

# Ciklodekstrini u mukoadhezivnim mikročesticama lorazepamima i risperidona

---

Jug, Mario

Doctoral thesis / Disertacija

2006

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:163:961860>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Mario Jug

CIKLODEKSTRINI U MUKOADHEZIVNIM  
MIKROČESTICAMA LORAZEPAMA I RISPERIDONA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2006.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr.sc. Mire Bećirević-Laćan, redovite profesorice na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, u okviru projekta pod nazivom "Terapijski sustavi s nosačima biološki aktivne supstancije" (broj 0006561) Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja znanstvenog stupnja doktora znanosti u znanstvenom području biomedicine i zdravstva, polje farmacija.

*Najtoplije zahvaljujem voditeljici prof. dr. sc. Miri Bećirević-Laćan koja mi je svojim znanjem i savjetima pomogla tijekom izrade i pisanja ovog rada.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Biserki Cetina-Čižmek i mr. sc. Ani Kwokal, Pliva – istraživanje i razvoj d.o.o. na pomoći i korisnim savjetima prilikom termalne (DSC) i spektroskopske (FTIR) karakterizacije pripremljenih kompleksa i mikročestica.*

*Veliko hvala svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta koji su mi na bilo koji način pomogli u radu.*

## KAZALO

1. UVOD.....	1
1.1. Anatomija nosne šupljine.....	2
1.2. Putovi transporta lijeka iz nosne šupljine u središnji živčani sustav.....	6
1.3. Mukoadhezivni polimeri u nazalnoj primjeni lijekova.....	13
1.4. Ciklodekstrini.....	18
1.4.1. Ciklodekstrini kao promotori nazalne apsorpcije lijekova.....	22
1.4.2. Toksični učinak nazalno primijenjenih ciklodekstrina.....	31
1.4.3. Utjecaj ciklodekstrina na oslobađanje lijekova iz polimernih matriksa.....	34
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	37
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	39
3.1. Materijali.....	39
3.2. Metode.....	40
3.2.1. Određivanje konstante stabilnosti kompleksa metodom određivanja topljivosti lijeka utjecajem ciklodekstrina.....	40
3.2.2. Određivanje konstante stabilnosti kompleksa i uspješnosti uklapanja lijeka u vodi utjecajem polimera.....	41
3.2.3. Ispitivanje utjecaja ciklodekstrina na nastajanje interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera u vodenim sustavima različitih pH-vrijednosti....	42
3.2.4. Priprema kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD u čvrstom stanju	42
3.2.5. Priprema interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera u čvrstom stanju	43
3.2.6. Priprema mukoadhezivnih mikročestica risperidona i lorazepama.....	43
3.2.7. Određivanje distribucije veličine čestica.....	44
3.2.8. Određivanje sadržaja lijeka u sustavima.....	45
3.2.9. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC).....	45
3.2.10. Infracrvena spektroskopija s Fourier-ovim transformacijama (FTIR).....	45
3.2.11. Određivanje vrijednosti zeta-potencijala.....	45
3.2.12. Ispitivanje mukoadhezivnosti.....	46
3.2.13. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja risperidona i lorazepama.....	46
3.2.14. <i>In vitro</i> ispitivanje difuzije risperidona i lorazepama.....	49
3.2.15. Statistička obrada podataka.....	50

4. REZULTATI.....	51
4.1. Utjecaj pH-vrijednosti medija na topljivost risperidona i nastajanje inkluzijskog kompleksa s HP- $\beta$ -CD u otopini.....	51
4.2. Utjecaj pH-vrijednosti medija na topljivost lorazepama i nastajanje inkluzijskog kompleksa s HP- $\beta$ -CD u vodi.....	54
4.3. Nastajanje inkluzijskog kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD utjecajem HPMC i karbomera.....	57
4.4. Priprema i karakterizacija kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD u čvrstom stanju.....	61
4.5. Utjecaj ciklodekstrina na nastajanje interpolimernog kompleksa HPMC i kabomera.....	68
4.6. Priprema i karakterizacija mukoadhezivnih mikročestica lorazepama i risperidona.....	72
4.7. Utjecaj mukoadhezivnih polimera i HP- $\beta$ -CD na oslobađanje lijekova iz mikročestica.....	80
4.8. In vitro ispitivanje difuzije lorazepama i risperidona.....	91
4.8.1. Utjecaj HP- $\beta$ -CD na difuziju lorazepama i risperidona.....	91
4.8.2. Utjecaj mukoadhezivnih polimera i HP- $\beta$ -CD na difuziju lorazepama i risperidona iz mikročestica.....	93
5. RASPRAVA.....	98
5.1 Utjecaj pH-vrijednosti medija na topljivost risperidona i nastajanje inkluzijskog kompleksa s HP- $\beta$ -CD u otopini.....	98
5.2. Utjecaj pH-vrijednosti medija na topljivost lorazepama i nastajanje inkluzijskog kompleksa s HP- $\beta$ -CD u vodi.....	105
5.3. Nastajanje inkluzijskog kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD utjecajem HPMC i karbomera.....	107
5.4. Priprema i karakterizacija kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD u čvrstom stanju.....	109
5.5. Utjecaj ciklodekstrina na nastajanje interpolimernog kompleksa HPMC i kabomera.....	115
5.6. Priprema i karakterizacija mukoadhezivnih mikročestica lorazepama i risperidona.....	117

5.7. Utjecaj mukoadhezivnih polimera i HP- $\beta$ -CD na oslobađanje lijekova iz mikročestica.....	122
5.8. In vitro ispitivanje difuzije lorazepama i risperidona.....	127
5.8.1. Utjecaj HP- $\beta$ -CD na permeabilnost lorazepama i risperidona.....	127
5.8.2. Utjecaj HP- $\beta$ -CD i mukoadhezivnih polimera na difuziju lorazepama i risperidona iz mikročestica .....	128
6. ZAKLJUČCI.....	131
7. LITERATURA.....	134
8. SAŽETAK.....	144
9. SUMMARY.....	146
10. ŽIVOTOPIS.....	148
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	149
BASIC DOCUMENTATION CARD.....	150

# **1. UVOD**

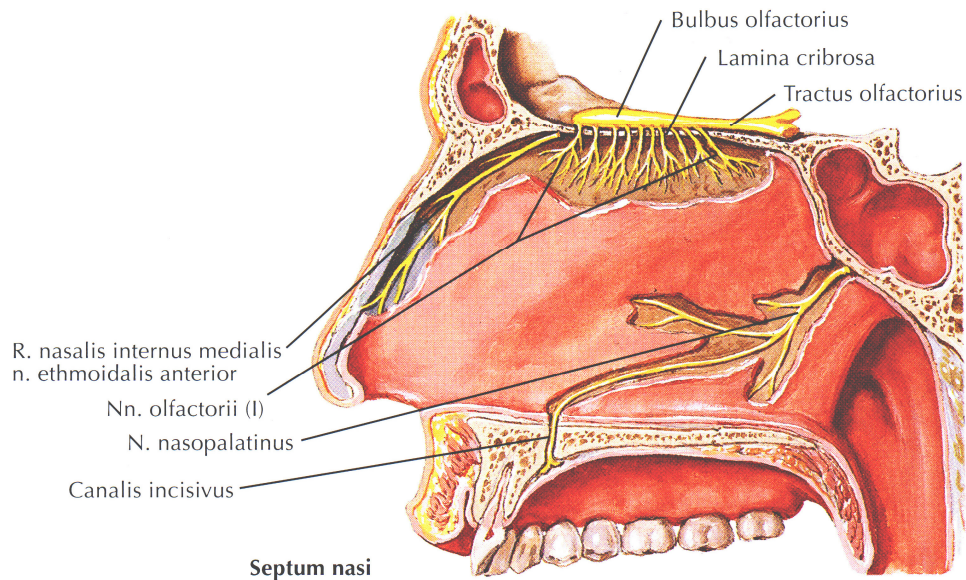


Optimalna farmakoterapija oralnom primjenom lijekova često je ograničena metaboličkom razgradnjom lijeka tijekom prvog prolaska kroz jetru ili u gastrointestinalnom sustavu te nuspojavama uslijed neselektivne distribucije lijeka u organizmu. Stoga je izučavanje alternativnih putova primjene lijeka u centru znanstvenog interesa različitih istraživačkih skupina. Sistemska primjena lijekova putem mukoznih sluznica tijela (bukalna, nazalna, rektalna i vaginalna sluznica) pruža mnoge prednosti u odnosu na oralnu primjenu lijekova. To je neinvazivan način primjene, pa je moguća i automedikacija. Mukozne sluznice tijela su dobro prokrvljene i relativno permeabilne, a apsorpcijom lijeka putem mukoznih sluznica tijela izbjegava se razgradnja molekule lijeka u gastrointestinalnom sustavu i jetri.

Veliki broj lijekova koji svoje farmakološko djelovanje ostvaruju u SŽS su izrazito aktivne molekule, tj. djeluju već u vrlo niskim dozama. Peroralna primjena ovih lijekova je vrlo često povezana s velikim brojem nuspojava te brzom metaboličkom razgradnjom lijeka tijekom prvog prolaska kroz jetru. Odabirom puta primjene kojim bi se mogao ostvariti izravan transport lijeka u cerebrospinalnu tekućinu (CST) i/ili parenhim mozga, mogla bi se smanjiti primijenjena doza lijeka te izbjeci njegovo neželjeno djelovanje.

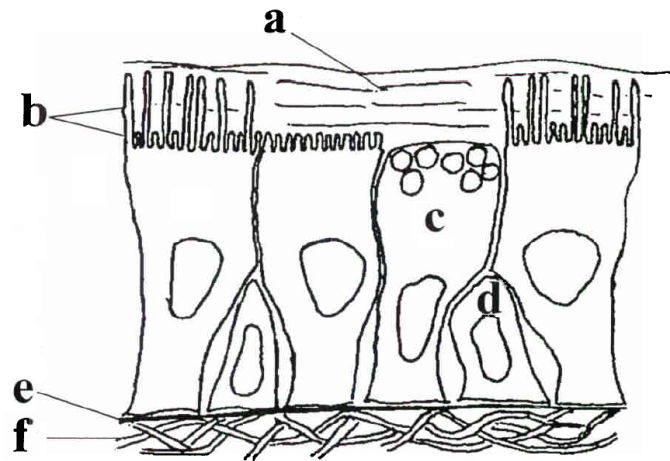
Novija ispitivanja ukazuju na činjenicu da se nazalnom primjenom lijekova može ostvariti izravan transport lijeka u CST i/ili moždano tkivo (Bagger i Bechgaard, 2004; Westin i sur., 2005). Izravna apsorpcija lijeka u CST i/ili moždano tkivo zavisi o molekularnoj veličini te lipofilnosti molekule lijeka. Za male lipofilne molekule utvrđeno je da se vrlo brzo pojavljuju u CST, a omjer koncentracije lijeka u CST i u plazmi je znatno veći nakon nazalne primjene lijeka nego nakon intravenske primjene iste doze lijeka (Illum 2003).

## 1.1. Anatomija nosne šupljine



Slika 1. Shematski prikaz sagitalnog presjeka nosne šupljine čovjeka (Netter, 2003).

U Slici 1. prikazana je građa nosne šupljine čovjeka. Nosne šupljine, lijeva i desna odijeljene su u sredini nosnom pregradom (septum nasi), a otvaraju se sprijeda nosnicama. Površina nosne šupljine iznosi oko  $150 \text{ cm}^2$  a volumen oko 15 ml. Obje nosne šupljine podijeljene su u tri područja: predvorje nosa te respiratorno i olfaktorno područje. Predvorje je prednji, prošireni dio nosne šupljine. Koža s vanjske površine nosa ulazi u nosnice i oblaže prednji dio predvorja. Na unutrašnjoj površini nosa nalaze se žlijezde znojnice i lojnice te kratke, zadebljane dlačice (vibressae), koje imaju ulogu zaustavljanja većih čestica iz udahnutog zraka. U predvorju epitel gubi svoj orožnjeni sloj i na prijelazu u nosne šupljine prelazi u respiratorni epitel (Slika 2.) koji se sastoji od četiri vrste stanica: cilindrične stanice s trepetljikama, čekinjaste stanice, vrčaste te bazalnih stanice.



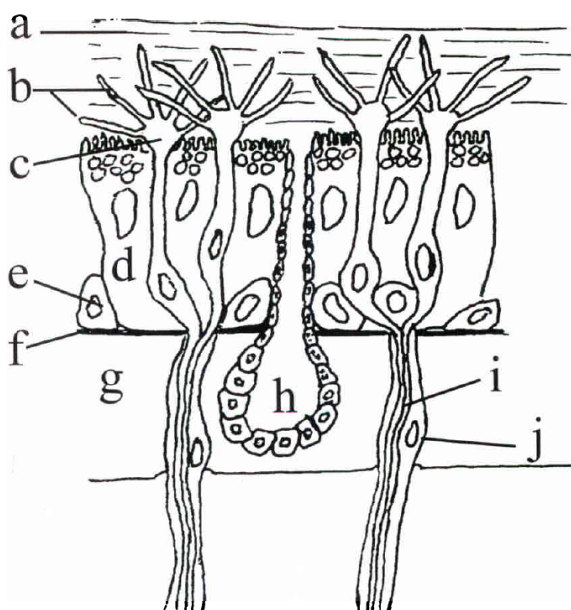
Slika 2. Shematski prikaz građe respiratorne sluznice nosne šupljine: (a) sloj sluzi, (b) cilindrične stanice s trepetljikama, (c) vrčaste stanice, (d) bazalne stanice, (e) bazalna membrana, (f) splet kapilara (Mathison i sur, 1998).

Bazalne stanice su male okrugle stanice koje leže na bazalnoj membrani koja se nalazi iznad laminae propriae, ali se ne protežu do luminalne površine epitela. Otprilike 15-20% površine respiratornih stanica prekriveno je slojem trepetljika dužine 2 – 4  $\mu\text{m}$ , koje se pokreću koordinirano frekvencijom 10-20 Hz (Edsman i Hägerstörn, 2005; Ugwoke i sur., 2005), pomičući sloj mucina po površini sluznice prema ždrijelu. Čekinjaste stanice pokrivene su sa oko 300 mikrovila po stanici koje značajno povećavaju površinu stanica, što olakšava međustanični transport supstancija i vode. Vrčaste stanice nalaze se između cilindričnih stanica te luče sluz (mucus) koja oblaže epitel. Sloj mucina uz površinu stanica je niže viskoznosti, dok je sloj u kojeg su uronjeni vrhovi trepetljika značajno viskozniji.

Epitelne stanice su međusobno vrlo čvrsto povezane međustaničnim spojevima. Čvrsti spojevi (zonula occludens) nalaze se pri samom vrhu stanice. Osnovna funkcija čvrstih spojeva je stvaranje barijere koja sprječava protok tvari između epitelih stanica u bilo kojem smjeru. U respiratornom epitelu postoji još jedna vrsta međustaničnog spoja, a to je zonula adherens. Taj spoj okružuje stanicu poput pojasa, a smatra se da služi povezivanju susjednih stanica. Važna osobina ovog spoja je prisutnost brojnih aktinskih mikrofilamenata koji potječu od završne mrežice koja se nalazi u apikalnom dijelu citoplazme. Smatra se da završna mrežica osigurava određenu čvrstoću vrha stanice. Treća vrsta međustaničnih spojeva u respiratornom epitelu su dezmosomi (macula adherens) koji osiguravaju čvrstu vezu među susjednim stanicama u višeslojnom epitelu.

Čvrsti spojevi ograničavaju permeabilnost molekula s hidrodinamskim radijusom većim od 3.6 Å, a u potpunosti su nepropusni za molekule s hidrodinamskim radijusom većim od 15 Å. Teško je povezati hidrodinamski radijus molekule s njenom molekularnom masom, naročito u slučaju peptida i proteina, jer njihov oblik zavisi o fizikalno-kemijskim karakteristikama medija te o sekundarnoj i tercijarnoj strukturi molekule. Prema literaturnim podacima, transport molekula molekularne mase veće od 100 Da kroz čvrste međustanične spojeve je veoma ograničen (Illum 2003).

Respiratorno područje nosne šupljine je dobro prokrvljeno gustom mrežom kapilara u lamini densi. Arterijska cirkulacija se odvija putem karotidnih arterija, a venska cirkulacija se odvija putem sphenopalatalnog foramena ili putem gornje oftalmičke vene, dok se krv iz prednjih dijelova nosa odvodi putem facijalnih vena.



Slika 3. Shematski prikaz građe olfaktorne sluznice nosne šupljine: (a) sloj mucina, (b) receptorske cilije, (c) olfaktorni neuroni, (d) potporne stanice, (e) bazalne stanice, (f) bazalna membrana, (g) lamina propria, (h) Bowmanova žlijezda, (i) snopovi neurona (fila olfactoria) i (j) Schwannove stanice (Mathison i sur, 1998).

Njušni receptori nalaze se u njušnom (olfaktornom) epitelu, koji prekriva specijalizirani dio sluznice u krovu nosne šupljine (Slika 3.). U čovjeka to područje zauzima površinu oko 10 cm<sup>2</sup>, debljine oko 100 μm. Budući da se olfaktorno područje nalazi iznad puta protoka zraka, mirisi dolaze do osjetilnih receptora procesom difuzije. Postupak udisanja pospješuje difuziju uzrokujući vrtloženje zraka unutar nosne šupljine prema gore, te veći postotak molekula dolazi u kontakt s receptorskim neuronima. Olfaktorni epitel je višeredni cilindrični epitel sastavljen od 3 vrste stanica. Potporne stanice su u gornjem dijelu široke, cilindrične, a prema bazi se sužavaju. Na slobodnoj površini imaju mikrovile uronjene u tekući sloj nastao izlučivanjem mukoznog i seroznog sekreta, koji pokriva cijelu površinu epitela. Dobro razvijeni spojni kompleksi povezuju potporne stanice sa susjednim njušnim stanicama. Bazalne stanice su malene, okrugle i tvore jedan sloj u bazalnom dijelu epitela. Između bazalnih i potpornih stanica nalaze se njušne stanice. To su bipolarni neuroni, kojima jezgre leže niže od jezgara potpornih stanica. Njihovi tanki apikalni kraj završava zadebljanjem, s kojeg polazi 6-20 dugačkih i nepokretnih cilija. One se smatraju neposrednim receptorima, koje reagiraju na mirisne tvari stvaranjem receptorskog potencijala te značajno povećavaju receptorsku površinu. Aferentni aksoni njušnih stanica su nemijelinizirani te prolaze kroz bazalnu membranu i udružuju se u snopove koji su smješteni u lamini proprii. Aksoni su obloženi glija stanicama (Schwannove stanice) i s kolagenom tvore nervne fascije (fila olfactoria) koje prolaze kroz laminu propriu te ulaze u kranijalnu šupljinu kroz male otvore na rešetkastoj ploči etmoidne kosti. Snopovi živčanih vlakana prolaze kroz površinu olfaktornog bulbosa, te tvore sinapse sa mitralnim dendritima ili ostalim neuralnim strukturama u glomerulu bulbosa. Osjetilni neuroni, zahvaljujući svojoj anatomske organizaciji, su u direktnom kontaktu s mirisnim tvarima, no izložene su i ostalim sastojcima udahnutog zraka koji obuhvaćaju različite kemikalije te virusne i bakterijske patogene. Stoga olfaktorni neuroni imaju relativno kratak vijek trajanja, od 30 do 90 dana. Uništeni neuroni zamjenjuju se novim senzornim neuronima, a neurogeneza karakteristična za olfaktorni epitel nije uočena u ostalim dijelovima živčanog sustava odrasle osobe.

U submukozi olfaktornog epitela su smještene i alveole Bowmanovih žlijezda te krvne i limfne žile. Opskrba krvlju olfaktornog područja odvija se putem gornjih i

doljnjih etmoidnih ogranaka oftalmičke arterije. Venska drenaža odvija se na isti način kao i u ostatku nosne šupljine (Mathison i sur. 1998; Illum 2004).

## **1.2. Putovi transporta lijeka iz nosne šupljine u središnji živčani sustav**

Mnogobrojna ispitivanja na animalnim modelima dokazuju da se veliki broj lijekova nakon nazalne primjene transportira u SŽS te se postižu više koncentracije u CST i olfaktornom bulbusu nego nakon intravenske primjene. U nekim slučajevima, zabilježen je transport molekule lijeka i do parenhima mozga. Taj popis obuhvaća cefaleksin (Sakane i sur., 1991<sup>a</sup>), sulfonamide (Sakane i sur., 1991<sup>b</sup>; Sakane i sur., 1994), kokain (Javard i Davis, 1993; Chow i sur., 1999) zidovudin (Seki i sur., 1994), antihistaminike (Chou i Donovan, 1998; Kandimalla i Donovan, 2005), dihidroergotamin (Wang i sur., 1998), različite lokalne anestetike (Chou i Donovan, 1998), propranolol (Einer-Jensen i Larsen, 2000), različite alkilne ester L-dope (Kao i sur., 2000), dopamin (Dahlin i sur., 2001), benzilekognin (Chow i sur., 2001), sumatriptan i naratriptan (Einer-Jensen i sur., 2001), melatonin (van den Berg i sur., 2004<sup>a</sup>), estradiol i progesteron (van den Berg i sur., 2004<sup>b</sup>) te morfín (Westin i sur., 2005).

Nakon nazalne primjene, lijek koji nije enzimatski razgrađen ili uklonjen iz nosne šupljine mukocilijarnim sustavom čišćenja, prolazi nazalnu membranu i brzo se apsorbira u sistemsku cirkulaciju. Apsorpcija u sistemsku cirkulaciju odvija se uglavnom u respiratornom području sluznice nosa, koje je dobro prokrvljeno. Bioraspoloživost lipofilnih lijekova nakon nazalne primjene je uglavnom potpuna. Nakon apsorpcije u sistemsku cirkulaciju, lijek se zavisno o svojim karakteristikama transportira kroz krvno-moždanu barijeru ili podliježe eliminaciji. Za lipofilne molekule niske molekularne mase, transport kroz krvno moždanu barijeru odvija se procesom pasivne difuzije, dok se neke makromolekule kao što su inzulin, transferin i albumin transportiraju specifičnim transportnim mehanizmima (Mathison i sur., 1998; Illum, 2000; Illum 2004).

Poznato je da različiti neurotropni virusi ulaze u receptorske stanice olfaktorne sluznice nosne šupljine te se transportiraju u SŽS putem olfaktornog živca (Mathison i sur., 1998). Aksonalni transport putem olfaktornog živca dokazan je i za različite

markere, kao što su čestice koloidnog zlata, aluminijev laktat te peroksidaza hrena, pri čemu se ulazak markera u stanicu neurona odvija pomoću endocitoze ili pinocitoze te se transportira intracelularnim aksonalnim transportom u olfaktorni bulbus (Mathison i sur., 1998). Smatra se da je aksonalni transport posljedica citoplazmatskog toka. Takav transport je vrlo spor te se njime ne može objasniti brzi transport malih lipofilnih molekula (Sakane i sur., 1991<sup>a</sup>; Wang i sur., 1998; Chow i sur., 2001) te nekih proteina (Gizurason i sur., 1997; Thorne i sur., 2004) iz nosne šupljine u SŽS.

Novija istraživanja ukazuju da se brz transport iz nosne šupljine može pripisati apsorpciji putem olfaktorne sluznice, tzv. perineuralnim putem apsorpcije (Mathison i sur. 1998; Illum 2003). Perineuralni put apsorpcije uključuje transport lijekova kroz međustanične veze između olfaktornih neurona i potpornih stanica ili transport kroz međustanične veze između potpornih stanica i Bowmanovih žlijezda do bazalne membrane. Nakon prolaska kroz bazalnu membranu, lijek ulazi u lamina propriu, odakle se transportira prema SŽS kroz perineuralni prostor koji okružuje njušni živac na mjestu prolaska kroz otvore na etmoidnoj kosti. Transport lipofilnih lijekova do bazalne membrane odvija se kroz epitelne stanice (transcelularno) do submukoze odakle se ovi lijekovi transportiraju do perineuralnog prostora. Perineuralni transport lijeka iz nosne šupljine u SŽS osim njušnog živca uključuje i živce koji se nalaze u blizini nosne šupljine, kao što je trigeminalni živac (Mathison i sur., 1998; Thorne i sur., 2004).

Lijek koji se putem olfaktorne sluznice apsorbira do razine lamine propriae može se transportirati u SŽS i putem limfnog sustava sve do cervikalnih limfnih čvorova (Thorne i sur., 2004).

Transport lijekova niske molekularne mase iz nosne šupljine do SŽS zavisi o fizikalno kemijskim svojstvima molekule lijeka. Apsorpcija kokaina nakon nazalne primjene je vrlo brza te rezultira pojavom euforije 3 do 5 minuta nakon primjene. Takav učinak pripisuje se postojanju izravnog puta apsorpcije kokaina iz nosne šupljine u tkivo mozga te njegovom nakupljanju u određenim dijelovima mozga (Chow i sur., 1999). Javard i Davis (1993) pratili su koncentracije kokaina u serumu i pojedinim dijelovima mozga nakon intraperitonealne primjene kokaina štakorima. Ustanovljeno je da je brzina apsorpcije kokaina nakon intraperitonealne primjene slična onoj kao u ljudi nakon nazalne primjene. Maksimalna koncentracija kokaina u tkivu mozga postiže se 10 minuta nakon primjene. Intraperitonealnom primjenom ne dolazi do selektivnog nakupljanja kokaina u pojedinim dijelovima mozga. Do sličnih

rezultata došli su Chow i sur. (1999) prateći koncentraciju kokaina u mozgu štakora nakon nazalne i intravenske primjene. Dokazali su da je nakon nazalne primjene apsorpcija kokaina bila brza te je uočena selektivna distribucija kokaina u tkivu mozga. Maksimalna koncentracije kokaina nađena je u olfaktornom bulbusu, a niže koncentracije u olfaktornom traktu i ostatku mozga. Minutu nakon primjene, koncentracija kokaina u olfaktornom bulbusu bila je 3 puta viša u usporedbi s koncentracijom nakon intravenske primjene. Nakon toga nema razlike u koncentraciji kokaina primijenjenog nazalno ili intravenski. Autori zaključuju da se kokain transportira u tkivo mozga uglavnom apsorpcijom u sistemsku cirkulaciju nakon koje slijedi prolazak lijeka kroz krvno moždanu barijeru, a tek manjim dijelom izravnim transportom, u kratkom vremenu nakon nazalne primjene. Transport sumatriptana i naratriptana iz nosne šupljine u SŽS odvija se istim mehanizmom (Einer-Jensen i sur., 2001), te je nazalnom i parenteralnom primjenom bioraspoloživost oba lijeka u CST jednaka.

U slučaju benzoilekognina, dobiveni su drugačiji podaci (Chow i sur., 2001). Pratio se omjer površina ispod krivulje (AUC) koja prikazuje ovisnost koncentracije lijeka u CST, odnosno plazmi o vremenu, pri nazalnoj i intravenskoj primjeni. Nazalnom primjenom benzoilekognina omjer  $AUC_{\text{olfaktorni bulbus}}/AUC_{\text{plazma}}$  je 10 do 100 puta veći u usporedbi s intravenskom primjenom jednake doze lijeka. Specifično nakupljanje lijeka nakon nazalne primjene uočeno je i u drugim dijelovima mozga, kao što su mali mozak, moždano deblo i kora mozga. Nadalje, nazalnom primjenom lijeka, koncentracija benzoilekognina u olfaktornom bulbusu je rasla brže u odnosu na koncentraciju lijeka u plazmi. Ti podaci ukazuju da se benzoilekognin transportira izravno iz nosne šupljine u tkivo mozga, a visoke koncentracije lijeka u tkivu mozga su zadržane kroz dulji vremenski period.

Razlike u apsorpciji kokaina i benzoilekognina pripisuju se fizikalno kemijskim karakteristikama lijekova. Kokain je značajno lipofilniji u odnosu na benzoilekognin (koeficijent raspodjele kokaina i benzoilekognina u sustavu oktanol/fosfatni pufer (pH-vrijednost 7.4) iznose 7.6, odnosno 0.15). To je razlog brze apsorpcije kokaina u sistemsku cirkulaciju. Sistemska apsorpcija benzoilekognina je također potpuna, no odvija je značajno sporije (konstante apsorpcije nazalno primijenjenog kokaina i benzoilekognina iznose  $0.306$ , odnosno  $0.086 \text{ min}^{-1}$ ). Zbog sporije nazalne apsorpcije, veći dio doze benzoilekognina zaostaje u nosnoj šupljini te je raspoloživ za izravnu apsorpciju u tkivo mozga. Značajno više koncentracije



benzoilekognina u tkivu mozga nakon nazalne primjene lijeka posljedica su izravnog transporta lijeka iz nosne šupljine u SŽS, dok slabi prolaz lijeka kroz krvno-moždanu barijeru dodatno usporava eliminaciju benzoilekognina iz SŽS.

Nazalna primjena dopamina rezultira značajno višim koncentracijama lijeka u olfaktornom bulbusu i u CST u usporedbi s intravenskom primjenom (Dahlin i sur., 2001). Nepromijenjeni dopamin se transportira olfaktornim putem do olfaktornog bulbusa kroz 30 minuta nakon primjene, a iz olfaktornog bulbusa transportira se u više moždane strukture. Nazalnom primjenom je sistemska apsorpcija dopamina značajno smanjena, a time se smanjuje i neželjeno djelovanje dopamina na perifernim organima.

Nazalnom primjenom alkilnih estera L-dope apsorpcija lijeka u sistemske cirkulacije je brza i kompletna (Kao i sur., 2000). U plazmi se lijekovi brzo biotransformiraju u farmakološki aktivnu L-dopu, dok je nastajanje dopamina, koji uzrokuje neželjene učinke na perifernim organima, zanemarivo. Nazalnom primjenom butilnog estera L-dope biorasploživost L-dope u CST je znatno poboljšana u odnosu na intravenski primijenjen prolijek. Rezultati ukazuju da nazalna primjena hidrofilnih prolijekova L-dope u terapiji Parkinsonove bolesti može imati prednosti kao što je povećana biorasploživost lijeka, smanjenje učestalosti nuspojava te direktan transport lijeka u SŽS.

Apsorpcija estrogena i progesterona nazalnom primjenom je brza, a biorasploživost je odgovara intravenskoj primjeni četverostruko nižih doza (van den Berg i sur., 2004<sup>b</sup>). Maksimalne koncentracije lijekova u CST i plazmi postižu se 15 minuta nakon nazalne primjene. Vrijednosti omjera  $AUC_{CST}/AUC_{plazma}$  za estradiol i progesteron su podjednake, bez obzira na način primjene. Nazalnom primjenom estradiol i progesteron se brzo apsorbiraju u plazmatsku cirkulaciju, odakle hormoni koji nisu vezani na proteine plazme ulaze u CST prelazeći krvno moždanu barijeru. Rezultati ispitivanja ne ukazuju na izravan transport ovih lijekova iz nosne šupljine u SŽS.

Lipofilnost molekule lijeka je jedan od ključnih parametara koji određuje apsorpciju lijeka iz nosne šupljine u CST i/ili tkivo mozga. Sakane i sur. (1991<sup>b</sup>) ispitivali su utjecaj lipofilnosti molekule lijeka na transport iz nosne šupljine u CST. Ispitivanje je obuhvatilo niz sulfonamida: sulfanilnu kiselinu, sulfameizol, sulfizoksazol i sulfizomidin čije vrijednosti koeficijenta razdjeljenja u sustavu izoamilni alkohol/fosfatni pufer iznose 0.012, 0.250, 0.261, odnosno 0.892.

Uspoređivale su se koncentracije lijekova u CST nazalnom primjenom i intravenskom primjenom iste doze lijeka. Dok su nazalnom primjenom koncentracije lijekova u plazmi bile su značajno niže od onih dobivenih intravenskom primjenom lijeka, koncentracije lijekova u CST su bile značajno više nakon nazalne primjene. Koncentracija pojedinog sulfonamida određenog u CST bila je u korelaciji s lipofilnošću molekule lijeka.

Chou i Donovan (1998) ispitivali su distribuciju niza lokalnih anestetika u CST nakon nazalne primjene. Niz je uključivao hidrokloride prokaina, lidokaina, tetrakaina i bupivakaina čije vrijednosti koeficijenta razdjeljenja u sustavu oktanol/voda iznose -0.092, 1.55, 2.18, odnosno 2.22. Dokazali su da bioraspoloživost lijeka nazalnom primjenom ovisi o lipofilnosti molekule lijeka. Zbog niske lipofilnosti, apsolutna nazalna bioraspoloživost prokaina iznosila je 43%. Za lipofilnije lokalne anestetike, nazalna bioraspoloživost iznosila je 100% u odnosu na intraarterijsku primjenu. Omjeri  $AUC_{CST}$  nakon nazalne i intraarterijske primjene lijekova slijede niz: tetrakain > bupivakain > lidokain > prokain, što je u korelaciji s vrijednostima koeficijenta raspodjele molekule lijeka u sustavu oktanol/voda.

Važan čimbenik koji utječe na transport lijekova iz nosne šupljine u CST i/ili tkivo mozga je ionizacija molekule. Sakane i sur. (1994) ispitivali su utjecaj stupnja disocijacije sulfizomidina, lijeka s  $pK_a$ -vrijednošću 7.5, na transport u CST kod štakora. Lijek je primijenjen nazalno u medijima različitih pH-vrijednosti u rasponu od 5.5 do 9.4. Istovremeno, kao kontrola, lijek je primijenjen intravenski. Dokazano je da se stupanj apsorpcije sulfizomidina u sistemska cirkulaciju, kao i transport lijeka u CST smanjuje s porastom udjela ioniziranih molekula lijeka zavisno o pH-vrijednosti sustava.

Utjecaj molekularne mase lijeka na transport lijeka iz nosne šupljine u CST kod štakora, ispitan je primjenom dekstrina različitih molekularnih masa (4400 – 40 500 Da) obilježenih fluorescin-izocijanidom (Sakane i sur., 1995). Ispitivanja su pokazala da se lijekovi molekularne mase do 20 000 Da mogu transportirati iz nosne šupljine do CST, a koncentracija lijeka u CST je obrnuto proporcionalna njegovoj molekularnoj masi. Transport molekula visoke molekularne mase ograničen je veličinom međustaničnih prostora olfaktorne sluznice. Koncentracije visokomolekularnih markera u CST nakon nazalne primjene su značajno niže nego kod lijekova niske molekularne mase (0.01 – 0.1%).

Ispitivanja pokazuju da se radioaktivno obilježeni inzulin nazalnom primjenom brzo transportira u olfaktorni bulbus (tijekom 10 min), dok intravenskom primjenom ne dolazi do značajnog transporta radioaktivno obilježenog inzulina u SŽS (Gizurarson i sur., 1997).

Nazalna primjena različitih peptida ima veliki potencijal u liječenju različitih neurodegenerativnih bolesti. Dokazano je da nazalna primjena inzulinu slične molekule faktora rasta rezultira značajnim smanjenjem obujma oštećenja moždanog tkiva te poboljšanjem neuroloških funkcija nakon moždanog udara u štakora (Liu i sur., 2001). Nazalno primijenjeni faktor rasta transportira se ekstracelularnim putem kroz olfaktorni i trigeminalni živac, pri čemu zaobilazi krvno moždanu barijeru te brzo ostvaruje biološke učinke u mozgu i kralježničkoj moždini (Thorne i sur., 2004).

Istim putem transportira se i interferon beta (Ross i sur., 2004), pri čemu se nazalnom primjenom štakorima ostvaruje 88-98% veće koncentracije peptida u SŽS te 100-1650% niže koncentracije peptida u perifernim organima u usporedbi s intravenskom primjenom. Nazalno primijenjen, interferon beta dolazi u SŽS nepromijenjen te ostvaruje svoj farmakodinamski učinak na  $INF_1$  receptoru. Zbog svog imunomodulacijskog učinka, interferon beta je pogodan za liječenje neuroloških bolesti kao što je multipla skleroza i Alzheimerova bolest. Da bi postigao djelotvornost, lijek mora proći krvno moždanu barijeru. Primijenjen parenteralno, interferon beta ne prolazi krvno-moždanu barijeru stoga nazalna primjena pruža mogućnost neinvazivne terapije interferonom beta.

Transport lijeka iz nosne šupljine u tkivo mozga najviše se ispituje na animalnim modelima, i to najčešće na štakorima (Illum, 2000). Olfaktorni epitel u glodavaca zauzima relativno veliki udio površine sluznice nosa (oko 50%), te se stoga rezultati ispitivanja dobiveni na animalnim modelima ne mogu direktno preslikati na čovjeka, kod kojeg olfaktorno područje zauzima samo 3-5% površine nazalne sluznice. Ispitivanjem transporta lijeka iz nosne šupljine u CST i/ili tkivo mozga u ljudi, često nije moguće odrediti brzinu transporta te koncentracije lijeka u CST i/ili tkivu mozga, već se prate farmakodinamski učinci lijeka na SŽS.

U brojnim kliničkim ispitivanjima, istražen je učinak različitih polipeptida, kao što su adenokortikotropin (Smolnik i sur., 1999), inzulin (Kern i sur., 1999) te kolecistokinin-8 (Petrovsky i sur., 2001), na kognitivne sposobnosti pacijenata. Polipeptidi su primijenjeni nazalno te intravenski kao kontrola. Rezultati ukazuju da je učinak polipeptida na kognitivne sposobnosti ispitanika izraženiji nazalnom

primjenom u odnosu na intravensku primjenu, što ukazuje na izravan transport ispitivanih peptida iz nosne šupljine u SŽS i u ljudskom organizmu (Illum, 2000).

Melanokortin, vazopresin i inzulin primijenjeni nazalno ljudima se brzo transportiraju u CST, gdje njihova koncentracija ostaje značajno povišena u odnosu na fiziološku razinu tijekom 80 minuta, te se vrijednosti koncentracije peptida značajno razlikuju od skupine pacijenata koji su primili placebo (Born i sur., 2002). Pri tome, nije došlo do promjene koncentracije peptida u plazmi, a razina glukoze u plazmi nije se promijenila nakon nazalne primjene inzulina. Ovi podaci ukazuju na postojanje izravnog transporta peptida iz nosne šupljine u SŽS ljudi, pri čemu se zaobilazi sistemska cirkulacija.

Učinkovitost nazalne primjene lidokaina na terapiju migrene s aurom ispitana je u dvostruko-slijepom, križnom ispitivanju koje je uključivalo 81 bolesnika (Maizels i sur., 1996). Smatra se da je mjesto djelovanja lidokaina sfenopalatalni ganglij u SŽS, koji ima ključnu ulogu u razvoju simptoma migrene. Rezultati ispitivanja su pokazali da nazalna primjena lidokaina rezultira brzim prestankom simptoma migrene u 55 % pacijenata, što neposredno ukazuje na klinički značajan transport lijeka u SŽS nazalnom primjenom. Nazalna primjena lidokaina pokazala se uspješnom u dugotrajnoj terapiji migrene s aurom (Maizels, 1999).

Nazalna primjena angiotenzina II rezultirala je jednakim profilom koncentracija lijeka u plazmi kao i intravenska primjena, no farmakodinamski učinci lijeka bili su različiti (Derad i sur., 1998). Intravenska primjena angiotenzina II uzrokuje trenutni porast vrijednosti krvnog tlaka, koji ostaje povišen do 3 sata nakon primjene, dok se nazalnom primjenom krvni tlak brzo smanjuje na početnu razinu. Također, nazalnom primjenom angiotenzina II koncentracije vazopresina u plazmi bile su značajno više u odnosu na vrijednosti nakon intravenske primjene lijeka. Slični učinci angiotenzina II zabilježeni su i kod životinja intracerebroventrikularnom primjenom, što ukazuje na izravan učinak angiotenzina II na SŽS nakon nazalne primjene.

Lindhardt i sur. (2001) pratili su učinak nazalno primijenjenog diazepama na oblik encefalograma i plazmatsku koncentraciju lijeka u pacijenata oboljelih od epilepsije. Bioraspoloživost nakon nazalne primjene 4 i 7 mg diazepama iznosila je 45, odnosno 47% u odnosu na intravensku primjenu. Promjene na encefalogramu ukazuju da je nazalnom primjenom diazepama moguće ostvariti transport klinički

učinkovite doze lijeka u SŽS, te se ova primjena može koristiti u tretmanu akutnog napada epilepsije.

Merkus i suradnici (2003) pratili su koncentraciju melatonina (lipofilna molekula,  $M_w$  232) i hidrosikobalamina (hidrofilna molekula,  $M_w$  1346) u plazmi i CST nakon nazalne i intravenske primjene ovih lijekova ljudima. Nazalna primjena melatonina i cijanokobalamina rezultira brзом apsorpcijom lijekova u sistemsku cirkulaciju i CST. S obzirom na postignute koncentracije lijekova u CST nazalnom i intravenskom primjenom, autori zaključuju da nema dokaza o izravnom transportu melatonina i cijanokobalamina iz nosne šupljine u CST. No valja napomenuti da su koncentracije melatonina i hidrosikobalamina u CST bile podjednake bez obzira na način primjene. Stoga se može zaključiti da je nazalna primjena prikladan i neinvazivan način liječenja lijekovima čije je mjesto djelovanja u SŽS.

### **1.3. Mukoadhezivni polimeri u nazalnoj primjeni lijekova**

Respiratorno i olfaktorno područje nosne šupljine prekriveno je slojem sluzi, koja se sastoji od vode (oko 95%), glikoproteina i lipida (od 0.5 do 5%), mineralnih soli (od 0.5 do 1%) te slobodnih proteina u količini oko 1% (Khanwilkar i sur., 2001). Sastav sluzi mijenja se zavisno o patološkim stanjima sluznice. Prilikom prehlada dolazi do hipersekrecije sluzi čime se mijenja njen proteinski sastav, a najčešće prisutni proteini su IgA imunoglobulini, albumin, laktoferin i lizozim, koji su nastali u samom dišnom sustavu. Također i sastav lipidne komponente sluzi varira zavisno o patološkim stanjima sluznice. Lipidi prisutni u sluzi su slobodne masne kiseline, trigliceridi, kolesterol i fosfolipidi. Prisustvo lipidne komponente odgovorno je za površinsku aktivnost sloja mucina. Površinska aktivnost može imati značajan utjecaj na stabilnost i/ili permeabilnost tvari dispergiranih u sluzi (Ugwoke i sur., 2005).

Mucin je glavni sastojak sluzi, a nalazimo ga u dva oblika: sekretorni mucin koji je u topljivom obliku te netopljivi mucin vezan na membrane. Zbog svoje velike molekularne mase te sposobnosti da tvori intermolekularne disulfidne veze sekretorni mucin tvori viskoznan gel. Membranski vezani mucin razlikuje se od sekretornog mucina po tome što sadrži hidrofobne domene preko kojih se veže na plazmatske

membrane te ne tvori intramolekularne disulfidne veze. Zbog toga je sloj mucina u kontaktu s tkivom sluznice manje viskozan.

Mucin je glikoproteinska makromolekula kod koje 10 do 30% mase otpada na proteinsku jezgru, a ostatak čine oligosaharidni lanci vezani putem o-glikozidnih veza na protein. Proteinska komponenta molekule mucina uglavnom je građena od aminokiselina kao što su serin, treonin, alanin, glicin i prolin, dok su aromatske aminokiseline manje zastupljene. Oligosaharidni lanci građeni su od 2 do 15 šećernih jedinica, a mogu biti i razgranate strukture. Najčešće zastupljeni monosaharidi su N-acetilgalaktozamin, N-acetilglukozamin, galaktoza, fukoza i sijalinska kiselina. Prisutnost sijalinske kiseline i sulfatnih ostataka doprinosi negativnom naboju molekule mucina (Khanwilkar i sur., 2001).

Debljina sloja sluzi u nosnoj šupljini iznosi oko 5  $\mu\text{m}$ . Sloj sluzi prekriva tkivo sluznice te joj pruža fizičku i enzimsku zaštitu od nepovoljnih čimbenika iz okoline, održava njenu vlažnost, te djeluje kao adheziv koji sprečava ulazak alergena, bakterija, virusa i/ili toksina u niže dijelove dišnog sustava. Takve tvari ostaju pričvršćene na površini ili se otapaju u sloju sluzi te se djelovanjem cilija epitelnih stanica transportiraju prema nazofaringsu i dalje u gastrointestinalni trakt. Ovaj mehanizam naziva se mukocilijarni klirens. Prosječna brzina mukocilijarnog klirensa iznosi oko 6 mm/min. Održavanje optimalnog mukoadhezivnog klirensa važno je u preventivi infekcija respiratornog sustava. Na mukocilijarni klirens utječu različiti čimbenici iz okoline te patološka stanja nosne sluznice. Temperatura ispod ili iznad 23°C, udisanje sumporovog dioksida ili dima cigarete umanjuje učinkovitost mukocilijarnog klirensa. Patološka stanja kao što je Kartagenerov i Sjorgensov sindrom, astma, nazalna polipoza, defekti septuma, rinitis, alergije, prehlade i sinusitisi mijenjaju mukocilijarni klirens zbog utjecaja na frekvenciju cilijarnog gibanja i/ili reološka svojstva sloja sluzi. Patološka stanja i utjecaj čimbenika okoline utjecat će i na učinkovitost terapijskih sustava za nazalnu primjenu što treba uzeti u obzir tijekom njihove formulacije (Ugwoke i sur., 2005).

U otopini, mucin stvara velike molekularne agregate. Postoji više teorija koje objašnjavaju strukturu agregata. Smatra se da su za tercijarnu strukturu molekule mucina odgovorne nekovalentne, intermolekularne veze između karboksilnih skupina polisaharidnih ogranaka te intermolekularne disulfidne veze. Također, dolazi do međusobne interakcije susjednih lanaca molekule mucina. Time se lanci mucina

međusobno povezuju i produžuju te nastaje kompleksna struktura slična patentnom zatvaraču koja predstavlja prepreku transportu molekula lijeka do površine sluznice, tj. mjesta apsorpcije. Transport lijekova kroz sloj mucina kontroliran je difuzijom. Dokazano je da male neutralne molekule difundiraju brzo kroz sloj sluzi te se na površini sluznice apsorbiraju. Mikročestice i liposomi s uklopljenim lijekovima također imaju dobra transportna svojstva te dolaze do površine epitela u intaktnom obliku. Veličina, svojstva močenja i površinski naboj čestica su čimbenici koji utječu na transport lijekova kroz sloj mucina. Interakcije između polimera korištenih u oblikovanju mikročestica i lijeka s mucinom i/ili mukoznim tkivom su kompleksne i do sada nisu u potpunosti razjašnjene. Bolje poznavanje i razumijevanje takvih interakcija omogućilo bi izbjegavanje problema kao što je niska bioraspoloživost lijekova te njihovo iskorištavanje u poboljšanju transporta lijeka kroz sloj sluzi. Promjene svojstava ljekovitog oblika u smislu variranja površinske pH-vrijednosti, ionske jakosti, vrste polimera, površinskog naboja mikročestica i sl. mogle bi utjecati na gel strukturu sloja mucina, što bi moglo dovesti do povećanja bioraspoloživosti nazalno primijenjenog lijeka (Khanvilkar i sur., 2001; Ugwoke i sur., 2005).

Zbog mukocilijarnog čišćenja ograničeno je vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu primjene što značajno može smanjiti bioraspoloživost. Dokazano je da poluvrijeme klirensa nazalno primijenjene otopine lijeka iznosi 15-20 minuta (Illum, 2003). Primjenom mukoadhezivnih polimera koji usporavaju brzinu mukocilijarnog klirensa uslijed interakcija sa sluznicom povećava se vrijeme kontakta i apsorpcije lijeka, a time i bioraspoloživost nazalno primijenjenog lijeka (Zhou i Donovan, 1996; Soane i sur., 1999, Ugwoke i sur., 2005).

Mukoadhezivni polimeri pokazuju svojstvo prianjanja (adhezije) na mukozna tkiva (Edsman i Hägerström, 2005). Mehanizam nastajanja adhezivne veze zavisi o velikom broju čimbenika, kao što su vrsta polimera te njegova molekularna masa, stupanj umreženosti i ionizacija, a uključuje nastanak mehaničkih i kemijskih veza.

Za nastajanje adhezivne veze između polimera i sluznice nosne šupljine nužan je bliski kontakt između mukoadhezivnog polimera i sluznice koji nastaje močenjem (hidratacijom) mukoadhezivne površine i bubrenjem polimera (Edsman i Hägerström, 2005; Ugwoke i sur., 2005). Hidratacijom dolazi do disocijacije interpolimernih vodikovih veza što uzrokuje relaksaciju polimernih lanaca (bubrenje) pri čemu oni postaju dostupni za interakciju s polisaharidnim ograncima molekule mucina. Također, polisaharidni ogranci molekule mucina interpenetriraju u poroznu strukturu

izbubrenog polimera. Nakon interpenetracije polimernih lanaca dolazi do stvaranja slabih kemijskih veza između polimera i molekule mucina što dodatno ojačava adhezivnu vezu. Postoji kritičan stupanj hidratacije polimera potreban za optimalnu mukoadhezivnost. U slučaju nepotpune hidratacije polimerni lanci ostaju u konformaciji klupka, pri čemu je otežana njihova interpenetracija s lancima mucina. Time skupine odgovorne za nastajanje adhezivne veze nisu dostupne za interakciju s molekulama mucina. Prekomjerna količina vode slabi adhezivnu vezu uslijed nastajanja višestrukih vodikovih veza.

Utjecaj molekularne mase polimera na njegova mukoadhezivna svojstva nije jednoznačan, već ovisi o vrsti i stupnju umreženosti polimera. Tako je mukoadhezivnost umrežene poliakrilne kiseline (PAA) maksimalna pri molekularnoj masi od 1 000 kDa (Tobyn i sur., 1996), dok mukoadhezivna svojstva karboksimetilceluloze (CMC) i polietilenglikola (PEG) rastu linearno s porastom molekularne mase. Fleksibilnost i konformacija polimernih lanaca značajno utječe na mukoadhezivna svojstva polimera. Kod PEG-a, mukoadhezivnost raste s porastom molekularne mase od 100 do 4 000 kDa, jer je molekula PEG linearne konformacije te su polimerni lanci dostupni za interpenetraciju. Nasuprot tome, dekstrani molekularne mase 19 500 kDa pokazuju sličnu mukoadhezivnost kao i oni molekularne mase 200 kDa. Konformacija dekstranskih molekula je uzvojita, pa su mnoge aktivne adhezivne grupe zasjenjene unutar uzvojnice i time nedostupne za adheziju. Zbog takve strukture češće se uspostavljaju neučinkovite intramolekularne veze, nego površinske intramolekularne veze koje doprinose adheziji (Gandhi i Robinson, 1994).

