

Mukoadhezivne nanočestice cefiksima

Bajo, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:574614>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**



Repository / Repozitorij:

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



Ana Bajo

Mukoadhezivne nanočestice cefiksima

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Maria Juga prijavljen je na kolegiju Oblikovanje lijekova u svrhu stjecanja zvanja magistre farmacije.

Želim se zahvaliti prof dr. sc. Mariu Jugu koji mi je omogućio da pod njegovim mentorstvom izradim diplomski rad. Zahvalna sam što mi je pomogao s upoznavanjem problematike područja njegovog istraživanja kao i na svoj pruženoj pomoći, vodstvu i strpljenju tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada te na prijedlozima i savjetima prilikom pisanja rada.

Zahvaljujem se i Zavodu za farmaceutsku tehnologiju što mi je omogućio izvođenje eksperimentalnog dijela rada te svim njegovim djelatnicima na dobrom raspoloženju i prijateljskoj okolini.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima i kolegama koji su mi vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali svojim prisustvom, posebno kolegici Mariji Bardić.

Posebnu zahvalnost iskazujem cijeloj svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i odricanju. Veliko hvala mojoj sestri Mariji na divnim studentskim i cimerskim danima te na bezrezervnoj podršci u svemu.

I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem svojim roditeljima, Niki i Zdravki, koji su mi sve ovo i omogućili te im ujedno i posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Gantrez.....	1
1.1.1. Kemijska struktura i svojstva.....	1
1.1.2. Primjena polimera u kozmetici i terapijskim sustavima.....	3
1.1.3. Sigurnost primjene.....	13
1.2. Primjena lijeka na sluznice.....	14
1.2.1. Bukalna sluznica.....	18
1.2.2. Vaginalna slunica.....	19
1.3. Mukoadhezivne nanočestice.....	22
1.4. Cefiksim.....	26
1.4.1. Kemizam.....	26
1.4.2. Mehanizam djelovanja.....	29
1.4.3. Spektar djelovanja.....	30
2.OBRAZLOŽENJE TEME	31
3. MATERIJALI I METODE	32
3.1. Materijali.....	32
3.2. Metode.....	33
3.2.1. Priprema nanočestica.....	33
3.2.2. Određivanje veličine nanočestica.....	34
3.2.3. Određivanje zeta potencijala nanočestica.....	35
3.2.4. Određivanje sadržaja cefiksima.....	37

3.2.5. Ispitivanje uklapanja cefiksima u nanočestice.....	38
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	39
4.1. Izrada baždarnog dijagrama.....	39
4.2. Fizikalne karakteristike nanočestica.....	43
4.3. Utjecaj dodatka različitih volumena vode preparaciji nanočestica.....	44
4.4. Utjecaj postupka liofilizacije na fizikalna svojstva nanočestica.....	46
5. ZAKLJUČCI.....	51
6. LITERATURA.....	52
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	62
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

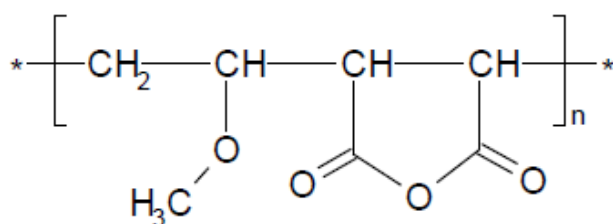
1. UVOD

1.1. Gantrez

1.1.1. Kemijska struktura i svojstva

Gantrez AN su linearni kopolimeri koji se sastoje od naizmjeničnih jedinica metil vinil etera (MVE) i anhidrida maleinske kiseline (MA). Gantrez AN kopolimeri su sipki bijeli prašci netopljivi u vodi, ali se lako dispergiraju u vodi pri čemu će hidrolizirati u njihov u vodi topljivi oblik slobodne dikiseline (Gantrez S kopolimeri). Topljivi su u organskim otapalima kao što su alkoholi, aldehidi, ketoni, laktami i niži alifatski esteri. Netopljivi su u alifatskim, aromatskim i halogeniranim otapalima. Reagirat će s alkoholom, epoksidima, amonijakom, aminima i drugim spojevima koji imaju funkcionalne skupine tipične za reakciju s karboksilnim kiselinama (www.ashland.com).

Iako anhidridni (AN) prašci nisu izravno upotrebljivi u pripravcima za oralnu njegu, koriste se kao osnovni polimeri za dobivanje polimernih soli koje se koriste kao bioadhezivi u zubnim protezama. Kada se Gantrez AN dispergira u vodi, anhidridni postranični lanac hidrolizira i nastaju slobodne dikiseline (Gantrez S). Gantrez S kopolimeri (topljivi u vodi) mogu se koristiti direktno u proizvodima za oralnu higijenu kao nosači aktivnih supstanci i za zadržavanje aktivne supstancije na sluznici. Gantrez MS-955 polimer se sastoji od natrijeve i kalcijeve soli metil vinil etera i kopolimera anhidrida maleinske kiseline, slabo je topljiv u vodi (www.stobec.com).



Gantrez™ AN

Zbog svoje jedinstvene kemijske strukture i reaktivnosti, Gantrez kopolimeri dobro funkcioniraju kao: raspršivači fluorescentnog fosfora, mikrokapsule klastera u papiru bez ugljika i lateks sustavima, kompleks koacerevata sa želatinom u oblikovanju omotača mikrokapsula u papiru bez ugljika, inhibitori kalcifikacije u detergentima za pranje rublja i

obradu tekstila, stabilizatori tekućih detergenata za pranje, derivati imida za antirefleksirajuće slojeve na silicijskim pločama prije premazivanja fotolakom i izloženosti svjetlosti, bioadhezivi u vlažnom okruženju, nosači aktivne tvari na sluznice (www.ashland.com).

Property	AN-119	AN-139	AN-149	AN-169
Color (APHA, 2.5 g in 100 ml acetone)	400 max.	150 max.	200 max.	100 max.
Specific Viscosity (1% in MEK @ 25°C) ^a	0.1 - 0.5	1.0 - 1.5	1.5 - 2.5	2.5 - 3.5
% Water	0.75 max.	0.75 max.	0.75 max.	0.75 max.
% Benzene	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
% Active	98 min.	98 min.	98 min.	98 min.
Absolute \bar{M}_w ^b	216,000	1,080,000	1,250,000	1,980,000
Polydispersity (\bar{M}_n/\bar{M}_w)	2.71	3.47	2.58	2.06
Tg (°C)	152	151	153	154
Refractive Index @ 25°C - 5% Solids, $\lambda=598$ nm	1.3417	1.3408	1.3409	1.3411
Specific Gravity @ 25°C - 5% Solids	1.018	1.016	1.017	1.017
Bulk Density (lbs./cu. ft.)	21.2	20.9	21.8	20.0
Brookfield Viscosity, cps ^c 5 % / 10% solids	15/35	40/145	45/360	85/1400
Acid Number (mg KOH / g sample)	695	696	695	695

^a Cannon Fenske, Tube Size 100

^b SEC / LALLS

^c RVT, Spindle 3, 20 rpm, 22-23°C

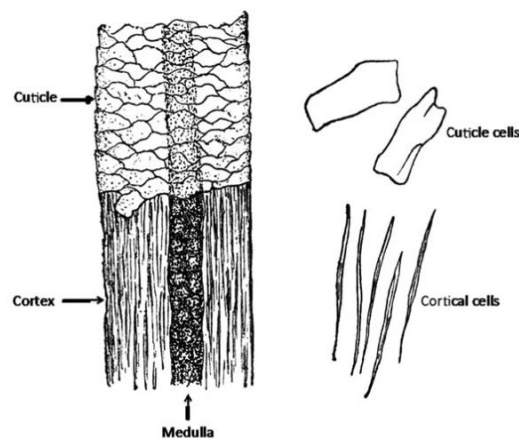
Slika 1: Svojstva pojedinih oblika Gantrez AN polimera (preuzeto iz: www.ashland.com)

Polimerne nanočestice trenutno se istražuju kao napredni sustavi za dostavu lijeka. Ti sustavi imaju niz prednosti u odnosu na dosadašnje tradicionalne oblike dostave lijeka kao što je ciljano djelovanje te posljedično smanjenje nuspojava lijekova (Beck i sur., 2006). Sudbina nanočestica u organizmu ovisi o njihovim fizičkim karakteristikama kao što su veličina, polidisperznost, zeta potencijal i karakteristike površine nanočestica (Prabu i sur., 2008; Shahani i sur., 2007). Da bi se postigla dugotrajna cirkulacija lijeka u organizmu, ciljano djelovanje ili bioadhezija koriste se površinski modificirane polimerne nanočestice. Materijal koji se koristi za pripremu nanočestica mora moći kontrolirati otpuštanje lijeka i imati funkcionalne skupine pogodne za modifikacije površine nanočestica (Irache i sur., 2005). Gantrez AN, kopolimer metil vinil etera i anhidrida maleinske kiseline (PVM/MA), kao biokompatibilan materijal pogodan je za pripremu nanočestica s gore navedenim karakteristikama, posebno bioadhezivnih nanočestica (Arbós i sur., 2002a; Arbós i sur., 2002b). Razvoj bioadhezivnih oblika dostave lijekova trenutno je u interesu i konvencionalne terapije i novih terapijskih sustava (Popovici i sur. 2008).

1.1.2. Primjena polimera u kozmetici i terapijskim sustavima

Maleinska kiselina i njezini derivati koriste se u različitim područjima osobne higijene, osnovni su sastojci u brojnim formulacijama za njegu kose, kože te u pripravcima za oralnu higijenu. U pripravcima za njegu kose, kopolimeri koji sadrže anhidride maleinske kiseline koriste se uglavnom u pripravcima za učvršćivanje i stiliziranje kose. Djeluju tako da stvaraju film, kompatibilan s različitim sustavima otapala, koji formira kompleks polimer-dlaka otporan na visoku vlažnost i mehaničke utjecaje. U njezi kože, anhidridi maleinske kiseline važni su za stvaranje kopolimera s metil vinil eterom koji se koristi u transdermalnim sustavima kao bioadheziv. Novija primjena anhidrida maleinske kiseline je u dopremi aktivnih sastojaka kozmetičkih pripravaka, primjerice u antiperspiransima. Djeluju i kao reološki modifikatori u gotovim formulacijama za njegu kože dajući poželjnu teksturu i osjećaj na koži. U oralnoj higijeni, poli (metil vinil eter anhidrida maleinske kiseline) djeluje kao bioadheziv u pastama za zube, stvara film i djeluje kao nosač aktivnih sastojaka (Hood i Musa, 2016).

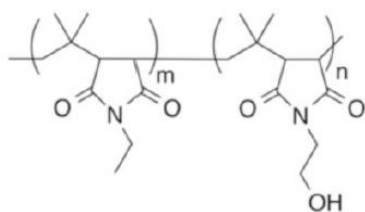
Primjena kopolimera anhidrida maleinske kiseline u preparatima za njegu kose



Slika 2: Dlaka je građena od unutarnje jezgre (cortex), koja se sastoji od vretenastih kortikalnih stanica (5 μ m promjer i 50 μ m duljina), okružena je kutikulom u kojoj su stanice raspoređene kao ljuske. U središtu korteksa nalazi se medula (srž). U kortikalnim stanicama prisutan je α keratin, udruživanjem lanaca α keratina nastaje intermedijarni filament (mikrofibril). Kristalni oblik intermedijarnih filamenata (stotine njih) su ugrađeni u pseudoheksagonalna polja unutar proteinskog matriksa bogatog cisteinom i tvore keratinske makrofibrile. Kristalni oblik inermedijarnih filamenata važan je za čvrstoću vlakana, jednako tako cisteinom bogate amorfne faze utječu na mehanička svojstva vlakana. Kutikularna stanica sastoji se od vanjskog β sloja, epikutikule, A sloja, egzokutikule, endokutikule, unutarnjeg sloja i unutarnjeg β sloja. Unutarnji i vanjski β sloj su dio kompleksa stanične membrane. Kompleks stanične membrane sadrži delta sloj koji služi kao međustanični cement koji pridružuje unutarnji β sloj

jedne kutikularne stanice vanjskom β sloju druge (stanica ispod). Smatra se da su A sloj, egzokutikula i unutarnji sloj bogati proteinima i disulfidnim vezama, dok je endokutikula siromašna cisteinom (Swift, 2012). Ljudska dlaka uglavnom sadrži deset slojeva kutikularnih stanica u korijenu, no taj se broj smanjuje od korijena pa nadalje. Zdrava kosa ima hidrofobnu površinu s obzirom na sastav vanjskog β sloja i lipida koji nemaju strukturnu ulogu, ali podmazuju kosu. Oštećena kosa ima potpuno različita svojstva površine (hidrofilna) (preuzeto iz: Hood i Musa, 2016).

Derivati maleinske kiseline primjenjuju se u pripravcima za njegu kose kao što su sprejevi, gelovi i pjene za kosu. Sprejevi za kosu dolaze u obliku aerosola i pumpe. Aerosoli su suspenzije finih čestica (tekućih, krutih) koje se stvaraju kada se ukapljeni potisni plin ispušta iz spremnika pod tlakom. Konverzijom potisnog ukapljenog plina u plinovito stanje pri atmosferskom tlaku dolazi do raspršivanja tekućeg nosača u fini aerosol. Aerosolski sprejevi za kosu kao pogonske plinove sadrže uglavnom ugljikovodike ili dimetil eter, kao otapalo se koristi alkohol. Aerosoli se sastoje još i od polimerne smole i lužine koja će neutralizirati tu smolu (ako sadrži kisele skupine), plastifikatora, surfaktanta i mirisa (Robbins, 2012). Polimerna smola je sastojak koji je odgovoran za vezanje, odnosno sljepljivanje dlaka; lužina, najčešće 2-amino-2-metil-1-propanol, prilagođava topljivost polimera te time omogućava lakše uklanjanje s kose; plastifikator mijenja mehanička svojstva filma (tvrdoća, fleksibilnost) do željene razine; surfaktant mijenja površinsku napetost čineći tako polimer više ili manje raspršivim na površinu kose. Sprejevi za kosu koji sadrže pumpu ne zahtijevaju pogonski plin, nego imaju mehanizam koji sadrži raspršivač koji proizvodi fine kapljice pomoću mehaničke sile. Prvi korišteni kopolimeri maleinske kiseline u sprejevima za kosu bili su kopolimeri metil vinil etera i maleinske kiseline, esterifikacijom jedne kisele skupine maleinske kiseline dobiveni su etilni i butilni ester. Postavljanje strogih zahtjeva za korištenje hlapljivih organskih spojeva zbog njihove ekološke neprihvatljivosti dovelo je do razvoja novih polimera koji su kompatibilni u novim sustavima (polimeri manje molekulske mase, bolje topljivi u vodi). Najbolji primjer polimera u ovoj skupini je poli (izobutilen-etilmaleimid-hidroksietilmaleimid) koji se koristi u sprejevima sa niskim udjelom hlapljivih organskih spojeva (Hood i Musa, 2016).



