

# In vitro ispitivanje oslobađanja azitromicina iz kationskih liposoma

---

Justić, Karmela

Master's thesis / Diplomski rad

2015

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:126997>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-31**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Božena Vuković**

***In vitro* ispitivanja oslobađanja azitromicina iz  
kitozanskih gelova**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Oblikovanje lijekova 2, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vanić.

**Zahvala:**

*Srdačno zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof. dr. sc. Željki Vanić na potpori i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala i na susretljivosti, razumijevanju i vremenu za sva moja pitanja.*

*Veliko hvala mag. pharm. Zori Palac na uloženom trudu i vremenu, te pruženoj pomoći, posebno u eksperimentalnom dijelu rada.*

*Najveće hvala ipak ide mojim roditeljima zbog ljubavi, strpljenja i bezuvjetne podrške tijekom cijelog studiranja.*

# SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.UVOD</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>1.1. OBILJEŽJA KOŽE I PRIMJENA LIJEKOVA NA KOŽU</b> .....                                    | <b>1</b>  |
| 1.1.1. Građa kože .....   | 1         |
| 1.1.2. Dermalna primjena lijekova .....   | 3         |
| 1.1.3. Fiziološka mikroflora kože .....   | 5         |
| 1.1.4. Liječenje bakterijskih infekcija kože.....   | 7         |
| <b>1.2.HIDROGELOVI I NJIHOVA TERAPIJSKA PRIMJENA</b> .....                                      | <b>8</b>  |
| 1.2.1. Kitozan .....  | 9         |
| 1.2.2. Antimikrobna svojstva kitozana .....   | 11        |
| 1.2.3. Farmaceutska primjena kitozanskih hidrogelova .....                                      | 11        |
| <b>1.3 AZITROMICIN</b> .....  | <b>13</b> |
| 1.3.1. Farmakokinetika azitromicina .....   | 13        |
| 1.3.2. Djelovanje i primjena azitromicina .....   | 14        |
| <b>1.4. IN VITRO ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA LIJEKA PRIMJENOM FRANZ<br/>DIFUZIJSKE ČELIJE</b> ..... | <b>16</b> |
| 1.4.1. Određivanje koncentracije oslobođenog lijeka .....                                       | 17        |
| <b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....   | <b>20</b> |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>3.1.MATERIJALI</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>3.2.METODE</b> .....   | <b>22</b> |
| 3.2.1. Izrada kitozanskih hidrogelova .....   | 22        |
| 3.2.2. Optimiziranje pH kitozanskih hidrogelova .....   | 24        |
| 3.2.3. Priprava kitozanskih gelova s azitromicinom za <i>in vitro</i> ispitivanje .....         | 24        |
| 3.2.4. Ispitivanje <i>in vitro</i> oslobađanja azitromicina iz kitozanskih gelova .....         | 24        |
| 3.2.5. Izrada kalibracijskog pravca.....  | 25        |
| 3.2.6. Određivanje sadržaja azitromicina oslobođenog iz kitozanskih hidrogelova .....           | 26        |

|   |    |
|---|----|
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | 27 |
| <b>4.1. KARAKTERIZACIJA KITOZANSKIH HIDROGELOVA</b> .....                                     | 27 |
| <b>4.2. <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJE OSLOBADANJA AZITROMICINA IZ<br/>    HIDROGELOVA</b> ..... | 29 |
| <b>5. ZAKLJUČCI</b> .....   | 35 |
| <b>6. LITERATURA</b> .....  | 36 |
| <b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....   | 38 |

# 1.UVOD

## 1.1. OBILJEŽJA KOŽE I PRIMJENA LIJEKOVA NA KOŽU

Koža je najveći organ ljudskog tijela te obuhvaća više od 10% ukupne tjelesne mase. Ona obavlja različite funkcije, a najznačajnija je da predstavlja barijeru koja, osim što sprječava gubitak vode, elektrolita i drugih sastojaka tijela, štiti tijelo od štetnih vanjskih utjecaja (fizičkih, kemijskih i mikrobioloških). Koža sudjeluje i u regulaciji tjelesne temperature budući da se čak 80% topline gubi putem kože, a ujedno je i medijator osjeta i mjesto odvijanja imunoloških procesa, te sinteze vitamina D. Zbog sposobnosti kože da sudjeluje u izmjeni tvari, svojstva kože su bitna za učinak dermatoterapijskih i kozmetičkih preparata. Koža čini jedinstvenu cjelinu s organizmom kojeg pokriva pa je razumljivo da se različite promjene u organizmu mogu očitovati na koži, a isto tako promjene na koži (zarazne bolesti, rane, opekline i sl.) mogu izazvati cijeli niz poremećaja u organizmu (Čajkovac, 2000).

### 1.1.1. Građa kože

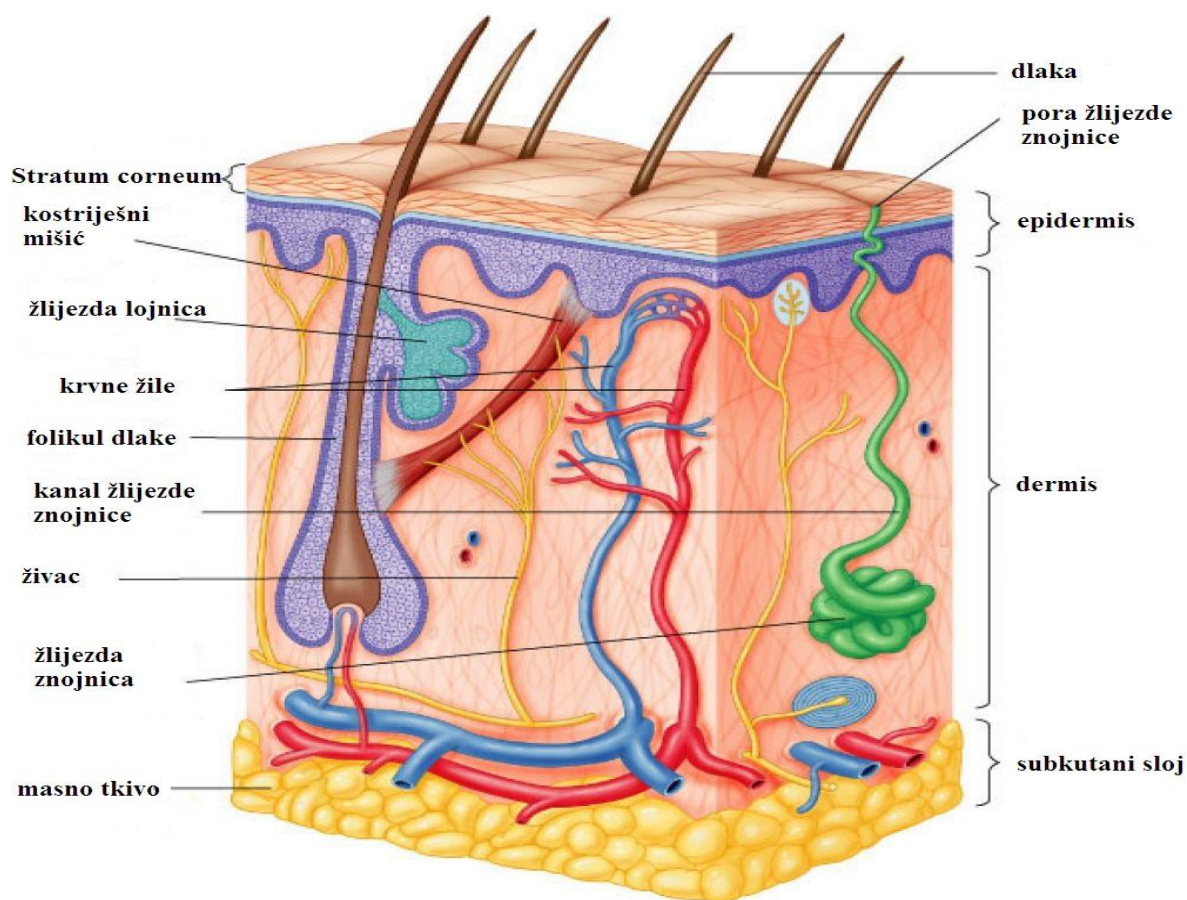
Koža je građena od dva osnovna sloja: epidermisa i dermisa, a ispod dermisa se nalazi potkožno tkivo (*subcutis*). Na površini kože nalazi se tanki hidrolipidni film (kiseli plašt) koji štiti kožu od gubitka vlage te prodora stranih tvari i mikroorganizama. Masne sastavnice ovog sloja uglavnom su produkti žlijezda lojnica, a hidrofilne komponente produkti žlijezda znojnice (Čajkovac, 2000).

Epidermis i dermis razlikuju se po građi i funkciji. Epidermis je vanjski dio kože i sastoji se od pet slojeva: rožnati sloj (*stratum corneum*), svijetli sloj (*stratum lucidum*), zrnati sloj (*stratum granulosum*), trnasti sloj (*stratum spinosum*) i bazalni sloj (*stratum basale*). Prosječna debljina epidermisa je oko 0,2 milimetra, ali ona varira ovisno o dijelu tijela i udjelu vode koju epidermis zadržava. Iako u epidermisu nema krvnih ni limfnih žila to je metabolički aktivno tkivo u čijem se bazalnom sloju stalno stvaraju nove stanice. Diferencijacijom bazalnih stanica i njihovim pomicanjem prema višim slojevima epidermis se konstantno obnavlja. Kod zdrave kože jedan ciklus obnove epidermisa traje 28 do 30 dana ili 13 do 14 dana u područjima gdje je proliferacija stanica brža, poput kože lica. U zratom

sloju dolazi do keratinizacije bazalnih stanica koje gube jezgru i mijenjaju oblik. Svijetli sloj nalazimo samo na području dlanova i tabana gdje je koža deblja i izložena trenju. Rožnati sloj je sloj na samoj površini kože, a sastoji se od 10 do 20 slojeva spljoštenih, orožnjelih stanica uklopljenih u visokoorganizirani lipidni matriks. Ovaj sloj zbog svoje specifične građe predstavlja glavnu nepropusnu barijeru kod dermalne primjene lijekova. Naime, stanice ispunjene keratinom pružaju značajan otpor prodoru tvari u oba smjera.

Dermis zauzima mnogo veću površinu od epidermisa i smatra se glavnim dijelom kože. Ovaj sloj je mnogo deblji i sadrži mali broj stanica. Građen je prvenstveno od kolagenskih i elastinskih vlakana. Dermis se sastoji od dva sloja: papilarnog i retikularnog. Papilarni sloj sadrži velik broj živčanih završetaka, kapilara i vode, pa sudjeluje u regulaciji tjelesne temperature i dostavi hranjivih tvari epidermisu. Retikularni sloj se nalazi ispod papilarnog, a čini ga gusta mreža proteinskih vlakana.

Potkožno tkivo (hipodermis, subcutis) služi kao spremište masti, a njegova debljina ovisi o spolu, dobi i endokrinom sustavu organizma, te prehrani. Djeluje kao toplinski izolator i ublažava mehaničke podražaje (Igarashi i sur., 2005).



**Slika 1.** Građa ljudske kože (<http://www.human-anatomyped.net/>)

### 1.1.2. Dermalna primjena lijekova

Ljekoviti oblici koji se primjenjuju topikalno na kožu dijele se u dvije kategorije - pripravci koji ostvaruju lokalni (topikalni) učinak i pripravci kojima se postiže sistemski učinak. Lokalni učinak na/u kožu(i) podrazumijeva djelovanje pripravka na površini kože, u *stratum corneumu*, epidermisu i potencijalno dermisu (Ueda i sur., 2009).

Za postizanje lokaliziranog terapijskog učinka na mjestu primjene potrebno je osigurati zadržavanje lijeka u koži kako bi njegova koncentracija u krvi i tkivima udaljenim od mjesta primjene bila gotovo zanemariva, čime je smanjena i učestalost neželjenih reakcija u odnosu na sistemsku primjenu. Primjer lijekova s poželjnim lokalnim djelovanjem su antibiotici i kortikosteroidi koji se koriste kod infekcija i iritacija kože, te lokalni anestetici.

Transdermalna primjena lijekova podrazumijeva apsorpciju lijeka kroz kožu ili sluznice i ostvarivanje učinka na mjestu udaljenom od mjesta primjene. Ovakva primjena



može biti jako dobra alternativa oralnoj i parenteralnoj primjeni lijekova. Posebnu prednost pred oralnom primjenom transdermalni put primjene ostvaruje kod lijekova koji imaju izraženi učinak prvog prolaska kroz jetru pri čemu dolazi do preranog metabolizma lijeka i smanjenog terapijskog učinka.