Stupanj umreženja negativno utječe na mukoadhezivna svojstva polimera. Porastom stupnja umreženja PAA (od 0.1 do 2%) slabi sila mukoadhezije uslijed smanjenja koeficijenta difuzije, fleksibilnosti i motiliteta segmenata lanaca polimera čime je reducirana udio interpenetracije (Park i Robinson, 1987). Ako se umrežavanjem mijenja kemijska struktura polimera, doći će do promjene mukoadhezivnih svojstava. Transmisijskom elektronskom mikroskopijom dokazano je da mucin ima veći afinitet prema neumreženim kitozanskim mikročesticama u odnosu na mikročestice s kitozanom umreženim dodatkom glutaraldehida (Genta i sur., 1998). Budući da glutaraldehyd reagira s amino skupinama molekule kitozana, smanjuje se broj funkcionalnih skupina polimera dostupnih za interakciju s molekulom mucina.

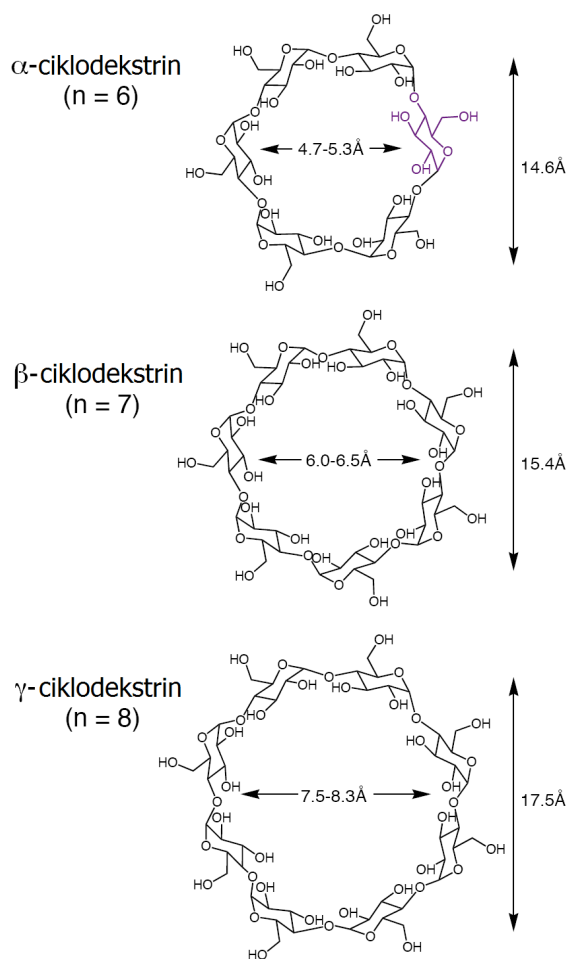


Kemijska struktura polimera određuje vrstu interakcija između polimera i molekule mucina te utječe na svojstva bubrenja. Vodikove veze imaju značajan utjecaj u interakciji između PAA i molekule mucina pri nižim pH-vrijednostima. Dodatak tvari koje ometaju nastajanje vodikovih veza značajno umanjuje mukoadhezivna svojstva karbomera i polietilenoksida (Mortazavi 1995). Korištenjem atenuirane infracrvene spektroskopije s totalnom refleksijom (ATR-FTIR) dokazano je postojanje vodikovih veza u interpenetracijskom sloju PAA i mucina (Saiano i sur., 2002). Osim vodikovih veza, važnu ulogu u interakciji polimera i molekule mucina imaju elektrostatske interakcije te je dokazana korelacija između vrijednosti zeta-potencijala i mukoadhezivnih karakteristika polimera (Bogataj i sur., 2003, Martinac i sur., 2005). Uočeno je da pozitivno nabijeni polimeri, kao što su kitozani pokazuju izraženija mukoadhezivna svojstva u odnosu na negativno nabijene polimere kao što su polikarbofil i CMC. Interakcija između tioliranih polimera i molekule mucina odvija se nastajanjem kovalentnih veza (Bernkop-Schnurch i Steininger, 2000).

Novija istraživanja ukazuju da neki mukoadhezivni polimeri kao što su karbomeri i kitozan utječu na propusnost sluznice uzrokujući otvaranje čvrstih međustaničnih veza te tako olakšavaju paracelularni put apsorpcije (Junginger i Verhoef, 1998). Smatra se da je mehanizam djelovanja u keliranju izvanstaničnog kalcija s karboksilnim, odnosno amino skupinama polimera što uzrokuje destabilizaciju proteinskih vlakana u zonuli okcludens, zonuli adherens te citoskeletnim elementima međustaničnih spojeva pa dolazi do njihova otvaranja (Li i sur., 2006). Učinak tih polimera na propusnost sluznice je reverzibilan, bez citotoksičnog učinka.

## 1.4. Ciklodekstrini

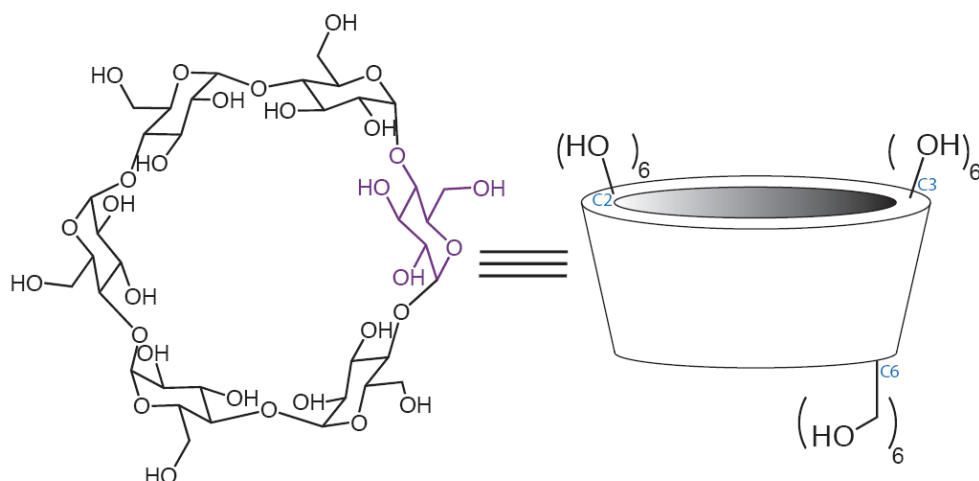
Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi građeni od 6, 7 ili 8 glukopiranoznih jedinica ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -ciklodekstrin) vezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnom vezom (Slika 4.). Ciklodekstrini s manje od 6 glukopiranoznih jedinica ne mogu nastati zbog steričkih razloga, a ciklodekstrini s više od 8 glukopiranoznih jedinica nisu od značaja u farmaciji (Frömming i Szejtli, 1994; Uekama 2002).



Slika 4. Strukture prirodnih ciklodekstrina (Frömming i Szejtli, 1994).

Zbog nemogućnosti slobodne rotacije oko  $\alpha$ -1,4 veza molekule ciklodekstrina nisu cilindrične strukture (Slika 5.). Najstabilnija molekularna konfiguracija ovih cikličkih oligosaharida je krnji stožac s centralnom šupljinom. Zbog rigidne prirode cikličke strukture molekule ciklodekstrina, primarne i sekundarne hidroksilne skupine nalaze se na suprotnim stranama šupljine. Uslijed slobodne rotacije primarnih hidroksilnih skupina smanjuje se promjer šupljine na strani primarnih hidroksilnih

skupina. Unutrašnjost centralne šupljine molekule ciklodekstrina omeđena je C-C, C-H i C-O-C vezama (Frömming i Szejtli, 1994). Takva građa odgovorna je za hidrofilna svojstva vanjskog dijela molekule i relativno dobru topljivost ciklodekstrina u vodi te za lipofilni karakter šupljine i sposobnost stvaranja inkluzijskih kompleksa s hidrofobnim molekulama (molekularno kapsuliranje).



Slika 5. Molekularna konfiguracija ciklodekstrina (Frömming i Szejtli, 1994).

Unutar molekule ciklodekstrina nastaje prsten vodikovih veza između C<sub>2</sub>-OH i susjedne C<sub>3</sub>-OH glukopiranozne jedinice. Tako u molekuli β-ciklodekstrina nastaje 7 intramolekularnih vodikovih veza koje uzrokuju rigidnost molekule zbog čega je topljivost β-ciklodekstrina ograničena te iznosi 1.85 g/100 mL vode. U molekuli α-ciklodekstrina zbog steričkih razloga nastaju samo 4 od 6 mogućih vodikovih veza pa je stoga α-ciklodekstrin 7.8 puta topljiviji u odnosu na β-ciklodekstrin, a najbolje topljiv je γ-ciklodekstrin koji je neplanarne, fleksibilnije strukture (20.6 g/100 mL vode). Tališta α-, β- i γ-ciklodekstrina iznose između 240 i 265 °C što je posljedica stabilne strukture kristalne rešetke.

Supstitucijom jedne od hidroksilnih skupina u molekuli β-ciklodekstrina prekida se prsten intramolekularnih vodikovih veza te se topljivost nastalih derivata ciklodekstrina značajno povećava. Drugi razlog koji doprinosi povećanju topljivosti derivata β-ciklodekstrina je u tome što kemijskom modifikacijom molekule nastaje veliki broj izomera čime se kristalinični ciklodekstrin pretvara u amorfnu smjesu izomernih derivata. Hidrofilni derivati ciklodekstrina značajni u farmaciji obuhvaćaju metilirane, hidroksialkilirane te razgranate derivate. Najčešće se koriste nasumično metilirani β-ciklodekstrin (RAMEB), dimetil-β-ciklodekstrin (DM-β-CD),

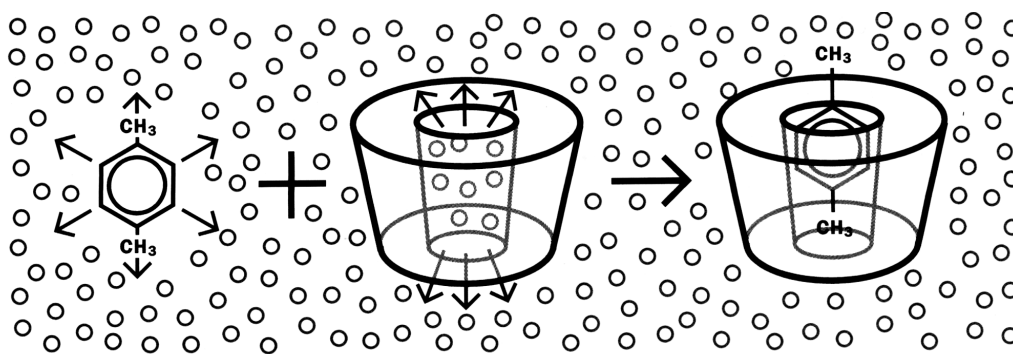
hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin (HP- $\beta$ -CD) te maltozil- i glukozil- $\beta$ -ciklodekstrin (Loftsson i Brewster, 1996; Sente i Szejtli 1999).

Uvođenjem izrazito lipofilnih supstituenata, kao što su alkilne i acetilalkilne skupine dobiven je niz lipofilnih derivata ciklodekstrina, niže topljivosti u vodi, prikladnih za izradu pripravaka s produženim oslobađanjem hidrofilnih lijekova te polipeptida i proteina (Hirajama i Uekama, 1999). Uvođenjem ionizirajućih skupina u molekulu dobiveni su derivati ciklodekstrina čija topljivost ovisi o pH-vrijednosti medija, a među njima su najznačajniji karboksilirani, karboksialkilirani te alkilsulfonirani derivati, npr. sulfobutileter- $\beta$ -ciklodekstrin (SBE- $\beta$ -CD). Međusobnim umrežavanjem ili vezanjem ciklodekstrinskih molekula na polimerne nosače dobiveni su polimeri ciklodekstrina. Polimeri niže molekularne mase, građeni od 5-10 ciklodekstrinskih jedinica topljivi su u vodi, a oni veće molekularne mase bubre u vodi stvarajući gelove (Frömming i Szejtli, 1994).

Ciklodekstrini su u potpunosti biokompatibilni (Irie i Uekama, 1997; Uekama i sur., 1998). Nakon oralne primjene, metaboliziraju se utjecajem crijevne mikroflore u maltodekstrin, maltozu i glukozu, koji se uključuju u metabolizam ugljikohidrata te se izlučuju u obliku CO<sub>2</sub> i vode. Moguća je topička i oralna primjena  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -ciklodekstrina, te njihovih hidrofilnih derivata kao što su 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin, sulfobutil- $\beta$ -ciklodekstrin i maltozil- $\beta$ -ciklodekstrin. Hidrofilni derivati ciklodekstrina slabo prolaze lipofilne biološke membrane, zbog čega imaju zanemarivo nisku oralnu, dermalnu ili okularnu bioraspoloživost, te ne uzrokuju lokalne iritacije i/ili kontaktne alergije.  $\gamma$ -ciklodekstrin i hidrofilni derivati  $\beta$ -ciklodekstrina kao što su 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin, sulfobutil- $\beta$ -ciklodekstrin mogu se koristiti i u parenteralnim pripravcima zbog njihove dokazane intravenozne netoksičnosti te brze eliminacije u nepromijenjenom obliku putem bubrega.  $\beta$ -ciklodekstrin i njegovi metilirani derivati su neprikladni za primjenu u parenteralnim lijekovitim oblicima, jer se  $\beta$ -ciklodekstrin zbog svoje niske topljivosti taloži u bubrezima te može djelovati nefrotoksično. Metilirani derivati  $\beta$ -ciklodekstrina pokazuju detergentu sličan učinak i destabiliziraju biološke membrane zbog interakcije s kolesterolom, te uzrokuju hemolizu (Frömming i Szejtli, 1994).

Ciklodekstrini se mogu smatrati praznim kapsulama molekularne veličine ("domaćin") koje će uklopiti molekulu lijeka ili neki njen dio ("gost") (Slika 6.). Inkluzijski kompleksi nastati će sa supstancijama koje su kompatibilne s veličinom

hidrofobne šupljine. Geometrija je odlučujući čimbenik u nastajanju ovih kompleksa. Moguće je također stvaranje kompleksa s molekulama značajno većim od centralne šupljine. Tada se u šupljinu ciklodekstrina uklapaju neki dijelovi molekula ili njeni pokrajnji lanci. Ako je pak molekula prevelika da se kompletno uklopi u jednu šupljinu, moguće je uklapanje molekule u dvije centralne šupljine. Stvaranje kompleksa zavisiće o polarnosti molekule “gosta”. Samo molekule koje su manje polarnosti od vode stvaraju komplekse s ciklodekstrinima.



Slika 6. Shematski prikaz nastajanja inkluzijskog kompleksa (Frömring i Szejtli, 1994).

Ciklodekstrini formiraju inkluzijske komplekse u otopini i u čvrstom stanju s velikim brojem lijekova, pri čemu se molekule vode smještene u centralnoj šupljini molekule ciklodekstrina zamjenjuju molekulom lijeka, ili češće samo nekim njenim dijelom (Slika 6.). Glavna pokretačka sila nastajanja kompleksa je u oslobađanju entalpijom bogatih molekula vode iz centralne šupljine molekule ciklodekstrina, čime se smanjuje entalpija sustava. Nastankom inkluzijskog kompleksa dolazi do van der Waalsovih i hidrofobnih interakcija između molekule gosta i šupljine ciklodekstrina te u slučaju nekih molekula i do nastajanja vodikovih veza, pri čemu se smanjuje napetost samog prstena. Važno je naglasiti da je proces stvaranja kompleksa reverzibilan, naročito u vodenim otopinama gdje postoji stalna i brza izmjena između vezanog i nevezanog oblika (Frömring i Szejtli, 1994; Loftsson i Brewster, 1996).

Najčešće nastaju kompleksi molarnog odnosa 1:1, no mogući su i odnosi 2:1, 1:2 ili 2:2, zavisno o molekularnoj masi molekule gosta i steričkim razlozima. Tendenciju nastajanja kompleksa opisuje konstanta stabilnosti kompleksa, a njena vrijednost može varirati od  $0 \text{ M}^{-1}$  što upućuje da molekula “gost” nema afiniteta

prema molekuli ciklodekstrina, pa do  $10000 \text{ M}^{-1}$  što je do sada najviša eksperimentalno određena vrijednost (Loftsson i Brewster, 1996).

Nastajanjem inkluzijskog kompleksa mijenjaju se fizikalna, kemijska i biološka svojstva uklopljene molekule lijeka. Stoga se ciklodekstrini koriste za modifikaciju svojstava lijeka kao što je agregatno stanje, topljivost, brzina oslobađanja iz ljekovitog oblika, stabilnost te bioraspoloživost. Rezultati mnogobrojnih istraživanja ukazuju da je kombinacija molekularnog kapsuliranja s različitim transportnim sustavima učinkovita metoda za razvoj novih terapijskih sustava.

#### **1.4.1. Ciklodekstrini kao promotori nazalne apsorpcije lijekova**

Transport molekula lijeka kroz biološke membrane uglavnom se odvija procesom pasivne difuzije, a zavisi o permeabilnosti molekule kroz lipidni dvosloj te o topljivosti lijeka u hidrofilnim sustavima. Da bi se molekula lijeka uspješno apsorbirala putem nazalne sluznice, mora imati zadovoljavajuću topljivost u vodi, ali istovremeno i adekvatna lipofilna svojstva koja omogućuje permeaciju kroz lipidni dvosloj. Molekularna masa je dodatni čimbenik koji ograničava transport molekule lijeka kroz lipidni dvosloj (Illum, 2003).

Nazalna apsorpcija malih lipofilnih molekula ograničena je njihovom slabom topljivošću u vodi. Također, javlja se problem uklapanja potrebne doze lijeka u volumen prikladan za nazalnu primjenu (25-250  $\mu\text{L}$  po nosnici). Zbog toga se nazalno mogu primjenjivati niskodozirni lijekovi (do 25 mg), a često se moraju koristiti razni sustavi kako bi se osigurala potrebna doza lijeka u volumenu prikladnom za aplikaciju. Nazalna primjena različitih organskih otapala može uzrokovati iritaciju nazalne sluznice (Behl i sur. 1998). Primjenom ciklodekstrina značajno se povećava topljivost lipofilnih lijekova uslijed nastanka inkluzijskog kompleksa. Pri tome se ne mijenja lipofilnost molekule lijeka, odnosno svojstvo permeabilnost kroz lipofilni dvosloj. Stvaranjem inkluzijskih kompleksa, ciklodekstrini djeluju kao nosači lipofilnih molekula kroz hidrofilne sustave do površine bioloških membrana, održavajući lijek u otopljenom stanju. Na površini membrane dolazi do prijelaza uklopljene molekule lijeka iz kompleksa u lipidni dvosloj. Pri tome je važno

napomenuti kako je inkluzijski kompleks ciklodekstrin-lijek izrazito dinamičan sustav. Pri tome se na površini bioloških membrana stvara visoka koncentracija lijeka raspoloživog za difuziju, što dodatno doprinosi apsorpciji lijeka. Biološke membrane su niskog afiniteta prema hidrofilnim molekulama ciklodekstrina koje ostaju na vanjskoj površini membrane (Masson i sur, 1999) te mogu ulaziti u interakcije s komponentama bioloških membrana i tako mijenjati barijernu ulogu sluznice. Budući da inkluzijski kompleksi lijek/ciklodekstrin prolaze kroz biološke membrane u ograničenom opsegu, prevelika količina ciklodekstrina u obliku može nepovoljno djelovati na nazalnu bioraspoloživost lijeka. Povećanje topljivosti lijeka uslijed nastajanja inkluzijskog kompleksa omogućava uklapanje potrebne doze lijeka u volumen prikladan za nazalnu primjenu. Moguće je pripremiti izotonične otopine lijekova koje sadrže i do 20% hidrofilnih derivata ciklodekstrina, pri fiziološkim pH-vrijednostima. Dodatkom niskih koncentracija hidrofilnih polimera moguće je dodatno povećati topljivost lipofilnih lijekova što se tumači stvaranjem ternarnog kompleksa lijek-CD-polimer (Loftsson, 2002; Loftsson i Másson, 2004).

Nazalnom primjenom estradiola izbjegavaju se visoke plazmatske koncentracije metabolita estrona karakteristične za peroralnu terapiju te se postiže fiziološki odnos koncentracija estrona i estradiola u plazmi. Bioraspoloživost estradiola nakon nazalne primjene kompleksa estradiola s DM- $\beta$ -CD štakorima i zečevima, iznosila je 94.6, odnosno 67.2% u odnosu na intravensku primjenu iste doze lijeka (Hermens i sur., 1990). Nazalnom primjenom estradiola s DM- $\beta$ -CD bolesnicama kojima su uklonjeni jajnici apsorpcija lijeka je brza, a tijekom šestomjesečne hormonske nadomjesne terapije primjenom ovog oblika, nisu uočene nuspojave (Hermens i sur., 1991). S obzirom na rezultate istraživanja razvijen je komercijalni pripravak Aerodiol<sup>®</sup> temeljen na sustavu 17- $\beta$ -estradiol/RAMEB. Kliničkim ispitivanjem na 120 pacijentica tijekom 12 tjedana dokazana je učinkovitost hormonske nadomjesne terapije nazalnom primjenom Aerodiol<sup>®</sup>-a (Pelliser i sur., 2001), praćenjem pomoću Kupermanovog indeksa (KI). KI je parametar koji vrednuje utjecaj simptoma vezanih uz menopauzu na kvalitetu života pacijentica. Nakon 12 tjedana terapije uočena je dobra učinkovitost Aerodiol<sup>®</sup>-a u 92% pacijentica, pri čemu je vrijednosti KI smanjena za oko 80% u odnosu na vrijednost bez terapije. Učestalost vazomotoričkih simptoma menopauze smanjena je za oko 94%, dok su plazmatske koncentracije folikulstimulirajućeg hormona snižene

za oko 40%. Podnošljivost terapije je dobra, nuspojave su se javile u 4.4% slučajeva, a vezane su uz neželjeno djelovanje estrogena. S obzirom na rezultate ispitivanja, autori zaključuju da je optimalna doza Aerodiol<sup>®</sup>-a 300 µg dnevno, a zavisno o težini simptoma, doza se može prilagoditi (100 do 600 µg dnevno).

Nazalna primjena pirodavira ljudima, pokazala se učinkovitom u sprečavanju kliničkih simptoma prehlade nakon eksperimentalno izazvane infekcije rinovirusom (Hayden i sur., 1992). Pirodahir, lipofilni antiviralni lijek primjenjivao se šest puta dnevno u 10%-tnoj otopini HP-β-CD čime se osigurala potrebna topljivost lijeka. Prilikom primjene uočeni su blaži simptomi iritacije sluznice nosa, kao što je osjećaj suhoće sluznice, dok nije primijećena promjena vrijednosti hematoloških i biokemijskih parametara.

Nazalna primjena dihidroergotamina (DHE) ima prednost u terapiji migrene u odnosu na peroralnu primjenu. Trenutno dostupni oblici na tržištu sadrže 4 mg/ml DHE te se za postizanje terapijske doze (2 mg) mora nazalno primijeniti 0.5 ml otopine lijeka, a stabilnost lijeka u takvom obliku je ograničena. Primjenom RAMEB, Martin i sur. (1997) pripremili su vodenu otopinu DHE u koncentraciji 10 mg/mL, a kruti oblik liofilizacijom otopine. U oba sustava omjer DHE:RAMEB iznosio je 1:10. Nazalnom primjenom sustava s RAMEB zečevima, apsolutna bioraspoloživost i farmakokinetički parametri DHE bili su jednaki onima određenim za komercijalno dostupne pripravke (Dihydergot<sup>®</sup> i Diergo<sup>®</sup>). Iako RAMEB nije značajno povećao nazalnu bioraspoloživost DHE, korištenjem ciklodekstrina volumen pripravka potreban za primjenu terapijske doze lijeka smanjen je 2.5 puta, a stabilnost DHE u pripravku je značajno povećana.

Utjecaj RAMEB na nazalnu apsorpciju DHE ispitan je na zdravim dobrovoljcima (van der Kuj i sur., 1999). Ispitanicima je nazalno primijenjena otopina (2 mg DHE u 2% otopini RAMEB), kruti oblik (2 mg DHE/4 mg RAMEB) te komercijalno dostupni pripravak (Diergo<sup>®</sup>) kao kontrola. Novi oblici DHE/RAMEB imaju slične vrijednosti farmakokinetičkih parametara kao i komercijalno dostupni pripravak. Relativna bioraspoloživost DHE nazalnom primjenom otopine, krutog oblika i komercijalno dostupnog pripravka u odnosu na intramuskularnu primjenu iznose 25, 19 i 21%. Relativna peroralna bioraspoloživost DHE u dozi 2 mg iznosi 8%. Tijekom ispitivanja nisu zabilježene ozbiljnije nuspojave. Time su potvrđeni rezultati ispitivanja na animalnom modelu (Marttin i sur., 1997). Nazalnom



primjenom DHE povećana je bioraspoloživost lijeka, a primjenom ciklodekstrina smanjen je volumen otopine koju je potrebno primijeniti. Time je olakšana aplikacija lijeka i ostvarena bolja suradljivost pacijenata, kojima je nazalna primjena sustava s RAMEB bila prihvatljivija u odnosu na komercijalno dostupan pripravak.

Oblikovanje vodenih otopina benzodiazepina prikladnih svojstava za nazalnu primjenu u obliku aerosola otežano je slabom topljivošću lijeka. Ciklodekstrini djeluju kao dobri solubilizatori alprazolama, midazolama i triazolama (Loftsson i sur., 2001). Utjecaj ciklodekstrina na topljivost benzodiazepina se povećava uslijed otvaranja benzodiazepinskog prstena i ionizacije takvog oblika lijeka pri nižim pH-vrijednostima. Prisustvo hidrofilnih polimera uz ciklodekstrine dodatno pridonosi porastu topljivosti benzodiazepina. Otvaranje benzodiazepinskog prstena molekule lijeka je reverzibilno i zavisno o pH-vrijednosti medija, a poluvrijeme reakcije zatvaranja benzenskog prstena midazolama i alprazolama u svježe izoliranom humanom serumu pri 37° C iznosi manje od 2 minute. Pripremljena je otopina midazolama pH-vrijednosti 4.3 koja je sadržavala 17 mg/mL lijeka, 14% SBE- $\beta$ -CD, 0.1% hidroksipropilmetil celuloze i konzervans te je primijenjena nazalno kao aerosol zdravim dobrovoljcima u dozi 0.06 mg/kg. Kao kontrola, midazolam je apliciran intravenski u dozi 2 mg. Nazalnom primjenom midazolam se brzo apsorbirao postićući maksimalnu plazmatsku koncentraciju  $c_{\max}$   $54.3 \pm 5.0$  ng/mL 10-15 minuta ( $t_{\max}$ ) nakon primjene, uz bioraspoloživost  $73 \pm 7\%$ . S obzirom na trajanje sedativnog učinka, brzinu djelovanja i plazmatske koncentracije lijeka, pripravak za nazalnu primjenu midazolama sa SBE- $\beta$ -CD ima slična svojstva kao i komercijalno dostupan intravenski pripravak (Dormicum®). Pripravak nije uzrokovao klinički uočljivu iritaciju sluznice nosa kao ni ozbiljnije nuspojave (Guðmundsdóttir i sur., 2001).

HP- $\beta$ -CD značajno poboljšava topljivost i stabilnost prostaglandina E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) u vodenim sustavima uslijed stvaranja inkluzijskog kompleksa (Gu i sur., 2005). Ispitana je apsorpcija PGE<sub>1</sub> nazalnom primjenom kompleksa štakorima te utjecaj kompleksa na pokretljivost cilija nazalne sluznice *in vitro*. PGE<sub>1</sub> se brzo oslobađa iz inkluzijskog kompleksa te se apsorbira kroz nazalnu sluznicu uzrokujući maksimalno sniženje krvnog tlaka 3 minute nakon primjene. Smanjenje krvnog tlaka je ovisno o primijenjenoj dozi kompleksa PGE<sub>1</sub>/ HP- $\beta$ -CD, a učinkovitost odgovara i.v. primjeni. Utjecaj kompleksa PGE<sub>1</sub>/ HP- $\beta$ -CD na pokretljivost cilija nazalne sluznice u *in vitro* uvjetima je zanemariv.

Nazalna apsorpcija hidrofilnih, polipeptidnih i proteinskih lijekova je relativno niska te se smanjuje s porastom molekularne mase lijeka. U monogobrojnim ispitivanjima na animalnim modelima, dokazano je da su ciklodekstrini, naročito  $\alpha$ -CD i metilirani derivati  $\beta$ -CD učinkoviti promotori nazalne apsorpcije lijekova. Pri tome su uočene varijabilnosti učinka ciklodekstrina kao promotora apsorpcije na različitim životinjskim modelima i ljudima (Merkus i sur., 1999).

Interakcija ciklodekstrina s komponentama biomembrana ispitivana je na štakorima metodom *in situ* perfuzije nosne šupljine otopinama različitih ciklodekstrina (Shao i sur., 1992). Utvrđeno je da  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD i  $\gamma$ -CD uzrokuju ekstrakciju membranskih lipida i proteina. Količina ekstrahiranih proteina rasla je linearno tijekom izvođenja eksperimenata, osim u slučaju DM- $\beta$ -CD, kod kojeg je utvrđena i brza inicijalna faza oslobađanja membranskih proteina (burst effect). Afinitet ciklodekstrina prema ekstrakciji membranskih proteina opada u nizu DM- $\beta$ -CD >  $\alpha$ -CD >  $\beta$ -CD > HP- $\beta$ -CD >  $\gamma$ -CD. Učinkovitost ciklodekstrina u ekstrakciji membranskih lipida slijedi isti niz.  $\beta$ -CD je odgovoran za ekstrakciju proteina i kolesterola iz biomembrana, a  $\alpha$ -CD pokazuje selektivan afinitet prema ekstrakciji membranskih fosfolipida. Selektivnost ovih derivata prema pojedinim membranskim komponentama posljedica je razlike u kemijskoj strukturi pojedinog derivata ciklodekstrina.  $\beta$ -CD ima veći promjer centralne šupljine (15.4 Å) i stvarati će inkluzijske komplekse s većim molekulama u odnosu na  $\alpha$ -CD (promjer centralne šupljine 14.6 Å), pa je interakcija  $\alpha$ -CD s komponentama biomembrane zbog steričkih razloga ograničena samo na fosfolipolipide. Nastajanjem inkluzijskog kompleksa između lipida i proteina s ciklodekstrinima dolazi do njihovog otapanja u vodenoj fazi perfuzata. Ovaj mehanizam je eksperimentalno potvrđen transportom [<sup>3</sup>H] kolesterola iz eritrocita u inkluzijski kompleks s ciklodekstrinima (Ohtani i sur., 1989). Čini se da je ekstrakcija lipida primarni proces nakon kojeg slijedi oslobađanje proteina uslijed erozije lipidnog dvosloja biomembrane.

Selektivna metilacija  $\beta$ -CD primarnih hidroksilnih skupina (C<sub>2</sub> i C<sub>6</sub>) osigurava dobru topljivost te površinsku aktivnost molekule DM- $\beta$ -CD, pa stoga ovaj derivat uzrokuje jaču ekstrakciju komponenata biomembrana. No, čini se da površinska aktivnost molekule DM- $\beta$ -CD nema presudnu ulogu u tom procesu. Uvođenjem treće metilne skupine (na C<sub>3</sub> hidroksilnu skupinu) značajno se povećava površinska aktivnost molekule TM- $\beta$ -CD, no njeno svojstvo ekstrakcije komponenata

biomembrana je na razini  $\beta$ -CD. Čini se da metilacija sekundarne hidroksilne skupine sterički ometa inkorporaciju fosfolipidnih molekula u centralnu šupljinu molekule TM- $\beta$ -CD.

Ekstrakcija komponenata biomembrana slabi njihovu barijerenu ulogu. Aktivnost površinski vezanog enzima 5'-nukleotidaze (5-ND) u perfuzatu ukazuje na stupanj oštećenosti membrane, dok porast aktivnosti enzima laktatdehidrogenaze (LDH), celularnog enzima, ukazuje na razaranje lipidnog dvosloja te izlazak celularnog sadržaja. S obzirom na aktivnost enzima u perfuzatu nosne šupljine štakora, može se zaključiti o relativnoj toksičnosti pojedinih derivata ciklodekstrina (Shao i sur., 1992). HP- $\beta$ -CD u koncentraciji od 5% uzrokuje minimalni porast aktivnosti 5-DH u nazalnom perfuzatu, dok aktivnost LDH nije uočena. Ovi podaci ukazuju da je HP- $\beta$ -CD prikladan promotor apsorpcije nazalno primijenjenih lijekova, s minimalnim lokalnim toksičnim učinkom. Nasuprot tome, DM- $\beta$ -CD uzrokuje značajan porast aktivnosti 5-DH i LDH u nazalnom perfuzatu, što ukazuje na stvaranje pora u staničnom dvosloju što je dovelo do izlaska citosolnih proteina. Ovi rezultati donekle objašnjavaju jači učinak DM- $\beta$ -CD na promociju apsorpcije nazalno primijenjenih lijekova u odnosu na ostale derivate ciklodekstrina, no mogu ukazivati i na potencijalno toksični učinak DM- $\beta$ -CD na nazalnu sluznicu.

Dokazano je da ciklodekstrini djeluju na otvaranje čvrstih međustaničnih spojeva te tako omogućuju paracelularni transport makromolekula (npr. manitol) kroz nazalnu sluznicu. Točan mehanizam djelovanja ciklodekstrina na otvaranje međustaničnih spojeva te povećanje transcelularnog transporta nije do sada poznat, no dokazano je da ciklodekstrini ne ulaze u interakcije sa citoskeletnim elementima čvrstih međustaničnih spojeva. Smatra se da ciklodekstrini zbog interakcije s komponentama biomembrana mijenjaju fluidnost membrane, što dovodi do konformacijskih promjena membranskih proteina te otvaranja čvrstih međustaničnih veza (Martin i sur., 1999, Ashan i sur., 2003).

Oralnom primjenom aciklovira, apsorpcija lijeka je spora te nepotpuna, uz apsolutnu bioraspoloživost od 15-30%. Nazalna apsorpcija aciklovira je ograničena hidrofilnim karakterom molekule lijeka i odvija se procesom pasivne difuzije paracelularnim putem. Primjenom odgovarajućeg promotora apsorpcije lijeka, mogla bi se ostvariti i odgovarajuća nazalna bioraspoloživost aciklovira (Chavanpatil i sur., 2004). Kao promotori nazalne apsorpcije aciklovira ispitivani su, HP- $\beta$ -CD, natrijev

kaprat, deoksikolat, tauroglikolat i EDTA koristeći tehniku in situ perfuzije nosne šupljine štakora. HP- $\beta$ -CD u koncentraciji od 5% pokazao se najučinkovitijim u povećanju nazalne apsorpcije aciklovira. Apsorpcija aciklovira nakon primjene je brza, a nazalna bioraspoloživost bila je 4.7 puta veća u odnosu na bioraspoloživost oralne primjene iste doze lijeka.

Oligopeptidni lijekovi, kao što su različiti analozi hormona koji oslobađa luteinizirajući hormon, burselin i leukoprolid, apsorbiraju se nazalnom primjenom štakorima, no njihova bioraspoloživost je relativno niska. Apsolutna nazalna bioraspoloživost ACTH peptidnog analoga u štakora i zečeva iznosi 15, odnosno 10%. Primjenom 5% DM- $\beta$ -CD kao promotora apsorpcije, apsolutna nazalna bioraspoloživost ACTH peptidnog analoga u štakora i zečeva porasla je na 70, odnosno na 25%. Sličan porast bioraspoloživosti uočen je i za  $\alpha$ -CD, dok je učinkovitost HP- $\beta$ -CD na nazalnu apsorpciju peptidnog analoga ACTH zanemarivo niska (Schipper i sur, 1993<sup>a</sup>). Povećana permeabilnost nazalne sluznice za peptidni analog ACTH je reverzibilna te se smanjuje na fiziološku razinu 1 sat nakon primjene DM- $\beta$ -CD.

Apsolutna nazalna bioraspoloživost buserelina u štakora povećala se na 60% primijenjene doze uz DM- $\beta$ -CD kao promotor apsorpcije, dok je učinkovitost DM- $\alpha$ -CD,  $\alpha$ -CD te  $\beta$ -CD kao promotora nazalne apsorpcije buserelina slabije izražena. Njihovom primjenom apsolutna nazalna bioraspoloživost buserelina povećana je na 30 do 38% (Matsubara i sur., 1995).  $\alpha$ -CD u koncentraciji od 5% učinkovito poboljšava nazalnu apsorpciju leukoprolida u štakora uz apsolutnu bioraspoloživost od 36% (Adjeji i sur, 1992). Primjenom istog sustava na ljudima, učinkovitost  $\alpha$ -CD kao promotora nazalne apsorpcije leuprolida bila je slabije izražena, uz apsolutnu bioraspoloživost lijeka od 4%.

Kalcitonin, polipeptid molekularne mase 3.4 kDa, primijenjen je nazalno štakorima i zečevima uz DM- $\beta$ -CD kao promotor nazalne apsorpcije (Schiper i sur., 1995). U koncentraciji 5%, DM- $\beta$ -CD je poboljšao nazalnu apsorpciju kalcitonina, pri čemu je došlo do sniženja plazmatske koncentracije kalcija u štakora za 24%. Učinak je odgovarao intravenskoj i subkutanoj primjeni kalcitonina štakorima. Više koncentracije DM- $\beta$ -CD (10%) nisu dodatno poboljšale nazalnu apsorpciju kalcitonina. TM- $\beta$ -CD u koncentraciji 5% bio je manje učinkovit kao promotor nazalne apsorpcije kalcitonina u odnosu na DM- $\beta$ -CD iste koncentracije.

Ciklodekstrini sprječavaju agregaciju heksamera inzulina te inhibiraju aktivnost proteolitičkih enzima što može doprinijeti povećanju nazalne bioraspoloživosti (Irie i sur., 1992). Rezultati ispitivanja na animalnim modelima ukazuju da su metilirani ciklodekstrini dobri promotori nazalne apsorpcije inzulina (Merkus i sur., 1991; Schipper i sur., 1993<sup>b</sup>). Nazalnom primjenom sustava inzulina/DM- $\beta$ -CD ljudima, apsolutna bioraspoloživost na zdravim dobrovoljcima je iznosila 3.4%, a na oboljelima od dijabetesa tip I, apsolutna bioraspoloživost je iznosila 5.1% (Merkus i sur., 1996). Nazalna apsorpcija inzulina u ljudi je vrlo niska, čak i uz druge promotore apsorpcije te se ne može smatrati sigurnom alternativom subkutanoj primjeni inzulina u terapiji dijabetesa melitusa. Velika varijabilnost u djelovanju ciklodekstrina kao promotora nazalne apsorpcije inzulina na različitim životinjskim vrstama i ljudima posljedica je anatomskih i fizioloških razlika među vrstama. Eksperimentalni uvjeti, položaj tijela, primjena analgetika i sedativa i dr. također značajno utječu na apsorpciju inzulina (Merkus i sur., 1999).

Istovremena primjena DM- $\beta$ -CD i dodecilmaldozida (DDM) nije povećala nazalnu apsorpciju inzulina (Ashan i sur., 2001). U smjesi DM- $\beta$ -CD i DDM dolazi do nastajanja inkluzijskog kompleksa DDM/DM- $\beta$ -CD što ometa interakciju DM- $\beta$ -CD s komponentama biomembrana. Također, nastajanje inkluzijskog kompleksa sprečava nastajanje micela DDM, a dokazano je da je micelarna solubilizacija komponenta biomembrana jedan od mehanizama kojim DDM doprinosi povećanju nazalne apsorpcije peptida.

HP- $\beta$ -CD (5%) i kitozan (1%) djeluju sinergistički na povećanje nazalne apsorpcije inzulina u štakora (Yu i sur., 2004). Dokazano je da kitozan otvara čvrste međustanične spojeve, pa ciklodekstrini mogu lakše penetrirati u pukotine među stanicama i ekstrahirati fosfolipide iz biomembrana. Pri tome, proteini koji grade čvrste međustanične veze ostaju ogoljeni te mijenjaju svoju konformaciju, što dodatno doprinosi porastu propusnosti nazalne sluznice za makromolekule.

Ciklodekstrini djeluju kao promotori nazalne apsorpcije različitih makromolekula neproteinske strukture. Potencijal i učinkovitost ciklodekstrina kao promotora nazalne apsorpcije heparina niske molekularne mase ispitan je primjenom enoksaparina, komercijalno dostupnog pripravka za s.c. primjenu, s  $\beta$ -CD, HP-  $\beta$ -CD i DM-  $\beta$ -CD (Yang i sur., 2004). Primjenom enoksaparina uz 1.25%  $\beta$ -CD štakorima, nazalna apsorpcija lijeka bila je zanemarivo niska. Ista brzina apsorpcije enoksaparina

postignuta je primjenom lijeka u fiziološkoj otopini. Uz 2.5 i 5%  $\beta$ -CD došlo je do značajnijeg porasta nazalne apsorpcije enoksaparina, pri čemu je značajno porasla i plazmatska koncentracija antifaktora Xa, što ukazuje da je enoksaparin apsorbiran u biološki aktivnom obliku putem nazalne sluznice. Smatra se da je postignuta plazmatska koncentracija antifaktora Xa 0.2 U/ml dostatna za antitrombotski učinak u glodavaca. Povećanje koncentracije  $\beta$ -CD s 1.25 na 2.5% uzrokovalo je porast biorasploživost heparina niske molekularne mase za 1.5 puta. No povećanje primijenjene koncentracije  $\beta$ -CD s 2.5 na 5% nije uzrokovalo daljnji porast biorasploživosti enoksaparina, kao ni daljnji porast plazmatske koncentracije antifaktora Xa.  $\beta$ -CD je ograničene topljivosti (1.8%), te je bez obzira na porast koncentracije ciklodekstrina, broj molekula ciklodekstrina koje mogu utjecati na apsorpciju enoksaparina ostao isti. Nazalnom primjenom enoksaparina uz HP-  $\beta$ -CD (1.25 i 2.5%) apsorpcija lijeka je bila zanemarivo niska. Primjenom enoksaparina uz 5% HP-  $\beta$ -CD, plazmatska koncentracije antifaktora Xa bila je na graničnoj vrijednosti za koju se smatra da može uzrokovati terapijski učinak. Primjenom enoksaparina zajedno s 5% DM-  $\beta$ -CD biorasploživost enoksaparina povećala se za 8 puta. DM-  $\beta$ -CD djeluje i kao promotor nazalne apsorpcije ostalih heparina niske molekularne mase, tinzaparina i dalteparina, koji se strukturno i farmakokinetički razlikuju od enoksaparina. Sva tri heparina niske molekularne mase uzrokovala su sličan porast plazmatske koncentraciju antifaktora Xa. Ta činjenica ukazuje da porast apsorpcije nije uzrokovan interakcijom ciklodekstrina s molekulama lijeka, već je to posljedica utjecaja ciklodekstrina na permeabilnost nazalne membrane. Zbog velike molekularne mase, nije vjerojatno da bi enoksaparin, tinzaparin i dalteparin stvarali inkluzijske komplekse s DM-  $\beta$ -CD.

Učinak DM-  $\beta$ -CD na permeabilnost nazalne membrane za heparine niske molekularne mase bio je reverzibilan. Ako se enoksaparin primijenio neposredno nakon primjene 5%-tne otopine DM-  $\beta$ -CD, nazalna biorasploživost lijeka bila je jednaka onoj nakon istovremene primjene enoksaparina i DM-  $\beta$ -CD. Primjenom enoksaparina 1, 2, 4 i 6 sati nakon primjene otopine DM-  $\beta$ -CD, došlo je do statistički značajne promjene (smanjenja) vrijednosti maksimalne plazmatske koncentracije ( $c_{max}$ ) te biorasploživosti lijeka u odnosu na onu nakon istovremene primjene enoksaparina i DM- $\beta$ -CD. Ti podaci ukazuju da je učinak DM-  $\beta$ -CD na nazalnu membranu privremen te nestaje s vremenom, a barijerna se funkcija sluznice

normalizira tijekom 6 sati. Reverzibilni učinak DM-  $\beta$ -CD na barijerna svojstva nazalne mukoze isključuje toksični učinak ovog derivata ciklodekstrina na nazalnu sluznicu.

Utjecaj DM-  $\beta$ -CD na apsorpciju  $^3\text{H}$ -enoksaparina ispitan je i na monosloju kulture stanica 16HBE14o $^-$ , koje tvore dobro oblikovane međustanične spojeve te su morfološki slične stanicama nazalne sluznice. Rezultati ukazuju da DM-  $\beta$ -CD uzrokuje otvaranje čvrstih međustaničnih spojeva te porast paracelularne permeabilnosti. Imunocitokemijskim metodama je dokazano da se pri tome stanjuje proteinski pojas koji obuhvaća stanicu u zoni okludens, a stanice mijenjaju svoju morfologiju. HP-  $\beta$ -CD uzrokuje blaže promjene u građi zone okludens, a i morfološka promjena stanica u monosloju nije toliko izražena. To ukazuje da ciklodekstrini uzrokuju reorganizaciju ZO-1 proteina na kontaktnim mjestima između dvije stanice te tako mijenjaju paracelularnu barijernu funkciju stanica. Da li je otvaranje čvrstih staničnih spojeva povezano sa solubilizacijom membranskih komponenata ili su ti procesi nezavisni, još nije razjašnjeno.

#### **1.4.2. Toksični učinak nazalno primijenjenih ciklodekstrina**

Toksični učinak ciklodekstrina nazalnom primjenom može biti lokaliziran na nazalnu sluznicu i/ili sistemski. Ispitan je utjecaj hidrofilnih derivata ciklodekstrina na histološki integritet sluznice štakora kako bi se odredila njihova prikladnost kao promotora topljivosti lijekova u otopinama za nazalnu primjenu (Asai i sur., 2002). Ciklodekstrini uzrokuju lizu staničnih membrana zbog ekstrakcije komponenata, kao što su kolesterol, fosfolipidi te naročito fosfatidilkolin i sfingomijelin iz vanjskog dijela membranskog dvosloja. Opsežna ekstrakcija membranskih komponenata uslijed interakcije s ciklodekstrinima može dovesti do destrukcije membrane. Praćenjem histoloških promjena nazalne sluznice uzrokovanih primjenom ciklodekstrina može se direktno evaluirati citotoksični učinak ciklodekstrina. Da bi se ostvarila potrebna topljivost lijeka, često se primjenjuju visoke koncentracije ciklodekstrina, a dokazano je da hipertonične ili hipotonične otopine mogu uzrokovati strukturne promjene na epitelnim stanicama sluznice nosa. Kako bi se isključio taj učinak, pripremljene su izotonične otopine  $\beta$ -CD, HP-  $\beta$ -CD i RAMEB. Kratkotrajna izloženost nazalne

sluznice tijekom 5 minuta 1.5%-tnoj otopini  $\beta$ -CD te otopinama HP- $\beta$ -CD u koncentraciji 5 i 20% nije uzrokovala statistički značajne promjene na sluznici u usporedbi s kontrolnom skupinom životinja, koja je bila tretirana fiziološkom otopinom. Dugotrajna izloženost nazalne sluznice 10% otopini HP-  $\beta$ -CD tijekom 30 i 60 minuta nije uzrokovala histološke promjene na sluznici, dok je dugotrajna izloženost otopini RAMEB pri koncentraciji 20% značajno povećala sekreciju mucina, a uočeno je stanjivanje epitelnog sloja nazalne sluznice. Histološke promjene sluznice tijekom dugotrajne izloženosti 10% otopini RAMEB bile su slabije izražene u odnosu na skupinu koja je bila izložena nižim koncentracijama RAMEB-a (5%) tijekom 5 minuta. Pojačana sekrecija mucina tijekom dugotrajne izloženosti višim koncentracijama RAMEB te mukocilijarni klirens uzrokuje smanjenje lokalne koncentracije RAMEB, čime se umanjuje njegov toksični učinak na nazalnu sluznicu. Tijekom dugotrajne izloženosti nazalne sluznice visokim koncentracijama RAMEB (20%), mikroskopski su uočene histološke promjene, kao što je deplacija cilija te nastajanje velikih pukotina u membrani. Dugotrajna izloženost sluznice HP- $\beta$ -CD i RAMEB u koncentraciji 10% nije uzrokovala značajnije histološke promjene na sluznici, no u skupini koja je bila tretirana s RAMEB cilije su bile slijepljene i prekrivene većom količinom sluzi. Čini se da povećana sekrecija sluzi blokira toksičan učinak 10% otopine RAMEB, pa nakon uzastopne primjene otopina RAMEB u koncentraciji 10 i 20% nisu uočene značajnije promjene nazalne sluznice.

Cilioinhibitorski učinak ciklodekstrina ispitan je na različitim modelima nazalnog tkiva (Agu i sur., 2000). Maksimalno smanjenje pokretljivosti cilija za  $36 \pm 5\%$  uočeno je tijekom tretmana stanica 10% otopinom DM- $\beta$ -CD kroz 45 minuta. Pri tome je važno naglasiti da je samo 50% promatranih cilija bilo u stazi, dok je pokretljivost preostalih cilija bila dobra. Prema rezultatima Shippera i sur. (1992), otopina 2% DM- $\beta$ -CD uzrokovala je smanjenje brzine gibanja cilija na modelu humanog te pilećeg embrija za oko 60%. Veće koncentracije DM- $\beta$ -CD (5%) uzrokovale su ireverzibilnu ciliostazu na istom modelu. Sličan učinak uočen je i za otopine  $\alpha$ -CD pri koncentracijama 2 i 5%. Otopina HP- $\beta$ -CD pri koncentraciji 10% uzrokuje minimalno smanjenje brzine gibanja cilija na modelu pilećeg embrija, dok  $\gamma$ -CD nema učinak na pokretljivost cilija (Merkus i sur., 1993). Općenito se može zaključiti da je cilioinhibitorski učinak ciklodekstrina uočen samo tijekom dugotrajne izloženosti visokim koncentracijama ciklodekstrina, a u *in vivo* sustavima može se



očekivati kako će se sekrecijom sluzi te djelovanjem mukocilijarnog sustava čišćenja minimalizirati cilioinhibitorni učinak ciklodekstrina.

Vjerojatnost sistemske toksičnosti povezana je sa stupnjem sistemske apsorpcije ciklodekstrina nakon nazalne primjene. Toksični učinak ciklodekstrina povezan je samo s parenteralnom primjenom  $\beta$ -CD te metiliranih derivata  $\beta$ -CD, a manifestira se kao renalna toksičnost, odnosno hemoliza. Nakon nazalne primjene sustava lijek/CD, samo se molekula lijeka apsorbira, a apsorpcija ciklodekstrina i kompleksa je zanemarivo niska te za DM- $\beta$ -CD iznosi 2.5 do 4% inicijalno primijenjene doze. Ostatak ciklodekstrina koji se ne apsorbira putem nazalne sluznice uklanja se iz nosne šupljine djelovanjem mukocilijarnog sustava čišćenja. Mukocilijarni sustav čišćenja transportira ciklodekstrin prema nazofaringu te se gutanjem transportira u gastrointestinalni sustav. Apsorpcija ciklodekstrina u gastrointestinalnom sustavu je također zanemarivo niska. Zbog niske nazalne i oralne apsorpcije, samo mali udio nazalno primijenjene doze ciklodekstrina se apsorbira u sistemske cirkulaciju. S obzirom na uobičajene doze DM- $\beta$ -CD u pripravcima za nazalnu primjenu, pojedinačnom primjenom doza DM- $\beta$ -CD iznosi 2 do 7.5 mg. Čak i da dođe do potpune sistemske apsorpcije ciklodekstrina, što nije vrlo vjerojatno, maksimalna doza DM- $\beta$ -CD bi iznosila 0.1 mg/kg tjelesne mase. Pri tako niskim dozama, vjerojatnost pojave simptoma sistemske toksičnosti ciklodekstrina je zanemarivo niska, te se može zaključiti kako je nazalna primjena niskih koncentracija ciklodekstrina u potpunosti sigurna (Irie i Uekama, 1997; Merkus i sur., 1999).