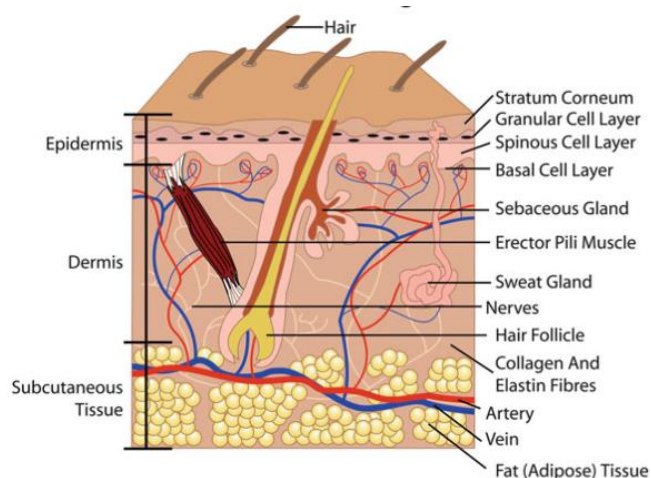
Molekularna struktura poli (izobutilen-etilmaleimid-hidroksietilmaleimid)

Glavni sastojci gelova za kosu su vodotopljivi polimeri sa sposobnošću geliranja, najčešće derivati poli akrilne kiseline (Carbopoli) koji se koriste u sprezi s poli (vinil pirolidonom) te poli (vinil pirolidon-vinil acetatom). Pjene za kosu su dostupne u obliku aerosola i ne-aerosolskih formulacija. Tipični sastojci aerosolskih pjena su otapalo (voda), pogonski plin (1,1-difluoretan i smjesa propana i izobutana), surfaktant (stabilizacija pjene) i polimerna smola. Kao i kod sprejeva za kosu, postoje ograničenja na postotak hlapljivih organskih spojeva u gelovima i pjenama za kosu. Polimeri dizajnirani za gelove i pjene za kosu su veće molekulske mase od polimera koji se koriste u sprejevima za kosu. Obično sadrže kationske i pseudo-kationske polimere. Umrežena poli akrilna kiselina (karbomer) je anionski zgušnjivač koji formira bistre gelove, koristi se kao zgušnjivač monoestera poli (izobutilen-dimetilaminopropil maleimid-etoksilat maleimid-maleinske kiseline) u gelovima za kosu. Vodotopljivi gelovi koji sadrže hidrolizirani poli(vinil eter-anhidrid maleinske kiseline) mogu se dobiti u kombinacijama s mnogim bazama, kao što su mineralne baze, alifatski amini, amino alkoholi ili trietanolamin. Neutralizacijom ovih skupina nastaju gelovi koji iritiraju kožu, da bi se to izbjeglo u formulacije se dodaju aminokiseline koje služe kao neutralizirajući agensi, aminokiseline koje sadrže amino skupine u postraničnom lancu (prolin, arginin) (Hood i Musa, 2016). Učestalo uređivanje (češljanje, četkanje) kose izložene kemijskim tretmanima (izbjeljivanje), UV zračenju i termalnoj obradi dovodi do mehaničkih oštećenja zaštitnog sloja kutikularnih stanica dlake, koji mogu dovesti do njihove erozije i nastanka podijeljenih vrhova. Postoji nekoliko različitih oblika karakteriziranih stupnjem cijepanja. Kosa nosi negativni naboj, koji se povećava nastankom podijeljenih vrhova. Oštećena kosa se inače tretira kationskim surfaktantima ili polimerima koji djeluju kao lubrikanti prilikom češljanja ili četkanja. Elektrostatske interakcije između dlake i kationskog agensa su dovoljno jake da izdrže kontinuirana ispiranja vodom, no mogu se isprati natrijevim dodecil sulfatom ili nekim drugim anionskim surfaktantom. U slučaju podijeljenog vrha dlake, tretman sa kationskim surfaktantom ili polimerom će poboljšati stanje dlake, ali neće riješiti podijeljeni kraj. Novi pristup liječenju je pomoću polielektrolitnog kompleksa. Polielektrolitni kompleks

nastaje kombinacijom dva suprotno nabijena polimera, polikationa i polianiona u vodenoj otopini pri odgovarajućem pH pri čemu nastaje kompleks koji daje sinergistički učinak oba polimera koji nije pokazan kod polimera pojedinačno. Studije su pokazale upotrebu neutraliziranog poli(metil vinil etera maleinske kiseline) u kombinaciji s kationskim poli(vinil pirolidon-metakrilamido propil trimetilamonij klorid) u tretiranju podijeljenih vrhova (Rigoletto i Zhou, 2010; Rigoletto i sur., 2007). Formiranje polielektrolitnog kompleksa vidljivo je na optičkom mikroskopu, Malvern analizi veličine čestica i viskozimetriji. Kada se pomiješaju ovi polimeri čine jedinstvenu mikrogel strukturu (Hood i Musa, 2016).

Toplinska zaštitna sredstva u njezi kose na bazi polimera djeluju tako da se trajno vežu na vlakna unakrsnim povezivanjem pri visokim temperaturama ili formiranjem polimernog toplinskog seta u kojem polimer reagira sam sa sobom nakon ponovljenog tretmana formirajući tako izdržljiv oblog na vlaknima. Studije su pokazale da poli(metil vinil eter maleinske kiseline) štiti keratin (praćeno mjerenjem sadržaja triptofana) u većoj mjeri od ostalih polimera i trajno ostaje na površini kose (McMullen i Jachowicz, 2001). U nedostatku spektroskopijskih podataka pretpostavlja se da polimer reagira sa amino skupinama na površini vlakana dlake. Druga sveobuhvatna studija dokazala je upotrebu polielektrolitnog kompleksa u prevenciji oštećenja kose prilikom termičkog tretmana temperaturama do 200°C. Polielektrolitni kompleks se sastoji od anionskog poli(metil vinil eter maleinske kiseline) i kationskog poli(vinil pirolidon-metakrilamido propil trimetilamonij klorid). Istraživači su pokazali djelotvornost polielektrolitnog kompleksa pomoću FTIR, DSC, DVS, AFM i SEM. Presjeci kose analizirani su FTIR spektroskopijom za praćenje količine α i β keratina. DSC mjerenje se koristi za praćenje zdravstvenog stanja kose donoseći informacije o kristalnoj fazi α keratina i amorfne matriksa koji okružuje keratin intermedijarnih vlakana. DVS daje informacije o vodi i njenom zadržavanju, termički oštećena kosa ima smanjenu razinu i zadržavanje vode. Predobrada kose s polielektrolitnim kompleksom prije toplinske obrade dovodi do poboljšanja oba parametra. Tehnologija temeljena na anhidridu maleinske kiseline razvijena je kao rješenje za zaštitu kose od toplinskih utjecaja. Primarna aplikacija djeluje na neposlušnu kosu s poli(metil vinil eter-maleinskom kiselinom) i poli(izobutilen-dimetilaminopropilmaleimid-etoksilat maleimid-maleinska kiselina) u kombinaciji s primjenom kod visoke temperature, pokazuje niz prednosti kao što su „de-frizzing“, poboljšanje sjaja i bolje usklađivanje vlakana koje može izdržati i do pet ciklusa pranja bez reaplikacije (Hood i Musa, 2016).

Primjena kopolimera anhidrida maleinske kiseline u formulacijama za njegu kože i transdermalnu dopremu



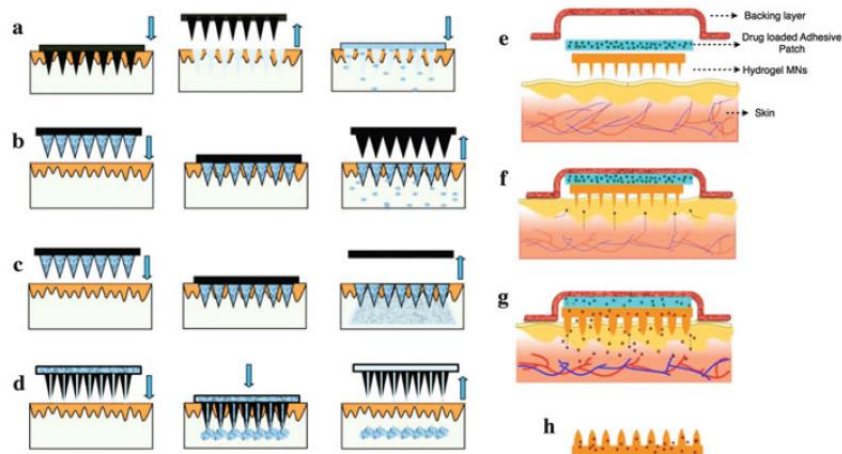
Slika 3: Morfološka struktura ljudske kože: koža se sastoji od tri osnovna dijela: epidermisa, dermisa te hipodermisa (subkutani sloj). Epidermis je avaskularni slojeviti epitel koji se sastoji od četiri osnovna tipa stanica: keratinocita (proizvode keratin i intercelularne lipide), melanocita (proizvode melanin), Langerhansovih stanica (makrofagi) i Merkelovih stanica (osjetni mehanoreceptori). Slojevi epidermisa su Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum i Stratum corneum. Proces keratinizacije započinje u Stratum basale gdje se stanice keratinocita dijele, putujući prema Stratum corneum jezgra stanice se povećava, tijelo postaje plosnatije te ispod Stratuma corneuma dolazi do raspadanja jezgre, gubitka organela te otpuštanja granula s lipidima koje tvore međustanični cement. Kada dosegnu Stratum corneum, keratinociti gube jezgru i organele te se nazivaju korneocitima, membrana im je veoma debela i s vanjske strane obložena cementom/lipidima. To je vodonepropusna barijera kože koju čini 20 slojeva mrtvih stanica (Stratum corneum). Dermis služi kao potpora epidermisu, a sastoji se od papilarnog i retikularnog sloja. Sadrži kompleksnu mrežu živčanih vlakana koja prenose podražaje za dodir, pritisak, toplinu i vibraciju. Iz dermisa se putem dermalnih-epidermalnih veza prenose nutrijenti u epidermis. Papilarni sloj se sastoji od vezivnog tkiva (kolagen, elastin), dobro je prokrvljen, a ime je dobio prema dermalnim papilama koje grade papilarne linije na jagodicama prstiju, dlanovima i stopalima. Retikularni sloj je građen od guste mreže vlakana (fibroblasti). Hipodermis (subkutani sloj) građen je od adipocita nagomilanih u lobule (jastučice), a služi uglavnom kao amortizer te za izolaciju dubljih tkiva (preuzeto iz: Hood i Musa, 2016).

Kao najveći organ tijela, koža pruža zaštitnu barijeru organizmu. Štiti dublja tkiva od mehaničkih, kemijskih i toplinskih oštećenja, isušivanja, ultraljubičastog zračenja te bakterijskih oštećenja. Nadalje, sprječava transepidermalni gubitak vode (TEWL) te pomaže održavanju tjelesne temperature na dva načina: hlađenje organizma lučenjem znoja iz žlijezda znojnice te vazokonstrikcijom ili vazodilatacijom krvnih žila u dermisu, koje ili smanjuju ili povećavaju protok krvi u dermis iz unutarnjih organa. Ako su unutarnji organi pregrijani, vazodilatiraju se krvne žile u dermisu što omogućuje gubitak topline. Još jedna važna uloga kože je osjet, osjetni živci smješteni su u dermisu i bazi epidermisa. Koža također sudjeluje u

sintezi vitamina D te pomaže izlučivanju ureje i ureične kiseline. Kopolimerni anhidridi maleinske kiseline koriste se kao bioadhezivi u brojnim formulacijama kao što su trake osjetljive na pritisak, trake u kirurgiji, dermatološke trake te u formulacijama za zacijeljivanje rana. Kopolimerni anhidridi maleinske kiseline kao i polimerni derivati akrilne kiseline umrežavaju se djelovanjem pritiska. Bioadheziv se na supstrat može vezati kemijskom vezom, adsorpcijom, elektrostatski, difuzijom ili sidrenjem. Bioadhezivni polimerni hidrogelovi služe kao vrlo dobra sredstva za pričvršivanje biosenzora za kožu. Hidrogel može postati vodljiv dodatkom elektrolita. Uobičajena formulacija uključuje polimer (poli-(metil vinil eter maleinske kiseline)), plastifikator (glicerol), tvar koja povećava viskoznost (poli-vinil pirolidon) i elektrolite (natrijev klorid). Prednost anhidrida maleinske kiseline nije samo bioadhezivnost nego i aktivacija vodom u vlažnim uvjetima (znoj). Osim kao bioadhezivi, kopolimerni anhidridi maleinske kiseline koriste se i u formulacijama za zarastanje rana. Dušikov oksid se koristi lokalno za liječenje kroničnih rana kao što je dijabetičko stopalo. Zbog kratkog poluživota i nestabilnosti nije doživio uspjeh u gotovim farmaceutskim pripravcima. Znanstvenici sa Sveučilišta u Torontu dizajnirali su supramolekularni kompleks koji kontinuirano otpušta dušikov oksid u ozlijeđene dijelove kože. Kompleksacijom dvaju polimera (poli vinil pirolidona i poli-(metil vinil eter anhidrida maleinske kiseline)) te esterifikacijom sa S-nitrozoglutationom postiže se kontrolirano oslobađanje dušikovog oksida. S-nitrozoglutation zadržava antioksidativna svojstva glutaciona te sadrži dušikov oksid u strukturi koji se oslobađa u tkiva (Hood i Musa, 2016). Polimeri anhidrida maleinske kiseline koriste se kao dermatološki flasteri za uklanjanje keratolitičnih čepova sa kože. Pilosebacealna jedinica građena od žlijezde lojnice i folikula dlake, odgovorna je za nastajanje pora (Roh i sur., 2006). Prekomjerno lučenje sebuma i ostaci keratinocita stvaraju komedeone, koji mogu biti otvoreni (black heads) ili zatvoreni (white heads). Proizvodi za uklanjanje zatvorenih komedeona dizajnirani su kao flaster trake i namijenjeni su za primjenu u području nosa. Analogi poli-(metil vinil etera maleinske kiseline) velike molekulske mase (1500000 Da) koriste se kao bioadhezivi u ovim formulacijama (Hood i Musa, 2016). Polimeri anhidrida maleinske kiseline koriste se i u formulacijama antiperspiransa. Lučenje znoja jedan je od načina termoregulacije, glavne žlijezde koje sudjeluju u toj regulaciji su ekrine žlijezde. Apokrine žlijezde znojnice proizvode znoj koji je viskozan, blago alkalan te može postati neugodnog mirisa djelovanjem bakterija. Iako nisu odgovorne za nastajanje neugodnog mirisa ekrine žlijezde meta su antiperspirirajućeg sredstva. Antiperspiransi su svojim svojstvima ponajprije adstringensi, ali su dijelom i baktericidi. Učinak ostvaruju sužavanjem otvora žlijezda znojnica. Najvažnije antiperspirantne tvari su aluminijske soli

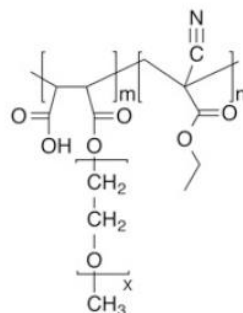
(aluminijev klorid, aluminijev klorhidrat). Zbog povezanosti aluminijevih spojeva s Alzheimerovom bolesti i rakom dojke se ograničava upotreba aluminijskih spojeva u antiperspiransima. Pripravci sa smanjenim udjelom aluminijskih spojeva mogu se postići dodatkom polimera koji će djelovati kao gelirajuća tvar sa aluminijevim solima te tako omogućiti korištenje manje količine aluminijevih soli u pripravku. Prvi ovakvi pripravci sadržavali su aluminijevu sol i poli (vinil eter maleinske kiseline) u dvije odvojene faze u formulaciji. Prilikom primjene antiperspiransa dolazi do miješanja faza i interakcije između polimera i aluminijevih soli što rezultira nastankom gela koji zatvara otvore ekrinih žlijezda i onemogućuje prolaz znoju (Rieley i Smith, 2002). Anhidridi maleinske kiseline imaju sposobnost da u kiselom obliku stvaraju komplekse s Lewis-ovim kiselinama kao što je aluminijev klorid (Travedi i Culbertson, 1982). Pozitivni naboj aluminijskih spojeva privlači negativni naboj deprotoniranih kiselih skupina poli (metil vinil etera maleinske kiseline) što omogućuje smanjenje količine aluminijevih soli u formulacijama od 10% do 20%. Drugi način kombinacije antiperspirirajućih soli i polimera anhidrida maleinske kiseline su emulzijski sustavi. Antiperspirant zajedno sa emulgatorom bio bi prisutan u uljnoj fazi dok bi polimer bio dispergirani u vodi (Brown i sur., 2006). Polieketrolitni kompleks formiran između poli (metil vinil etera maleinske kiseline) i poli (vinil piroolidon-meta-akril-amido-propil tri metil amonijev klorid) je mikrogel niske viskoznosti koji može biti prisutan u raznim formulacijama (u obliku stika, aerosola, roll-ona). Koncentracija aluminijevih soli u ovim formulacijama je 1% (Hood i Musa, 2016).

Transdermalna dostava lijekova ima niz prednosti u odnosu na oralnu primjenu i subkutane injekcije: zaobilazi jetru i metabolizam prvog prolaska kroz jetru te pruža dobre sustave kontroliranog oslobađanja. U početku su transdermalni sustavi prenosili isključivo male lipofilne molekule (pasivno), zatim su sustavi poboljšani pojačivačima penetracije, iontoforezom i sonoforezom (aktivno). Najnoviji oblici su mikroigle, termalna ablacija, elektroporacija, mikrodermoabrazija. Anhidridi maleinske kiseline koriste se u osnovnim transdermalnim sustavima, a to su transdermalni flasteri. Osim bioadhezivnog polimera sadrže podlogu (najlon), plastifikator te aktivnu tvar. Kao plastifikator se najčešće koristi polietilenglikol molekulske mase 200 Da. Mikroigle su transdermalni sustav koji zaobilazi rožnati sloj kože, a primjena je bezbolna jer ne dopiru do živaca. Postoji nekoliko izvedbi mikroigala s obzirom na način dopreme lijeka (slika 5.). Najčešće su građene od silikona, no zbog slabe biokompatibilnosti najnoviji pristupi rješavanja ovog problema su hidrogelovi sa poli (metil vinil eterom maleinske kiseline) i poli (etilen glikolom) (Donnelly i sur., 2014).



Slika 4: (a) čvrste mikroigle probiju kožu, a zatim se koristi transdermalni flaster (b) čvrste mikroigle obložene lijekom (c) mikroigle s topljivim polimernim nosačem lijeka (d) šuplje mikroigle ispunjene lijekom (e-h) transdermalni sustavi sa pokrovnom membranom, slojem polimera i lijeka te sustavom mikroigala sa hidrogelom (f) penetracija kroz kožu (g) prodiranje vode u hidrogel mikroigle i polimerni nosač (h) molekule lijeka se oslobađaju te migriraju kroz hidrogel u kožu (preuzeto iz: Donnelly i sur., 2012).