Transdermalna primjena je neinvazivna i pacijentu prihvatljiva metoda koja može osigurati oslobađanje lijeka kroz duži vremenski period (do tjedan dana), a zbog jednostavnosti primjene povećavana je i suradljivost pacijenata (Prausnitz i Langer, 2008).

Nedostatak transdermalne primjene je relativno mali broj lijekova koji se mogu apsorbirati ovim putem primjene.

*Stratum corneum* predstavlja osnovnu barijeru prolaska aktivnih/djelatnih tvari u kožu te ograničava brzinu perkutanog transporta. Transport hidrofilnih ili nabijenih molekula je otežan zbog građe *stratum corneuma* koji sadrži veće količine lipida i proteina, a tek 10-20% vode. Tvar može prolaziti kroz rožnate stanice tzv. transcelularnim putem ili kroz međustanične prostore – intercelularno. Ako se prolaz tvari odvija kroz stanicu, tada su proteinski filamenti putevi za prolaz polarnih (u vodi topljivih) tvari, a lipidni medij u koji su uloženi filamenti put je transporta nepolarnih (u ulju topljivih) tvari (Čajkovac, 2000).

Apsorpcija hidrofilnih molekula može se odvijati i kroz otvore folikula dlake i žlijezda lojnica, ali površina ovih otvora čini tek oko 1% ukupne površine kože što uvelike ograničava količinu apsorbiranog lijeka. U pravilu kad lijek prijeđe barijeru rožnatog sloja prolazak u dublje slojeve kože i sistemsko djelovanje se ostvaruju relativno lako i brzo.

Fizikalno-kemijska svojstva aktivne tvari značajno utječu na perkutanu apsorpciju. Apsorpcija se najčešće događa pasivnom difuzijom, a brzina transporta prati Fick-ov zakon difuzije. Brzina prolaska lijeka je direktno proporcionalna koeficijentu raspodjele ulje/voda, koncentraciji lijeka u formulaciji i površini kože na koju se lijek primjenjuje, a obrnuto je proporcionalna debljini sloja kroz koji prolazi (Mehta,2004).

Dermalnu i transdermalnu apsorpciju topikalno primjenjenih lijekova moguće je povećati koristeći nekoliko različitih kemijskih i fizikalnih pristupa.

Od kemijskih pristupa najčešće se koriste tzv. kemijski promotori penetracije, pomoćne tvari pri izradi fomulacija namijenjenih dermalnoj i transdermalnoj primjeni. Tu spadaju suotapala kao što su alkoholi, propilenglikol, dietilenglikol, dimetilsulfoksid, potom surfaktanti (SDS), urea i njoj srodni spojevi te neke masne kiseline koje poboljšavaju penetracija lijeka kroz kožu. Ovi spojevi iskazuju svoj učinak narušavanjem visoko uređene strukture međustaničnih

lipida u rožnatom sloju, tako što se molekule promotora apsorpcije umeću između molekula lipida organiziranih kao dvosloj. Problem ovog pristupa leži u činjenici da povećanje propusnosti rožnatog sloja korelira s povećanjem stupnja iritacije kože, pa posebni zahtjevi za promotore apsorpcije uključuju nisku toksičnost, neimunogenost i biorazgradivost. Surfaktanti i suotapala pospješuju penetraciju malih molekula lijeka, no imaju ograničeno djelovanje kod primjene hidrofilnih lijekova i makromolekula.

Terapijski sustavi poput liposoma, dendrimera i mikroemulzija se također koriste kao promotori penetracije, a ujedno i povećavaju topljivost lijeka u formulaciji i njegovu raspodjelu u kožu. Njihova supramolekulska struktura, ovisno o sastavu, utječe na prolazak lijeka kroz *stratum corneum* čime se može fino optimizirati dubina penetracije kroz slojeve kože. Povećanjem lipofilnosti lijeka vezanjem alkilnih postranih lanaca na molekulu, odnosno stvaranje lipofilnih prolijekova je također jedan od načina povećanja (trans)dermalnog transporta.

Najčešće korištena fizikalna metoda za povećanje penetracije lijekova je ionoforeza. Ionoforezom se poboljšava prolazak nabijenih molekula kroz kožu primjenom niskih vrijednosti istosmjerne struje. Nabijene molekule se pomiču elektroforezom, a nenabijene mogu prolaziti u dublje slojeve pomoću elektroosmotskog toka. Povećanjem jakosti primjenjene struje povećava se i brzina prolaska lijeka kroz rožnati sloj. Jačina struje koju je moguće primijeniti ovisi o stupnju iritacije kože i boli koju ovaj pristup izaziva zbog nemogućnosti lokaliziranog učinka na sam *stratum corneum*.

Propusnost rožnatog sloja može se povećati i korištenjem drugih fizikalnih metoda poput ultrazvuka, mikroigala i mikrodermoabrazije ( Prausnitz i Langer, 2008).

### **1.1.3. Fiziološka mikroflora kože**

Površina kože ima različite vrijednosti pH i varira između 4,1 na vlasištu do 7,2 na stopalima. Najveći dio kože na tijelu ima blago kiselu pH vrijednost (5,5) i nije povoljna sredina za razvoj mikroorganizama, budući da je za većinu medicinski značajnih bakterija optimalni pH oko 7. Ipak, treba napomenuti da se na površini kože nalaze brojni mikroorganizmi, a na područjima gdje je koža alkalnija mogu se naseliti gljivice i plijesni (Čajkovac, 2000).

Skup mikroorganizama, prvenstveno bakterija, koje obitavaju na koži čovjeka i ne uzrokuju simptome ili bolest nazivamo normalnom mikrobiološkom florom. Normalna flora

pomaže u sprječavanju razmnožavanja patogenih bakterija zauzimajući mjesto i kompetirajući za nutrijente. Različita bakterijska flora karakterizira 3 područja kože: (1) pazuh, međica, koža između nožnih prstiju; (2) dlanovi, lice i trup; (3) ruke i noge.

Djelovi kože koji su djelomično zatvoreni (pazuh, međica, koža između nožnih prstiju) sadrže više mikroorganizama od ostalih područja. Ove razlike se povezuju s većim udjelom vlage, većom tjelesnom temperaturom i većom koncentracijom površinskih lipida kože u djelomično zatvorenim područjima. Ova područja su također češće naseljena Gram-negativnim bakterijama nego područja kože manje vlažnosti.

Većina bakterija obitava u površinskim dijelovima *stratum corneum* i gornjem dijelu folikula dlake. *Staphylococcus epidermidis* je glavni stanovnik kože, pa u nekim područjima predstavlja i do 90% prisutne aerobne flore. Sluznica nosa i međica su uobičajena mjesta za kolonizaciju s vrstom *S. aureus*, čija prisutnost varira od 10 pa sve do 40% u odraslih osoba. *S. aureus* prevladava i na koži stidnice (67%), a jako je čest izolat na koži pacijenata sa određenim dermatološkim bolestima poput atopijskog dermatitisa.

Anaerobni predstavnici roda *Corynebacterium* najčešće koloniziraju područja bogata žlijezdama lojnicama, pa ih uglavnom nalazimo u području pazuha. Korinebakterije i vrsta *Propionibacterium acnes* se povezuju s patogeneзом akni.

Gram-negativni bacili (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*) nisu učestali stanovnici kožne flore. Njihov broj je daleko veći u gastrointestinalnom sustavu, a na koži naseljavaju vlažnija područja poput pazuha i kože između nožnih prstiju.

Velik broj bakterija koje čine normalnu miklofloru kože su potencijalni patogeni i pri promjeni uvjeta na koži, poput oštećenja površinskog sloja kože (ogrebotine, ubodne rane, opekline i sl.) često izazivaju infekcije (Baron, ured., 1996).

**Tablica 1.** Bakterije koje uobičajeno nastanjuju kožu i sluznice čovjeka

| Bakterijska vrsta  | Koža | Konjuktiva | Nosna sluznica | Vagina |
|--|------|------------|----------------|--------|
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                          | ++   | +          | ++             | ++     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> *                             | +    | +/-        | +              | +/-    |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> *                          | -    | +/-        | +/-            | +/-    |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> *                            | +/-  | +/-        |                | +/-    |
| <i>Neisseria sp.</i>                                       | -    | +          | +              | +      |
| <i>Enterobacteriaceae</i> *<br>( <i>Escherichia coli</i> ) | +/-  | +/-        | +/-            | +      |
| <i>Haemophilus influenzae</i> *                            | -    | +/-        | +              | -      |
| Corynebacteria   | ++   | +          | ++             | +      |
| Mycobacteria   | +    | -          | +/-            | -      |

++ = gotovo 100% prisutna vrsta; + = učestalo prisutna vrsta (oko 25 %);

+/- = rijetko prisutna vrsta (manje od 5%); - = vrsta nije prisutna

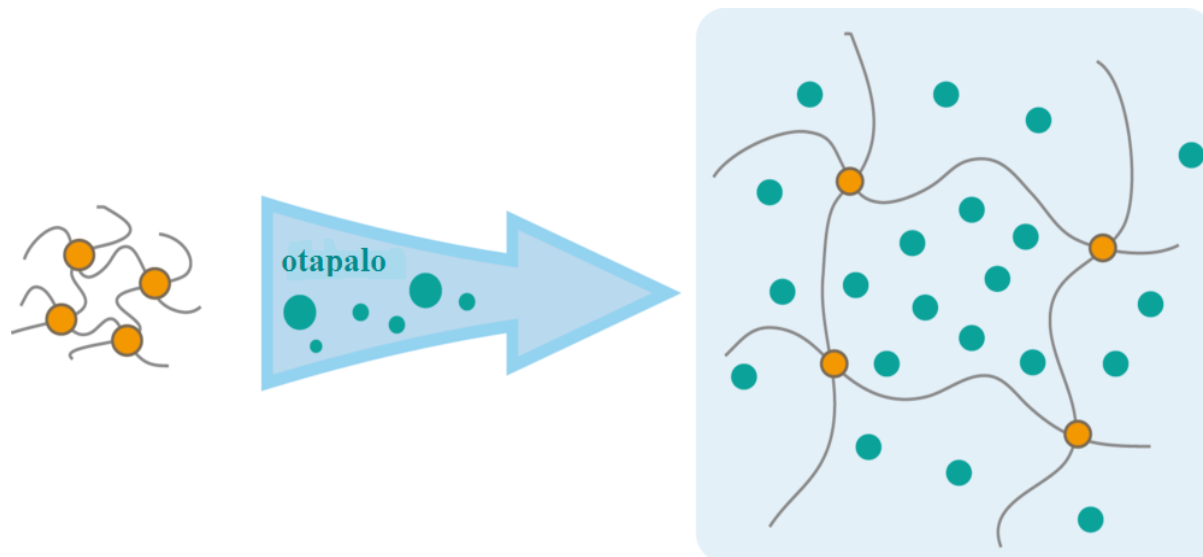
\* = potencijalno patogena vrsta

#### 1.1.4. Liječenje bakterijskih infekcija kože

Većina bakterijskih infekcija kože uzrokovana je aerobnim stafilokokima i streptokokima. Gram-negativni bacili i anaerobi su pak uključeni u komplicirane infekcije. Sistemska terapija s raznovrsnim  $\beta$ -laktamima, makrolidima i linkozamidima (klindamicin) je temelj liječenja ovih infekcija već dugi niz godina. Uz izuzetak mupirocina, lokalna topikalna terapija je slabo zastupljena u odnosu na sistemska. Unatoč pojavi antimikrobne rezistencije kod patogena koji se najčešće povezuju uz bakterijske kožne infekcije (na primjer *Streptococcus pyogenes* i makrolidi; *Staphylococcus aureus* i meticilin, vankomicin, penicilin i mupirocin), terapija je uglavnom uspješna. Noviji antimikrobni lijekovi (linezolid, kvinupristin/dalfopristin, gatifloksacin, gemifloksacin i moksifloksacin) ne pokazuju značajan napredak u odnosu na stariju terapiju (Guay, 2005).

## 1.2.HIDROGELOVI I NJIHOVA TERAPIJSKA PRIMJENA

Hidrogelovi su polukruti oblici nastali bubrenjem hidrofilnih polimera u vodi. Udio vode često je veći od 80% (Gupta i sur., 2002).