### **1.4.3. Utjecaj ciklodekstrina na oslobađanje lijekova iz polimernih matriksa**

Nazalna primjena lijekova ograničena je djelovanjem mukocilijarnog sustava čišćenja (Illum, 2003). Oblikovanjem mikročestica s različitim mukoadhezivnim polimerima osigurava se dulje zadržavanje terapijskog sustava na mjestu primjene čime se povećava bioraspoloživost lijeka. Oslobađanje lipofilnih lijekova iz mukoadhezivnih mikročestica je često nepotpuno uslijed njihove slabe topljivosti. Kako oslobađanje lijeka iz oblika ne bi bio korak koji ograničava apsorpciju lijeka, potrebno je osigurati zadovoljavajuću topljivost lijeka, a da se pri tome ne mijenja njegovo svojstvo prolaska kroz biološke membrane, odnosno lipofilnost molekule (Loftsson, 2002). Primjenom ciklodekstrina može se utjecati na brzinu i mehanizam oslobađanja lipofilnih lijekova iz polimernih matriksnih sustava (Rajewski i Stella 1996, Biby i sur., 2000).

Inkluzijski kompleks i/ili fizička smjesa ciklodekstrin/lijek može modificirati topljivost i/ili svojstvo difuzije lijeka u izdubrenom polimernom matriksu, poboljšati hidrataciju polimernog matriksa ili promovirati njegovu eroziju. Ciklodekstrini doprinose porastu brzine oslobađanja lipofilnih lijekova iz polimernog matriksa povećavanjem koncentracije lijeka raspoloživog za difuziju stvaranjem inkluzijskog kompleksa. Na taj način nastaje visoki koncentracijski gradijent lijeka unutar izdubrenog polimernog matriksa što dodatno doprinosi porastu brzine oslobađanja lijeka. Pri niskom udjelu lijeka u polimernom matriksu ili u slučaju umreženih polimernih matriksa, interakcija ciklodekstrin-lijek smanjiti će difuzibilnost lijeka kroz polimerni matriks te tako usporiti oslobađanje lijeka (Biby i sur., 2000).

Ciklodekstrini u polimernim sustavima mogu ubrzati oslobađanje lijeka djelujući osmotski, stvarajući pore unutar polimernog matriksa ili ubrzavajući eroziju polimernog matriksa.  $\beta$ -CD je ubrzao oslobađanje triamcinolon acetonida iz peleta oblikovanih s mikrokristaliničnom celulozom (MKC). Oslobađanje lijeka iz peleta koji su sadržavali lijek,  $\beta$ -CD i MKC u omjeru 5:90:5 bilo je potpuno nakon 2 sata, a deseterostruko niži udio  $\beta$ -CD u sustavu smanjuje količinu oslobođenog lijeka nakon 2 sata na 60%. Oslobađanje lijeka iz peleta koji su sadržavali samo lijek i MKC u omjeru 5:5, bilo je sporo i nepotpuno (manje od 20% tijekom 2 sata). Nakon 5 sati ispitivanja oslobađanja lijeka, snimljene su pretražne elektronske mikrofografije, te je

uočena povećana poroznost peleta koji su sadržavali  $\beta$ -CD. U kontaktu s vodom dolazi do otapanja  $\beta$ -CD pri čemu se povećava poroznost matriksnog sustava. Triamcinolon stvara stabilni inkluzijski kompleks sa  $\beta$ -CD ( $K_s = 2800 \text{ M}^{-1}$ ), pri čemu se topljivost lijeka povećala višestruko, što dodatno doprinosi poboljšanju oslobađanja lijeka iz peleta (Villar-Lopez i sur, 1999).

Ciklodekstrini povećavaju hidrataciju polimernog matriksa te na taj način ubrzavaju oslobađanje lijeka iz polimernog matriksa (Gürson i sur., 1995).  $\beta$ -CD je korišten kao promotor oslobađanja dipiridamola iz tabletiranih mikrosfera, a dodavao se tijekom tabletiranja. Time je ubrzana difuzija vode u tabletu a i oslobađanje lijeka. Dipiridamol ne stvara inkluzijske komplekse s  $\beta$ -CD, te se brže oslobađanje lijeka ne može pripisati interakciji ciklodekstrin/lijek.

Loftsson i sur., (1992) oblikovali su mikrokapsule citostatika karboplatina s etilcelulozom i HP-  $\alpha$ -CD. *In vitro* oslobađanje lijeka iz mikrokapsula s HP-  $\alpha$ -CD bilo je značajno ubrzano u odnosu na mikročestice koje su sadržavale samo lijek. Poboljšana svojstva hidratacije te brže bubrenje mikrokapsula HP-  $\alpha$ -CD doprinijelo je bržem i potpunijem oslobađanju lijeka. Terapijska učinkovitost novog terapijskog sustava ispitana je na štakorima s tumorom mozga (glioma model). Skupine životinja primile su intratumorsku injekciju mikrokapsula karboplatina sa i bez HP-  $\alpha$ -CD dok je kontrolna skupina životinja bila tretirana placebo mikrokapsulama etilceluloze. Srednje vrijeme preživljavanja skupina životinja iznosilo je 51, 34 odnosno 24 dana. Uklapanje kompleksa karboplatina sa HP-  $\alpha$ -CD u mikrokapsule zaštitila je lijek od biorazgradnje u tumorskom tkivu te je poboljšala *in vivo* profil oslobađanja što je doprinijelo duljem vremenu preživljavanja životinja.

Bioadhezivne i biorazgradive mikrosfere s ciklodekstrinima za nazalnu primjenu gabeksat mesilata (GM) pripremljene su umrežavanjem alkalne otopine škroba i  $\alpha$ -,  $\beta$ - ili  $\gamma$ -CD s epiklordihrinom (Fundueanu i sur., 2004). Postotak uklapanja  $\alpha$ -,  $\beta$ - ili  $\gamma$ -CD u škrobne mikročestice iznosi 18.28, 19.04, odnosno 27.40%. GM je uklopljen u mikrokapsule močenjem placebo mikrokapsula u vodenoj otopini lijeka uz solvent evaporaciju ili liofilizaciju. UV, IR i DSC ispitivanja ukazuju da hidrofilni GM stvara inkluzijske komplekse sa ciklodekstrinima unutar mikročestica uklapanjem benzenskog prstena molekule lijeka u centralnu šupljinu ciklodekstrina. Konstante stabilnosti kompleksa GM s  $\alpha$ -,  $\beta$ - ili  $\gamma$ -CD iznose 15 000, 3751, odnosno 6200  $\text{M}^{-1}$ , a postotak uklapanja lijeka iznosio je oko 3%, neovisno o

metodi uklanjanja otapala. *In vitro* oslobađanje lijeka iz mikrokapsula u koje je GM uklopljen metodom solvent evaporacije bilo je postupno, a tijekom 30 minuta oslobodilo se 90-95% početno uklopljenog lijeka. Stabilnost kompleksa lijek-ciklodekstrin nema presudan učinak na brzinu oslobađanja GM iz mikročestica, a mehanizam oslobađanja lijeka zavisi o korištenom derivatu ciklodekstrina. Oslobađanje GM iz mikročestica s  $\alpha$ -CD kontrolirano je difuzijom, dok je kod mikročestica s  $\beta$ -CD, odnosno  $\gamma$ -CD, oslobađanje kontrolirano difuzijom i erozijom polimernog matriksa. Mikrokapsule u koje je GM uklopljen metodom liofilizacije bile su porozne teksture te je *in vitro* oslobađanje lijeka bilo vrlo brzo (70% tijekom prve minute). Interakcijom GM s ciklodekstrinima unutar mikrokapsula znatno je povećana stabilnost molekule lijeka. Sve mikrokapsule imale su dobra mukoadhezivna svojstva te se čini kako su one pogodan terapijski sustav za nazalnu primjenu lijekova.

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Utjecaj ciklodekstrina na transmukoznu apsorpciju lijekova je vrlo aktualna tema znanstvenih istraživanja jer je dokazano da ciklodekstrini djeluju kao promotori apsorpcije lijekova primijenjenih na sluznice. Hidroksipropil- i dimetil- $\beta$ -ciklodekstrin ne uzrokuju vidljivo oštećenje sluznice čak ni nakon uzastopne primjene (Asai i sur., 2002), a pokazuju protektivan učinak na nazalnu sluznicu nakon primjene terapijskih sustava koji sadrže druge promotore apsorpcije.

Mukoadhezivne mikročestice su prikladan terapijski sustav za nazalnu primjenu lijekova. Njihovom primjenom osigurano je dugotrajno zadržavanje lijeka na mjestu primjene, što pozitivno djeluje na nazalnu bioraspoloživost lijeka (Ugwoke i sur, 2005). Oslobođanje lipofilnih lijekova iz mikročestica je često nepotpuno uslijed njihove slabe topljivosti. Kako oslobođanje lijeka iz oblika ne bi ograničavalo apsorpciju lijeka, potrebno je osigurati zadovoljavajuću topljivost lijeka u izdubrenom polimernom matriksu. Primjenom ciklodekstrina može se poboljšati topljivost lipofilnih lijekova u hidrofilnim sustavima, a time povećati bioraspoloživost lijeka (Rajewski i Stella 1996; Loftsson 2002).

Utjecaj ciklodekstrina na oblikovanje i karakteristike mukoadhezivnih mikročestica s lipofilnim lijekovima nije do sada sustavno izučavan. Mukoadhezivne mikročestice s ciklodekstrinima mogle bi biti potencijalan sustav za nazalnu primjenu lijekova s učinkom na SŽS, te je njihovo oblikovanje i karakteristike potrebno detaljnije proučiti. Kao modeli lijekova korišten je anksiolitik i antikonvulziv lorazepam te antipsihotik risperidon.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- Ispitati utjecaj hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina na topljivost lorazepama i risperidona u vodi te karakterizirati interakciju lijekova s hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom određivanjem konstante stabilnosti kompleksa. Također, potrebno je ispitati utjecaj ostalih parametara, kao što su pH-vrijednost medija i prisustvo mukoadhezivnih polimera na topljivost lijeka te na interakciju lijekova s hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom.
- S obzirom na rezultate ispitivanja interakcije lijekova s hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom u vodi, odabrati odgovarajuću metodu za pripremu inkluzijskog kompleksa lorazepama odnosno risperidona s hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom u čvrstom stanju, te karakterizirati dobiveni kompleks.

- Oblikovati mikročestice lorazepama i risperidona s hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom te hidroksipropilmetil celulozom i karbomerom kao mukoadhezivnim polimerima. Da bi se ispitaio utjecaj ciklodekstrina na svojstva pripremljenih čestica, potrebno je pripremiti i mikročestice bez hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina.
- Oblikovane mikročestice potrebno je karakterizirati s obzirom na uklapanje djelatne tvari, raspodjelu veličina čestica, vrijednost zeta-potencijala te na svojstva oslobađanja djelatne tvari u *in vitro* uvjetima. Pri tome će se odrediti mehanizam koji kontrolira oslobađanje djelatne tvari iz mikročestica. Nadalje, ispitati će se utjecaj korištenih polimera pri oblikovanju mikročestica na difuziju lijekova kroz polupropusnu membranu u *in vitro* uvjetima na prikladnom modelu te na mukoadhezivna svojstva pripremljenih mikročestica.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### **3.1. Materijali**

Kao modeli lijekova korišteni su lorazepam (Belupo, Hrvatska) i risperidon (Pliva, Hrvatska). Inkluzijski kompleksi oblikovani su sa hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom (HP- $\beta$ -CD) prosječne molarne supstitucije 0.9 (Wacher Chemie GmbH, Njemačka). Kao mukoadhezivni polimeri korišteni su hidroksipropil metilceluloza (HPMC, Metolose<sup>®</sup> 90 SH;  $\eta = 4000$  mPa s; Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japan) i karbomer (Carbopol<sup>®</sup> 941,  $\eta = 4000$ -10 000 mPa s; Noveon, USA).

Svi ostali materijali i otapala upotrijebljeni u izradi ovog rada bili su farmakopejskog stupnja čistoće i korišteni su bez daljnjeg pročišćavanja.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Određivanje konstante stabilnosti kompleksa metodom određivanja topljivosti lijeka utjecajem ciklodekstrina

Konstanta stabilnosti kompleksa ( $K_s$ ) risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD u vodenim sustavima određena je ispitivanjem utjecaja ciklodekstrina na topljivost lijekova pri različitim pH-vrijednostima medija prema metodi Higuchija i Connorsa (1965). Za sustave pH-vrijednosti 3 do 9 korišteni su fosfatni puferi, a za sustave pH-vrijednost 10.4 korišten je amonijakalni pufer. Svi puferi pripremljeni su prema propisima Ph Eur (2002).

U niz Erlenmayerovih tikvica odvagano je po 0.1 g risperidona ili 0.05 g lorazepama te je dodano po 20 ml otopine HP- $\beta$ -CD različitih koncentracija (0- 40 mmol L<sup>-1</sup>) pripremljenih korištenjem navedenih pufera. Uzorci su miješani magnetnom miješalicom (600 okretaja/minuti) pri 25°C tijekom 24 sata do uspostavljanja ravnoteže topljivosti. pH-vrijednost uzoraka pratila se tijekom cijelog eksperimenta (pH-metar, Mettler Toledo GmgH, Švicarska). Neotopljeni lijek iz uzoraka uklonjen je filtracijom (Milipore<sup>®</sup>, 0.20  $\mu$ m), a nakon razrjeđenja filtrata metanolom, sadržaj lijeka u uzorcima određen je spektrofotometrijski (Ultrospec Plus, LKB, Pharmacia, Švedska). Risperidon se određivao mjerenjem apsorbancije pri valnoj dužini 280 nm (El-Sherif et al, 2005), a lorazepam pri 230 nm (Puglia et al, 2001). Prisustvo ciklodekstrina u uzorcima te pH-vrijednost sustava nije utjecala na vrijednost apsorbancije lijekova pri ispitivanim valnim duljinama.

Konstanta stabilnosti kompleksa određena je iz grafičkog prikaza zavisnosti topljivosti lijekova o koncentraciji ciklodekstrina prema jednadžbi (1):

$$K_s = \frac{tg\alpha}{s_0(1-tg\alpha)} \quad (1)$$

gdje  $tg\alpha$  predstavlja koeficijent smjera pravaca izoterme topljivosti, a  $S_0$  predstavlja topljivost lijeka u sustavu bez ciklodekstrina.

Analizom izoterme topljivosti određena je učinkovitost kompleksiranja (eng. "complexation efficiency"). Učinkovitost kompleksiranja (UK) definirana je izrazom:

$$UK = \frac{[CD-L]}{[CD]_s} \quad (2)$$

pri čemu  $[CD-L]$  označava koncentraciju inkluzijskog kompleksa, a  $[CD]_s$  koncentraciju slobodnih molekula ciklodekstrina. Uz pretpostavku nastajanja inkluzijskog kompleksa stehiometrijskog odnosa lijek:ciklodekstrin 1:1, konstante stabilnosti  $K_s$ , koncentracija inkluzijskog kompleksa u sustavu izražava se kao:

$$[CD-L] = K_s \times s_0 \times [CD]_s \quad (3)$$

Učinkovitost kompleksiranja se tada može definirati izrazom:

$$UK = \frac{s_0 \times [CD]_s \times K_s}{[CD]_s} = s_0 \times K_s \quad (4)$$

Uvrštavanjem jednadžbe (1) u izraz (4) dobije se:

$$UK = \frac{tg\alpha}{1-tg\alpha} \quad (5)$$

### **3.2.2. Određivanje konstante stabilnosti kompleksa i uspješnosti uklapanja lijeka u vodi utjecajem polimera**

Utjecaj polimera na nastajanje inkluzijskog kompleksa risperidona i lorazepamima s HP- $\beta$ -CD u vodenim sustavima ispitan je dodatkom 0.1% HPMC te 0.1% karbomera u niz uzoraka koji su sadržavali 0.1 g risperidona ili 0.05 g lorazepamima te 20 ml vodene otopine HP- $\beta$ -CD različitih koncentracija (0-40 mmol L<sup>-1</sup>). Uzorci su sonicirani u ultrazvučnoj kupelji (Branson Ultrasonic, Nizozemska) pri 70 °C tijekom 60 minuta kako bi se potaknula interakcija polimer-ciklodekstrin-lijek. Nakon toga, uzorci su miješani magnetnom miješalicom (600 okretaja/minuti) pri 25 °C tijekom 76 sati, tj. do uspostavljanja ravnoteže topljivosti. Neotopljeni lijek uklonjen je iz uzoraka centrifugiranjem (4000 okretaja/minuti, 15 minuta), a sadržaj otopljenog lijeka određen je spektrofotometrijski na ranije opisani način.

Konstanta stabilnosti kompleksa ( $K_s$ ) i uspješnost uklapanja (UK) u disperzijama polimera određeni su analizom izoterme topljivosti prema jednadžbama (1) i (5).

### **3.2.3. Ispitivanje utjecaja ciklodekstrina na nastajanje interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera u vodenim sustavima različitih pH-vrijednosti**

Utjecaj HP- $\beta$ -CD na nastajanje interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera u otopini ispitan je u vodi te puferima pH-vrijednosti 3.0 i 7.4 mjerenjem turbidnost uzoraka (Ikinči i sur., 2000). Uzorci su pripremljeni miješanjem otopina HPMC i karbomera u različitim omjerima (1:9, 2:8, 4:6, 5:5, 6:4, 8:2 i 9:1) te razrijeđeni vodom ili fosfatnim puferima pH-vrijednosti 3.0 i 7.4. Ukupna koncentracija polimera u ispitivanim uzorcima iznosila je 0.01%. Pripremljeni su i uzorci s HP- $\beta$ -CD koncentracija 0.05, 0.25 i 0.5%. Uzorci su miješani 1 sat na sobnoj temperaturi, a turbidnost uzoraka određivala se mjerenjem apsorbancije pri 600 nm. Apsorbancija polimera i ciklodekstrina u ispitivanim sustavima pri toj valnoj dužini je zanemariva.

### **3.2.4. Priprema kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD u čvrstom stanju**

Lijek (0.821 g risperidona ili 0.642 g lorazepama) otopljen je u 50 ml koncentriranog etanola, a 3.0 g HP- $\beta$ -CD otopljeno je u 50 ml vode. Ove otopine su pomiješane, te su miješane 24 sata na sobnoj temperaturi kako bi se uspostavila ravnoteža u nastajanju inkluzijskog kompleksa. Kruti produkt iz otopine izoliran je metodom sušenja raspršivanjem (Büchi 190 Mini Spray dryer, Švicarska) ili evaporacijom pri 60 °C. Sušenje raspršivanjem provedeno je pri brzini protoka otopina 0.25 Lh<sup>-1</sup>, ulaznoj temperaturi 150 °C, izlaznoj temperaturi 100 °C i brzini protoka zraka 700 NLh<sup>-1</sup>.

Pripremljene su i vodeno-etanolne otopine lijekova bez ciklodekstrina, a otapalo je uklonjeno evaporacijom te metodom sušenja raspršivanjem.

### **3.2.5. Priprema interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera u čvrstom stanju**

Interpolimerni kompleks HPMC i karbomera masenog omjera 1:1 u krutom stanju pripremljen je metodom sušenja raspršivanjem otopine polimera. Otopina HPMC (1%) pripremljena je dispergiranjem HPMC u vrućoj vodi (80°C) uz miješanje do ohlađenja, a otopina karbomera (1%) pripremljena je dispergiranjem polimera u vodi brzohodnom miješalicom (1200 okretaja/min) tijekom 20 minuta. Otopine su međusobno pomiješane, te miješane na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata da bi se osiguralo nastajanje interpolimernog kompleksa. Nakon toga, otopina polimera je sušena raspršivanjem, a uvjeti rada uređaja opisani su u poglavlju 3.2.4.

Interpolimerni kompleks HPMC i karbomera s HP- $\beta$ -CD pripremljen je na isti način. Koncentracija ciklodekstrina u otopini iznosila je 0.5%.

### **3.2.6. Priprema mukoadhezivnih mikročestica risperidona i lorazepama**

Mikročestice risperidona i lorazepama pripremljene su metodom sušenja raspršivanjem. 0.5 g lijeka ili ekvivalentna količina inkluzijskog kompleksa otopljen je u koncentriranom etanolu, a 0.5 g HPMC, karbomera ili interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera dispergirano je u 50 mL pročišćene vode. Maseni omjer mukoadhezivnog polimera i lijeka u svim sustavima iznosio je 1:1. Pripremljene otopine su međusobno pomiješane, a mikročestice su oblikovane metodom sušenja raspršivanjem. Uvjeti rada instrumenta su opisani u poglavlju 3.2.4. Sastav oblikovanih mikročestica prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav oblikovanih mikročestica:

a) mikročestice s lorazepamom

	ML1	ML2	ML3	ML4	ML5	ML6
lorazepam / (g)	0.50	-	0.50	-	0.50	-
kompleks / (g)	-	2.84	-	2.84	-	2.84
HPMC / (g)	0.50	0.50	-	-	-	-
karbomer / (g)	-	-	0.50	0.50	-	-
IPK* / (g)	-	-	-	-	0.50	0.50

b) mikročestice s risperidonom

	MR1	MR2	MR3	MR4	MR5	MR6
risperidon / (g)	0.50	-	0.50	-	0.50	-
kompleks / (g)	-	2.33	-	2.33	-	2.33
HPMC / (g)	0.50	0.50	-	-	-	-
karbomer / (g)	-	-	0.50	0.50	-	-
IPK* / (g)	-	-	-	-	0.50	0.50

\* interpolimerni kompleks HPMC i karbomera

### 3.2.7. Određivanje distribucije veličine čestica

Distribucija veličina čestica određena je pomoću mikroskopa (Olympus BH-2, SAD). Uzorak je nanesen u tankom sloju na predmetno staklo te je promatran pod mikroskopom uz povećanje 400 x. Slika je digitalizirana te analizirana kompjuterskim sustavom za analizu slike (Optomax V, Velika Britanija). Ovom metodom ispitana je distribucija veličina čestica raspršivanjem osušenih lorazepama i risperidona, njihovih kompleksa s HP- $\beta$ -CD te oblikovanih mukoadhezivnih mikročestica.

### **3.2.8. Određivanje sadržaja lijeka u sustavima**

U odmjerne tikvice odvagano je 0.025 g čvrstog produkta koji je otopljen uz soniciranje i mućkanje u 10 mL koncentriranog metanola. Sadržaj risperidona i lorazepama u uzorcima određen je spektrofotometrijski kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. nakon razrjeđenja s istim otapalom na koncentraciju pogodnu za mjerenje.

### **3.2.9. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)**

DSC termogrami snimljeni su korištenjem uređaja Perkin-Elmer DSC 7, (SAD) u atmosferi dušika nakon kalibracije indijem i cinkom. Uzorci (2-5 mg) odvuđnuti su u aluminijske posudice, a termogram je snimljen pri brzini zagrijavanja od 10 °C min<sup>-1</sup> u temperaturnom rasponu od 20-220 °C. Ovom metodom analizirani su lorazepam i risperidon, inkluzijski kompleksi lijekova s HP-β-CD te mikročestice.

### **3.2.10. Infracrvena spektroskopija s Fourier-ovim transformacijama (FTIR)**

FTIR spektri snimljeni su korištenjem disperzije uzoraka (1% w/w) u kalijevom bromidu. Uzorci su komprimirani u diskove, a spektri su snimljeni koristeći Perkin-Elmer Spectrum GX spektrometar (SAD) u području valnih brojeva 4000 do 500 cm<sup>-1</sup>. Za svaki uzorak snimljeno je 16 spektara pri rezoluciji od 4 cm<sup>-1</sup>. Ovom metodom analizirani su lorazepam i risperidon, inkluzijski kompleksi lijekova s HP-β-CD, mukoadhezivni polimeri te interpolimerni kompleks HPMC i karbomera.

### **3.2.11. Određivanje vrijednosti zeta-potencijala**

Zeta potencijal mikročestica određen je mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica u električnom polju foton-korelacijskom spektroskopijom koristeći Malvern 3000 HS Zetasizer (Velika Britanija). Mikročestice su dispergirane

u 10 mmol L<sup>-1</sup> otopini natrijevog klorida, a mjerenja su izvedena pri 25°C. Ovom tehnikom analizirane su mikročestice lorazepam i risperidona, HPMC, karbomer i interpolimerni kompleks koji su oblikovani u mikročestice bez lijeka te raspršivanjem osušeni lorazepam i risperidon.

### **3.2.12. Ispitivanje mukoadhezivnosti**

Mukoadhezivnost mikročestica određena je mjerenjem rada adhezije potrebnog za prekidanje mukoadhezivne veze između uzorka i sluznice. Kao mukoadhezivno tkivo korišteno je tanko crijevo svinje. Nakon žrtvovanja životinje, tkivo je zamrznuto na -20 °C, a prije korištenja je odmrznuto u izotoničnom fosfatnom puferu pH-vrijednosti 7.4.

100 mg mikročestica sa i bez lijeka komprimirano je u diskove promjera 1 cm uz tlak od 160 kPa cm<sup>-2</sup>. Diskovi su cijanoakrilatnim ljepilom pričvršćeni na čelični nosač koji je povezan na preciznu vagu (Sartorius GM 312, Germany). Uzorak mukoze pričvršćen je na staklenu Petrijevu zdjelicu koja je postavljena na pomičnu platformu. Površina mukoze je ovlažena sa 100 µL simuliranog nazalnog fluida te pomicanjem platforme dovedena u kontakt s uzorkom mikročestica. Nakon 1 minute sluznica i uzorak mikročestica su razdvajani konstantnom brzinom od 0.3 mm/s do potpunog razdvajanja uzorka i mukoze. Vrijednost rada adhezije određena je kao površina ispod krivulje dijagrama zavisnosti sile o putu razdvajanja.

### **3.2.13. *In vitro* ispitivanje oslobađanja risperidona i lorazepam**

Oslobađanje lijeka iz čvrstih sustava ispitano je u vodi pri 37 °C tijekom 90 minuta koristeći Erweka Dissolution tester (Erweka Apparatebau GmbH, Njemačka). Uzorci koji su sadržavali 10 mg risperidona ili lorazepam stavljeni su u 500 ml vode (uvjeti osigurane topljivosti) i miješani (50 okretaja/min). U prikladnim vremenskim intervalima uzimani su uzorci, a volumen je održavan konstantnim tijekom cijelog pokusa. Uzorci su profiltrirani (Milipore<sup>®</sup>, Sartorius), a sadržaj lijeka u uzorcima



određen je spektrofotometrijski nakon razrjeđenja koncentriranim metanolom na koncentraciju prikladnu za određivanje lijeka.

Kinetika oslobađanja lijeka iz mikročestica određena je regresijskom analizom eksperimentalnih podataka prema sljedećim izrazima:

Kinetika prvog reda :

$$Q_t = Q_\infty (1 - e^{-kt}) \quad (6)$$

gdje  $Q_t$  predstavlja količinu lijeka oslobođenog u vremenu  $t$ ,  $Q_\infty$  ukupnu količinu lijeka u polimernom matriksu, a  $k$  konstantu brzine oslobađanja.

Dvofazična kinetika prvog reda:

$$Q_t = Q_1(1 - e^{-k_1t}) + Q_2(1 - e^{-k_2t}) \quad (7)$$

$$Q_1 + Q_2 = Q_\infty \quad (8)$$

kinetika prema Higuchiju:

$$Q_t = k_H t^{1/2} \quad (9)$$

gdje  $k_H$  predstavlja konstantu brzine oslobađanja lijeka u vremenu  $t$ .

Oslobađanje lijekova iz mikročestica dodatno je karakterizirano primjenom semiempirijskog modela Peppasa i Korsmeyera (Peppas i Korsmeyer, 1986) kako bi se odredio mehanizam oslobađanja lijeka iz pripremljenih mikročestica. Model Peppasa i Korsmeyera definiran je izrazom:

$$\log \left( \frac{Q_t}{Q_\infty} \right) = \log K + n \log t \quad (10)$$

pri čemu omjer  $\frac{Q_t}{Q_\infty}$  predstavlja udio lijeka oslobođenog u vremenu  $t$ ,  $K$  je kinetička konstanta  $n$ -tog reda, a  $n$  je eksponent koji ukazuje na mehanizam kojim je kontrolirano oslobađanja lijeka iz polimernog matriksa.

Podaci oslobađanja lijekova su obrađeni i prema modelu Peppasa i Sahlina (1989) koji je definiran izrazom:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = k_D t^m + k_E t^{2m} \quad (11)$$

gdje su  $k_D$ ,  $k_E$  i  $m$  konstante. U ovom matematičkom modelu, lijevi dio izraza opisuje doprinos difuzije ( $D$ ), a desni dio opisuje doprinos erozije polimernog matriksa ( $E$ ) oslobađanju lijeka. Vrijednost konstante  $m$  ovisi o geometriji polimernog matriksa, te

za sferične mikročestice iznosi 0.43. Doprinos pojedinog mehanizma oslobađanju lijeka u vremenu  $t$  ( $E/D$ ) može se izraziti kao:

$$\frac{E}{D} = \frac{k_E t^{2m}}{k_D t^m} = \frac{k_E t^m}{k_D} \quad (12)$$

Osim toga, izračunata je učinkovitost oslobađanja ( $DSE$  od *eng.* dissolution efficiency). Učinkovitost oslobađanja definirana je omjerom površine ispod krivulje koja prikazuje količinu oslobođenog lijeka ( $Q$ ) u vremenu  $t$  i površine pravokutnika čija visina iznosi 100% oslobođene količine lijeka ( $Q_{100}$ ) u istom vremenskom intervalu. Učinkovitost oslobađanja izražena je kao postotak, a računa se prema izrazu:

$$DSE = \frac{\int_0^t Q dt}{Q_{100} \times t} \times 100\% \quad (13)$$

Učinak HP- $\beta$ -CD na oslobađanje lorazepamima i risperidona iz mikročestica vrednovan je izračunom fit-faktora ( $f_1$  i  $f_2$ ; Moore i Flanner, 1996). Faktor različitosti ( $f_1$ ) računa se prema izrazu:

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \times 100\% \quad (14)$$

pri čemu je  $n$  broj vremenskih točaka,  $R_t$  je postotak oslobođene količine lijeka u vremenu  $t$  za referentni sustav (u eksperimentu to su mikročestice bez ciklodekstrina), a  $T_t$  oslobođena frakcija lijeka ispitivanog sustava izražena u postocima (mikročestice s ciklodekstrinom).

Faktor sličnosti ( $f_2$ ) računa se prema slijedećem izrazu:

$$f_2 (\%) = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \times \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (15)$$

### 3.2.14. *In vitro* ispitivanje difuzije risperidona i lorazepama

Difuzija lijekova u *in vitro* uvjetima ispitana je korištenjem horizontalne Franz-difuzijske ćelije (PermeGear, USA), difuzijske površine 10.18 cm<sup>2</sup> te volumena akceptorskog odjeljka 17 mL.

Akceptorski odjeljak horizontalne Franz-difuzijske ćelije napunjen je izotoničnim fosfatnim puferom pH-vrijednosti 7.4 te je termostatiran na 37 °C. Kao polupropusna membrana korištena je celulozna membrana (Medicell Dialysis Tubing MW CO 600, UK). Površina membrane navlažena je sa 100 µL simuliranog nazalnog fluida (8.77 g NaCl, 2.98 g KCl, 0.59 g CaCl<sub>2</sub> i 1 g mucina u 1000 mL deionizirane vode). Na pripremljenu membranu se u jednolikom sloju nanosio uzorak lijeka, kompleksa ili pripremljenih mikročestica koji je sadržavao 5 mg risperidona ili lorazepama. U prikladnim vremenskim intervalima iz akceptorskog odjeljka uzimalo se po 500 µL uzorka. Volumen medija u akceptorskom odjeljku bio je konstantan tijekom trajanja eksperimenta. Sadržaj lijeka u uzorcima određivao se spektrofotometrijski na ranije opisani način.

Koeficijent difuzije lijeka ( $D$ ) izračunat je prema izrazu:

$$D = \frac{B \times l_m}{C_i} \quad (16)$$

gdje  $B$  predstavlja koeficijent smjera pravaca linearnog dijela grafičkog prikaza količine difundiralog lijeka kroz polupropusnu membranu u zavisnosti o vremenu,  $l_m$  debljinu celulozne membrane (0.03 mm), a  $C_i$  početnu koncentraciju (mg/mL) lijeka u donorskom odjeljku Franz difuzijske ćelije.

Kinetika difuzije lijeka određena je regresijskom analizom eksperimentalnih podataka prema kinetici nultog reda te kinetici prema Higuchiju (9). Difuzija kinetikom nultog reda definirana je izrazom:

$$Q_t = Q_\infty (1 - k_d t) \quad (17)$$

pri čemu  $Q_t$  označava količinu lijeka difundiralog kroz polupropusnu membranu u vremenu  $t$ ,  $Q_\infty$  označava početnu količinu lijeka u donorskom odjeljku Franz-difuzijske ćelije, a  $k_d$  je kinetička konstanta difuzije.

Da bi se olakšala usporedba eksperimentalnih podataka, izračunata je i učinkovitost difuzije (DFE od *eng.* diffusion efficiency). Učinkovitost difuzije definirana je omjerom površine ispod krivulje koja prikazuje količinu difundiralog

lijeka ( $Q$ ) u vremenu  $t$  i površine pravokutnika čija visina iznosi 100 % difundirale količine lijeka ( $Q_{100}$ ) u istom vremenskom intervalu, a izražena je u postotku. Računa se prema izrazu:

$$DFE = \frac{\int_0^t Q dt}{Q_{100} \times t} \times 100\% \quad (18)$$

### 3.2.15. Statistička obrada podataka

Sve vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija  $n$  nezavisnih eksperimenata. Podaci su statistički obrađeni primjenom testa analize varijance (ANOVA) ili Studentovog t-testa korištenjem programa GraphPad Prism® (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA; [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Razina statističke značajnosti iznosila je  $p < 0.05$ .

## **4. REZULTATI**

#### **4.1. Utjecaj pH-vrijednosti medija na topljivost risperidona i nastajanje inkluzijskog kompleksa s HP- $\beta$ -CD u otopini**

Utjecaj pH-vrijednosti medija na nastajanje inkluzijskog kompleksa risperidona s HP- $\beta$ -CD u otopini ispitan je analizom izoterme topljivosti u vodi i vodenim medijima različitih pH-vrijednosti. Raspon pH-vrijednosti medija odabran je s obzirom na  $pK_{a1}$ -vrijednosti risperidona te je iznosio  $pH=pK_{a1} \pm 2$ .  $pK_{a1}$ -vrijednost risperidona iznosi 8.17, pa je ispitivanje provedeno u području pH-vrijednosti 6.0 – 10.4. U kiselom pH-području topljivost lijeka je visoka ( $<13.6 \text{ mg mL}^{-1}$  pri pH-vrijednosti 3.0), stoga utjecaj ciklodekstrina na topljivost risperidona u tom pH-području nije ispitan. Uspostavljanjem ravnoteže topljivosti lijeka u sustavu sa ili bez HP- $\beta$ -CD, pH-vrijednost uzoraka nije se značajno promijenila.

Topljivost risperidona u vodi i vodenim medijima različitih pH-vrijednosti prikazana je u Tablici 2. Risperidon je slaba baza pa je vodena otopina lijeka blago lužnata (pH-vrijednost  $\sim 8.15$ ). pH-vrijednost medija utječe na topljivost risperidona u vodi, tj. porastom pH-vrijednost medija smanjuje se topljivost lijeka.

Utjecaj HP- $\beta$ -CD na topljivost risperidona u vodi pri različitim pH-vrijednostima medija prikazan je izotermama topljivosti kao zavisnost koncentracije otopljenog lijeka o koncentraciji ciklodekstrina (Slika 7.). Topljivost risperidona u vodi raste linearno pri svim ispitivanim pH-vrijednostima. Izoterme topljivosti risperidona u vodi te puferima pH-vrijednosti 8.0 i 9.0 su gotovo identične. Linearan porast topljivosti lijeka utjecajem ciklodekstrina ( $r^2 > 0.98$ ) i vrijednosti nagiba pravaca izoterme topljivosti ( $< 1$ ) ukazuju na  $A_L$  tip izoterme topljivosti prema Higuchiju i Connorsu (1965), odnosno na nastajanje inkluzijskog kompleksa risperidona i HP- $\beta$ -CD u stehiometrijskog odnosa 1:1. Stehiometrija inkluzijskog kompleksa ne mijenja se utjecajem pH-vrijednosti.

Vrijednosti konstante stabilnosti kompleksa risperidona s HP- $\beta$ -CD u ispitivanim sustavima izračunate su prema jednadžbi (1) i prikazane su u Tablici 2. Učinkovitost kompleksiranja u sustavima različitih pH-vrijednosti izračunata je prema jednadžbi (5), a vrijednosti su prikazane u Tablici 2.

Tablica 2. Utjecaj pH-vrijednosti na topljivost risperidona u vodi i otopini HP- $\beta$ -CD ( $s_0$ ,  $s_p$ ), koeficijent korelacije izoterme topljivosti ( $r^2$ ), vrijednost konstante stabilnosti kompleksa ( $K_s$ ) te uspješnost uklapanja (UK).

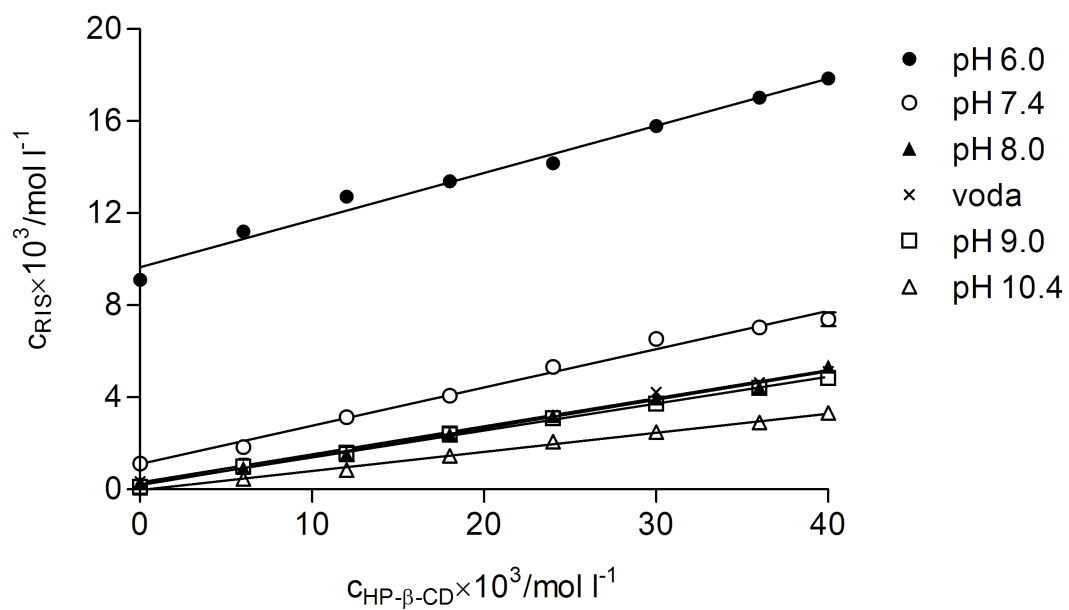
pH	<sup>(a)</sup> $s_0$ /(mg ml <sup>-1</sup> )	<sup>(b)</sup> $s_p$ /(mg ml <sup>-1</sup> )	$r^2$	$K_s$ /M <sup>-1</sup>	UK/(%)
	srednja vrijednost $\pm$ S.D.	srednja vrijednost $\pm$ S.D		srednja vrijednost $\pm$ S.D	
6.0	3.735 $\pm$ 0.025	7.332 $\pm$ 0.115	0.9846	31.70 $\pm$ 1.16	29.1
7.4	0.458 $\pm$ 0.002	3.035 $\pm$ 0.171	0.9889	178.84 $\pm$ 6.49	19.9
8.0	0.131 $\pm$ 0.001	2.187 $\pm$ 0.047	0.9942	441.29 $\pm$ 12.10	14.1
<sup>(c)</sup> voda	0.125 $\pm$ 0.011	2.290 $\pm$ 0.024	0.9952	456.61 $\pm$ 12.77	13.9
9.0	0.043 $\pm$ 0.003	1.987 $\pm$ 0.071	0.9981	1274.07 $\pm$ 20.01	13.3
10.4	0.028 $\pm$ 0.001	1.363 $\pm$ 0.018	0.9954	1308.33 $\pm$ 33.54 <sup>(d)</sup>	9.0

(a) - topljivost lijeka u mediju bez HP- $\beta$ -CD

(b) - topljivosti lijeka uz 40 mmol L<sup>-1</sup> HP- $\beta$ -CD

(c) - pH-vrijednost vodene otopine risperidona iznosi 8.15  $\pm$  0.25

(d) - statistički značajna razlika u odnosu na  $K_s$ (pH 6.0) na razini vjerojatnosti P < 0.001



Slika 7. Izoterme topljivosti risperidona utjecajem HP- $\beta$ -CD u otopinama različitih pH-vrijednosti pri 25°C (srednja vrijednost  $\pm$  SD; n=5).



## 4.2. Utjecaj pH-vrijednosti medija na topljivost lorazepama i nastajanje inkluzijskog kompleksa s HP- $\beta$ -CD u vodi

Ispitan je utjecaj različitih pH-vrijednosti na nastajanje inkluzijskog kompleksa lorazepama i HP- $\beta$ -CD metodom Higuchija i Connorsa (1965). Raspon pH-vrijednosti medija odabran je s obzirom na  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$ -vrijednosti lorazepama te je iznosio  $pK_{a1} + 2 \leq pH \leq pK_{a2} - 2$ .  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$ -vrijednosti lorazepama iznose 1.3 te 11.5 (Popović i sur., 2003), pa je stoga ispitivanje provedeno u rasponu pH-vrijednosti 3.0 – 9.0. Topljivost lorazepama u vodi pri različitim pH-vrijednostima prikazana je u Tablici 3. Lorazepam je vrlo teško topljiv u vodi, a topljivost lijeka se neznatno mijenja s promjenom pH-vrijednosti medija. Razlika topljivosti pri ispitivanim pH-vrijednostima nije statistički značajna ( $p > 0.05$ ).

Izoterme topljivosti lorazepama utjecajem HP- $\beta$ -CD pri različitim pH-vrijednostima prikazane su u Slici 8. kao ovisnost koncentracije otopljenog lijeka o koncentraciji ciklodekstrina. Topljivost lorazepama raste linearno utjecajem HP- $\beta$ -CD neovisno o pH-vrijednosti, a izoterme topljivosti su međusobno paralelne. Linearnost izoterme topljivosti ( $r^2 > 0.99$ ) te vrijednosti koeficijenta smjera pravca ( $\tan \alpha < 1$ ) ukazuju na  $A_L$  tip izoterme topljivosti, odnosno na nastajanje inkluzijskog kompleksa molarnog odnosa 1:1 (Higuchi i Connors, 1965).

Konstante stabilnosti kompleksa lorazepama i HP- $\beta$ -CD te učinkovitost kompleksiranja u sustavima različitih pH-vrijednosti određene su analizom izoterme topljivosti prema jednadžbama (1) i (5) te su prikazane u Tablici 3. Vrijednost konstante stabilnosti se značajno ne mijenja promjenom pH-vrijednosti ( $p > 0.05$ ). Također, pH-vrijednost medija ne utječe na učinkovitost kompleksiranja lorazepama s HP- $\beta$ -CD ( $p > 0.05$ ).

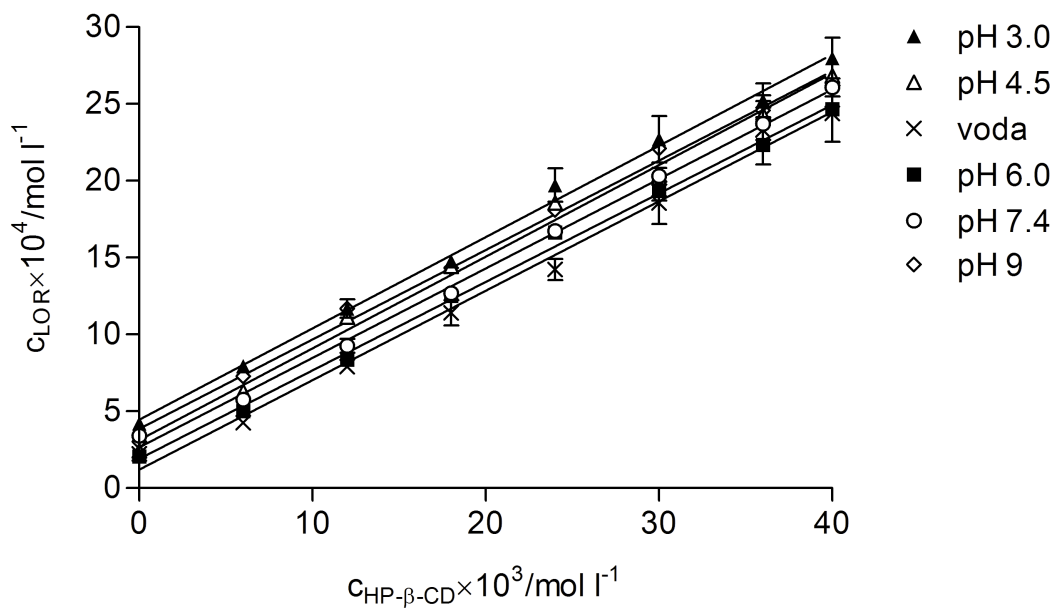
Tablica 3. Utjecaj pH-vrijednosti na topljivost lorazepama u vodi i otopini HP- $\beta$ -CD ( $s_0$ ,  $s_p$ ), koeficijent korelacije izoterme topljivosti ( $r^2$ ), vrijednost konstante stabilnosti kompleksa ( $K_s$ ) te uspješnost uklapanja (UK).

pH	<sup>(a)</sup> $s_0/(\text{mg ml}^{-1})$	<sup>(b)</sup> $s_p/(\text{mg ml}^{-1})$	$r^2$	$K_s / \text{M}^{-1}$	UK/(%)
	srednja vrijednost $\pm$ S.D.	srednja vrijednost $\pm$ S.D		srednja vrijednost $\pm$ S.D	
3.0	0.178 $\pm$ 0.020	0.900 $\pm$ 0.074	0.9959	293.23 $\pm$ 3.29	6.1
4.5	0.078 $\pm$ 0.006	0.862 $\pm$ 0.040	0.9927	300.54 $\pm$ 6.68	6.3
6.0	0.066 $\pm$ 0.008	0.792 $\pm$ 0.014	0.9970	295.46 $\pm$ 6.73	6.1
<sup>(c)</sup> voda	0.074 $\pm$ 0.006	0.726 $\pm$ 0.022	0.9925	281.25 $\pm$ 21.51	6.2
7.4	0.098 $\pm$ 0.012	0.839 $\pm$ 0.033	0.9976	292.53 $\pm$ 4.35	6.2
9.0	0.111 $\pm$ 0.004	0.847 $\pm$ 0.018	0.9944	296.96 $\pm$ 4.63	6.2

(a) - topljivost lijeka u mediju bez HP- $\beta$ -CD

(b) - topljivosti lijeka uz 40 mmol L<sup>-1</sup> HP- $\beta$ -CD

(c) – pH-vrijednost otopine lorazepama iznosi 6.50  $\pm$  0.05



Slika 8. Izoterme topljivosti lorazepama utjecajem HP- $\beta$ -CD u otopinama različitih pH-vrijednosti pri 25°C (srednja vrijednost  $\pm$  SD; n=5).

### **4.3. Nastajanje inkluzijskog kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD utjecajem HPMC i karbomera**

Ispitivan je utjecaj HPMC i karbomera na topljivost risperidona i lorazepama te na nastajanje inkluzijskih kompleksa s HP- $\beta$ -CD u vodi. Koncentracija polimera u otopinama iznosila je 0.1%. HPMC i karbomer mijenjaju topljivost lijekova u vodi. Utjecajem HPMC, topljivost risperidona i lorazepama porasla je oko 1.94, odnosno 2.29 puta u odnosu na topljivost ovih lijekova u vodi. Uz karbomer topljivost risperidona i lorazepama se neznatno smanjila (Tablica 4 i 5.).

Topljivost risperidona i lorazepama utjecajem polimera i HP- $\beta$ -CD prikazana je izotermama topljivosti lijekova u Slici 9. U svim ispitivanim sustavim topljivost lijekova raste linearno s porastom koncentracije HP- $\beta$ -CD. U otopini polimera i HP- $\beta$ -CD risperidon i lorazepam stvaraju inkluzijske komplekse molarnog odnosa 1:1, a HPMC i karbomer ne utječu na stehiometriju kompleksa.

Vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa lorazepama i risperidona s HP- $\beta$ -CD utjecajem polimera prikazane su u Tablicama 4. i 5. HPMC ne mijenja vrijednost konstante stabilnosti kompleksa lijekova s HP- $\beta$ -CD ( $p > 0.05$ ). Utjecajem karbomera smanjila se topljivost risperidona i lorazepama u otopinama HP- $\beta$ -CD. Vrijednosti konstante stabilnosti kompleksa risperidona i lorazepama uz karbomer manje su oko 2.5 puta u odnosu na one u otopini bez polimera (Tablica 4. i 5.).

Tablica 4. Utjecaj polimera na topljivost risperidona u vodi i otopini HP- $\beta$ -CD ( $s_0$ ,  $s_p$ ), koeficijent korelacije ( $r^2$ ), vrijednost konstante stabilnosti ( $K_s$ ) te učinkovitost kompleksiranja (UK).