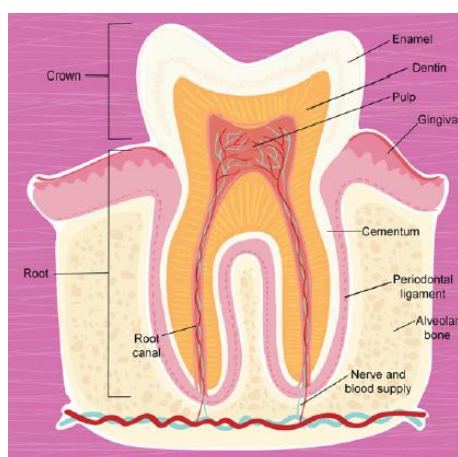
Polimerne nanočestice povećavaju učinak lijeka, omogućuju ciljno djelovanje te dostavu proteina, DNA i ostalih biomolekula u ciljano tkivo (Shroff i Vidasagar, 2013). Polimerne nanočestice veličine su od 10 nm do 1000 nm u promjeru, a dostavljaju se oralnim putem (Soppimath i sur., 2001). Polimerne nanočestice ispitivane su i za transdermalnu primjenu u farmaceutske i kozmetičke svrhe (Guterres i sur., 2007). Zbog svojeg kemizma anhidridi maleinske kiseline koriste se u peroralnim pripravcima, gdje se vežu za mukozu gastrointestinalnog trakta te omogućuju kontrolirano otpuštanje lijeka. S obzirom na biokompatibilnost anhidrida maleinske kiseline s kožom dizajnirane su polimerne nanočestice za transdermalnu primjenu (kopolimer polietilenglikol derivata anhidrida maleinske kiseline i etil cijanoakrilata) (Xing i sur., 2009). Cilj je postići kontrolirano oslobađanje lijeka kontroliranom brzinom. Ex vivo ispitivanje oslobađanja lijeka vrši se u Franz difuzijskim ćelijama.



Molekularna struktura poli { α -maleinska kiselina- ω -metoksi-poli(etilen glikol)-kopolimer-etil cijanoakrilat}

Derivati anhidrida maleinske kiseline koriste se u raznim formulacijama za njegu kože („leave-on“ i „rinse-off“), gdje služe kao emulgatori, emolijensi, gelirajuća sredstva. Kao emolijensi koriste se u kremama, losionima, gelovima te u kompleksima sa biljnim uljima. U sredstvima za čišćenje kože derivati anhidrida maleinske kiseline u obliku terpolimera s alfa olefinima smanjuju iritacije (Chaussee, 1986). Pomažu stabilizaciju askorbinske kiseline i spječavaju oksidaciju u koži (Biatry, 2004). U formulacijama za zaštitu od sunca, anorganski spojevi kao što su titanov dioksid i cinkov oksid reflektiraju sunčeve zrake, organski filteri (benzofenon-4, avobenzon) apsorbiraju svjetlost, a anhidridi maleinske kiseline poboljšavaju svojstva formulacije (vodootporni, stabilni na povišenim temperaturama, ne ostavljaju masne tragove, brzo sušenje, dobro raspršenje). Kao modifikatori reoloških svojstava pripravaka za njegu kože anhidridi maleinske kiseline iznimno su važni. Koriste se i u sredstvima za zatezanje kože (Hood i Musa, 2016).

Primjena kopolimera anhidrida maleinske kiseline u pripravcima za oralnu higijenu



Slika 5: Anatomija zuba: zub je građen od korijena, vrata i krune; korijen je ugrađen u koštanoj masi mandibule, sadrži živčane završetke i krvne žile koje se protežu u pulpu. Odontoblasti u pulpi odgovorni su za stvaranje dentina. Oblažuci strukturu korijena, cement čini prirodni adhezivni sloj između tijela korijena i parodontnog ligamenta. Vrat zuba je područje gingive izloženo usnoj šupljini, a kruna zuba je vidljivi dio koji je prekriven caklinom koja sprječava demineralizaciju unutarnje strukture zuba (preuzeto iz: Hood i Musa, 2016).

Poli (metil vinil eter maleinske kiseline) poznat je po dobrim bioadhezivnim svojstvima te se kao takav koristi za sporije otpuštanje hidrofobnih terapijskih tvari u usnu šupljinu te kao ljepilo za proteze. Dobra bioadhezivna svojstva polimera pripisuju se (-COOH) skupinama koje se mogu deprotonirati te stvoriti jake negativne naboje koji dobro reagiraju s vodom što polimeru omogućuje penetraciju i adheziju na mukozi i mukozna tkiva (Roy i Prabhakar, 2010). Adsorpcija poli (metil vinil etera maleinske kiseline) opisana je u tri koraka (Gregory, 1995). Prvi korak je transport polimera blizu površine mukoze, drugi korak uključuje interakciju polimera s mukozom van der Waalsovima vezama, vodikovim vezama i elektrostatskim interakcijama. Zadnji korak je rearanžman adsorbiranog polimera u najstabilniji oblik. Karakteristike poli (metil vinil etera maleinske kiseline) kao što su formiranje stabilnih filmova, odličan sigurnosni profil, ne izaziva iritaciju mukozne membrane, velika molekulska masa i kompatibilnost čine ga veoma korisnim u formulacijama oralne higijene (Hood i Musa, 2016).

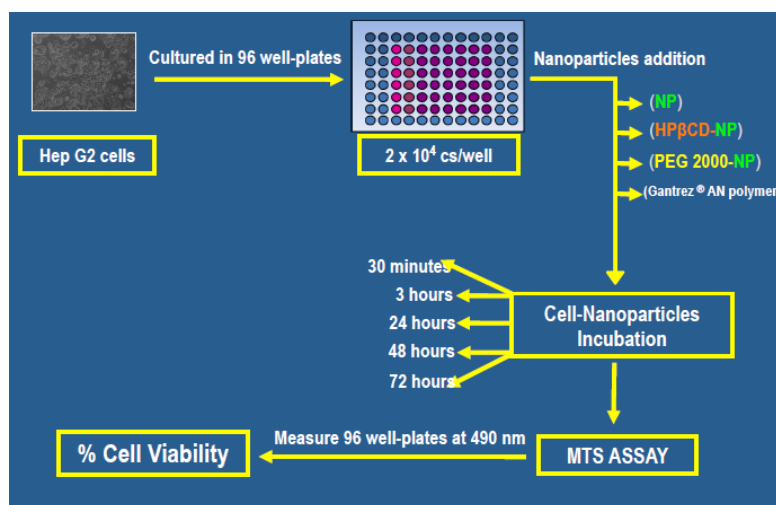
Tablica 1: Prikaz mukoadhezivne sile različitih polimera (preuzeto iz: Alexander i sur., 2011).

Mucoadhesive polymers	Adhesive force (N/m)
Poly(acrylic acid)	185,0 ± 10,3
Tragacanth	154,4 ± 7,5
Poly(methyl vinyl ether-maleic acid)	147,7 ± 9,7
Poly(ethylene oxide)	128,6 ± 4,0

U pastama za zube i vodicama za ispiranje polimeri anhidrida maleinske kiseline služe kao bioadhezivi, ali također preveniraju nastanak kamenca (www.stobec.com). Važna primjena poli (metil vinil etera maleinske kiseline) je kao lijepilo za zubne proteze koje se može koristiti u kombinacijama sa karboksi-metil celulozom i poli-vinil piroolidonom (Hood i Musa, 2016).

1.1.3. Sigurnost primjene

EFSA (European Food Safety Authority) je na zahtjev Europske Komisije donijela znanstveno mišljenje o sigurnosti kopolimera metil-vinil etera maleinske kiseline kao novog sastojka hrane (glavni sastojak žvakaćih guma). Analitički podaci potvrdili su da je novi sastojak hrane u skladu sa specifikacijom. Toksikološke informacije o polimeru uključile su provedbu raznih ispitivanja. Ispitivanje genotoksičnosti provedeno je reverznim Amesovim testom, koristeći sojeve *Salmonelle typhimurium*, koji nije pokazao mutagenost. In vitro studije i studije na životinjama pokazale su da se polimer ne apsorbira u organizmu (99,7 % izlučuje se fecesom, 0,1% u urinu, do 0,3% u izdahnutom CO₂), definirani NOAEL iznosi 1,8 g/kg i 2,1 g/kg dnevno za žene i muškarce. Specifikacija ograničava razinu metanola i acetaldehida u polimeru. Komponente niske molekulske mase kao što su MAN i MVE (maksimalni dnevni unos 70 µg, odnosno 42 µg). Prema dobivenim rezultatima polimer nema utjecaj na crijevnu mikrofloru. Oralna tosičnost ovih polimera je relativno niska (LD₅₀ zamorca iznosi 8-9 g/kg per os). Vijeće zaključuje da je poli (metil-vinil eter maleinske kiseline) siguran u navedenim primjenama i razinama upotrebe, svrstan je u skupinu GRAS. (European Food Safety Authority, 2013).



Slika 6: Prikaz postupka ispitivanja toksičnosti Gantrez^{AN} polimera (preuzeto iz: www.ecopa.eu).

Toksikološka svojstva nanočestica dobivenih od poli (metil-vinil etera maleinske kiseline) razlikuju se od svojstava samog polimera. U studiji koju je provelo Sveučilište u Navarri, a koja je obuhvatila citotoksična istraživanja s MTS-om na Hep G2 staničnim linijama, dobiveni su sljedeći podaci: nanočestice poli (metil-vinil etera maleinske kiseline) nisu pokazale nikakav toksičan učinak na Hep G2 stanice u 30 minuta, 3 sata i 24 sata. No, u 48 sati i 72 sata pokazan je značajan toksični učinak koncentracija 1 i 2 mg/mL nanočestica (www.ecopa.eu).

Tablica 2: Specifikacija za kopolimer metil vinil etera i anhidrida maleinske kiseline kao osnovnog sastojka guma za žvakanje (preuzeto iz: European Food Safety Authority, 2013).

Test	Limit	Test method
Identification test	Matches standard	By IR, MP 1125W & Gantrez AN reference
Visual	Free-flowing, white to off-white powder	
Purity	≥ 99,5 % corrected for water	
Residual MVE ^(a) (ppm)	Not more than 150 ppm	By GC, 1642 W
Residual MAN ^(b) (ppm)	Not more than 250 ppm	By HPLC, MP 1633 W
Acetaldehyde (ppm)	Not more than 500 ppm	MP – 880 W
Methanol (ppm)	Not more than 500 ppm	1642 W
Dilauroyl peroxide (ppm)	Not more than 15 ppm	1684 W
Specific viscosity (1% MEK)	2-10	MP 1115
BHT (ppm, from batch records)	< 120 ppm	-
% total water	Not more than 2,0	By oven transfer/Karl Fisher MP-732
Heavy metals (tin, lead, mercury, cadmium, bismuth, silver, arsenic, copper, antimony, molybdenum, in total)	Not more than 10 ppm	By ICP, MP-1494
Total aerobic plate count (CFU/g)	< 500	Q200, USP, Ch 61
Mould/yeast (CFU/g)	< 500	Q200, UPS, Ch 61
<i>Staphylococcus aureus</i> (CFU/g)	Negative to test	Q200, USP, Ch 61
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CFU/g)	Negative to test	Q200, USP, Ch 61
<i>Salmonella</i> (CFU/g)	Negative to test	Q200, USP, Ch 61
<i>Escherichia coli</i> (CFU/g)	Negative to test	Q200, USP, Ch 61

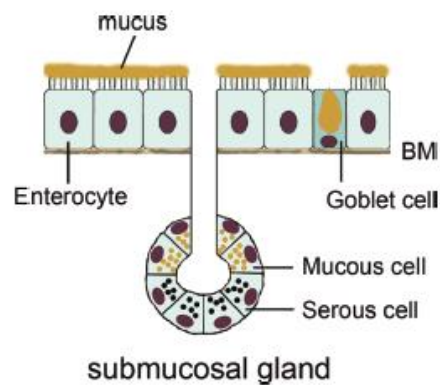
(a) – methyl vinyl ether (MVE) is quantified by gas chromatography (Ashland GC, Method 1642 W). The limit of detection in Gantrez SF polymer is 50ppm.

(b) – residual maleic anhydride (MAN) is reported as maleic acid (MAA) due to the conditions of analytical test method. For calculation purposes MAA is convertible to MAN by subtracting one mole of water i.e. MAN is 84,7 % of the weight of MAA.

1.2. Primjena lijeka na sluznice

Doprema lijeka na sluznicu nudi brojne prednosti uključujući ciljanu dopremu lijeka lokalno, kako bi se smanjila sistemska apsorpcija i nuspojave. Glavne funkcije sluzi su zaštita i podmazivanje. Mukozne membrane nalaze se u brojnim dijelovima tijela kao što su oči, respiratorni trakt, gastrointestinalni trakt i reproduktivni sustav. Prisutnost mukoznih sluznica

na membranama ovih sustava u mnogim slučajevima je prepreka za isporuku lijeka (Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016).



Slika 7: Sluz u gastrointestinalnom traktu proizvode intraepitelne stanice (goblet stanice), smještene između enterocita te ekstraepitelne žlijezde smještene u submukozi. Submukozne žlijezde su najčešće građene od dva tipa stanica: mukozne stanice koje proizvode viskozni sekret i serozne stanice koje proizvode sekret manje viskoznosti (preuzeto iz: Fröhlich i Roblegg, 2014).

Mukoza je viskozni sloj gela kojeg proizvode vrčaste stanice, stanice koje proizvode sluz ili submukozne žlijezde prisutne na mukoznim membranama očiju (Kessler i Dartt, 1994), gastrointestinalnog trakta (Deplancke i Gaskins, 2001) i respiratornog sustava (Spicer i sur., 1983). U želucu sluz proizvode epitelne stanice, a vaginalna sluz rezultat je smjese različitih fluida uključujući cervikalnu sluz (Neves i sur., 2014). Prisutnost mukoze na membrani štiti epitel od vanjskih čimbenika (virusi, bakterije, toksini), također sprječava gubitak vode. Prisutnost mukoze na epitelu dio je imunskog sustava organizma i predstavlja važnu barijeru prolasku čestica (Fröhlich i Roblegg, 2014). Glavni sastojak sluzi je voda (do 95%) (Serra i sur., 2009). Bez obzira na podrijetlo, sluz se sastoji od umreženih i isprepletenih vlakana mucina, odumrlih stanica, bakterija, lipida, soli, proteina, makromolekula i staničnih ostataka (Johansson i sur., 2011). Mucini su velike molekule veličine 0,5-40 MDa, dobiveni su povezivanjem monomera mucina veličine 0,3-0,5 MDa te su presvučeni kompleksom koji je sačinjen od različitih proteoglikana (Cone, 2009). Debljina sloja mukoze i pH mogu varirati ovisno o smještaju mukozne membrane i drugim parametrima. U probavnom sustavu debljina sluzi ovisi o aktivnosti probave i prehrani (Szentuki i Lorenz, 1995). pH sluzi može znatno varirati ovisno o površini sluznice. Sluznice respiratornog trakta, kao i nazalna sluznica imaju neutralan pH (Hehar i sur, 1999), sluznica oka je blago alkalna (pH~7,8) (Greaves i Wilson, 1993). Nasuprot tome, gastrointestinalna mukoza izložena je širokom rasponu pH vrijednosti: veliki gradijent pH postoji u istom sloju mukoze, pH raste od luminalnog ~1-2 do ~7 na površini epitela (Schreiber i Scheid, 1997). pH vaginalne sluzi kreće se u rasponu od 3,5 do

4,5 zahvaljujući zakiseljavanju mliječnom kiselinom koju proizvode *lactobacilli* u anaerobnim uvjetima (Boskey i sur., 2001).

Tablica 3: Fiziološka svojstva mukusa u različitim dijelovima organizma (preuzeto iz: Netsomboon i Bernkop-Schnürch i prilagođeno, 2016).