**Slika 2.** Shematski prikaz bubrenja hidrogela dodatkom otapala (<http://www.aip.nagoya-u.ac.jp/en/public/nu>)

Polimeri koji stvaraju hidrogelove posjeduju hidrofilne funkcionalne skupine poput amino (-NH<sub>2</sub>), hidroksi (-OH), amidne (CONH-, -CONH<sub>2</sub>) i sulfatne (-SO<sub>3</sub>H) skupine. Upravo su hidrofilne skupine zaslužne za sposobnost apsorpcije vode i vodenih fluida pri čemu dolazi do ekspanzije hidrogela i povećanja volumena koji zauzima (bubrenje). Brzina i stupanj navlačenja vode ovisi o vrsti i broju hidrofilnih skupina, te pH i ionskoj jakosti vodenog medija. Veći broj nabijenih skupina u polimeru povećava stupanj hidratacije.

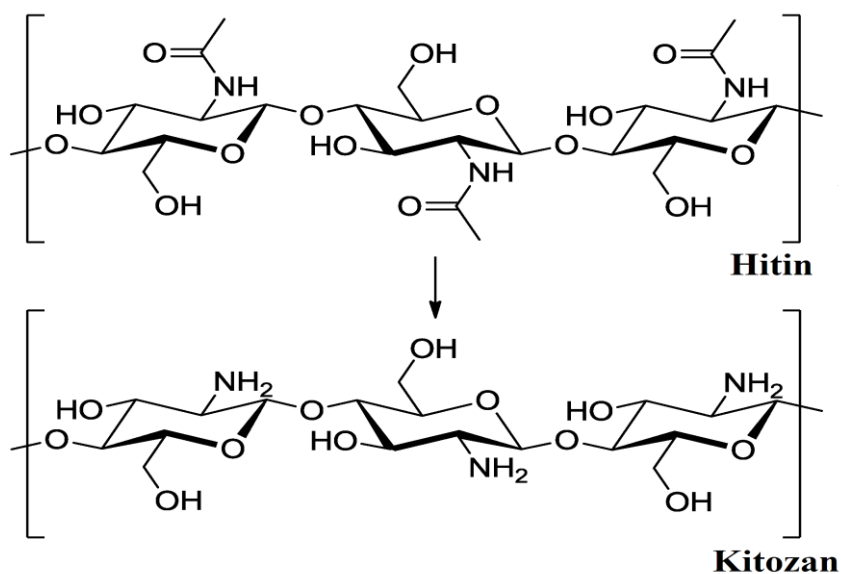
Polimeri se dijele na prirodne ili sintetske. Najčešće korišteni prirodni polimeri su polisaharidi hidrofilne strukture (alginat, celuloza, hitin, kitozan, hijaluronska kiselina, pektin i dr.). Osim polisaharida hidrogelove mogu stvarati i proteini (kolagen, svila, keratin, elastin, želatina i dr.). U pravilu, hidrogelovi građeni od polimera prirodnog porijekla pokazuju veću kompatibilnost s humanim tkivima, te nakon primjene podliježu razgradnji humanim enzimima poput lizozima pri čemu nastaju biokompatibilni razgradni produkti (Ahmadi i sur., 2015).

U usporedbi s drugim biosintetskim materijalima, hidrogelovi značajno nalikuju živom tkivu zbog relativno visokog udjela vode i mekane konzistencije. Mogu pokazivati promjene u bubrenju, mrežastoj strukturi, permeabilnosti i/ili mehaničkim svojstvima kao

odgovor na različite vanjske podražaje, poput promjene temperature ili pH. Usljed takvih promjena u kemijskom ili fizikalnom ponašanju hidrogela dolazi do modificiranog, kontroliranog otpuštanja uklopljenog lijeka (Gupta i sur., 2002).

### 1.2.1. Kitozan

Kitozan je prirodni polimer koji se dobiva alkalnom N-deacetilacijom hitina, visokomolekularnog polisaharida sastavljenog od  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina. Hitin je, nakon celuloze, drugi po učestalosti polimer u prirodi. Glavna je građevna jedinica egzoskeleta morskih člankonožaca (rakovi, škampi) koji su i glavni komercijalni izvor hitina. Ujedno je i sastavni dio staničnog zida većine gljiva, od kojih su medicinski značajni rodovi *Aspergillus* i *Mucor*.



Slika 3. Struktura hitina i kitozana (<http://www.mdpi.com>)

Kada stupanj deacetilacije hitina dosegne oko 50% on postaje topljiv u kiselom vodenom mediju i takav polimer nazivamo kitozanom. S obzirom da je kitozan slaba baza (pKa=6,5) u kiselom mediju dolazi do protonacije slobodnih amino skupina nastalih deacetilacijom na C2 poziciji D-glukozamina. Kitozan je jedini kationski polimer prirodnog porijekla, bioadhezivan je i biorazgradiv, a ujedno netoksičan i neimunogen.

Topljivost kitozana ovisi o njegovom stupnju deacetilacije, rasporedu acetilnih grupa duž

glavnog lanca i molekulskej masi. Kitozan je topljiv u razrijeđenim organskim kiselinama (octena, mravlja, jantarna, mliječna i jabučna kiselina), a otapanje i ispitivanje topljivosti se najčešće provodi uz 1% octenu kiselinu (Rinaudo, 2006).

Upotreba kitozana je ograničena zbog netopljivosti u samoj vodi, visoke viskoznosti i tendencije da koagulira s proteinima pri visokom pH. Općenito povećanje temperature uzrokuje smanjenje viskoznosti otopine/gela (Rabea i sur., 2003).

Svojstva kitozana moguće je poboljšati modifikacijama reaktivne amino skupine na C2 poziciji D-glukozamina. Uvođenjem specifičnih funkcionalnih skupina dizajniraju se polimeri različitih svojstava za određenu primjenu (Rinaudo, 2006). Kitozan se koristi kao antimikrobni spoj u agronomiji, sredstvo flokulacije u pročišćavanju otpadnih voda, aditiv u prehrambenoj industriji, sredstvo hidratacije u kozmetičkim pripravcima, a ima i raznoliku primjenu u biomedicini (Tablica 2).

**Tablica 2.** Različita područja primjene kitozana

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>Agronomija</b>                 | Poboljšanje obrambenog mehanizma biljaka<br>Stimulacija rasta<br>Zaštita sjemena i zaštita od smrzavanja                                      |
| <b>Voda i zbrinjavanje otpada</b> | Flokulant u procesu pročišćavanja<br>Uklanjanje metalnih iona<br>Neutralizacija mirisa<br>Ekološki polimer                                    |
| <b>Prehrana</b>                   | Dijetetsko vlakno<br>Vežanje lipida (smanjuje kolesterol)<br>Stvaranje antifungalnog i antibakterijskog filma na voću<br>Konzervans           |
| <b>Kozmetika</b>                  | Zadržavanje vlažnosti kože<br>Tretman akni<br>Proizvodi za kosu (poboljšava podatnost i smanjuje statički elektricitet)<br>Oralna njega       |
| <b>Biofarmaceutici</b>            | Imunološke i antitumorske formulacije<br>Hemostatski činitelj i antikoagulans<br>Zacjelivanje rana (traume tkiva, opekline)<br>Bakteriostatik |

### **1.2.2. Antimikrobna svojstva kitozana**

Pretpostavlja se da je antimikrobni učinak kitozana rezultat više različitih mehanizama djelovanja. Primjerice, stanična stijenka Gram-pozitivnih bakterija sadrži teikoičnu kiselinu koja je nositelj negativnog naboja, pa pozitivno nabijene kitozanske molekule stupaju u interakcije sa negativno nabijenom staničnom stijenkom pri čemu dolazi do promjene permeabilnosti stijenke i curenja unutarstaničnog sadržaja. Kitozan također djeluje i kao kelirajući agens koji selektivno veže metale u tragovima i na taj način inhibira produkciju toksina i mikrobnog rast. Vežanjem na DNA i inhibicijom sinteze mRNA mikroorganizama ometa sintezu proteina, odnosno rast i razmnožavanje bakterija i gljivica. Osim na mikroorganizme kitozan može djelovati i na domaćina aktivirajući obrambene procese u tkivima, npr. inhibira različite enzime.

Treba napomenuti da kitozan pokazuje antimikrobni učinak samo u kiselom mediju zbog slabe topljivosti kod pH većeg od 6,5. Pokazalo se da stupanj deacetilacije polimera i njegova molekulska masa također utječu na antimikrobni učinak (Rabea i sur., 2003).

### **1.2.3. Farmaceutska primjena kitozanskih hidrogelova**

Kitozanski hidrogelovi su polučvrsti farmaceutski pripravci koji se zbog svog omekšavajućeg i zaštitnog učinka na kožu najčešće istražuju kao nosači za dermalnu primjenu lijekova. Međutim, njihova primjena nije ograničena samo na kožu već su to sustavi i za oralnu, nazalnu, bukalnu, rektalnu, vaginalnu i okularnu primjenu lijekova (Gupta i sur., 2002).

Raznolike mogućnosti primjene posljedica su bioadhezivnosti i biokompatibilnosti ovih hidrogelova. Mukoadhezivnost kitozanskih hidrogelova je veoma važno svojstvo koje posjeduju jer omogućava veću apsorpciju lijekova primjenjenih na sluznice. Primjerice, pH-osjetljivi kitozanski hidrogelovi predstavljaju iznimno prikladne nosače za ciljanu dostavu lijekova u gastrointestinalnom sustavu. Kod okularne primjene lijekova je često potrebno povećati vrijeme zadržavanja samog pripravka u/na oku kako bi se postigla željena biodostupnost lijeka, a termo-osjetljivi kitozanski hidrogelovi mogu omogućiti duži kontakt lijeka s okom i uspješno se koriste u kontroli okularne hipertenzije (kitozanski gel s latanoprostom). Kitozanski hidrogelovi mogu prodrijeti kroz čvrste spojeve mukoznih stanica i na taj način povećati transport lijeka kroz sluznicu. Ovo svojstvo je posebno zanimljivo kod nazalne primjene lijekova i pokazuje obećavajuće rezultate u razvoju formulacija za primjenu



cjepiva i peptidnih lijekova koji nisu prikladni za oralnu primjenu. Kitozanski hidrogelovi nastaju otapanjem kitozana u razrijeđenim organskim kiselinama, pa su nakon procesa bubrenja kiselih svojstava. Kao takvi bi mogli biti zanimljivi u razvoju formulacija za vaginalnu primjenu lijekova (pH vaginalne sluznice kod zdravih žena fertile dobi se kreće od 3,8-4,2). Pokazalo se da kitozanski hidrogelovi namijenjeni topikalnoj primjeni na kožu poboljšavaju zacjeljivanje rana i smanjuju upalu. Naime, vezanje N-acetil-D-glukoamina na receptore povećava aktivnost makrofaga i aktivira sustav komplementa (Ahmadi i sur., 2015).

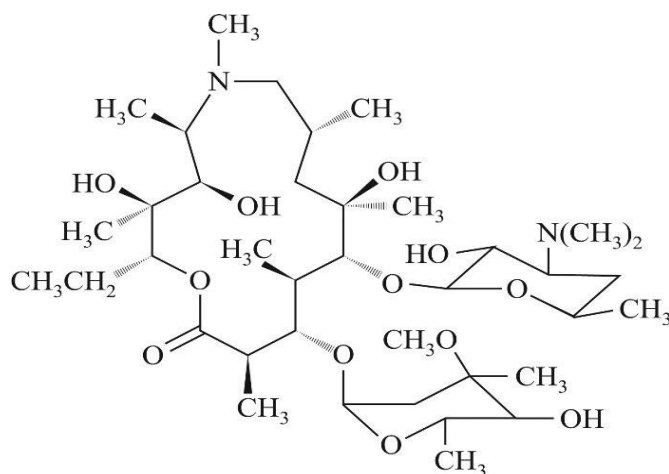
Istraživanja su pokazala da visokomolekulski kitozan s većim stupnjem deacetilacije pokazuje bolji učinak na zacjeljivanje rana od niskomolekulskog i srednjemolekulskog kitozana (Alsarra, 2009).

Zbog svoje biokompatibilnosti i biorazgradivosti kitozanski hidrogelovi se koriste i kao materijali pri rekonstrukciji tkiva (Ahmadi i sur., 2015).