<b>sustav</b>	<sup>(a)</sup> $s_0/(\text{mg ml}^{-1})$ srednja vrijednost $\pm$ S.D.	<sup>(b)</sup> $s_p/(\text{mg ml}^{-1})$ srednja vrijednost $\pm$ S.D.	$r^2$	$K_s /(\text{M}^{-1})$ srednja vrijednost $\pm$ S.D.	UK/(%)
voda	0.125 $\pm$ 0.011	2.290 $\pm$ 0.024	0.9952	456.61 $\pm$ 12.77	13.9
HPMC	0.242 $\pm$ 0.020	2.391 $\pm$ 0.070	0.9870	491.84 $\pm$ 11.67	14.5
karbomer	0.120 $\pm$ 0.040	1.965 $\pm$ 0.023	0.9855	198.81 $\pm$ 6.62	6.1

(a) - topljivost lijeka u mediju bez HP- $\beta$ -CD

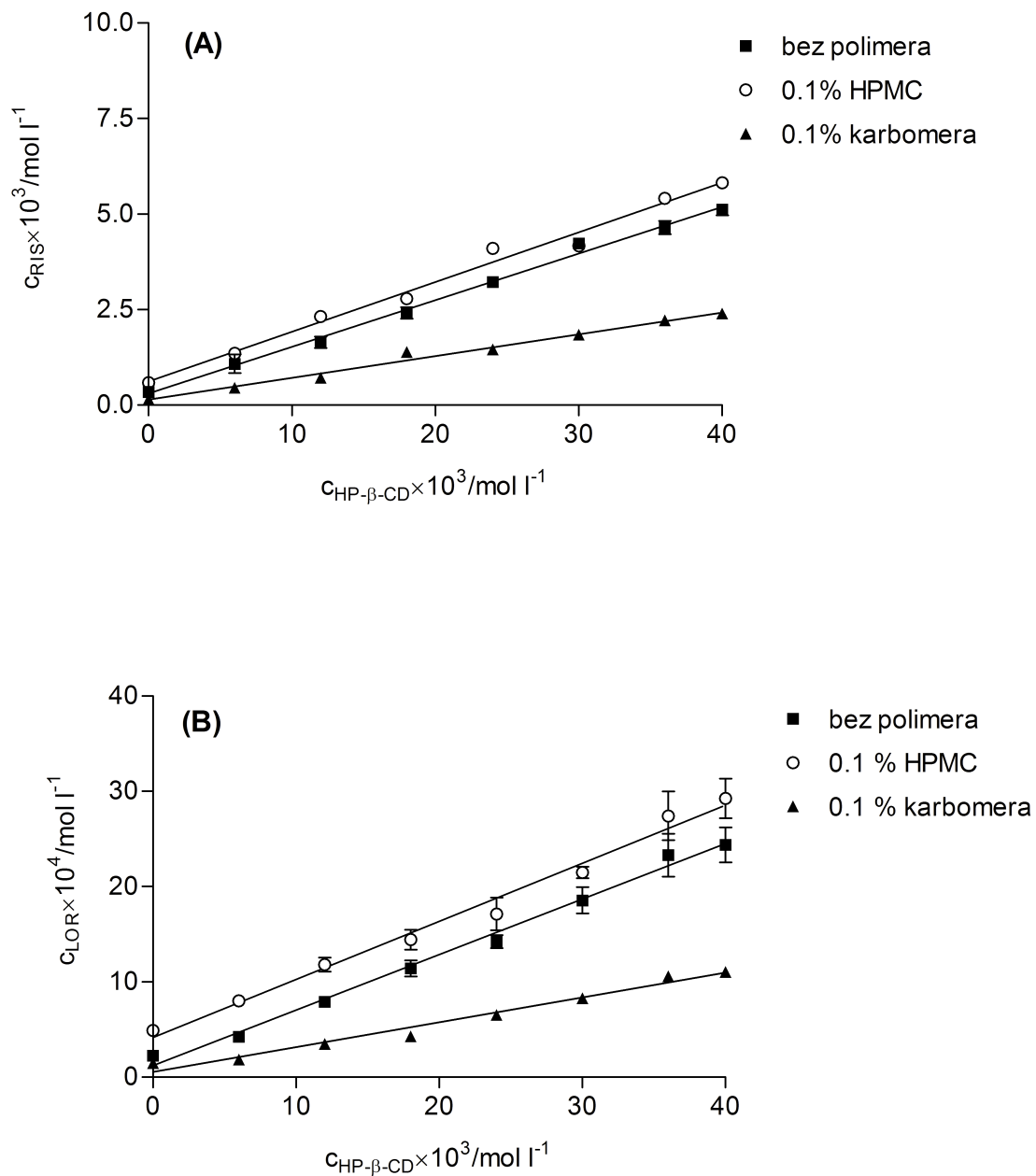
(b) - topljivosti lijeka uz 40 mmol L<sup>-1</sup> HP- $\beta$ -CD

Tablica 5. Utjecaj polimera na topljivost lorazepamima u vodi i otopini HP- $\beta$ -CD ( $s_0$ ,  $s_p$ ), koeficijent korelacije ( $r^2$ ), vrijednost konstante stabilnosti ( $K_s$ ) te učinkovitost kompleksiranja (UK).

sustav	<sup>(a)</sup> $s_0$ /(mg ml <sup>-1</sup> )	<sup>(b)</sup> $s_p$ /(mg ml <sup>-1</sup> )	$r^2$	$K_s$ /M <sup>-1</sup>	UK/(%)
	srednja vrijednost $\pm$ S.D.	srednja vrijednost $\pm$ S.D.		srednja vrijednost $\pm$ S.D.	
voda	0.074 $\pm$ 0.006	0.726 $\pm$ 0.022	0.9925	281.25 $\pm$ 21.51	6.2
HPMC	0.170 $\pm$ 0.013	0.941 $\pm$ 0.017	0.9867	280.94 $\pm$ 32.12	6.1
karbomer	0.059 $\pm$ 0.013	0.355 $\pm$ 0.006	0.9756	106.77 $\pm$ 16.71	2.3

(a) - topljivost lijeka u mediju bez HP- $\beta$ -CD

(b) - topljivosti lijeka uz 40 mmol L<sup>-1</sup> HP- $\beta$ -CD



Slika 9. Izoterme topljivosti risperidona (A) i lorazepama (B) s HP- $\beta$ -CD utjecajem HPMC i karbomera pri 25°C (srednja vrijednost  $\pm$  SD, n=5)

#### **4.4. Priprema i karakterizacija kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD u čvrstom stanju**

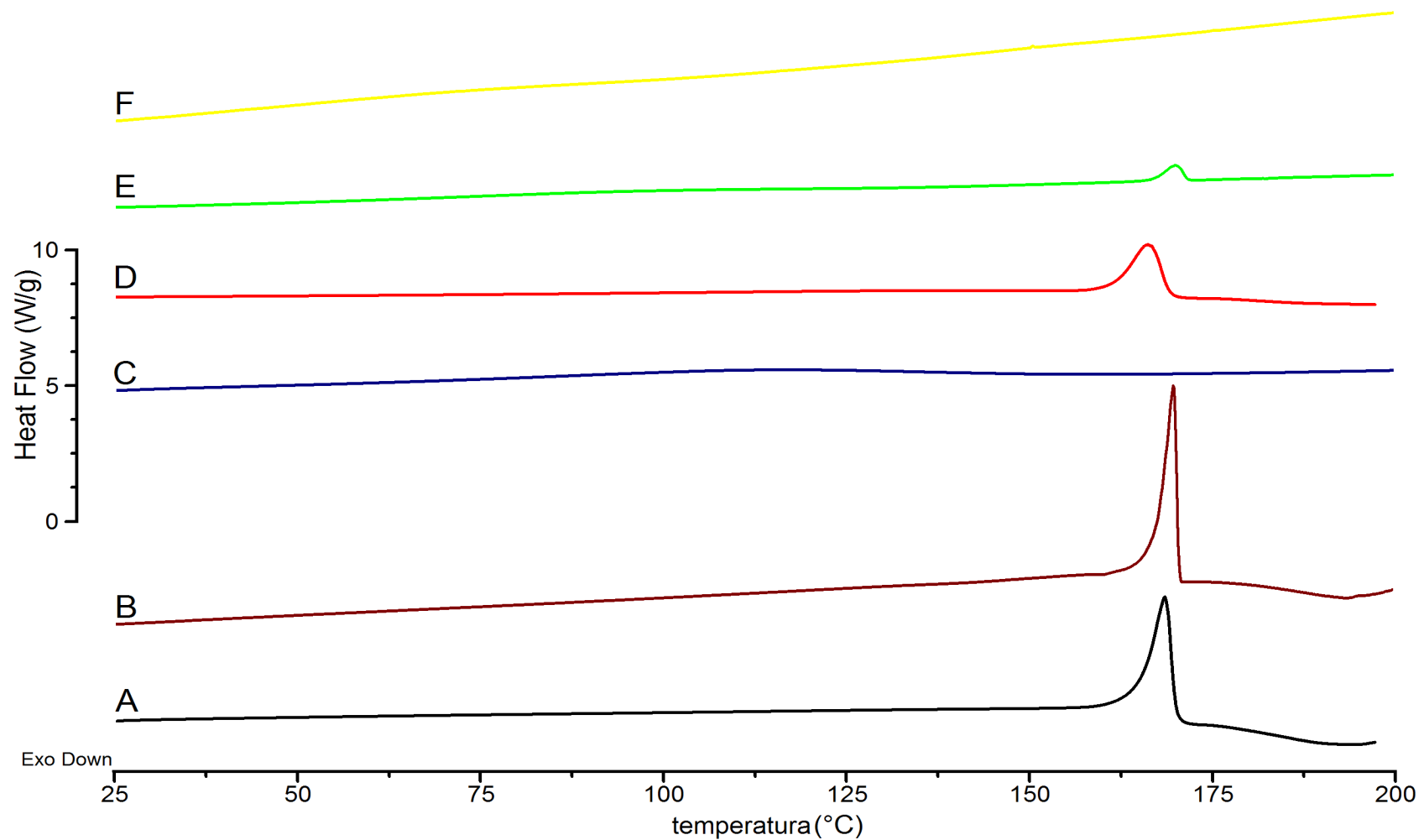
Inkluzijski kompleksi risperidona i lorazepama u čvrstom stanju pripremljeni su iz etanolno-vodenih otopina lijekova i HP- $\beta$ -CD u ekvimolarnom odnosu. Kako bi se pronašla optimalna tehnika pripreme inkluzijskih kompleksa lijekova s HP- $\beta$ -CD u čvrstom stanju, čvrsti produkt je izoliran evaporacijom smjese otapala pri 60°C, te metodom sušenja raspršivanjem. Istom postupku podvrgnute su i etanolno-vodene otopine lijekova. Evaporacijom etanolno-vodenih otopina risperidona i lorazepama dobiveni su kristalinični produkti, a evaporacijom ekvimolarnih etanolno-vodenih otopina lijekova i ciklodekstrina dobiveni su kruti produkti staklastog izgleda. Produkti dobiveni sušenjem raspršivanjem etanolno-vodenih otopina lijekova te otopine lijekova s HP- $\beta$ -CD su vrlo sitni prašci. Osim toga, pripremljena je fizička smjesa lijekova i HP- $\beta$ -CD u ekvimolarnom odnosu. Dobiveni produkti karakterizirani su termalnom analizom (DSC) i FTIR spektroskopijom. DSC termogrami dobivenih produkata risperidona i lorazepama prikazani su u Slikama 10. i 11., a FTIR spektri u Slikama 12. i 13..

Inkluzijski kompleksi pripremljeni metodom sušenja raspršivanjem karakterizirani su određivanjem raspodjele veličine čestica te ispitivanjem topljivosti lijeka. Rezultati ispitivanja uspoređeni su s raspršivanjem osušenim lorazepamom i risperidonom. Određen je sadržaj risperidona i lorazepama u kompleksima s HP- $\beta$ -CD nakon otapanja kompleksa u koncentriranom metanolu. Udio risperidona u kompleksu s HP- $\beta$ -CD iznosi  $21.19 \pm 0.39$  %, a udio lorazepama je  $18.44 \pm 0.17$  % što je u skladu s teoretski očekivanim vrijednostima (21.49, odnosno 17.62%).

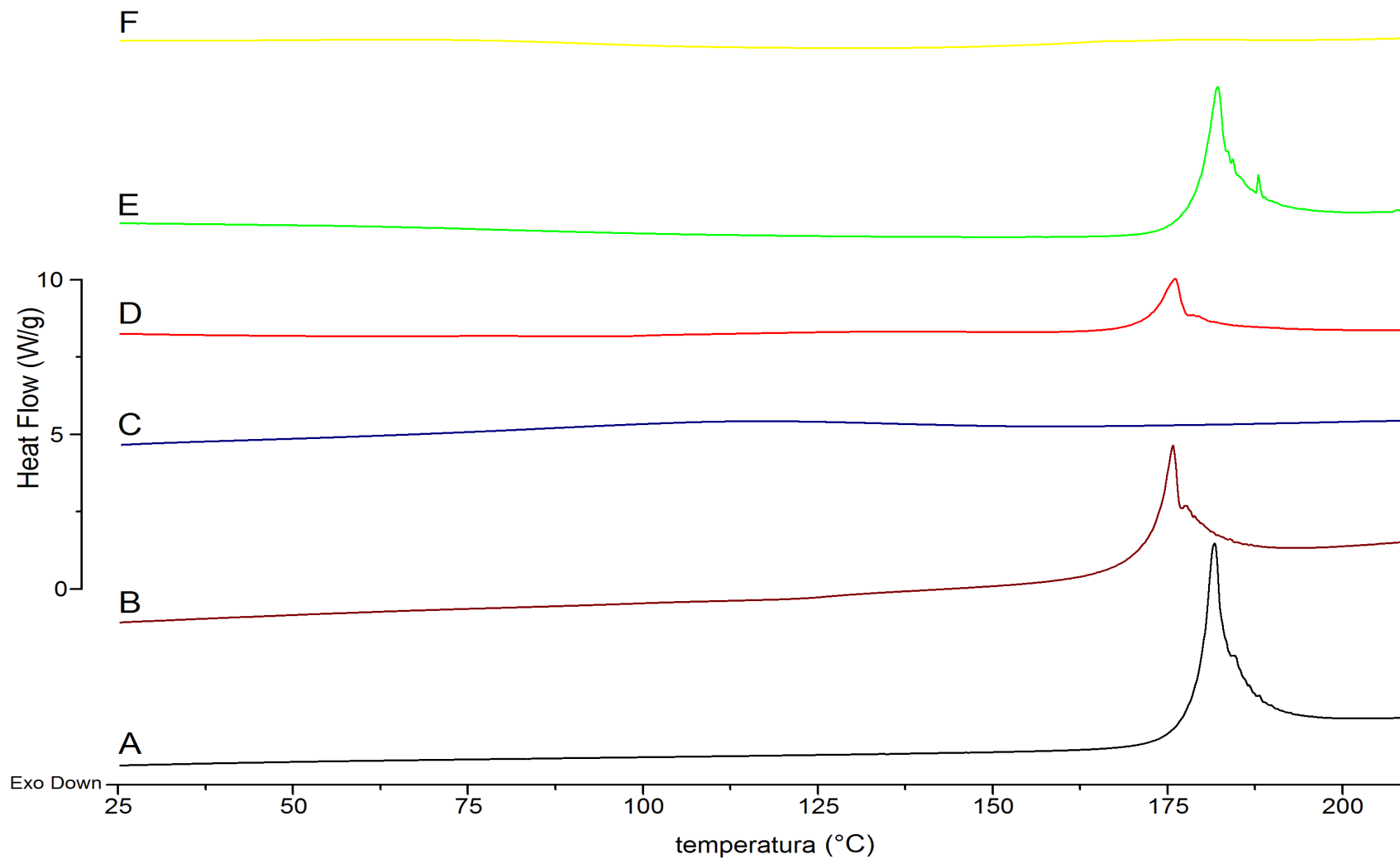
Raspodjela veličina čestica čvrstih produkata pripremljenih metodom sušenja raspršivanjem etanolno-vodenih otopina lijeka sa ili bez ciklodekstrina prikazana je u Slici 14. Risperidon dobiven metodom sušenja raspršivanjem karakteriziran je uskom raspodjelom veličina čestica pri čemu je 93.7 % čestica veličine 1-2  $\mu\text{m}$ , a srednji promjer čestica iznosi  $1.45 \pm 0.76$   $\mu\text{m}$ . Raspodjela veličina čestica raspršivanjem osušenog lorazepama je također logaritamska, s 76.7 % čestica u rasponu veličina od 1 do 2.5  $\mu\text{m}$  i srednjim promjerom čestica  $2.09 \pm 1.02$   $\mu\text{m}$ . Raspršivanjem osušeni kompleksi risperidona i lorazepama karakterizirani su logaritamskom raspodjelom veličina čestica, sa srednjim promjerom čestica  $2.58 \pm 1.23$  i  $2.56 \pm 1.03$   $\mu\text{m}$ .



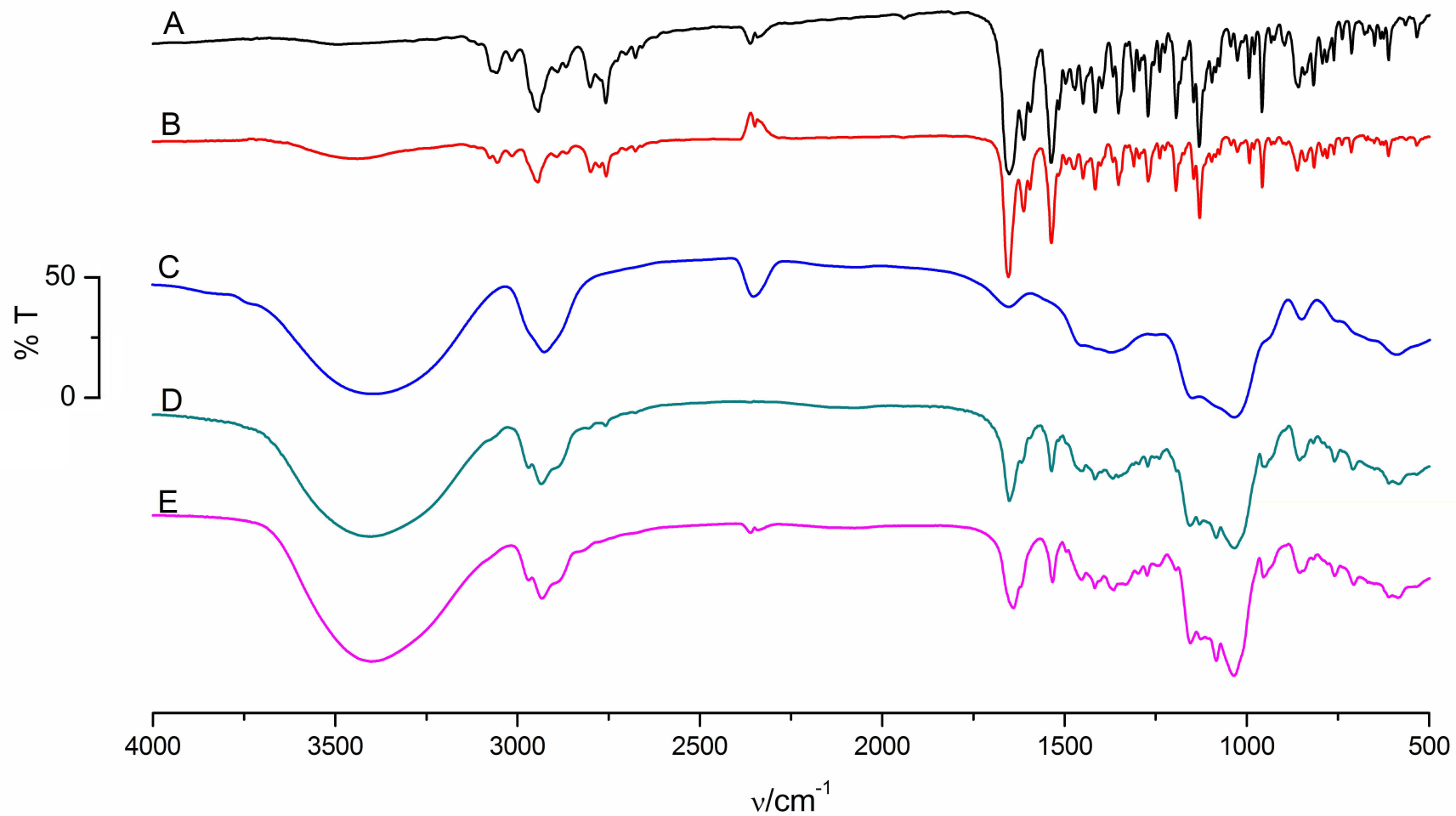
Zavisnost količine otopljenog lijeka o vremenu pri ispitivanju topljivosti raspršivanjem osušenog risperidona i lorazepama te inkluzijskih kompleksa u vodi pri 37°C prikazana je u Slici 15. Otapanje risperidona i lorazepama je sporo i ograničeno slabom topljivošću lijekova u vodi. Nasuprot tome, topljivost kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD je značajno poboljšana. Ispitivana količina lijeka potpuno se otopila tijekom 30 minuta.



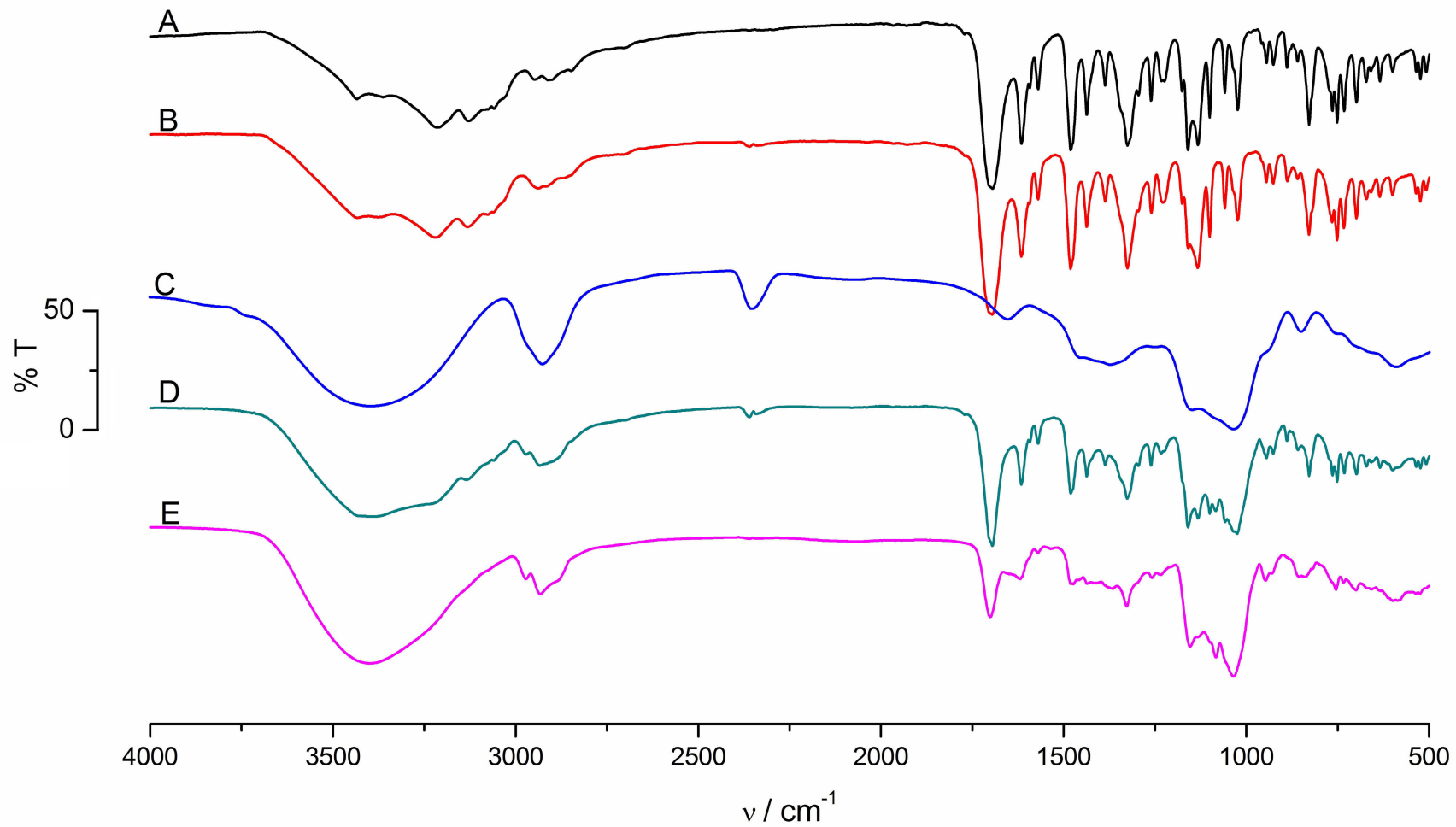
Slika 10. DSC termogrami risperidona dobivenog evaporacijom (A) te sušenjem raspršivanjem (B) vodeno-etanolne otopine lijeka, HP- $\beta$ -CD (C), fizičke smjese risperidona i HP- $\beta$ -CD (D), kompleksa pripremljenog evaporacijom (E) i kompleksa pripremljenog sušenjem raspršivanjem (F).



Slika 11. DSC termogrami lorazepama dobivenog evaporacijom (A) te sušenjem raspršivanjem (B) vodeno-etanolne otopine lijeka, HP- $\beta$ -CD (C), fizičke smjese lorazepama i HP- $\beta$ -CD (D), kompleksa pripremljenog evaporacijom (E) i kompleksa pripremljenog sušenjem raspršivanjem (F).

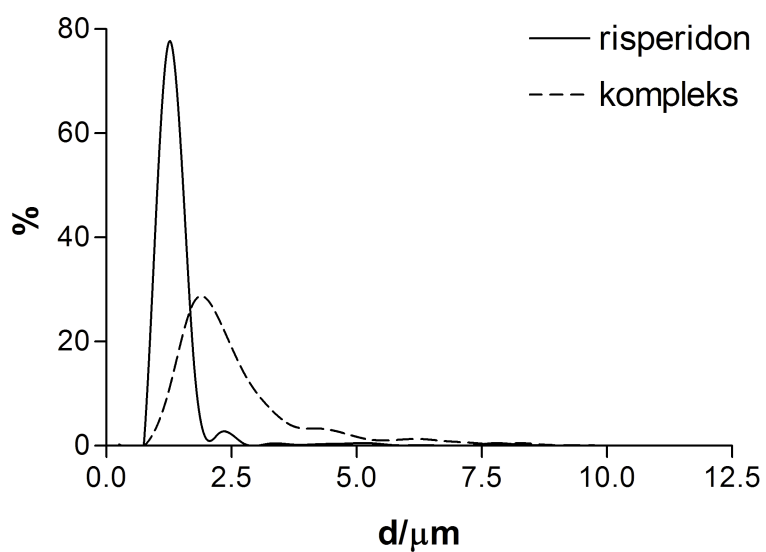


Slika 12. FTIR spektri risperidona dobivenog evaporacijom (A) te sušenjem raspršivanjem (B) vodeno-etanolne otopine lijeka, HP- $\beta$ -CD (C), spektri kompleksa risperidona s HP- $\beta$ -CD pripremljenog evaporacijom (E) i kompleksa pripremljenog sušenjem raspršivanjem (F).

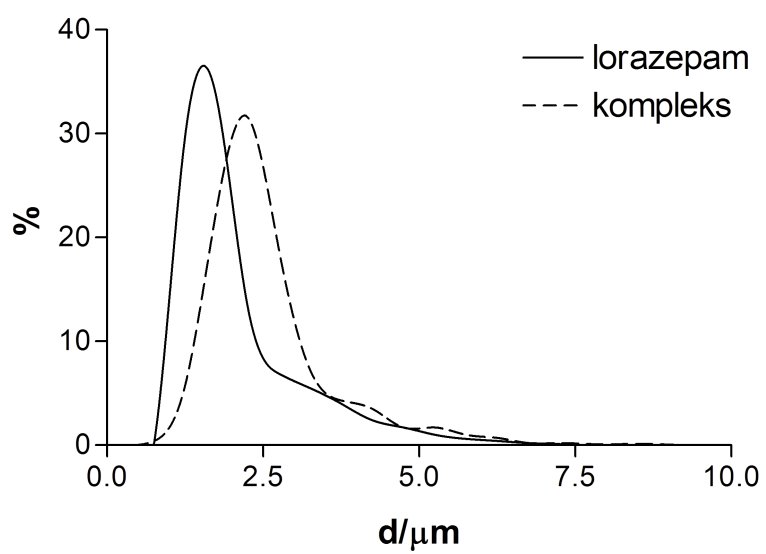


Slika 13. FTIR spektri lorazepama dobivenog evaporacijom (A) te sušenjem raspršivanjem (B) vodeno-etanolne otopine lijeka, HP- $\beta$ -CD (C), spektri kompleksa lorazepama s HP- $\beta$ -CD pripremljenog evaporacijom (E) i kompleksa pripremljenog sušenjem raspršivanjem (F).

(A)

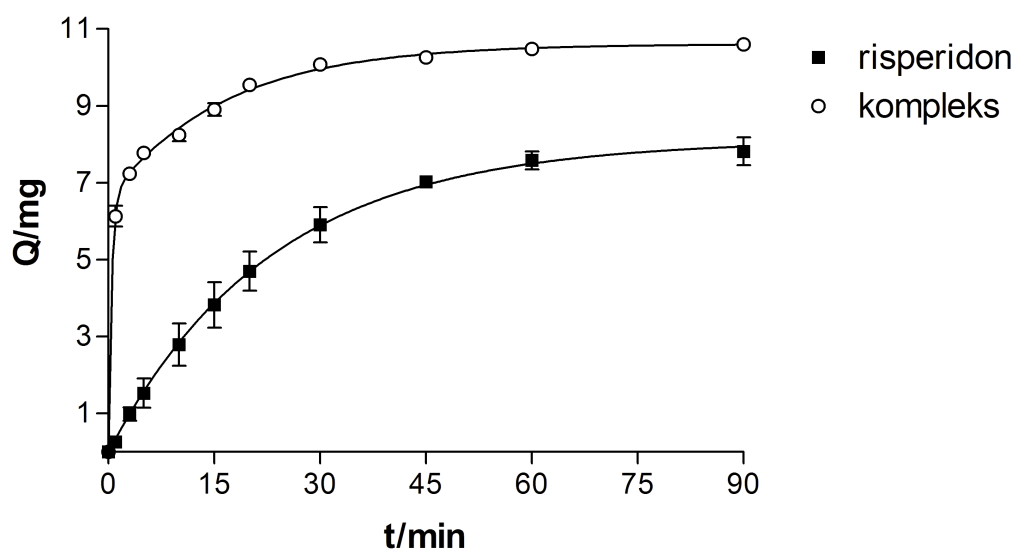


(B)

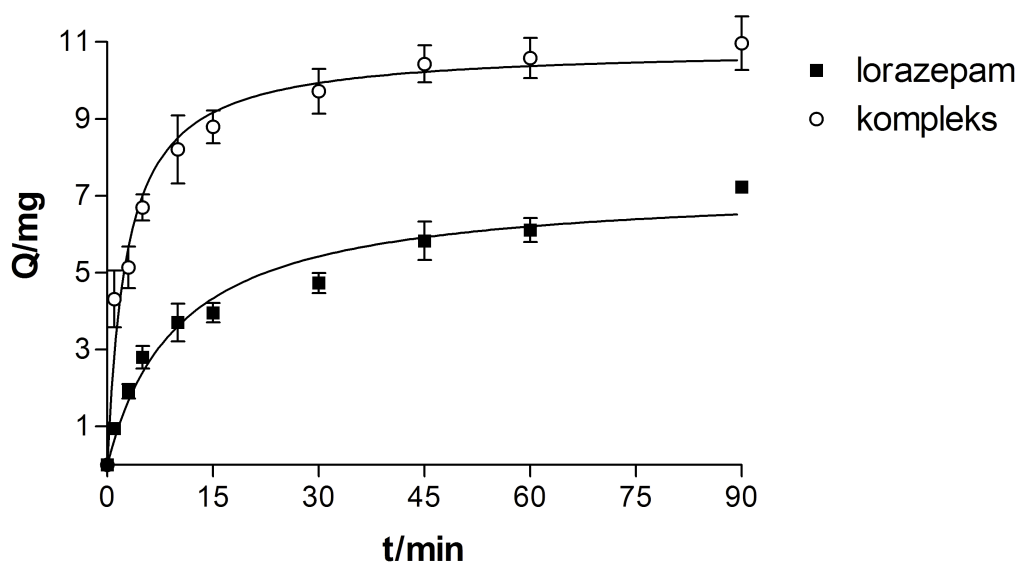


Slika 14. Raspodjela veličina čestica raspršivanjem osušenog risperidona (A) i lorazepama (B) te njihovih inkluzijskih kompleksa pripremljenih istom metodom.

(A)



(B)



Slika 15. Zavisnost količine otopljenog lijeka o vremenu pri ispitivanju topljivosti raspršivanjem osušenog risperidona (A) i lorazepama (B) te njihovih inkluzijskih kompleksa u vodi pri 37°C (srednja vrijednost  $\pm$  S D; n=3).

#### **4.5. Utjecaj ciklodekstrina na nastajanje interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera**

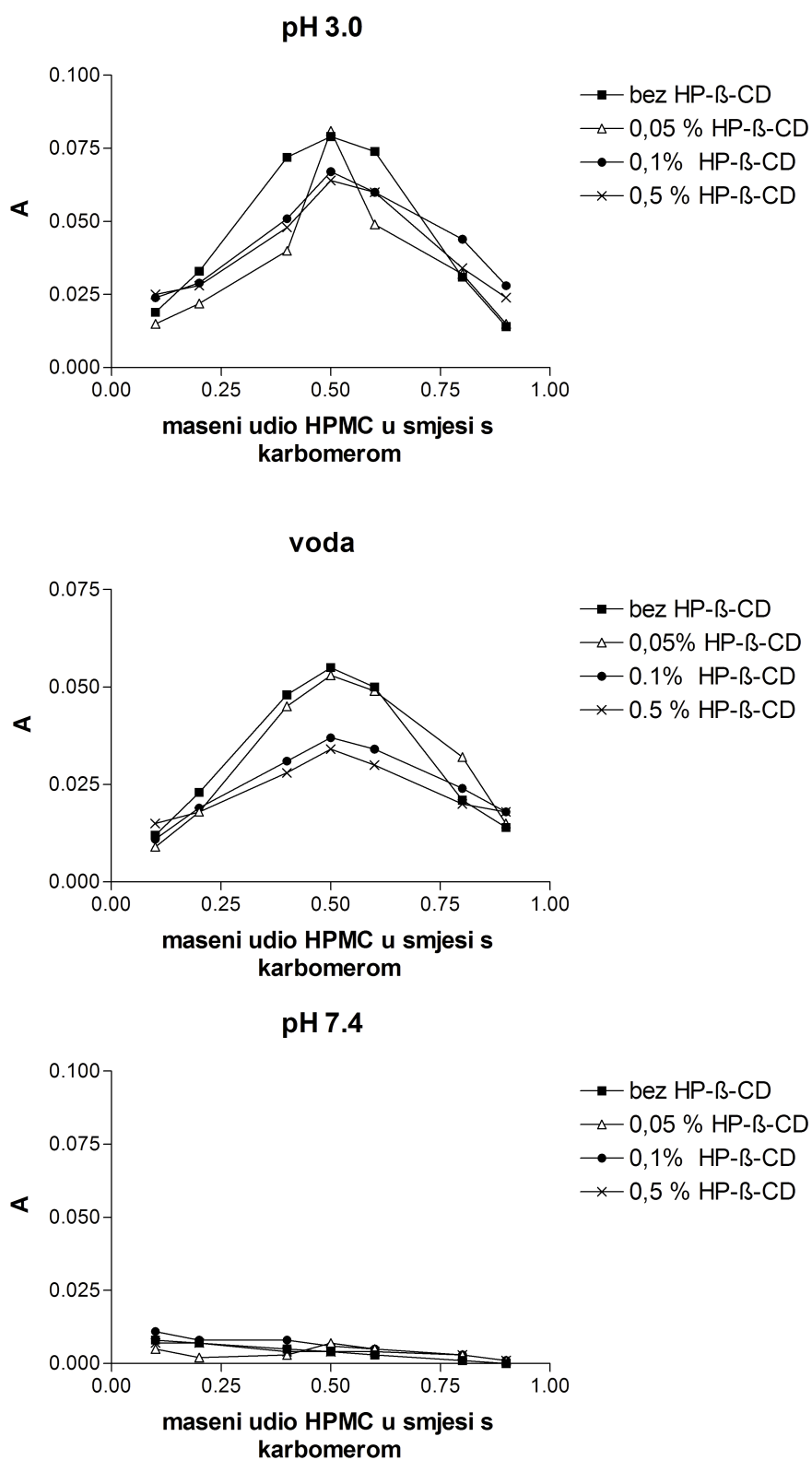
Nastajanje interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera u otopini pratilo se metodom prema Ikinciju i suradnicima (2000). Metoda se temelji na mjerenju turbidnosti uzoraka različitog udjela polimera. Turbidnost uzoraka određena je mjerenjem apsorbancije pri 600 nm. Apsorbancija otopina HPMC, karbomera i HP- $\beta$ -CD pri ispitivanoj valnoj dužini i koncentracijama je zanemariva.

Turbidnost otopina HPMC/karbomer zavisi o pH-vrijednosti i masenom udjelu polimera u uzorku (Slika 16.). Maksimalna turbidnost izmjerena je pri pH-vrijednosti 3.0 i odnosu polimera 1:1, što ukazuje na nastajanje interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera. Maksimalna turbidnost uzorka u vodi određena je pri istom omjeru polimera, no turbidnost sustava je nešto niža. U fosfatnom puferu pH-vrijednosti 7.4, turbidnost uzoraka se značajno ne mijenja pri različitim omjerima HPMC i karbomera te se može zaključiti da pri toj pH-vrijednosti ne dolazi do nastajanja interpolimernog kompleksa.

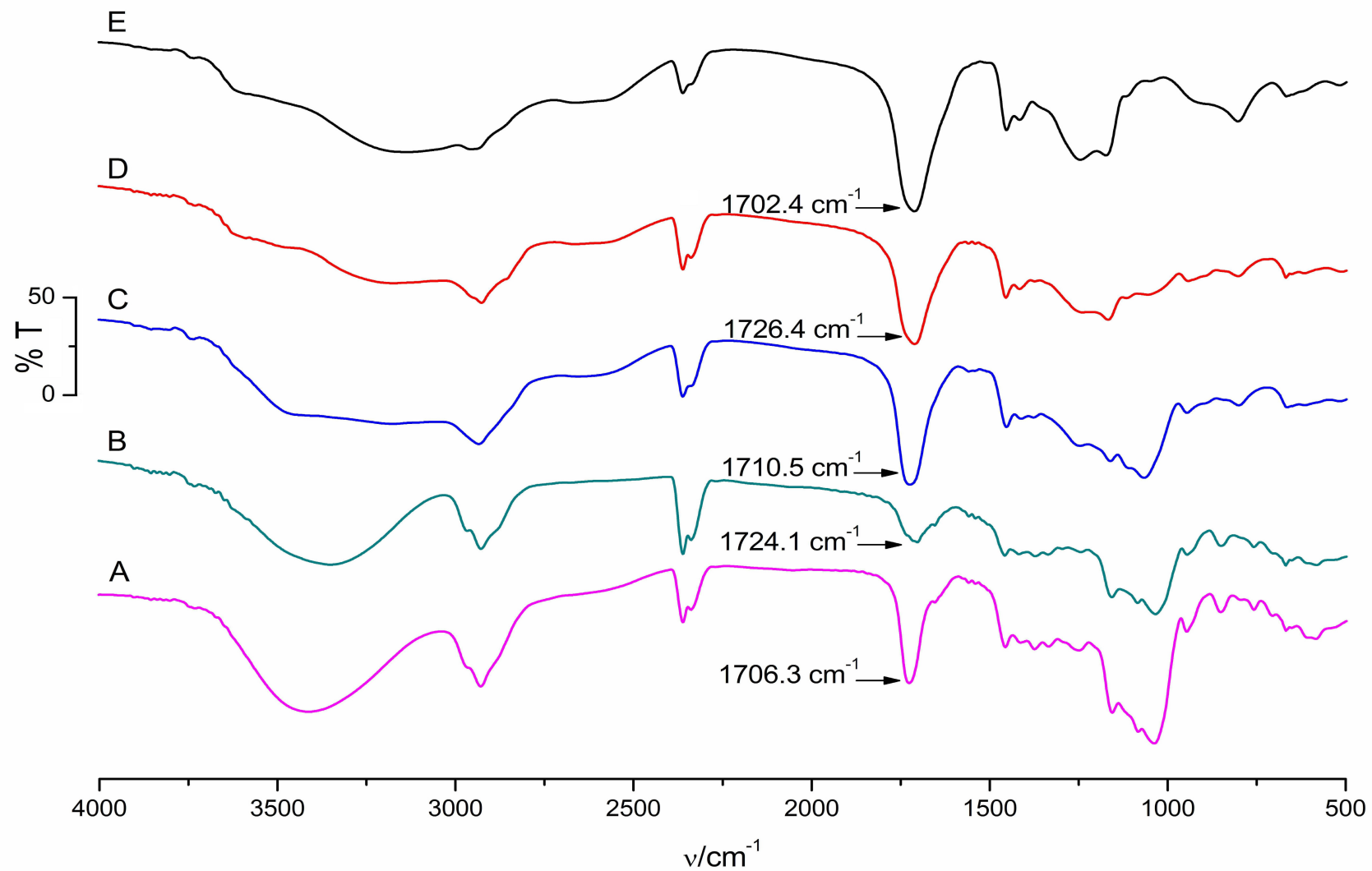
Dodatkom ciklodekstrina u otopine polimera, turbidnost uzoraka se neznatno promijenila. Maksimalna turbidnost uzoraka određena je pri masenom odnosu polimera 1:1 i pH-vrijednosti 3.0. Turbidnost uzoraka smanjuje se porastom koncentracije ciklodekstrina (Slika 16.).

Interpolimerni kompleksi sa i bez HP- $\beta$ -CD u čvrstom stanju pripremljeni su metodom opisanom u poglavlju 3.2.5. i karakterizirani su snimanjem FTIR spektara. Također, su pripremljene i karakterizirane odgovarajuće fizičke smjese polimera. U Slici 17. prikazani su FTIR spektri karbomera, interpolimernog kompleksa, fizičke smjese, interpolimernog kompleksa s HP- $\beta$ -CD te fizičke smjese HPMC, karbomera i HP- $\beta$ -CD. Nastajanje interpolimernog kompleksa ne mijenja FTIR spektar HPMC, pa on nije prikazan.





Slika 16. Turbidnost uzoraka HPMC/karbomer kao funkcija masenog udjela HPMC u smjesi polimera pri različitim pH-vrijednostima medija i koncentracijama HP-β-CD pri sobnoj temperaturi.



Slika 17. FTIR spektri karbomera (A), interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera (B), fizičke smjese HPMC i karbomera (C), interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera s HP- $\beta$ -CD (D) te fizičke smjese HPMC, karbomera i HP- $\beta$ -CD (E).

#### **4.6. Priprema i karakterizacija mukoadhezivnih mikročestica lorazepama i risperidona**

Mikročestice lorazepama i risperidona pripravljene su metodom sušenja raspršivanjem etanolno-vodenih disperzija mukoadhezivnih polimera i lijeka te inkluzijskog kompleksa lijeka s HP- $\beta$ -CD. Maseni odnos lijeka i mukoadhezivnog polimera u svim pripremljenim sustavima je 1:1. Kao mukoadhezivni polimeri korišteni su HPMC, karbomer te interpolimerni kompleks koji je pripremljen na način opisan u poglavlju 3.2.5.

Oblikovane mikročestice lorazepama i risperidona karakterizirane su određivanjem sadržaja lijeka, veličinom čestica, diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom te mjerenjem zeta-potencijala. Mukoadhezivna svojstva mikročestica ispitana su određivanjem rada adhezije.

Sadržaj lijeka određen je nakon otapanja mikročestica u koncentriranom metanolu uz soniciranje, a uspješnost uklapanja lijeka u mikročestice izražena je u postocima kao omjer eksperimentalno određene i teorijski izračunate količine lijeka u mikročesticama. Rezultati su prikazani u Tablici 6.

Određivanje veličina čestica ukazuje na usku logaritamsku normalnu raspodjelu, pri čemu srednji promjer čestica varira od  $2.54 \pm 1.29 \mu\text{m}$  do  $3.41 \pm 1.47 \mu\text{m}$  (Slika 18). Mikročestice lorazepama su nešto manje u odnosu na mikročestice risperidona (Tablica 6.), a vrsta polimera korištena pri oblikovanju mikročestica utjecala je na njihov promjer. Mikročestice oblikovane s HPMC su nešto veće u odnosu na one oblikovane s karbomerom te interpolimernim kompleksom. Mikročestice s inkluzijskim kompleksom su nešto veće u odnosu na istovrsne čestice bez ciklodekstrina, no ta razlika nije statistički značajna ( $p > 0.05$ ).

DSC termogrami mikročestica risperidona i lorazepama uspoređeni su s termogramima raspršivanjem osušenih lijekova i prikazani su u Slikama 19. i 20.

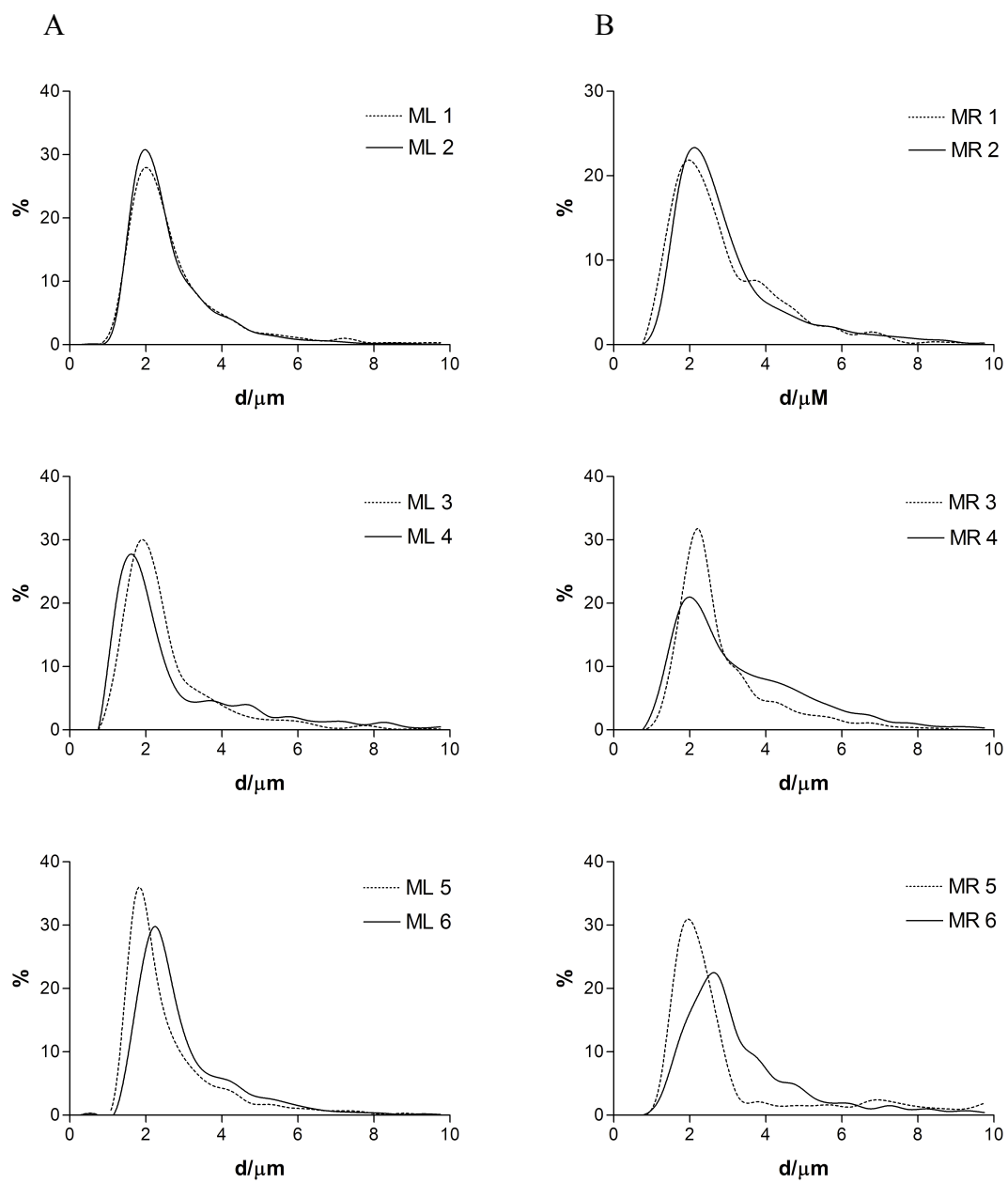
Zeta potencijal mikročestica određen je mjerenjem elektroforetske pokretljivosti mikročestica u električnom polju foton-korelacijskom spektroskopijom. Također, određen je zeta potencijal samih polimera te zeta potencijal raspršivanjem osušenog lorazepama i risperidona. Rezultati ispitivanja prikazani su u Slici 21.