Sluznica	Temperatura (°C)	Debljina sluznice (µm)	Debljina sloja sluzi (µm)	Debljina labavo vezanih mucina (µm)	pH sluznice	hidrodinamika	Brzina obnove sluzi/ toka sluzi
Bukalna	36,2-36,7	70-100	70-100	28	6,5-7,5	±	12-24 h
Nazalna	30,2-34,4	10-15	6	4-9	5,5-6,5	±	Mukocilijarni klirens: 6 mm/min Vrijeme prolaska: 15-20 min
Pulmonarna	32,5-35,5	5-55	5-10	5-10	7,0	±	10-20 min
Okularna Sluznica Suzni film	34,0 0,02-0,05	n/a	n/a		7,8	±	5,5-7,7 min
Želučana (antrum)	37,0	30-300	110,5±37	n/a	6,40±0,24	±	24-48 h
Sluznica tankog crijeva	37,0	150-400	15,5±4,5	n/a	5,5-7,5	+++	24-48 h
Sluznica kolona	37,0	30-280	5-13	n/a	7,0	+++	24-48 h
Intravezikalna	37,0	10-20	n/a	n/a	n/a	±	Ovisi o vremenu pražnjenja urina
Vaginalna	37,0	50	n/a	n/a	3,5-4,0	±	1,5 mL/day', 6,0 mL/day"

± - niski protok ili bez protoka vode

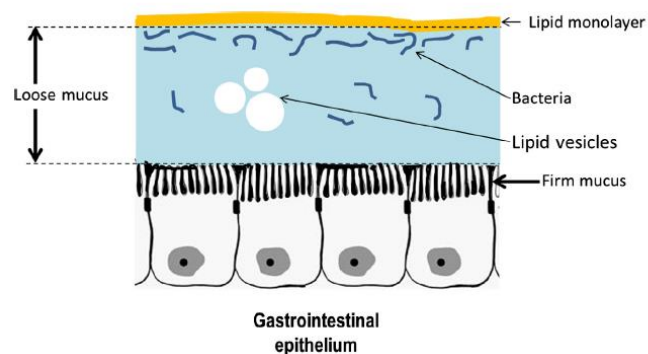
+++ - izrazito kretanje vode prema apsorpcijskoj membrani

' - vrijeme proizvodnje cervikalne sluzi

" - proizvodnja vaginalne tekućine (znatno povećana seksualnom stimulacijom)

Mukozni klirens je vrijeme koje je potrebno da se sluz izlučena iz vrčastih stanica i stanica koje luče sluz ukloni sa mukozne membrane i zamijeni novom sluzi (Johansson, 2012; Rubinstein i Tirosh, 1994). Brzina klirensa ovisi o debljini sloja sluzi, što je sloj tanji, to je klirens brži. Debljina sloja sluzi ovisi o brzini izlučivanja i uklanjanja sluzi sa mukozne membrane (Zhang i sur., 2014). Toksične tvari mogu povećati lučenje sluzi što dovodi do povećanja debljine sloja na mukoznoj membrani (Cone, 2009). S obzirom na debljinu sluzi i klirens, sluz se može podijeliti na dva tipa: slobodna i vezana sluz (Ensign i sur., 2012; Atuma i sur., 2001). Slobodna sluz ili slabo vezana sluz može se pronaći na površini mukoznih membrana želuca, tankog i debelog crijeva te respiratornog trakta (Smith i sur., 2008; Atuma i sur., 2001). Ova se sluz lako može ukloniti usisavanjem i smicanjem, a sastoji se od velikog udjela vlakana koja na sebe navlače vodu što rezultira debljim slojem sluzi (Smith i sur., 2008). Drugi tip sluzi je čvrsta sluz vezana za membranu, uglavnom je građena

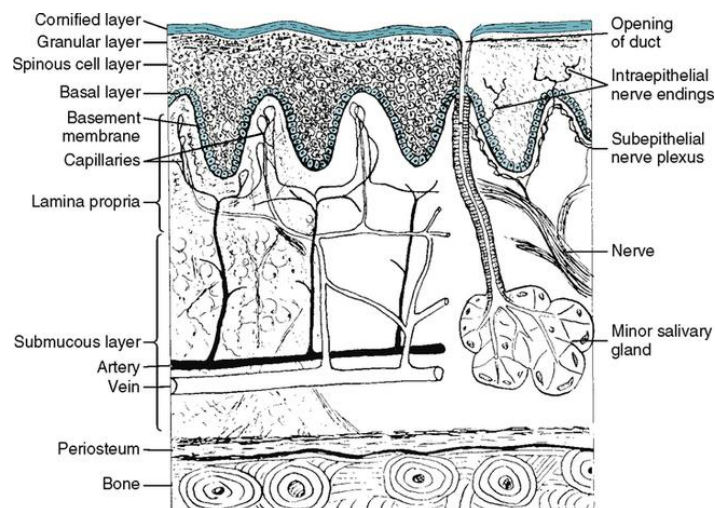
od mucina velike molekulske mase (0,5-40 MDa) (Zhang i sur., 2014). Ova sluz se sidri za epitel preko transmembranske domene i tvori zaštitni sloj. Otporna je na uklanjanje smicanjem i usisavanjem (Strugala i sur., 2003). Čvrsti sloj sluzi učinkovita je barijera za bakterije, enzime i toksine. Međutim, prisutnost čvrstog sloja sluzi na mukoznim membranama je dodatna barijera za slabo topljive lijekove, posebno one iz skupine II i IV klasifikacijskog sustava, jer se formirani sloj sluzi ne miješa sa vodom. Na mukoznim membranama gastrointestinalnog trakta stalno kretanje vode prema epitelu igra važnu ulogu u kretanju čestica u sloju sluzi. U tankom crijevu apsorpcija vode pomaže u dostavi čestica što bliže epitelu. Količina apsorbirane vode u ljudskom crijevu iznosi 0,1-0,2 mL/h cm² (Lennernäs i sur., 1994) što dovodi do mnogo bržeg kretanja čestica u sloju sluzi nego što se može postići difuzijom s velikim gradijentom koncentracije. Kretanje čestica kroz sluz ovisi o njihovoj veličini. Zaplitanje mucina uzrokuje nastajanje guste mreže vlakana u sloju gela. Prosječna veličina čestica od oko 100 nm utvrđena je pokretljivošću različitih veličina virusa (Lai i sur., 2009). Prosječna veličina čestica može se odrediti i analizom pomoću elektronskog mikroskopa, no zbog dinamičnosti sustava sluzi i različitih svojstava s obzirom na smještaj membrane, ove orijentacijske vrijednosti treba uzeti s oprezom. Gusta mreža vlakana blokira prolaz velikih čestica. Kretanje MPPs veličine 530 nm u ljudskoj sluzi je četiri puta sporije nego li u vodi (Lai i sur., 2007). Veličina čestica ima veliki utjecaj na sposobnost prodiranja čestica do epitela, no znatno manji utjecaj ima na mogućnost rasprostiranja čestica u mukozi u svrhu povećanja površine apsorpcije i ciljnog djelovanja. Različite interakcije između čestica i mukoze kao što su ionske interakcije, vodikove veze i hidrofobne interakcije utječu na sposobnost kretanja čestica u mukoznom sloju (Takeuchi i sur., 2001).



Slika 8: Građa mukoznih membrana (preuzeto iz: Cone, 2009).

1.2.1. Bukalna sluznica

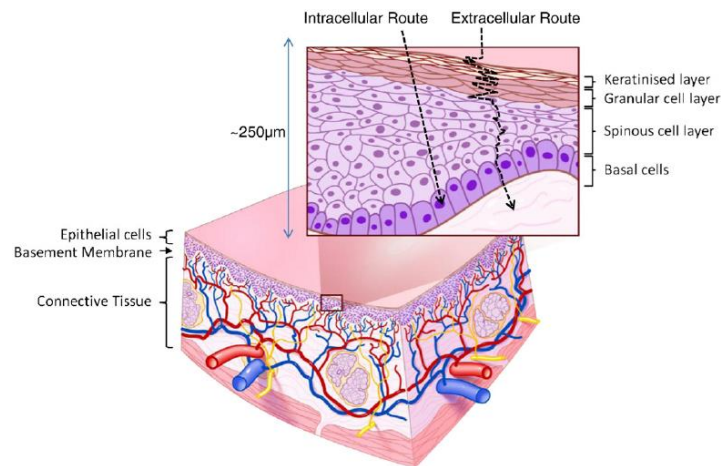
Među različitim putevima primjene lijekova pacijentima je najprihvatljiviji oralni put, no on ima svoje nedostatke kao što su metabolizam prvog prolaska kroz jetru i enzimatska razgradnja u gastrointestinalnom traktu. Bukalna primjena zaobilazi prvi prolaz kroz jetru i presistemsku eliminaciju u gastrointestinalnom traktu. Bukalna sluznica građena je od sloja epitelnih stanica, ispod kojeg se nalazi bazalna membrana te lamina propria koja je najdublji sloj do submukoze. Epitel bukalne sluznice građen je od 40 do 50 slojeva stanica, dok je sublingvalni epitel građen od nešto manjeg broja slojeva. Brzina bukalnog klirensa je 5 do 6 dana (Harris i Robinson, 1992). Sloj sluzi na bukalnoj membrani, građen od kompleksa proteina i ugljikohidrata, izlučuju velike i male žlijezde slinovnice kao dio sline (Rathbone i sur., 1994; Tabak i sur., 1982). Pri fiziološkom pH sluz nosi negativni naboj zbog sijalinske kiseline i sulfatnih ostataka. Taj negativni naboj važan je čimbenik mukoadhezije jer pri tom pH sluz može formirati gel čvrste strukture koji se veže na epitel (Gandhi i Robinson, 1988). Prisutnost sline u usnoj šupljini važan je faktor. Slina je zaštitna tekućina građena od 1% organskih i anorganskih tvari, a glavna karakteristika sline je brzina protoka koja ovisi o dobu dana, tipu stimulansa i stupnju stimulacije (Rathbone i sur., 1994; Tabak i sur., 1982). pH sline varira u rasponu od 5,5 do 7 ovisno o protoku, pri bržem protoku povećana je koncentracija bikarbonata i natrija što dovodi do povećanja pH. Dnevni volumen sline iznosi od 0,5 do 2 L. Zbog ovog vodenog okoliša usne šupljine u formulacijama za bukalnu primjenu koriste se hidrofilni polimeri.



Slika 9: Građa bukalne sluznice (preuzeto iz: www.pocketdentistry.com).

Dva su puta pasivnog prolaska kroz bukalnu membranu: transcelularni i paracelularni put. Najčešće je preferiran jedan put prolaska ovisno o fizikalno-kemijskim osobinama tvari koja

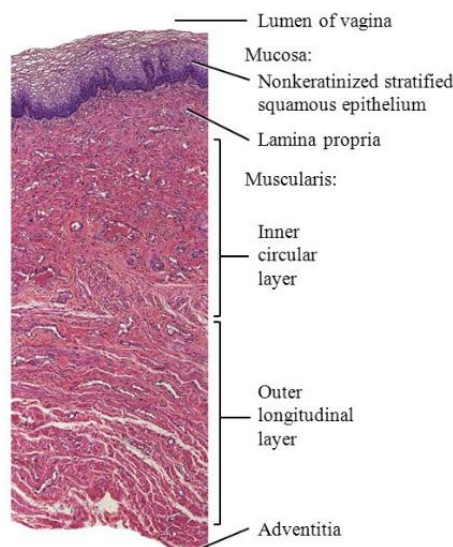
prolazi. Intercelularni prostor i citoplazma su hidrofilni, lipofilne tvari bit će slabo topljive u ovim prostorima. Stanična membrana je lipofilna i onemogućuje prolaz hidrofilnim tvarima. Bukalna sluznica pogodna je za formulacije produženog oslobađanja lijeka, isporuku slabo permeabilnih molekula (peptidni lijekovi). Mukoadhezivne nanočestice s antimikoticima pogodne su za lokalnu terapiju oralne kandidijaze na bukalnoj sluznici (Rencber i sur., 2016).



Slika 10: Putevi prolaska oralne sluznice (prikaz sluznice nepca koja je keratinizirana za razliku od bukalne i sublingvalne sluznice) (preuzeto iz: www.researchgate.net).

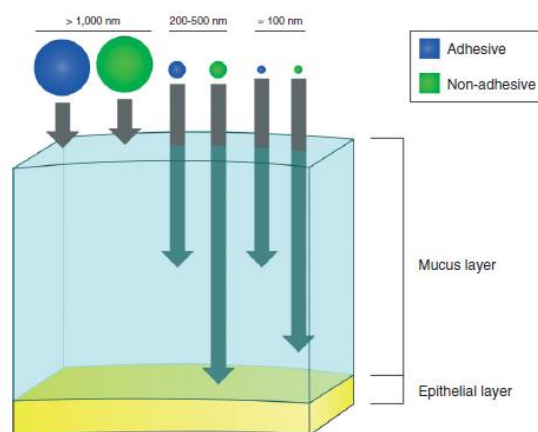
1.2.2. Vaginalna sluznica

Ljudska cervikovaginalna sluznica ima niz specifičnosti kad je u pitanju mukoadherencija. Sluznica je prekrivena vaginalnom tekućinom čije karakteristike (pH, reološka svojstva, sastav, količina) mogu jako varirati. Ove varijacije mogu biti fiziološke ili patološke te ovise o reproduktivnom statusu žene. U zdravih žena reproduktivne dobi vaginalna sluz predstavlja tekućinu izgleda gela, kiselih svojstava (pH 4-5), 90-95 % vode u sastavu, 1-2 % mucina i ostalih komponenti niskog udjela. Konačni sastav vaginalne sluzi određen je doprinosom vaginalne sluznice (pH 7 ili više, varijabilan sadržaj mucina), tekućine endometrija, sekreta vestibularnih žlijezda, lučenjem vaginalne stijenke i malom količinom urina (Owen i Katz, 1999; Wolf i sur., 1980). Mucin je odgovoran za osnovna svojstva sluzi (konzistencija, kohezija, podmazivanje), što se povezuje s njegovom trodimenzionalnom strukturom u fiziološkim tekućinama, koja sadrži kompleksan sustav vodenih kanala (Bansil i sur., 1995; Sheehan i sur., 1986) izrazito osjetljivih na pH, kemikalije, čestice i sadržaj mucina (McGill i Smyth, 2010; Lee i sur., 2002).



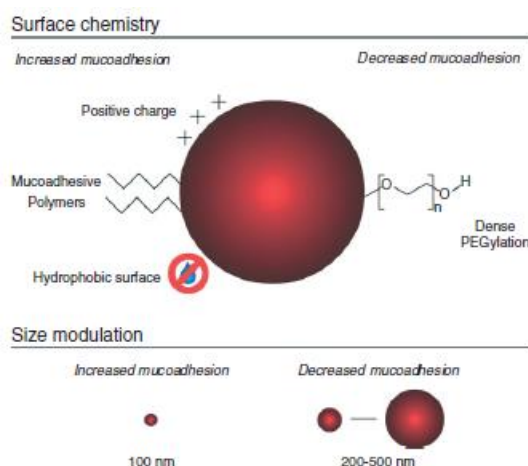
Slika 11: Građa vaginalne sluznice (preuzeto iz: www.researchgate.net).

Jedan od glavnih izazova u razvoju mukoadhezivnih sustava za vaginalnu primjenu odnosi se na stalne promjene u svojstvima cervikovaginalne tekućine (Valenta, 2005). Menstrualni ciklus važan je faktor varijabilnosti sastava i strukture sluzi kao i intravaginalni postupci (ispiranje), zdravlje i reproduktivni status (prisutnost spolnih bolesti, menopauza). Tijekom seksualnog uzbuđenja, količina tekućine prisutne u vagini se znatno poveća, uglavnom zbog lučenja vode iz subepitelnog tkiva kao rezultat povećanog vaskularnog protoka i tlaka (Breman i Bassuk, 2002.). Ovaj dotok vode uzrokovat će razrijeđenje mucina i promjene u strukturi (djelomično pucanje) i smanjenje viskoznosti. U pogledu prijanjanja na sluznicu ove promjene olakšat će interakciju između mucina i mukoadhezivnih molekula, no stupanj konsolidacije i jačina interakcije će biti slabiji (Lai i sur., 2008). Razrijeđivanje će izazvati porast pH, koji može promijeniti mukoadhezivnost vaginalnih sustava (das Neves i sur., 2008). Razrijeđenje će negativno utjecati na *in situ* imobilizaciju zbog smanjene adhezije. Spolni odnos ima drastičan učinak na razrijeđivanje i smicanje, poništava adheziju i smještaj adhezivnih sustava u vagini (Lai i sur., 2008). Tijekom intravaginalne ejakulacije dolazi do fizikalno-kemijskih promjena u vagini. pH iz kiselog prelazi u umjereno alkalni, ne samo zbog većeg pH sperme (pH 8) nego i zbog većeg puferskog kapaciteta sperme (Owen i Katz, 2005). Ovaj efekt traje nekoliko sati. Pri dizajniranju vaginalnih mukoadhezivnih sustava dva su zahtjeva: neosjetljivost na promjene (pH i razrijeđenje) (Aka-Any-Grah i sur., 2010; Garg i sur., 2001) i sposobnost iskorištenja prirodnih varijacija kao što je varijacija pH pri ejakulaciji (Gupta i sur., 2007).



Slika 12: Veličina nanočestica i svojstva površine utječu na interakciju nanosustava i sluznice. Studija koja je koristila MPT (microscopic multiple particle tracking) visoke rezolucije pokazala je da čestice veličine 500 nm prolaze kroz mrežu mucina (Lai i sur., 2007; Suhi sur., 2005). Čestice većeg promjera imaju ograničenu difuziju jer se kreću samo kroz kanale većeg promjera, no manje čestice (100 nm) nailaze na veće smetnje nego li čestice veličine 200-500 nm. Ova činjenica pripisuje se heterogenoj strukturi sluzi, manje čestice difundiraju kroz kanale užeg promjera koji su često slijepe ulice, dok veće čestice difundiraju nesmetano kroz kanale šireg promjera (Wang i sur., 2008) (pruzeto iz: das Neves i sur., 2011).