### 1.3 AZITROMICIN

Azitromicin je polusintetski makrolidni antibiotik iz skupine azalida. To je bijeli, amorfni prah, bez mirisa, gorkog okusa, slabo topljiv u vodi. Molekulska formula azitromicina je  $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ , a molekulska masa (Mr) iznosi 748,98. Razvijen je po uzoru na eritromicin A, no za razliku od 14-eročlanog prstena eritromicina osnovni makrolidni prsten azitromicina sadrži 15 članova. Proširenje je postignuto uvođenjem dodatnoga metiliranog atoma dušika na položaj 9a laktonskog prstena eritromicina koji je važan za posebna farmakokinetička i farmakodinamska svojstva lijeka.

Mehanizam antibakterijskog djelovanja je vezanje na 50S podjedinicu ribosoma bakterija. Dijeli isto vezno mjesto s eritromicinom, no azitromicin ima veći afinitet vezanja za ribosom. Vezanjem inhibira aktivnost peptidil transferaze i onemogućava translokaciju aminokiselina tijekom procesa translacije, čime je spriječena sinteza proteina bakterijske stanice ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)).



**Slika 4.** Strukturna formula azitromicina (<http://www.enciklopedija.hr>)

#### 1.3.1. Farmakokinetika azitromicina

Apsorpcija azitromicina iz gastrointestinalnog trakta nakon peroralne primjene brza je i apsolutna bioraspoloživost azitromicina kreće se između 35%-52%. Za ovakvu bioraspoloživost azitromicina odgovorna je nepotpuna apsorpcija iz gastrointestinalnog sustava, a ne razgradnja u kiselom mediju želuca ili fenomen prvog prolaza kroz jetru.

Maksimalna koncentracija u plazmi nakon peroralne primjene, bilo u obliku tableta ili sirupa, postiže se za oko 2 sata, a iznosi 5 µg/mL nakon primjene u dozi od 500 mg.

Azitromicin se raspodjeljuje u gotovo sva tkiva i tjelesne tekućine, a zbog svojstva bazičnosti nakuplja se intracelularno, u kiselom mediju lizosoma. Za tkivnu distribuciju azitromicina i intracelularno nakupljanje odgovorna je kemijska struktura azitromicina kod koje je u laktonski prsten umetnut metilirani dušik (slika 4). Azitromicin vrlo brzo ulazi u stanice i kako raste kiselost pojedinih staničnih prostora tako je koncentracija azitromicina viša, pri čemu zahvaljujući većoj disocijaciji, dolazi do tzv. "ion trappinga" s konačno najvišom koncentracijom lijeka u lizosomima.

Omjer intracelularne prema ekstracelularnoj koncentraciji ovisi o vremenu. Nakon 1 sat koncentracija azitromicina intracelularno i do 30 puta je viša od ekstracelularne, a zahvaljujući kumulaciji i "ion trapping" fenomenu, u 24 sata ovaj je omjer intracelularne prema ekstracelularnoj koncentraciji i do 200.

Za klinički učinak azitromicina od posebne je važnosti da se koncentrira u fagocitima, uključujući polimorfonukleare, monocite, makrofage i fibroblaste. Postupno otpuštanje azitromicina iz fagocita ubrzano je pri kontaktu fagocita i uzročnika infekcije, dok fibroblasti služe kao rezervoar azitromicina koji se postupno otpušta i transportira fagocitima na mjesto upale. Azitromicin ne inhibira niti stimulira citokrom P-450, što znači da ne stupa u interakcije s lijekovima koji se metaboliziraju ovim enzimatskim sustavom (Francetić, 2008).

### **1.3.2. Djelovanje i primjena azitromicina**

Za razliku od ostalih makrolida azitromicin dobro djeluje na neke enterobakterije uključujući salmonele i šigele. Također djeluje i na atipične mikobakterije, a zbog svojih farmakokinetičkih svojstava ima jako dobar učinak na većinu unutarstaničnih uzročnika infekcije. Vrlo se sporo eliminira iz organizma ( $t_{1/2}$  oko 70 sati) zbog čega je trajanje terapije skraćeno na 3 dana kod većine infekcija (faringitis, pneumonija i dr.), a kod liječenja spolno prenosivih bolesti često se primjenjuje i jednokratno u dozi od 1 grama. Trodnevna terapija azitromicinom ima isti terapijski efekt kao i liječenje istog sindroma penicilinom 10 dana.

Azitromicin se koristi u liječenju infekcija dišnog sustava, kože i mekih tkiva, spolno prenosivih bolesti uzrokovanih vrstom *Chlamydia trachomatis*, uropatogenim mikoplazmama i *Neisseria gonorrhoeae*, kroničnog migrirajućeg eritema, ulkusne bolesti, te atipičnih mikobakterioza u HIV-pozitivnih bolesnika (Francetić i sur., 2010).

U Hrvatskoj su registrirani različiti oblici za oralnu (filmom obložene tablete, kapsule, prašak i granule s produljenim oslobađanjem za oralne suspenzije), parenteralnu (prašak za infuzijsku otopinu) i okularnu primjenu (kapi) ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

Zbog širokog spektra djelovanja i relativno male opasnosti izazivanja neželjenih učinaka često se propisuje, pa postoji povećan rizik od razvoja rezistentnih sojeva uzročnika infekcija na koje azitromicin djeluje (Francetić i sur., 2010).

#### 1.4. *IN VITRO* ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA LIJEKA PRIMJENOM FRANZ-DIFUZIJSKE ČELIJE

Bilo da je lijek namijenjen dermalnoj ili transdermalnoj primjeni, djelatna tvar se mora osloboditi iz podloge i prodrijeti kroz *stratum corneum*. *In vitro* ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz formulacije jedna je od standardnih metoda kojima se kontrolira kvaliteta proizvoda od laboratorijske do proizvodne faze. Ispitivanja oslobađanja daju informacije o svojstvima polučvrstih ljekovitih oblika kao što su topljivost i veličina čestica djelatne tvari, viskoznost i sl. (Ueda i sur., 2009).

Upotreba *in vitro* difuzijskih ćelija razvila se u najčešće korištenu metodu za procjenjivanje permeabilnosti lijeka iz različitih formulacija kroz kožu i sluznice (Ng i sur, 2010).

Franz-difuzijska ćelija (Slika 5) se sastoji od donorskog i receptorskog odjeljka između kojih je membrana. Na inertnu, polupropusnu membranu nanosi se uzorak u tankom sloju. Membrana tako razdvaja uzorak od receptorskog medija u kojem djelatna tvar mora biti dobro topljiva, a ostale sastavnice formulacije minimalno topljive. Za ispitivanja *in vitro* oslobađanja lijeka koriste se polimerne membrane, najčešće sintetičke membrane od polisulfona, te membrane iz miješanih estera celuloznog acetata i nitrata. Uzorci medija uzimaju se u definiranim vremenskim razmacima. Nakon uzimanja određenog volumena alikvota uzorka, receptorski odjeljak nadopunjuje se ekvivalentnim volumenom svježeg termostatiranog receptorskog medija ([www.particlesciences.com](http://www.particlesciences.com)).



**Slika 5.** Franz difuzijska ćelija (<http://www.particlesciences.com>)

Receptorski odjeljak ima točno određen volumen i otvor za uzimanje uzoraka. Potrebno je da receptorski medij ima kontroliranu temperaturu i da se konstantno miješa tijekom izvođenja eksperimenta. Obično se zagrijava na 37°C kako bi se na površini membrane postigla temperatura od  $32\pm 1^\circ\text{C}$ . Budući da je fiziološka temperatura na površini kože 32°C, na taj se način oponašaju *in vivo* uvjeti, pri čemu bi i receptorski medij trebao imati fiziološki pH. Stabilnost lijeka u receptorskom mediju treba biti osigurana tijekom *in vitro* ispitivanja, ali i kasnijih mjerenja (Bartosova i Bajgar, 2012).

Izbor receptorskog medija ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima samog lijeka i o tipu difuzijske ćelije. Kao prvi zadatak u tom izboru, nameće se ispitivanje topljivosti lijeka u nekoliko otapala (npr. voda, fosfatni pufer ili vodeno-alkoholne smjese) kako bi se identificirala otapala koja će pružiti uvjete osigurane topljivosti i spriječiti eventualno taloženje lijeka. Uvjeti osigurane topljivosti prema Europskoj farmakopeji su postignuti kada je volumen otapala takav da će maksimalna postignuta koncentracija u receptorskom mediju biti barem tri puta manja od koncentracije zasićene otopine lijeka. Receptorski medij izbora za lipofilne lijekove je obično vodeni medij s dodatkom tvari za povećanje topljivosti (npr. etanol), a za hidrofilne lijekove puferi ([www.particlesciences.com](http://www.particlesciences.com)).

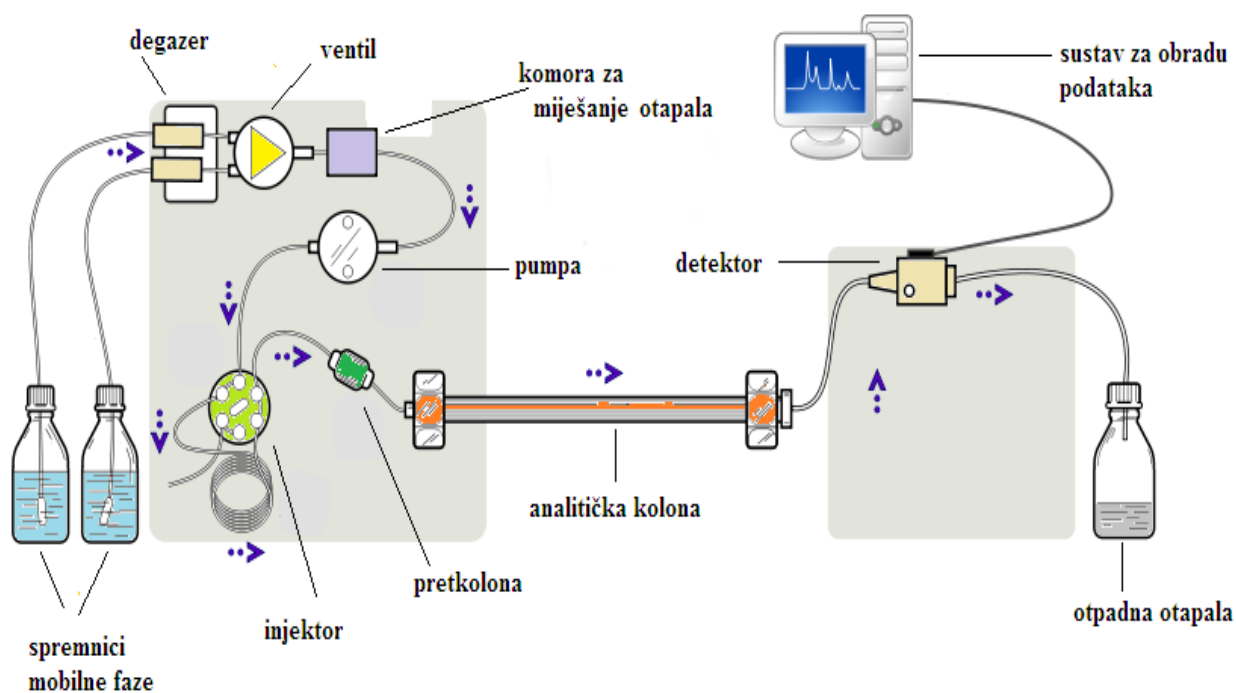
#### **1.4.1. Određivanje koncentracije oslobođenog lijeka**

Lijek oslobođen u receptorski medij potrebno je kvantitativno odrediti. Izbor analitičke metode ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka, a uobičajene tehnike su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, *high performance liquid chromatography*), ELISA-testovi i fluorimetrija ([www.permegear.com](http://www.permegear.com)).

Kromatografija je analitička tehnika koja se zasniva na separaciji molekula na temelju razlike u njihovoj kemijskoj strukturi. Općenito, kromatografija uključuje kretanje uzorka nošenog mobilnom fazom kroz sustav preko stacionarne faze, a različit afinitet molekula uzorka prema stacionarnoj fazi u konačnici dovodi do njihovog razdvajanja. Kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti tekuća pokretna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama nepokretne faze noseći sastavnice uzorka.

Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti nepokretne faze, a razlikujemo razdijeljenje između mobilne i stacionarne faze, adsorpciju, ionsku izmjenu, odjeljivanje prema veličini čestica i stereokemijske interakcije, od kojih je razdijeljenje između mobilne i stacionarne faze najčešće korišteni mehanizam odjeljivanja. Razdjelna kromatografija dijeli se na kromatografiju normalnih i obrnutih faza, a 80% svih odjeljivanja ubrajamo u kromatografiju obrnutih faza. Kod kromatografije obrnutih faza nepokretna faza je nepolarna (kemijski modificirana površina silikagela) dok je pokretna faza polarna (npr. voda, metanol, acetonitril). Povećanjem nepolarnosti pokretne faze ubrzavamo eluciju, a polarniji spojevi se eluiraju prvi, dok se oni manje polarni eluiraju kasnije (Nigović, 2014).

HPLC instrument (Slika 6) sastoji se od spremnika pokretne faze, sustava za obradu otapala (*engl. degasser*) koji uklanja otopljene plinove, komore za miješanje otapala, crpke, sustava za unošenje uzorka, pretkolone (zaštita od mehaničkih onečišćenja u uzorku), kolone i detektora koji daje analitički zapis. Tekućina na izlazu iz kromatografa odlazi u spremnik za otpad. Uloga pumpe je stvaranje pritiska, tj. potisne sile koji omogućuje protok mobilne faze kroz kolonu. Otopina uzorka se na kolonu unosi preko injektora, a volumen uzorka se može kretati od 0,1 do 100 ml. Kolona u kojoj se nalazi stacionarna faza čini glavni dio kromatografskog sustava. Odabirom pogodne kombinacije duljine kolone te stacionarne i mobilne faze, može se postići visok stupanj učinkovitosti razdvajanja analita u uzorku. Kolone imaju dugi vijek trajanja, osim ako dođe do oštećenja uslijed primjene izrazito kiselih ili bazičnih otapala ili injektiranja onečišćenih uzoraka. Stoga je sve uzorke prije injektiranja potrebno filtrirati. Tipovi detektora koji se najčešće koriste za detekciju i/ili kvantifikaciju analita u HPLC tehnici su UV-Vis detektor, detektor indeksa refrakcije i detektor fluorescencije (Kupiec, 2004).



**Slika 6.** Shematski prikaz HPLC instrumenta (<http://chemwiki.ucdavis.edu>)

HPLC se koristi za određivanje sadržaja ljekovitih (aktivnih, djelatnih) tvari, praćenje stabilnosti ljekovitih supstancija i dozirnih oblika te određivanje sadržaja sintetskih međuprodukata i razgradnih produkata u dozirnim oblicima. Primjenjuje se za određivanje sadržaja aminokiselina, nukleinskih kiselina i proteina u biološkim tekućinama, za određivanje koeficijenta razdjeljenja i pKa vrijednosti molekula lijeka te vezanja lijeka na proteine (Nigović, 2014).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U današnje vrijeme kožne bolesti predstavljaju rastući problem i svakodnevno utječu na milijune ljudi te postaju znatan ekonomski teret za javno zdravstvo. Bolesti kože, kožnih privjesaka i potkožnog tkiva obuhvaćaju široki niz stanja u rasponu od benignih do po život opasnih bolesti. Terapijski ishodi liječenja ovih bolesti konvencionalnim farmaceutskim pripravcima su često nezadovoljavajući te stoga njihovo uspješno liječenje i dalje predstavlja veliki izazov.

Azitromicin zbog svog širokog spektra djelovanja ima mnogobrojne indikacije za primjenu, među kojima su i infekcije kože i potkožnog tkiva (acne vulgaris, erizipel, erythema migrans, impetigo i piodermija). Azitromicin se danas na tržištu nalazi u ljekovitim oblicima namijenjenim za oralnu, oftalmičku i intravensku primjenu. S obzirom da još uvijek nema prikladnog sustava za dermalnu primjenu ovog antibiotika, ne čudi činjenica da postoji interes za razvoj takve formulacije. Također, ostvarivanjem ciljanog lokalnog djelovanja na mjestu infekcije smanjila bi se učestalost nuspojava vezanih uz sistemsku primjenu i razvoj rezistencije bakterijskih vrsta na ovaj lijek.

Lijek primijenjen na kožu mora prijeći slabo propusnu barijeru rožnatog sloja da bi ostvario željeni učinak. Kako bi se poboljšala dostava lijeka u kožu istražuju se novi terapijski sustavi temeljeni na nanočesticama, te polimeri prikladni za izradu polučvrstih vehikuluma. Jedan od izazova topikalne primjene lijekova uklopljenih u lipidne nanočestice jest kratko vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu primjene. Zbog toga je potrebno koristiti prikladan vehikulum u koji se lijek može uklopiti. Idealna podloga se mora lako nanositi na kožu/sluznice, biti stabilna, homogena i neškodljiva, osigurati oslobađanje lijeka i prikladan pH (Pavelić i sur., 2001).

Ove uvjete zadovoljavaju kitozanski hidrogelovi, koji osim svoje biokompatibilnosti i neimunogenosti posjeduju i izvjesna antimikrobna svojstva (Rinaudo, 2006).

Cilj ovog istraživanja bio je pripremiti i usporediti kitozanske hidrogelove s različitim udjelom kitozana kao potencijalno prikladne podloge za lokalnu dermalnu primjenu azitromicina. Ispitivanjem oslobađanja lijeka iz hidrogelova moglo bi se zaključiti koja je od ispitivanih formulacija pogodna za daljnja ispitivanja s ciljem razvoja sustava za dermalnu primjenu azitromicina. Pritom je pH gelova optimiziran kako bi se omogućilo uklapanje i različitih liposomskih formulacija s azitromicinom u gel tijekom daljnjih istraživanja (pH 6).

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. MATERIJALI

Instrumenti i pribor:

- ❖ celuloza-nitratne membrane 0,2 µm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ filteri veličine pora 0,22 µm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka)
- ❖ filteri veličine pora 0,45 µm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka)
- ❖ Franz difuzijska ćelija (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ pH metar (Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska)
- ❖ ultrazvučna kupelj (Branson 1210, Emerson, SAD)
- ❖ HPLC instrument (Shimadzu LC-10AD, Kyoto, Japan)
- ❖ kolona za HPLC (Kinetex, Phenomenex, SAD)

Kemikalije:

- ❖ acetonitril (Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Nizozemska)
- ❖ 96% etanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ azitromicin (PLIVA Hrvatska Ltd., Zagreb, Hrvatska)
- ❖ fosfatni pufer 0,01 M, pH 7,5
- ❖ glicerol (T.T.T.doo, Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- ❖ niskomolekulski kitozan (Sigma-Aldrich, SAD)
- ❖ srednjemolekulski kitozan (Sigma-Aldrich, SAD)
- ❖ visokomolekulski kitozan (Fluka, SAD)
- ❖ trietanolamin 50% (w/w) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ ledena octena kiselina (Alkaloid, Skopje)

Fosfatni pufer (0,01 mol/L) pripremljen je otapanjem 1,3609 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u destiliranoj vodi, u tikvici od 1000 mL. pH otopine podešen je na 7,5 pažljivom titracijom s 10M KOH (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Octena kiselina koncentracije 2,5% 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 kitozanskih hidrogelova

Tijekom ovog istraživanja izrađeni su kitozanski hidrogelovi koristeći kitozan različitih molekulskih masa ( $M_r$ ): niskomolekulski (*low molecular weight*, LMW), srednjemolekulski (*medium molecular weight*, MMW) i visokomolekulski (*high molecular weight*, HMW) kitozan. Pripremljene su formulacije s udjelom kitozana (w/w) u rasponu 1-6%. Svi izrađeni gelovi su sadržavali 10% (w/w) glicerola, a razlikovali su se prema metodi izrade i udjelu vode, odnosno octene kiseline. Korištene su tri metode pripreme hidrogelova:

- **Metoda A:** Prvo je odvagan glicerol kao najviskozija komponenta, zatim octena kiselina (2,5%) te kitozan. Sastojci su miješani ručno staklenim štapićem nekoliko minuta kako bi se pospješilo otapanje kitozana. Na kraju je u pripravak umiješana propisana količina destilirane vode.
- **Metoda B:** Prvo je odvagan glicerol kao najviskozija komponenta, zatim octena kiselina (2,5%) i potom voda. Kitozan je dodan na kraju i svi sastojci su miješani ručno staklenim štapićem nekoliko minuta kako bi se pospješilo otapanje kitozana.
- **Metoda C:** Kitozan je umiješan u octenu kiselinu (2,5%) , te je na kraju dodan glicerol. Sastojci su miješani ručno staklenim štapićem nekoliko minuta kako bi se pospješilo otapanje kitozana.

Gelovi izrađeni metodom A i B sadržavali su vodu i octenu kiselinu u omjeru 50:50 (v/v), što znači da je kitozan zapravo otapan u 1,25%-tnoj kiselini. Svi pripremljeni gelovi (A, B i C metodom) su nakon miješanja komponenti sonicirani 30 minuta na ultrazvučnoj vodenoj kupelji da u potpunosti izbubre. Nakon bubrenja su podvrgnuti degaziranju na vodenoj kupelji kroz 30-60 minuta. Zrak je iz gelova, ovisno koncentraciji kitozana i viskoznosti gel, uklanjan i centrifugiranjem (5 min, 3500 okretaja/min).

#### *Ispitivanje topljivosti kitozana*

Za preliminarno ispitivanje topljivosti kitozana pripremljeno je po 10 g 2,5% visokomolekulskog kitozanskog gela s tri različita udjela octene kiseline. Svaki gel je pripremljen A i B metodom.

- Ispitivanje topljivosti u 1,25%-tnoj octenoj kiselini:  
gel je izrađen od 1 g glicerola, 0,25 g kitozana, 4,35 g vode i 4,35 g octene kiseline
- Ispitivanje topljivosti u 0,6%-tnoj octenoj kiselini:  
gel je izrađen od 1 g glicerola, 0,25 g kitozana, 6,5 g vode i 2,2 g octene kiseline.
- Ispitivanje topljivosti u 0,3 % octenoj kiselini:  
gel je izrađen od 1 g glicerola, 0,25 g kitozana, 7,6 g vode i 1,1 g octene kiseline

Pokazano je da se kitozan sporije i teže otapa što je udio organske kiseline (octene) manji. Stoga je 1,25% octena kiselina odabrana kao optimalno otapalo za izradu kitozanskih gelova u ovom istraživanju, pri čemu je otapanje kitozana i bubrenje gelova zadovoljavajuće, a udio organske kiseline u gelu što manji zbog postizanja odgovarajućeg pH gelova.

**Tablica 3.** Kitozanski gelovi izrađeni tijekom istraživanja

| Mr kitozana | Udio kitozana u gelu (%) | Metoda priprave |
|-------------|--------------------------|-----------------|
| <b>LMW</b>  | 3,5                      | C               |
| <b>MMW</b>  | 1,5                      | A               |
|             | 2,0                      | A               |
|             | 2,5                      | A, B            |
|             | 3,5                      | A, C            |
|             | 6,0                      | A,C             |
| <b>HMW</b>  | 1,0                      | A               |
|             | 1,5                      | A               |
|             | 2,0                      | A               |
|             | 2,5                      | A, B            |
|             | 3,5                      | A, C            |
|             | 5,0                      | A, C            |

*LMW-niskomolekulski kitozan, MMW-srednjemolekulski kitozan, HMW-visikomolekulski kitozan*

### 3.2.2. Optimiziranje pH kitozanskih hidrogelova

Nakon izrade gelova svakom gelu je izmjeren pH korištenjem pH metra s pH elektrodom za polučvrste pripravke. Gelovi pH vrijednosti u ciljanom rasponu 5,8 - 6,2 dobiveni su dodatkom odgovarajuće količine trietanolamina u sustav. Trietanolamin (50%, w/w) je dodavan mikropipetom u malim obrocima po 50  $\mu$ L.

Nakon svakog dodatka trietanolamina gel je dobro izmješšan i izmjeren mu je pH sve do postizanja ciljanih vrijednosti, te su gelovi naknadno degazirani u ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 minuta.

### 3.2.3. Priprava kitozanskih gelova s azitromicinom za *in vitro* ispitivanje

Pripravljeno je 10 ml otopine azitromicina koncentracije 3 mg/ml sljedećim postupkom: u odmjernu tikvicu od 10 ml odvagane se 30 mg azitromicina i doda 5 ml apsolutnog etanola. Nakon što se azitromicin soniciranjem otopi u etanolu dodaje se 5 ml vode i otopina promiješa.