Mukoadhezivnost mikročestica ispitana je određivanjem rada adhezije potrebnog za prekidanje mukoadhezivne veze između površine mikročestica i

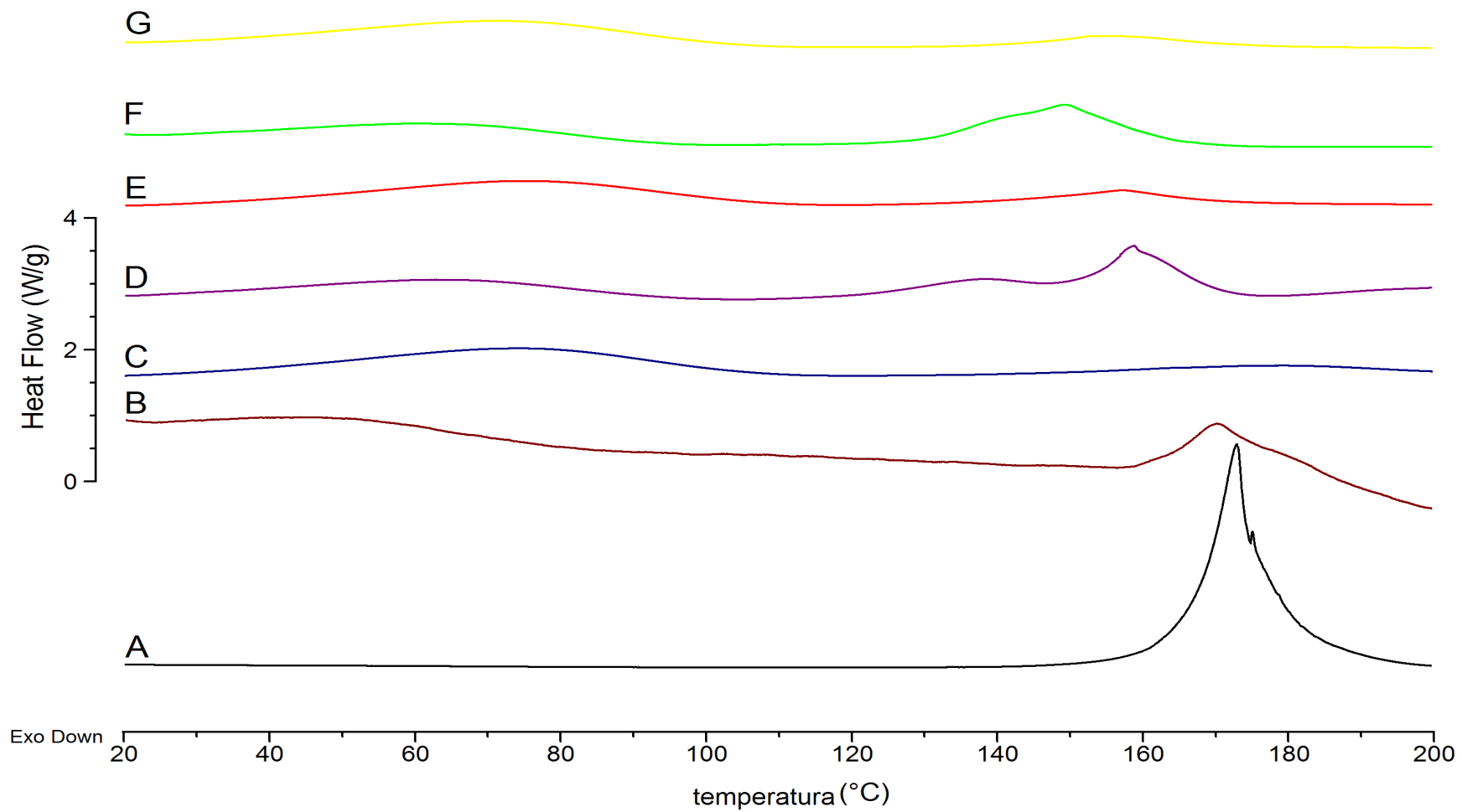
sluznice. Vrijednosti rada adhezije oblikovanih mikročestica lorazepama i risperidona uspoređene su s vrijednostima rada adhezije polimera. Rezultati ispitivanja prikazani su u Slici 22.

Tablica 6. Sadržaj i uspješnost uklapanja lijeka te srednji promjer mikročestica (d) lorazepamama i risperidona.

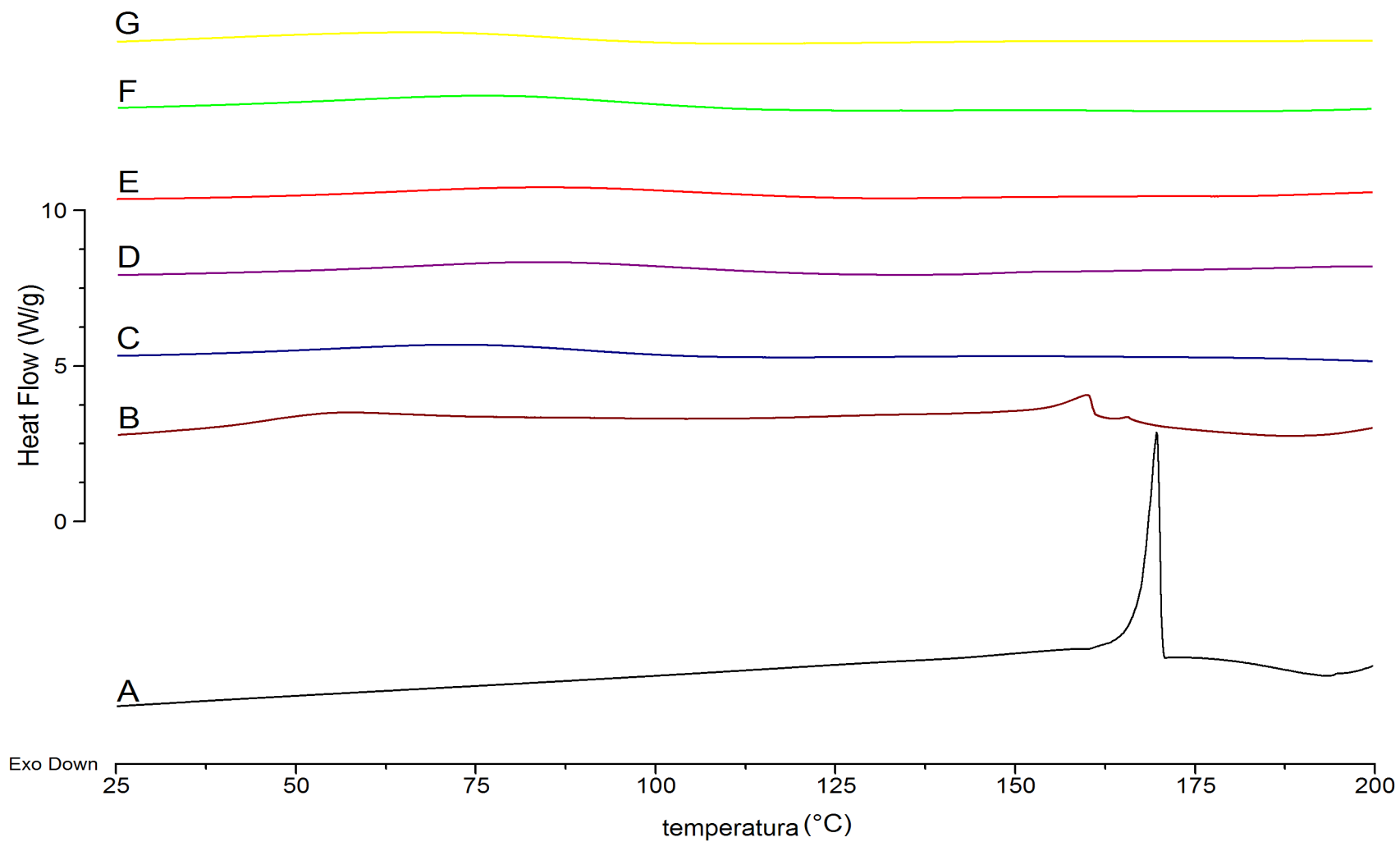
uzorak	LORAZEPAM			uzorak	RISPERIDON		
	sadržaj lijeka (%)	uspješnost uklapanja (%)	d/ $\mu\text{m}$		sadržaj lijeka (%)	uspješnost uklapanja (%)	d/ $\mu\text{m}$
ML1	50.18 $\pm$ 0.80	100.36 $\pm$ 1.64	2.73 $\pm$ 1.33	MR1	42.39 $\pm$ 0.35	84.78 $\pm$ 0.79	2.90 $\pm$ 1.44
ML2	14.29 $\pm$ 0.29	95.39 $\pm$ 1.67	2.62 $\pm$ 1.17	MR2	16.82 $\pm$ 0.12	95.08 $\pm$ 0.82	3.20 $\pm$ 1.47
ML3	50.73 $\pm$ 0.11	101.46 $\pm$ 0.29	2.54 $\pm$ 1.29	MR3	44.17 $\pm$ 0.12	88.34 $\pm$ 0.85	2.83 $\pm$ 1.28
ML4	14.22 $\pm$ 1.39	94.92 $\pm$ 7.80	2.67 $\pm$ 1.18	MR4	18.06 $\pm$ 0.81	102.09 $\pm$ 5.40	3.41 $\pm$ 1.68
ML5	50.89 $\pm$ 0.92	101.78 $\pm$ 1.83	2.59 $\pm$ 1.28	MR5	44.59 $\pm$ 0.59	89.18 $\pm$ 1.18	2.86 $\pm$ 1.86
ML6	15.00 $\pm$ 0.13	100.10 $\pm$ 0.78	2.97 $\pm$ 1.22	MR6	18.44 $\pm$ 0.36	104.24 $\pm$ 2.40	3.19 $\pm$ 1.47



Slika 18. Raspodjela veličina mikročestica lorazepama (A) i risperidona (B).

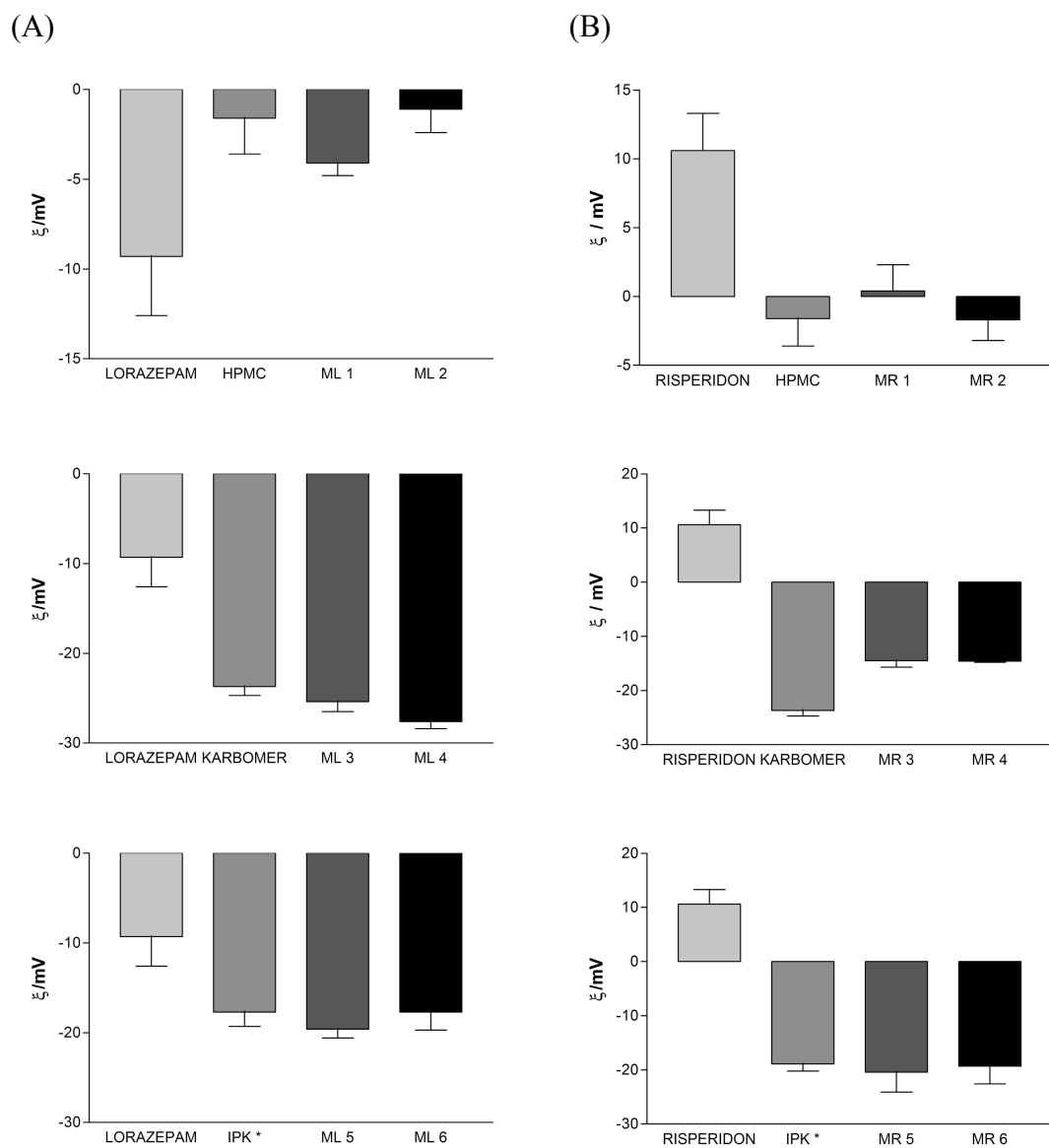


Slika 19. DSC termogrami raspršivanjem osušenog lorazepama (A) te mikročestica ML1 (B), ML2 (C), ML3 (D), ML4 (E), ML5 (F) i ML6 (G).



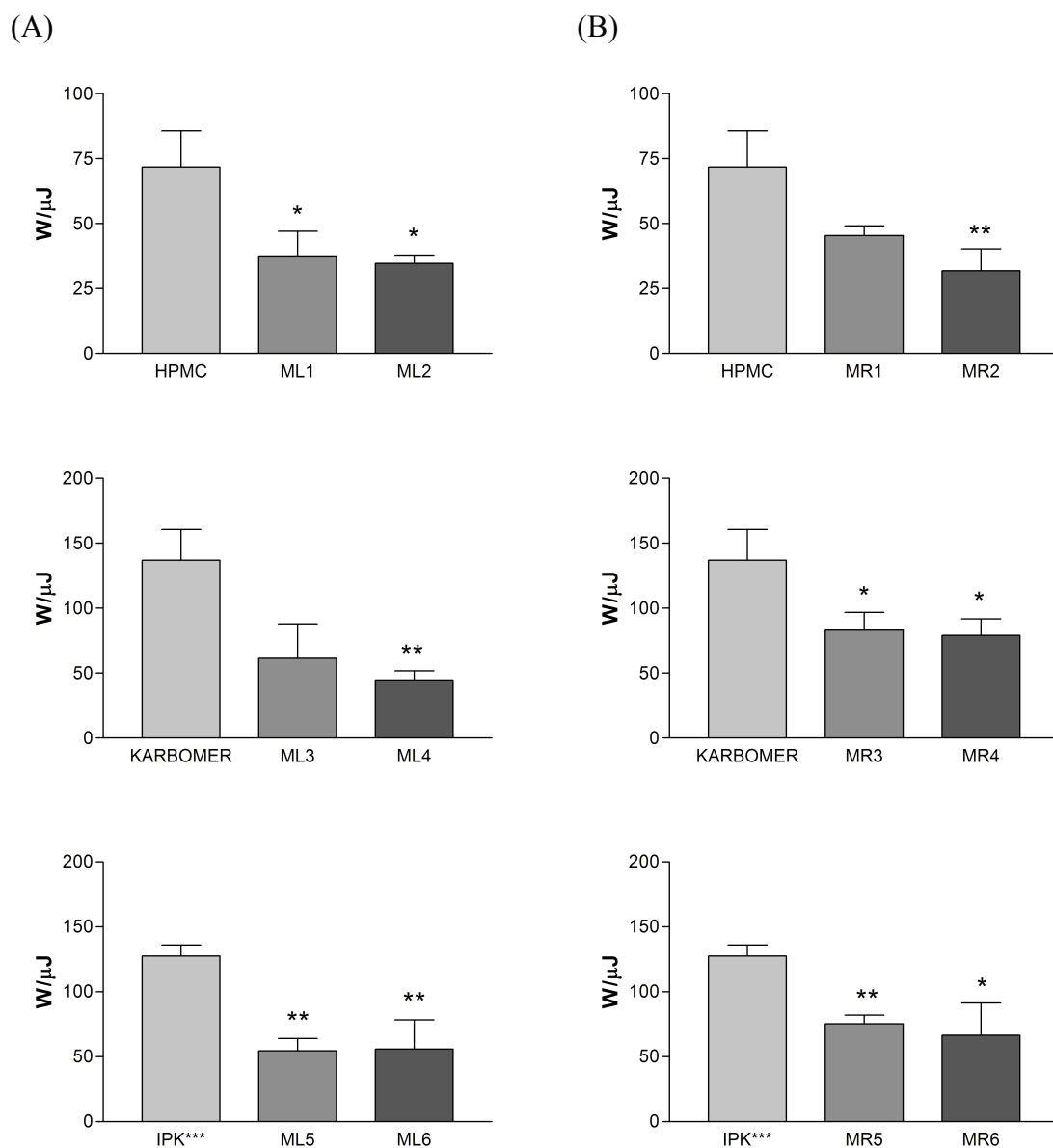
Slika 20. DSC termogrami raspršivanjem osušenog risperidona (A) te mikročestica MR1 (B), MR2 (C), MR3 (D), MR4 (E), MR5 (F) i MR6 (G).





\* - interpolimerni kompleks

Slika 21. Vrijednosti zeta potencijala ( $\zeta$ ) raspršivanjem osušenih lijekova, polimera oblikovanih u mikročestice bez lijeka te mikročestica s lorazepamom (A) i risperidonom (B).



- \* statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u odnosu na mikročestice oblikovane istovrsnim polimerom bez lijeka
- \*\* statistički značajna razlika ( $p < 0.001$ ) u odnosu na mikročestice oblikovane istovrsnim polimerom bez lijeka
- \*\*\* interpolimerni kompleks

Slika 22. Mukoadhezivnost polimera te mikročestica lorazepama (A) i risperidona (B) izražena radom adhezije (srednja vrijednost  $\pm$  SD;  $n=5$ )

#### 4.7. Utjecaj mukoadhezivnih polimera i HP- $\beta$ -CD na oslobađanje lijekova iz mikročestica

Oslobađanje lorazepamom i risperidonom iz mikročestica ispitano je u vodi pri 37°C uz uvjete osigurane topljivosti lijekova ( $c \ll 0.2 C_{ss}$ ). Ovisnost oslobođene količine lorazepamom i risperidonom iz mikročestica o vremenu prikazane su u Slikama 23. i 24., a eksperimentalni podaci obrađeni su prema matematičkim modelima kinetike prvog reda, bifazične kinetike prvog reda te Higuchijeve kinetike. Rezultati su prikazani u Tablicama 7. i 8.

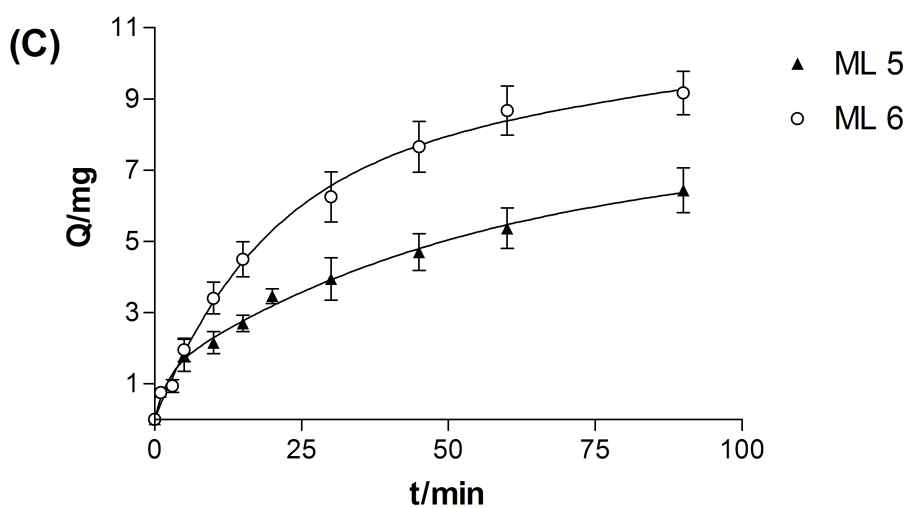
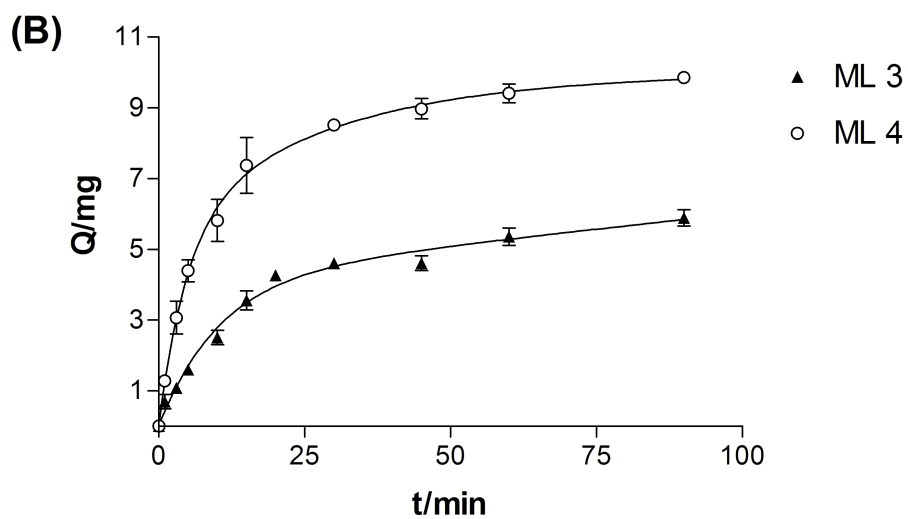
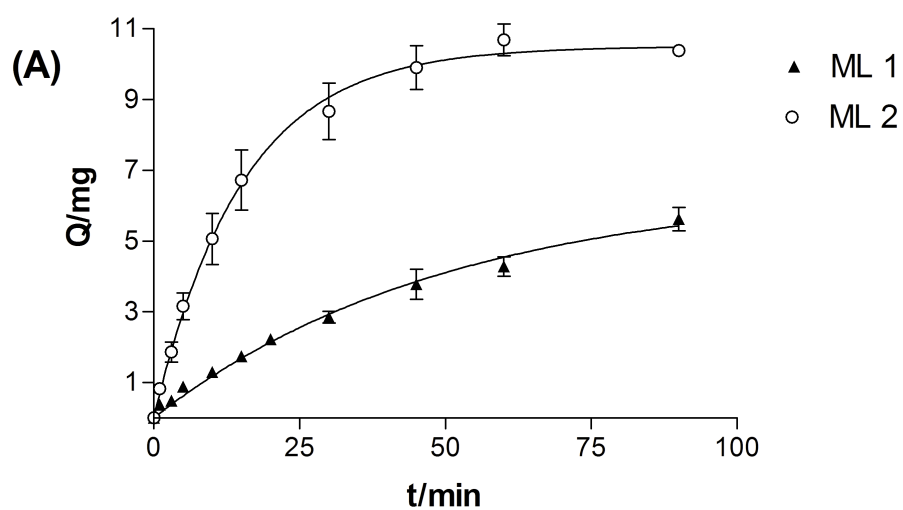
U Tablici 9. i 10. prikazane su vrijednosti eksponenta  $n$  određene prema semiempirijskom modelu Peppasa i Korsmeyera koji je definiran jednačbom (10). Vrijednost eksponenta  $n$  ukazuje na mehanizam koji određuje oslobađanje lijeka iz mikročestica. Pri tome valja voditi računa o geometriji polimernog matriksa. U polimernom matriksu sferičnog oblika, vrijednost eksponenta  $n=0.43$  ukazuje na proces koji je kontroliran difuzijom lijeka kroz polimerni matriks, a vrijednost eksponenta  $n=0.85$  ukazuje na oslobađanje lijeka koje se definira kao "case II transport". Pri tomu je relaksacija polimernih lanaca i erozija matriksa ključan proces koji određuje oslobađanje lijeka iz sustava. Vrijednosti parametra  $n$  u području između ovih krajnjih vrijednosti ukazuju na anomalni transport, odnosno na istovremeni doprinos difuzije lijeka kroz izdubljene matriks i erozije matriksa na oslobađanje lijeka (Siepmann i Peppas, 2001).

Primjenom modela Peppasa i Sahlina (1989) definiranog jednačbama (11) i (12) moguće je pratiti relativni doprinos difuzije, odnosno erozije polimernog matriksa ( $E/D$ ) na oslobađanje lijeka iz mikročestica tijekom eksperimenta. Vrijednosti konstanti  $k_D$  i  $k_E$  za mikročestice s lorazepamom prikazane su u Tablici 9, a iste vrijednosti za mikročestice s risperidonom u Tablici 10. Zbog niskih vrijednosti koeficijenta korelacije ( $r^2$ ) za mikročestice risperidonom oblikovane s karbomerom i interpolimernim kompleksom, vrijednosti konstanti  $k_D$  i  $k_E$  su izostavljene. Oslobađanje risperidonom iz mikročestica oblikovanih s ovim polimerima je vjerojatno kontrolirano drugim mehanizmima, pa ga se ne može opisati ovim modelom.

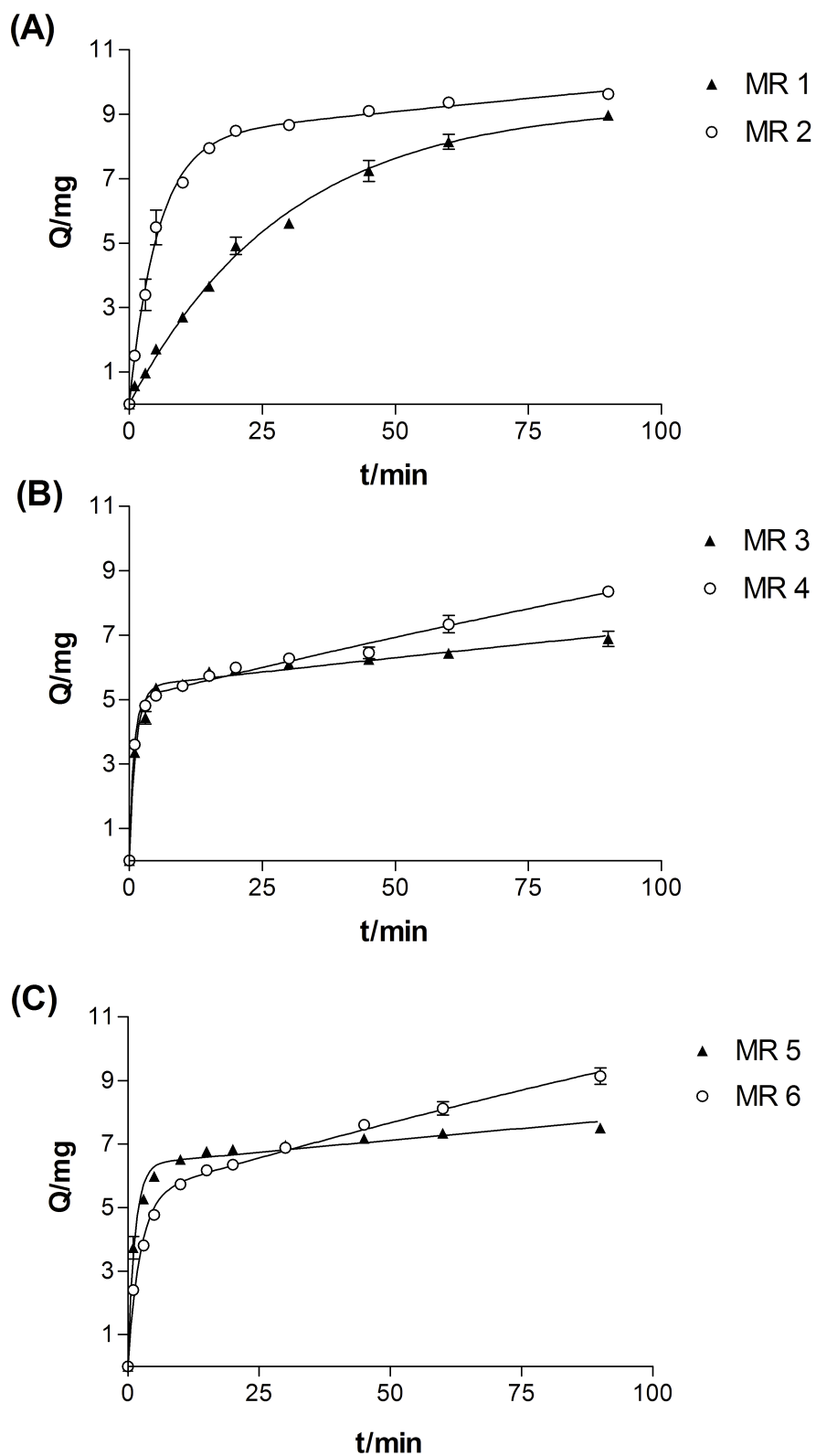
Relativni doprinos erozije i difuzije ( $E/D$ ) oslobađanju lijekova iz mikročestica tijekom trajanja eksperimenta prikazan je u Slikama 25. i 26. Pri tome, niske vrijednosti omjera  $E/D$  ukazuju na difuziju kao dominantan mehanizam koji određuje brzinu oslobađanja lijeka, dok vrijednosti  $E/D > 1$  ukazuju na značajniji doprinos erozije matriksa na brzinu oslobađanja lijeka.

Učinkovitost oslobađanja (DSE) izračunata je prema jednadžbi (13), a olakšava usporedbu profila oslobađanja lorazepama i risperidona iz mikročestica različitog sastava. Ove vrijednosti su prikazane u Tablici 11.

Učinak HP- $\beta$ -CD na oslobađanje lorazepama i risperidona iz mikročestica vrednovan je izračunom fit-faktora ( $f_1$  i  $f_2$ ; Moore i Flanner, 1996). Vrijednosti faktora različitosti ( $f_1$ ) i faktora sličnosti ( $f_2$ ) za mikročestice lorazepama i risperidona oblikovane istovrsnim mukoadhezivnim polimerom prikazane su u Tablici 12. Faktor različitosti proporcionalan je prosječnoj razlici dvaju profila oslobađanja. Nasuprot tome, faktor sličnosti je obrnuto proporcionalan prosječnoj kvadratnoj razlici dvaju profila oslobađanja s naglaskom na velike razlike (za svaku od vremenskih točaka) i mjera je sličnosti dvaju profila oslobađanje. Vrijednosti  $f_1$  u rasponu od 0 do 10 te vrijednosti  $f_2$  od 50 do 100 ukazuju na ekvivalentnost dviju krivulja oslobađanja, a pri tome razlika između referentnog i ispitivanog sustava u pojedinoj točki nije veća od 10% (Koester i sur., 2004).



Slika 23. Profili oslobađanja lorazepama iz mikročestica oblikovanih s HPMC (A), karbomerom (B) i interpolimernim kompleksom (C) u vodi 37°C (srednja vrijednost  $\pm$  SD; n=5).



Slika 24. Profili oslobađanja risperidona iz mikročestica oblikovanih s HPMC (A), karbomerom (B) i interpolimernim kompleksom (C) u vodi 37°C (srednja vrijednost ± SD; n=5).

Tablica 7. Kinetički parametri oslobađanja lijeka iz mikročestica s lorazepamom: konstante brzine oslobađanja ( $k$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_H$ ) i koeficijenti korelacije ( $r^2$ ).

kinetika prvog reda	mikročestice					
	ML1	ML2	ML3	ML4	ML5	ML6
$k \times 10^2/(\text{min}^{-1})$	$0.88 \pm 0.03$	$5.90 \pm 0.33$	$0.89 \pm 0.14$	$4.62 \pm 0.37$	$1.06 \pm 0.06$	$3.98 \pm 0.24$
$r^2$	0.9937	0.9816	0.8401	0.9614	0.9778	0.9776
<b>bifazična kinetika prvog reda</b>						
$k_1 \times 10^2/(\text{min}^{-1})$	$2.37 \pm 0.23$	$7.37 \pm 0.45$	$9.55 \pm 0.75$	$28.25 \pm 2.67$	$6.12 \pm 0.74$	$3.98 \pm 0.24$
$k_2 \times 10^3/(\text{min}^{-1})$	$3.66 \pm 0.52$	$7.33 \pm 0.32$	$3.65 \pm 0.41$	$4.47 \pm 2.51$	$4.53 \pm 0.72$	$7.23 \pm 0.076$
$r^2$	0.9929	0.9935	0.9895	0.9971	0.9865	0.9967
<b>kinetika prema Higuchiju</b>						
$k_H/(\text{mg min}^{-1/2})$	$0.61 \pm 0.02$	$1.51 \pm 0.11$	$0.66 \pm 0.06$	$1.16 \pm 0.16$	$0.69 \pm 0.02$	$1.24 \pm 0.05$
$r^2$	0.9876	0.9699	0.9326	0.8999	0.9942	0.9893

Tablica 8. Kinetički parametri oslobađanja lijeka iz mikročestica s risperidonom: konstante brzine oslobađanja ( $k$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_H$ ) i koeficijenti korelacije ( $r^2$ ).

kinetika prvog reda	mikročestice					
	MR1	MR2	MR3	MR4	MR5	MR6
$k \times 10^2/(\text{min}^{-1})$	$2.58 \pm 0.07$	$9.37 \pm 0.71$	$0.76 \pm 0.21$	$2.18 \pm 0.14$	$0.59 \pm 0.09$	$2.08 \pm 0.13$
$r^2$	0.6192	0.9719	0.8401	0.9651	0.7250	0.9455
<b>bifazična kinetika prvog reda</b>						
$k_1 \times 10^2/(\text{min}^{-1})$	$4.80 \pm 0.47$	$30.30 \pm 3.68$	$91.00 \pm 10.51$	$109.21 \pm 13.67$	$125.34 \pm 36.36$	$144.87 \pm 3.77$
$k_2 \times 10^3/(\text{min}^{-1})$	$17.69 \pm 1.60$	$49.50 \pm 4.71$	$5.48 \pm 0.59$	$9.39 \pm 0.77$	$11.95 \pm 1.99$	$15.67 \pm 0.98$
$r^2$	0.9968	0.9918	0.9909	0.9960	0.9968	0.9960
<b>kinetika prema Higuchiju</b>						
$k_H/(\text{mg min}^{-1/2})$	$1.06 \pm 0.05$	$1.21 \pm 0.17$	$0.28 \pm 0.06$	$0.47 \pm 0.04$	$0.24 \pm 0.05$	$0.63 \pm 0.06$
$r^2$	0.9825	0.7902	0.7137	0.9460	0.8049	0.9641

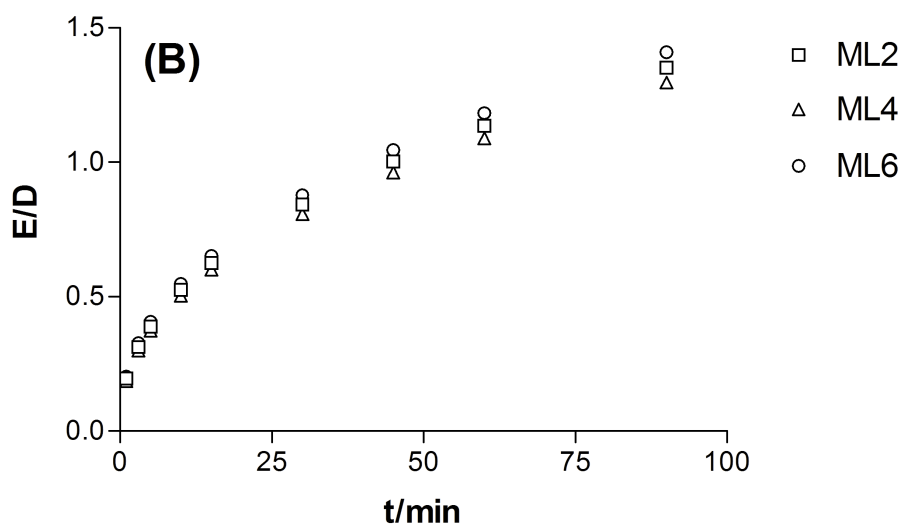
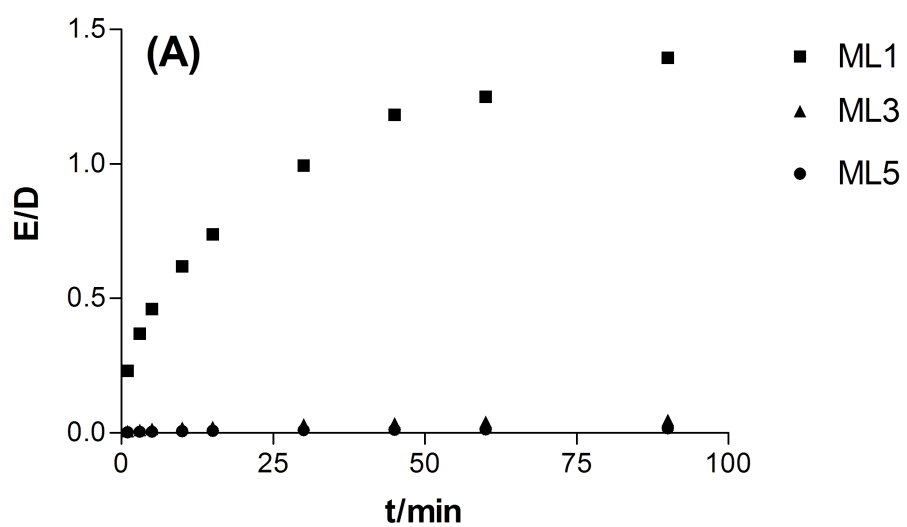


Tablica 9. Parametri oslobađanja lorazepamima iz mikročestica određeni primjenom modela Korsmeyera i Peppasa te modela Peppasa i Sahlina.

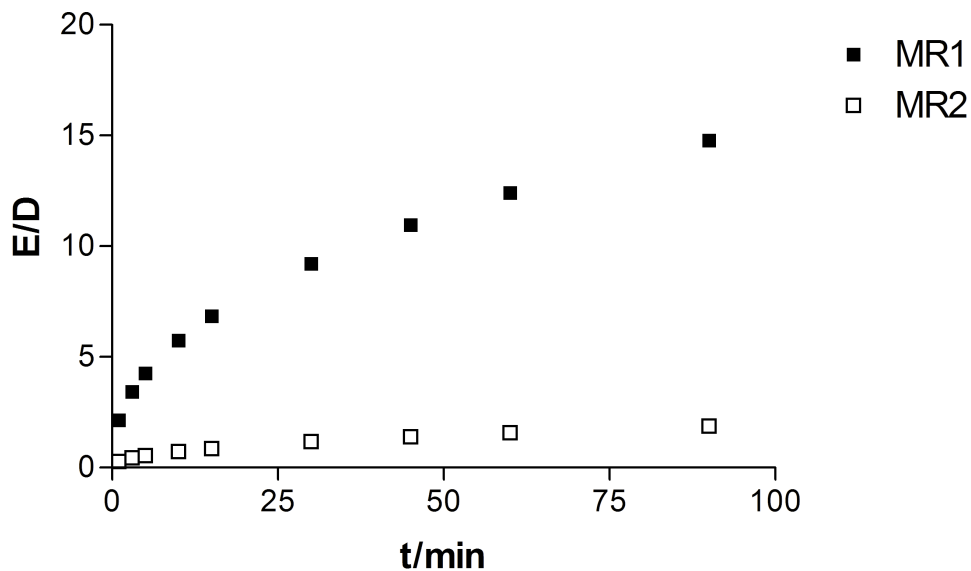
<b>model Korshmeyera i Peppasa</b>	<b>mikročestice</b>					
	ML1	ML2	ML3	ML4	ML5	ML6
n	0.696 ± 0.023	0.783 ± 0.058	0.492 ± 0.057	0.637 ± 0.050	0.509 ± 0.038	0.730 ± 0.071
$K \times 10^2 / (\text{min}^n)$	2.59 ± 0.93	8.14 ± 0.86	7.69 ± 0.88	13.84 ± 0.91	6.79 ± 0.92	8.93 ± 0.78
$r^2$	0.9926	0.9893	0.9667	0.9818	0.9825	0.9943
<b>model Peppasa i Sahlina</b>						
$k_D / (\% \text{ min}^{-m})$	0.319 ± 0.033	1.146 ± 0.295	0.968 ± 0.189	1.453 ± 0.257	0.754 ± 0.045	0.814 ± 0.167
$k_E / (\% \text{ min}^{-2m})$	0.073 ± 0.006	0.224 ± 0.085	0.006 ± 0.046	0.272 ± 0.096	0.019 ± 0.008	0.154 ± 0.039
$r^2$	0.9960	0.9975	0.9855	0.9901	0.9943	0.9832

Tablica 10. Parametri oslobađanja risperidona iz mikročestica određeni primjenom modela Korsmeyera i Peppasa te modela Peppasa i Sahlina.

<b>model Korshmeyera i Peppasa</b>	mikročestice					
	MR1	MR2	MR3	MR4	MR5	MR6
n	0.700 ± 0.029	0.642 ± 0.067	0.089 ± 0.08	0.183 ± 0.023	0.077 ± 0.074	0.235 ± 0.016
$K \times 10^2 / (\text{min}^n)$	5.35 ± 0.93	16.48 ± 1.88	35.12 ± 1.95	34.64 ± 0.75	53.21 ± 1.21	31.57 ± 2.16
$r^2$	0.9897	0.9968	0.9567	0.9220	0.9594	0.9732
<b>model Peppasa i Sahlina</b>						
$k_D / (\% \text{ min}^{-m})$	0.152 ± 0.47	1.542 ± 3.68	-	-	-	-
$k_E / (\% \text{ min}^{-2m})$	0.324 ± 1.60	0.417 ± 4.71	-	-	-	-
$r^2$	0.9909	0.9955	0.8845	0.8528	0.8984	0.8785



Slika 25. Relativni doprinos erozije polimernog matriksa i difuzije lijeka kroz izbubreni polimerni matriks (E/D) na oslobađanje lorazepama iz mikročestica bez (A) i s HP-β-CD (B) tijekom eksperimenta.



Slika 26. Relativni doprinos erozije polimernog matriksa i difuzije lijeka kroz izbubreni polimerni matriks (E/D) na oslobađanje risperidona iz mikročestica oblikovanih s HPMC bez (MR1) i s HP- $\beta$ -CD (MR2) tijekom eksperimenta.

Tablica 11. Učinkovitost oslobađanja (DSE) lorazepamima i risperidona iz mikročestica.

	DSE/(%)					
	Mx1	Mx2	Mx3	Mx4	Mx5	Mx6
x = lorazepam	34.39 $\pm$ 3.11	87.02 $\pm$ 8.45	45.20 $\pm$ 2.24	83.21 $\pm$ 3.82	44.12 $\pm$ 6.79	71.10 $\pm$ 1.36
x = risperidon	63.81 $\pm$ 0.94	85.11 $\pm$ 1.75	61.38 $\pm$ 1.19	66.21 $\pm$ 2.26	69.67 $\pm$ 0.97	72.75 $\pm$ 1.70

Tablica 12. Vrijednosti fit faktora ( $f_1$  i  $f_2$ ) podataka oslobađanja lijekova iz mikročestica, sa i bez HP- $\beta$ -CD.

	LORAZEPAM			RISPERIDON		
	ML1/ML2	ML3/ML4	ML5/ML6	MR1/MR2	MR3/MR4*	MR5/MR6**
$f_1$ /(%)	244.85	116.68	52.82	131.73	6.79	13.73
$f_2$ /(%)	23.52	28.03	36.96	25.15	62.66	53.17

\* i \*\*-ekvivalentni sustavi

## 4.8. *In vitro* ispitivanje difuzije lorazepama i risperidona

### 4.8.1. Utjecaj HP- $\beta$ -CD na difuziju lorazepama i risperidona iz kompleksa

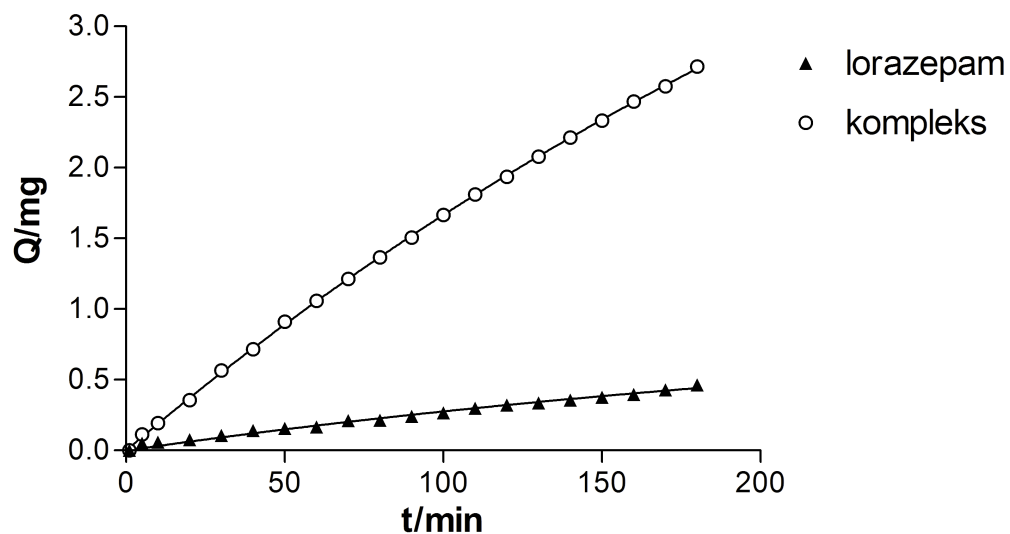
Ispitan je utjecaj HP- $\beta$ -CD na *in vitro* difuziju lorazepama i risperidona korištenjem horizontalne Franz-difuzijske ćelije. Pri tome su simulirani uvjeti koji odgovaraju apsorpciji na površini nazalne sluznice. Ovisnost količine difundiranog lijeka iz raspršivanjem osušenog lorazepama i risperidona te iz njihovih inkluzijskih kompleksa o vremenu ispitivanja prikazana je u Slici 27. Vrijednosti konstante brzine difuzije, koeficijenta difuzije te učinkovitosti difuzije (DFE) prikazane su u Tablici 13. Difuzija lorazepama i risperidona odvija se kinetikom nultog reda ( $r^2 > 0.99$ ), a HP- $\beta$ -CD ne utječe na ovu kinetiku. Utjecajem HP- $\beta$ -CD, brzina difuzije lorazepama i risperidona povećana je 6.4, odnosno 2.8 puta.

Tablica 13. Vrijednosti konstante brzine difuzije ( $k$ ), koeficijenta difuzije ( $D$ ) i učinkovitosti difuzije (DFE) pri ispitivanju difuzije lorazepama i risperidona iz raspršivanjem osušenog lijeka te iz inkluzijskih kompleksa .

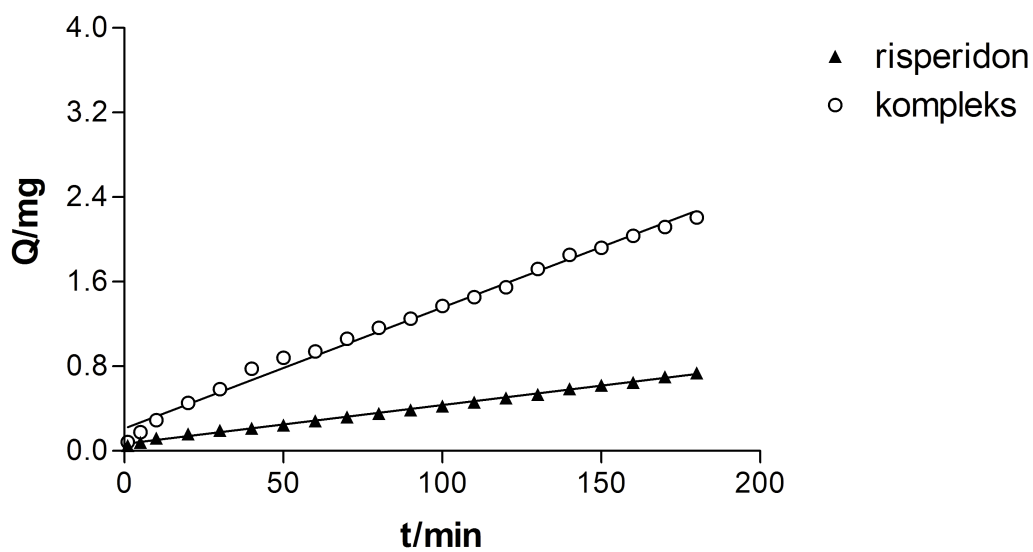
uzorak	$k \times 10^3 / (\text{mg min}^{-1})$	$r^2$	$D \times 10^4 / (\text{mg min}^{-1} \text{ cm}^{-2})$	DFE/(%)
lorazepam	$2.36 \pm 0.05$	0.9935	1.42	$4.88 \pm 0.13$
kompleks	$15.05 \pm 0.24$	0.9955	9.03	$29.27 \pm 0.40^*$
risperidon	$3.66 \pm 0.04$	0.9974	2.20	$7.96 \pm 0.18$
kompleks	$10.42 \pm 0.23$	0.9920	6.25	$25.07 \pm 0.12^*$

\* - statistički značajna razlika u odnosu na raspršivanjem osušeni lijek ( $p < 0.05$ ).

(A)



(B)

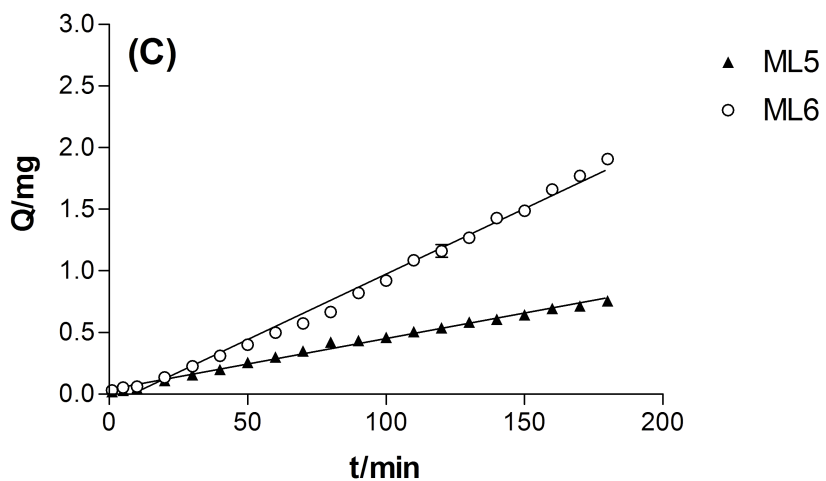
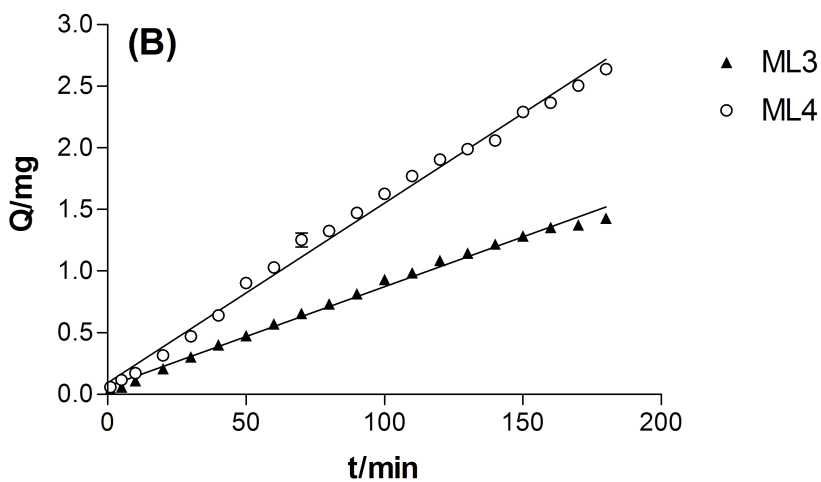
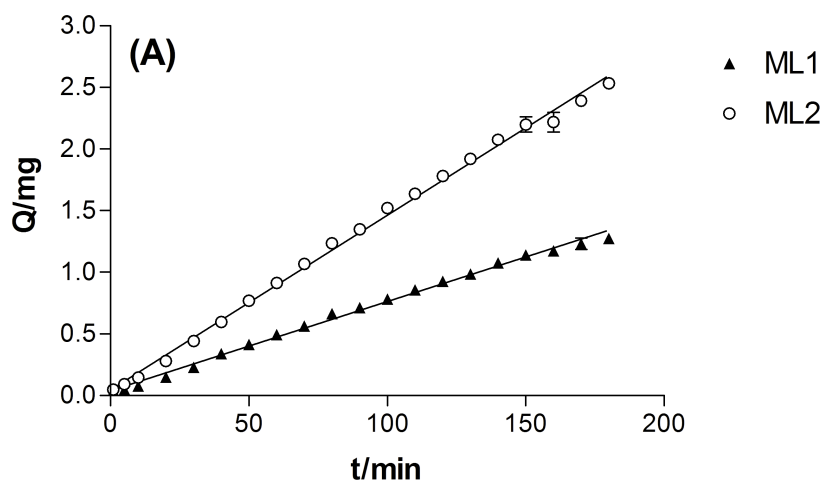


Slika 27. Zavisnost količine difundiranog lijeka iz raspršivanjem osušenog lorazepama (A) i risperidona (B) te iz njihovih inkluzijskih kompleksa o vremenu ispitivanja pri 37°C (srednja vrijednost  $\pm$  SD; n=3).