Interferencija nanosustava sa zaštitnim svojstvima cervikovaginalne sluzi treba biti ograničena zbog važnosti sluzi u obrani od različitih patogena (Lai i sur., 2010; Boukari i sur., 2009). U slučajevima kada je mukoadhezija opravdana promjene u strukturi sluzi su moguće, pokazane su na različitim polimerima i nanočesticama, osobito kada su pozitivno nabijeni (Chen i sur., 2010; Willitis i Saltzman, 2001). Promjenom površinskih svojstava nanočestica moguće je povećati ili smanjiti mukoadheziju.

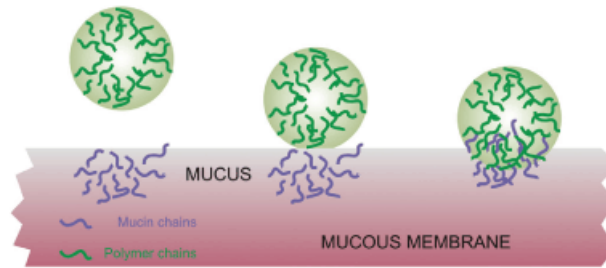


Slika 13: Strategije promjene mukoadhezivnih svojstava nanosustava (preuzeto iz: das Neves i sur., 2011).

Mukoadhezivni nanosustavi za vaginalnu primjenu indicirani su u liječenju bakterijskih, virusnih i gljivičnih infekcija. Ispitivani su kao nosači anti-HIV lijekova te antimikotika u liječenju vaginalne kandidijaze (des Neves i sur., 2011).

1.3. Mukoadhezivne nanočestice

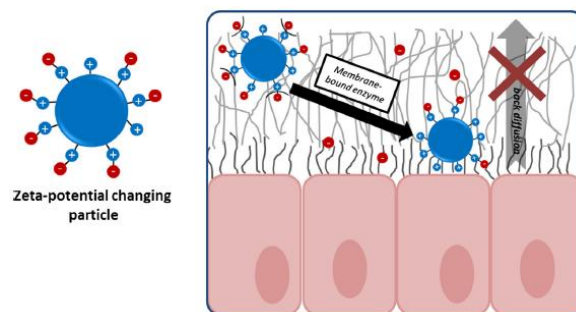
Nanočestice su novi terapijski sustavi koji u odnosu na konvencionalne sustave imaju mnogobrojne prednosti. Veličina čestica od 10 nm do 1000 nm omogućava ciljano djelovanje lijeka, produženo oslobađanje, zaštitu od razgradnje djelatne tvari, nisku toksičnost i veću adhezivnost lijeka na kožu. Glavno obilježje nanočestica je veliki omjer površine u odnosu na volumen čestica. Primjenom terapijskih sustava nanočestica postiže se veća specifičnost u dostavi lijeka te manji broj nuspojava zbog primjene manjih doza lijeka. Nanočestice kao novi terapijski sustavi namijenjeni su za oralnu dostavu lijekova niske biorasploživosti. Polimerne nanočestice pokazuju visok kapacitet povećanja oralne biorasploživosti lijekova koji se slabo apsorbiraju (Yang i sur., 1999; Damge´ i sur., 1997). Nanočestice kao nosači lijekova primjenjuju se za dostavu konvencionalnih lijekova, rekombinantnih proteina (inzulin, kalcitonin), cjepiva i nukleotida (Fröhlich i Roblegg, 2014). Kalcitonin (Sakuma i sur., 1999), dikumarol (Chickering i sur., 1997), nifedipin (Kim i sur., 1997), furosemid (Akiyama i sur., 1998) i plazmidi (Mathiowitz, 1997) lijekovi su čija je biorasploživost povećana uklapanjem u polimerne nosače (nanočestice). Bioadhezija je stanje u kojem se dva materijala drže zajedno međusobnim interakcijama kroz određeni vremenski period. Ako je supstrat sluz, a ne biološka membrana onda je riječ o mukoadheziji. Materijali koji pokazuju mukoadhezivna svojstva mogu biti prirodni ili sintetski polimeri. Ti polimeri koriste se u različitim oblicima isporuke lijekova kao što su tablete, prašci, gelovi, filmovi, masti i flasteri. Kao nosači lijekova pogodni su za ciljano lokalno djelovanje, ali mogu i poboljšati dostavu lijekova preko gastrointestinalnog trakta (Fröhlich i Roblegg, 2014). Mukoadhezija se sastoji od dvije faze: faza kontakta i faza konsolidacije. U prvoj fazi čestice su pod utjecajem odbojnih (osmotski tlak, elektrostatsko odbijanje) i privlačnih sila (van der Waalsove interakcije, elektrostatsko privlačenje) (Smart, 2005). Kada čestice prevladaju odbojne sile prva faza je završena i vlaga dopušta mukoadhezivnim česticama formiranje slabih van der Waalsovih interakcija i vodikovih veza. To se može dogoditi međusobnim povezivanjem lanaca polimera i stvaranjem sekundarnih veza ili dehidracijom mukusa dok se ne postigne osmotska ravnoteža i konsolidira adhezija (Fröhlich i Roblegg, 2014).



Slika 14: Interakcija polimera i mukozne membrane (preuzeto iz: www.scielo.br)

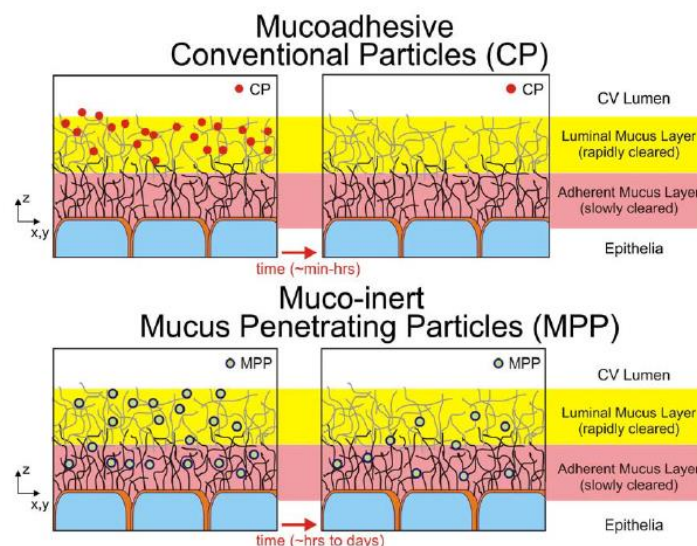
Molekularna masa (MW) polimera ima velik utjecaj na snagu adhezije. Za polietilenglikol od 20 000 MW mukoadhezija je zanemariva, na 200 000 MW mukoadhezija je poboljšana, a na 400 000 MW mukoadhezija je izvrsna. Zbog boljeg prodiranja u sloj sluzi polimeri s duljim lancima uzrokuju bolje prijanjanje od polimera s kraćim lancima. Smanjena fleksibilnost polimernih lanaca omogućuje bolju difuziju vode, poboljšava hidrataciju i unos čestica. Raspored polimernih lanaca u prostoru također je jedan od faktora mukoadhezije. Koncentracija polimera optimirana je za pojedine formulacije. Preniska koncentracija uzrokovat će izostanak mukoadhezije dok će prevelike koncentracije polimera ometati difuziju otapala (Fröhlich i Roblegg, 2014). Za formuliranje mukoadhezivnih nanočestica potrebno je utvrditi biološke faktore kao što su pH i ionska jakost te elektrostatske interakcije polimera i sluzi. Kationski polimeri (kitozan) reagiraju sa glikoproteinima sluzi samo u neutralnom do alkalnom pH. Anionski polimeri (karbomeri, karboksimetilceluloza i alginat) formiraju hidrofobne interakcije, vodikove i van der Waalsove interakcije. Neionski polimeri (hidroksipropilmetilceluloza, hidrosimetilceluloza i metilceluloza) pokazuju slabu mukoadheziju (Fröhlich i Roblegg, 2014). Konvencionalne nanočestice u mukozi ostaju zarobljene zbog adherencije ili steričkih smetnji te se brzo eliminiraju mukocilijarnim klirensom. U probavnom sustavu oralno primjenjene nanočestice mogu se eliminirati zajedno sa probavljenom hranom, vezati se na vlakna mucina te mukocilijarnim klirensom izlučiti u feces, mogu pokušati penetrirati u epitel ili se što dulje zadržati na sloju mukoze koji nije topljiv u vodi (Galindo-Rodriguez i sur., 2005; Ponchel i Irache, 1998). Kratko vrijeme prolaza kroz gastrointestinalni trakt onemogućuje primjenu velikih doza lijeka kroz duži period, što vodi niskoj bioraspoloživosti i slaboj učinkovitosti lijeka. Minimaliziranjem frakcije lijeka koja se izluči zajedno sa hranom, a povećanjem frakcije koja stupa u interakcije sa slojem sluzi prevladava se nedostatak kratkog prolaza kroz gastrointestinalni sustav. Mukoadhezija čestica usporava njihov prolaz kroz probavni sustav do ponovne obnove sloja sluzi čime se povećava apsorpcija lijeka. Interakcija sluzi i nanočestica može biti putem vodikovih veza, hidrofobnih interakcija, van der Waalsovih interakcija, interakcijom

polimernih lanaca i elektrostatskih interakcija (Woodley, 2001; Ponchel i Irache, 1998). Elektrostatske interakcije najvažniji su iskorišteni oblik interakcije. Sloj sluzi pokazuje negativan naboj zbog prisutnosti sijalinske kiseline i sulfonske kiseline u substrukturama (Bansil i Turner, 2006). Negativno nabijene i neutralne čestice mogu lako proći kroz sloj sluzi dok su pozitivne čestice imobilizirane u sloju sluzi zbog elektrostatskih interakcija (Crater i Carrier, 2010; Bansil i Turner, 2006). Međutim, pozitivno nabijene čestice pokazuju mnogo veći unos u stanicu putem endocitoze od negativno nabijenih (Loretz i sur., 2007; Miller i sur., 1998). Negativno nabijene čestice mogu promijeniti zeta potencijal u pozitivnu vrijednost kada prođu kroz sloj sluzi i dođu do epitela što predstavlja vrlo obećavajuć mehanizam dostave lijekova.



Slika 15: Čestice koje mijenjaju zeta potencijal prolaskom kroz mukožu (preuzeto iz: Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016).

Vrijeme zadržavanja mukoadhezivnih sustava ovisi o fiziološkom procesu obnove sluzi koji uglavnom traje između 50 i 270 minuta (Lehr i sur., 1991), što onemogućuje zadržavanje mukoadhezivnih nanočestica dulje od 4 do 5 sati. Mukoadhezivne nanočestice se zadržavaju u sloju sluzi, ali nemaju sposobnost prodrijeti kroz sluz do epitela.



Slika 16: Prikaz interakcija mukoadhezivnih i mukopenetrirajućih nanočestica sa slojem sluzi. Mukopenetrirajuće nanočestice pokazale su bolju učinkovitost u oralnoj primjeni dok su mukoadhezivne nanočestice učinkovitije na ostalim mukoznim membranama što se može objasniti brzim klirensom gastrointestinalne mukoze, koji onemogućuje dulje zadržavanje mukoadhezivnih nanočestica. Konstantno cirkuliranje vode u gastrointestinalnom traktu prema membrani uzrokuje bolju učinkovitost mukopenetrirajućih nanočestica (Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016) (preuzeto iz: Lai i sur., 2009).

Mukoadhezivne nanočestice intenzivno su istraživane zbog produljenog zadržavanja aktivnih molekula na mjestu primjene. Pokazale su potencijal i u lokalnoj i u sistemske primjeni. Pokazale su pozitivan učinak u lokalnoj terapiji antifungalnim i antibakterijskim lijekovima. Uklapanje natamicina u mukoadhezivne nanočestice pokazalo je značajnu inhibiciju *C. albicans* i *Aspergillus fumigate* s nižom koncentracijom lijeka (Bhatta i sur., 2012). Mukoadhezivne nanočestice također su pokazale potencijal i u sistemske primjeni lijekova. Oralna bioraspoloživost valsartana i inzulina može biti izrazito povećana korištenjem mukoadhezivnih nanočestica (Cao i sur., 2012; Zhang i sur., 2011).

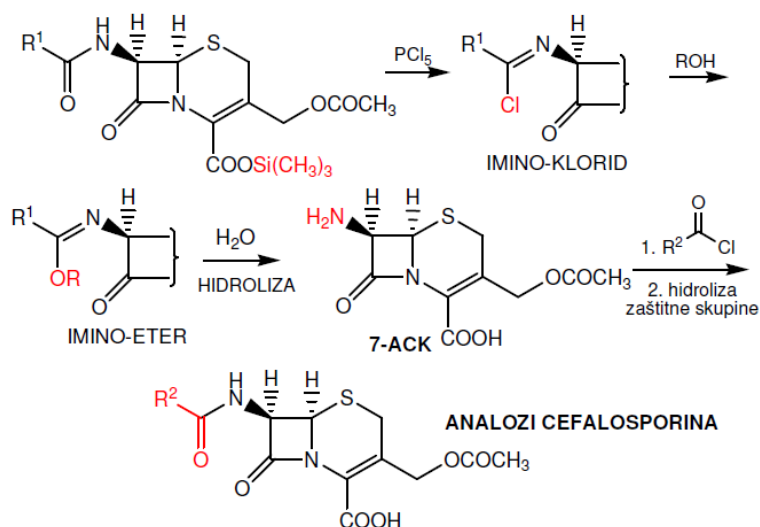
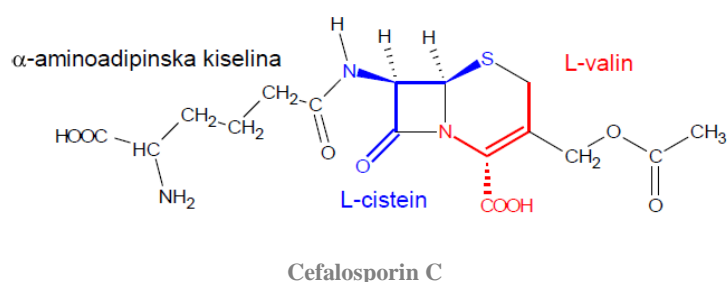
Tablica 4: SWOT analiza mukoadhezivnih sustava (preuzeto iz: Netsomboon i Bernkop- Schnürch, 2016 i prilagođeno)

SNAGE	SLABOSTI
Čestice ne mijenjaju strukturu mukoze	Čestice reagiraju s mucinom i ne mogu doseći epitel
PRILIKE	PRIJETNJE
Produljeno zadržavanje djelatne tvari Smanjenje učestalosti doziranja Maksimalna iskoristivost primjenjene doze lijeka te posljedično smanjenje ukupne primjenjene doze	Čestice se uklanjaju mukoznim klirensom

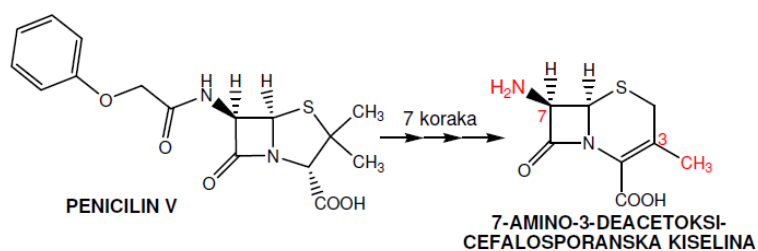
1.4. Cefiksim

1.4.1. Kemizam

Cefiksim pripada skupini antibiotičkih lijekova koji se nazivaju cefalosporini. Cefalosporini su polusintetski antibiotici dobiveni iz Cefalosporina C, koji je izoliran iz kulture *Cephalosporium acremonium* 1948. godine, pokazalo se da je veoma nestabilan u kiselinama i lužinama, osjetljiv na djelovanje β laktamaze, da ima širok spektar djelovanja, ali slabo antibiotičko djelovanje. Promjenom supstituenta u položaju C7 mijenja se kemijska stabilnost i spektar djelovanja. Supstitucijom na položaju C3 mijenjaju se farmakokinetička svojstva. Danas se cefalosporini dobivaju polusintetski, iz cefalosporina C se kemijskom hidrolizom preko imino-klorida i imino-etera dobije 7 ACK. Također je moguće dobiti cefalosporine iz penicilina, što je vrlo učinkovita metoda jer se penicilini puno lakše dobivaju biosintetski od cefalosporina (Sweetman, 2009).



