijeka iz magistralnog pripravka diltiazemklorida, svrha ovog rada je evaluacija postojećeg magistralnog pripravka i razvoj inovativne podloge za uklapanje diltiazemklorid – kitozanskog hidrogela, pripremljenog iz kitozana velike molekulske mase. Prema literaturnim saznanjima njegova primjena zasad nije istraživana za terapiju analnih fisura. Korištenjem kitozanskog gela kao podloge za uklapanje diltiazemklorida moglo bi se poboljšati zadržavanje lijeka na mjestu primjene, pospješiti zacjeljivanje, tj. epitelizacija oštećenog tkiva anusa te osigurati antimikrobni učinak formulacije koji bi doprinijeli većoj terapijskoj učinkovitosti i boljoj adherenciji pacijenata. Stoga će istraživanja u sklopu eksperimentalnog dijela ovog rada će uključivati pripravu i karakterizaciju hidroksietilceluloznog i kitozanskog hidrogela s diltiazemkloridom, ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz različitih gelova, te detaljnu reološku karakterizaciju postojećeg i inovativnog pripravka.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

Instrumenti i pribor:

- celuloza-nitratne membrane 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Franz difuzijska ćelija (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- pH metar (Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj (Branson 1210, Emerson, SAD)
- UV/Vis spektrofotometar Varian Cary 50 Probe (Varian Inc., Nizozemska )
- modularni reometar Physica MCR 301 (Anton-Paar GmbH, Graz, Austria)

Kemikalije:

- diltiazemklorid (Fagron, Barsbüttel, Belgija)
- gelhidroksietilceluloze (Caelo, Hilden, Njemačka)
- kalijdihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- dikalij hidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrij klorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 96% etanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- glicerol (T.T.T.d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- kitozan velike molekulske mase (Fluka, SAD)
- trietanolamin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ledena octena kiselina (Alkaloid, Skopje, Makedonija)

- fosfatni pufer 0,01 M; pH 6,9

Fosfatni pufer pripremljen je otapanjem 1,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska), 2,0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i 8,5 g NaCl u destiliranoj vodi, u tikvici od 1000 ml.

Izmjereni pH pufera iznosio je 6,9.

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

Sve korištene kemikalije odgovarale su farmakopejskim zahtjevima čistoće.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izrada hidroksietilceluloznog gela s diltiazemkloridom

Diltiazemklorid 2% (w/w) hidrogel izrađen je umiješavanjem 2 g diltiazemklorida u komercijalno dostupnu podlogu hidroksietilceluloznog gela (98 g). Pripravak je izrađen u pateni, a izmjereni pH pripravka iznosio je 4,48.

### 3.2.2. Izrada kitozanskog hidrogela

Kitozanski hidrogel (100 g) pripremljen je otapanjem/dispergiranjem 2 g kitozana velike molekulske mase u 44 g 2,5% (v/v) octene kiseline te je dodana jednaka količina (44 g) demineralizirane vode i 10 g glicerola. Pripravak je podvrgnut soniciranju na ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 60 minuta nakon čega je ostavljen na sobnoj temperaturi preko noći da u potpunosti izbubri. Neposredno prije korištenja

gel je degaziran (30 minuta na ultrazvučnoj kupelji). Konačna koncentracija kitozana u hidrogelu iznosila je 2% (w/w).

### **3.2.3. Izrada kitozanskog hidrogela s diltiazemkloridom**

Diltiazemklorid 2% (w/w) gel izrađen je umiješavanjem 1 g djelatne tvari u 2% (w/w) kitozanski hidrogel (49 g) u pateni. Zrak iz pripravka uklonjen je centrifugiranjem na 2000 okretaja/min tijekom 3 minute.

### **3.2.4. Optimiziranje pH vrijednosti hidrogelova**

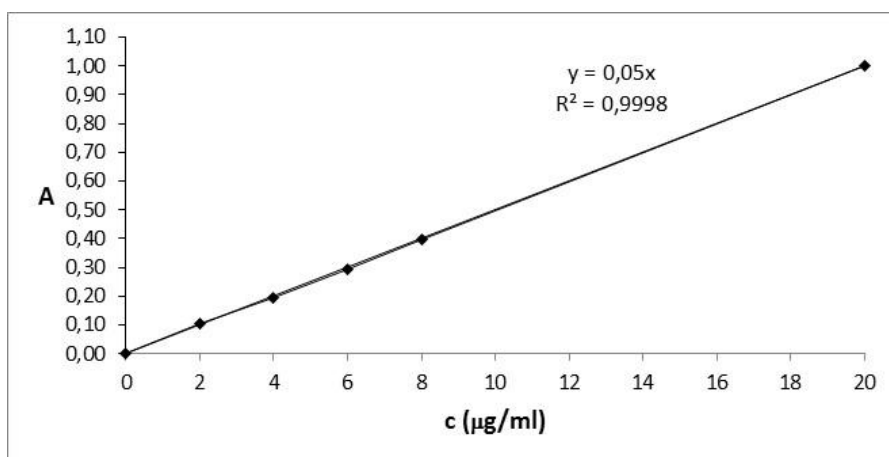
Nakon izrade, hidrogelovima je izmjeren pH korištenjem pH-metra s elektrodom za polučvrste pripravke. Gelovi pH vrijednosti 5,5 dobiveni su dodatkom odgovarajuće količine 50% w/w trietanolamina. Trietanolamin je dodavan mikropipetom u malim obrocima od po 50  $\mu$ l. Gel je dobro izmiješan, te mu je izmjeren pH. Postupak je ponavljan do postizanja ciljane pH vrijednosti. Neutraliziranim gelovima zrak je uklonjen centrifugiranjem (3 minute, 2000 okretaja/minuti).

### **3.2.5. Izrada kalibracijskog pravca**

Pripremljeno je pet otopina diltiazemkloridau fosfatnom puferu (pH 6,9) različitih koncentracija: 20, 40, 60, 80, 2000  $\mu$ g/ml. Svakoj otopini tri puta je mjerena vrijednost apsorbancije pri valnoj duljini od 237 nm te su za izradu kalibracijskog



pravca uzete srednje vrijednosti izmjerenih apsorbancija. Kalibracijski pravac (Slika 13) izrađen je iz ovisnosti dobivenih srednjih vrijednosti izmjerenih apsorbancija ( $y$ -os) o koncentraciji diltiazemklorida ( $x$ -os). Linearnost metode izražena je koeficijentom korelacije ( $R = 0,9999$ ). Iz dobivene jednadžbe kalibracijskog pravca ( $y = 0,05x$ ) izračunavate su nepoznate koncentracije diltiazemklorida u ispitivanjima *in vitro* oslobađanja lijeka.



Slika 13. Kalibracijski pravac (otopina diltiazemklorida u fosfatnom puferu, pH 6,9)

### 3.2.6. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja diltiazemklorida iz hidrosietilceluloznih i kitozanskih gelova

Oslobađanja diltiazemklorida iz hidrosietilceluloznih i kitozanskih hidrogelova provedeno je na Franz-difuzijskoj ćeliji. Na prethodno nakvašenu celuloza-nitratnu membranu, ravnomjerno je nanoseno 0,5 g gela. Kao receptorski medij korišten je fosfatni pufer pH 6,9 volumena 16 ml. Alikvoti receptorskog medija (0,5 ml) uzorkovani su tijekom u razmacima od 30 minuta tijekom 6 sati nakon

postavljanja eksperimenta. Nakon svakog uzorkovanja, receptorski medij je nadopunjen ekvivalentnom količinom (0,5 ml) svježeg termostatiranog pufera. Cijeli sustav je bio termostatiran na 34°C, a tijekom eksperimenta receptorski medij je kontinuirano miješan magnetskim mješačem (100 okretaja/minuti).

### **3.2.7. Određivanje sadržaja diltiazemklorida oslobođenog iz hidrogelova**

Za detekciju i određivanje sadržaja diltiazemklorida oslobođenog iz izvornih i neutraliziranih hidroksietilceluloznih i kitozanskih gelova korištena je spektrofotometrijska metoda. Apsorbancija je mjerena na 237 nm.

Koncentracija diltiazemklorida u alikvotu od 0,5 ml uzorka izračunata je dijeljenjem izmjerene apsorbancije ( $y$  vrijednost) s koeficijentom smjera baždarnog pravca (0,05) i množenjem s faktorom 10, budući da je uzorkovani alikvot nadopunjen u odmjernoj tikvici od 10 ml s fosfatnim puferom. Količina diltiazemklorida u cijelom receptorskom mediju je dobivena umnoškom koncentracije u 0,5 ml uzorka i ukupnog volumena receptorskog medija (16 ml). Potom je izračunata kumulativna količina oslobođenog diltiazemklorida u receptorskom mediju ( $Q$ ). Kumulativni udio (%) oslobođenog diltiazemklorida dobiven je iz omjera kumulativne količine ( $Q$ ) diltiazemklorida u receptorskom mediju i početnog sadržaja diltiazemklorida u ispitivanom hidrogelu.

### **3.2.8. Reološka ispitivanja**

Reološka karakterizacija hidroksietilceluloznih i kitozanskih gelova (izvorni i neutralizirani) provedena je na Anton Paar modularnom reometru Physica MCR 301. Pritom je korišteno mjerno tijelo PP25 i temperaturna ploča P-PTD200.

#### **3.2.8.1. Određivanje profila viskoznosti**

Profili viskoznosti (eng. *flowcurve*) za sve uzorke hidrogelova izmjereni su u rasponu brzina smicanja  $0,01 - 1000 \text{ s}^{-1}$ , na 15 mjernih točaka uz logaritamski postavljeno trajanje u svakoj točki (100 - 1s), te mjerno tijelo PP25 ( $d = 1 \text{ mm}$ ). Svi su uzorci mjereni na temperaturi od  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2.8.2. Test promjene amplitude**

Za određivanje linearnog viskoelastičnog područja (LVE) korišten je test promjene amplitude (eng. *amplitude sweep*). Tijekom mjerenja praćeni su viskoelastični modul pohrane  $G'$  i modul gubitka  $G''$  za sve uzorke hidrogelova. Budući da je LVE područje ovisno o frekvenciji, mjerenje je provedeno na konstantnoj frekvenciji od  $1 \text{ s}^{-1}$ . Raspon amplitude postavljen je na 0,1% - 1000%. Mjerenja su provedena na temperaturama  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2.8.3. Test promjene frekvencije**

Za test promjene frekvencije (eng. *frequency sweep*) naprezanje je postavljeno na konstantnu vrijednost od 1%, koja je puno niža od kritične vrijednosti za sve gelove

(50% za hidroksietilcelulozne i 10% za kitozanske gelove). Raspon frekvencija postavljen je na  $0,5 - 100 \text{ s}^{-1}$ .

#### **3.2.8.4. Ispitivanje oporavka strukture hidrogelova**

Ispitivanja su provedena u 4 intervala. Prvi interval podešen je na vrlo blage uvjete da bi se simuliralo stanje mirovanja uzorka. Za to je izabran oscilacijski test uz amplitudu 1% i frekvenciju  $1 \text{ s}^{-1}$ , na 10 točaka po 10 s. U drugom intervalu (nanošenje stresa uzorku koji odgovara razmazivanju) korišten je rotacijski test. Brzina smicanja postavljena je na  $1000 \text{ s}^{-1}$ , na 3 s (30 točaka po 1 s). Treći interval je interval mirovanja kada nema stresa na uzorak. Četvrti interval odgovara prvom intervalu i stanju mirovanja uzorka. Tijekom ovog testa se prati koliko je vremena uzorku potrebno da postigne početnu strukturu. Ispitivanja oporavka strukture gelova provedena su na temperaturama  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $34 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **3.2.8.5. Ispitivanje adhezivnosti**

Ispitivanje adhezivnosti je provedeno tzv. „*tack*“ testom na temperaturama  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $34 \text{ }^\circ\text{C}$ . U prvom intervalu se mjerno tijelo spusti do uzorka, u drugom ga se na 50 s pritisne silom od 10 N te se potom, u trećem intervalu, odvaja od uzorka brzinom  $5 \text{ mm/s}$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. pH vrijednost hidrogelova

Diltiazemklorid je uklopljen u dva različita hidrogela; kitozanski i komercijalno dostupni gel hidroksietilceluloze. Gelovima je određen pH prije i nakon dodatka 50% (w/w) trietanolamina. Rezultati mjerenja pH vrijednosti gelova prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. pH vrijednost hidrogelova

Hidrogelovi s diltiazemkloridom		pH
Hidroksietilcelulozni gel	Izvorni	4,48
	Neutralizirani	5,65
Kitozanski hidrogel	Izvorni	4,66
	Neutralizirani	5,45

### 4.2. Oslobađanja diltiazemklorida iz hidrogelova *in vitro*

Ispitivanja oslobađanja diltiazemklorida iz hidroksietilceluloznih i kitozanskih gelova (izvornih i neutraliziranih) *in vitro* su provedena korištenjem Franz difuzijske ćelije prema postupku opisanom u poglavljima 3.2.6. i 3.2.7.. Rezultati su prikazani Tablicama 2-5. Usporedba profila oslobađanja diltiazemklorida iz izvornih i neutraliziranih podloga prikazana je Slikama 14 i 15.

Kod svih ispitivanih hidrogelova uočeno je povećanje oslobođenog diltiazemklorida tijekom prvih 120 minuta, poslije čega slijedi razdoblje uspostavljanja dinamičke ravnoteže između donorskog i receptorskog odjeljka.

Neutralizacijom hidrogelova nije narušen profil oslobađanja djelatne tvari iz podloge, a postignuta je bolja prilagođenost pH pripravka mjestu apliciranja (Slika 14 i Slika 15).

**Tablica 2.** Oslobađanje diltiazemklorida iz izvornog hidroksietilceluloznog gela

t (min)	A	$\Delta$ ( $\mu\text{g}$ )	Q ( $\mu\text{g}$ )	%
30	0,1091	218,13	6980,27	51,55
60	0,1579	315,80	10323,73	76,23
90	0,1710	342,00	11259,80	83,15
120	0,1862	372,33	12256,67	90,51
150	0,1977	395,47	13027,27	96,20
180	0,1935	387,07	12781,60	94,38
240	0,1930	386,00	12739,07	94,07

*t (min)* - vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *A* - prosječna apsorbancija uzorka mjenog u triplikatu;  $\Delta(\mu\text{g})$  - količina diltiazemklorida u alikvotu uzorka (0,5 ml), *Q*( $\mu\text{g}$ ) - kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremena; % - kumulativni udio oslobođenog lijeka tijekom određenog vremena. Volumen receptorskog medija iznosio je 16 ml.