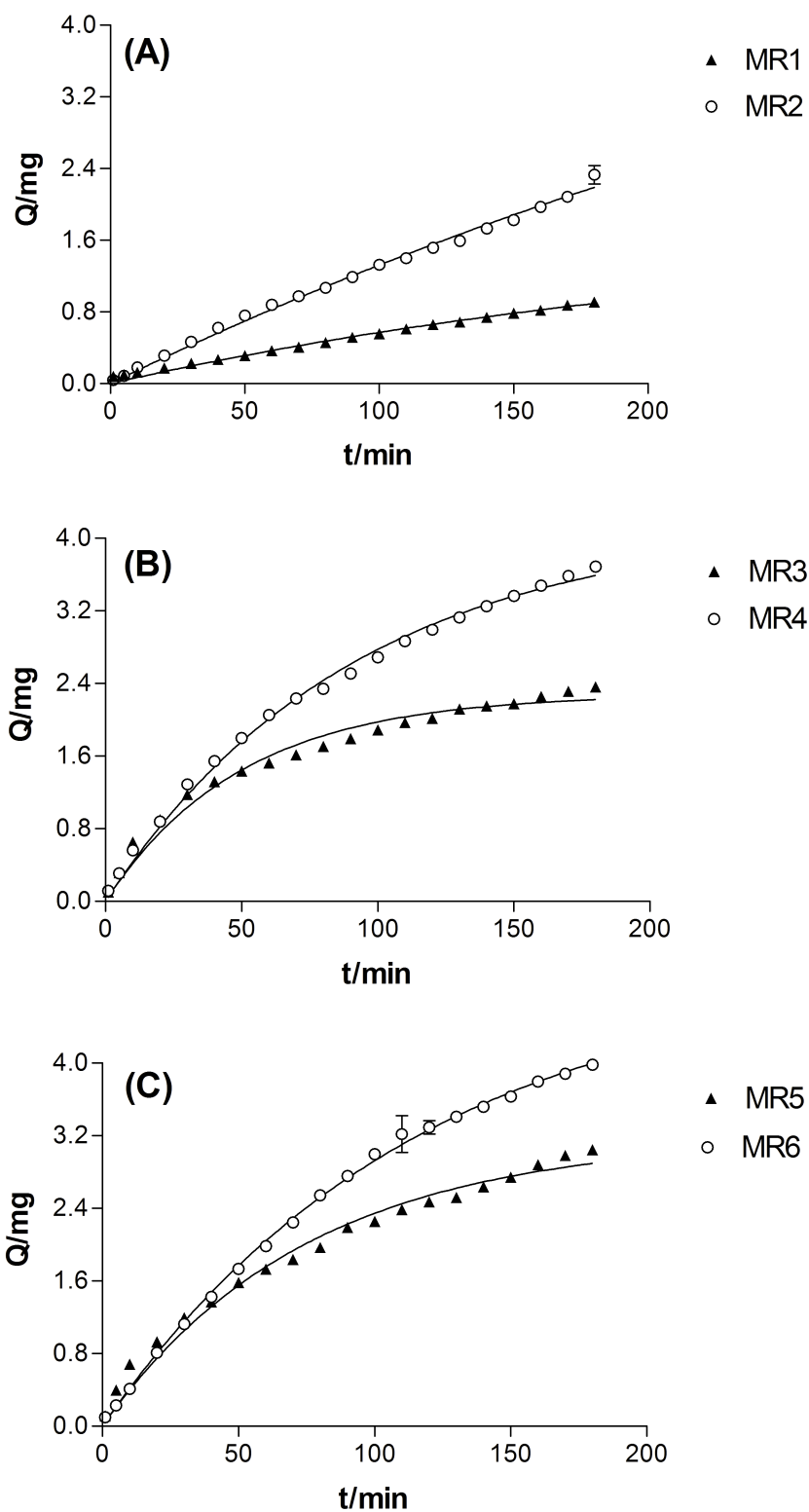
#### **4.8.2. Utjecaj mukoadhezivnih polimera i HP- $\beta$ -CD na difuziju lorazepama i risperidona iz mikročestica**

Oblikovanjem mikročestica mijenja se difuzibilnost lorazepama i risperidona. Ovisnost količine difundiranog lorazepama i risperidona o vremenu ispitivanja difuzije lijeka iz mikročestica kroz polupropusnu membranu prikazane su u Slikama 28. i 29. Vrijednosti konstanti brzina difuzije, koeficijenta difuzije te učinkovitosti difuzije (DFE) lorazepama iz mikročestica prikazane su u Tablici 14., a iste vrijednosti za difuziju risperidona prikazane su u Tablici 15. Difuzija lorazepama iz mikročestica odvija se kinetikom nultog reda. Vrsta mukoadhezivnog polimera mijenja kinetiku difuzije risperidona iz mikročestica. Difuzija risperidona iz mikročestica oblikovanih s HPMC (MR1 i MR2) odvija se kinetikom nultog reda, dok se difuzija risperidona iz mikročestica oblikovanih s karbomerom (MR3 i MR4) i interpolimernim kompleksom (MR5 i MR6) odvija kinetikom prema Higuchiju. Neovisno o vrsti mukoadhezivnog polimera, HP- $\beta$ -CD je ubrzao difuziju lorazepama i risperidona iz mikročestica.





Slika 28. Ovisnost količine difundiranog lorazepama o vremenu ispitivanja difuzije lijeka iz mikročestica oblikovanih s HPMC (A), karbomerom (B) i interpolimernim kompleksom (C) pri 37°C (srednja vrijednost  $\pm$  SD; n=3).



Slika 29. Ovisnost količine difundiranog risperidona o vremenu ispitivanja difuzije lijeka iz mikročestica oblikovanih s HPMC (A), karbomerom (B) i interpolimernim kompleksom (C) pri 37°C (srednja vrijednost  $\pm$  SD; n=5).

Tablica 14. Vrijednosti konstante brzine difuzije (k), koeficijenta difuzije (D) i učinkovitosti difuzije (DFE) u ispitivanju difuzije lorazepama iz mikročestica.

<b>mikročestice</b>	<b><math>k \times 10^3 / (\text{mg min}^{-1})</math></b>	<b><math>r^2</math></b>	<b><math>D \times 10^4 / (\text{mg min}^{-1} \text{ cm}^{-2})</math></b>	<b>DFE/%</b>
<b>ML1</b>	$7.24 \pm 0.12$	0.9952	4.34	$13.82 \pm 0.56$
<b>ML2</b>	$14.18 \pm 0.18$	0.9970	8.51	$26.48 \pm 0.65^*$
<b>ML3</b>	$8.09 \pm 0.15$	0.9933	4.85	$15.89 \pm 0.58$
<b>ML4</b>	$14.56 \pm 0.28$	0.9932	8.74	$28.27 \pm 0.09^*$
<b>ML5</b>	$4.15 \pm 0.09$	0.9922	2.49	$8.23 \pm 0.17$
<b>ML6</b>	$10.62 \pm 0.23$	0.9914	6.37	$17.12 \pm 0.52^*$

\* - statistički značajna razlika u odnosu na mikročestice oblikovane s istim mukoadhezivnim polimerom bez HP- $\beta$ -CD ( $p < 0.05$ ).

Tablica 15. Vrijednosti konstante brzine difuzije ( $k$  i  $k_H$ ), koeficijenta difuzije ( $D$ ) i učinkovitosti difuzije (DFE) u ispitivanju difuzije risperidona iz mikročestica.

mikročestice	$k \times 10^3 / (\text{mg min}^{-1})$	$r^2$	$k_H 10^3 / (\text{mg min}^{-0.5})$	$r^2$	$D \times 10^4 / (\text{mg min}^{-1} \text{cm}^{-2})$	DFE / $(\text{mg min}^{-1})$
<b>MR1</b>	$4.68 \pm 0.03$	0.9992	-	-	2.81	$10.06 \pm 0.06$
<b>MR2</b>	$11.97 \pm 0.19$	0.9951	-	-	7.18	$23.40 \pm 0.28^{**}$
<b>MR3</b>	-	-	$17.23 \pm 0.43$	0.9886	6.52*	$33.53 \pm 0.36$
<b>MR4</b>	-	-	$22.54 \pm 0.49$	0.9915	11.44*	$47.14 \pm 0.25^{**}$
<b>MR5</b>	-	-	$22.77 \pm 0.30$	0.9968	8.86*	$39.89 \pm 0.32$
<b>MR6</b>	-	-	$30.05 \pm 1.01$	0.9951	13.19*	$49.76 \pm 0.26^{**}$

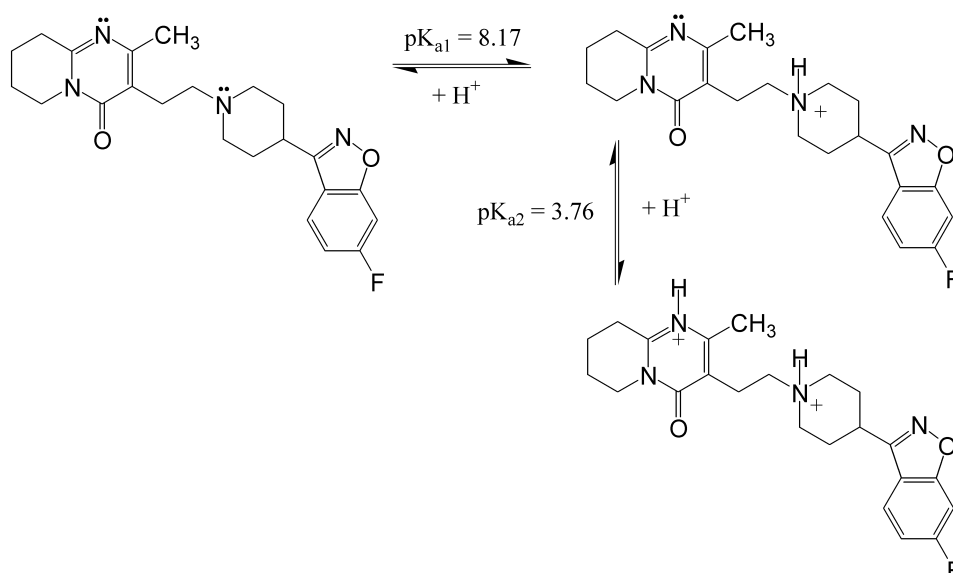
\* - izračunato prema linearnom segmentu ovisnosti količine difundiranog risperidona o vremenu ispitivanja difuzije lijeka iz mikročestica.

\*\* - statistički značajna razlika u odnosu na mikročestice oblikovane s istim mukoadhezivnim polimerom bez HP- $\beta$ -CD ( $p < 0.05$ ).

## **5. RASPRAVA**

## 5.1 Utjecaj pH-vrijednosti medija na topljivost risperidona i nastajanje inkluzijskog kompleksa s HP- $\beta$ -CD u otopini

Topljivost risperidona u vodi mijenja se ovisno o pH-vrijednosti medija, tj. porastom pH-vrijednost medija smanjuje se topljivost lijeka (Tablica 2.). Promjena topljivosti risperidona promjenom pH-vrijednosti medija može se objasniti ionizacijom molekule lijeka. Zavisno o pH-vrijednosti medija, risperidon je neutralna molekula, monoprotionirani ili diprotionirani oblik (Shema 1.). Ionizacija molekule lijeka povećava hidrofilnost risperidona, a time i njegovu topljivost u vodi.



Shema 1. Ionizacija molekule risperidona

Pri pH-vrijednosti medija većoj za dvije jedinice od  $pK_{a1}$  ( $pH \geq 10.2$ ) u otopini će prevladavati neprotionirani oblik lijeka, niske topljivosti ( $28.13 \pm 1.23 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Pri pH vrijednosti medija  $pK_{a1}-2 \leq pH \leq pK_{a1}+2$  ( $6.2 \leq pH \leq 10.2$ ) u sustavu će istovremeno biti prisutni neprotionirani i monoprotionirani oblik risperidona u različitim omjerima. U intervalu pH - vrijednosti  $pK_{a2}+2 \leq pH \leq pK_{a1}-2$  ( $5.8 \leq pH \leq 6.2$ ) u sustavu će prevladavati monoprotionirani oblik, a pri nižim pH - vrijednostima medija rasti će udio diprotioniranog risperidona koji je dobre topljivosti ( $> 13 \text{ mg/mL}$ ).

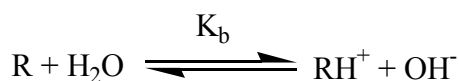
Topljivost risperidona u vodi ( $s$ ) može se definirati kao:

$$s = [R] + [RH^+] + [RH_2^{++}] \quad (19)$$

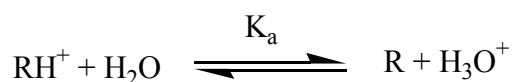
gdje  $[R]$  predstavlja koncentraciju neprotoniranog risperidona,  $[RH^+]$  koncentraciju monoprotiranog risperidona, a  $[RH_2^{++}]$  koncentraciju diprotoniranog oblika lijeka. S obzirom na raspon pH-vrijednosti pri kojima se određivala topljivost lijeka ( $6.0 \leq \text{pH} \leq 10.4$ ), utjecaj diprotoniranog oblika lijeka na topljivost risperidona može se zanemariti (Junquera i Aicart, 1999; Miro i sur, 2004), stoga jednačba (19) prelazi u:

$$s = [R] + [RH^+] \quad (20)$$

Protonaciju molekule risperidona možemo prikazati sljedećom ravnotežnom reakcijom:



odnosno



iz čega slijedi da se utjecaj koncentracije  $[H_3O^+]$ , odnosno pH-vrijednosti medija na koncentraciju monoprotiranog oblika lijeka može izraziti kao

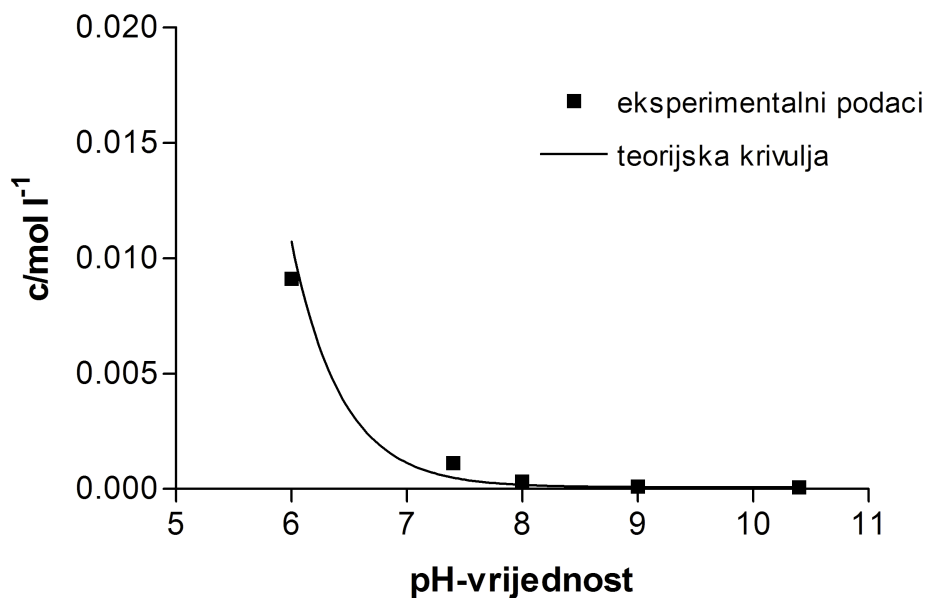
$$[RH^+] = \frac{[R][H_3O^+]}{K_a} \quad (21)$$

odnosno

$$[RH^+] = [R] \times 10^{pK_a - pH} \quad (22)$$

Budući da je  $[R]$  jednaka intrizičkoj topljivosti lijeka ( $s_0$ ) te ne ovisi o pH-vrijednosti medija, ova se vrijednost može zamijeniti sa  $s_0$ , te uvrštavanjem u jednačbu (20) dobivamo izraz:

$$s = s_0 (1 + 10^{pK_a - pH}) \quad (23)$$

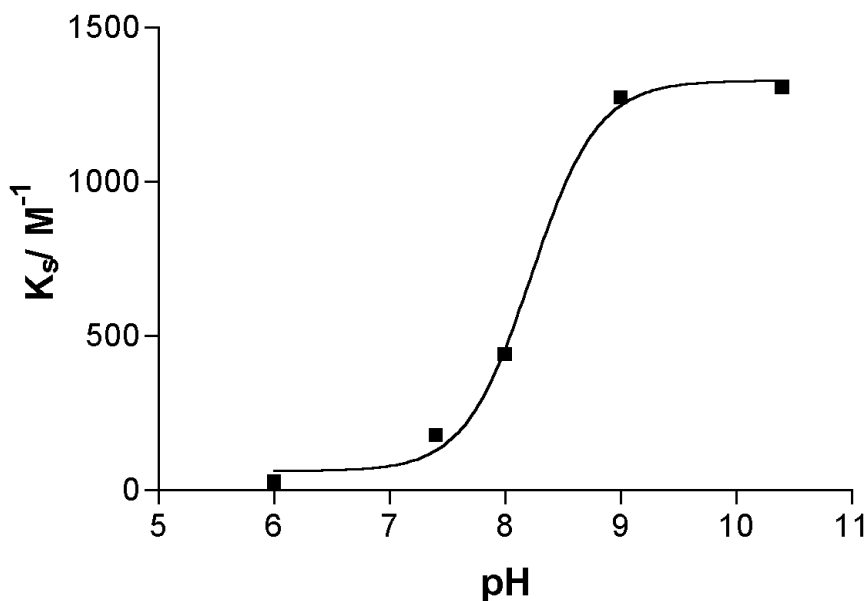


Slika 30. Utjecaj pH-vrijednosti medija na topljivost risperidona u vodi pri 25°C.

U Slici 30. prikazana je ovisnost eksperimentalno određenih koncentracija otopljenog risperidona o pH - vrijednostima medija te teoretska krivulja izračunata prema jednadžbi (23). Korelacija između eksperimentalnih i teorijski izračunatih vrijednosti je visoka ( $r^2 = 0.9804$ ) što upućuje na zaključak da jednadžba (23) dobro opisuje topljivost risperidona u ispitivanom rasponu pH-vrijednosti.

U otopini risperidon s HP- $\beta$ -CD stvara inkluzijske komplekse molarnog odnosa 1:1. Konstante stabilnosti kompleksa pri različitim pH-vrijednostima prikazane su u Tablici 2. pH-vrijednost medija značajno utječe na vrijednosti konstanti stabilnosti.





Slika 31. Ovisnost vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa risperidona i HP- $\beta$ -CD ( $K_s$ ) o pH-vrijednosti medija.

Ovisnost konstante stabilnosti o pH-vrijednosti medija prikazana je u Slici 31. Riječ o sigmoidalnoj zavisnosti, pri čemu se vrijednosti konstanti stabilnosti kreću između dvije krajnje vrijednosti s točkom infleksije pri pH-vrijednosti 8.2. U mediju pH-vrijednosti 10.4 prisutan je isključivo neionizirani oblik risperidona koji s HP- $\beta$ -CD stvara stabilne inkluzijske komplekse pa je određena vrijednost konstante stabilnosti  $1308.33 \pm 33.54 M^{-1}$ . Pri pH-vrijednosti 6.0 risperidon je isključivo u monoprotiniranom obliku. Monoprotinirani oblik risperidona je dobre topljivosti i s HP- $\beta$ -CD stvara inkluzijski kompleks relativno niske vrijednosti konstante stabilnosti ( $31.70 \pm 1.16 M^{-1}$ ). Niska vrijednost konstante stabilnosti monoprotiniranog kompleksa može se objasniti ionizacijom molekule lijeka. Monoprotinirani risperidon je hidrofilniji u odnosu na neprotinirani oblik lijeka te ima manji afinitet za uklapanje u lipofilnu šupljinu HP- $\beta$ -CD.

Termodinamički gledano, molarna entalpija nastajanja inkluzijskog kompleksa smanjuje se ionizacijom molekule lijeka, što upućuje na slabiju interakciju ionizirane molekule lijeka s ciklodekstrinom (Perlovich i sur., 2003). No, bez obzira na ionizaciju molekule lijeka, standardna promjena entalpije sustava je uvijek pozitivna. U otopini, molekula lijeka je okružena sa solvatnim slojem koji se sastoji od strukturiranih molekula vode. Nastajanjem inkluzijskog kompleksa dolazi do

razbijanja solvatnog sloja oko molekule lijeka te do oslobađanja molekula vode iz centralne šupljine molekule ciklodekstrina, što doprinosi porastu nereda u sustavu. Može se zaključiti kako je promjena entropije sustava pokretačka sila koja uvjetuje nastajanje inkluzijskog kompleksa ciklodekstrin-lijek, pa ciklodekstrini stvaraju inkluzijske komplekse i s ioniziranim molekulama.

U sustavu koji sadrži ciklodekstrin u rasponu pH-vrijednosti 6.0 – 10.4, ukupna topljivost risperidona može se definirati sljedećim izrazom:

$$s = s_0 + [RH^+] + [CD - R] + [CD - RH^+] \quad (24)$$

pri čemu  $[CD - R]$  i  $[CD - RH^+]$  predstavljaju koncentracije neprotoniranog, odnosno monoprotoniranog kompleksa risperidona s HP- $\beta$ -CD. Budući da risperidon s HP- $\beta$ -CD stvara inkluzijski kompleks molarnog odnosa 1:1, koncentracije kompleksa definirane su konstantom stabilnosti neprotoniranog, odnosno protoniranog kompleksa,  $K_1$  i  $K_2$ , i opisane su sljedećim izrazima:

$$K_1 = \frac{[CD - R]}{s_0 [CD]_s} \quad (25)$$

$$K_2 = \frac{[CD - RH^+]}{s_0 [CD]_s} \quad (26)$$

Koncentracija ciklodekstrina koji nije uključen u nastajanje inkluzijskog kompleksa  $[CD]_s$  definirana je izrazom:

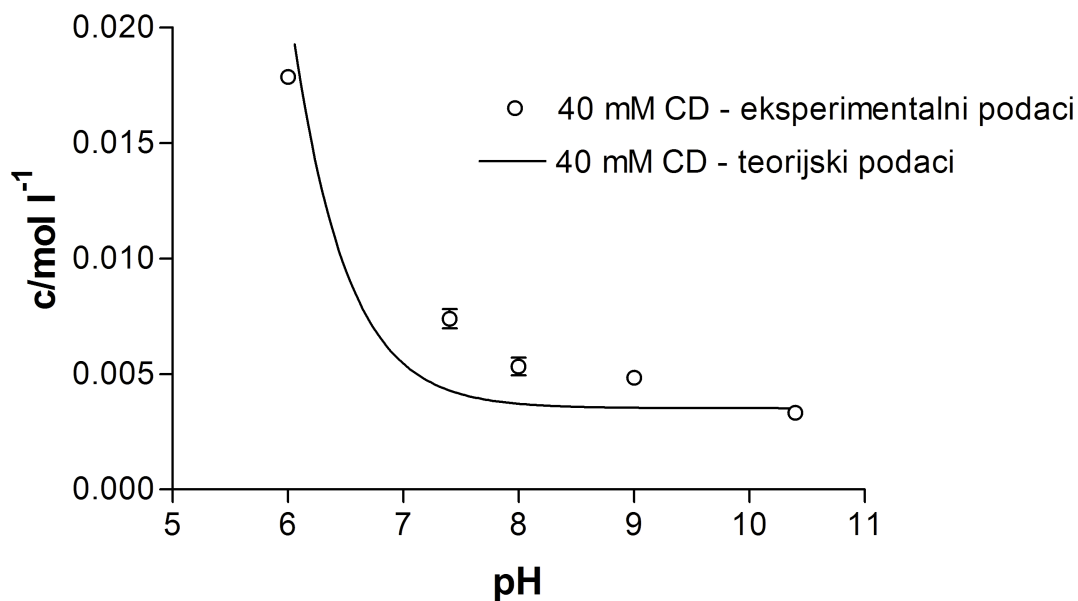
$$[CD]_s = [CD]_u - [CD - R] - [CD - RH^+] \quad (27)$$

pri čemu je  $[CD]_u$  ukupna koncentracija ciklodekstrina u sustavu. Uvrštavanjem izraza iz jednadžbi (25) i (26) u jednadžbu (27) koncentracija slobodnog ciklodekstrina u sustavu definirana je kao:

$$[CD]_s = \frac{[CD]_u}{1 + K_1 s_0 + K_2 s_0 10^{pK_{a1} - pH}} \quad (28)$$

Uvrštavanjem jednadžbe (22), (25), (26) i (28) u izraz (24) dobiva se izraz za ukupnu topljivost risperidona utjecajem HP- $\beta$ -CD u rasponu pH-vrijednosti 6.0 – 10.4:

$$s = s_0 + s_0 10^{pK_{a1} - pH} + \frac{K_1 s_0 + K_2 s_0 10^{pK_{a1} - pH}}{1 + K_1 s_0 + K_2 s_0 10^{pK_{a1} - pH}} [CD]_u \quad (29)$$



Slika 32. Utjecaj pH-vrijednosti medija na topljivost risperidona u 40 mmol L<sup>-1</sup> otopini HP-β-CD.

U Slici 32. prikazana je eksperimentalno određena topljivost risperidona u sustavu s 40 mmol L<sup>-1</sup> HP-β-CD pri različitim pH - vrijednostima te teorijska krivulja izračunata prema jednadžbi (29). Teorijski određene topljivosti donekle odstupaju od eksperimentalnih podataka ( $r^2 = 0.9472$ ), naročito u području pH-vrijednosti 7.4 do 9.0. U tom pH-području u otopini su istovremeno prisutni neprotonirani i protonirani oblik lijeka te njihovi inkluzijski kompleksi. Mogućnosti međusobnih interakcija u takvom sustavu su mnogobrojne. Ukupna topljivost risperidona u takvom sustavu je posljedica aditivnog učinka različitih solubilizacijskih procesa, kao što je asocijacija protoniranih i neprotoniranih molekula lijeka (Bergstörn i sur., 2004), nastajanje inkluzijskih kompleksa ciklodekstrin-lijek, interakcija nabijenih i nenabijenih molekula lijeka s inkluzijskim kompleksom itd. (Loftsson i sur., 2005). Stoga se ovakvi sustavi ne mogu točno definirati matematičkim izrazom. Točan mehanizam ovih interakcija na molekularnoj razini je tek potrebno razjasniti.

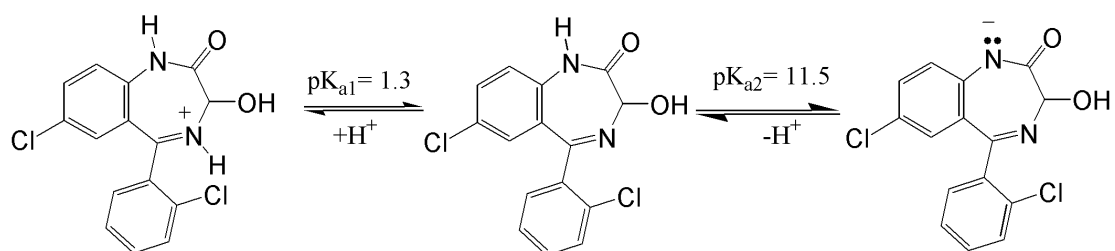
Učinkovitost kompleksiranja (*eng.* "complexation efficiency") je parametar koji također opisuje interakciju lijek-ciklodekstrin u otopinama (Loftsson i sur., 2005). Prednost korištenja učinkovitosti kompleksiranja u odnosu na konstantu

stabilnosti kompleksa u opisivanju učinka ciklodekstrina na topljivost lijeka je u tome što ovaj parametar ne uključuje vrijednost topljivosti lijeka u sustavu bez ciklodekstrina ( $s_0$ ). Određivanje  $s_0$  može biti povezano s velikim odstupanjima zbog eksperimentalne greške, naročito kod lijekova sa  $s_0 < 1 \text{ mmol L}^{-1}$ . Zbog toga su moguće velike varijacije u određivanju vrijednosti konstante stabilnosti kompleksa.

Vrijednosti učinkovitosti kompleksiranja risperidona s HP- $\beta$ -CD pri različitim pH-vrijednostima prikazane su u Tablici 2. Vrijednosti ovog parametra su obrnuto proporcionalne u odnosu na vrijednosti konstante stabilnosti kompleksa. U sustavu pH-vrijednosti 10.4 učinkovitost kompleksiranja iznosi 9.0%. Pri toj pH-vrijednosti risperidon je u neioniziranom obliku, pa je topljivost risperidona je vrlo niska (0.028 mg). Zbog toga je niska koncentracija risperidona raspoloživa interakciji s HP- $\beta$ -CD, a u otopini je prisutan visoki udio "slobodnih" molekula ciklodekstrina. Nastali inkluzijski kompleks je stabilan, na što upućuje visoka vrijednost konstante stabilnosti kompleksa (Tablica 2.). Pri nižim pH-vrijednostima u otopini raste udio monoprotiniranog oblika lijeka koji je veće topljivosti u odnosu na neionizirani risperidon. Stoga je veći broj molekula lijeka raspoloživ za nastajanje inkluzijskog kompleksa. Također, više koncentracije otopljenog lijeka pomiču ravnotežu reakcije u smjeru nastajanja inkluzijskog kompleksa (Tommasini i sur., 2004). Zbog toga učinkovitost kompleksiranja raste sniženjem pH-vrijednosti medija te pri pH-vrijednosti 6.0 iznosi 29.1%. Time se može objasniti sinergistički utjecaj pH-vrijednosti medija i HP- $\beta$ -CD na topljivost risperidona.

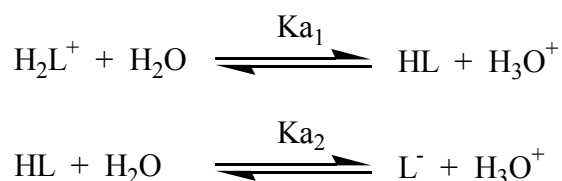
## 5.2. Utjecaj pH-vrijednosti medija na topljivost lorazepama i nastajanje inkluzijskog kompleksa s HP- $\beta$ -CD u vodi

Lorazepam je vrlo teško topljiv u vodi (oko  $0.07 \text{ mg mL}^{-1}$ ), a topljivost lijeka se neznatno mijenja s promjenom pH-vrijednosti medija (Tablica 3.). Promjenom pH-vrijednosti dolazi do ionizacije molekule lorazepama (Popović i sur., 2003). Ionizacija molekule lijeka prikazana je u Shemi 2, a  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$ -vrijednosti iznose 1.3 i 11.5.



Shema 2. Ionizacija molekule lorazepama.

U kiselom području pH-vrijednosti dolazi do protonacije N4 atoma dušika u benzodiazepinskom prstenu te nastaje diprotonirani oblik lijeka ( $H_2L^+$ ). Popović i sur. (2003) su pokazali da pri visokim pH-vrijednostima dolazi do deprotonacije N1 atoma benzodiazepinskog prstena te nastaje neprotonirani oblik lorazepama ( $L^-$ ). Ionizacija molekule lorazepama može se prikazati sljedećim ravnotežnim reakcijama:



Iz toga slijedi da se utjecaj koncentracije  $[H_3O^+]$ , odnosno pH-vrijednosti medija na koncentraciju diprotoniranog i neprotoniranog lorazepama može izraziti kao:

$$[H_2L] = \frac{[HL][H_3O^+]}{K_{a1}} = [HL] \times 10^{pK_{a1} - pH} \quad (30)$$

odnosno

$$[L^-] = \frac{K_{a2}[HL]}{[H_3O^+]} = [HL] \times 10^{pH - pK_{a2}} \quad (31)$$

pri čemu  $[H_2L^+]$ ,  $[HL]$  i  $[L^-]$  predstavljaju koncentracije diprotoniranog, monoprotiranog te neprotoniranog oblika lijeka. S obzirom na ionizaciju molekule lorazepama, topljivost lijeka u sustavima različitih pH-vrijednosti može se opisati izrazom:

$$s = [H_2L^+] + [HL] + [L^-] \quad (32)$$

U ispitivanom rasponu pH-vrijednosti ( $pK_{a1} + 2 \leq pH \leq pK_{a2} - 2$ ) koncentracije  $[H_2L^+]$  i  $[L^-]$  su zanemarivo niske te se jednadžba (32) može pojednostaviti na:

$$s = [HL] = s_0 \quad (33)$$

Prema jednadžbi (33), topljivost lorazepama u ispitivanim uvjetima ne zavisi o pH-vrijednosti otopine. Odstupanje eksperimentalnih podataka od ove pretpostavke nije statistički značajno, a može se objasniti eksperimentalnom greškom. Osim toga, eksperimentalno određene topljivosti lijeka pri različitim pH-vrijednostima medija često odstupaju od teoretskih vrijednosti izračunatih pomoću Hendersson-Hasselbachove jednadžbe (Bergstöröm i sur., 2004). Moguće je da asocijacija molekula lijeka te interakcija lijeka sa solima korištenim u pripremi pufera utječe na topljivost lorazepama (Loftsson i sur., 2005).

Utjecajem ciklodekstrina mijenja se topljivost lijeka što se može objasniti nastajanjem inkluzijskog kompleksa molarnog odnosa lorazepama i HP- $\beta$ -CD 1:1. Vrijednost konstante stabilnosti i učinkovitost kompleksiranja se ne mijenja utjecajem pH-vrijednosti. U ispitivanim sustavima uglavnom prevladava neionizirani oblik molekule lijeka te određene vrijednosti konstante stabilnosti opisuju nastajanje inkluzijskog kompleksa neioniziranog lorazepama i HP- $\beta$ -CD.

Učinkovitost kompleksiranja lorazepama s HP- $\beta$ -CD iznosi oko 6%. Molekula lorazepama je neplanarne strukture i niske topljivosti u vodi. Čini se da su to čimbenici koji ograničavaju nastajanje inkluzijskog kompleksa u otopini, pa je stoga učinkovitost kompleksiranja niska.

### **5.3. Nastajanje inkluzijskog kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD utjecajem HPMC i karbomera**

Utjecajem HPMC raste topljivost risperidona i lorazepama u vodi (Slika 9.; Tablica 4. i 5.), što nedvojbeno upućuje na interakciju lijek-polimer. Tijekom eksperimenta, suspenzija lijeka u 0.1 %-tnoj otopini polimera se zagrijava na 70°C uz soniciranje. Time se povećava topljivost lijeka u vodi, pa je više molekula lijeka raspoloživo za interakciju s HPMC i karbomerom. Interakcija lorazepama i risperidona s HPMC se vjerojatno odvija van der Waalsovima i vodikovim vezama pri čemu nastaju agregati lijek-polimer. Hlađenjem uzoraka uz miješanje nastaje supersaturirana otopina lijeka koja je stabilizirana nastalim agregatima lijeka i HPMC. Time se može objasniti veća topljivost risperidona i lorazepama u 0.1%-tnoj otopini HPMC. Zagrijavanje i soniciranje uzoraka koji nisu sadržavali polimer nije utjecalo na topljivost risperidona i lorazepama u vodi.

Uz karbomer, topljivost risperidona i lorazepama se neznatno smanjila (Tablica 4. i 5.). Različiti učinak HPMC i karbomera na topljivost lijekova može se objasniti različitom kemijskom strukturom polimera. HPMC je linearan polimer, a karbomer je umrežene strukture. Linearnost HPMC omogućuje veći motilitet segmenata polimernog lanca, pa je time olakšana interakcija lijek-polimer. Nasuprot tome, umrežena struktura karbomera je odgovorna za rigidnost segmenata polimernih lanaca. Time je ograničena interakcija s funkcionalnim skupinama molekule lijeka, pa učinak karbomera na topljivost lijeka izostaje.

HPMC ulazi u interakcije i s inkluzijskim kompleksom ciklodekstrin-lijek, pri čemu polimerni lanac djelomično obavija nastali inkluzijski kompleks. Pri tome dolazi do interakcija polimera s molekulom ciklodekstrina i molekulom lijeka nastajanjem vodikovih veza tj. nastaje ternarni kompleks lijek-ciklodekstrin-polimer (Ribeiro i sur., 2003; Loftsson i Másson, 2004). Pri tome, raste topljivost lijeka, a povećava se i vrijednost konstante stabilnosti kompleksa.

Topljivost risperidona i lorazepama u otopinama HP- $\beta$ -CD u prisustvu HPMC je veća u odnosu na onu u otopinama ciklodekstrina iste koncentracije (Slika 9.). Pri tome se utjecajem HPMC ne mijenjaju vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa risperidona i lorazepama te učinkovitost kompleksiranja (Tablice 4. i 5.). To upućuje na činjenicu da risperidon i lorazepam ne stvaraju ternarne komplekse.

Zagrijavanjem slabi interakcija lijek-ciklodekstrin (Frömming i Szejtli, 1994). Stoga pri višim temperaturama prevladava nastajanje agregata lijek-polimer. Molekule lijeka uklopljene u agregate s HPMC zbog steričkih razloga nisu dostupne interakciji s HP- $\beta$ -CD. Hlađenjem uzoraka, dolazi do nastajanja inkluzijskog kompleksa. S obzirom na lipofilan karakter centralne šupljine ciklodekstrina, može se očekivati da će lijek imati veći afinitet prema stvaranju inkluzijskog kompleksa u odnosu na stvaranje agregata s hidrofilnom HPMC. Nastajanjem inkluzijskog kompleksa, funkcionalne skupine molekule lijeka ključne za interakciju s HPMC su zasjenjene, pa ne dolazi do interakcije inkluzijskog kompleksa i HPMC. U otopini HP- $\beta$ -CD i HPMC odvijaju se dva zasebna solubilizacijska procesa: nastajanja agregata lijeka s HPMC te kompleksiranje s HP- $\beta$ -CD. Zbog toga je topljivost risperidona i lorazepama u otopinama HP- $\beta$ -CD uz dodatak HPMC nešto veća u odnosu na topljivost lijekova u otopinama ciklodekstrina.

Karbomer nepovoljno utječe na nastajanje inkluzijskog kompleksa risperidona, odnosno lorazepama s HP- $\beta$ -CD. Vrijednosti konstanti stabilnosti i učinkovitosti kompleksiranja risperidona, odnosno lorazepama uz karbomer su znatno niže u odnosu na sustave u kojima se nalaze samo HP- $\beta$ -CD i lijek (Tablica 4. i 5.). U ovim otopinama dolazi do interakcije između molekula karbomera i ciklodekstrina. Naročito je izražen afinitet karbomera prema interakciji s HP- $\beta$ -CD u odnosu na druge ciklodekstrine (Rodríguez-Tenreiro i sur., 2004). Interakcija karbomera s molekulama ciklodekstrina odvija se vodikovim vezama, a u interakciju s HP- $\beta$ -CD uključeno je i do 50% karboksilnih skupina molekule polimera. Čini se da su pentarne hidroksilne skupine molekule HP- $\beta$ -CD zbog steričkih razloga izrazito pogodne za interakciju s karboksilnim skupinama polimera. Interakcija molekule ciklodekstrina s karbomerom sterički ograničava nastajanje inkluzijskih kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD. Usljed toga se smanjuje učinkovitost uklapanja, a utjecaj HP- $\beta$ -CD na topljivost lijekova je slabije izražen.



#### **5.4. Priprema i karakterizacija kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD u čvrstom stanju**

U literaturi je opisan veliki broj tehnika kojima je moguće pripremiti inkluzijski kompleks u čvrstom stanju (Frömming i Szejtli, 1994). Metodu pripreme inkluzijskog kompleksa treba prilagoditi fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka i ciklodekstrina kako bi se ostvarila maksimalna učinkovitost kompleksiranja. U ovom radu inkluzijski kompleksi risperidona i lorazepama u čvrstom stanju pripremljeni su metodom sušenja raspršivanjem te evaporacijom etanolno-vodne otopine lijeka i HP- $\beta$ -CD. Istom postupku podvrgnute su i etanolno-vodne otopine ispitivanih lijekova. Također je pripremljena i fizička smjesa lijekova s HP- $\beta$ -CD. S obzirom na tip solubilizacijskih izoterma, odnos ciklodekstrina i lijekova prilikom pripreme kompleksa je ekvimolaran. Dodatkom etanola povećana je topljivost lijekova u vodi, a time je omogućena maksimalna interakcija lijeka i ciklodekstrina. Odabir vrste suotapala prilikom pripreme inkluzijskog kompleksa iz otopina ograničen je činjenicom da molekule otapala stvaraju inkluzijske komplekse s ciklodekstrinima te zbog toga zaostaju u čvrstom produktu kao onečišćenje (Frömming i Szejtli, 1994). S obzirom na povoljna toksikološka svojstva, kao suotapalo odabran je etanol.

Za karakterizaciju dobivenih produkata korištene su termoanalitičke (DSC) i spektroskopske metode (FTIR).

Termalnom analizom moguće je pratiti interakciju molekule ciklodekstrina i lijeka jer se nastajanjem inkluzijskog kompleksa mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva uklopljene molekule kao što su vrelište, talište, temperatura sublimacije i sl. (Frömming i Szejtli, 1994; Giordano i sur., 2001). Stoga je ovom tehnikom moguće razlikovati inkluzijske komplekse od adsorbata.

Termogram risperidona (Slika 10.) pripremljenog evaporacijom etanolno-vodne otopine lijeka (A) karakteriziran je oštrim endotermnim pikom pri 168.5°C što se može pripisati taljenju lijeka, a entalpija taljenja ( $\Delta H$ ) iznosi 101.6 J/g. Na termogramu raspršivanjem osušenog risperidona (B) položaj i oblik pika taljenja lijeka nije se značajno promijenio (169.6°C i  $\Delta H=101.8$  J/g). Termogram HP- $\beta$ -CD (C) karakteriziran je širokim, slabo izraženim endotermnim pikom koji se proteže od 45.7 do 140°C ( $\Delta H=158.7$  J/g), a može se pripisati gubitku vode iz centralne šupljine molekule ciklodekstrina. Zbog svoje amorfности, ciklodekstrini nemaju definiranu

temperaturu taljenja, a termalna razgradnja počinje pri temperaturama višim od 270°C (Brown i sur., 2002). Na termogramu fizičke smjese risperidona s HP-β-CD (D) izražen je egzotermni pik risperidona, no pomaknut je prema nižoj temperaturi (162.2°C,  $\Delta H=56.82$  J/g). Na termogramu kompleksa risperidona s HP-β-CD pripremljenog evaporacijom (E) endotermni pik taljenja risperidona nalazi se pri 169.9°C a vrijednost entalpije taljenja iznosi 10.31 J/g. Kod kompleksa pripremljenog metodom sušenja raspršivanjem (F) endotermni pik taljenja risperidona nije vidljiv.

Termogram lorazepamima pripremljen evaporacijom etanolno-vodene otopine lijeka (A) karakteriziran je endotermnim pikom pri 179.6°C koji je posljedica taljenja lijeka uz vrijednost entalpije taljenja 192.0 J/g (Slika 11.) Na termogramu lorazepamima pripremljenog sušenjem raspršivanjem (B) pik taljenja lijeka nalazi se na 172.9°C uz vrijednost  $\Delta H=205.5$  J/g. Termogram fizičke smjese lorazepamima i HP-β-CD (D) karakteriziran je pikom taljenja lijeka pri 175.9°C ( $\Delta H=36.9$  J/g). Kod kompleksa lorazepamima s HP-β-CD pripremljenog evaporacijom (E) pik taljenja lijeka nalazi se pri 182°C uz vrijednost entalpije taljenja  $\Delta H=121.4$  J/g. Na termogramu kompleksa lorazepamima pripremljenog metodom sušenja raspršivanjem (F), pik taljenja lijeka nije vidljiv.

Nestanak pika taljenja lijeka u termogramima kompleksa risperidona i lorazepamima s HP-β-CD pripremljenih metodom sušenja raspršivanjem upućuje na nastanak nove čvrste faze koja se može pripisati amorfnom obliku lijeka i/ili nastanku inkluzijskog kompleksa (Mura i sur., 2002). Tijekom pripreme kompleksa metodom sušenja raspršivanjem otopina se raspršuje u sitne kapljice u struji zagrijanog zraka. Pri tome dolazi do brze evaporacije otapala zbog velike površine kapljica što doprinosi nastanku amorfnog oblika lijeka. No, termička svojstva uzoraka pripremljenih metodom sušenja raspršivanjem etanolno-vodenih otopina lijeka bez ciklodekstrina ne razlikuju se značajno u odnosu na svojstva kristaliničnog risperidona i lorazepamima pripremljenih evaporacijom etanolno-vodene otopine lijeka (Slike 10. i 11.). Amorfnu oblik lijeka je vrlo nestabilan te na sobnoj temperaturi često spontano rekristalizira nekoliko sati nakon pripreme (Redenti i sur., 1996). Nasuprot tome, termička svojstva kompleksa pripremljenih metodom sušenja raspršivanjem nisu se promijenila skladištenjem na sobnoj temperaturi uz relativnu vlažnost zraka od 40% tijekom šest mjeseci (termalne krivulje nisu prikazane). Može se zaključiti da amorfnost risperidona i lorazepamima u kompleksu s HP-β-CD pripremljenog metodom

sušenja raspršivanjem nije posljedica primijenjene metode izolacije krutog produkta nego se može pripisati nastajanju inkluzijskog kompleksa ciklodekstrin lijek. Uklapanje lijeka u centralnu šupljinu molekule ciklodekstrina sterički onemogućava stvaranje kristalne rešetke. Osim toga, HP- $\beta$ -CD je amorfan, pa su stoga i njegovi inkluzijski kompleksi također amorfne strukture.

Kod pripreme kompleksa metodom evaporacije, isparavanje otapala je polagano te se u sustavu uspostavlja ravnoteža između kompleksa i lijeka. Zbog toga su oni istovremeno prisutni u čvrstom produktu. Udio kristaliničnog lijeka i kompleksa u sustavu zavisi o stabilnosti molekule lijeka u kristalnoj rešetci. S obzirom na izraženi pik taljenja lijeka u termogramu kompleksa lorazepama dobivenog evaporacijom, može se zaključiti kako je kristalizacija lorazepama energetski povoljnija u odnosu na nastanak inkluzijskog kompleksa. Na termogramu kompleksa risperidona pripremljenog evaporacijom, pik lijeka je slabije izražen, ukazujući da je u tom sustavu favorizirano nastajanje inkluzijskog kompleksa. S obzirom na termička svojstva uzoraka može se zaključiti da izolacija čvrstog produkta metodom evaporacije nije prikladna za pripremu inkluzijskih kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD. Takvi produkti sadrže visoki udio kristaliničnog lijeka.

Promjena temperature taljenja lijeka u fizičkim smjesama risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD može se objasniti termalno induciranom interakcijom lijekova s HP- $\beta$ -CD tijekom pokusa (Aigner i sur., 2005).

Kompleksi risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD karakterizirani su također i snimanjem FTIR spektara. U FTIR spektru kristaliničnog risperidona (A) pripremljenog evaporacijom etanolno-vodene otopine lijeka (Slika 12.) izražene apsorpcijske vrpce u području 3059 do 2800  $\text{cm}^{-1}$  mogu se pripisati vibracijama istezanja, a izražene apsorpcijske vrpce u području 1450 do 1310  $\text{cm}^{-1}$  vibracijama savijanja C-H veze metilne skupine molekule lijeka. Izražena apsorpcijska vrpca na 1656.37  $\text{cm}^{-1}$  odgovara vibracijama istezanja amidnog karbonila, a apsorpcijske vrpce u području 1250 do 1020  $\text{cm}^{-1}$  mogu se pripisati vibracijama istezanja C-N veza u benzizoksazolnom, pirimidinskom i piridinskom prstenu molekule lijeka. Apsorpcijske vrpce u području 900 do 675  $\text{cm}^{-1}$  odgovaraju vibracijama savijanja C-H veza u policikličkim heteroaromatskim prstenima molekule lijeka. Izražena apsorpcijska vrpca na 1450  $\text{cm}^{-1}$  može se pripisati vibracijama istezanja N-O veze u

benzizoksazolnskom prstenu, a uska apsorpcijska vrpca pri  $1230\text{ cm}^{-1}$  odgovara vibracijama istezanja C-F veze fluora vezanog na benzizoksazolnski prsten.

Položaj i intenzitet karakterističnih vrpca funkcionalnih skupina lijeka u FTIR spektru raspršivanjem osušenog risperidona (B) nije se promijenio u odnosu na spektar kristaliničnog risperidona, što upućuje na činjenicu da se metodom sušenja raspršivanjem nisu promijenila kristalinična svojstva produkta. Time su potvrđeni rezultati termičkih ispitivanja.

U FTIR spektru molekule HP- $\beta$ -CD (C) izražena je široka apsorpcijska vrpca pri  $3401.21\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara vibracijama istezanja O-H veze hidroksilnih skupina u molekuli ciklodekstrina. Apsorpcijske vrpce pri  $2971.71$  i  $2930.69\text{ cm}^{-1}$  mogu se pripisati vibracijama istezanja C-H veza u molekulama glukoze. Apsorpcijska vrpca u području  $1156.67$  do  $1034.69\text{ cm}^{-1}$  odgovara vibracijama istezanja C-O-C i C-C-C veza u molekuli glukoze.

U FTIR spektru kompleksa risperidona i HP- $\beta$ -CD (D) pripremljenog evaporacijom došlo je do pomaka vrijednosti apsorpcijskog maksimuma vrpce amidnog karbonila s  $1656.37$  na  $1651,11\text{ cm}^{-1}$ , a u spektru kompleksa pripremljenog metodom sušenja raspršivanjem (E) taj pomak je još značajnije izražen ( $1639.56\text{ cm}^{-1}$ ), pri čemu je intenzitet apsorpcijske vrpce smanjen. Pomak vrijednosti apsorpcijskog maksimuma prema nižim valnim brojevima upućuje na nastanak vodikovih veza između karbonilne skupine molekule lijeka i hidroksilnih skupina molekule ciklodekstrina, odnosno na nastajanje inkluzijskog kompleksa risperidona s HP- $\beta$ -CD u čvrstom stanju.