Kako bi se membrana Franz-difuzijske ćelije prekrila ravnomjernim slojem kitozanskog hidrogela potrebno je oko 1 g gela. Zbog toga je prije svakog *in vitro* ispitivanja na difuzijskoj ćeliji pripravljeno ukupno 2 g uzorka gela koji sadrži 30% (w/w) otopine azitromicina (3 mg/ml). Hidrogel s lijekom izrađen je vaganjem 1,4 g gela u koji je laganim mješanjem dodano 600  $\mu$ L pripravljene otopine azitromicina.

### 3.2.4. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja azitromicina iz kitozanskih gelova

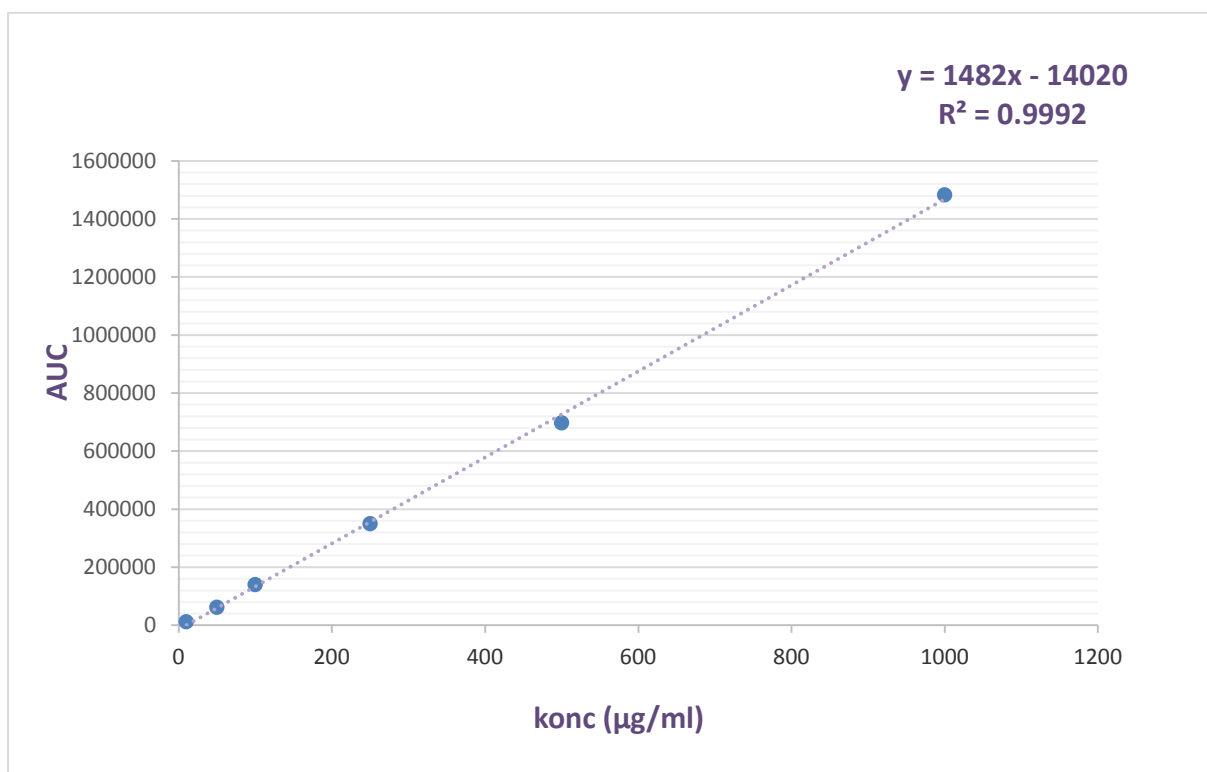
*In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz kitozanskih hidrogelova je provedeno na Franz-difuzijskoj ćeliji. Na prethodno nakvašenu i termostatiranu celuloza-nitratnu membranu, ravnomjerno je nanoseno oko 1 g gela. Kao receptorski medij korištena je smjesa etanola i fosfatnog pufera (5:95, v/v), volumena 16 ml. Alikvoti receptorskog medija uzorkovani su (0,5 ml) tijekom prvih 6 sati u razmacima od 30 minuta, a zadnje uzorkovanje provedeno je 24 h nakon postavljanja eksperimenta. Nakon svakog uzorkovanja, receptorski medij je nadopunjen ekvivalentnom količinom (0,5 ml) svježeg termostatiranog medija, a tijekom eksperimenta kontinuirano je miješan magnetskim mješaćem (50 rpm). Cijeli sustav

je bio termostatiran na 37°C kako bi bila osigurana temperatura od 32°C na površini membrane.

### 3.2.5. Izrada kalibracijskog pravca

Pripremljeno je šest otopina azitromicina različitih koncentracija u metanolu: 10, 50, 100, 250, 500 i 1000 µg/mL. Za svaku je otopinu tri puta kromatografski određena površina ispod krivulje (AUC) pri valnoj duljini od 210 nm.

Pomoću korelacijske analize srednjih aritmetičkih vrijednosti AUC u ovisnosti o koncentraciji lijeka, izrađen je kalibracijski pravac (Slika 7;  $y = \text{AUC}$ , površina ispod krivulje;  $x = c$  (µg/ml), koncentracija lijeka). Dobivena je jednadžba kalibracijskog pravca pomoću koje su određivane koncentracije azitromicina oslobođenog u receptorski medij tijekom ispitivanja oslobađanja na osnovu dobivenih vrijednosti AUC tijekom kvantitativne analize. Linearnost metode izražena je koeficijentom korelacije ( $R = 0,9992$ )



Slika 7. Kalibracijski pravac (otopina azitromicina u metanolu)

### 3.2.6. Određivanje sadržaja azitromicina oslobođenog iz kitozanskih hidrogelova

Za detekciju i određivanje sadržaja azitromicina u uzorcima korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).

Uvjeti kromatografske analize za sve uzorke bili su sljedeći:

- ❖ mobilna faza: acetonitril i fosfatni pufer (0,01 M, pH=7,5) u omjeru 70:30
- ❖ brzina protoka mobilne faze: 1,2 ml/min
- ❖ kolona: C18, reverzno fazna
- ❖ radna temperatura kolone: 40°C
- ❖ valna duljina detekcije: 210 nm
- ❖ vrijeme analize: 5 min

Uzorci su prije injektiranja filtrirani kroz filtere veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$ , a sastavnice mobilne faze degazirane, kako bi se otklonila mogućnost onečišćenja i oštećenja kromatografske kolone. Pomoću izmjerenih površina ispod krivulje i prethodno dobivene jednadžbe kalibracijskog pravca, izračunate su koncentracije oslobođenog lijeka iz svakog pojedinog kitozanskog gela.

Količina azitromicina u alikvotu uzorka ( $\Delta$ ) izračunata je množenjem koncentracije azitromicina ( $\mu\text{g/ml}$ ) u prikupljenom uzorku i volumena uzorka (0,5 ml). Količina azitromicina u cijelom receptorskom mediju je dobivena umnoškom koncentracije azitromicina u 0,5 mL uzorka i ukupnog volumena receptorskog medija (16 ml). Potom je izračunata kumulativna količina oslobođenog azitromicina u receptorskom mediju (Q). Kumulativni udio (%) oslobođenog azitromicina dobiven je iz omjera kumulativne količine (Q) azitromicina u receptorskom mediju i sadržaja azitromicina u testiranim gelovima.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. KARAKTERIZACIJA KITOZANSKIH HIDROGELOVA

Najčešće razmatrana reološka veličina je viskoznost. Viskoznost je svojstvo tekućina kojim se iskazuje njihova otpornost tečenju pa prema tome tekućine visoke viskoznosti teku sporo, a tekućine niske viskoznosti teku brzo. Viskoznost polučvrstih formulacija je važno svojstvo u njihovom razvoju jer direktno utječe na brzinu difuzije djelatne tvari iz pripravka. Osim toga utječe i na nanošenje lijeka i ustrajnost u terapiji, a time i na dostavu lijeka na mjesto djelovanja.

Tijekom ovog istraživanja, zbog objektivnih okolnosti, nije bilo moguće provesti instrumentalnu viskozimetrijsku karakterizaciju testiranih kitozanskih hidrogelova. Međutim, u ovom radu su opisana reološka svojstva kitozanskih gelova uočena empirijskim promatranjem gelova tijekom njihove pripreme i ispitivanja. Naime, budući da je pripremljen veći broj formulacija različitog sastava i svojstava, opservacijskom procjenom reoloških svojstava pripravaka, donešeni su određeni zaključci o ponašanju hidrogelova korisni za daljnje istraživanje.

Polazeći od pretpostavke da bi se dodatkom otopine lijeka u sustav mogla potencijalno smanjiti viskoznost hidrogela, formulacije pripremljene na početku istraživanja su sadržavale veći udio (w/w) kitozana: 3,5%, 5% i 6% (gelovi su izrađeni metodama A i C opisanim u poglavlju 3.2.1.)

Svi dobiveni gelovi bili su homogeni, lagano žućkaste boje i providni. Pokazalo se da viskoznost gelova raste s porastom udjela kitozana u pripravku, pa je tako izrađeni 6%-tni gel (MMW) pokazao najveću viskoznost, te se teže degazirao od gelova manje koncentracije kitozana. Gel pripremljen s niskomolekulskim kitozonom (3,5%-tni LMW) je pokazao najmanju viskoznost.

Kako je opisano u poglavlju 3.2.1 kitozanski hidrogelovi izrađivani su s 1,25%-tnom octenom kiselinom kako bi početni pH pripravka bio što bliži željenom pH 6. Iako je ispitana mogućnost pripreme gela i s 0,6 i 0,3%-tnom octenom kiselinom pokazalo se da kitozan nije topljiv u takvim sustavima. Iako je topljivost kitozana bila veća u 2,5% octenoj kiselini u odnosu na 1,25%, iz tablice 4 je vidljivo da se kod gelova pripremljenih s 2,5%-tnom octenom kiselinom (metoda C) početni pH kreće od 4,1-4,3 i potrebna je gotovo dvostruka količina trietanolamina za postizanje željenog pH u odnosu na gelove koji sadrže 1,25%



octene kiseline (metoda A i B). Također, uočeno je da s povećanjem pH hidrogelova, odnosno dodatkom trietanolamina u sustav raste viskoznost gelova, budući da se pritom gelovi teže miješaju i degaziraju.

Kod gelova s manjim udjelom kitozana (1,5%-tni HMW i 1,5%-tni MMW) primijećeno je da stajanjem (više od 5 dana) nakon dodatka trietanolamina također dolazi do izvjesnog povećanja viskoznosti.

**Tablica 4.** Ovisnost pH kitozanskih gelova o udjelu kitozana, octene kiseline i trietanolamina

| Vrsta kitozana (Mr) | Udio kitozana u gelu(%) | Metoda izrade | Masa gela (g) | Početni pH | Konačni pH | V (μl) |
|---------------------|-------------------------|---------------|---------------|------------|------------|--------|
| LMW                 | 2,5                     | C             | 10            | 4,27       | 6,04       | 550    |
| MMW                 | 3,5                     | C             | 10            | 4,29       | 6,04       | 550    |
|                     | 2,5                     | A             | 20            | -          | 6,03       | 550    |
|                     | 2,5                     | A             | 30            | 4,60       | 5,58       | 650    |
|                     | 2                       | A             | 20            | -          | 5,91       | 600    |
|                     | 1,5                     | A             | 20            | -          | 5,86       | 700    |
|                     | HMW                     | 1             | A             | 20         | -          | 5,93   |
| 1,5                 |                         | A             | 30            | 4,50       | 5,49       | 850    |
| 2,5                 |                         | A             | 10            | 4,66       | 5,52       | 200    |
| 2,5                 |                         | B             | 10            | 4,69       | 5,89       | 250    |
| 2,5                 |                         | C             | 10            | 4,10       | 5,80       | 650    |

*LMW-niskomolekulski kitozan, MMW-srednjemolekulski kitozan, HMW-visokomolekulski kitozan*

*V (μl)- volumen dodanog trietanolamina (50%, w/w)*

Ispitivanje prikladne viskoznosti gelova za nastavak rada provedeno je tako da je u pripravljene gelove redom umješano 10, 20, 30 i 40 % (m/v) otopine azitromicina (3 mg/ml u otapalu etanol/voda 50:50, v/v). Primijećeno je da ne dolazi do smanjenja viskoznosti kod

hidrogelova, odnosno da kitozanski gelovi imaju veliku sposobnost apsorpcije vode i vodenih fluida bez narušavanja trodimenzionalne strukture gela.