**Tablica 3.** Oslobađanje diltiazemklorida iz neutraliziranog hidroksietilceluloznog gela

t (min)	A	$\Delta$ ( $\mu\text{g}$ )	Q ( $\mu\text{g}$ )	%
30	0,5356	107,11	3427,63	51,20
60	0,7661	153,21	5009,94	74,83
90	0,8276	165,51	5449,64	81,40
120	0,8779	175,57	5783,86	86,39
150	0,9383	187,67	6180,91	92,32
180	0,9220	184,41	6088,68	90,94
210	0,9093	181,87	6004,14	89,68
240	0,9057	181,13	5978,13	89,29

*t (min)* - vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *A* - prosječna apsorbancija uzorka mjenog u triplikatu;  $\Delta(\mu\text{g})$  - količina diltiazemklorida u alikvotu uzorka (0,5 ml), *Q*( $\mu\text{g}$ ) - kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremena; % - kumulativni udio oslobođenog lijeka tijekom određenog vremena. Volumen receptorskog medija iznosio je 16 ml.

**Tablica 4.** Oslobađanje diltiazemklorida iz izvornog kitozanskog hidrogela

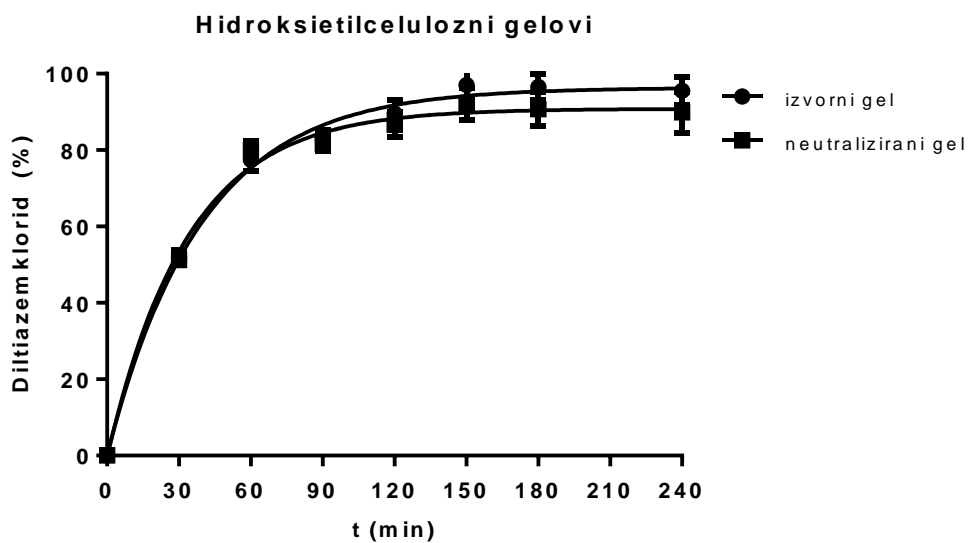
t (min)	A	$\Delta$ ( $\mu\text{g}$ )	Q ( $\mu\text{g}$ )	%
30	0,5702	1140,40	36492,80	36,92
60	1,0206	2041,13	66456,67	67,23
90	1,0558	2111,60	69612,33	70,43
120	1,0639	2127,88	70203,76	71,03
150	1,0567	2113,40	69756,68	70,57
180	1,0551	2110,20	69639,80	70,45
210	1,0385	2076,93	68572,07	69,37
240	1,0224	2004,87	66232,67	68,02

*t (min)* - vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *A* - prosječna apsorbancija uzorka mjenog u triplikatu;  $\Delta(\mu\text{g})$  - količina diltiazemklorida u alikvotu uzorka (0,5 ml), *Q*( $\mu\text{g}$ ) - kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremena; % - kumulativni udio oslobođenog lijeka tijekom određenog vremena. Volumen receptorskog medija iznosio je 16 ml.

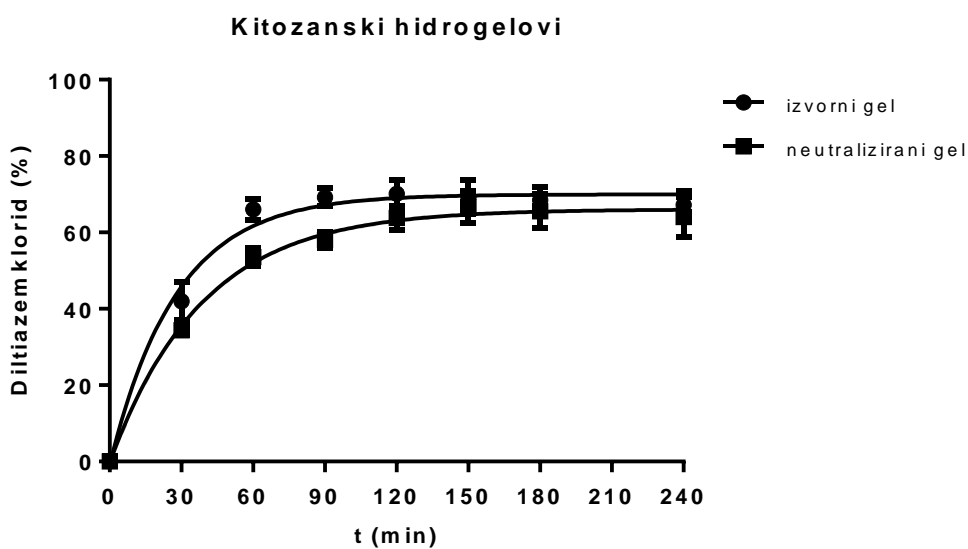
**Tablica 5.** Oslobađanje diltiazemklorida iz neutraliziranog kitozanskog hidrogela

	t (min)	A	$\Delta$ ( $\mu\text{g}$ )	Q ( $\mu\text{g}$ )	%
	30	0,5000	100,00	3200,00	34,39
	60	0,7527	150,55	4917,49	52,85
	90	0,8277	165,55	5448,04	58,56
	120	0,9044	180,88	5953,71	63,99
	150	0,9406	188,11	6200,51	66,64
	180	0,9297	185,94	6138,19	65,97
	210	0,9235	184,70	6096,34	65,52
	240	0,9157	183,13	6044,97	64,97

*t (min)* - vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *A* - prosječna apsorbancija uzorka mjenog u triplikatu;  $\Delta(\mu\text{g})$  - količina diltiazemklorida u alikvotu uzorka (0,5 ml), *Q*( $\mu\text{g}$ ) - kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremena; % - kumulativni udio oslobođenog lijeka tijekom određenog vremena. Volumen receptorskog medija iznosio je 16 ml.



Slika 14. Usporedba profila oslobađanja diltiazemklorida iz izvornog i neutraliziranog hidroksietilceluloznog gela



Slika 15. Usporedba profila oslobađanja diltiazemklorida iz izvornog i neutraliziranog kitozanskog hidrogela

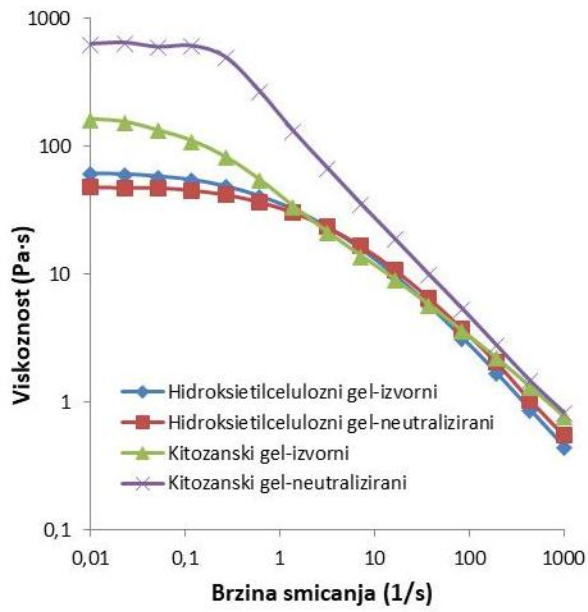


### 4.3. Profili viskoznosti

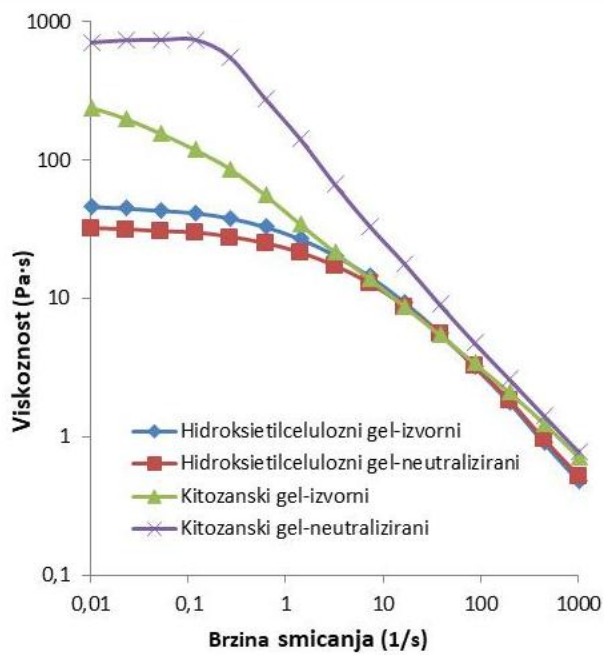
Hidroksietilcelulozni i kitozanski hidrogelovi (izvorni i neutralizirani) pokazali su očekivano ne-Newtonsko ponašanje. Viskoznost gelova je ovisna o brzini smicanja te se povećanjem brzine viskoznost značajno smanjuje (Slike 14 i 15). Takvo je „*shear-thinning*“ ponašanje očekivano kod polimernih gelova, te je posljedica narušavanja trodimenzionalne strukturne mreže koja se događa prilikom povećanja momenta sile na uzorak povećanjem brzine smicanja.

Ispitivanja viskoznosti hidrogelova provedena su na temperaturama 25 °C i 34 °C koje odgovaraju temperaturama uskladištenja pripravka i temperaturi površine sluznice na koju se pripravak nanosi. Sumarni rezultati profila viskoznosti prikazani su Slikama 16 (25 °C) i 17 (34 °C).

Neovisno o temperaturi na kojoj su provedena ispitivanja, kod hidroksietilceluloznog gela neutralizacijom dolazi do blagog pada viskoznosti, dok je kod kitozanskog gela obrnuto; viskoznost neutraliziranog gela je značajno veća (Slike 16 i 17).



Slika 16. Profili viskoznosti hidrogelova na 25 °C



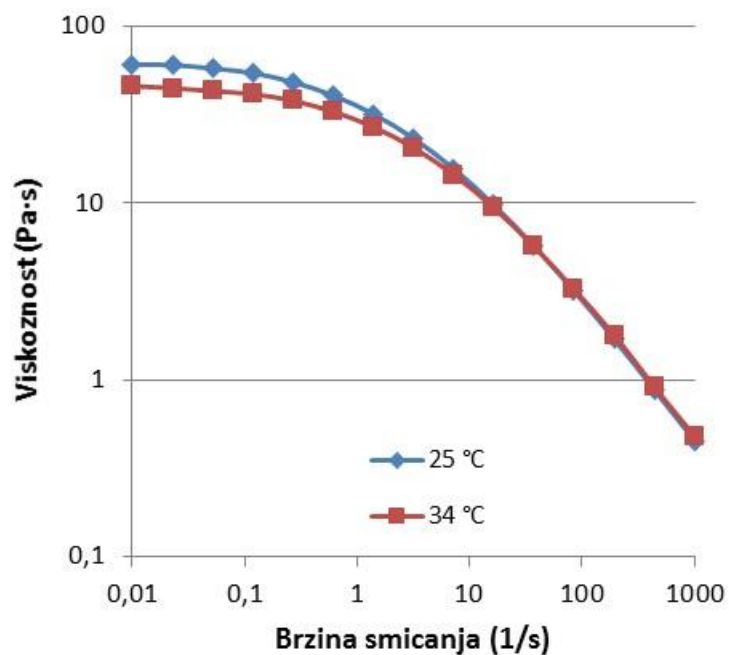
Slika 17. Profili viskoznosti hidrogelova na 34 °C

Kitozanski gelovi su, neovisno o temperaturi, bili veće viskoznosti od hidroksietilceluloznih gelova (Slike 14 i 15). To je posebice izraženo u prvom dijelu krivulja koje su indikativne za stanje mirovanja gela. U zadnjem dijelu krivulja (brzine smicanja 10-1000 s<sup>-1</sup>), koje su indikativne za stanje istiskivanja iz tube ili razmazivanja, svi gelovi imaju vrlo slične, niske, vrijednosti viskoznosti.

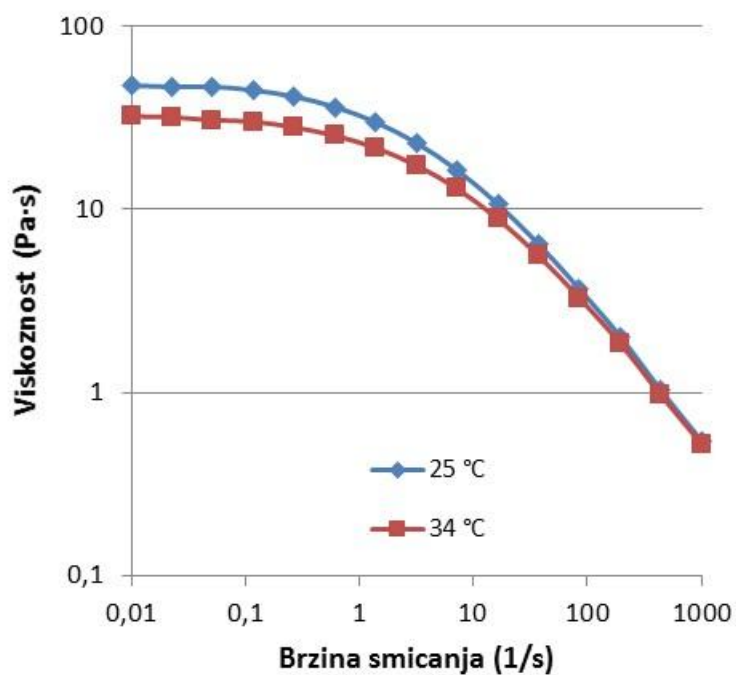
Vrijednosti viskoznosti na početnoj i završnoj brzini smicanja navedene su u Tablici 6, dok su profili viskoznosti svakog od ispitivanih hidrogela u odnosu na temperaturu mjerenja prikazani Slikama 18-21.