FTIR spektar kristaliničnog lorazepam (A) prikazan u Slici 13. karakterizira široka apsorpcijska vrpca u području valnih brojeva  $3343.32$  do  $2911.09\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara vibracijama istezanja O-H veze u molekuli lijeka ( $3434.32\text{ cm}^{-1}$ ), a spojena je s apsorpcijskom vrpcom koja se može pripisati vibracijama istezanja C-H veze u aromatskom prstenu molekule lijeka ( $3128.55$  i  $3059\text{ cm}^{-1}$ ). Vibracije savijanja O-H veze udružene s vibracijama savijanja C-H veza rezultiraju oštrim pikovima pri  $1436.55$  i  $1325.37\text{ cm}^{-1}$ . Intenzivne apsorpcijske vrpce na području  $900$  do  $675\text{ cm}^{-1}$  mogu se pripisati vibracijama savijanja C-H veza na aromatskim prstenima molekule lorazepama. U spektru je izražena apsorpcijska vrpca amidnog karbonila na  $1694.85\text{ cm}^{-1}$  ("amide band I") te apsorpcijska vrpca na  $1615.51\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara vibracijama savijanja N-H veze amidne skupine u molekuli ("amide band II").

Apsorpcijske vrpce na području 1250 do 1020  $\text{cm}^{-1}$  pripisuju se vibracijama istezanja C=N veze u benzodiazepinskom prstenu. Oštra apsorpcijska vrpca pri 1100.14  $\text{cm}^{-1}$  može se pripisati vibracijama istezanja C-Cl veze.

Položaj i intenzitet karakterističnih apsorpcijskih vrpca molekule lorazepama u FTIR spektru raspršivanjem osušenog lijeka (B) ne razlikuje se značajno u odnosu na FTIR spektar kristaliničnog lorazepama što upućuje na kristalinična svojstva nastalog produkta. Time su potvrđeni rezultati termičkih ispitivanja.

U FTIR spektru kompleksa lorazepama s HP- $\beta$ -CD (D) pripremljenog metodom evaporacije položaj i intenzitet karakterističnih apsorpcijskih vrpca molekule lorazepama nije se značajno promijenio, što upućuje da je taj produkt zapravo fizička smjesa lorazepama i HP- $\beta$ -CD. U FTIR spektru kompleksa pripremljenog metodom sušenja raspršivanjem (E) došlo je do pomaka vrijednosti maksimuma apsorpcijske vrpce amidnog karbonila s 1694.85 na 1701.38  $\text{cm}^{-1}$ . Pomak apsorpcijskog maksimuma karboksilne skupine molekule lorazepama prema većim valnim brojevima upućuje na disocijaciju intermolekularnih veza u kristalnoj rešetki lorazepama. Nastajanjem inkluzijskog kompleksa onemogućeno je stvaranje kristalne strukture te se tako stabilizira amorfni oblik lijeka (Brown i sur., 2002). Ovaj zaključak je u skladu s rezultatima termičkih ispitivanja. Nastajanjem inkluzijskog kompleksa molekule lijeka s ciklodekstrinom ograničava se mogućnost vibracija veza u molekuli lijeka, pa je stoga intenzitet apsorpcijske vrpce smanjen (Slika 13.).

S obzirom na rezultate termičkih i FTIR ispitivanja može se zaključiti da je metoda sušenja raspršivanjem etanolno-vodenih otopina lijeka i HP- $\beta$ -CD prikladnija za pripremu inkluzijskih kompleksa risperidona i lorazepama u krutom stanju.

Raspršivanjem osušeni risperidon, lorazepam te inkluzijski kompleksi karakterizirani su određivanjem raspodjele veličina čestica. Na veličinu čestica raspršivanjem osušenog produkta utječe niz parametara kao što je promjer sapnice, brzina protoka uzorka, brzina protoka zraka, viskoznost te napetost površine otopine lijeka i sl. (Van Campen i Vethoye, 2002). Logaritamska raspodjela veličina čestica karakteristična je za čvrste produkte pripremljene metodom sušenja raspršivanjem otopina, a može se objasniti sekundarnom agregacijom čestica prilikom procesa sušenja. Interakcija HP- $\beta$ -CD s molekulom lijeka mijenja viskoznost, odnosno površinsku napetost otopine lijeka (Fromming i Szejtli, 1994). Zbog toga je srednji

promjer čestica kompleksa veći u odnosu na srednji promjer čestica lijeka, a raspon veličina čestica kompleksa je širi (Slika 14.).

Oblikovanjem inkluzijskih kompleksa risperidona i lorazepama s HP- $\beta$ -CD značajno se poboljšala topljivost i brzina otapanja lijekova u vodi (Slika 15.). Otapanje krutina započinje na dodirnoj površini krutih čestica i vode. Moćenje čestica risperidona i lorazepama otežano je zbog lipofilnog karaktera lijekova. Zbog toga je i otapanje lijekova usporeno, bez obzira na uvjete osigurane topljivosti u eksperimentu. U inkluzijskom kompleksu lijek je djelomično ili potpuno uklopljen u lipofilnu centralnu šupljinu molekule ciklodekstrina (molekularno inkapsuliranje). Zbog velikog broja hidroksilnih skupina na površini, molekula ciklodekstrina je hidrofilnog karaktera te se nastali kompleks brzo otapa. Osim toga, inkluzijski kompleksi risperidona i lorazepama su amorfne strukture što je vidljivo iz rezultata termičkih i FTIR ispitivanja. Amorfna svojstva kompleksa također doprinose brzom otapanju lijekova.

## 5.5. Utjecaj ciklodekstrina na nastajanje interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera

Slaba kiselina (karbomer) u otopini djeluje kao proton donorski polimer i tvori interpolimerne komplekse s neionskim, protonakceptorskim polimerima kao što je HPMC. Interakcija uključuje simultano nastajanje intermolekularnih vodikovih veza između dvije različite polimerne molekule. Tako nastaje stabilna struktura slična ljestvama koja odmah nakon nastajanja stvara agregate. Time se smanjuje površina kontakta s molekulama otapala. Uslijed nastajanja agregata, raste turbidnost otopine polimera, a time i apsorbanija sustava (Nurkeeva i sur., 2003). Stoga se mjerenjem apsorbanije uzoraka može pratiti nastajanje interpolimernog kompleksa u otopini.

S obzirom na rezultate ispitivanja, može se zaključiti da je maseni odnos HPMC i karbomera 1:1 najpovoljniji za nastajanje interpolimernog kompleksa. pH-vrijednost otopine ima važnu ulogu u nastajanju interpolimernog kompleksa.  $pK_a$ -vrijednost akrilne kiseline, glavnog monomera karbomera pri 25°C iznosi 4.25. Pri pH-vrijednosti 3.0 karboksilne skupine karbomera su u potpunosti neionizirane, a porastom pH-vrijednosti sustava raste udio ioniziranih skupina u polimeru. Rezultati ispitivanja ukazuju, da je za nastajanje interpolimernog kompleksa ključno da karboksilne skupine karbomera budu u neioniziranom obliku.

Molekula ciklodekstrina u svojoj strukturi ima veliki broj hidroksilnih i eterskih skupina koje su dobri protonakceptor. Stoga se može zaključiti da interpolimerni kompleks nastaje i uz HP- $\beta$ -CD, a moguće je i nastajanje interpolimernog kompleksa koji sadrži HPMC, karbomer i ciklodekstrin.

Interpolimerni kompleksi sa i bez ciklodekstrina u čvrstom stanju pripremljeni su metodom sušenja raspršivanjem i karakterizirani su FTIR spektrima. Istom metodom ispitane su i odgovarajuće fizičke smjese polimera. Spektar karbomera (A) karakteriziran je izraženom apsorpcijskom vrpcom pri 1706.3  $\text{cm}^{-1}$  koja odgovara frekvenciji rastezanja karboksilnih skupina u molekuli polimera (Slika 17.). U spektru interpolimernog kompleksa (B) te spektru interpolimernog kompleksa s HP- $\beta$ -CD (D), ta vrpca je pomaknuta prema većim frekvencijama (1724.1, odnosno 1726.4  $\text{cm}^{-1}$ ). Ovaj pomak upućuje na prekidanje vodikovih veza unutar molekule karbomera i na nastajanje novih veza s protonakceptorskim skupinama na molekuli HPMC, odnosno HP- $\beta$ -CD. Time je potvrđena pretpostavka o nastajanju interpolimernog kompleksa sa

i bez HP- $\beta$ -CD. Ovom metodom nije moguće pouzdano odrediti protonakceptorske skupine, no s obzirom na literaturne podatke, vjerojatno je riječ o hidroksilnim i eterskim skupinama HPMC i HP- $\beta$ -CD (Khutoryanski i sur., 2003; Rodriguez-Terreiro i sur., 2004). U spektru fizičke smjese HPMC i karbomera (C) te spektru fizičke smjese koja sadrži HPMC, karbomer i HP- $\beta$ -CD (E), pomak apsorpcijskog maksimuma je unutar vrijednosti razlučivosti instrumenta te ne upućuje na nastajanje interpolimernog kompleksa. Za nastajanje interpolimernog kompleksa važno je prisustvo vode, jer su u čvrstom stanju molekule polimera u konformaciji klupka. Skupine ključne za nastajanje interpolimernog kompleksa su zasjenjene unutar takve strukture i nisu dostupne interakciji. U vodi, polimeri bubre i mijenjaju konformaciju, a skupine ključne za nastajanje interpolimernih kompleksa postaju dostupne interakciji.



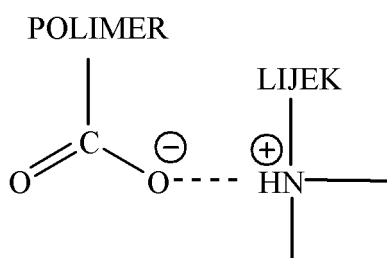
## **5.6. Priprema i karakterizacija mukoadhezivnih mikročestica lorazepamama i risperidona**

Mikročestice lorazepamama i risperidona oblikovane su metodom sušenja raspršivanjem. Ovom tehnikom ostvareno je dobro uklapanje lijekova u mikročestice srednjeg promjera oko 3.0  $\mu\text{m}$  (Tablica 6.).

U Slici 19. prikazani su DCS termogrami mikročestica lorazepamama te termogrami raspršivanjem osušenog lijeka. Na termogramima mikročestica (B-G), u temperaturnom rasponu od 20 do 110°C nalazi se široki, slabo izraženi endotermni pik koji se može pripisati evaporaciji adsorbirane vlage. Na termogramima mikročestica lorazepamama oblikovanih s HPMC (B), karbomerom (D) i interpolimernim kompleksom (E) vidljiv je pik taljenja lijeka, no on je slabije izražen nego u termogramu raspršivanjem osušenog lorazepamama (A) i pomaknut je prema nižim temperaturama (170.2, 158.9 i 149.3°C) u odnosu na raspršivanjem osušeni lorazepam (172.9°C). Pomak pika taljenja lorazepamama prema nižim temperaturama upućuje na djelomični gubitak kristaliničnih svojstava lijeka uslijed uklapanja u polimerni matriks mikročestica (Vueba i sur., 2004). U termogramima mikročestica u kojima je lijek u obliku inkluzijskog kompleksa s ciklodekstrinima (C, E i G) pik taljenja lijeka nije vidljiv. Nestanak pika taljenja upućuje na činjenicu da uklapanjem u polimerni matriks mikročestica nije došlo do razgradnje inkluzijskog kompleksa lorazepamama s HP- $\beta$ -CD. Lorazepam u mikročesticama s HP- $\beta$ -CD je u potpunosti amorfan.

DSC termogrami raspršivanjem osušenog risperidona te mikročestica risperidona prikazani su u Slici 20. U termogramima mikročestica (B - G) vidljiv je slabo izraženi, endotermni pik u temperaturnom rasponu 20 do 110°C koji je posljedica evaporacije adsorbirane vlage. Pik taljenja lijeka vidljiv je na termogramu mikročestica risperidona oblikovanih s HPMC (B), ali je slabije izražen i pomaknut prema nižim temperaturama u odnosu na raspršivanjem osušeni risperidon (159.9°C za MR1 u odnosu na 169.6°C za risperidon). Promjena položaja i intenziteta pika taljenja lijeka posljedica je djelomičnog gubitka kristaliničnih svojstava risperidona uslijed uklapanja u polimerni matriks mikročestica. Na termogramu HPMC mikročestica oblikovanih s inkluzijskim kompleksom risperidona (C) pik taljenja lijeka nije vidljiv. Nestanak pika taljenja lijeka upućuje na amorfnost risperidona u mikročesticama, a može se objasniti kompleksiranjem lijeka s HP- $\beta$ -CD. Na

termogramima mikročestica risperidona oblikovanih s karbomerom (D) i interpolimernim kompleksom (F) pik taljenja lijeka nije vidljiv. Nestanak pika taljenja lijeka može se objasniti interakcijom molekula risperidona s karboksilnim skupinama molekule kabomera (Shema 3.). Molekula lijeka u svojoj strukturi sadrži 3 kvaterne amino skupine, što omogućuje stvaranje soli između kiselog polimera i molekule lijeka prema shemi (Elkheshen 2001):



Shema 3. Pretpostavljeni mehanizam interakcije risperidona i karbomera.

Uslijed interakcije dolazi do nastanka molekularne disperzije lijeka u polimernom matriksu te pik taljenja lijeka nestaje. U slučaju mikročestica risperidona s ciklodekstrinima (E i G), nestanak pika taljenja lijeka može se objasniti kompleksiranjem risperidona s molekulom HP- $\beta$ -CD i/ili interakcijom s karbomerom.

Vrijednost zeta potencijala ukazuje na dominantnu komponentu na površini mikročestica te se određivanjem zeta potencijala može pratiti interakcija polimera i molekule lijeka (Duro i sur. 1998; Harnsilawat i sur., 2006). HPMC je neutralni polimer pa zeta potencijal mikročestica HPMC iznosi  $-1.6 \pm 2.0$  mV što je u skladu s podacima objavljenim u literaturi (Yokoi i sur., 2005). Zeta potencijal mikročestica samog karbomera iznosi  $-23.7 \pm 1.0$  mV. Karbomer je anionski polimer, a u eksperimentalnim uvjetima (pH  $\sim$  6.8) karboksilne skupine polimera su ionizirane što doprinosi negativnom naboju na površini mikročestica. Vrijednost zeta potencijala interpolimernog kompleksa oblikovanog u mikročestice je niža u odnosu na zeta potencijal mikročestica karbomera (Slika 21.). Niže vrijednosti zeta potencijala u tom sustavu ukazuju na nastanak interpolimernog kompleksa pri čemu karboksilne skupine molekule karbomera stvaraju vodikove veze s protonakceptorskim skupinama HPMC. Uslijed interakcije smanjuje se broj slobodnih karboksilnih skupina na površini mikročestica što doprinosi smanjenju vrijednosti površinskog naboja.

Vrijednosti zeta potencijala mikročestica lorazepamom (ML1-ML6) ne razlikuju se značajno u odnosu na vrijednost zeta potencijala polimera. Može se zaključiti da je lijek uklopljen u polimerni matriks, a polimer je dominantna komponenta na površini mikročestica. HP- $\beta$ -CD nema značajan utjecaj na vrijednost zeta potencijala mikročestica s lorazepamom.

Pozitivan naboj raspršivanjem osušenog risperidona može se objasniti prisustvom monoprotiniranog oblika lijeka na površini čestica u eksperimentalnim uvjetima (pH  $\sim$  6.8). Vrijednosti zeta potencijala mikročestica MR1 i MR2, oblikovanih s HPMC su niže u odnosu na raspršivanjem osušeni risperidon. Niže vrijednosti zeta potencijala mikročestica upućuju na uklapanje molekula lijeka u polimerni matriks. Niže vrijednosti zeta potencijala mikročestica risperidona s karbomerom upućuju na interakciju molekule lijeka i polimera koja je elektrostatske prirode. Time se smanjuje broj ioniziranih karboksilnih skupina na površini mikročestica, a uslijed toga i vrijednost zeta potencijala. HP- $\beta$ -CD u mikročesticama risperidona s karbomerom (MR4) ne mijenja vrijednost zeta potencijala. To se može objasniti ukapanjem dijela molekule lijeka u centralnu šupljinu ciklodekstrina. Pri tome ciklodekstrini ne ometaju interakciju ostatka molekule lijeka s karbomerom.

Vrijednosti zeta potencijala mikročestica risperidona oblikovanih s interpolimernim kompleksom (MR5 i MR6) ne razlikuju se značajno u odnosu na vrijednost zeta potencijala interpolimernog kompleksa što upućuje da je polimer dominantna komponenta na površini mikročestica.

Mukoadhezivnost mikročestica osigurava zadržavanje oblika na mjestu primjene stvaranjem mukoadhezivne veze s molekulom mucina na površini sluznice. Uslijed toga postiže se bliski kontakt površine mikročestice i sluznice što pozitivno utječe na bioraspoloživost lijeka (Khanvilkar i sur., 2001; Ugwoke i sur., 2005).

Vrsta polimera značajno utječe na mukoadhezivnost mikročestica (Slika 22.). Mukoadhezivnost mikročestica oblikovanih korištenjem HPMC slabije je izražena u odnosu na mukoadhezivna svojstva mikročestica karbomera i interpolimernog kompleksa ( $p < 0.05$ ). HPMC je neutralni polimer linearne strukture čime se može objasniti slabije izražena mukoadhezivnost. U kontaktu s površinom sluznice dolazi do interpenetracije lanaca HPMC s lancima molekule mucina, odnosno stvaranja mehaničke veze. Smatra se kako je nastanak mehaničke veze glavni mehanizam kojim se može objasniti mukoadhezivnost HPMC (Smart, 2005).

Karbomer je anionski polimer umrežene strukture. Veliki broj karboksilnih skupina u polimernom matriksu odgovoran je za dobra svojstva bubrenja polimera u fiziološkim uvjetima. Karboksilne skupine doprinose negativnom naboju što uzrokuje osmotski uvjetovan ulazak vode u matriks te brže bubrenje uslijed djelovanja elektrostatskih odbojnih sila među istovrsno nabijenim segmentima polimera. Umrežena struktura i dobra svojstva bubrenja pogoduju mukoadhezivnim svojstvima mikročestica karbomera. Mukoadhezivna veza nastala mehaničkom interpenetracijom lanaca mucina u izbubreni matriks karbomera dodatno se stabilizira vodikovim vezama (Jabbari i sur., 1993; Edsman i Hägerström, 2005).

Interpolimerni kompleks nastaje udruživanjem polimernih lanaca stvaranjem vodikovih veza između karboksilnih skupina karbomera i protonakceptorskih skupina lanca HPMC. Interpenetracijom lanaca mucina u takvu umreženu strukturu nastaje čvrsta mehanička veza koja stabilizira adhezivnu vezu između mikročestica i površine sluznice. Uslijed toga, mukoadhezivnosti ovih mikročestica ne razlikuju se značajno u odnosu na mikročestice samog karbomera ( $p > 0.05$ ).

Risperidon i lorazepam smanjuju mukoadhezivnost mikročestica (Slika 22.). Uklapanjem lijeka u mikročestice smanjuje se koncentracija mukoadhezivnog polimera u matriksu. Time se može objasniti slabija mukoadhezivnost mikročestica s lorazepamom i risperidonom. Osim toga, molekula lijeka može ometati nastajanje elektrostatskih i vodikovih veza koje dodatno stabiliziraju mehaničku vezu polimera i mucina nastalu interpenetracijom polimernih lanaca (Ikinci i sur., 2000). Pri tome, lorazepam ima značajniji utjecaj na mukoadhezivnost mikročestica u odnosu na risperidon, što je vjerojatno posljedica različitih fizikalno-kemijskih svojstava lijekova.

Mukoadhezivnost mikročestica oblikovanih s inkluzijskim kompleksom lorazepama i risperidona je manje izražena u odnosu na mukoadhezivnost mikročestica oblikovanih s istom vrstom polimera bez ciklodekstrina, no ta razlika nije statistički značajna (Slika 22.). Ovo se djelomično može objasniti i potkrijepiti rezultatima dobivenim određivanjem zeta potencijala koji ukazuju da je polimer prevladavajuća komponenta na površini mikročestica.

Poznato je da ciklodekstrini u otopini mogu stvarati neinkluzijske komplekse s hidrofilnim polimerima (Ribeiro i sur., 2003; Rodríguez-Terreiro i sur., 2004). Pri tome dolazi do djelomičnog ili potpunog oblaganja molekule ciklodekstrina polimernim lancem. Tijekom sušenja raspršivanjem, evaporacija otapala je vrlo brza,

pa se nastala struktura ne mijenja. Uslijed toga, polimer prevladava na površini mikročestica, osiguravajući mukoadhezivnost.

Ciklodekstrini u mikročesticama mijenjaju svojstva bubrenja. Dokazano je da prisutnost HP- $\beta$ -CD u polimernom matriksu HPMC i karbomera pozitivno djeluje na bubrenje takvog sustava (Jug i Bećirević, 2004), pa on brže bubri u odnosu na matriks bez HP- $\beta$ -CD. Poboljšana svojstva bubrenja polimernog matriksa utjecajem ciklodekstrina mogu se objasniti boljim ovlaživanjem polimernog matriksa u prisustvu amornog kompleksa. U kontaktu s vodom, dolazi do brzog otapanja kompleksa pri čemu raste poroznost polimernog matriksa što doprinosi njegovoj boljoj hidrataciji. Ulaskom vode u polimerni matriks povećava se motilitet segmenata polimernih lanaca te oni postaju dostupniji za interpenetraciju s lancima mucina i nastanak mukoadhezivne veze.

## 5.7. Utjecaj mukoadhezivnih polimera i HP- $\beta$ -CD na oslobađanje lijekova iz mikročestica

Određivanjem konstanti brzine oslobađanja lijekova u vodi praćen je utjecaj ciklodekstrina i mukoadhezivnih polimera na oslobađanje lorazepama i risperidona iz mikročestica (Tablice 7. i 8.). Rezultati ukazuju da bifazična kinetika prvog reda najbolje opisuje oslobađanje lorazepama i risperidona iz mikročestica ( $r^2 > 0.99$ ). Bifazično oslobađanje lijeka karakteristično je za mikročestice. Prvi brži proces odgovara oslobađanju lijeka sa i blizu površine mikročestica. Zbog malog promjera mikročestica, ukupna površina s koje se odvija oslobađanje lijeka je vrlo velika. Uslijed toga je oslobađanje lijeka iz slojeva sa i blizu površine mikročestica brzo ("burst effect"), a karakterizirano je konstantom brzine  $k_1$ . Drugi sporiji proces je oslobađanje lijeka iz dubljih slojeva mikročestica, a karakteriziran je konstantom brzine  $k_2$  (Tablica 7. i 8.).

Vrsta mukoadhezivnog polimera korištena pri oblikovanju mikročestica lorazepama ne mijenja značajno brzinu oslobađanja lijeka, pa se tijekom 90 minuta iz mikročestica ML1, ML3 i ML5 oslobodilo oko 60% uklopljene količine lorazepama. Vrijednosti eksponenta  $n$  za te sustave variraju od 0.492 do 0.696, što upućuje da je oslobađanje lorazepama istovremeno kontrolirano difuzijom lijeka kroz izbubreni polimerni matriks te njegovom erozijom. Zavisno o vrsti polimera mijenja se relativni doprinos pojedinog mehanizma oslobađanja lorazepama. HPMC je neutralni polimer linearne strukture (Siepmann i Peppas, 2001) koji u kontaktu s vodom bubri stvarajući sloj hidrogela oko čvrste jezgre mikročestice. Voda djeluje kao plastifikator snižavajući temperaturu staklastog prijelaza polimera i povećavajući motilitet segmenata polimernih lanaca. Istovremeno, ulaskom vode u polimerni matriks dolazi do otapanja molekula lijeka koja difundira iz sloja hidrogela u medij koji okružuje mikročestice. Daljnjim ulaskom vode u polimerni matriks dolazi do otapanja HPMC u površinskom sloju hidrogela te do erozije polimernog matriksa. Uslijed toga se mijenja mehanizam oslobađanja lijeka. Prema podacima u Slici 25., oslobađanje lorazepama iz mikročestica oblikovanih s HPMC kontrolirano je difuzijom unutar prvih 20 minuta eksperimenta, dok s vremenom raste doprinos erozije polimernog matriksa.

Kod mikročestica oblikovanih s karbomerom (ML3), vrijednost eksponenta  $n$  je niža ( $n=0.492$ ). Karbomer je anionski umreženi polimer, koji zbog velikog broja karboksilnih skupina u strukturi brže bubri stvarajući konzistentni sloj hidrogela oko mikročestica. Ionizacija karboksilnih skupina u mediju ispitivanja stvara osmotski tlak unutar polimernog matriksa što uzrokuje brži ulazak vode, odnosno brže bubrenje polimernog matriksa u usporedbi s matriksom HPMC. Bržem bubrenju karbomernog matriksa dodatno doprinose repulzivne sile koje se javljaju među istovrsno nabijenim segmentima polimernih lanaca (García-González i sur., 1993; Dittgen i sur., 1997). Zbog umrežene strukture karbomera, erozija polimernog matriksa je ograničena, te je difuzija lorazepama kroz sloj hidrogela ključan proces koji određuje brzinu oslobađanja lorazepama iz mikročestica oblikovanih s karbomerom. Na to upućuje vrijednost omjera  $E/D$  koja je niska tijekom cijelog eksperimenta (Slika 25.). Istim mehanizmom može se objasniti oslobađanje lorazepama iz mikročestica oblikovanih s interpolimernim kompleksom. Vrijednost eksponenta  $n$ , kao i vrijednosti omjera  $E/D$  tijekom eksperimenta za mikročestice ne razlikuju se značajno u usporedbi s mikročesticama oblikovanim s karbomerom.

Dodatak inkluzijskog kompleksa u mikročestice utjecao je na mehanizam oslobađanja lorazepama iz polimernog matriksa. Pri tome se značajno ubrzalo oslobađanje lijeka, pa se tijekom 15 minuta iz mikročestica oblikovanih s HPMC i karbomerom (ML2 i ML4) oslobodilo oko 75 % uklopljene količine lijeka. Oslobađanje lorazepama iz mikročestica oblikovanih s interpolimernim kompleksom (ML6) bilo je nešto sporije, pa se tijekom 15 minuta oslobodilo oko 45% uklopljene količine lijeka. Oslobađanje lijeka iz svih mikročestica bilo je kompletno za vrijeme trajanja eksperimenta. Uklapanjem lorazepama u inkluzijski kompleks s HP- $\beta$ -CD značajno je poboljšao topljivost lijeka u izbubrenom polimernom matriksu, a povećana je i erodibilnost sustava. Brzo otapanje amorfnog inkluzijskog kompleksa u kontaktu s vodom povećava poroznost polimernog matriksa te tako olakšava ulazak vode u sustav, čime se ubrzava bubrenje i erozija polimernog matriksa (Jug i Bećirević, 2004). Uslijed toga, erozija polimernog matriksa postaje dominantni mehanizam koji kontrolira brzinu oslobađanja lorazepama iz mikročestica (Slika 25.). Zbog toga su i vrijednosti eksponenta  $n$  više (0.637-0.783) u odnosu na vrijednosti dobivene za mikročestice bez ciklodekstrina.

U slučaju mikročestica risperidona oblikovanih s HPMC (MR1), oslobađanje lijeka odvija se "anomalnim transportom" ( $n=0.624$ ). Pri tome se oslobodilo oko 90% uklopljene količine risperidona, a brže oslobađanje lijeka u odnosu na brzinu oslobađanja lorazepamima iz mikročestica oblikovanih s istovrsnim polimerom može se objasniti višom topljivosti risperidona (Tablica 10.). Pri tome, erozija polimernog matriksa ima značajniji utjecaj na oslobađanje lijeka iz ovih mikročestica (Slika 26.). Na to upućuje i veća vrijednost eksponenta  $n$  ( $n=0.700$ ). Oblikovanjem mikročestica s inkluzijskim kompleksom risperidona značajno je ubrzano oslobađanje lijeka, te je ono potpuno u 30 minuta. Pri tome se, zbog dobre topljivosti inkluzijskog kompleksa, značajno povećala difuzibilnost risperidona u polimernom matriksu, pa je vrijednost konstante  $k_D$  koja upućuje na doprinos difuzije ukupnoj brzini oslobađanja lijeka oko 10 puta veća u odnosu na istovrsni sustav bez HP- $\beta$ -CD (Tablica 10.). Zbog brze difuzije lijeka, erozija ima manji utjecaj na brzinu oslobađanja lijeka iz mikročestica. To proizlazi iz podataka prikazanih u Slici 26. Omjer E/D je vrlo niskih vrijednosti tijekom cijelog eksperimenta. Na značajniji doprinos difuzije oslobađanju lijeka iz mikročestica upućuje i vrijednost eksponenta  $n$  ( $n=0.624$ ) koja je nešto niža u odnosu na mikročestice bez ciklodekstrina (MR1;  $n=0.700$ ).

Interakcija risperidona i karbomera ima ključan utjecaj na brzinu oslobađanja lijeka iz mikročestica oblikovanih s karbomerom i interpolimernim kompleksom, pa se primjenom modela Pepasa i Korsmeyera (1986) te Peppasa i Sahlina (1989) ne može opisati oslobađanje risperidona iz ovih sustava. Molekula risperidona u svojoj strukturi ima 3 tercijarne amino skupine, što omogućuje interakciju s različitim polimerima akrilne kiseline (Elkhesheh 2001; Tatavari i sur., 2004). Interakcija se odvija elektrostatskim vezama koje uključuju tercijarne amino skupine molekule lijeka i karboksilne skupine karbomera, prema shemi u poglavlju 5.6.. Uslijed te interakcije dolazi do neutralizacije karboksilnih skupina na karbomeru što utječe na svojstva bubrenja polimernog matriksa. Izostaje osmotski uvjetovan ulazak vode u polimerni matriks te učinak repulzivnih sila među istovrsno nabijenim segmentima polimernih lanaca (Elkhesheh 2001). To neposredno otežava difuziju lijeka. Zbog toga je oslobađanje risperidona iz slojeva bliže površini mikročestica relativno brzo. Oko 50% uklopljene količine lijeka oslobođeno je tijekom 5 minuta, a nakon toga slijedi sporije oslobađanje risperidona iz dubljih slojeva mikročestica. Oblikovanje mikročestica s inkluzijskim kompleksom (MR4) rezultiralo je nešto bržim



oslobađanjem risperidona u odnosu na mikročestice bez ciklodekstrina (MR3), no ta razlika nije statistički značajna (Slika 24.). S obzirom na geometriju molekule risperidona i rezultate FTIR ispitivanja može se zaključiti da inkluzijski kompleks risperidona nastaje djelomičnim uklapanjem molekule risperidona u centralnu šupljinu molekule ciklodekstrina, a ostatak molekule ostaje dostupan za interakciju s karbomerom. Nešto brže oslobađanje risperidona oblikovanih s inkluzijskim kompleksom može se pripisati utjecaju HP- $\beta$ -CD na svojstva bubrenja polimernog matriksa.

Oslobađanje risperidona iz mikročestica oblikovanih s interpolimernim kompleksom (MR5) je nešto brže u odnosu na sustav s karbomerom (MR3). Uslijed nastajanja interpolimernog kompleksa, karboksilne skupine karbomera su okupirane stvaranjem vodikovih veza s protonakceptorskim skupinama lanca HPMC, pa je stoga interakcija s trecijarnim amino skupinama molekule lijeka ograničena steričkim razlozima. Zbog toga je oslobađanje risperidona iz ovog sustava nešto brže, pa se tijekom 10 minuta oslobodilo oko 60% ukupne količine lijeka. Oslobađanje risperidona iz mikročestica oblikovanih s inkluzijskim kompleksom (MR6) je u prvih 20 minuta nešto sporije u odnosu na sustav bez ciklodekstrina (MR5), što se može objasniti utjecajem umrežene strukture interpolimernog kompleksa. Ulaskom vode u matriks, dolazi do prekidanja vodikovih veza koje stabiliziraju interpolimerni kompleks, pa je stoga oslobađanje lijeka tijekom druge faze nešto brže, a u 90 minuta se oslobodilo oko 90% risperidona.

Kako bi se smanjila kompleksnost podataka i olakšala međusobna usporedba oslobađanja lijeka iz mikročestica različitog sastava, određena je učinkovitost oslobađanja (DSE). Vrijednost DSE za mikročestice lorazepama oblikovane s HPMC (ML1) je niska (Tablica 11.), što se može objasniti niskom topljivošću lijeka u vodi. Uslijed toga je oslobađanje lorazepama sporo, pa je i površina ispod krivulje oslobađanja manja. Oblikovanjem mikročestica lorazepama s karbomerom (ML3) i interpolimernim kompleksom (ML5) oslobađanje lijeka je poboljšano, pa su i vrijednosti DSE nešto veće. Uklapanjem inkluzijskog kompleksa lorazepama u mikročestice, povećava vrijednost DSE oko 2 puta u odnosu na mikročestice oblikovane samo s polimerom. To se može objasniti utjecajem HP- $\beta$ -CD na topljivost te na mehanizam oslobađanja lorazepama. Visoke vrijednosti SDE za mikročestice

ML2 i ML4 ukazuju na vrlo brzi početak djelovanja lijeka i potencijalno dobru bioraspoloživost.

Vrijednosti DSE za mikročestice risperidona (MR1) su više u odnosu na istovrsne mikročestice lorazepama (ML1), što se objašnjava boljom topljivošću risperidona. Dodatkom HP- $\beta$ -CD u mikročestice risperidona oblikovane s HPMC (MR2), vrijednost DSE je povećana oko 1.4 puta. Ovo upućuje na pozitivan utjecaj ciklodekstrina na oslobađanje lijeka. Vrijednosti parametra DSE za ostale mikročestice risperidona (MR3 – MR6) ne razlikuju se značajno. To se može objasniti utjecajem karbomera na oslobađanje lijeka, što je ranije objašnjeno. Uslijed toga, ciklodekstrini ne utječu na vrijednosti DSE.

Učinak HP- $\beta$ -CD na oslobađanje lorazepama i risperidona iz pripremljenih mikročestica vrednovan je model-neovisnom metodom koja se temelji na određivanju faktora različitosti ( $f_1$ ) i faktora sličnosti ( $f_2$ ; Moore i Flanner, 1996). Ova metoda evaluacije krivulja oslobađanja lijeka iz različitih mikročestica ima značajnu prednost u odnosu na statističke metode. Statističke metode, kao što je ANOVA, ne uzimaju u obzir odnos između pojedinih točaka u profilu oslobađanja lijeka, već ih tretiraju kao nezavisne (Anderson i sur., 1998). Vrijednosti fit-faktora prikazane u Tablici 12. ukazuju da HP- $\beta$ -CD značajno mijenja profil oslobađanja lorazepama iz svih mikročestica. U slučaju mikročestica risperidona, HP- $\beta$ -CD utječe na oslobađanje lijeka iz mikročestica s HPMC. Time su potvrđene pretpostavke iz ranije diskusije. Može se zaključiti kako se brže oslobađanje lijeka iz mikročestica s ciklodekstrinom može pripisati sposobnosti HP- $\beta$ -CD da stvara inkluzijske komplekse s lorazepamom i risperidonom uslijed čega se mijenja topljivost lijeka u izdubrenom polimernom matriksu. Također, HP- $\beta$ -CD u polimernom matriksu utječe na bubrenje i eroziju sustava što doprinosi bržem oslobađanju lijeka. U slučaju mikročestica risperidona oblikovanih s karbomerom (MR3 i MR4) te interpolimernim kompleksom (MR5 i MR6), HP- $\beta$ -CD u sustavu ne mijenja značajno oslobađanje lijeka. Brzina oslobađanja risperidona ograničena je interakcijom lijeka s karboksilnim skupinama karbomera.

## **5.8. *In vitro* ispitivanje difuzije lorazepama i risperidona**

Određivanjem kinetičkih parametara difuzije neke molekule kroz polupropusnu membranu moguće je predvidjeti brzinu apsorpcije lijeka kroz sluznice organizma. Difuzija molekule lijeka iz donorskog u akceptorski odjeljak Franz-difuzijske ćelije odvija se u više uzastopnih koraka. Prvi korak obuhvaća otapanje, odnosno oslobađanje lijeka te difuziju otopljenih molekula lijeka kroz hidrodinamski sloj donorskog odjeljka do površine polupropusne membrane. Nakon toga slijedi difuzija lijeka kroz polupropusnu membranu u akceptorski odjeljak Franz-difuzijske ćelije. Određene vrijednosti konstanti brzine difuzije i koeficijenta difuzije obuhvaćaju oba procesa (Tablice 13., 14. i 15.).

### **5.8.1. Utjecaj HP- $\beta$ -CD na permeabilnost lorazepama i risperidona**

Topljivost lijeka je ključan parametar koji određuje brzinu difuzije lorazepama i risperidona kroz polupropusnu membranu. Tijekom eksperimenta, u donorskom odjeljku horizontalne Franz-difuzijske ćelije nisu postojali uvjeti osigurane topljivosti. Zbog niske topljivosti lorazepama i risperidona, količina lijeka raspoloživog za difuziju u hidrodinamskom sloju na površini membrane je ograničena. Uslijed toga vrijednosti konstante brzine difuzije, koeficijenta difuzije te učinkovitosti difuzije su niske (Tablica 13.). Oblikovanjem inkluzijskih kompleksa lorazepama i risperidona značajno se poboljšala difuzibilnost lijekova. Na to ukazuju više vrijednosti ispitivanih kinetičkih parametara difuzije lijeka iz kompleksa. Mehanizam djelovanja ciklodekstrina kao promotora difuzije može se objasniti povećanjem topljivosti lijekova u hidrodinamskom sloju na površini polupropusne membrane. Ciklodekstrini djeluju kao nosači lipofilnih molekula lijeka kroz hidrofilnu sredinu do površine membrane. Time je olakšana difuzija molekule lijeka kroz hidrodinamski sloj. Zbog velike molekularne mase i hidrofilnosti molekule ciklodekstrina, prolazak kompleksa kroz polupropusnu membranu nije vjerojatan. Lijek uklopljen u središnju šupljinu molekule ciklodekstrina je u brznoj dinamičkoj ravnoteži sa "slobodnim" molekulama lijeka, pa ciklodekstrini na površini polupropusne membrane osiguravaju visoku koncentraciju molekula lijekova raspoloživih za difuziju. Time je stvoren visoki koncentracijski gradijent lijeka na površini polupropusne membrane čime je značajno

ubrzana difuzija lijeka. Pri tome je učinak HP- $\beta$ -CD na difuziju lorazepama naglašeniji u odnosu na risperidon. Razlog za to je ionizacija risperidona pri uvjetima ispitivanja (pH-vrijednost 6.5) koja je oslabila interakciju risperidona s HP- $\beta$ -CD, kao što je objašnjeno u poglavlju 5.1. Uslijed toga su vrijednosti ispitivanih kinetičkih parametara difuzije risperidona utjecajem ciklodekstrina nešto niže u odnosu na one za lorazepam.

### **5.8.2. Utjecaj HP- $\beta$ -CD i mukoadhezivnih polimera na difuziju lorazepama i risperidona iz mikročestica**

Oblikovanjem lijekova u mikročestice mijenja se difuzibilnost lorazepama i risperidona. Vrijednosti kinetičkih parametara difuzije lorazepama i risperidona iz mikročestica su znatno više u odnosu na vrijednosti kinetičkih parametara određenih pri difuziji raspršivanjem osušenih lijekova (Tablice 13., 14. i 15.). Učinci mukoadhezivnih polimera na ispitivane kinetičke parametre difuzije lorazepama i risperidona iz mikročestica se međusobno razlikuju.

Utjecaj HPMC i karbomera na vrijednosti ispitivanih kinetičkih parametara difuzije lorazepama iz mikročestica ML1 i ML3 je jednako izražen (Tablica 14.). Brzina oslobađanja lorazepama iz mikročestica ML1 i ML3 se ne razlikuje značajno (Slika 24.), što je posljedica ograničene topljivosti lorazepama u izbubrenom polimernom matriksu. Topljivost lorazepama je parametar koji određuje i koncentraciju lorazepama raspoloživog za difuziju, pa vrijednosti ispitivanih kinetičkih parametara difuzije lorazepama iz mikročestica ML1 i ML3 nisu značajno različite.

Umrežena struktura interpolimernog kompleksa ograničava oslobađanje lorazepama iz mikročestica ML5 pa su manje koncentracije lorazepama raspoložive za difuziju. Time se mogu objasniti niske vrijednosti kinetičkih parametara difuzije lorazepama iz mikročestica oblikovanih s interpolimernim kompleksom.

Vrijednosti ispitivanih kinetičkih parametara difuzije risperidona iz mikročestica MR1 ne razlikuju se značajno u odnosu na one raspršivanjem osušenog risperidona (Tablice 13. i 15.). Dokazano je da ionska jakost medija značajno utječe na svojstva bubrenja i eroziju matriksnih sustava oblikovanih s HPMC (Kavanagh i

Corrigan, 2004). Pri ispitivanju difuzije, sloj mikročestica u donorskom odjeljku horizontalne Franz-difuzijske ćelije ovlažen je simuliranim nazalnim fluidom pH-vrijednosti 6.5. U tim uvjetima, ulaskom medija u polimerni matriks dolazi do ionizacije molekula risperidona unutar polimernog matriksa. Pri tome se smanjuje hidratacija polimernih lanaca HPMC zbog kompeticije ioniziranih molekula risperidona za raspoloživu vodu (Katzhendler i sur., 2000). Uslijed slabije hidratacije polimernih lanaca usporeno je bubrenje i erozija polimernog matriksa, a time i brzina oslobađanja risperidona. Zbog toga je koncentracijski gradijent molekula risperidona na površini polupropusne membrane niži, pa je proces difuzije sporiji. Lorazepam pri ispitivanoj pH-vrijednosti medija nije ioniziran, pa utjecaj na hidrataciju lanaca HPMC izostaje. Zbog toga je utjecaj HPMC na vrijednosti ispitivanih kinetičkih parametara difuzije lorazepama iz mikročestica ML1 izraženiji.

Kod mikročestica risperidona oblikovanih s karbomerom i interpolimernim kompleksom (MR3 i MR5), vrijednosti kinetičkih parametara difuzije su znatno više u odnosu na one za raspršivanjem osušeni risperidon. Oslobađanje risperidona iz mikročestica MR3 i MR5 karakterizirano je tzv. "burst" efektom (Slika 24.). Pri nižim pH-vrijednostima medija, oslobađanje bazičnih lijekova kao što je risperidon iz veze s karbomerom je značajno brže (Elkheshen 2001; Tatavarti i sur., 2004). To se objašnjava boljom topljivošću lijekova pri nižim pH-vrijednostima, pa je "burst" efekt pri oslobađanju risperidona još više izražen. Uslijed toga nastaje visoki koncentracijski gradijent risperidona u donorskom odjeljku Franz-difuzijske ćelije što ubrzava difuziju. Pri tome se promijenio kinetički model difuzije risperidona iz mikročestica oblikovanih s karbomerom i interpolimernim kompleksom. Difuziju risperidona iz mikročestica MR3 i MR5 najbolje opisuje kinetika prema Higuchiju (Tablica 15.). Promjena kinetike difuzije može se povezati s brzim inicijalnim oslobađanjem risperidona iz mikročestica. U početku eksperimenta visoka koncentracija risperidona je raspoloživa za difuziju kroz polupropusnu membranu, pa je taj proces brži. S vremenom, koncentracijski gradijent risperidona u donorskom odjeljku se smanjuje, a uslijed toga opada i brzina difuzije.

HP- $\beta$ -CD je utjecao na difuziju lorazepama i risperidona iz mikročestica. Pri tome su vrijednosti konstanti brzina difuzije i koeficijenta difuzije lorazepama iz svih pripremljenih mikročestica te risperidona iz mikročestica oblikovanih s HPMC veće oko 2 puta u odnosu na vrijednosti konstanti brzine i koeficijenata difuzije za

mikročestice bez ciklodekstrina. Utjecaj HP- $\beta$ -CD na difuziju lorazepama iz mikročestica ML2, ML4 i ML6 može se objasniti utjecajem ciklodekstrina na oslobađanje lijeka. Ciklodekstrini povećavaju topljivost lijeka u izbubrenom polimernom matriksu te djeluju na eroziju mikročestica. Uslijed toga je veća koncentracija lijeka raspoloživa za difuziju. Pri tome, vrijednosti ispitivanih kinetičkih parametara difuzije lorazepama iz mikročestica ML2, ML4 i ML6 su nešto niže u odnosu na one za inkluzijski kompleks lorazepama. Prilikom oslobađanja lijeka iz mikročestica dolazi do brzog otapanja kompleksa u izbubrenom sloju polimera. Nakon toga slijedi difuzija lijeka kroz izbubreni polimerni matriks do hidrodinamskog sloja na površini polupropusne membrane te difuzija lijeka u akceptorski odjeljak Franz-difuzijske ćelije. Difuzija lijeka kroz izbubreni polimerni matriks je proces koji utječe na ukupnu brzinu difuzije. Time se mogu objasniti niže vrijednosti kinetičkih parametara difuzije lorazepama iz mikročestica s ML2, ML4 i ML6 u odnosu na one za inkluzijski kompleks lijeka. Učinak HP- $\beta$ -CD na difuziju risperidona iz mikročestica oblikovanih s HPMC može se objasniti istim mehanizmom.

HP- $\beta$ -CD i karbomer djeluju sinergistički na difuziju risperidona iz mikročestica MR4 i MR6. Vrijednosti ispitivanih kinetičkih parametara difuzije risperidona iz mikročestica MR4 i MR6 su oko 6 puta više u odnosu na one raspršivanjem osušenog risperidona (Tablica 15.). Pri tome, je učinak HP- $\beta$ -CD na difuziju risperidona iz mikročestica nešto slabije izražen. Vrijednosti konstante brzine difuzije i koeficijenta difuzije ovih mikročestica su 1.4 puta više u odnosu na mikročestice bez ciklodekstrina (MR3 i MR5). *In vitro* ispitivanje oslobađanja risperidona iz mikročestica MR4 i MR6 pokazalo je da je interakcija lijeka i karbomera parametar koji određuje brzinu oslobađanja risperidona, dok je učinak ciklodekstrina zanemariv. Više vrijednosti ispitivanih kinetičkih parametara difuzije risperidona iz mikročestica MR4 i MR6 mogu se objasniti učinkom HP- $\beta$ -CD na transport lijekova kroz hidrodinamski sloju na površini polupropusne membrane. Ciklodekstrini djeluju kao nosači molekula lijeka kroz hidrodinamski sloj, povećavajući njegovu raspoloživost za difuziju. Uslijed toga rastu vrijednosti ispitivanih kinetičkih parametara difuzije risperidona. Difuzija risperidona iz mikročestica MR4 i MR6 odvija se prema Higuchijevom kinetičkom modelu.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti:

- Risperidon i lorazepam u otopinama različitih pH-vrijednosti stvaraju inkluzijske komplekse s HP- $\beta$ -CD molarnog odnosa 1:1. Nastajanje inkluzijskih kompleksa mijenja topljivost risperidona i lorazepama u vodi. Ovisno o pH-vrijednosti medija, risperidon je u protoniranom ili neprotoniranom obliku. Ionizacija risperidona utječe na stabilnost inkluzijskog kompleksa. Vrijednosti konstante stabilnosti kompleksa protoniranog risperidona s HP- $\beta$ -CD su niske, što je posljedica hidrofilnog karaktera monoprotoniranog risperidona. Neprotonirani risperidon je lipofilniji te s HP- $\beta$ -CD stvara stabilnije komplekse. Nastajanje kompleksa lorazepama s HP- $\beta$ -CD neovisno je o pH-vrijednosti medija.
- HPMC mijenja topljivost risperidona i lorazepama u vodi što upućuje na interakciju lijek-polimer. Utjecaj karbomera na topljivost lijekova je zanemariv. Risperidon i lorazepam ne stvaraju ternarne komplekse s HPMC i HP- $\beta$ -CD. Karbomer nepovoljno utječe na nastajanje inkluzijskih kompleksa, što je posljedica interakcije polimera i HP- $\beta$ -CD.
- Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) i infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama (FTIR) potvrđeno je nastajanje inkluzijskog kompleksa risperidona i lorazepama u čvrstom stanju. Kompleksi su pripremljeni metodom sušenja raspršivanjem i dobro su topljivi u vodi.
- Metodom turbidimetrije i FTIR spektroskopijom potvrđeno je nastajanje interpolimernog kompleksa HPMC i karbomera u otopini i u čvrstom stanju. Interpolimerni kompleks nastaje i uz HP- $\beta$ -CD, a moguće je i nastajanje interpolimernog kompleksa koji sadrži HPMC, karbomer i ciklodekstrin.
- Oblikovane su mikročestice lorazepama i risperidona metodom sušenja raspršivanjem. Ovom tehnikom ostvareno je dobro uklapanje lijekova u mikročestice srednjeg promjera oko 3.0  $\mu\text{m}$ . Metoda pripreme mikročestica je brza i jednostavna te bi mogla biti prikladna za industrijsku proizvodnju.
- Rezultati termoanalitičkih ispitivanja (DSC) upućuju na uklapanje lorazepama i risperidona u polimerni matriks mikročestica što uzrokuje djelomični gubitak



kristaliničnih svojstava lijekova. Termalna svojstva mikročestica ukazuju na interakciju risperidona s karbomerom i interpolimernim kompleksom. Uklapanje u polimerni matriks mikročestica ne mijenja termalna svojstva inkluzijskih kompleksa lorazepama i risperidona.

- Vrijednosti zeta potencijala mikročestica potvrđuju nastajanje interpolimernog kompleksa te upućuju na elektrostatsku prirodu interakcije risperidona s karbomerom. Polimer je dominantna komponenta na površini mikročestica. HP- $\beta$ -CD ne mijenja vrijednost zeta-potencijala mikročestica.
- Mukoadhezivna svojstva mikročestica lorazepama i risperidona definirana su fizikalno-kemijskim svojstvima polimera. Zbog umrežene strukture karbomera, mikročestice oblikovane s karbomerom i interpolimernim kompleksom pokazuju izraženiju mukoadhezivnost. Mukoadhezivnost mikročestica s HPMC je nešto slabije izražena, što je posljedica linearne strukture HPMC. Uklapanje lorazepama i risperidona u mikročestice mijenja njihovu mukoadhezivnost. HP- $\beta$ -CD značajno ne utječe na mukoadhezivna svojstva mikročestica.
- Oslobođanje lorazepama iz mikročestica kontrolirano je difuzijom lijeka kroz izbubreni polimerni matriks te njegovom erozijom. Difuzija lijeka kroz izbubreni polimerni matriks je dominantni mehanizam oslobađanja lorazepama iz mikročestica oblikovanih s karbomerom i interpolimernim kompleksom, što je posljedica umrežene strukture polimera. HPMC je polimer linearne strukture te je erozija polimernog matriksa dominantan mehanizam oslobađanja lorazepama i risperidona iz mikročestica. HP- $\beta$ -CD utječe na difuziju lorazepama u izbubrenom polimernom matriksu. Brzo otapanje inkluzijskog kompleksa doprinosi eroziji polimernog matriksa. Zbog toga je oslobađanje lorazepama iz mikročestica oblikovanih s HP- $\beta$ -CD brže. Istim mehanizmom može se objasniti utjecaj HP- $\beta$ -CD na oslobađanje risperidona iz mikročestica HPMC. Interakcija risperidona i karbomera ključna je pri oslobađanju lijeka iz mikročestica oblikovanih s karbomerom i interpolimernim kompleksom. Stoga je utjecaj HP- $\beta$ -CD na oslobađanje risperidona iz mikročestica slabije izražen.