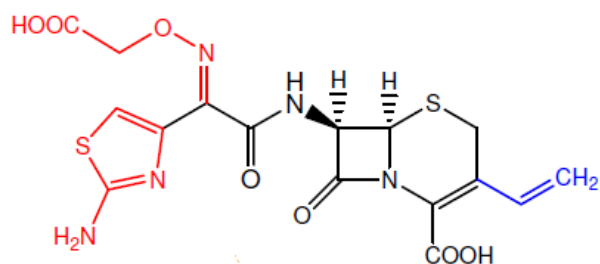
Sinteza analoga cefalosporina



Sinteza cefalosporina iz penicilina

Cefiksime je bijeli, blago higroskopan prašak, slabo topljiv u vodi, slabo topljiv u dehidriranom alkoholu, praktički netopljiv u etil acetatu, blago topljiv u alkoholu, acetonu i glicerolu, slobodno topljiv u metilnom alkoholu. Pohranjuje se u hermetički zatvorenim kontejnerima. Zaštićen od svjetlosti.

$C_{16}H_{15}N_5O_7S_2 \cdot 3H_2O = 507,5$



(Z)-7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(karboksi-metoksi-imino) acetamido]-3-vinil-3-cefem-4-trihidrat karboksilne kiseline

Jedini je cefalosporin treće generacije za per os primjenu. Samo 40 do 50% oralne doze cefiksima se apsorbira iz gastrointestinalnog trakta, razina apsorpcije se može smanjiti u prisutnosti hrane. Cefiksime se bolje apsorbira iz oralne suspenzije nego li iz tablete. Apsorpcija je prilično spora; vršne koncentracije od 2 do 3 $\mu\text{g/ml}$ i od 3,7 do 4,6 $\mu\text{g/ml}$ dosegnute su između 2 i 6 sati nakon pojedinačne doze od 200 do 400 mg. Vrijeme poluživota u plazmi je uobičajeno oko 3 do 4 sata, ali može biti produljeno u slučaju oštećenja bubrega. Oko 65% cefiksima vezano je za proteine plazme. Prolazi placentu. Relativno visoke koncentracije mogu se naći u žuči i urinu. Oko 20% oralne doze (ili 50% apsorbirane doze) izluči se nepromijenjeno urinom unutar 24 sata. Do 60% se može eliminirati iz organizma putem koji zaobilazi bubrege; ne postoje dokazi metabolizma, ali dio se vjerojatno izluči fecesom iz žuči. Cefiksime je klasificiran kao treća generacija cefalosporina i koristi se peroralno kao terapija infekcija gonoreje, upale srednjeg uha, faringitisa, upala donjih dišnih

puteva (bronhitis) i urinarnih infekcija. Dostupan je u obliku trihidrata, a doze su izražene za anhidrid cefiksima (1,12 g cefiksim trihidrata odgovara 1 g anhidrida cefiksima). Oralna doza za odrasle iznosi od 200 mg do 400 mg dnevno kao pojedinačna doza ili podijeljena u dvije doze. Djeci iznad 6 mjeseci i ispod 50 kg daje se 8 mg/kg dnevno u obliku oralne suspenzije, kao jedna pojedinačna doza ili podijeljeno u dvije doze. Doza cefiksima se korigira kod bolesnika s umjerenim do teškim oštećenjem bubrega. Doza od 200 mg dnevno ne bi trebala biti prekoračena kod bolesnika s klirensom kreatinina manjim od 20 ml/min. Najčešće prijavljivane nuspojave su gastrointestinalne smetnje, posebno dijareja te reakcije preosjetljivosti (osip, kardiovaskularni kolaps). Cefiksim se ne bi trebao uzimati sa antikoagulansima jer može produljiti protrombinsko vrijeme (Sweetman, 2009). Cefiksim se koristi kao alternativa kod komplicirane infekcije mokraćnog sustava te kao alternativa kod akutnog nekompliciranog pijelonefritisa (cefiksim 1x400 mg) (www.iskra.bfm.hr).

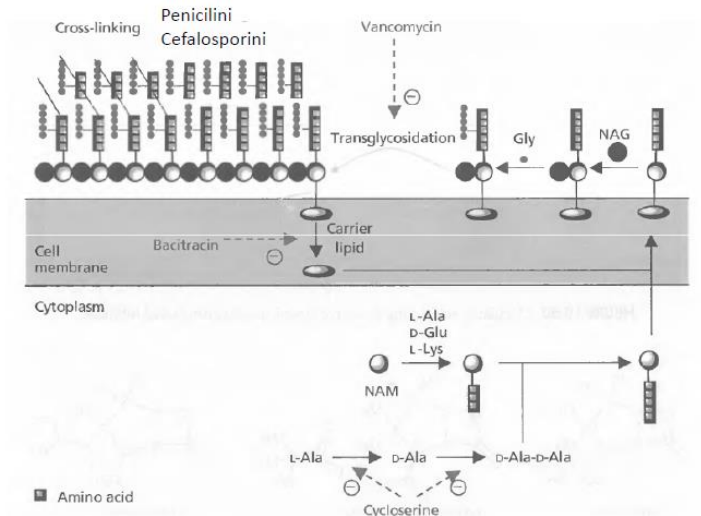
Tablica 5: 4 generacije cefalosporina

1.generacija	2.generacija	3.generacija	4.generacija
cefalotin	cefamicin c	cefotaksim	Cefepim
cefaloridin	cefoksitin	ceftizoksim	Cefpirom
cefaleksin	cefuroksim	ceftriakson	
cefazolin		ceftazidim	
		cefiksim	
		ceftibuten	
		cefoperazon	

Cefalosporini su klasificirani u četiri generacije. Prva generacija cefalosporina dobro djeluje na Gram pozitivne, a slabo na Gram negativne bakterije. Većina Gram pozitivnih koka (iznimka su enterokoki, meticilin rezistentni *S.aureus* i *S.epidermidis*) su osjetljivi na prvu generaciju cefalosporina dok su sojevi *B.fragilis* rezistentni. Koriste se u liječenju infekcija kože i mekih tkiva. Druga generacija cefalosporina ima pojačano djelovanje na Gram negativne bakterije, ali su manje djelotvorni od treće generacije. Cefoksitin, cefotetan i cefmetaol djeluju na *B.fragilis*. Koriste se u liječenju infekcija respiratornog trakta. Treća generacija cefalosporina slabije djeluje na Gram pozitivne koke od prve generacije, ali je puno aktivnija protiv *Enterobacteriaceae*, uključujući sojeve koji proizvode β -laktamazu. Ceftazidin i cefoperazon su djelotvorni protiv *P.aeruginosa*, ali slabije djeluju od ostalih cefalosporina treće generacije na Gram pozitivne koke. Četvrta generacija (cefepim) ima

proširen spektar djelovanja u usporedbi s trećom generacijom i otporniji su na hidrolizu β -laktamazama. Osobito je djelotvorna u empirijskom liječenju ozbiljnih infekcija u hospitaliziranih pacijenata kad nije poznat uzročnik (Gram pozitivne bakterije, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*). Koriste se u liječenju ozbiljnih infekcija kojima je uzročnik *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* i *Haemophilus spp.* Lijekovi su izbora u liječenju meningitisa uzrokovanog *H.influenzae*, osjetljivog *S.pneumoniae*, *N.meningitidis*. Nijedan cefalosporin ne djeluje na penicilin rezistentni *S.epidermidis* i ostale koagulaza negativne stafilokoke (*Enterococcus*, *L. monocitogenes*, *Legionella pneumophila*, *L. micdadei*, *C. difficile.*, *Xanthomonas maltophilia*, *Campylobacter jejuni*, *Acinetobacter spp.*) (Brunton i sur., 2008).

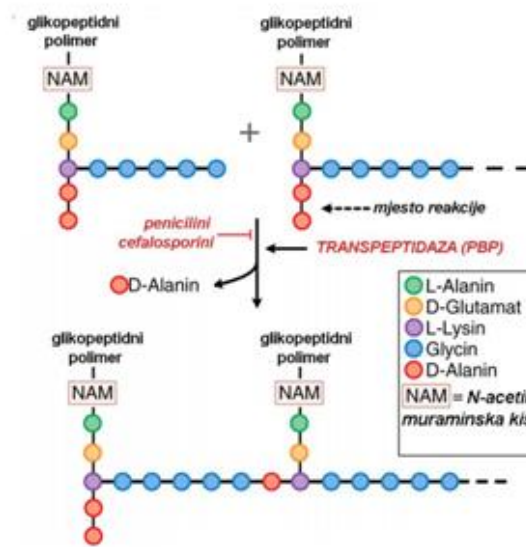
1.4.2. Mehanizam djelovanja



Slika 17: SINTEZA STANIČNE STIJENKE BAKTERIJA: 1. povezivanje NAM-a i tripeptida L-Ala-D-Glu-L-Lys. 2. Racemizacija L-Ala u D-Ala (L-Ala racemaza). 3. Nastajanje D-Ala-D-Ala dipeptida (D-Ala-D-Ala ligaza). 4. Vezanje dipeptida na NAM-tripeptid 5. Vezanje NAM-pentapeptida na lipidni nosač koji ih prenosi kroz staničnu membranu do vanjske površine bakterije. 6. Povezivanje NAM-pentapeptida i NAG-a. 7. Vezanje pentaglicinskog mosta na L-Lys. 8. Vezanje disaharidnih jedinica u rastući peptidoglikan (transglikozidaza). 9. Poprečno povezivanje peptidnih lanaca (transpeptidaza) (preuzeto iz: www.moodle.srce.hr).

Mehanizam djelovanja cefalosporina analogan je mehanizmu djelovanja penicilina. Vežu se u aktivno mjesto transpeptidaze esterskom vezom te ireverzibilno inhibiraju taj enzim, čime je

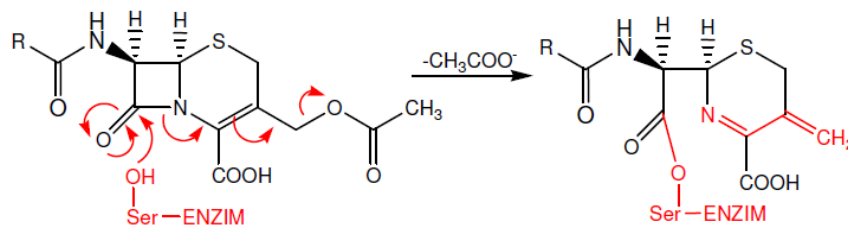
spriječeno daljnje poprečno povezivanje peptidnih lanaca što uzrokuje lizu stanice (baktericidno djelovanje).



Slika 18: Zbog strukturne sličnosti s D-alanin D-alanin ostatkom na NAM podjedinicama peptidoglikana ireverzibilno se vežu za aktivno mjesto (Ser403) na PBP s transpeptidaznom aktivnosti i sprječavaju transpeptidaciju.

Hidrolitičko uklanjanje završnog alanina daje potrebnu energiju za transpeptidaciju (preuzeto iz:

www.doctorlib.info).



1.4.3. Spektar djelovanja

Cefiksime je baktericid otporan na hidrolizu β -laktamazama, ima mehanizam djelovanja treće generacije cefaloporina, ali neke *Enterobacteriaceae* su manje osjetljive na cefiksime. *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* i *Neisseria gonorrhoeae* su osjetljive, uključujući i sojeve koji produciraju β -laktamazu. Od Gram pozitivnih bakterija, streptokoki su osjetljivi na cefiksime dok većina sojeva stafilokoka, enterokoka i *Listeria spp.* nisu. *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacteroides spp.* su rezistentni na cefiksime (Brunton i sur., 2008)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U posljednjih se desetak godina velika pozornost posvećuje razvoju novih terapijskih sustava temeljenih na nanočesticama. Konvencionalni sustavi imaju brojna ograničenja koja se mogu nadvladati primjenom novih terapijskih sustava koji omogućuju ciljano djelovanje lijekova, veću bioraspoloživost te smanjenje nuspojava. Ciljana isporuka lijeka na sluznice, odnosno lokalno djelovanje lijeka imperativ je koji se želi postići.

Mukozne membrane nalaze se u brojnim dijelovima tijela kao što su oči, respiratorni trakt, gastrointestinalni trakt i reproduktivni sustav. Konvencionalne nanočestice u mukozni ostaju zarobljene zbog adherencije ili steričkih smetnji te se brzo eliminiraju mukocilijarnim klirensom. Prisutnost mukoznih sluznica na membranama ovih sustava u mnogim slučajevima je prepreka za isporuku lijeka. Mukoadhezivni oblici nanočestica omogućuju dostavu lijeka na mjesto primjene bez sistemske apsorpcije i nuspojava te produljeno djelovanje lijekova.

Gantrez AN, kopolimer metil vinil etera i anhidrida maleinske kiseline (PVM/MA), kao biokompatibilni materijal pogodan je za pripremu bioadhezivnih nanočestica. Razvoj bioadhezivnih oblika dostave lijekova trenutno je u interesu i konvencionalne terapije i novih terapijskih sustava.

Cilj ovog istraživanja bio je prirediti mukoadhezivne nanočestice s cefiksimom, optimirati uvjete pripreme te ispitati njihova fizikalna svojstva i uklapanje lijeka u nanočestice. Mukoadhezivne nanočestice pripremljene su metodom jednostavne desolvacije i karakterizirane mjerenjem zeta potencijala i veličine čestice te uklapanja lijeka. Također je proveden razvoj i validacija HPLC metode korištene u eksperimentalnom dijelu rada.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Korištene supstancije i otopine:

- GANTREZ AN-169 polimer (Ashland Industries Europe GMBH)
- Cefiksim trihidrat (Berlin-Chemie Menarini d.o.o.)
- Aceton (Sigma)
- Acetonitril (Chromasolv®, Sigma)
- Aqua purificata
- 10 mmol otopina NaCl
- Glukoza monohidrat (Kemig d.o.o.)
- Laktoza monohidrat (Kemig d.o.o.)
- 5 %-tna otopina laktoze (priređena otapanjem 5 g laktoza monohidrata u 100 mL pročišćene vode)
- 5 %-tna otopina glukoze (priređena otapanjem 5 g glukoza monohidrata u 100 mL pročišćene vode)

Instrumenti i pribor:

- rotirajući vakuum uparivač (Büchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska)
- HPLC instrument (Shimadzu LC-10AD, Kyoto, Japan)
- HPLC kolona capcell pack C-18, dimenzija 250 x 4.6 mm, veličina zrnaca 5 µm (Kinetex, Phenomenex, SAD)
- zetasizer (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija)
- filteri veličine pora 0,45 µm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka)
- filteri veličine pora 0,22 µm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka)
- liofilizator (alpha-1.4, Christ Martin, Njemačka)
- Biofuge centrifuga (Heraus, Njemačka)
- analitička vaga (Mettler Toledo, Njemačka)
- vorteks Vibromix, miješalica za epruvete (Fisher Scientific, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema nanočestica

Nanočestice sa uklopljenim cefiksimom pripremljene su metodom jednostavne desolvacije. Preparacije su rađene u duplikatu. 200 mg GANTREZ-a otopljeno je u 4 mL acetona u tikvici okruglog dna, nakon što se polimer otopio dodana su još 2 mL acetona. 20 mg cefiksima otopljeno je u 4 mL acetona. Otopina lijeka dodana je otopini polimera uz miješanje 1 minutu. Zatim je kap po kap, uz miješanje 800 okretaja u minuti, dodavano 10 mL, 20 mL, 30 mL i 50 mL vode. Tako priređene disperzije uparavane su pomoću rotirajućeg vakuum uparivača (Büchi Rotavapor R-200) do potpunog otparavanja acetona. Tijekom uparavanja, uzorci su termostatirani u vodenoj kupelji na temperaturu od 40 °C. Nakon uparavanja se uzorak prenese u odmjernu tikvicu od 25 mL koju se nadopuni do oznake.

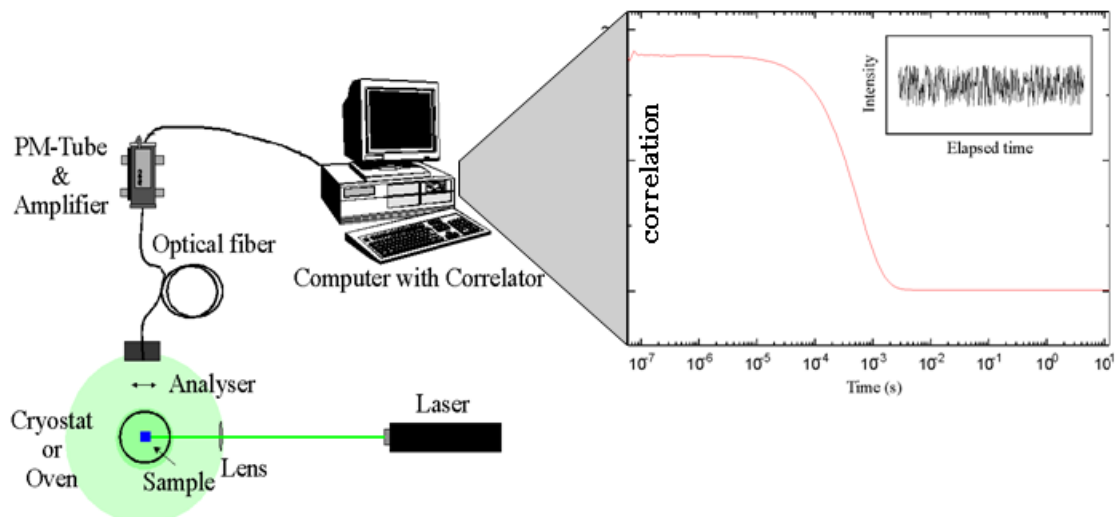


Slika 19: Metoda pripreme nanočestica (preuzeto iz: www.elsevier.es)

300 μ L uzorka se razrijedi i koristi za određivanje veličine nanočestica i zeta potencijala. Uzorak se zatim prenese u epruvetu za centrifugiranje i centrifugira pri 4 °C na 18 000 g tijekom 20 minuta. 2 mL supernatanta prenese se u eppendorf epruvete te zamrzne do analize uklapanja lijeka. Talog se nakon centrifugiranja resuspendira sa 5 mL 5 %-tnih otopina krioprotektanata glukoza monohidrata i laktoza monohidrata (A_{LMH} i B_{GMH}), uzorci se zamrznu do liofilizacije. Nakon liofilizacije nanočestice se redispergiraju u vodi i odredi im se veličina i zeta potencijal.