**Tablica 6.** Viskoznost hidrogelova na početnoj i konačnoj brzini smicanja

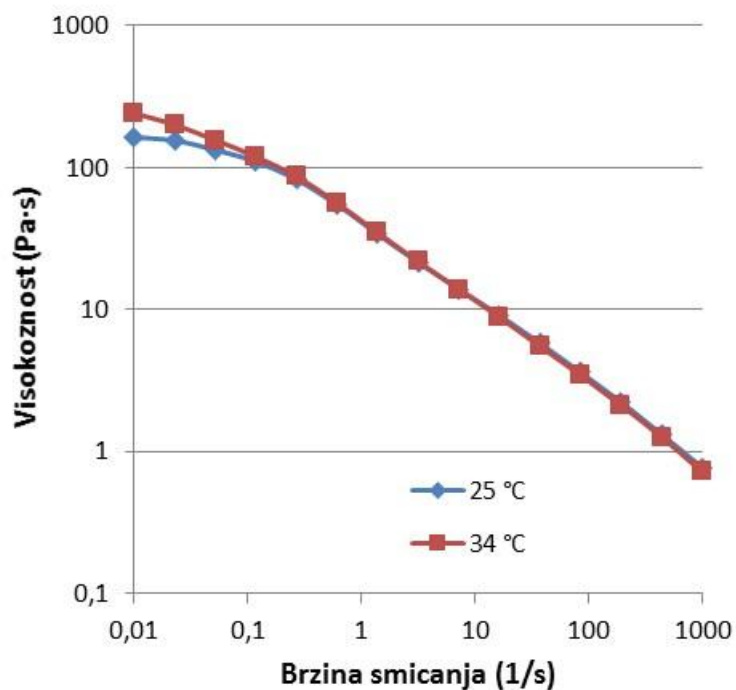
Uzorak gela	25 °C		34 °C	
	$\eta_{\text{initial}}$ (Pa·s)	$\eta_{\text{final}}$ (Pa·s)	$\eta_{\text{initial}}$ (Pa·s)	$\eta_{\text{final}}$ (Pa·s)
HEC (izvorni)	60,8	0,5	46,1	0,5
HEC (neutralizirani)	47,6	0,5	32,3	0,5
Kitozan (izvorni)	163	0,7	241	0,7
Kitozan (neutralizirani)	628	0,8	709	0,8



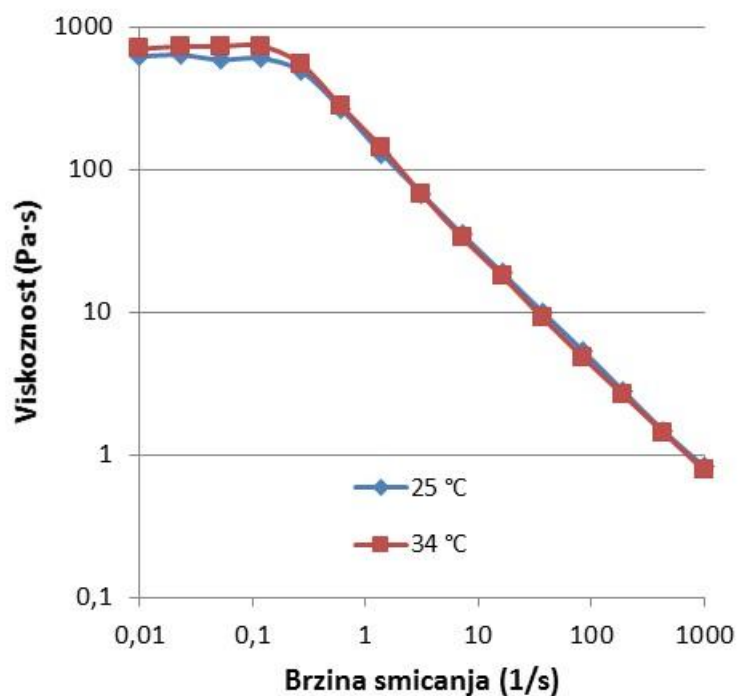
Slika 18. Viskoznost izvornog hidroksietilceluloznog gela na 25 i 34°C



Slika 19. Viskoznost neutraliziranog hidroksietilceluloznog gela na 25 i 34°C



Slika 20. Viskoznost izvornog kitozanskog gela na temperaturama 25 i 34°C



Slika 21. Viskoznost neutraliziranog kitozanskog gela na 25 i 34°C

U prvom dijelu krivulja, na nižim brzinama smicanja, povećanjem temperature s 25 °C na 34 °C kod hidroksietilceluloznih gelova dolazi do pada viskoznosti (Slike 18 i 19). Na većim brzinama smicanja, budući da je trodimenzionalna struktura već narušena, nema razlike u viskoznosti. Za razliku od hidroksietilceluloznih gelova, viskoznost kitozanskih hidrogelova je bila manje temperaturno ovisna, te čak pokazuje blagi porast viskoznosti s porastom temperature na nižim brzinama smicanja (Slike 20 i 21).

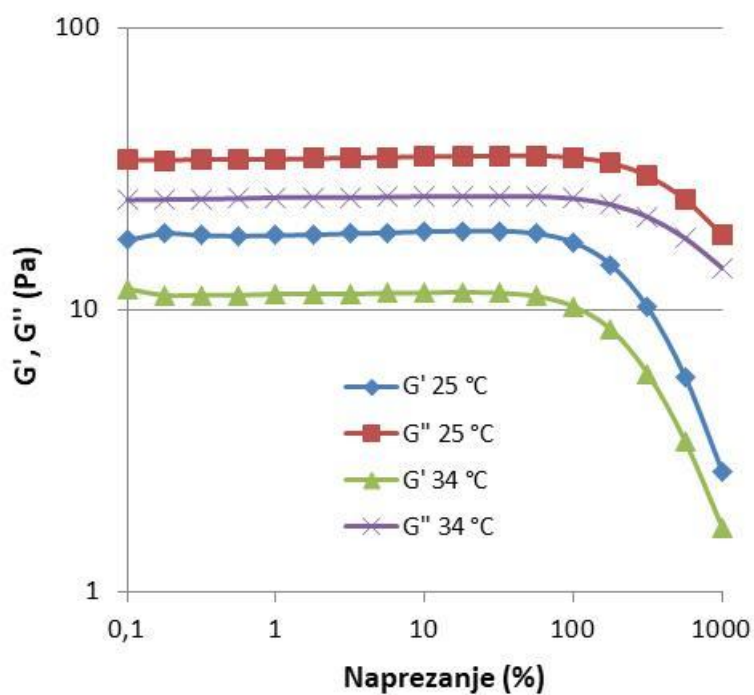
#### 4.4. Test promjene amplitude

Za određivanje linearnog viskoelastičnog područja (LVE) gelova korišten je test promjene amplitude (eng. *amplitude sweep*). Tijekom mjerenja praćeni su viskoelastični modul pohrane  $G'$  i modul gubitka  $G''$ . Rezultati ispitivanja su prikazani Slikama 22-25.

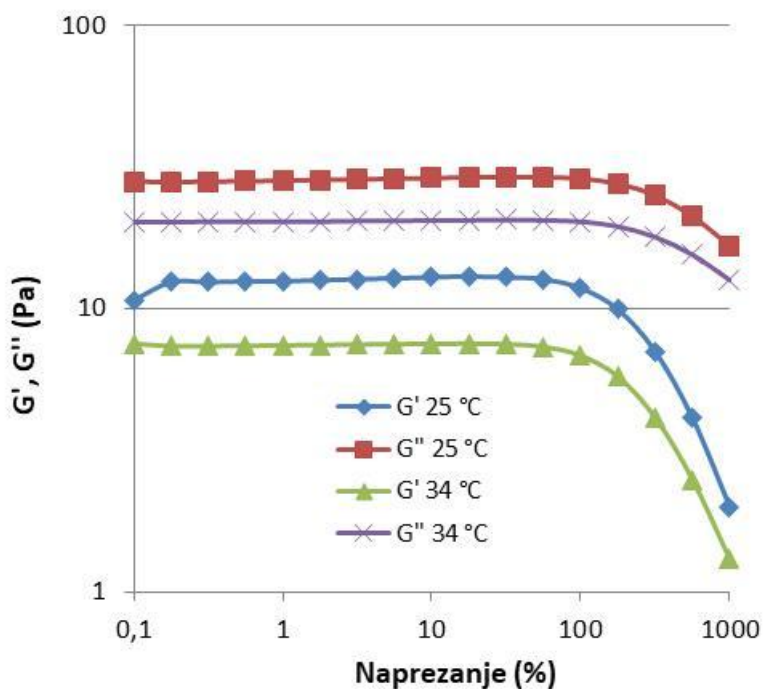
Kitozanski i hidroksietilcelulozni gelovi su se međusobno razlikovali po temperaturnoj ovisnosti i po profilima ovisnosti o naprezanju (Slike 22-25). Pri malim amplitudama kod svih su uzoraka gelova oba modula ( $G'$  i  $G''$ ) bila neovisna o naprezanju.

Hidroksietilcelulozni gelovi su, bez obzira na amplitudu, pokazali višu vrijednost modula gubitka  $G''$  nego modula pohrane  $G'$ , odnosno više izražena viskozna nego elastična svojstva, te se stoga ponašaju više kao tekućina. Neutralizirani hidroksietilcelulozni gel (Slika 23) je imao nešto niže vrijednosti oba modula od izvornog gela (Slika 22).

LVE je pri frekvenciji od  $1 \text{ s}^{-1}$  neovisan o naprezanju od 0,1% do 50% za hidroksietilcelulozne gelove. Pri naprezanju manjem od 50% struktura gela ostaje netaknuta. Modul gubitka  $G''$  je bio veći od modula pohrane  $G'$  što ukazuje na manje uređenu, manje „čvrstu“ strukturu gela. Povećanjem temperature s 25 na 34 °C se mjereni parametri pomiču prema nižim vrijednostima (Slike 22 i 23).



Slika 22. Test promjene amplitude izvornog hidroksietilceluloznog gela na 25 i 34 °C.  
G', modul pohrane, G'', modul gubitka



Slika 23. Test promjene amplitude neutraliziranog hidroksietilceluloznog gela na 25 i 34 °C.  
G', modul pohrane, G'', modul gubitka

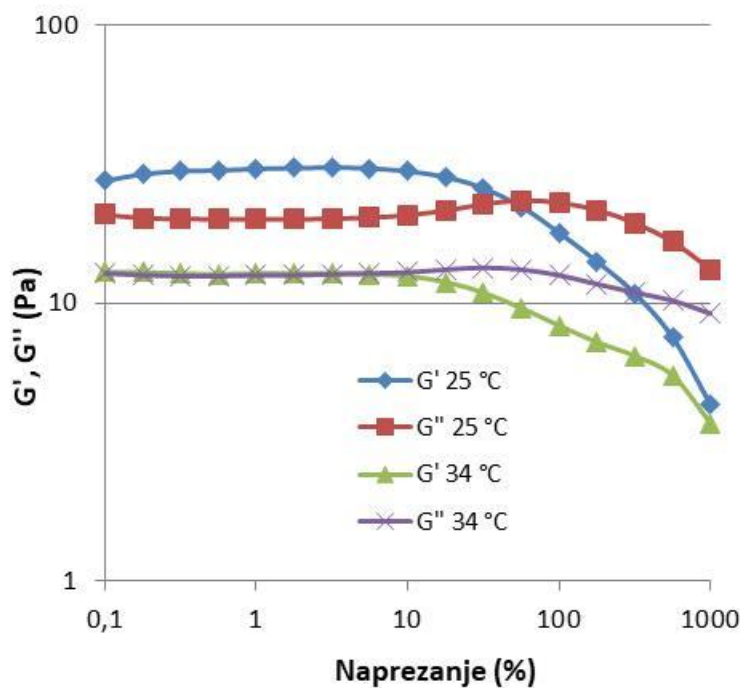


Izvorni i neutralizirani kitozanski hidrogelovi su se međusobno više razlikovali, te je bio izraženiji utjecaj temperature na cijeli profil, strukturu i ponašanje hidrogelova (Slike 22 i 23). Na 25 °C oba hidrogela su imali višu vrijednost modula pohrane  $G'$  nego modula gubitka  $G''$  pri naprezanju od 0,1% do 10%, u linearnom viskoelastičnom području.

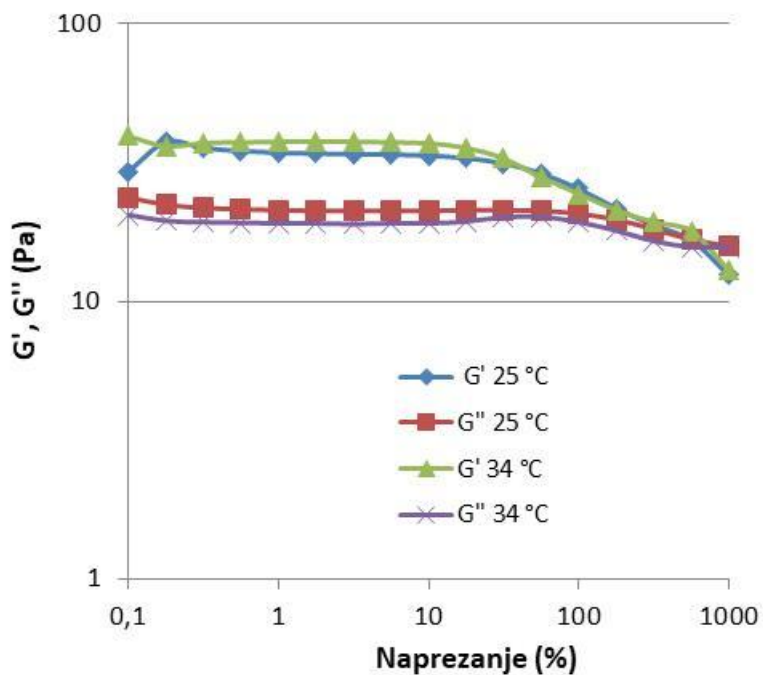
Struktura gela je čvrsta te ostaje netaknuta kod naprezanja manjeg od 10%. Povećanjem sile naprezanja iznad 10%, unutrašnja struktura gela se narušava, te se gel počinje sve više ponašati kao tekućina; modul gubitka  $G''$  postaje veći od modula pohrane  $G'$ . Takvo je ponašanje izraženije kod neutraliziranog gela zbog njegove čvršće strukture u odnosu na izvorni gel, a povećanjem temperature navedene razlike se dodatno naglašavaju.

Kod izvornog kitozanskog gela vrijednosti modula pohrane  $G'$  i modula gubitka  $G''$  se snižavaju povećanjem temperature, te imaju gotovo iste vrijednosti do 10% naprezanja (Slika 22). Povećanjem temperature dolazi do omekšavanja izvorne strukture kitozanskog gela i potrebna je manja sila za njeno narušavanje, odnosno za postizanje točke tečenja.

Neutralizirani kitozanski hidrogel (Slika 23) pri 34 °C ima čvršću strukturu nego pri 25 °C (veća vrijednost modula pohrane i manja vrijednost modula gubitka). Kod jačih naprezanja dolazi do križanja modula i narušavanja čvrste strukture gela.