- Topljivost lorazepama i risperidona ograničava oslobađanje lijekova iz mikročestica, a time i *in vitro* difuziju lijekova. Stvaranje inkluzijskih kompleksa utječe na *in vitro* difuzibilnost lorazepama i risperidona. Mehanizam djelovanja HP- $\beta$ -CD kao promotora difuzije lijekova tumači se visokom topljivosti inkluzijskih kompleksa te utjecajem ciklodekstrina na transport lijekova. HP- $\beta$ -CD djeluje kao nosač lipofilnih lijekova kroz hidrodinamski sloj do površine polupropusne membrane stvarajući visoki koncentracijski gradijent lorazepama i risperidona raspoloživih za difuziju. HP- $\beta$ -CD u mikročesticama lorazepama i risperidona mijenja vrijednosti kinetičkih parametara difuzije lijekova. Stvaranje inkluzijskih kompleksa utječe na brzinu oslobađanja lijekova iz mikročestica, a uslijed toga rastu koncentracije lorazepama i risperidona raspoložive za difuziju. Time je *in vitro* difuzija lijekova značajno brža.
- Mikročestice oblikovane s inkluzijskim kompleksom lorazepama i karbomerom (ML4) te mikročestice oblikovane s inkluzijskim kompleksom risperidona i interpolimernim kompleksom (MR6) karakteriziraju dobro definirani kinetički parametri *in vitro* difuzije lijekova te izražena mukoadhezivnost. Ove karakteristike mikročestica pružaju potencijal za nazalnu primjenu ispitivanih lijekova i njihov transport u CST i/ili tkivo mozga. Ciklodekstrini i ispitivani polimeri u mikročesticama lorazepama i risperidona stoga mogu oblikovati terapijski sustav prikladan za nazalnu primjenu lijekova s učinkom na središnji živčani sustav.

## **7. LITERATURA**

- Adjei, A., Sundberg, D., Miller, J. i Chun, A., 1992. Bioavailability of leuprolide acetate following nasal and inhalational delivery to rats and healthy humans. *Pharm. Res.* **9**, 244-249.
- Agu, R. U., Jorissen, M., Willems, T. den Mooter, G. V. Kinget, R., Verbeke, N. i Augustijns, P., 2000. Safety assessment of selected cyclodextrins — effect on ciliary activity using a human cell suspension culture model exhibiting in vitro ciliogenesis. *Int. J. Pharm.* **193**, 219-226.
- Aigner, Z., Hassan, H. B., Berkesi, O., Kata, M. i Eros, I., 2005. Thermoanalytical, FTIR and X-ray studies of gemfibrozil-cyclodextrin complexes. *J. Therm. Anal. Calorim.* **81**, 267-272.
- Anderson, N. H., Bauer, M., Boussac, N., Khan-Malek, R., Munden, P. i Sardaro, M., 1998. An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of in vitro dissolution profiles. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 811-822.
- Asai, K., Morishita, M., Katsuta, H., Hosoda, S., Shinomiya, K., Noro, M., Nagai, T. i Takayama, K., 2002. The effect of water-soluble cyclodextrins on the histological integrity of the rats nasal mucosa. *Int. J. Pharm.* **246**, 25-35.
- Ashan, F., Arnold, J. J., Yahg, T., Meezan, E., Schwiebert, E. M. i Pillion, D. J., 2003. Effects on the permeability enhancers, tetradecylmaltoside and dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin, on insulin movement across human bronchial epithelial cells (16HBE14o-). *Eur. J. Pharm. Sci.* **20**, 27-34.
- Bagger, M. A. i Bechgaard, E., 2004. The potential of nasal application for delivery to the central brain – a microdialysis study of fluorescein in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* **21**, 235-242.
- Behl, C. R., Pimplaskar, H. K., Sileno, A. P., deMerireles, J. i Romeo, V. D., 1998. Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* **29**, 89-116.
- Bergstöröm A. S., Luthmann, K. i Artursson, P., 2004. Accuracy of calculated pH-dependent aqueous drug solubility. *Eur. J. Pharm. Sci.* **22**, 387-398.
- Bernkop-Schnurch, A. i Steininger, S., 2000. Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers. *Int. J. Pharm.* **194**, 239-247.
- Bibby, D. C., Davies, N. M. i Tucker I. G., 2000. Mechanism by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* **197**, 1-11.
- Bogataj, M., Vovk, T., Kerec, M., Dimnik, A., Grabnar, I. i Mrhar, A., 2003. The correlation between zeta potential and mucoadhesion strength on pig vesical mucosa. *Biol. Pharm. Bul.* **26**, 743-746.
- Born, J., Lange, T., Kern, W., McGregor, G. P., Bickel, U. i Fehm, H. L., 2002. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nature Neurosci.* **6**, 514-516.
- Brown, M. E., Glass, B. D. i Worthington, M. S., 2002. Binary systems of nifedipine and various cyclodextrins in the solid state: Thermal, FTIR XRD studies. *J. Therm. Anal. Calorim.* **68**, 631-646.

- Chavanpatil, M. D. i Vavia, P. R., 2004. The influence of absorption enhancers on nasal absorption of acyclovir. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**, 483-487.
- Chou, J. K. i Donovan, M. D., 1998<sup>a</sup>. The distribution of local anesthetics into CSF following intranasal administration. *Int. J. Pharm.* **168**, 137-145.
- Chou, J. K. i Donovan, M. D., 1998<sup>b</sup>. Distribution of antihistamines into the CSF following intranasal delivery. *Biopharm. Drug Depos.* **18**, 335-346.
- Chow, H. H. S., Anavy, N. i Villalobos, A., 2001. Direct nose-brain transport of benzoylecognine following intranasal administration in rats. *J. Pharm. Sci.* **90**, 1729-1735.
- Chow, H. H. S., Chen, Z. i Matsuura, G. T., 1999. Direct transport of cocaine from the nasal cavity to the brain following intranasal cocaine administration in rats. *J. Pharm. Sci.* **88**, 754-758.
- Dahlin, M., Jansson, B. i Bjork, E., 2001. Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* **14**, 75-80.
- Derad, I., Willeke, K., Pietrowsky, R., Born, R. i Fehm, H. L., 1998. Intranasal angiotensin II directly influences central nervous regulation of blood pressure. *Am. J. Hypertens.* **11**, 971-977.
- Dittgen, M., Durrani, M. i Lehmann, K., 1997. Acrylic polymers. A review of pharmaceutical application. *S. T. P. Pharma. Sci.* **7**, 403-437.
- Duro, R., Alvarez, C., Martinez-Pacheco, G., Gomez-Amoza, J. L., Concheiro, A. i Souto, C., 1998. The absorption of cellulose ethers in aqueous suspension of pyrantel pamoate: effects on zeta potential and stability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**, 181-188.
- Edsman, K. i Hägerström, H., 2005. Pharmaceutical application of mucoadhesion for the non-oral routes. *J. Pharm. Pharmacol.* **57**, 3-22.
- Einer-Jensen, N. i Larsen, L., 2000. Transfer of tritiated water, tyrosine and propranolol from the nasal cavity to cranial arterial blood in rats. *Exp. Brain Res.* **130**, 216-220.
- Einer-Jensen, N., Laresen, L., Deprez, S., Starns, E. i Schwartz, S., 2001. Intranasal absorption of sumatriptan and naratriptan: no evidence of local transfer from the nasal cavities to the brain arterial blood in male rats. *Biopharm. Drug Dispos.* **22**, 213-219.
- Elkheshen, S. A., 2001. Interaction of verapamil hydrochloride with Carbopol 934 P and its effect on the release rate of the drug and water uptake of the polymer matrix. *Drug Devel. Ind. Pharm.* **27**, 925-934.
- El-Sherif, Z. A., El-Zeany, B. I El-Houssini, O. M., 2005. High performance chromatographic and thin layer densitometric methods for determination of risperidone in the presence of its degradation products in bulk powder and in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36**, 975-981.
- Frömming, K. H. i Szejtli, J., 1994. Cyclodextrins in Pharmacy, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 1-32.
- Fundueanu, G., Constantin, M., Dalpiaz, A., Bortolotti, F., Cortesi, R., Ascenzi, P. i Menegatti, E., 2004. Preparation and characterization of starch/cyclodextrin

- bioadhesive microspheres as platform for nasal administration of Gabexate Mesylate (Foy<sup>®</sup>) in allergic rhinitis treatment. *Biomaterials* **25**, 159-170.
- Gandhi R. B. i Robinson J. R., 1994. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **13**, 43-74.
- García-González, N., Kellaway, I. W., Blanco-Fuente, H., Anguiano-Igea, Delgado-Charro, B., Otero-Espinar, F. J. i Blanco-Mendez, J., 1993. Influence of  $\beta$ -cyclodextrin concentration and polyacrylic acid molecular weight on swelling and release characteristic of metoclopramide-containing hydrogels. *Int. J. Pharm.* **100**, 25-31.
- Genta, I., Constantini, M., Asiti, A., Conti, B. i Montanari, L., 1998. Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Carbohydr. Polymers* **36**, 81-88.
- Giordano, F., Novak, C. i Moyano, J. R., 2001. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochim. Acta.* **380**, 123-151.
- Gizurason, S., Thorvaldsson, T., Sigurdsson, P. i Gunnarson, E., 1997. Selective delivery of insulin into the brain: intraolfactory absorption. *Int. J. Pharm.* **146**, 135-141.
- Gu, F., Cui, F. i Gao Y., 2005. Preparation of prostaglandin E<sub>1</sub>-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complex and its nasal delivery in rats. *Int. J. Pharm.* **290**, 101-108.
- Guðmundsdóttir, H., Sigurjódóttir, J. F., Másson, M., Fajalldal, O., Stefánsson, E. i Loftsson, T., 2001. Intranasal administration of midazolam in a cyclodextrin based formulation: bioavailability and clinical evaluation in humans. *Pharmazie* **56**, 963-966.
- Gürson, A., Turkoglu, M., Seyucel, B., Kalkan, F. i Okar, I., 1995. Evaluation of tableted microspheres of dypiridamole. *Drug Del. Ind. Pharm.* **21**, 503-507.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R. i McClements, D. J., 2006. Characterisation of  $\beta$ -lactoglobulin sodium alginate interactions in aqueous solution: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility studies. *Food Hydrocoll.* **20**, 577-585.
- Hayden, F. G., Andries K. i Jansen, P. A. J., 1992. Safety and efficacy of intranasal pirodavir (R77975) in experimental rhinovirus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36** 727-732.
- Hermens, W. A. J. J., Belder, C. W. J., Merkus, J. M. W. M., Hooymans, P. M., Verhoef J. i Merkus, F.W.H.M. 1991. Intranasal estradiol administration to oophorectomized women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **40**, 35-41.
- Hermens, W. A. J. J., Deurloo, M. J. M., Romeyn, S. G., Verhoef, J. C. i Merkus, F. W. H. M., 1990. Nasal absorption enhancement of 17- $\beta$ -estradiol by dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin in rabbits and rats. *Pharm. Res.* **7**, 500-503.
- Higuchi, T. i Connors, K., 1965. Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **7**, 117-212.
- Hirayama, F. i Uekama, K., 1999. Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Adv. Drug Del. Rev.* **36**, 125-141.

- Ikinçi, G., Çapan, Y., Şenel, S., Alaaddinoğlu, E., Dalkara, T. i Hincal, A., 2000. In vitro/in vivo studies on a buccal bioadhesive tablet formulation of carbamazepine. *Pharmazie* **55**, 762-765.
- Illum L. B., 2003. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions. *J. Control. Release*. **87**, 187-198.
- Illum, L. B., 2000. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Sci.* **11**, 1-18.
- Illum, L., 2004. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 3-17.
- Irie, T. i Uekama, K., 1997. Pharmaceutical application of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* **86**, 147-162.
- Irie, T., Wakamatsu, Y., Arima, H., Aritomi, H. i Uekama, K., 1992. Enhancing effect of cyclodextrins on nasal absorption of insulin in rats. *Int. J. Pharm.* **84**, 129-139.
- Jabbari, E., Wisniewski, N. i Peppas, N. A., 1993. Evidence of mucoadhesion by cation interpenetration at a poly(acrylic acid) mucin interface using ATR-FTIR spectroscopy. *J. Control. Rel.* **26**, 99-108.
- Javaid, J. i Davis, J. M., 1993. Cocaine disposition in discrete regions of rat brain. *Biopharm. Drug Dispos.* **14**, 205-214.
- Jug, M. i Bećirević-Laćan, M., 2004. Influence of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complexation on piroxicam release from buccadhesive tablets. *Eur. J. Pharm. Sci.* **21** 251-260.
- Junginger, H. E. i Verhoef, J. C., 1998. Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs – a fiction? *P.S.T.T.* **9**, 371-376.
- Junquera, E. i Aicart, E., 1999. A fluorimetric, potentiometric and conductimetric study of the aqueous solutions of naproxen and its association with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* **176**, 169-178.
- Kandimalla, K. K i Donovan, M. D., 2005. Carrier mediated transport of chlorpheniramine and chlorcyclizine across bovine olfactory mucosa: Implications on nose-to-brain transport. *J. Pharm. Sci.* **94**, 613-624.
- Kao, H., D., Traboulsi, A., Itoh, S., Dittert, L. i Hussain, A., 2000. Enhancement of the systemic and CNS delivery of L-dopa by the nasal administration of its water soluble prodrugs. *Pharm. Res.* **17**, 978-984.
- Katzhendeler, I., Mäder, K. i Friedman, M., 2000. Structure and hydration properties of hydroxypropyl methylcellulose matrices containing naproxen and naproxen sodium. *Int. J. Pharm.* **200**, 161-179.
- Kavanagh, N. i Corrigan, O. I., 2004. Swelling and erosion properties of hydroxypropylmethylcellulose (Hypromellose) matrices-influence of agitation rate and dissolution medium composition. *Int. J. Pharm.* **279**, 141-152.
- Kern, W., Born, J., Schrieber, H. i Fehm, H. L., 1999. Central nervous system effects of intranasally administrated insulin during euglycemia in men. *Diabetes*, **48**, 557-563.

- Khanvilkar, K., Donovan, M. D. i Flanagan, D. R., 2001. Drug transfer through mucus. *Adv. Drug Del. Rev.* **48**, 173-193.
- Khurtoryanskiy, V. V., Dubolazov, A. V., Nurkeeva, Z. S. i Mun, G. A., 2003. Complexation of poly(acrylic acid) with hydroxypropylcellulose in aqueous solutions. *Polym. Sci.* **45**, 89-91.
- Li, L., Mathias, N. R., Heran, C. L., Moench, P., Wall, D.A. i Smith, R. L., 2006. Carbopol-mediated paracellular transport enhancement in Calu-3 cell layers. *J. Pharm. Sci.* **95**, 326-335.
- Lindhardt, K., Gizurason, S., Stefansson, S. B., Olafsson, D. R. i Bechgaard E., 2001. Electroencephalographic effects and serum concentrations after intranasal administration of diazepam to healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **52**, 521-527.
- Liu, X. F., Fawcett, J. R., Thorne, R. G., DeFor, T. A. i Frey, W. H., 2001. Intranasal administration of insulin-like growth factor-1 bypasses the blood-brain barrier and protects against cerebral ischemic damage. *J. Neurol. Sci.* **187**, 91-97.
- Loftsson T., Kristmundsdóttir, T., Ingvarsdóttir, K., Baldvinsdóttir, J. i Olafsdóttir, B. J., 1992. Microcapsules of hydrophilic drug-cyclodextrin complexes. *Proceedings of the International Symposium on the Controlled Release of Bioactive Materials* **19**, Orlando, p. 359-360.
- Loftsson, T., Herinsdóttir, D. i Másson, M., 2005. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm.* **302**, 18-28.
- Loftsson, T. i Brewster, M. E., 1996. Pharmaceutical application of cyclodextrins. I. Drug solubilization and stabilisation. *J. Pharm. Sci.* **85**, 1017-1025.
- Loftsson, T. i Másson, M., 2004. The effects of water-soluble polymers on cyclodextrins and cyclodextrin solubilization of drugs. *J. Drug Del. Sci. Tech.* **14**, 35-43.
- Loftsson, T., 2002. Cyclodextrin and the biopharmaceutical classification system of drugs. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* **44**, 63-67.
- Loftsson, T., Guðmundsdóttir, H., Sigurjódóttir, J. F., Sigurðsson, H. H., Sigfússon, S. D., Másson, M. i Stefánsson, E., 2001. Cyclodextrin solubilization of benzodiazepines: formulation of midazolam nasal spray. *Int. J. Pharm.* **212**, 29-40.
- Maizles, M., 1999. Intranasal lidocaine to prevent headache following migraine aura, *Headache*, **39**, 439-442.
- Maizles, M., Scott, B., Cohen, W. i Chen, W., 1996. Intranasal lidocaine for treatment of migraine: A randomised, double-blind, controlled trial. *J. A. M. A.* **276**, 319-321.
- Martinac, A., Filipović-Grčić, J., Voinovich, D., Perissutti, B. i Franceschinis, E., 2005. Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *Int. J. Pharm.* **291**, 69-77.
- Martín, E., Romejin, S. G., Verhoef, J. C. i Merkus, F. W. H. M., 1997. Nasal absorption of dihydroergotamine from liquid and powder formulations in rabbits. *J. Pharm. Sci.* **86**, 802-807.



- Marttin, E., Verhoef, J. C., Spies, F., van der Meulen, J., Nagelkerke, J. F., Koerten, H. K. i Merkus, F. W. H. M., 1999. The effect of methylated  $\beta$ -cyclodextrins on the tight junctions of the rat nasal respiratory epithelium: Electron microscopic and confocal laser scanning microscopic visualisation studies. *J. Cont. Release* **57**, 205-213.
- Masson, M., Loftsson, T, Masson G. i Stefansson, E., 1999. Cyclodextrins as permeation enhancers:some theoretical evaluation and in vivo testing. *J. Control. Release* **59**, 107-118.
- Mathison, S., Nagilla, R. i Kompella, U. B., 1998. Nasal route for direct delivery of solutes to the central nervous system: Fact of Fiction? *J. Drug Targeting* **5**, 415-441.
- Matsubara, K., Abe, K., Irie T. i Uekama, K., 1995. Improvement of nasal bioavailability of luteinizing hormone-releasing hormone agonist, burselyn, by cyclodextrin derivates in rats. *J. Pharm. Sci.* **84**, 1295-1300.
- Mercus, P., Guchelaar, H. J., Bosch, A. i Merkus F. W. H. M., 2003. Direct access of drugs to the human brain after intranasal drug administration? *Neurology*, **60**, 1669-1671.
- Merkus, F. W. H. M., Schipper, N. G. M. i Verhoef, J. C., 1996. The influence of absorption enhancers on the intranasal insulin absorption in normal and diabetic subjects. *J. Control. Release* **41**, 69–75.
- Merkus, F. W. H. M., Schipper, N. G. M., Hermens, W. A. J. J., Romeijn, S. G. i Verhoef J. C., 1993. Absorption enhancers in nasal drug delivery-efficiency and safety. *J. Control. Release* **24**, 201-208.
- Merkus, F. W. H. M., Verhoef, J. C., Marttin, E., Romejin, S. G., van der Kuy, P. H. M., Hermens, W. A. J. J. i Schipper, N. G. M., 1999. Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* **36**, 41-57.
- Merkus, F. W. H. M., Verhoev, J., Romejin, S. G. i Schipper, H. G. M., 1991. Absorption enhancing effect of cyclodextrins on intranasally administered inzulin in rats. *Pharm. Res.* **8**, 588-592.
- Miro, A., Quaglia, F., Sorrentino, U., La Rotonda, M. I., D'Emmanuele, Di Villa Bianca, R. i Sorrentino, R., 2004. Improvement of gliquidone hypoglycaemic effect in rats by cyclodextrin formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **23**, 57-64.
- Moore, J. W., Flanner, H. H., 1996. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharm. Tech.* **20**, 64-74.
- Mortazavi, S. A., 1995. An in vitro assesment of mucus mucoadhesive interactions. *Int. J. Pharm.* **124**, 173-182.
- Mura, P., Zerrouk, N., Faucci, M. T., Maestrelli, F. i Chemtob, C., 2002. Comparative study of ibuproxam complexytion with amorphous  $\beta$ -cyclodextrin derivates in solution and in solid state. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **54**, 181-191.
- Netter, F. H., 2003. Atlas anatomije čovjeka, Golden marketing, Zagreb, p 86.
- Nurkeeva, Z. S., Mun, G. A. i Khutoryanskiy, V. V., 2003. Interpolymer complexes of water-soluble nonionic polysaccharides wuth polycarboxylic acids and their applications. *Macromol. Biosci.* **3**, 283-295.

- Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K. i Pitha, J., 1989. Differential effect of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **186**, 17-22.
- Park, H. i Robinson J. R., 1987. Mechanisms of mucoadhesion of poly(acrylic acid) hydrogels. *Pharm. Res.* **4**, 457-464.
- Pelisser, C., de Kervasdoue, A., Choung, V. T., Maugis, E. L., de Mouillac, F. V., Breil, M. H., Moniot, G., Zeitoun-Lepvirer, G., Robin M. i Rime, B., 2001. Clinical evaluation, dose-finding and acceptability of AERODIOL<sup>®</sup>, the pulsed estrogen therapy for treatment of climacteric symptoms. *Maturitas* **37**, 181-189.
- Pepas, N. A. i Korsmeyer, R. W., 1986. Dynamically swelling hydrogels in controlled release application. U: Pepas, N. A. (ur.), Hydrogels in medicine and Pharmacy, vol.3, CRC Press, Boca Raton, p. 109-136.
- Pepas, N. A. i Sahlin, J. J., 1989. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int. J. Pharm.* **57**, 169-172.
- Perlovich, G. L., Skar, M. i Bauer-Brandl, A., 2003. Driving forces and the influence of the buffer composition on the complexation reaction between ibuprofen and HP- $\beta$ -CD. *Eur. J. Pharm. Sci.* **20**, 197-200.
- Pietrowsky, R., Claassen, L., Frercks, H., Fehm, H. L. i Born, J., 2001. Time course of intranasally administered cholecystokinin-8 on central nervous effects. *Neuropsychobiology*, **43**, 254-259.
- Popović, G. V., Sladić, D. M., Stefanović, V. M. i Pfendt, L. B., 2003. Study on protolytic equilibria of lorazepam and oxazepam by UV and NMR spectroscopy. *J. Pharm. Biom. Anal.* **31**, 693-699.
- Puglia, C., Bonina, F., Trapan, G., Franco, M. i Ricci, M., 2001. Evaluation of in vitro percutaneous absorption of lorazepam and clonazepam from hydro-alcoholic gel formulations. *Int. J. Pharm.* **228**, 79-87.
- Rajewski, R. A. i Stella, V. J., 1996. Pharmaceutical application of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **85**, 1142-1168.
- Redenti, E., Peveri, T., Zanol, M., Ventura, P., Gnappi, G. i Montenero, A., 1996. A study on the differentiation between amorphous piroxicam :  $\beta$ -cyclodextrin complex and a mixture of the two amorphous components. *Int. J. Pharm. Sci.* **129** 289-294.
- Ribeiro, L. S. S., Ferreira, D. C. i Veiga, F. J. B., 2003. Physicochemical investigation of the effects of waters-soluble polymers on vimpocetine complexation with  $\beta$ -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivate in solutian and solid state. *Eur. J. Pharm. Sci.* **20**, 253-266.
- Rodríguez-Tenreiro, C., Alvarez-Lorenzo, C, Concheiro, A. i Torres-Labandeira, J. J., 2004. Characterization of cyclodextrin-carbopol interactions by DSC and FTIR. *J. Therm. Anal. Calorim.* **77**, 403-411.
- Ross, T. M., Martinez, P. M., Renner, J. C., Hanson, L. R. i Frey, W. H., 2004. Intranasal administration of interferon beta bypasses the blood-brain barrier to target the central nervous system and cervical lymph nodes: a non-invasive treatment strategy for multiple sclerosis. *J. Neuroimunol.* **151**, 66-77.

- Saiano, F., Pitarresi, G., Cavallaro, G., Licciardi, M. I Giammona, G. 2002. Evaluation of mucoadhesive properties of  $\alpha$ , $\beta$ -poly(N-hydroxyethyl)-DL-aspartamide and  $\alpha$ , $\beta$ -poly(aspartylhydrazide) using ATR-FTIR spectroscopy. *Polymer*. **43**, 6281-6286.
- Sakane, T., Azikuzi, M., Taki, Y., Yamashita, S., Sezaki, H. i Nadai, T., 1995. Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: the relation to the molecular weight of drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* **47**, 379-381.
- Sakane, T., Azikuzi, M., Yamashita, S., Nadai, T., Hashida, M. i Sezaki, H., 1991<sup>b</sup>. Transport of a drug to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity: The relation to the lipophilicity of the drug. *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 449-451.
- Sakane, T., Azikuzi, M., Yoshida, M., Yamashita, S., Hashida, M., Sezaki, H. i Nadai, T., 1994. Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: the relation to the dissociation of the drug. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 378-379.
- Sakane, T., Azikuzi, M., Yoshida, M., Yamashita, S., Nadai, T., Hashida, M. i Sezaki, H., 1991<sup>a</sup>. Transport of cephalixin to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**, 449-451.
- Schipper, N. G. M., Romeijn, S. G., Verhoef, J. C. i Merkus, F. W. H. M., 1993<sup>b</sup>. Nasal insulin Delivery with dymethyl- $\beta$ -cyclodextrin as an absorption enhancer in rabbits: Powder more effective than liquid formulation. *Pharm. Res.* **10**, 682-686.
- Schipper, N. G. M., Verhoef, J. C., De Lannoy, L. M., Romeijn, S. G., Brakkee, J. H., Wiegant, V. M., Gispen, W. H. i Merkus, F. W. H. M., 1993<sup>a</sup>. Nasal administration of an ACTH (4-9) peptide analogue with dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin as an absorption enhancer: pharmacokinetics and dynamics. *Br. J. Pharmacol.* **110**,1335-1340.
- Schipper, N. G. M., Verhoef, J., Romeijn, S. G. i Merkus, F. W. H. M., 1992. Absorption enhancers in nasal insulin delivery and their influence on nasal ciliary functioning. *J. Control. Release* **21**, 173-186.
- Schipper, N. M. G., Verhoef, J. C., Miller, J. i Chun, A., 1995. Methylated  $\beta$ -cyclodextrins are able to improve the nasal absorption of slaomon calcitonin. *Calcif. Tissue Int.* **56**, 280-282.
- Seki, T., Sato, N., Hasegawa, T, Kawaguchi, T. i Juni, K., 1994. Nasal absorption of zidovudine and its transport to cerebrospinal fluid in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1135-1137.
- Shao, Z., Krishnamoorthy, R. i Mitra, A. K., 1992. Cyclodextrins as nasal absorption promoters of insulin: Mehanistic evaluations. *Pharm. Res.* **9**, 1157-1163.
- Siepmann, J. i Peppas, N. A., 2001. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl mezhylcellulose (HPMC). *Adv. Drug. Del. Rev.* **48**, 139-157.
- Smart, J. D., 2005. The basic and underlying mechanism of mucoadhesion. *Adv. Drug. Del. Rev.* **57**, 1556-1568.

- Smolnik, R., Molle, M., Fehm, H. L. i Born, J., 1999. Brain potentials and attention after acute and subchronic intranasal administration of ACTH 4-10 and desacetyl-alpha-MSH in humans. *Neuroendocrinology* **70**, 63-72.
- Soane, R. J., Frier M., Perkins, A. C., Johnes, N. S., Davis, S. S. i Illum, L., 1999. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *Int. J. Pharm.* **178**, 55-65.
- Szente, L. i Szejtli, J., 1999. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties and trends in development. *Adv. Drug Del. Rev.* **36**, 17-28.
- Tatavarti, A. S., Mehta, K. A., Augsburger, L. L. i Hoag, S. W., 2004. Influence of methacrylic and acrylic acid polymers on the release performance of weakly basic drugs from sustained release hydrophilic matrices, *J. Pharm. Sci.* **93**, 2319-2331.
- Thorne, R. G., Pronk, G. J., Padmanabhan, V. i Frey, W. H., 2004. Delivery of insulin like growth factor-1 to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*, **127**, 481-496.
- Tobyn, M. J., Johnson, J. R. i Dettmar, P. W., 1996. Factors affecting in vitro gastric mucoadhesion. 2. Physical properties of polymer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **42**, 56-61.
- Tommasini, S., Calabrò, M. L., Raneri, D., Ficarra, P. i Ficarra, R., 2004. Combined effect of pH nad polysorbates with cyclodextrins on solubilization of naringerin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36**, 327-333
- Uekama, K., 2002. Recent aspects of pharmaceutical application of cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* **44**, 3-7.
- Uekama, K., Hirayama, F. i Irie, T., 1998. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem. Rev.* **98**, 2045-2076.
- Ugwoke, M. I., Agu, R. U., Verbeke, N. i Kinget, R., 2005. Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Adv. Drug Del. Rev.* **57**, 1640-1665.
- Van Campen, L. i Venthoye, G., 2002. Inhalation, dry powder. U: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Marcel Dekker, Inc., New York, volumen 2, 1529-1544.
- van den Berg, M., Merkus, P., Romejin, S. G., Verhoef, J.C. i Merkus, F., W., H., M., 2004<sup>a</sup>. Uptake of melatonin into the cerebrospinalfluid after nasal and intravenous delivery: Studies in rats and comparison with a human study. *Pharm. Res.* **21**, 799-802.
- van den Berg, M., Verhoef, J.C., Romejin, S. G. i Merkus, F., W., H., M., 2004<sup>b</sup>. Uptake of estradiol of progesterone into the CSF following intranasal and intravenous delivery in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**, 131-135.
- van der Kuy, P. H. M., Lohman, J. J. H. M., Hooymans, P. M., Ter Berg, J. W.M. i Merkus, F. W. H. M., 1999. Bioavailability of intranasal formulations of dihydroergotamine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **55**, 677-680.

- Villar-López, M. E., Nieto-Reyes, L., Anguiano-Igea, S., Otero-Espinar, F. J. and Blanco-Méndez, J., 1999. Formulation of triamcinolone acetonide pellets suitable for coating and colon targeting. *Int. J. Pharm.* **179**, 229–235.
- Vueba, M. L., Batista De Carvalho, L. A. E., Veiga, F., Sousa, J. J. i Pina, M. E., 2004. Influence of cellulose ether polymers on ketoprofen release from hydrophilic matrix tablets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**, 51-59.
- Wang, Y., Aun, R. i Tse, F. L. S., 1998. Brain uptake of dyhydroergotamine after intravenous and nasal administration in the rat. *Biopharm. Drug Dispos.* **19**, 571-575.
- Westin, U., Piras, E., Jansson, B., Bergstörn, U., Dahlin, M., Brittebo, E. i Björk, E., 2005. Transfer of morphine along the olfactory pathway to the central nervous system after nasal administration to rodents. *Eur. J. Pharm. Sci.* **24**, 565-573.
- Yang, T., Hussain, A., Paulson, J., Abbruscato, T. J. i Ahsan, F. 2004. Cyclodextrins in nasal selivery of low-molecular-weight heparins: In vivo and in vitro studies. *Pharm. Res.* **21**, 1127-1136.
- Yokoi, Y., Yonemochi, Y. i Terada, K., 2005. Effects of sugar esters and hydroxypropyl methylcellulose on the physiochemical stability of amorphous cefditoren piroxil in aqueous suspension. *Int. J. Pharm.* **290**, 91-99.
- Yu, S., Zhao, Y., Wu, F., Zhang, X., Lü, W., Zhang, H. i Zhang Q., 2004. Nasal insulin delivery in the chitosan solution: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* **281**, 11-23.
- Zhou, M i Donovan, M. D., 1996. Intranasal mucociliary clearence of putative bioadhesive polymer gels. *Int. J. Pharm.* **135**, 115-125.

## **8. SAŽETAK**

Ispitano je nastajanje inkluzijskih kompleksa lorazepam i risperidona s hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom (HP- $\beta$ -CD) u otopini i u čvrstom stanju. U otopinama HP- $\beta$ -CD različitih pH-vrijednosti lorazepam i risperidon stvaraju inkluzijske komplekse molarnog odnosa ciklodekstrin lijek 1:1. Nastajanje inkluzijskih kompleksa mijenja topljivost lijekova u vodi. Na stabilnost inkluzijskih kompleksa lorazepam i risperidona u otopini HP- $\beta$ -CD utječe pH-vrijednost medija te prisustvo polimera (HPMC i karbomer). Inkluzijski kompleksi lorazepam i risperidona u čvrstom stanju pripremljeni su metodom sušenja raspršivanjem i karakterizirani su diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom i infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama.

Lorazepam, risperidon i njihovi inkluzijski kompleksi uklopljeni su u mukoadhezivne mikročestice metodom sušenja raspršivanjem. Kao mukoadhezivni polimeri korišteni su HPMC, karbomer i interpolimerni kompleks HPMC i karbomera. Termoanalitička ispitivanja mikročestica upućuju na uklapanje lorazepam i risperidona u mikročestice na što ukazuje djelomični gubitak kristaliničnih svojstava lijekova. Termalna svojstva mikročestica upućuju na interakciju risperidona s karbomerom i interpolimernim kompleksom.

Zeta potencijal mikročestica određen je mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica u električnom polju fotonkorelacijskom spektroskopijom. Vrijednosti zeta potencijala mikročestica pokazuju da je polimer dominantna komponenta na površini mikročestica te upućuju na elektrostatsku prirodu interakcije risperidona s karbomerom. HP- $\beta$ -CD ne utječe na vrijednosti zeta potencijala mikročestica.

Mukoadhezivnost mikročestica ispitana je *in situ* metodom određivanja rada adhezije. Zbog umrežene strukture karbomera, mikročestice oblikovane s karbomerom i interpolimernim kompleksom pokazuju izraženiju mukoadhezivnost u odnosu na mikročestice oblikovane s HPMC, polimerom linearne strukture. Uklapanje lorazepam i risperidona u mikročestice mijenja njihovu mukoadhezivnost. Utjecaj HP- $\beta$ -CD na mukoadhezivnost mikročestica je zanemariv.

*In vitro* oslobađanje lorazepam i risperidona iz mikročestica ograničeno je topljivošću lijekova. Mehanizam oslobađanja lorazepam i risperidona iz mikročestica uključuje difuziju lijeka kroz izdubreni polimerni matriks te eroziju matriksa. Difuzija lijeka kroz izdubreni polimerni matriks je dominantni mehanizam

oslobađanja lorazepamima iz mikročestica oblikovanih s karbomerom i interpolimernim kompleksom, što je posljedica umrežene strukture polimera. HPMC je polimer linearne strukture te je erozija polimernog matriksa dominantan mehanizam oslobađanja lorazepamima i risperidona iz mikročestica oblikovanih s ovim polimerom. HP- $\beta$ -CD utječe na difuziju lorazepamima u izdubrenom polimernom matriksu. Brzo otapanje inkluzijskog kompleksa doprinosi eroziji polimernog matriksa. Zbog toga je oslobađanje lorazepamima iz mikročestica oblikovanih s HP- $\beta$ -CD brže. Istim mehanizmom može se objasniti utjecaj HP- $\beta$ -CD na oslobađanje risperidona iz mikročestica HPMC. Interakcija risperidona i karbomera ključna je pri oslobađanju lijeka iz mikročestica oblikovanih s karbomerom i interpolimernim kompleksom. Stoga je utjecaj HP- $\beta$ -CD na oslobađanje risperidona iz mikročestica slabije izražen.

*In vitro* difuzija lijekova kroz polupropusnu membranu ispitana je korištenjem standardne Franz-difuzijske ćelije pri čemu su se pokušali oponašati uvjeti koji odgovaraju apsorpciji lijeka na nazalnoj sluznici. Stvaranje inkluzijskih kompleksa utječe na *in vitro* difuzibilnost lorazepamima i risperidona. Mehanizam djelovanja HP- $\beta$ -CD kao promotora difuzije lijekova tumači se visokom topljivosti inkluzijskih kompleksa te utjecajem ciklodekstrina na transport lijekova. HP- $\beta$ -CD djeluje kao nosač lipofilnih lijekova kroz hidrodinamski sloj do površine polupropusne membrane stvarajući visoki koncentracijski gradijent lorazepamima i risperidona raspoloživih za difuziju. HP- $\beta$ -CD u mikročesticama lorazepamima i risperidona mijenja vrijednosti kinetičkih parametara difuzije lijekova. Stvaranje inkluzijskih kompleksa utječe na brzinu oslobađanja lijekova iz mikročestica, a uslijed toga rastu koncentracije lorazepamima i risperidona raspoložive za difuziju. Ove karakteristike mukoadhezivnih mikročestica pružaju potencijal za nazalnu primjenu ispitivanih lijekova i njihov transport u CST i/ili tkivo mozga. Ciklodekstrini i ispitivani polimeri u mikročesticama lorazepamima i risperidona mogli bi oblikovati terapijski sustav prikladan za nazalnu primjenu lijekova s učinkom na središnji živčani sustav.



## **9. SUMMARY**

The inclusion complex formation of lorazepam and risperidone with HP- $\beta$ -CD in solution and in solid state was investigated. In solutions of different pH values risperidone and lorazepam formed inclusion complexes with HP- $\beta$ -CD. The inclusion complex formation significantly increased risperidone and lorazepam solubility. Media pH value and presence of the polymers (HPMC and carbomer) influenced the stability of inclusion complexes. Inclusion complexes of risperidone and lorazepam in solid state were prepared by spray drying and characterised by differential scanning calorimetry (DSC) and FTIR spectroscopy.

Lorazepam, risperidone and their inclusion complexes were incorporated in mucoadhesive microparticles by spray drying. HPMC, carbomer and interpolymer complex of HPMC and carbomer were used as mucoadhesive components. High drug entrapment in microparticles of 3.0  $\mu\text{m}$  diameter was obtained. Thermal properties of the microparticles showed that lorazepam and risperidone incorporation into polymer matrices affected crystalline properties of the drugs and suggested the interaction of risperidone with carbomer.

The zeta-potential values of microparticles were determined by photon-correlation spectroscopy. The results suggested electrostatic nature of risperidone and carbomer interaction. Polymer is the dominant component on the microparticles surface, what could also be deduced from the zeta-potential measurement.

Mucoadhesion of the microparticles was investigated by *in situ* method based on adhesion work measurement. Due to cross-linked structure of the polymers, mucoadhesion of microparticles formulated with carbomer and interpolymer complex was more pronounced compared to the mucoadhesion of HPMC microparticles. Incorporation of the drugs into polymeric matrices affected the mucoadhesion. The influence of HP- $\beta$ -CD on the mucoadhesion of microparticles was negligible.

*In vitro* drug release from microparticles was limited by low water solubility of lorazepam and risperidone. The drug release mechanism included the drug diffusion through hydrated polymer matrix and matrix erosion. Due to cross-linked polymer structure, the drug diffusion across the swollen polymer matrix was major release mechanism of lorazepam from the microparticles formulated with carbomer and interpolymer complex. The linear structure of HPMC contributed to the matrix erosion. Therefore erosion was the major release mechanism of lorazepam from the microparticles formulated with HPMC. HP- $\beta$ -CD affected the lorazepam release rate

by increasing the drug solubility in the swollen polymer matrix of the microparticles. HP- $\beta$ -CD also promoted the matrix erosion and therefore contributed to the drug release. The same mechanism controlled the risperidone release from HPMC microparticles containing HP- $\beta$ -CD. The drug-carbomer interaction limited the release of risperidone from the microparticles formulated with carbomer and interpolymer complex. Therefore, the influence of HP- $\beta$ -CD on drug release from this microparticles was less pronounced.

The *in vitro* diffusion studies were performed using standard Franz-diffusion cell. Thereby nasal absorption of the drugs was simulated. Inclusion complex formation affected lorazepam and risperidone diffusibility by increasing the drug solubility. HP- $\beta$ -CD acted as a carrier of the lipophilic drugs across the hydrodynamic layer on the membrane surface and increased the drug concentration gradient over the membrane. HP- $\beta$ -CD in microparticles changed the values of *in vitro* drug diffusion. Inclusion complex formation affected the drug release rate from the microparticles and therefore higher concentrations of lorazepam and risperidone were available for the diffusion. Above-mentioned characteristics of the mucoadhesive microparticles offer the potential for nasal application of lorazepam and risperidone and their transport to the cerebrospinal fluid and the brain. Cyclodextrins and investigated polymers in lorazepam and risperidone microparticles could formulate suitable drug delivery system for nasal application of psychoactive drugs.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## Mario Jug

<b>Datum i mjesto rođenja</b>	9. lipnja 1976. godine; Zagreb, Hrvatska	
<b>Nacionalnost:</b>	Hrvat	
<b>Državljanstvo:</b>	hrvatsko	
<b>Zaposlenje:</b>	Zavod za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu	
<b>Školovanje:</b>	1995-1999	Studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
	2000-2003	Poslijediplomski studij "Farmaceutske znanosti" na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
	2003	Magistar znanosti u znanstvenom području biomedicine i zdravstva, polje farmacija.
<b>Radno iskustvo:</b>	2000-2003	Mlađi asistent na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
	2003-	Asistent na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
<b>Suradnik na znanstvenim projektima</b>	2002-	“Terapijski sustavi s nosačima biološki aktivne supstancije” (projekt pri Ministarstvu znanosti i tehnologije RH, 0006561)
<b>Znanstveni interes</b>	Oblikovanje terapijskih sustava s inkluzijskim kompleksom ciklodekstrin-lijek u svrhu postizanja kontroliranog oslobađanja lijeka, s ciljem poboljšanja bioraspoloživosti lijeka, smanjenja učestalost doziranja, čime lijek postaje prihvatljiviji za pacijenta	
<b>Usavršavanje:</b>	svibanj 2006	Zavod za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutskog fakulteta Sveučilišta u Szegedu, Republika Mađarska u okviru projekta CEEPUS CII-45-01-0506. Tema studijskog boravka je primjena termoanalitičkih metoda (DSC, TG) u istraživanju inkluzijskih kompleksa ciklodekstrin-lijek (suradnja s Dr. sc. Zoltanom Aignerom).
<b>Kongresi</b>	2 međunarodna kongresa 2 domaća kongresa	
<b>Objavljeni radovi:</b>	6 znanstvenih radova (3 CC) 3 stručna rada	

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

### CIKLODEKSTRINI U MUKOADHEZIVNIM MIKROČESTICAMA LORAZEPAMA I RISPERIDONA

*Mario Jug*  
*Zavod za farmaceutsku tehnologiju,*  
*Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

Ispitano je nastajanje inkluzijskih kompleksa lorazepama i risperidona s hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom (HP- $\beta$ -CD) u otopini i u čvrstom stanju. U otopinama HP- $\beta$ -CD različitih pH-vrijednosti lorazepam i risperidon stvaraju inkluzijske komplekse molarnog odnosa ciklodekstrin lijek 1:1. Nastajanje inkluzijskih kompleksa mijenja topljivost lijekova u vodi. Na stabilnost inkluzijskih kompleksa lorazepama i risperidona u otopini HP- $\beta$ -CD utječe pH-vrijednost medija te prisustvo polimera (hidroksipropilmetilceluloza (HPMC) i karbomer). Inkluzijski kompleksi lorazepama i risperidona u čvrstom stanju pripremljeni su metodom sušenja raspršivanjem i karakterizirani su diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom i infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama.

Lorazepam, risperidon i njihovi inkluzijski kompleksi uklopljeni su u mukoadhezivne mikročestice metodom sušenja raspršivanjem. Kao mukoadhezivni polimeri korišteni su HPMC, karbomer i interpolimerni kompleks HPMC i karbomera. Oblikovane mikročestice karakterizirane su s obzirom na uklapanje djelatne tvari, raspodjelu veličina čestica, vrijednost zeta-potencijala te termoanalitičkom metodom (DSC). Mukoadhezivnost mikročestica ispitana je *in situ* metodom određivanja rada adhezije. Utvrđeno je da na mukoadhezivnost mikročestica utječe kemijska struktura polimera te prisustvo lijeka, dok je utjecaj HP- $\beta$ -CD zanemariv.

*In vitro* oslobađanje lorazepama i risperidona iz mikročestica ograničeno je topljivošću lijekova. Mehanizam oslobađanja lorazepama i risperidona iz mikročestica uključuje difuziju lijeka kroz izdubreni polimerni matriks te eroziju matriksa. HP- $\beta$ -CD utječe na difuziju lorazepama u izdubrenom polimernom matriksu. Brzo otapanje inkluzijskog kompleksa doprinosi eroziji polimernog matriksa. Zbog toga je oslobađanje lorazepama iz mikročestica oblikovanih s HP- $\beta$ -CD brže. Istim mehanizmom može se objasniti utjecaj HP- $\beta$ -CD na oslobađanje risperidona iz mikročestica HPMC. Interakcija risperidona i karbomera ključna je pri oslobađanju lijeka iz mikročestica oblikovanih s karbomerom i interpolimernim kompleksom. Stoga je utjecaj HP- $\beta$ -CD na oslobađanje risperidona iz mikročestica slabije izražen.

Stvaranje inkluzijskih kompleksa utječe na *in vitro* difuzibilnost lorazepama i risperidona. Mehanizam djelovanja HP- $\beta$ -CD kao promotora difuzije lijekova tumači se visokom topljivosti inkluzijskih kompleksa te utjecajem ciklodekstrina na transport lijekova kroz hidrodinamski sloj na površini polupropusne membrane. Stvaranje inkluzijskih kompleksa utječe na brzinu oslobađanja lijekova iz mikročestica, a uslijed toga rastu koncentracije lorazepama i risperidona raspoložive za difuziju. Ove karakteristike mukoadhezivnih mikročestica pružaju potencijal za nazalnu primjenu ispitivanih lijekova i njihov transport u CST i/ili tkivo mozga. Ciklodekstrini i ispitivani polimeri u mikročesticama lorazepama i risperidona mogli bi oblikovati terapijski sustav prikladan za nazalnu primjenu lijekova s učinkom na središnji živčani sustav.

(148 stranica, 15 tablica, 32 slike, 3 sheme, 139 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u biblioteci Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, A. Kovačića 1, Zagreb.

Ključne riječi: lorazepam, risperidon, inkluzijski kompleksi, hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin, hidroksipropilmetilceluloza, karbomer, izravan transport lijeka iz nosne šupljine u mozak, mukoadhezivnost

Mentor: Dr. sc. Mira Bećirević-Laćan, red. prof. FBF-a

Ocjenjivači: Dr. sc. Jelena Filipović-Grčić, izv.prof. FBF-a  
Dr. sc. Mira Bećirević-Laćan, red. prof. FBF-a  
Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek, znan. sur.

Rad prihvaćen dne: 29 studenog 2006.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dissertation

### CYCLODEXTRINS IN MUCOADHESIVE MICROPARTICLES CONTAINING LORAZEPAM AND RISPERIDONE

*Mario Jug*

*Department of Pharmaceutics*

*Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia*

The inclusion complex formation of lorazepam and risperidone with HP- $\beta$ -CD in solution and in solid state was investigated. In solutions of different pH values risperidone and lorazepam formed inclusion complexes with HP- $\beta$ -CD. The inclusion complex formation significantly increased risperidone and lorazepam solubility. Media pH value and presence of the polymers (hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) and carbomer) influenced the stability of inclusion complexes. Inclusion complexes of risperidone and lorazepam in solid state were prepared by spray drying and characterised by differential scanning calorimetry (DSC) and FTIR spectroscopy.

Lorazepam, risperidone and their inclusion complexes were incorporated in the mucoadhesive microparticles by spray drying. HPMC, carbomer and interpolymer complex of HPMC and carbomer were used as mucoadhesive components. Prepared microparticles were characterised by determination of drug content, particle size distribution, zeta potential measurement and DSC measurement. Mucoadhesion of the microparticles was investigated by *in situ* method based on adhesion work measurement. Chemical structure of the polymers and drug entrapment affected the mucoadhesion of the microparticles, while HP- $\beta$ -CD effect was negligible.

*In vitro* drug release from microparticles was limited by low water solubility of lorazepam and risperidone. The drug release mechanism included the drug diffusion through hydrated polymer matrix and matrix erosion. HP- $\beta$ -CD affected the lorazepam release rate by increasing the drug solubility in swollen polymer matrix of the microparticles. HP- $\beta$ -CD also promoted the matrix erosion and therefore contributed to the drug release. The same mechanism controlled the risperidone release from HPMC microparticles containing HP- $\beta$ -CD. The drug-carbomer interaction limited the release of risperidone from the microparticles formulated with carbomer and interpolymer complex. Therefore, the influence of HP- $\beta$ -CD on drug release from this microparticles was less pronounced.

The *in vitro* diffusion studies were performed using standard Franz-diffusion cell. Thereby nasal absorption of the drugs was simulated. Inclusion complex formation affected lorazepam and risperidone diffusibility by increasing the drug solubility. HP- $\beta$ -CD acted as a carrier of the lipophilic drugs across the hydrodynamic layer on the membrane surface and increased the drug concentration gradient over the membrane. HP- $\beta$ -CD in microparticles changed the values of *in vitro* drug diffusion. Inclusion complex formation affected the drug release rate from the microparticles and therefore higher concentrations of lorazepam and risperidone were available for the diffusion. Above-mentioned characteristics of the mucoadhesive microparticles offer the potential for nasal application of lorazepam and risperidone and their transport to the cerebrospinal fluid and the brain. Cyclodextrins and investigated polymers in lorazepam and risperidone microparticles could formulate suitable drug delivery system for nasal application of psychoactive drugs.

(148 pages, 15 tables, 32 pictures, 3 schemes, 139 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovačića 1, Zagreb, Croatia.

Key Words: lorazepam, risperidone, inclusion complexes, hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, hydroxypropylmethyl cellulose, carbomer, nose to brain delivery, mucoadhesion

Supervisor: Prof. Dr. Mira Bećirević-Laćan

Reviewers: Prof. Dr. Jelena Filipović-Grčić  
Prof. Dr. Mira Bećirević-Laćan  
Dr. Biserka Cetina-Čizmek

Thesis accepted: November 29, 2006