Iz tog razloga su u nastavku istraživanja ispitivani hidrogelovi s manjim udjelom kitozana (1%, 1,5%, 2% i 2,5%-tni gelovi).

Kako bi se provjerila mikrobiološka stabilnost kitozanskih hidrogelova, pripremljeni gelovi bez dodatka azitromicina su skladišteni 2 tjedna na sobnoj temperaturi. Nakon ovog vremenskog perioda nije primijećen mikrobn rast u formulacijama. Za sve formulacije koje su korištene u ispitivanjima također je uočena fizičko-kemijska i mikrobiološka stabilnost tijekom 2 mjeseca skladištenja u hladnjaku na 2-8°C.

S obzirom na prikladnu viskoznost za *in vitro* ispitivanje u konačnici su odabrani gelovi izrađeni s MMW kitozansom u 3 različite koncentracije: 1,5%-tni, 2%-tni i 2,5%-tni gel. Azitromicin je u gelove uklopljen prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.

#### **4.2. IN VITRO ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA AZITROMICINA IZ HIDROGELOVA**

*In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz kitozanskih hidrogelova je provedeno upotrebom Franz-difuzijske ćelije (postupak opisan u poglavlju 3.2.4.). Uzorci prikupljeni tijekom 24 sata su analizirani pomoću HPLC metode. Iz dobivenih vrijednosti površina ispod krivulje i kalibracijskog pravca su izračunati koncentracija (c) i kumulativni udio (%) azitromicina oslobođen tijekom eksperimenta (poglavlje 3.2.6.). Rezultati oslobađanja azitromicina iz srednjemolekulskih kitozanskih hidrogelova su predočeni tablicama 5, 6 i 7. Profili oslobađanja azitromicina uspoređeni su između tri hidrogela kao što je prikazano na slici 8.

**Tablica 5.** *In vitro* oslobađanje azitromicina iz 2,5%-tnog kitozanskog gela (MMW)

| <b>t (min)</b> | <b>c (µg/mL)</b> | <b>Δ (µg)</b> | <b>Q (µg)</b> | <b>%</b>     | <b>SD</b> |
|----------------|------------------|---------------|---------------|--------------|-----------|
| <b>0</b>       | 0.00             | 0             | 0             | <b>0.00</b>  | 0.0       |
| <b>30</b>      | 18.97            | 9.483131      | 303.4602      | <b>26.58</b> | 8.1       |
| <b>60</b>      | 20.80            | 10.40137      | 342.327       | <b>29.97</b> | 9.2       |
| <b>90</b>      | 26.58            | 13.29195      | 445.2268      | <b>38.98</b> | 7.2       |
| <b>120</b>     | 28.00            | 13.9991       | 481.1477      | <b>42.03</b> | 9.5       |
| <b>150</b>     | 28.35            | 14.1742       | 500.75        | <b>43.89</b> | 7.8       |
| <b>180</b>     | 29.59            | 14.79723      | 534.8612      | <b>46.96</b> | 7.1       |
| <b>210</b>     | 29.33            | 14.66588      | 545.4551      | <b>47.98</b> | 6.6       |
| <b>240</b>     | 30.35            | 15.1769       | 576.4737      | <b>50.65</b> | 7.7       |
| <b>270</b>     | 28.93            | 14.46536      | 568.8814      | <b>49.98</b> | 7.4       |
| <b>300</b>     | 28.99            | 14.49606      | 584.3292      | <b>51.33</b> | 7.5       |
| <b>330</b>     | 29.62            | 14.81017      | 608.8765      | <b>53.51</b> | 7.0       |
| <b>360</b>     | 29.82            | 14.91048      | 626.8968      | <b>54.99</b> | 9.0       |
| <b>1440</b>    | 28.98            | 14.48752      | 628.2724      | <b>55.15</b> | 8.0       |

*t (min)* – vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *A* – kromatografski izmjerena površina ispod krivulje; *c (µg/ml)* – koncentracija azitromicina u receptorskom mediju; *Δ (µg)* – količina lijeka u uzorku, *Q (µg)* – kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; % – kumulativni udio oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *V (ml)* – volumen receptorskog medija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ( $n=3$ )

**Tablica 6.** *In vitro* oslobađanje azitromicina iz 2%-tnog kitozanskog gela (MMW)

| <b>t (min)</b> | <b>c (µg/mL)</b> | <b>Δ (µg)</b> | <b>Q (µg)</b> | <b>%</b>     | <b>SD</b> |
|----------------|------------------|---------------|---------------|--------------|-----------|
| <b>0</b>       | 0.00             | 0             | 0             | <b>0.00</b>  | 0.0       |
| <b>30</b>      | 19.79            | 9.895299      | 316.6496      | <b>30.27</b> | 4.4       |
| <b>60</b>      | 23.44            | 11.72042      | 384.9488      | <b>36.75</b> | 4.1       |
| <b>90</b>      | 27.23            | 13.61505      | 457.2972      | <b>43.49</b> | 1.6       |
| <b>120</b>     | 29.56            | 14.78014      | 508.1952      | <b>48.36</b> | 2.2       |
| <b>150</b>     | 31.49            | 15.74663      | 553.9029      | <b>52.72</b> | 3.9       |
| <b>180</b>     | 29.76            | 14.8791       | 541.8889      | <b>51.41</b> | 6.6       |
| <b>210</b>     | 30.79            | 15.39744      | 573.3546      | <b>54.35</b> | 3.3       |
| <b>240</b>     | 29.65            | 14.82647      | 570.4812      | <b>54.13</b> | 2.8       |
| <b>270</b>     | 30.22            | 15.11134      | 594.4233      | <b>56.36</b> | 4.4       |
| <b>300</b>     | 31.77            | 15.88338      | 634.24        | <b>60.07</b> | 4.9       |
| <b>330</b>     | 30.64            | 15.31815      | 632.0361      | <b>59.90</b> | 5.0       |
| <b>360</b>     | 32.43            | 16.21559      | 676.0722      | <b>63.96</b> | 5.9       |
| <b>1440</b>    | 33.56            | 16.77946      | 710.3319      | <b>67.18</b> | 5.9       |

*t (min)* – vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *A* – kromatografski izmjerena površina ispod krivulje; *c (µg/ml)* – koncentracija azitromicina u receptorskom mediju; *Δ (µg)* – količina lijeka u uzorku, *Q (µg)* – kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; % – kumulativni udio oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *V (ml)* – volumen receptorskog medija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ( $n=3$ )

**Tablica 7.** *In vitro* oslobađanje azitromicina iz 1,5%-tnog kitozanskog gela (MMW)

| <b>t (min)</b> | <b>c (µg/mL)</b> | <b>Δ (µg)</b> | <b>Q (µg)</b> | <b>%</b>     | <b>SD</b> |
|----------------|------------------|---------------|---------------|--------------|-----------|
| <b>0</b>       | 0.00             | 0             | 0             | <b>0.00</b>  | 0.0       |
| <b>30</b>      | 23.63            | 11.81292      | 378.0135      | <b>32.48</b> | 4.9       |
| <b>60</b>      | 27.81            | 13.90638      | 456.817       | <b>39.40</b> | 3.8       |
| <b>90</b>      | 32.42            | 16.21221      | 544.5101      | <b>47.11</b> | 2.3       |
| <b>120</b>     | 33.68            | 16.84109      | 580.8465      | <b>50.31</b> | 1.7       |
| <b>150</b>     | 38.20            | 19.09868      | 669.9305      | <b>57.93</b> | 3.3       |
| <b>180</b>     | 40.69            | 20.3443       | 728.8888      | <b>62.79</b> | 7.2       |
| <b>210</b>     | 39.80            | 19.89811      | 734.9551      | <b>63.48</b> | 4.8       |
| <b>240</b>     | 40.19            | 20.097        | 761.2176      | <b>65.63</b> | 6.6       |
| <b>270</b>     | 40.38            | 20.18792      | 784.2242      | <b>67.59</b> | 7.2       |
| <b>300</b>     | 41.66            | 20.82794      | 824.8925      | <b>71.13</b> | 7.0       |
| <b>330</b>     | 42.22            | 21.11134      | 854.7893      | <b>73.74</b> | 6.9       |
| <b>360</b>     | 41.43            | 20.71306      | 863.1557      | <b>74.57</b> | 5.3       |
| <b>1440</b>    | 45.38            | 22.6891       | 947.1022      | <b>82.48</b> | 3.9       |

*t (min)* – vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *A* – kromatografski izmjerena površina ispod krivulje; *c (µg/ml)* – koncentracija azitromicina u receptorskom mediju; *Δ (µg)* – količina lijeka u uzorku, *Q (µg)* – kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *%* – kumulativni udio oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *V (ml)* – volumen receptorskog medija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (*n=2*)

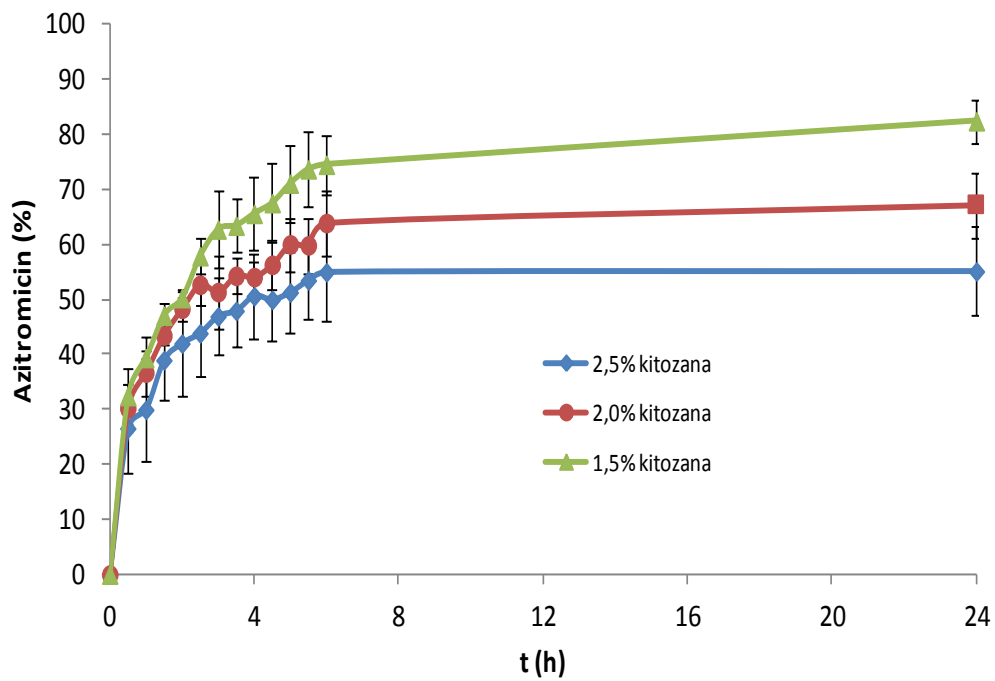
Kod svih ispitivanih kitozanskih hidrogelova uočeno je progresivno povećanje koncentracije oslobođenog azitromicina tijekom prvih 2,5-3 sata, nakon čega dolazi do uspostavljanja platoa. Stvaranje platoa može se objasniti zasićenjem membrane i receptorskog medija nakon određenog vremenskog razdoblja tijekom *in vitro* ispitivanja, tj. uspostavljanja dinamičke ravnoteže između nanesenog uzorka i receptorskog medija.

Azitromicin je u tekućem obliku uklopljen u gel, pa prepreku njegovoj difuziji kroz membranu predstavlja sama mrežasta struktura gela koja je izravno povezana sa viskoznošću gela. Već nakon prvih pola sata eksperimenta udio (%) azitromicina oslobođenog u receptorski medij iznosio je 26-30%. Lijek pasivno difundira kroz membranu i nakuplja se u receptorskom mediju. Ukupni udio azitromicina koji je difundirao kroz membranu nakon 24 sata kretao se od 55% kod 2,5%-tnog gela do 82% kod 1,5%-tnog gela. Očito je da s povećanjem koncentracije kitozana u gelu raste viskoznost gela, a udio oslobođenog lijeka se smanjuje (Tablice 5, 6 i 7).

Na slici 8. sumarno je prikazan sadržaj (%) oslobođenog azitromicina iz 1,5%-tnog, 2%-tnog i 2,5%-tnog srednjemolekulskog kitozanskog gela koji sadrži 30% vodeno-etanolne otopine azitromicina tijekom 24 sata. Profili oslobađanja ova tri gela su jako slični, a oslobađanje lijeka iz gela je najveće kod gela najmanje koncentracije (1,5%).