Slika 24. Test promjene amplitude izvornog kitozanskog gela na 25 i 34 °C.  
G', modul pohrane, G'', modul gubitka

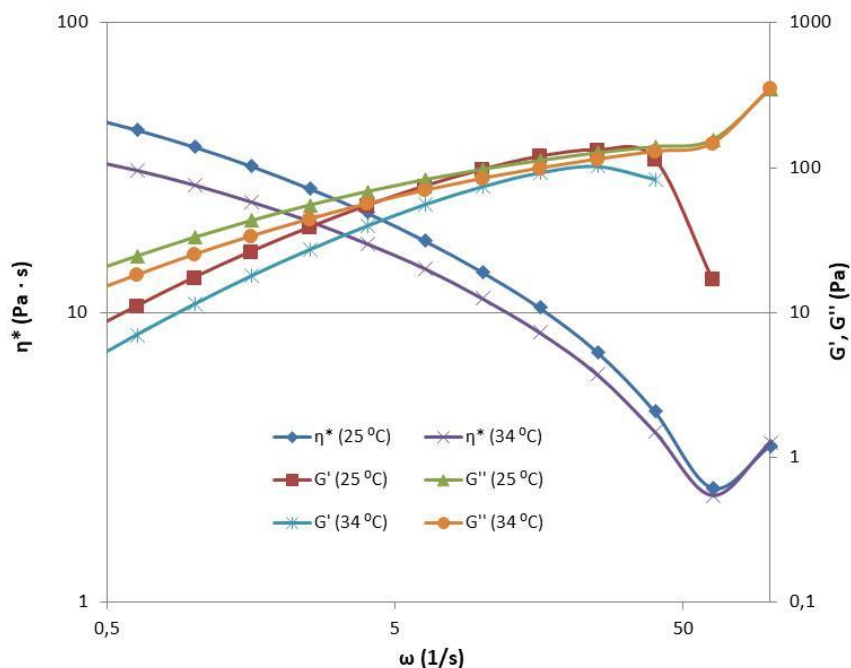


Slika 25. Test promjene amplitude neutraliziranog kitozanskog gela na 25 i 34 °C.  
G', modul pohrane, G'', modul gubitka

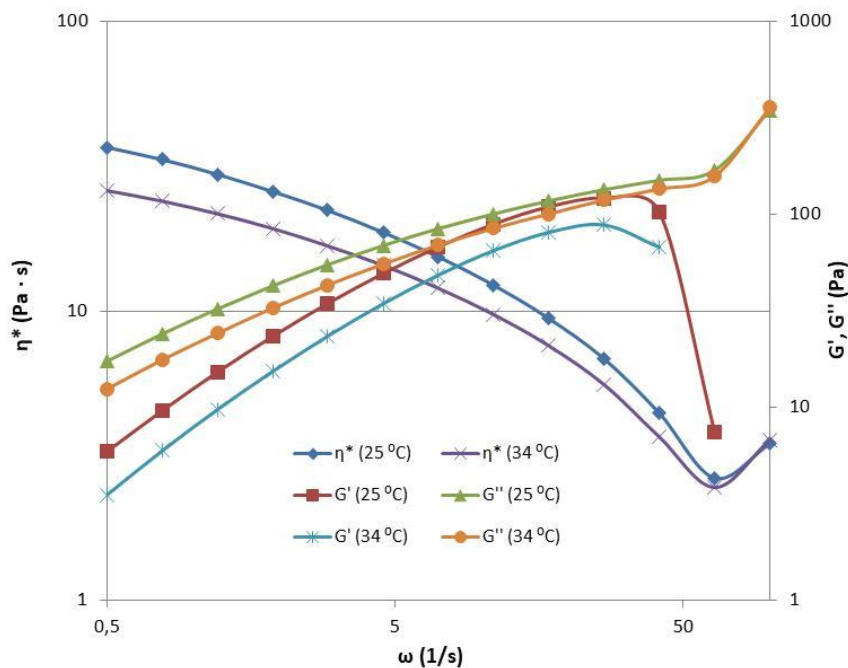
#### 4.5. Test promjene frekvencije

Testom promjene frekvencije (eng. *frequency sweep*) se željela ispitati unutarnja struktura gela pri različitim frekvencijama uz konstantnu amplitudu, tj. ovisnost viskoelastičnih modula pohrane  $G'$  i modula gubitka  $G''$  o frekvenciji. Rezultati su prikazani Slikama 26-29.

Ispitivanja promjene frekvencije provedena na hidroksietilceluloznim gelovima su pokazala višu vrijednost modula gubitka  $G''$  od modula pohrane  $G'$  pri niskim frekvencijama. Porastom frekvencije rastu vrijednosti oba modula, pri čemu je izraženiji porast modula pohrane  $G'$  (Slike 26 i 27). Temperaturna ovisnost je bila vrlo malo izražena, blagim pomakom prema nižim vrijednostima.



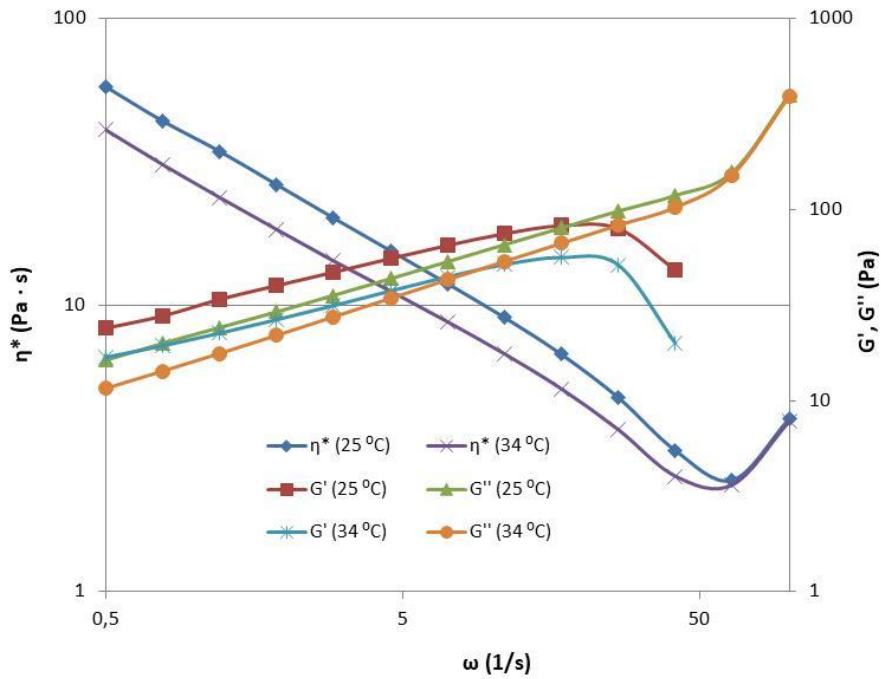
Slika 26. Test promjene frekvencije izvornog hidroksietilceluloznog gela na 25 i 34 °C.  $G'$ , modul pohrane,  $G''$ , modul gubitka,  $\eta^*$ , kompleksna viskoznost.



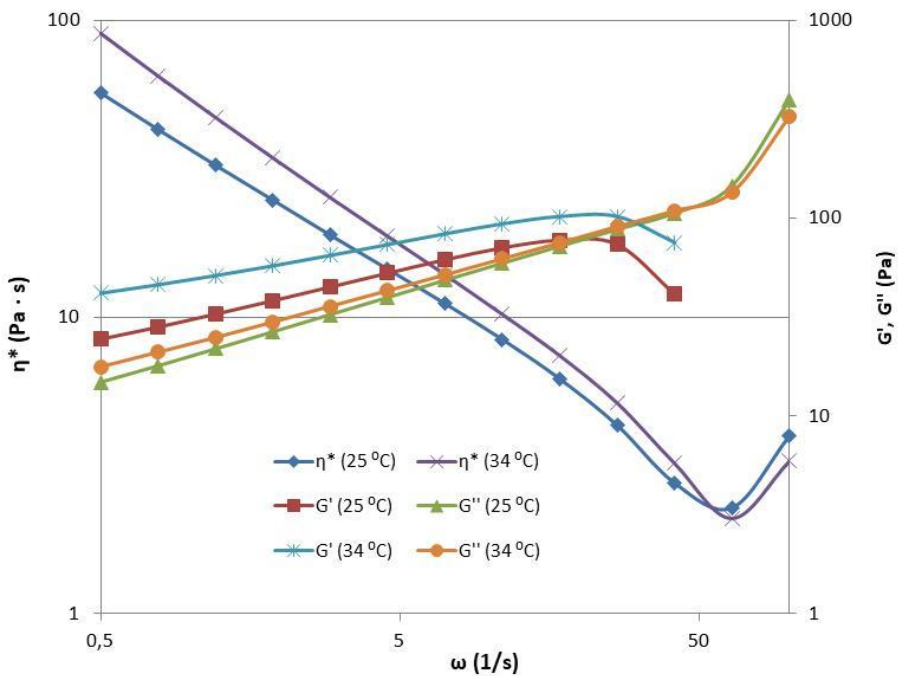
**Slika 27.** Test promjene frekvencije neutraliziranog hidroksietilceluloznog gela na 25 i 34 °C. G', modul pohrane, G'', modul gubitka,  $\eta^*$ , kompleksna viskoznost.

Za razliku od hidroksietilceluloznih gelova, kitozanski gelovi su pri niskim frekvencijama imali višu vrijednost modula pohrane G' u odnosu na modul gubitka G''. Porastom frekvencije rastu vrijednosti oba modula, izraženije modula gubitka G'', te kod visokih frekvencija (više od 10 s<sup>-1</sup>) dolazi do kidanja unutarnje strukture što se vidi iz križanja krivulja modula, nakon čega prevladava modul gubitka.

Temperaturna ovisnost nije bila izražena, no postoji ukupni pomak prema nižim vrijednostima (Slike 28 i 29).



Slika 28. Test promjene frekvencije izvornog kitozanskog gela na 25 i 34 °C.  
 $G'$ , modul pohrane,  $G''$ , modul gubitka,  $\eta^*$ , kompleksna viskoznost.

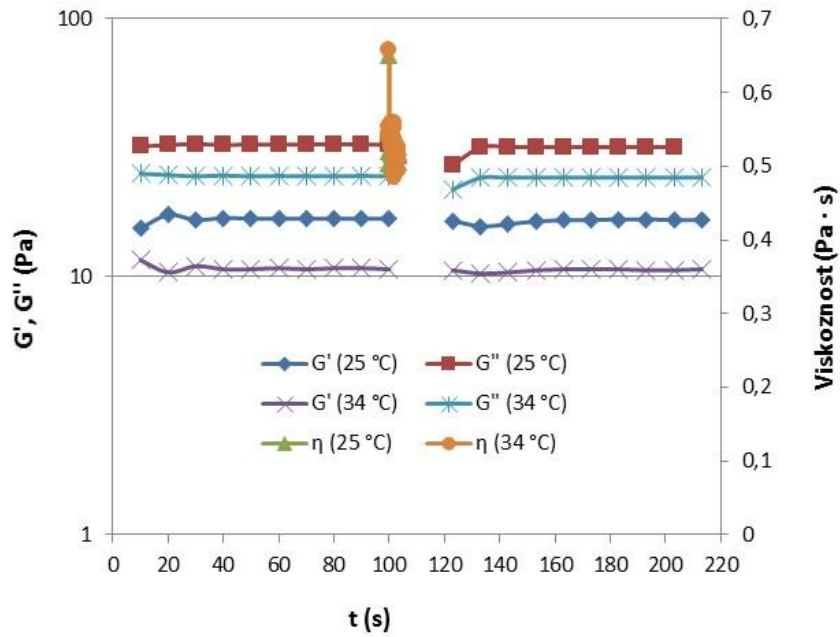


Slika 29. Test promjene frekvencije neutraliziranog kitozanskog gela na 25 i 34 °C.  
 $G'$ , modul pohrane,  $G''$ , modul gubitka,  $\eta^*$ , kompleksna viskoznost.

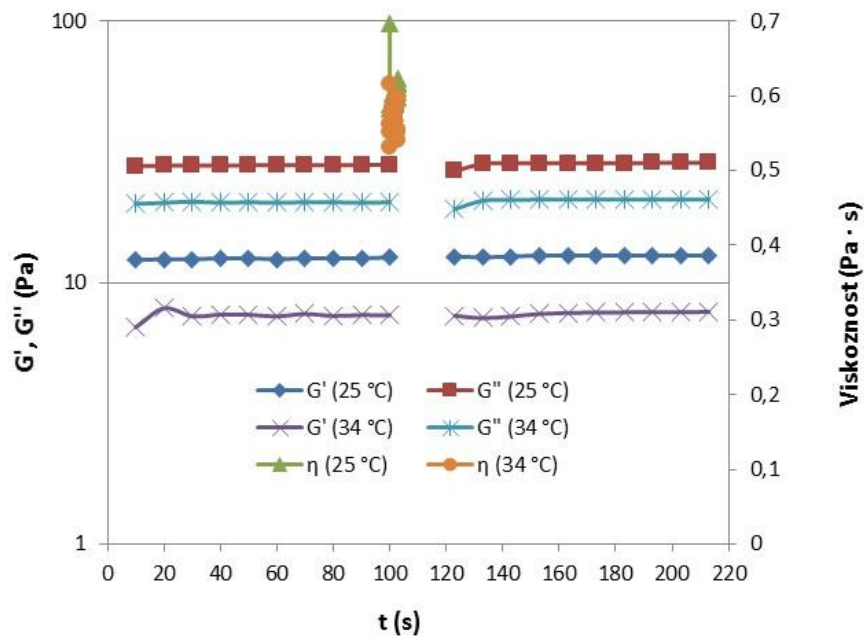
#### 4.6. Ispitivanje oporavka strukture

Kako bi se ispitala postojanost strukture hidrogelova, napravljen je test sastavljen od 4 intervala. Prvi interval je podešen na vrlo blage uvjete da bi se simuliralo stanje mirovanja uzorka. Za to je izabran oscilacijski test uz amplitudu 1% i frekvenciju  $1 \text{ s}^{-1}$ , na 10 točaka po 10 s. Cilj drugog intervala je bio nanijeti uzorku stres na strukturu kakav bi bio primjerice prilikom razmazivanja pripravka. Takvi se uvjeti najbolje simuliraju rotacijskim testom. Brzina smicanja je postavljena na  $1000 \text{ s}^{-1}$ , na 3 s (30 točaka po 1 s). Treći interval predstavlja interval mirovanja kada nema stresa na uzorak. Četvrti interval odgovara prvom intervalu i stanju mirovanja uzorka. Tijekom njega se prati koliko je vremena potrebno uzorku da postigne/uspostavi početnu strukturu. Oporavak strukture hidrogelova praćen je na temperaturama 25 i 34 °C, a rezultati su prikazani Slikama 30-33.

Hidroksietilcelulozni gelovi (izvorni i neutralizirani) u ispitivanjima oporavka struktura nakon stresa (primjerice prilikom istiskivanja iz tube ili razmazivanja na mjestu primjene) su pokazali gotovo trenutni oporavak (Slike 30 i 31).