3.2.2. Određivanje veličine nanočestica

Srednji promjer i indeks polidisperznosti nanočestica određen je foton korelacijskom spektroskopijom (*photon correlation spectroscopy*, PCS) na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern instruments, Malvern, Velika Britanija). Foton korelacijska spektroskopija temelji se na nasumičnom kretanju čestica u tekućini ili plinu (Brownovo gibanje). Kretanje tih čestica opisuje Stokes-Einstein jednadžba: $D = \frac{k_B \times T}{6\pi\eta R}$. Difuzija (D) jednaka je produktu Boltzmannove konstante (k_B) podijeljenim sa hidrodinamičkim promjerom čestica (R) i viskoznošću otapala (η). Veće čestice imaju manji koeficijent difuzije. Laser (HeNe) svjetlošću poznate valne duljine obasjava uzorak razrijeđen u otopini, raspršena svjetlost dolazi do detektora koji koristeći razne matematičke algoritme određuje raspodjelu veličine čestica uzorka (www.pssnicomp.com).



Slika 20: Prikaz principa rada foton korelacijskog spektroskopa (preuzeto iz: www.slideplayer.com)

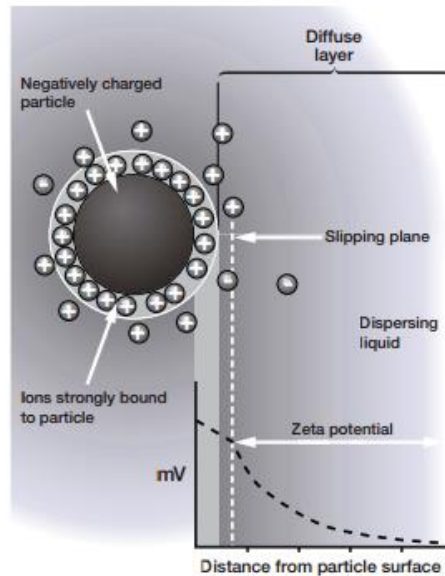
Uzorci za mjerenje foton korelacijske spektroskopije moraju se sastojati od dobro dispergirane faze u suspendirajućem mediju. Mora postojati razlika između indeksa refrakcije disperzne faze i medija, a indeks refrakcije otapala mora biti poznat. Viskoznost na određenoj temperaturi mora biti poznata (temperaturni raspon od 10 do 60 °C). Otapalo mora biti čisto, filtrirano kroz membranske filtere (Malvern Instruments, 2013).

Uzorak za ispitivanja veličine nanočestica pripremljen je uzimanjem 300 μ L otopine uzorka nakon uparavanja i dodatkom 10 mL 10 mmol otopine NaCl (spriječava agregaciju čestica

prilikom mjerenja) koja je prethodno filtrirana kroz filtere Minisart veličine pora 0,45 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka). Mjerenje je provedeno na 25 °C.

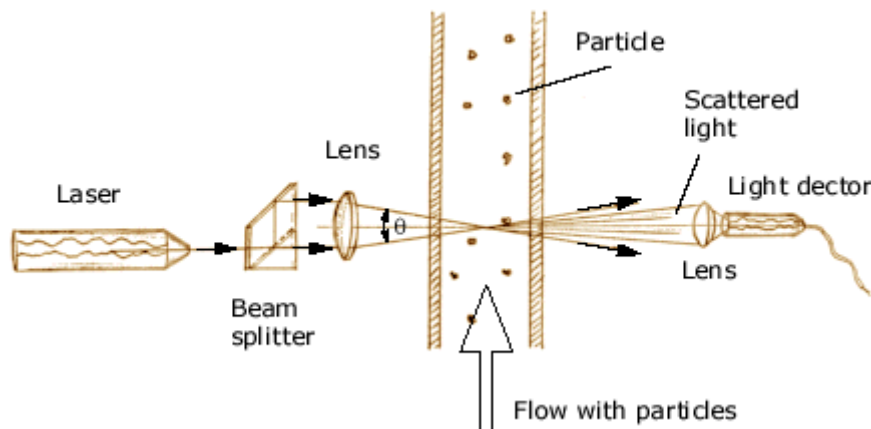
3.2.3. Određivanje zeta potencijala nanočestica

Zeta potencijal mjeren je na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern instruments, Malvern, Velika Britanija). Većina otopina sadrži ione, katione i anione. Kada je dispergirana čestica nabijena (bilo pozitivno ili negativno) ona će privlačiti ione suprotnog naboja na svoju površinu. Ioni suprotnog predznaka koji se nalaze blizu površine nabijene čestice bit će snažno vezani, neposredno uz njih je sloj suprotno nabijenih iona koji čine Sternov sloj. Ioni koji su udaljeni od površine nabijene čestice slabije su vezani i tvore difuzijski sloj (Gouy-Chapmanov sloj). Kada nabijene dispergirane čestice stavimo u električno polje one putuju prema elektrodi suprotnog predznaka, i ta se pojava naziva elektroforetskom pokretljivošću. Zajedno s česticom giba se i Sternov sloj te dio „vezanih“ molekula otapala, odnosno mali volumen medija odijeljen od ostalih molekula otapala plohom smicanja. Potencijal na udaljenosti te plohe smicanja zove se elektrokinetički (ζ) zeta potencijal. ζ potencijal važan je jer se može veoma lako odrediti iz elektroforetske pokretljivosti čestica, a o njemu i naboju na površini dispergirane faze ovisi stabilnost disperzija (Jalšenjak i sur., 1998). Poznavanje zeta potencijala nanočestica može pomoći predvidjeti sudbinu nanočestica u *in vivo* uvjetima te stabilnost tijekom skladištenja. Ako sve čestice u uzorku imaju velik negativni ili pozitivni zeta potencijal težit će međusobnom odbijanju, stoga neće doći do agregacije čestica. Čestice sa zeta potencijalom pozitivnijim od +30 mV i negativnijim od -30 mV obično se smatraju stabilnim (Laouini i sur., 2012).



Slika 21: Prikaz nabijene čestice u električnom polju (preuzeto iz: Malvern Instruments, 2013).

Zeta potencijal se može mjeriti kombinacijom elektroforeze i Laser Doppler Velocimetry (LDV). Ova metoda mjeri koliko se brzo čestica kreće u otapalu kad se nalazi u električnom polju. Kada znamo brzinu kretanja čestice u električnom polju i jačinu primjenjenog električnog polja, možemo pomoću poznatih konstanti (viskoznost i dielektrična konstanta) odrediti zeta potencijal.



Slika 22: Laser Doppler Velocimetry optički sistem (preuzeto iz: www.velocimetry.net).

Kalibracija uređaja provedena je upotrebom standardne otopine (Zeta Potential Transfer Standard, Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija) čiji zeta potencijal iznosi $-42 \pm 4,2$ mV. Uzorak za određivanje zeta potencijala pripremi se uzimanjem 300 μ L uzorka nakon uparavanja te se doda 10 mL 10 mmol otopine NaCl koja je prethodno filtrirana kroz filtere

Minisart veličine pora 0,45 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka). Uzorak je injektiran u kolonu instrumenta i izvršeno je mjerenje zeta potencijala.

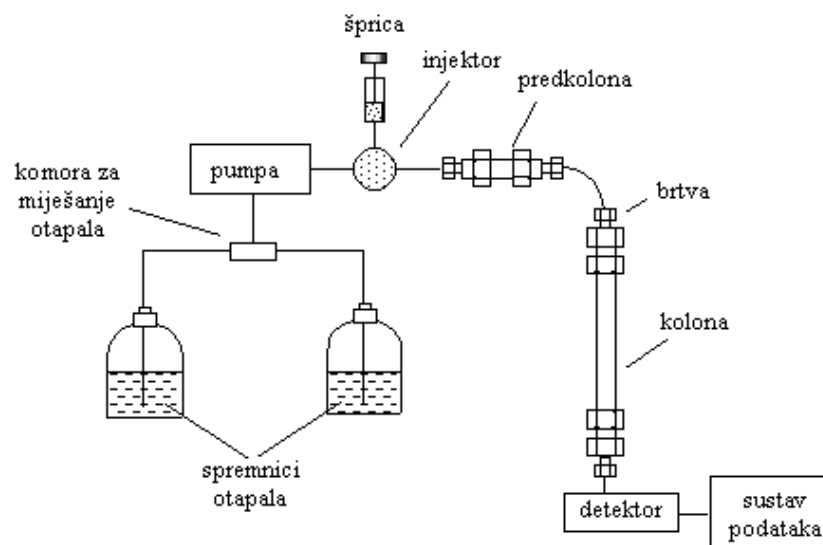
3.2.4. Određivanje sadržaja cefiksima

Za detekciju i određivanje sadržaja cefiksima u uzorcima koristila se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (high performance liquid chromatography, HPLC). Mjerenja su provedena na uređaju Shimadzu LC – 10 AD (Kyoto, Japan) koristeći C18 kolonu obrnutih faza (Kinetex, Phenomenex). Uvjeti kromatografske analize bili su sljedeći:

- Mobilna faza: acetonitril s fosfatnim puferom (0,01M) u omjeru 70:30; pH 7,5
- Protok mobilne faze: 1,2 ml/min
- Temperatura: 40°C
- Valna duljina detekcije: 287 nm (UV-VIS detektor)

Prije injektiranja uzoraka na kolonu svaki uzorak filtriran je kroz filtere veličine pora 0,22 μm kako bi se izbjegla bilo kakva mogućnost oštećenja kolone..

HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) je visoko efikasna razdjeljna kromatografija koja se u 75 % primjena danas koristi kao kromatografija obrnutih faza. Osnovni konstitucijski dijelovi u HPLC kromatografu su rezervoar za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, po mogućnosti predkolona, kolona za odjeljivanje i detektor (slika 24) (Luterotti, 2002).



Slika 23: Shematski prikaz HPLC kromatografa (preuzeto iz: Luterotti, 2002).

HPLC metoda koristi se za određivanje onečišćenja u farmaceutskim tvarima, za kvantitativnu analizu farmaceutskih tvari i gotovih proizvoda, praćenje stabilnosti ljekovitih tvari, praćenje oslobađanja ljekovite tvari iz farmaceutskog oblika. Kromatografske metode u kvantitativnoj analizi zahtijevaju upotrebu kemijskih poredbenih tvari. Određivanje sadržaja kromatografskim tehnikama može se provesti metodom s vanjskim standardom, metodom s unutrašnjim standardom te postupkom kalibracije. U postupku kalibracije se upotrebljava koncentracijski niz poredbenih otopina. Kalibracijska krivulja se dobiva mjerenjem niza poredbenih otopina različitih koncentracija za koje je odnos površine pikova i koncentracije linearan. Pomoću kalibracijske krivulje se iz izmjerene površine pika ispitivane tvari izračuna sadržaj ispitivane tvari (Nigović i sur., 2014).

3.2.5. Ispitivanje uklapanja cefiksima u nanočestice

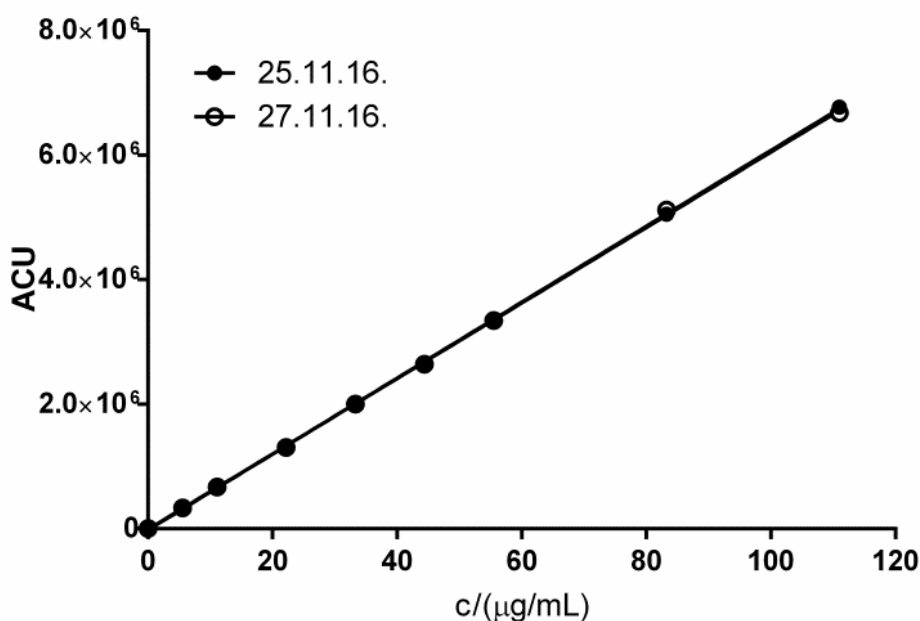
Ispitivanje uklapanja lijeka u nanočestice provedeno je pomoću HPLC metode. Iz dobivenih površina ispod pika (AUC) uzorka uz pomoć kalibracijskog pravca dobivena je koncentracija cefiksima u uzorku. Uzorci za ispitivanje uklapanja lijeka u nanočestice uzeti su nakon centrifugiranja (2mL supernatanta). Iz omjera početne koncentracije cefiksima otopljenog u acetonu i koncentracije cefiksima nakon formiranja nanočestica dobije se postotak uklapanja lijeka u nanočestice.

$$\text{Postotak uklopljenog lijeka} = \left[1 - \frac{c(\text{uzorak nakon centrifugiranja})}{c(\text{cefiksima u acetonu})} \right] \times 100$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Izrada baždarnog dijagrama

Matična otopina pripravljena je otapanjem 5,55 mg cefiksima u 50 mL mobilne faze (ACN: 0,05 M K_2HPO_4 , 70:30). Razrijeđivanjem matične otopine s mobilom fazom dobivene su otopine različitih koncentracija, redom od 10,10 $\mu\text{g/mL}$, 20,20 $\mu\text{g/mL}$, 30,30 $\mu\text{g/mL}$, 40,40 $\mu\text{g/mL}$, 50,50 $\mu\text{g/mL}$, 83,25 $\mu\text{g/mL}$ i 111,00 $\mu\text{g/mL}$. Za svaku je otopinu kromatografski određena površina ispod krivulje (AUC) u triplikatu, uzastopno dva dana pri valnoj duljini 287 nm. Analizom srednjih aritmetičkih vrijednosti AUC u ovisnosti o koncentraciji lijeka, izrađen je kalibracijski pravac (slika , $y = \text{AUC}$, površina ispod krivulje; $x = c$ ($\mu\text{g/mL}$), koncentracija lijeka). Dobivena je jednažba kalibracijskog pravca ($y = 60948x - 21809$) pomoću koje su na osnovu dobivenih vrijednosti AUC tijekom analize uklapanja lijeka u nanočestice izračunavane koncentracije cefiksima u uzorcima.



Grafički prikaz 1: Kalibracijski pravac cefiksima u sustavu acetonitril i KH_2PO_4 u omjeru 70:30 izmjeren na 287 nm u dva uzastopna dana

Validacija analitičkog postupka utvrđuje prikladnost ispitivanog analitičkog postupka za određenu primjenu. Validacija analitičkog postupka jamči da će se u propisanim uvjetima

njegove primjene dobiti valjani rezultati. Prema regulatornim zahtjevima Dobre proizvođačke prakse (GMP) i Dobre laboratorijske prakse (GLP) postupci validacije analitičkih postupaka postali su obveza. Postupci provođenja validacije analitičkih metoda propisani su ICH smjernicom Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 2006. Analitičke značajke koje se određuju postupkom validacije su: preciznost, specifičnost/selektivnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost i radno područje, točnost i izdržljivost (otpornost). Analitički postupak se razvija i validira sve dok validacijski parametri ne zadovolje zahtjeve predviđene određenim propisima. Analitički postupak treba detaljno opisati kako bi ga svaki analitičar mogao ponoviti. Opis analitičkog postupka uključuje pripravu uzorka, poredbenih tvari i reagensa, opis mjernih uređaja i instrumentalnih parametara analize, kao i primjenu formula za izračunavanje rezultata analize.