Kod ispitanih formulacija ne možemo govoriti o produljenom oslobađanju lijeka iz terapijskog sustava. Ipak, kao što je već ranije objašnjeno, formulacije kitozanskih hidrogelova su razvijane s ciljem potencijalnog uklapanja liposomskih preparacija s azitromicinom u gel. Takvi terapijski sustavi mogli bi omogućiti kontrolirano i produženo oslobađanje lijeka, te ujedno i smanjenje učestalosti doziranja pripravka.

Iz svega navedenog može se zaključiti da dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost upotrebe kitozanskih hidrogelova kao podloga za razvoj topikalnih terapijskih sustava za liječenje kožnih oboljenja azitromicinom. No naravno, potrebno je napraviti još brojna ispitivanja poput ispitivanja permeabilnosti, testova stabilnosti, procjene antibakterijske aktivnosti, *in vitro* ispitivanja oslobađanja azitromicina iz liposomskih preparacija i dr. kako bi se potvrdio njihov terapijski potencijal.



**Slika 8.** *In vitro* oslobađanje azitromicina iz hidrogelova različite koncentracije kitozana (MMW)

% - kumulativni udio oslobođenog azitromicina iz hidrogel preparacija s različitim udjelom srednjemolekuskog kitozana

## 5. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenih ispitivanja i obradom dobivenih rezultata, iz ovog je istraživanja moguće izvesti sljedeće zaključke:

- ❖ Kitozanske gelove odgovarajućih svojstava sa sadržajem kitozana od 1-6% moguće je prirediti bubrenjem u razrijeđenoj octenoj kiselini koncentracije 1,25 i 2,5%, pri čemu je koncentracija 1,25% optimalna s obzirom na ciljani pH gelova.
- ❖ Vrijednost pH gelova priređenih otapanjem kitozana u 1,25% octenoj kiselini kreće se u rasponu 4,50-5,50 ovisno o vrsti i koncentraciji kitozana i metodi izrade.
- ❖ Viskoznost gelova raste proporcionalno s porastom udjela kitozana u formulaciji.
- ❖ Ciljani pH dobivenih gelova moguće je optimizirati dodatkom trietanolamina u sustav, pri čemu se povećava viskoznost hidrogelova.
- ❖ Kitozanski hidrogelovi imaju veliku sposobnost apsorpcije vode i vodenih fluida pri čemu ne dolazi do značajnijeg narušavanja trodimenzionalne strukture gela.
- ❖ *In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz kitozanskih hidrogelova s različitim udjelom kitozana pokazalo je da je brzina oslobađanja lijeka najmanja kod 2,5%-tnog gela (najviskozniiji gel), a najveća kod 1,5%-tnog gela (najmanje viskozan od uspoređivanih gelova).
- ❖ Za sve ispitivane gelove ustanovljen je sličan profil oslobađanja azitromicina iz gela karakteriziran brzim oslobađanjem u prvih nekoliko sati i uspostavljanjem platoa nakon 2,5-3 h od postavljanja eksperimenta, koji ukazuje na zasićenje membrane i na relativno brzo postizanje ravnotežnog stanja između donorskog i receptorskog medija.
- ❖ Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost uporabe kitozanskih hidrogelova kao prikladne podloge za liposomske preparacije azitromicina u terapiji kožnih oboljenja.



## 6. LITERATURA

Ahmadi F, Oveisi Z, Samani S.M, Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res Pharm Sci.* 2015, 10(1), 1–16.

Alsarra I, Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, 45, 16–21.

Azithromycin, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00207> , pristupljeno 9.3.2016

Bartosova L, Bajgar J. Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. *Curr Med Chem*, 2012, 19, 4671-4677.

Baza lijekova: Lijekovi s azitromicinom, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 20.4.2016.

Čajkovic M. Kozmetologija. Jastrebarsko, Naklada Slap, 2000, str. 25-67.

Davis C, Normal flora. U: *Medical Microbiology*. 4th edition. Baron S, urednik. Galveston, University of Texas, Dept. of Microbiology and Immunology, 1996, str. 653-684.

Development and validation of in vitro release testing methods for semisolid formulations, 2009., <http://www.particlesciences.com> , pristupljeno 17.02.2016.

Diffusion testing fundamentals, 2012., <http://www.permeagear.com> , pristupljeno 17.02.2016.

Fracetić I i suradnici, *Farmakoterapijski priručnik*, 6.izdanje. Medicinska naklada, Zagreb, 2010, str. 377-379.

Francetić I. Farmakokinetika azitromicina. *Medicus* 2008, 17(2), 9 - 14.

Guay D. Treatment of bacterial skin and skin structure infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2003, 4(8), 1259-1275.

Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. DDT, 2002, 7(10), 569-579.

Igarashi T, Nishino K, Nayar KS. The Appearance of Human Skin. Columbia University, New York, 2005, 11-21.

Kupiec T. Quality – Control Analytical Methods:High-Performance Liquid Chromatography. Int J Pharm Comp, 2004, 8, 223-227.

Mehta R. Topical and Transdermal Drug Delivery: What a Pharmacist Needs to Know. Midwestern University Glendale, Arizona, 2004, 2-7.

Ng SF, Rouse JJ, Sanderson FD, Meidan V, Eccleston GM. Validation of a static franz diffusion cell system for in vitro permeation studies. AAPS PharmSciTech, 2010, 11(3), 1432-1441.

Nigović B, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). U: Analitika lijekova 2. Zagreb, 2014.

Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Schubert R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. Int J Pharm Comp, 2001, 219, 139-149.

Prausnitz M, Langer R. Transdermal drug delivery. Nat Biotechnol., 2008, 26(11), 1261–1268.

Rabea E, Badawy M, Stevens V.C, Smagghe G, Steurbault W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. Biomacromolecules, 2003, 4(6), 1457-1465.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer science, 2006, 31(7), 603-632.

Ueda CT, Shah VP, Derdzinski K, Ewing G, Flynn G, Maibach H, Marques M, Rytting H, Shaw S, Thakker K, Yacobi A. Topical and transdermal drug products. PF, 2009, 35, 750-764

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Cilj ovog rada bila je priprava kitozanskih gelova s uklopljenim azitromicinom te ispitivanje *in vitro* oslobađanja lijeka iz dobivenih formulacija. Uspješan razvoj formulacije omogućio bi dermalnu primjenu azitromicina koji je zbog svog širokog spektra djelovanja često dio oralne terapije bakterijskih kožnih oboljenja. Pripremljeni su hidrogelovi s različitim tipovima kitozana s obzirom na molekulsku masu (niskomolekulski, srednjemolekulski, visokomolekulski), te s različitim udjelima kitozana i različitim udjelima octene kiseline. Provedena je i titracija pH vrijednosti dobivenih gelova kako bi se postigla optimalna pH vrijednost (pH=6). Zbog zadovoljavajućih reoloških svojstava za *in vitro* ispitivanje oslobađanja uklopljenog azitromicina odabran je srednjemolekulski kitozanski gel s 1,5%, 2% i 2,5% kitozana. *In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz hidrogelova u koje je umiješana otopina lijeka (30%, m/m) provedeno je na Franz-difuzijskoj ćeliji tijekom 24 sata. Sadržaj oslobođenog azitromicina određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (high performance liquid chromatography, HPLC). Dobiveni rezultati pokazuju da se najveći udio azitromicina (%) oslobodio iz hidrogela s najmanjim udjelom kitozana (1,5%-tni MMW). Potvrđeno je da je oslobađanje azitromicina iz kitozanskih hidrogelova ovisno o njihovoj viskoznosti koja je određena sadržajem kitozana u gelu i pH vrijednosti gela.

The aim of this study was development and evaluation of chitosan-based hydrogels with azithromycin. Successful development of topical skin formulation would enable dermal application of azithromycin which is, due to its wide range of antibacterial activities, commonly used for the treatment of bacterial skin infections via oral route of administration. Hydrogels containing different types of chitosan (low molecular weight, medium molecular weight and high molecular weight chitosan), different weights of chitosan and different amounts of acetic acid have been prepared. In order to optimize pH of the gels (pH 6) triethanolamin was applied as neutralizing agent. Considering appropriate viscosities of the gel, 1,5%, 2% and 2,5% medium molecular weight chitosan gels were chosen for investigation of the *in vitro* release of azithromycin entrapped in the hydrogels. *In vitro* release studies were performed during 24 h using Franz diffusion cell system. The release of azithromycin from different hydrogels containing 30% of drug solution (3µg/ml) was tested. The amount of the released azithromycin was determined chromatographically (HPLC). The largest amount of azithromycin was released from hydrogel with the lowest chitosan concentration (1,5%). It can be concluded that the release of azithromycin from chitosan hydrogel formulations depends on their viscosity which is directly influenced by chitosan concentration and pH of the gel.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za farmaceutsku tehnologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### IN VITRO ISPITIVANJA OSLOBAĐANJA AZITROMICINA IZ KITOZANSKIH GELOVA

Božena Vuković

#### SAŽETAK

Cilj ovog rada bila je priprava kitozanskih gelova s uklopljenim azitromicinom te ispitivanje *in vitro* oslobađanja lijeka iz dobivenih formulacija. Uspješan razvoj formulacije omogućio bi dermalnu primjenu azitromicina koji je zbog svog širokog spektra djelovanja često dio oralne terapije bakterijskih kožnih oboljenja. Pripremljeni su hidrogelovi s različitim tipovima kitozana s obzirom na molekulsku masu (niskomolekulski, srednjemolekulski, visikomolekulski), te s različitim udjelima kitozana i različitim udjelima octene kiseline. Provedena je i titracija pH vrijednosti dobivenih gelova kako bi se postigla optimalna pH vrijednost (pH=6). Zbog zadovoljavajućih reoloških svojstava za *in vitro* ispitivanje oslobađanja uklopljenog azitromicina odabran je srednjemolekulski kitozanski gel s 1,5%, 2% i 2,5% kitozana. *In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz hidrogelova u koje je umiješana otopina lijeka (30%, m/m) provedeno je na Franz-difuzijskoj ćeliji tijekom 24 sata. Sadržaj oslobođenog azitromicina određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (high performance liquid chromatography, HPLC). Dobiveni rezultati pokazuju da se najveći udio azitromicina (%) oslobodio iz hidrogela s najmanjim udjelom kitozana (1,5%-tni MMW). Potvrđeno je da je oslobađanje azitromicina iz kitozanskih hidrogelova ovisno o njihovoj viskoznosti koja je određena sadržajem kitozana u gelu i pH vrijednosti gela.

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

Rad sadrži: 39 stranica, 8 grafičkih prikaza, 7 tablica i 23 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kitozan, dermalna primjena, azitromicin, *in vitro* oslobađanje

Mentor: **Dr. sc. Željka Vanić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Anita Hafner**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: travanj 2016.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of pharmaceutical technology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### IN VITRO RELEASE STUDIES OF AZITHROMYCIN FROM CHITOSAN GELS

**Božena Vuković**

#### SUMMARY

The aim of this study was development and evaluation of chitosan-based hydrogels with azithromycin. Successful development of topical skin formulation would enable dermal application of azythromycin which is, due to its wide range of antibacterial activities, commonly used for the treatment of bacterial skin infections via oral route of administration. Hydrogels containing different types of chitosan (low molecular weight, medium molecular weight and high molecular weight chitosan), different weights of chitosan and different amounts of acetic acid have been prepared. In order to optimize pH of the gels (pH 6) triethanolamin was applied as neutralizing agent. Considering appropriate viscosities of the gel, 1,5%, 2% and 2,5% medium molecular weight chitosan gels were chosen for investigation of the *in vitro* release of azithromycin entrapped in the hydrogels. *In vitro* release studies were performed during 24 h using Franz diffusion cell system. The release of azithromycin from different hydrogels containing 30% of drug solution (3µg/ml) was tested. The amount of the released azithromycin was determined chromatographically (HPLC). The largest amount of azithromycin was released from hydrogel with the lowest chitosan concentration (1,5%). It can be concluded that the release of azithromycin from chitosan hydrogel formulations depends on their viscosity which is directly influenced by chitosan concentration and pH of the gel.

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

Thesis includes: 39 pages, 8 figures, 7 tables and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: chitosan, dermal application, azythromicin, *in vitro* release

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

Reviewers: **Željka Vanić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Anita Hafner, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2016.