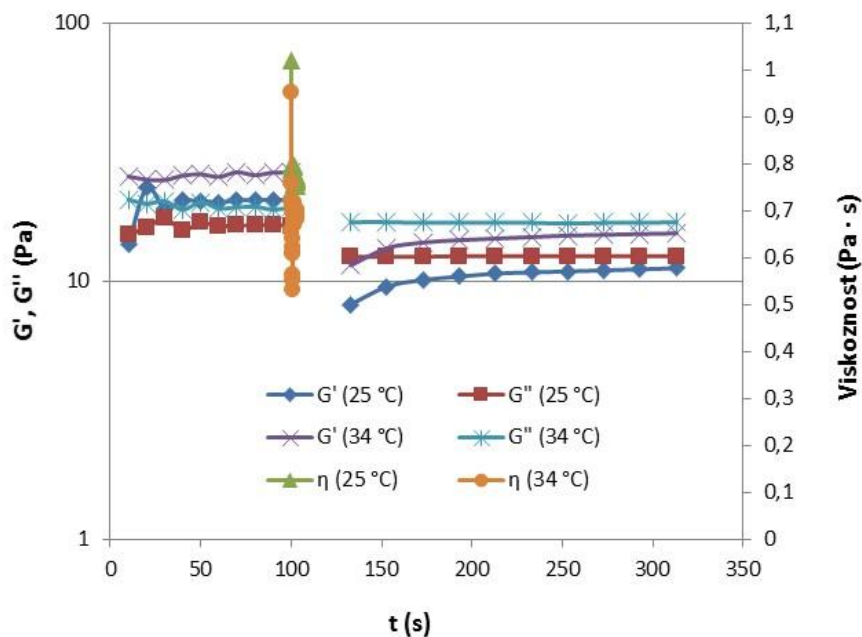
Slika 30. Oporavak strukture izvornog hidroksietilceluloznog gela na 25 i 34 °C. G', modul pohrane, G'', modul gubitka,  $\eta$ , viskoznost.



Slika 31. Oporavak strukture neutraliziranog hidroksietilceluloznog gela na 25 i 34 °C. G', modul pohrane, G'', modul gubitka,  $\eta$ , viskoznost.

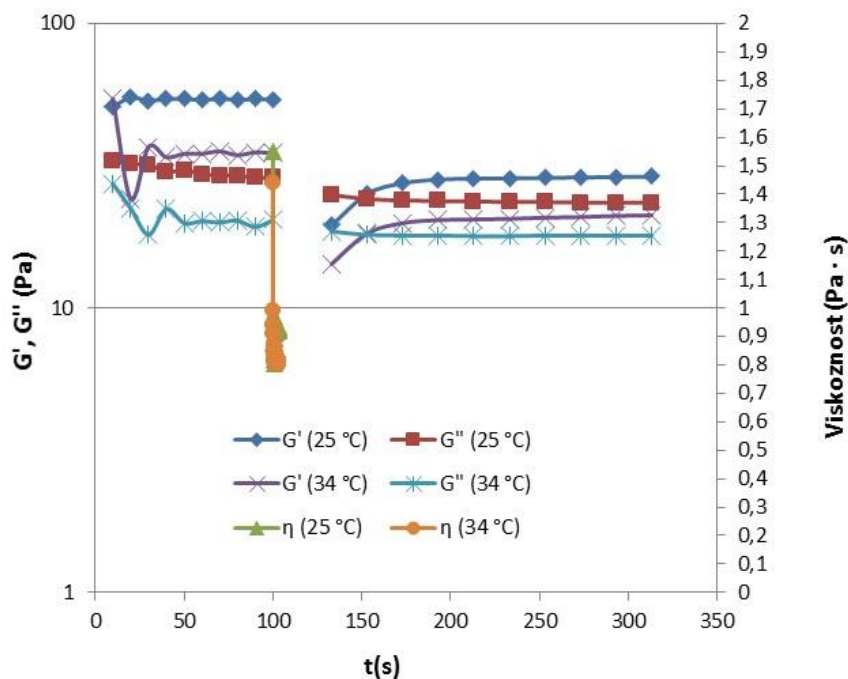
U usporedbi s hidroksietilceluloznim gelovima (Slike 30 i 31), kitozanskim se hidrogelovima u zadanom vremenu struktura ne oporavlja ili se djelomično

oporavlja (Slike 32 i 33). Izvorni kitozanski hidrogel je nakon stresa imao višu vrijednost modula gubitka  $G''$  od modula pohrane  $G'$ . Jače su bila izražena viskozna nego elastična svojstva, što znači da se ponaša više kao tekućina nego krutina. Njemu se struktura u potpunosti narušila tijekom stresa, te nema tendenciju povratka u početno stanje (Slika 32). Struktura neutraliziranog kitozanskog (Slika 33) gela se djelomično oporavlja uz povratak na više vrijednosti modula pohrane  $G'$  te se nakon primjenjenog stresa uspostavi dio originalne čvrste strukture.



**Slika 32.** Oporavak strukture izvornog kitozanskog gela na 25 i 34°C.  $G'$ , modul pohrane,  $G''$ , modul gubitka,  $\eta$ , viskoznost.

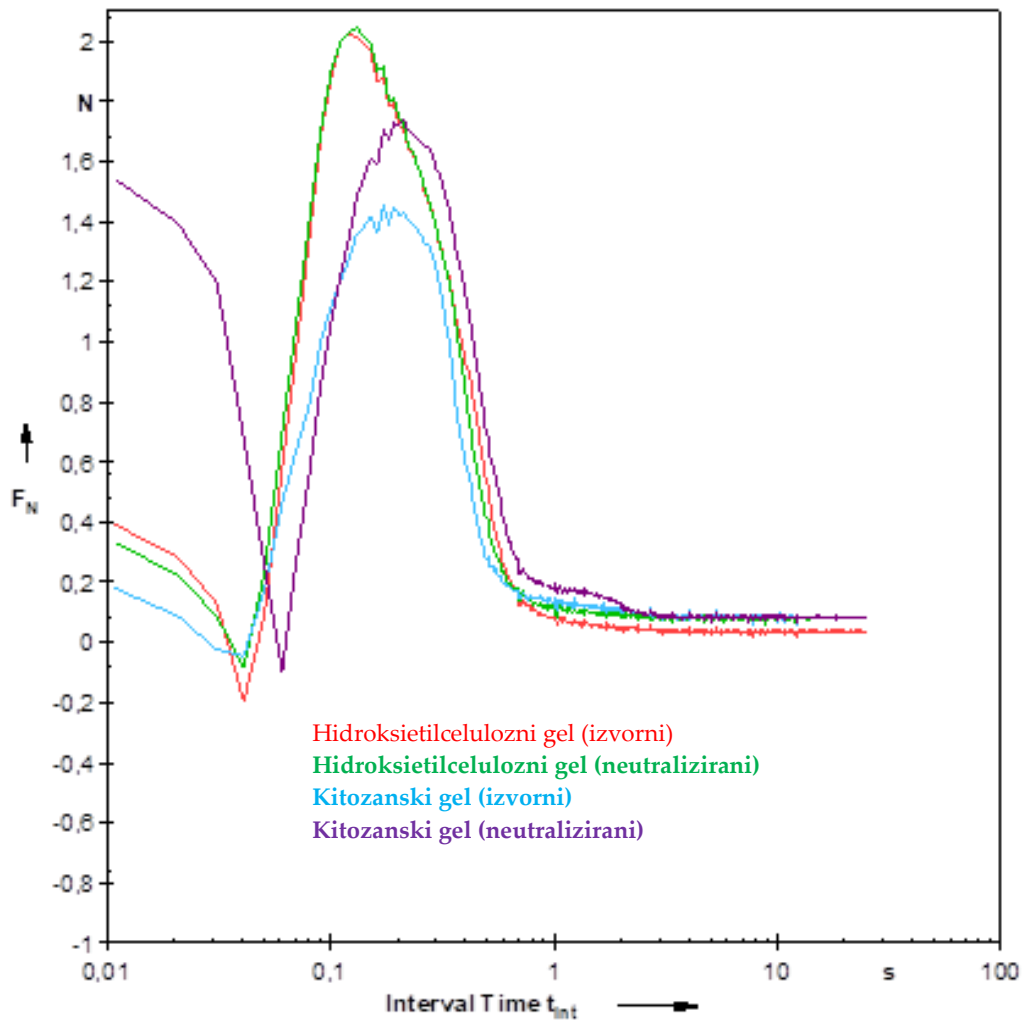




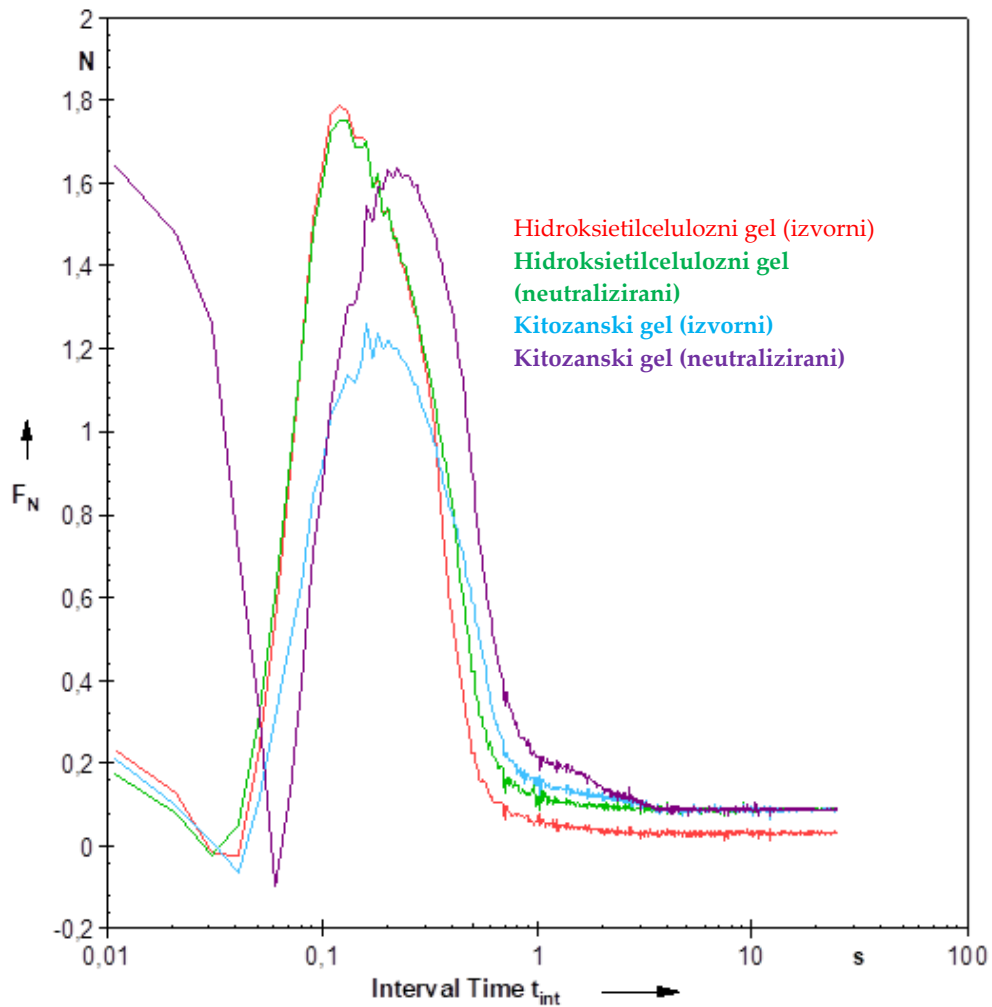
Slika 33. Oporavak strukture neutraliziranog kitozanskog gela na 25 i 34 °C. G', modul pohrane, G'', modul gubitka,  $\eta$ , viskoznost.

#### 4.7. Ispitivanje adhezivnosti

Adhezivnost svih uzoraka hidrogelova ispitana je tzv. *tack* testom na 25 i 34 °C na način opisan u poglavlju 3.2.8.5.. Rezultati mjerenja prikazani Slikama 34 i 35 pokazuju da svi gelovi imaju definiranu točku odvajanja mjernog tijela od uzorka (eng. *cleanbreak*), pri obje temperature.



Slika 34. Adhezivnost hidrogelova na 25 °C



Slika 35. Adhezivnost hidrogelova na 34 °C

Hidroksietilcelulozni gelovi su imali manju „gap“ vrijednost, odnosno manje se rastežu, ali su bili adhezivniji te je stoga bila potrebna veća sila za razdvajanje mjernog tijela od hidrogela (Tablica 7).

**Tablica 7.** Rezultati ispitivanja adhezivnosti

Hidrogel		25 °C			34 °C		
		t (s)	Sila max (N)	Gap (mm)	t (s)	Sila max (N)	Gap (mm)
Hidroksi- etilceluloza	izvorni	15,1	2,03	0,591	15,1	1,79	0,591
	neutralizirani	15,1	2,05	0,602	15,1	1,75	0,602
Kitozan	izvorni	15,2	1,45	0,671	15,2	1,25	0,639
	neutralizirani	15,2	1,73	0,706	15,2	1,64	0,743

Oba hidroksietilcelulozna gela, izvorni i neutralizirani, su pokazala ista svojstva koja se očituju u blagom smanjenju adhezivnosti povišenjem temperature.

Za razliku od hidroksietilceluloznih gelova, kitozanski gelovi su se međusobno razlikovali. Neutralizirani kitozanski hidrogel je bio adhezivniji od izvornog te je njegova adhezivnost bila manje ovisna o temperaturi.

## 5. RASPRAVA

Otkriće farmakoloških mogućnosti liječenja dovelo je do značajnog pomaka u učinkovitosti terapije analnih fisura te su time kirurški zahvati postali druga linija liječenja rezervirana samo za pacijente kod kojih nema pozitivnog učinka na liječenje topikalnim lijekovima ili kod kojih su česte egzacerbacije. Topikalni lijek koji se prvi počeo primjenjivati u terapiji analne fisure je 0,2% nitroglicerina u ljekovitom obliku masti. Međutim, prema novijim smjernicama u liječenju analne fisure ovaj topikalni pripravak nema snažne preporuke jer nije potvrđena značajno veća uspješnost zacjeljivanja fisure u odnosu na placebo skupinu ispitanika. Naime, zacjeljivanje je postignuto u otprilike 50% ispitanika nakon 6-8 tjedana terapije. Pritom je najčešća nuspojava, uslijed sistemske apsorpcije lijeka, bila izražena glavobolja koja je kod nekih pacijenata dovela do prekida liječenja (5). Upotreba lijekova iz skupine blokatora kalcijevih kanala rezultirala je većom učinkovitosti terapije i nešto boljom podnošljivosti lijeka od strane pacijenata (44). Naime, pokazalo se da primjena 2% diltiazemklorida u obliku hidrogela, dva puta dnevno tijekom 6-8 tjedana dovodi do zacjeljivanja fisura kod 65-95% oboljelih (46).

Upravo iz razloga što sve veći broj pacijenata kao inicijalnu terapiju prima topikalne lijekove, potrebno ih je formulirati u ljekoviti oblik dostatnog zadržavanja na mjestu primjene koji će omogućiti polagano oslobađanje lijeka kako bi se osigurao lokalni učinak lijeka, te smanjila neželjena sistemska apsorpcija. Budući da sam farmaceutski oblik, pored fizičko-kemijskih svojstava djelatne tvari, doprinosi

učinkovitosti terapije (112), posebna pozornost se posvećuje oblikovanju pripravka, tj. odabiru pomoćnih tvari (ekscipijensa) koji će utjecati na fizička svojstva pripravka, oslobađanje i apsorpciju lijeka. Pomoćne tvari moraju biti kompatibilne s djelatnom tvari i fiziološki prihvatljive, dok djelatna tvar treba biti u odgovarajućoj koncentraciji koja će osigurati lokalni učinak lijeka. Sam pripravak treba biti pakiran na način koji će pacijentu omogućiti što jednostavniju primjenu. Time se dodatno poboljšava suradljivost pacijenata, što je od velikog značaja kod polučvrstih pripravaka namijenjenih rektalnoj primjeni.

Brojni su zahtjevi koje bi idealna podloga namijenjena (peri)analnoj primjeni lijekova trebala ispunjavati. Prije svega mora imati minimalni iritativni potencijal jer pacijent nanosi pripravak na bolno područje gdje se često javlja pečenje prilikom nanošenja lijeka što dodatno smanjuje suradljivost. Također, podloga bi morala imati odgovarajuću viskoznost i adhezivnost čime bi se omogućila lagana primjena i zadržavanje pripravka na mjestu djelovanja, te kontinuirano, jednolično, oslobađanje lijeka uz prikladan režim doziranja. Konačno, djelatna tvar bi trebala biti stabilna u podlozi kroz dulji period (idealno pri sobnoj temperaturi).

Zanimljivo je istaknuti da neke polučvrste podloge poput kitozanskih hidrogelova mogu imati i potencijalni biološki učinak. Naime, istraživanja su pokazala da kitozan povoljno utječe na sve faze cijeljenja rana uključujući hemostazu, upalu, migraciju i proliferaciju u različitim tkivima: koži, sluznicama, jetri i rožnici (113). Potvrđeno je da potiče migraciju upalnih stanica koje zatim vrše sekreciju faktora rasta u ranim fazama cijeljenja te utječe na faktor rasta fibroblasta

stimulirajući njihovo stvaranje (114), pojačava djelovanje polimorfonuklearnih leukocita (115, 116) i makrofaga (117), čime se potiče granulacija i organizacija tkiva. Nekoliko je ispitivanja potvrdilo da kitozan velike molekulske mase i većeg stupnja deacetilacije značajno više potiče aktivnost kolagenaze i makrofaga. To se djelovanje pripisuje *N*-acetil-*D*-glukozaminu koji se oslobađa iz molekule kitozana djelovanjem lizozima, enzima prisutnog u polimorfonuklearnim leukocitima na mjestu upale (83). Osim navedenih učinaka, važno je istaknuti antimikrobno djelovanje kitozana prema različitim bakterijama i gljivicama (87, 88, 89). Premda se o mehanizmima antimikrobne aktivnosti kitozana dosta raspravlja u literaturi (90, 91, 92), najprihvatljiviji je onaj temeljen na ionskoj interakciji između pozitivno nabijenog kitozana i negativno nabijene membrane bakterijske stanice koji rezultira većom permeabilnošću membrane i gubitkom staničnog sadržaja (87). U pravilu, što je molekulska masa i stupanj deacetilacije kitozana niži, veća je njegova učinkovitost na redukciju rasta i replikaciju mikroorganizama (94).

Potencijalno antimikrobno djelovanje kitozana je od iznimne važnosti u analnom području budući da se kod 65% pacijenata s kroničnom analnom fisurom kao komplikacija javlja intrasfinkterični apces (118), u 39% slučajeva fistule, te antibiomi kod 19% pacijenata (119). Navedene komplikacije mogu uzrokovati produženje terapije i potrebu za uvođenjem antibiotika (120).

Trenutno se lokalna terapija analnih fisura na području Republike Hrvatske provodi magistralnim pripravkom diltiazemklorida uklopljenim u komercijalno dostupnu podlogu gela hidroksietilceluloze. S obzirom da podloga umnogome

doprinosi profilu oslobađanja lijeka te svojim reološkim svojstvima utječe na zadržavanje formulacije na mjestu primjene, na taj način posredno doprinosi i određuje učinkovitost topikalne terapije.

Pretraživanjem literature nisu pronađeni podaci o provedenoj karakterizaciji postojećeg magistralnog pripravka diltiazemklorida. Stoga se opravdanim ukazala potreba evaluacije reoloških svojstava i određivanja profila oslobađanja lijeka iz postojećeg magistralnog pripravka.

Uzimajući u obzir mnogobrojne potencijale korištenja kitozana kao pomoćne tvari u farmaceutskom obliku namijenjenom terapiji analnih fisura, istraživanja su također uključivala razvoj i karakterizaciju kitozanskog hidrogela s diltiazemkloridom, pripremljenog iz kitozana velike molekulske mase.

Provedena *in vitro* ispitivanja oslobađanja diltiazemklorida iz komercijalnog hidroksietilceluloznog gela čiji je pH iznosio 4,5 pokazala su brzo oslobađanje lijeka već unutar prvih 30 minuta (Slika 14). Nakon toga dolazi do usporavanja oslobađanja i uspostavljanja dinamičke ravnoteže između donorskog i receptorskog odjeljka Franz-difuzijske ćelije. Neutralizacija gela trietanolaminom, provedena zbog prilagođavanja pH hidrogela uvjetima sličnijim analnom području, nije imala utjecaja na profil oslobađanja lijeka. U prvih 60 minuta ispitivanja iz hidroksietilceluloznog gela je oslobođeno više od 75% diltiazemklorida, neovisno o pH hidrogela. Nakon 2,5 sata dolazi do uspostavljanja dinamičke ravnoteže (plato), pri čemu je iz hidrogela bilo oslobođeno više od 90% lijeka (Slika 14).



Ispitivanja provedena s kitozanskim hidrogelom (Slika 15) pokazala su manji udio oslobođenog lijeka u usporedbi s hidroksietilceluloznim gelom (t-test,  $p < 0,05$ ), premda je profil oslobađanja bio veoma sličan. To znači brzo oslobađanje lijeka unutar prvih 30 minuta te uspostavljanje platoa nakon 150 minuta, pri čemu je nakon 6 sati oslobođeno oko 60% diltiazemklorida.

pH pripravaka je imao utjecaja na oslobađanje lijeka iz oba tipa hidrogela, hidroksietilceluloznog (Slika 14) i kitozanskog (Slika 15). Nešto sporije oslobađanje postignuto je iz neutraliziranih gelova ( $pH \approx 5,5$ ) u usporedbi s izvornim gelovima ( $pH \approx 4,5$ ). Naime, nakon neutralizacije gela trietanolaminom dolazi do blagog povećanja viskoznosti hidrogela koje doprinosi sporijem oslobađanju lijeka iz podloge.

Brzo oslobađanje lijeka nakon nanošenja pripravka na oboljelo područje imalo bi povoljan učinak vezano uzbrzi početak djelovanja lijeka, nakon čega bi bilo poželjno da se lijek sporije oslobađa. U tom smislu, kitozanski gel bi bio prikladniji jer je oslobađanje diltiazemklorida sporije nego iz hidroksietilceluloznog hidrogela.

Dodatne prednosti koje bi se mogle postići korištenjem kitozanskog gela odnose se na mogućnost bržeg zacjeljivanja fisure, što bi dovelo do kraćeg trajanja terapije. Za očekivati je da bi kitozanski gel mogao imati antimikrobni učinak čime bi se smanjila vjerojatnost nastanka komplikacija poput sekundarnih infekcija što je karakteristično za analno područje gdje nastaju fisure. Budući da je fiziološka podnošljivost pripravka povezana s njegovom pH vrijednosti, neutralizirani kitozanski hidrogel bi imao većeg potencijala, no, s druge strane treba uzeti u obzir da je antimikrobni

učinak kitozana jače izražen u kiselom pH području. Stoga bi buduća istraživanja svakako trebala obuhvatiti ispitivanje antimikrobne aktivnosti kitozanskog gela ovisno o njegovoj pH vrijednosti.

Jedan od važnih zahtjeva u odabiru podloge za oblikovanje polučvrstog pripravka je njezina kompatibilnost s djelatnom tvari. Valja naglasiti da su oba tipa polimera korištena za izradu hidrogela, hidroksietilceluloza i kitozan, kompatibilni sa solima te su prikladni za uklapanje diltiazemklorida. Karbopolski gelovi, unatoč dobrim mukoadhezivnim svojstvima, ne bi bili prikladni za uklapanje diltiazemklorida zbog inkompatibilnosti sa solima i narušavanja izvorne strukture gela (123).

Kako bi se dobio uvid u mehanička svojstva postojećeg i potencijalnog novog magistralnog pripravka diltiazemklorida provedena su opsežna reološka ispitivanja svih hidrogelova koja su uključivala: određivanje profila viskoznosti, oscilacijske testove promjene amplitude i frekvencije, ispitivanje oporavka strukture te mjerenje adhezivnosti. Sva su ispitivanja provedena na temperaturi od 25 °C, koja bi odgovarala temperaturi uskladištenja pripravka te 34 °C, koja odgovara temperaturi na mjestu primjene (analna regija).

Rezultati provedenih reoloških ispitivanja ukazuju na značajne razlike u karakteristikama hidroksietilceluloznog i kitozanskog hidrogela. Svi ispitivani gelovi pokazuju očekivano ne-Newtonsko ponašanje te im je viskoznost ovisna o brzini smicanja (Slike 16 i 17). Povećanjem brzine smicanja, viskoznost se značajno

zmanjuje, što je posljedica narušavanja trodimenzionalne strukturne mreže polimera zbog povećanja momenta sile na uzorak. Kitozanski gelovi su bili veće viskoznosti od hidroksietilceluloznih gelova, bez obzira na temperaturu mjerenja. Porast viskoznosti neutraliziranih hidrogelova u skladu je s nešto sporijim oslobađanjem diltiazemklorida nego iz izvornih, blago kiselih, gelova (Slike 14, 15). Povećanjem temperature mjerenja s 25 na 34 °C kod hidroksietilceluloznih gelova dolazi do pada viskoznosti, dok je viskoznost kitozanskih gelova manje temperaturno ovisna te čak pokazuje blagi porast s porastom temperature (Slika 18, 19, 20, 21).

Hidrogelovi su se razlikovali po viskoelastičnim modulima pohrane  $G'$  i gubitka  $G''$ , te linearnom viskoelastičnom području. Hidroksietilcelulozni gelovi su bez obzira na amplitudu imali višu vrijednost modula gubitka  $G''$  nego modula pohrane  $G'$ , odnosno više izražena viskozna svojstva, nego elastična svojstva te širi raspon linearnog viskoelastičnog područja (Slike 22 i 23). S druge strane, kitozanski gelovi su u linearnom viskoelastičnom području pokazali višu vrijednost modula pohrane  $G'$  nego modula gubitka  $G''$  (Slike 24 i 25). Pri višim napreznjima (iznad 10%), unutarnja struktura gela se remeti pa modul gubitka  $G''$  postaje veći od modula pohrane  $G'$  što je izraženije kod neutraliziranog gela koji ima čvršću strukturu (Slika 25). Povećanjem temperature mjerenja s 25 na 34 °C naglašavaju se razlike između izvornog (Slika 24) i neutraliziranog (Slika 25) hidrogela. Naime, neutralizirani kitozanski hidrogel pokazuje čvršću strukturu pri višoj temperaturi.

Postojanost strukture hidrogelova, primjerice nakon istiskivanja iz spremnika (tube) ili tijekom razmazivanja na mjestu primjene, određena je ispitivanjem oporavka strukture korištenjem rotacijskog testa. Dok se struktura hidroksietilceluloznih gelova oporavlja gotovo trenutno, neovisno da li se radi o izvornom ili neutraliziranom gelu (Slike 30 i 31), kod kitozanskih hidrogelova je dokazano suprotno (Slike 32 i 33). Izvornom kitozanskom gelu se u zadanom vremenu struktura ne oporavlja (Slika 32), dok se struktura neutraliziranog kitozanskog gela (Slika 33) djelomično vrati na početnu strukturu.

Zadržavanje pripravka na mjestu primjene nakon aplikacije je od velike važnosti i posredno doprinosi učinkovitosti terapije. Provedeni reološki test koji simulira adhezivnost pokazuje da je hidroksietilcelulozni gel adhezivniji od kitozanskog gela budući da je potrebno primijeniti manju silu za razdvajanje mjernog tijela od gela (Tablica 7). Povišenjem temperature oba hidroksietilcelulozna gela pokazuju trend blagog smanjenja adhezivnosti (Slika 34), dok su se kitozanski hidrogelovi međusobno razlikovali. Pritom je neutralizirani kitozanski hidrogel pokazao veću adhezivnost od izvornog hidrogela i manju ovisnost o temperaturi mjerenja (Slike 34 i 35). Premda je, prema literaturnim podacima (121) bilo za očekivati obrnuto, tj. da je kitozanski hidrogel adhezivniji od hidroksietilceluloznog gela, treba imati u vidu da su provedeni testovi uzimali u obzir silu potrebnu za razdvajanje gela od mjernog tijela, a ne od sluznice, odnosno da je riječ o testovima

adhezivnosti, a ne mukoadhezivnosti. Zato bi u budućim istraživanjima bilo zanimljivo provesti određivanja mukoadhezivnosti oba hidrogela.

Mukoadhezivnost kitozana se zasniva na interakcijama protoniranih amino skupina D-glukozamina s negativno nabijenom sijalinskom kiselinom i sulfatnim skupinama prisutnima u mucinu (123). Što je veći stupanj deacetilacije, jači je pozitivni naboj kitozana i izraženija je mukoadhezivnost (124). Stoga se može pretpostaviti da bi kitozanski gelovi, pored povoljnih bioloških učinaka, omogućili dobro prianjanje i dulje zadržavanje formulacije s lijekom na ciljanom mjestu djelovanja – (peri)analnoj regiji.

Topikalni pripravak diltiazemklorida bi, osim ranije navedenih zahtjeva, trebao biti stabilan u podlozi, minimalno tijekom perioda primjene pripravka. Trenutno nema dostupnih podataka o stabilnosti diltiazemklorida u obliku gela, no poznato je da je u obliku injekcija stabilan tijekom mjesec dana pohrane na sobnoj temperaturi (125). Pretpostavlja se da bi u istim uvjetima diltiazemklorid bio stabilan i u obliku hidrogela, koliko je preporučeni režim lokalne terapije analnih fisura. Budući da su ispitivanja stabilnosti od velikog značaja za kliničku primjenu pripravka, potrebno ih je predvidjeti u budućim istraživanjima.

Terapijski učinkovit, stabilan i siguran topikalni oblik diltiazemklorida od izuzetne je važnosti, pogotovo ako se primjenjuje u djece. Naime, analna fisura se može javiti i u dječjoj dobi, s time da je nešto veća pojavnost zabilježena do treće godine života (126, 127) nego kod starije djece. Kirurški pristup u liječenju se u praksi

rijetko primjenjuje, te su donedavno jedine terapijske opcije bile davanje laksativa i lubrikanata (128, 129). U novije se vrijeme ispituje učinkovitost terapije koja se primjenjuje kod odraslih pacijenata, tj. korištenje 2% diltiazemklorida. On, naime, ima najkraće prosječno vrijeme potrebno za zacjeljivanje fisure (5,4 tjedana), u usporedbi s gliceriltrinitratom (8,8 tjedana) i lidokainom (8,9 tjedana) te najbrže dovodi do smanjenja osjeta boli i prestanka krvarenja (126). Diltiazemklorid se pokazao učinkovitim lijekom za liječenje analne fisure kod djece u dobi do 16 godina; no potrebna su još dodatna klinička ispitivanja sigurnosti primjene da bi ga se moglo proglasiti lijekom prvog izbora posebno za djecu mlađe dobi (27). Upravo je ta skupina bolesnika posebno osjetljiva jer je kod njih koža tanja, a samim time i lakša apsorpcija lijeka, dok istovremeno nema mogućnosti prijavljivanja nuspojava (glavobolja). Ono što dodatno treba uzeti u obzir jest da kod mlađe djece postoji sklonost razvoju dermatitisa i pelenskog osipa, čime se također narušava integritet kože.

Razvojem biorazgradivih i biokompatibilnih suvremenih farmaceutskih oblika kojima se može postići kontrolirano i polagano oslobađanje lijeka učinkovitost topikalne terapije analne fisure mogla bi se značajno unaprijediti. Tako bi se primjerice uklapanjem diltiazemklorida u polimerne ili fosfolipidne nanosustave (liposomi) i njihovom ugradnjom u podlogu kao što je kitozanski hidrogel oslobađanje lijeka dodatno usporiti. Osim toga smanjile bi se moguće iritacije i

nuspojave izazvane slobodnim lijekom, a korištenjem biokompatibilnih polimera ili fosfolipida doprinijelo bi i boljoj fiziološkoj podnošljivosti konačne formulacije.

Keny i Lourencoc (2010) su predložili korištenje diltiazemklorida u obliku termoreverzibilnih i mukoadhezivnih *in situ* gelirajućih sustava (130). Takvi oblici su tekući pri sobnoj temperaturi, a pri tjelesnoj temperaturi zbog prisustva temperaturno osjetljivih poloksamera (Pluronic F-127 i F-68) formiraju gelove. Prisustvo mukoadhezivnih polimera (karbopola ili polikarbofila) omogućuje dulje zadržavanje diltiazemklorida na mjestu primjene i time veći lokalni učinak lijeka (130).

## 6. ZAKLJUČCI

Provedena je karakterizacija propisivanog magistralnog pripravka diltiazemkorida za lokalnu terapiju analnih fisura, predložene blage modifikacije u sastavu podloge (gel hidroksietilceluloze) te razvijen potencijalni novi magistralni pripravak diltiazemklorida korištenjem kitozanskog hidrogela pripremljenog iz visokomolekularnog kitozana.

Na osnovu provedenih ispitivanja postojećeg i potencijalnog novog magistralnog pripravka moguće je izvesti sljedeće zaključke:

- Sastav hidrogelova, tip polimera i pH vrijednost hidrogela utječu na profil oslobađanja diltiazemklorida te reološka svojstva pripravka.
- Najbrže oslobađanje postignuto je iz izvornog hidroksietilceluloznog gela (pH 4,5), dok je najsporije oslobađanje lijeka postignuto korištenjem kitozanskog hidrogela (pH $\approx$ 5,5).
- Brzina oslobađanja diltiazemklorida iz oba tipa hidrogela (hidroksietilceluloznog i kitozanskog) je u obrnuto proporcionalnom odnosu s viskoznosti hidrogelova. Porastom viskoznosti hidrogela oslobađanje je sporije i obratno.
- Hidroksietilcelulozni gelovi (izvorni i neutralizirani) su bili značajno manje viskoznosti u odnosu na kitozanske gelove.



- Kitozanskom hidrogelu se dodatkom trietanolamina, tj. porastom pH vrijednosti izvornog gela viskoznost povećava, dok hidroksietilceluloznom gelu viskoznost opada.
- Viskoznost svih hidrogelova je temperaturno ovisna. Značajan pad viskoznosti zabilježen je kod hidroksietilceluloznih gelovana višoj temperaturi (34 °C), u usporedbi s kitozanskim gelovima.
- Hidroksietilcelulozni gelovi su imali veću vrijednost modula gubitka  $G''$  od modula pohrane  $G'$ , odnosno više izražena viskozna svojstva nego elastična svojstva te širi raspon linearnog viskoelastičnog područja.
- Kitozanski gelovisu pokazali višu vrijednost modula pohrane  $G'$  nego modula gubitka  $G''$  u linearnom viskoelastičnom području. Povećanjem temperature se naglašavaju razlike između izvornog i neutraliziranog kitozanskog gela (porastom temperature gel poprima čvršću strukturu).
- Nakon primjenjenog stresa hidroksietilcelulozni gelovi brzo uspostavljaju početnu strukturu u usporedbi s kitozanskim hidrogelovima. Izvornom kitozanskom gelu se u zadanom vremenu struktura ne oporavi, dok se struktura neutraliziranog kitozanskog gela djelomično uspostavi.
- Hidroksietilcelulozni gelovi su adhezivniji od kitozanskih gelova.
- Adhezivnost kitozanskog gela raste povećanjem pH vrijednosti gela.

Kitozanski gelovi omogućuju sporije oslobađanje diltiazemklorida nego hidroksietilcelulozni gelovi, te bi zbog potencijalnog antimikrobnog učinka i

povoljnog djelovanja visokomolekularnog kitozana na zacjeljivanje rana bili prikladni u lokalnoj terapiji analnih fisura. Međutim, neophodno je provesti daljnja ispitivanja kojima bi se dokazao antimikrobni učinak kitozanskog hidrogela te klinička ispitivanja kojima bi se procijenila efikasnost pripravka u zacjeljivanju fisura. Oslobađanje diltiazemklorida moglo bi se dodatno usporiti njegovim uklapanjem u biorazgradive i biokompatibilne nanočestice te umješavanjem nanočestica u kitozanski gel čime bi se povećao lokalni terapijski učinak, smanjila učestalost doziranja i pripravak postao prikladniji za pacijenta.

## 7. LITERATURA

1. Anatomija analnog područja.

*Dostupno na: <https://www.learningmedical.co/archives/1129>, pristupljeno 14. lipnja 2016.*

2. Guyton AC, Hall JE. ur. Textbook of Medical Physiology. Saunders; 2011, str. 753-772.

3. Tanaka E, Noguchi T, Nagai K, Akashi Y, Kawahara K, Shimada T. Morphology of the epithelium of the lower rectum and the anal canal in the adult human. *Med Mol Morphol* 2012;45:72-9.

4. Cross KL, Massey EJDA, Fowler AL, Monson JRT. The management of anal fissure: ACPGBI position statement. *Colorectal Dis* 2008;10:1-7.

5. Wald A, Bharucha E, Cosman BC, Whitehead WE. ACG Clinical Guideline: Management of Benign Anorectal Disorders. *Am J Gastroenterol* 2014;12-3.

6. Prikaz nastale analne fisure.

*Dostupno na: <http://www.apotheken-umschau.de/anal fissur>, pristupljeno: 16. lipnja 2016.*

7. Patofiziološki mehanizam nastanka analne fisure. *Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4816871/>, pristupljeno: 16. lipnja 2016.*

8. Herzig DO, Lu KC. Anal Fissure. *Surg Clin N Am* 2010;90:33-44.

9. Perry WB, Dykes SL, Buie WD. Practice parameters for the management of anal fissures. *Dis Colon Rectum* 2010;53:1110-5.

10. Poh A, Tan KY, Seow-Choen F. Innovations in chronic anal fissure treatment: a systematic review. *World J Gastrointest Surg* 2010;2:231-41.

11. Razlike između akutne i kronične analne fisure. *Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4816871/>, pristupljeno: 23. lipnja 2016.*

12. Zaghiyan KN, Fleshner P. Anal Fissure. *Clin Colon Rectal Surg* 2011;24:22-30.

13. Jonas M, Scholefield JH. Anal Fissure. *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30:167-81.

14. Schlichtemeier S, Engel A. Anal Fissure. *Aust Prescr* 2016;39:14-7.

15. Gupta PJ. Consumption of red-hot chill pepper increases symptoms in patients with acute anal fissures. A prospective, randomized, placebo-controlled, double blind, crossover trial. *Arg Gastroenterol* 2008;45:124-7.

16. Carroccio A, Mansueto P, Morfino G i sur. Oligo-antigenic diet in the treatment of chronic anal fissures. Evidence for a relationship between food hypersensitivity and anal fissures. *Am J Gastroenterol* 2013;108:825-32.
17. Vivek T, Saxena A. Establishing the superiority of topical diltiazem over glyceryl trinitrate in the treatment of chronic anal fissure: a prospective analytical study. *Glob J Surg* 2014;2:37-41.
18. Madalinski MH. Identifying the best therapy for chronic anal fissure. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2011;2:9.
19. Mapel DW, Schum M, Von Worley A. The epidemiology and treatment of anal fissures in a population-based cohort. *BMC Gastroenterol* 2014;14:129.
20. Lund JN, Scholefield JH. Aetiology and treatment of anal fissure. *Br J Surg* 1996;83:1335-44.
21. Schouten WR, Briel JW, Auwerda JJ. Relationship between anal pressure and anodermal blood flow. The vascular pathogenesis of anal fissures. *Dis Colon Rectum* 1994;37:664-9.
22. Klosterhalfen B, Vogel P, Rixen H, Mittermayer C. Topography of the interior rectal artery: a possible cause of chronic, primary anal fissure. *Dis Colon Rectum* 1989;32:43-52.
23. Schouten WR, Briel JW, Auwerda JJ, De Graaf EJ. Ischaemic nature of anal fissure. *Br J Surg* 1996;83:63-5.
24. Collins EE, Lund JN. A review of chronic anal fissure management. *Tech Coloproctol* 2007;11:209-23.
25. Gupta P. Randomized, controlled study comparing sitz-bath and no-sitz-bath treatments in patients with acute anal fissures. *ANZ J Surg* 2006;76:718-21.
26. Colorectal Surgeons Sydney (CSS): Anal Fissures. *Dostupno na: <http://colorectalsurgeonssydney.com.au/wp-content/uploads/2012/08/anal-fissures.pdf>, pristupljeno: 15. siječanja, 2016.*
27. Nice Guidance, 2013: Chronic anal fissure: 2% topical diltiazem hydrochloride. *Dostupno na: <http://www.nice.org.uk/advice/esuom3/chapter/Key-points-from-the-evidence>, pristupljeno: siječanj 2016.*
28. National Health Service: Hertfordshire Medicines Management Committee (NHS HMMC): Diltiazem 2% Topical Cream For The Treatment Of Chronic Anal Fissures. 2013. *Dostupno na:*

[http://hertsvalleysccg.nhs.uk/uploads/file/Pharmacy/Local%20Decisions/DiltiaDil%20for%20Anal%20fissures%20201306%20\(HMMC\).pdf](http://hertsvalleysccg.nhs.uk/uploads/file/Pharmacy/Local%20Decisions/DiltiaDil%20for%20Anal%20fissures%20201306%20(HMMC).pdf), pristupljeno: 16. siječanja 2016.

29. Katzung B, Masters BS, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Medicinska naklada;2011, str.195.
31. Fenton C, Wellington K, Easthope SE. 0.4% nitroglycerin ointment in the treatment of chronic anal fissure pain. *Drugs* 2006;66:343-9.
32. Bailey HR, Beck DE, Billingham RP i sur. A study to determine the nitroglycerin ointment dose and dosing interval that best promote the healing of chronic anal fissures. *Dis Colon Rectum* 2002;45:1192-9.
33. Nelson RL, Thomas K, Morgan J. Non surgical therapy for anal fissure. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;1:23-31.
34. Lund JN, Scholefield JH. A randomized, prospective, double-blind, placebo-controlled trial of glyceryl trinitrate ointment in treatment of anal fissure. *Lancet* 1997;349:11-4.
35. Zuberi BF, Rajput MR, Abro H, Shaikh SA. A randomized trial of glyceryl trinitrate ointment and nitroglycerin patch in healing of anal fissures. *Int J Colorectal Dis* 2000;15:243-5.
36. Azarnoff DL, Lee JC, Lee C, Chandler J, Karlin D. Quality of extemporaneously compounded nitroglycerin ointment. *Dis Colon Rectum* 2007;50:509-16.
37. Ahmad N, Amin S, Neupane YR, Kohli K. Anal fissure nanocarrier of lercanidipine for enhanced transdermal delivery: formulation optimization, ex vivo and in vivo assessment. *Expert Opin Drug Deliv* 2014;11:467-78.
38. Golfam F, Golfam P, Khalaj A, Sayed Mortaz SS. The effect of topical nifedipine in treatment of chronic anal fissure. *Acta Med Iran* 2010;48:295-9.
39. Knight JS, Birks M, Farouk R. Topical diltiazem ointment in the treatment of chronic anal fissure. *Br J Surg* 2001;88:553-6.
40. Pub Chem Open Chemistry Database: Compound Summary for diltiazem. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diltiazem#section=Top>, pristupljeno: 8. siječnja 2016.
41. Jonas M, Speake W, Scholefield JH. Diltiazem heals glyceryl trinitrate-resistant chronic anal fissures: a prospective study. *Dis Colon Rectum* 2002;45:1091-5.

42. Carapeti EA, Kamm MA, Phillips RK. Topical diltiazem and bethanechol decrease anal sphincter pressure and heal anal fissures without side effects. *Dis Colon Rectum* 2000;43:1359–62.
43. Kocher HM, Steward M, Leather AJ, Cullen PT. Randomized clinical trial assessing the side-effects of glyceryl trinitrate and diltiazem hydrochloride in the treatment of chronic anal fissure. *Br J Surg* 2002;89:413–7.
44. Bielecki K, Kolodziejczak M. A prospective randomized trial of diltiazem and glyceryl trinitrate ointment in the treatment of chronic anal fissure. *Colorectal Dis* 2003;5:256-7.
45. Sajid MS, Whitehouse PA, Sains P. Systematic review of the use of topical diltiazem compared with glyceryltrinitrate for the nonoperative management of chronic anal fissure. *Colorectal Dis* 2013;15:19–26.
46. Shrivastava UK, Jain BK, Kumar P. A comparison of the effects of diltiazem and glyceryl trinitrate ointment in the treatment of chronic anal fissure: a randomized clinical trial. *Surg Today* 2007;37:482–5.
47. Leinonen PT, Riekkki R, Oikarinen A. Contact allergy to diltiazem cream. *Contact Dermatitis* 2010;63:228-30.
48. Katzung B, Masters BS, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Medicinska naklada;2011, str. 201.
49. Pub Chem Open Chemistry Database: Compound Summary for Nifedipine. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nifedipine#section=2D-Structure>, pristupljeno: 19. travnja 2018.
50. Antropoli C, Perrotti P, Rubino M i sur. Nifedipine for local use in conservative treatment of anal fissures: preliminary results of a multicenter study. *Dis Colon Rectum* 1999;42:1011-5.
51. Katsinelos P, Kountouras J, Paroutoglou G i sur. Aggressive treatment of acute anal fissure with 0.5% nifedipine ointment prevents its evolution to chronicity. *World J Gastroenterol* 2006;12:6203–6.
52. Perrotti P, Bove A, Antropoli C i sur. Topical nifedipine with lidocaine ointment vs. active control for treatment of chronic anal fissure: results of a prospective, randomized, double-blind study. *Dis Colon Rectum* 2002;45:1468–75.
53. Oshiro H, Kobayashi I, Kim D, Takenaka H, Hobson RW 2<sup>nd</sup>, Duran WN. L-type calcium channel blockers modulate the microvascular hyperpermeability induced by platelet-activating factor in vivo. *J Vasc Surg* 1995;22:732-9.

54. Fleischmann JD, Huntley HN, Shingleton WB, Wentworth DB. Clinical and immunological response to nifedipine for the treatment of interstitial cystitis. *J Urol* 1991;146:1235-9.
55. Agaoglu N, Cengiz S, Arslan MK i sur. Oral nifedipine in the treatment of chronic anal fissure. *Dig Surg* 2003;20:452-6.
56. Agrawa V, Kaushal GMS, Gupta R. Randomized controlled pilot trial of nifedipine as oral therapy vs topical application in the treatment of fissure-in-ano. *Am J Surg* 2013;206:748-51.
57. Cook TA, Humphreys MM, Mortensen NJ. Oral nifedipine reduces resting anal pressure and heals chronic anal fissure. *Br J Surg* 1999;86:1269-73.
58. Mustafa NA, Lengiz S, Turkuilmaz S i sur. Comparison of topicalglyceryl trinitrate ointment and oral nifedipine in treatment of chronic anal fissure. *Acta Chir Belg* 2006;106:55-8.
59. Jonas-Obichere M, Scholefield JH, Acheson A, Munday M, Tyler H, Wilson VG. Comparison of the effects of nitric oxide donors and calcium channel blockers on the intrinsic myogenic tone of sheep isolated internal anal sphincter. *Br J Surg* 2005;92:1263-9.
60. Gulrez SKH, Al-Assaf S, O'Phillips G, Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. U: Carpi A. ur. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Application*. Intech; 2011, str. 517-561.
61. Abdel-Halim ES. Chemical modification of cellulose extracted from sugarcane bagasse: Preparation of hydroxyethyl cellulose. *Arab J Chem* 2014;7:362-71.
62. Goddard DE, Greber JV. *Principles of Polymer Science and Technology in Cosmetics and Personal Care*. Marcel Dekker Inc; 1999, str. 379-387.
63. Zhou J, Qin Y, Liu S, Zhang L. Homogenous Synthesis of Hydroxyethylcellulose in NaOH/Urea Aqueous Solution. *Macromol Biosci* 2006;6:84-9.
64. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. ur. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press; 2006, str. 330-334.
65. Desmarais AJ, Wint RF. Hydroxyalkyl and ethyl ethers of cellulose. U: Whistler RL, Miller JN ur. *Industrial Gums Polysaccharides and Their Derivatives*. San DiegoAcademic Press; 1993, str. 505-535.

66. Labrude P, Becq P. Pharmacist and chemist Henri Braconnot. *Rev Hist Pharm* 2003;51:61-78.
67. Nilsen-Nygaard J, Strand PS, Kjell MV, Draget IK, Nordgård CT. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers* 2015;7:552-79.
68. van den Broek LAM, Knoop RIJ, Kappen FHJ, Boeriu CG. Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydr Polym.* 2015;13:237-42.
69. Muzzarelli RAA, Muzzarelli C. ur. *Advances in Polymer Science: Polysaccharides I. Chitozan chemistry: relevance to the biomedical sciences.* Springer; 2005; str. 151-209.
70. Croisier F, Jerome C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Poly J* 2013;49:780-92.
71. Se-Kwon K, Nghiep ND, Rajapakse N. Therapeutic prospectives of Chitin, Chitosan and Their Derivatives. *J Chitin Chitosan* 2006;11:1-10.
72. Balazs N, Sipos P. Limitations of pH-potenciometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Carbohydr Res* 2006;342:124-30.
73. Muzzarelli RAA, Rocchetti R, Stanic V, Weckx M. Methods for the Determination of the degree of Acetylation of Chitin and Chitosan. U: Muzzarelli RAA, Peter MG,ur. *Chitin Handbook.* E.C Society; 1997, str. 109-15.
74. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006;31:603-32.
75. Stand SP, Tommeraas K, Varum KM, Ostgaard K. Electrophoretic light scattering studies of chitosan with different degrees of N-acetylation. *Biomacromol* 2001;2,1310-4.
76. Nordtveit RJ, Varum KM, Smidsrod O. Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme. *Carbohydr Polym* 1996;29:163-7.
77. Alves NM, Mano JF. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int J Biol Macromol* 2008;43:401–14.
78. Bagheri-Khoulenjani S, Taghizadeh SM, Mirzadeh H. An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. *Carbohydr Polym* 2009;78:773–8.
79. Tomihata K, Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films in chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* 1997;18:567–75.



80. Elviri L, Bianchera A, Bergonzi C, Bettini R. Controlled local drug delivery strategies from chitosan hydrogels for wound healing. *Expert Opin Drug Deliv* 2017;897-908.
81. Rampino A, Borgogna M, Blasi P, Bellich B, Cesàro A. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. *Int J Pharm* 2013;15;455:219-28.
82. Hurler J, Škalko-Basnet N. Potentials of chitosan-based delivery systems in wound therapy: bioadhesion study. *Funct Biomater* 2012;3:37-48.
83. Ahmadi F, Oveisi Z, Mohammadi Samani S, Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res Pharm Sci* 2015;10:1-16.
84. Dhawan S, Medhi B, Chopra S. Formulation and Evaluation of Diltiazem Hydrochloride Gels for the Treatment of Anal Fissures. *Sci Pharm* 2009;77:465-82.
85. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:83-99.
86. Alsarra IA. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *Int J Biol Macromol* 2009;45:16-21.
87. Kong M, Chen XG, Xing K. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol* 2010;144:51-63.
88. Ong SY, Wu J, Moochhala SM, Tan M-H, Lu J. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials* 2008;29:4323-32.
89. Muzzarelli R, Tarsi R, Filippini O. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:2019-23.
90. Andres Y, Giraud L, Gerente C. Antibacterial effects of chitosan powder: mechanisms of action. *Environ Technol* 2007;28:1357-63.
91. Chung YC, Chen CY. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour Technol* 2008;99:2806-14.
92. Hernandez-Lauzardo AN, Bautista-Banos S, Velazquez-del Valle MG, Mendez Montevalvo MG, Sanchez-Rivera MM, Bello-Perez LA. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.Fr.) Vuill. *Carbohydr Polym* 2008;73:541-7.
93. Aiedeh K, Taha MO. Synthesis of iron-crosslinked chitosan succinate and iron-crosslinked hydroxamated chitosan succinate and their in vitro evaluation as

potential matrix materials for oral theophylline sustained-release beads. Eur J Pharm Sci 2001;13:159-68.

94. Goy CG, de Britto D, Odilio BGA. A review of the antimicrobial activity of chitosan. Polímeros 2009;19:241-7.

95. European Pharmacopoeia 8.0. Strasbourg, Council of Europe;2014, str. 2062.

96. Directive 2001/83/Ec Of The European Parliament And Of The Council On The Community Code Relating To Medicinal Products For Human Use, 2001.

*Dostupno na:*

[http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir\\_2001\\_83\\_consol\\_2012/dir\\_2001\\_83\\_cons\\_2012\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_consol_2012/dir_2001_83_cons_2012_en.pdf), pristupljeno: 23. siječnja 2016.

97. Vuleta G, Kovačević A, Savić S, Milić J. In vitro ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz farmaceutskih preparata za primenu na kožu. Arh farm 2007;57:375–98.

98. USP Pharmacopeial Forum: Topical and Transdermal Drug Product- Product Quality Tests 2010.

*Dostupno na:* [http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/2010-09-17revisionGC3TopicalTransdermal.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/2010-09-17revisionGC3TopicalTransdermal.pdf), pristupljeno: 22. siječnja 2016.

99. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4, 2004. *Dostupno na:* <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9742801e.pdf?expires=1452961046&id=id&accname=guest&checksum=AFEEDA483B79A8D1C0E5FF5A1D15AECC>, pristupljeno: 22. siječnja 2016.

100. Franz difuzijska ćelija. *Dostupno na:* <http://www.particlesciences.com>, pristupljeno: 25. veljače 2017.

101. Maugin GA. Continuum Mechanics through the Ages - From the Renaissance to the Twentieth Century. Springer; 2016, str.267.

102. Goodyer S. Measuring polymers using a rotational rheometer in oscillatory mode. Anton Paar Ltd. *Dostupno na:* [http://www.t-p-a.org/archive/papers/15052013/Measuring Polymers using a Rotational Rheometer in Oscillatory Mode.pdf](http://www.t-p-a.org/archive/papers/15052013/Measuring%20Polymers%20using%20a%20Rotational%20Rheometer%20in%20Oscillatory%20Mode.pdf), pristupljeno: 23. listopada 2017.

103. das Neves J, da Silvab MV, Gonçalvesb MP, Amarala MH, Bahiia MF. Rheological Properties of Vaginal Hydrophilic Polymer Gels. Current Drug Delivery 2009;6:83-92.

104. Malvern Instruments White Paper: A Basic Introduction to Rheology 2006.  
*Dostupno na:*  
<https://www.malvern.com/en/support/resource-center/Whitepapers/WP160620BasicIntroRheology.html>, pristupljeno: 10. listopada 2017.
105. Jones DS. Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance. *Int J Pharm* 1999;179:167-7.
106. Tamburic S, Craig DQM. The effects of ageing on the rheological, dielectric and mucoadhesive properties of poly(acrylic acid) gel systems. *Pharm Res* 1996;13:279-83.
107. Siska B, Snejdrova E, Machac I, Dolecek P, Martiska J. Contribution to the rheological testing of pharmaceutical semisolids. *Pharm Dev Technol* 2018;22:1-9.
108. Andrews GP. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;71:505-18.
109. Mariott C, Gregory NP. Mucus physiology and pathology. U: Lenaerts V, Gurny R, ur. *Bioadhesive drug delivery systems*. CRC Press, 1990;1-24.
110. Woodley J. Bioadhesion: new possibilities for drug administration. *Clin Pharmacokinet* 2001;40:77-84.
111. das Neves J, Bahia MF. Gels as vaginal drug delivery systems. *Int J Pharm* 2006;318:1-14.
112. Barry BW. Transdermal drug delivery. U: Aulton ME, ur. *The design and manufacture of Medicines*. Elsevier, 2007;565-97.
113. Lih E, Lee JS, Park KM, Park KD. Rapidly curable chitosan-PEG hydrogels as tissue adhesives for hemostasis and wound healing. *Acta Biomater* 2012;8:3261-9.
114. Mi FL, Shyu SS, Wu YB. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials* 2001;22:165-73.
115. Santos TC, Marques AP, Silva SS. In vitro evaluation of the behaviour of human polymorphonuclear neutrophils in direct contact with chitosan-based membranes. *J Biotechnol* 2007;132:218-26.
116. Ueno H, Murakami M, Okumura M. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. *Biomaterials* 2001;22:1667-73.
117. Kojima K, Okamoto Y, Kojima K i sur. Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing. *J Vet Med Sci* 2004;66:1595-8.

118. Naldini G, Cerullo G, Mascagni D i sur. Hiding intersphincteric and transsphincteric sepsis in a novel pathological approach to chronic anal fissure. *SurgInnov* 2012;19:33–6.
119. Gupta PJ. A study of supportive pathologies associated with chronic anal fissures. *Tech Coloproctol* 2005;9:104–7.
120. Deen-Molenaar CH, Jordanov T, Felt-Bersma RJ. Intersphincteric infection due to an anal fissure. *Int J Colorectal Dis* 2016;31:727-8.
121. Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Schubert R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. *Int J Pharm.* 2001;219:139-49.
122. Lehr CM, Bouwstra JA, Schacht EH, Junginger HE. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int J Pharm* 1992;78:43–8.
123. Rossi S, Ferrari F, Bonferoni MC, Caramella C. Characterization of chitosan hydrochloride-mucin interaction by means of viscosimetric and turbidimetric measurements. *Eur J Pharm Sci* 2000;10:251-7.
124. He P, Davis SS, Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int J Pharm* 1998;166:75–88.
125. Kaushal G, Sayre BE, Prettyman T. Stability of extemporaneously compounded diltiazem hydrochloride infusions stored in polyolefin bags. *Am J Health-System Pharm* 2013;70:894-9.
126. Cevik M, Boleken ME, Koruk I, Ocal S, Balcioglu ME, Aydinoglu A. A prospective, randomized, double-blind study comparing the efficacy of diltiazem, glyceryl trinitrate, and lidocaine for the treatment of anal fissure in children. *Pediatr Surg Int* 2012;4:411-6.
127. Keshtgar AS, Ward HC, Clayden GS. Transcutaneous needle-free injection of botulinum toxin: a novel treatment of childhood constipation and anal fissure. *J Pediatr Surg* 2009;44:1791–8.
128. Nelson RA. A systematic review of medical therapy for anal fissure. *Dis Colon Rectum* 2004;47:422–31.
129. Sonmez K, Demirogullar B, Ekingen G. Randomized, placebo-controlled treatment of anal fissure by lidocaine, EMLA, and GTN in children. *J Pediatr Surg* 2002;37:1313–6.

130. Keny RV, Lourencoc F. Formulation and evaluation of thermoreversible *in situ* gelling and mucoadhesive diltiazem hydrochloride liquid suppository. Int J Phar Bio Sci 2010;1:1-17.