Preciznost analitičke metode izražava podudaranje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. S obzirom na uvjete ispitivanja, preciznost se može iskazati kao ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) i obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost označava podudaranje rezultata dobivenih istom metodom pod istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu. Srednja preciznost označava odstupanje rezultata dobivenih pod različitim uvjetima u istom laboratoriju (različiti dani, analitičari, instrumenti, kolone, reagensi). Obnovljivost označava odstupanje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima. Preciznost se izražava statističkim veličinama kao standardno odstupanje (SD), relativno standardno odstupanje (RSD, %) ili raspon pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Ovim validacijskim parametrom se ispituje hoće li metoda nakon razvoja davati iste rezultate tijekom uporabe u laboratoriju. Podaci o dnevnoj i međudnevnoj preciznosti za razvijenu metodu prikazani su u Tablici 6. i 7. te dobivene vrijednosti zadovoljavaju postavljene zahtjeve.

Tablica 6. Dnevna preciznost HPLC metode za određivanje sadržaja CFX u ispitivanim uzorcima. AUC je površina ispod pika na kromatogramu, SD standardna devijacija mjerenja, a RDS relativna standardna devijacija kao pokazatelj preciznosti metode.

c(CFX)/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	AUC ₁	AUC ₂	AUC ₃	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
5,55	337479,8	336029,6	320739,4	331416,3	9274,8	2,80
11,10	651331,5	672957,5	661849,7	662046,2	10814,3	1,63
22,20	1341166,9	1349074,9	1300985,3	1330409,0	25786,6	1,94
33,30	2011931,0	1961861,4	2011986,5	1995259,6	28923,7	1,45
44,40	2625513,7	2637090,1	2623844,8	2628816,2	7213,8	0,27
55,50	3362178,5	3384653,5	3332982,5	3359938,2	25908,2	0,77
83,25	5155512,8	5016973,2	4983014,8	5051833,6	91380,1	1,81
111,00	6832361,5	6711045,2	6762865,5	6768757,4	60872,4	0,90

Tablica 7. Međudnevna preciznost HPLC metode za određivanje sadržaja CFX u ispitivanim uzorcima. AUC je površina ispod pika na kromatogramu, SD standardna devijacija mjerenja, a RDS relativna standardna devijacija kao pokazatelj preciznosti metode.

c(CFX)/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	AUC		Srednja vrijednost	SD	RDC(%)
	Dan 1	Dan 2			
5,55	331416,3	332909,8	332163,1	1056,1	0,3
55,50	3359938,2	3341923,4	3350930,8	12738,3	0,4
111,00	6768757,4	6677573,4	6723165,4	64476,8	1,0

Specifičnost analitičke metode je njezina sposobnost da razlikuje ispitivani analit od ostalih komponenti uzorka pri određenim uvjetima ispitivanja. Optimirati metodu tako da ona prepoznaje samo određeni analit je jako teško, stoga se u praksi češće govori o selektivnosti analitičke metode. **Selektivnost** je mogućnost metode da točno odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenti uzorka, onečišćenja, razgradnih produkata, pomoćnih tvari, odnosno matrice uzorka. Ispitivanje selektivnosti analitičke metode za određivanje sadržaja ili čistoće provodi se dodatkom onečišćenja ili pomoćnih tvari čistoj tvari. Specifičnost određivanja lijeka osigurana je odabirom valne duljine (289 nm) pri kojoj se provodila detekcija analita, a koja odgovara apsorpcijskom maksimumu cefiksima.

Linearnost analitičke metode je parametar koji predstavlja sposobnost metode da u određenom intervalu daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Linearnost metode se određuje mjerenjem tri do šest puta primjenom najmanje pet različitih koncentracija analita. Dobivena kalibracijska krivulja predstavlja ovisnost analitičkog signala o koncentraciji analita, a linearnost se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca (k) koji treba biti veći od 0,999. Linearnost metode za određivanje

sadržaja cefiksima izražena je koeficijentom korelacije regresijskog pravca, a on iznosi $R = 0,9997$. Razvijena metoda pokazuje linearnost u rasponu koncentracija od 0 do 110 $\mu\text{g/mL}$.

Tablica 8. Podaci dobiveni analizom kalibracijskog pravca CFX.

koeficijent baždarnog pravca	odsječak na ordinati	linearnost	granica dokazivanja ($\mu\text{g/mL}$)	granica određivanja ($\mu\text{g/mL}$)	radno područje ($\mu\text{g/mL}$)
$60948 \pm 226,6$	-21809 ± 12194	0.9997	0.60	2.00	5.00-110.00

Radno područje je raspon između gornje i donje koncentracije analita u uzorku unutar kojega primjenjena analitička metoda ima zadovoljavajuću točnost, preciznost i linearnost. Preporučeno radno područje za određivanje sadržaja aktivne tvari je od 80 do 120 %. Radno područje razvijene metode je u rasponu od 5,00 do 110,00 $\mu\text{g/mL}$, što odgovara postavljenim zahtjevima.

Točnost analitičke metode označava podudaranje srednje vrijednosti dobivenih rezultata s referentnim vrijednostima. Za utvrđivanje točnosti provode se najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije unutar radnog područja metode. Odstupanje od stvarne vrijednosti izražava se kao analitički prinos (engl. *recovery*).

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) je najniža koncentracija analita koja se pri zadanim uvjetima analitičke metode može dokazati, ali ne i točno odrediti. Granica dokazivanja određena je iz prikazane jednadžbe gdje σ označava standardnu devijaciju odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, a a nagib kalibracijskog pravca.

$$LOD = \frac{3 \times \sigma}{a}$$

Granica određivanja (engl. *limit of quantitation*, LOQ) je najniža koncentracija analita koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima analitičke

metode. Granica određivanja određena je iz prikazane jednadžbe gdje σ označava standardnu devijaciju odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, a a nagib kalibracijskog pravca.

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a}$$

Vrijednosti LOD i LOQ nalaze se u Tablici 8. te odgovaraju namjeni analitičke metode.

Izdržljivost/otpornost (engl. *robustness*) analitičke metode je mjera sposobnosti metode da ostane nepromijenjena pri malim, namjernim promjenama uvjeta metode.

4.2. Fizikalne karakteristike nanočestica

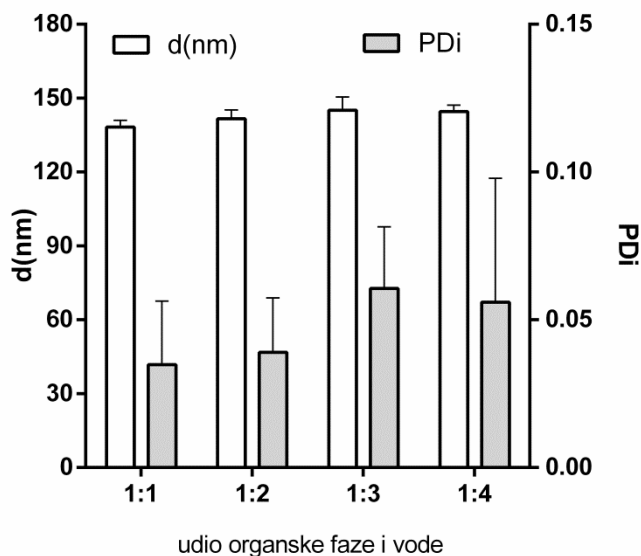
Nanočestice su pripravljene metodom jednostavne desolvacije polimera kako je opisano u poglavlju 3.2.1. Fizikalna svojstva nanočestica: veličina, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal određeni su fotonsko korelacijskom spektroskopijom (photon correlation spectroscopy, PCS). Rezultati su prikazani u Tablici 9. Prema dobivenim podacima veličina nanočestica kreće se od 138,3 nm do 145,1 nm s vrlo niskim indeksom polidisperznosti od 0,035 do 0,061. Raspon veličina nanočestica pripremljenih uzoraka je u skladu s ranije objavljenim podacima.

Tablica 9. Sastav i tehnološke karakteristike pripremljenih nanočestica: veličina, polidisperznosti (PDi), zeta potencijal (ζ) i postotak uklapanja lijeka.

uzorak	omjer vodene i organske faze	d/nm	PDi	Z (mV)	% uklapanja
1.	1:1	138,3±2,7	0,035	-42,0±2,3	9,41±2,17
2.	1:2	143,6±3,7	0,039	-43,1±0,9	10,11±2,90
3.	1:3	145,1±5,3	0,061	-41,4±2,4	15,10±0,87
4.	1:5	144,6±2,6	0,042	-41,7±1,4	5,25±1,35

4.3. Utjecaj dodatka različitih volumena vode preparaciji nanočestica

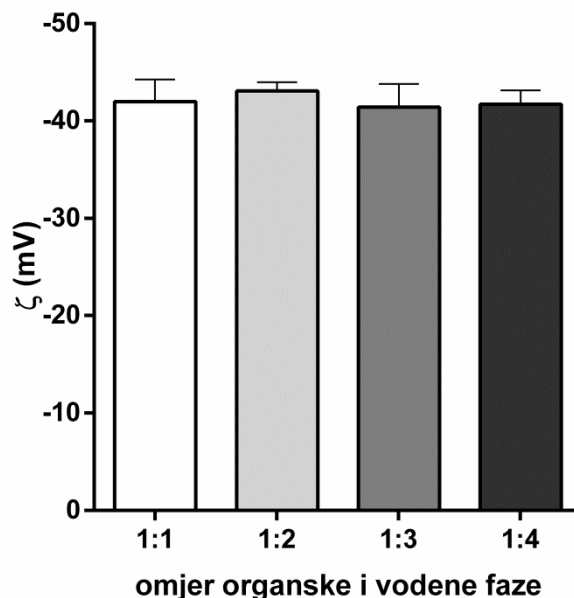
Postupak pripreme nanočestica opisan je u poglavlju 3.2.1. Nakon dodatka 10 mL, 20 mL, 30 mL i 50 mL vode dobivene su različite vrijednosti veličine nanočestica, polidisperznosti, zeta potencijala i postotka uklapanja cefikima u nanočestice.



Grafički prikaz 2: Utjecaj omjera organske i vodene faze na veličinu i polidisperznost (Pdi) pripremljenih nanočestica s cefiksimom

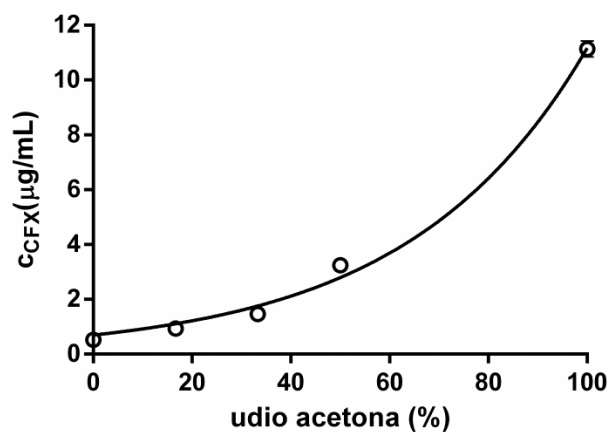
Iz Grafičkog prikaza 2. može se zaključiti da je veličina nanočestica u blagom porastu povećanjem omjera organske i vodene faze, no ove varijacije veličine nanočestica nisu od statističkog značaja. Također, porast je vidljiv i u indeksu polidisperznosti, odnosno raznovrsnosti veličina dobivenih čestica.

Zeta potencijal dobivenih nanočestica blago varira dodatkom različitih volumena vode u sustav (Grafički prikaz 3.). Ono što je bitno, uvijek je manji od -30 mV što znači da neće doći do agregacije nanočestica. Naime, smatra se da su čestice koje imaju zeta potencijal negativniji od -30 mV ili pozitivniji od +30 mV stabilne (Laouini i sur., 2012).

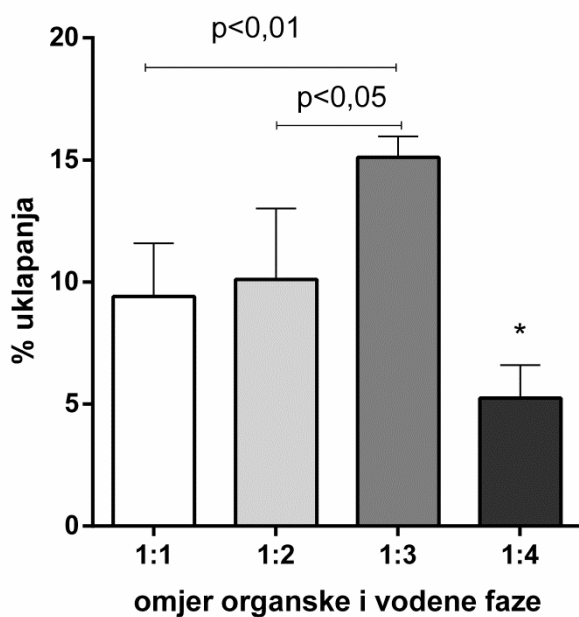


Grafički prikaz 3: Utjecaj omjera organske i vodene faze na zeta potencijal (ζ) pripremljenih nanočestica s cefiksimumom

Prema grafičkom prikazu 5., učinkovitost uklapanja cefiksima u nanočestice ovisi uvelike o količini dodane vode u preparaciju. Kao što je u poglavlju 1.4.1. opisano, cefiksimum je slabo topljiv u vodi te umjereno topljiv u acetonu, stoga njegova topljivost ovisi o udjelu acetona u smjesi s vodom. Iz grafičkog prikaza 4. može se zaključiti da topljivost cefiksimuma raste što je udio acetona u smjesi s vodom veći. Dodatkom veće količine vode u formulaciju cefiksimum ostaje otopljen u organskoj fazi, a Gantrez AN polimer dodatkom vode u organsku fazu „bježi“ od molekula vode i spontano formira nanočestice. Prema dobivenim rezultatima najveće uklapanje cefiksimuma u nanočestice postignuto je pri 1:3 omjeru organske i vodene faze. Pri omjeru organske i vodene faze 1:4, uklapanje lijeka je znatno niže, što je posljedica najvjerojatnije većeg zaostajanje otopljenog cefiksimuma u matičnici. Iako je topljivost lijeka u sustavima s visokim udjelom vode relativno niska, relativno veliki volumen vodene faze (50 mL) osigurava otapanje značajne frakcije cefiksimuma te je stoga njegovo uklapanje u anhidridne nanočestice niže.



Grafički prikaz 4: Utjecaj volumnog udjela acetona u smjesi s vodom na topljivost cefiksima pri sobnoj temperaturi.

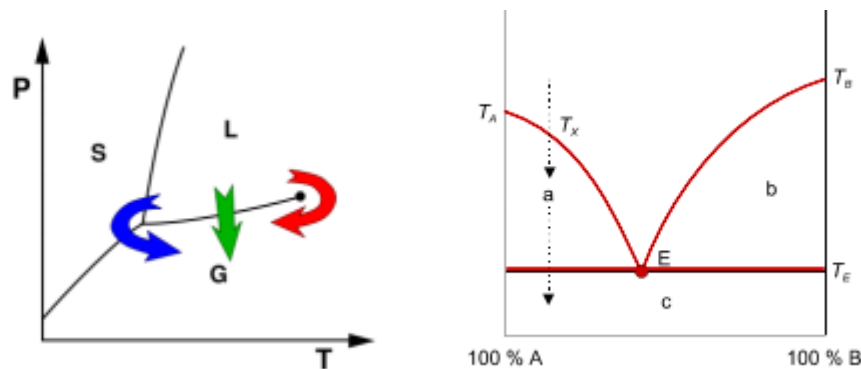


Grafički prikaz 5: Utjecaj omjera vodene i organske faze pri izradi na učinkovitost uklapanja cefiksima u nanočestice.

4.4. Utjecaj postupka liofilizacije na fizikalna svojstva nanočestica

Uzorci uzeti nakon centrifugiranja (resuspendirani talog u otopini krioprotektanta) podvrgnuti su procesu liofilizacije. Liofilizacija ili sušenje smrzavanjem je postupak sušenja koji se

provodi za tvari nestabilne u vodenom mediju (antibiotici, proteini, hormoni, vitamini, cjepiva, krvna plazma, biotehnoški lijekovi). Materijal osušen smrzavanjem je porozan, amorfan, velike specifične površine i higroskopan, kao takav je lako topljiv u vodi („liofilan“). Liofilizacija se temelji na sublimaciji vode, odnosno izravnom prijelazu leda u vodenu paru ispod trojne točke. U trojnoj su točki sva tri agregatna stanja u ravnoteži, karakteristična je za svaku supstanciju, a za vodu je pri tlaku 0,61 kPa (4,58 mm Hg) i temperaturi 273,16 K (0,01 °C). Iznad trojne točke ravnoteža postoji između leda i vode (taljenje – smrzavanje) te vode i pare (isparavanje – ukapljivanje). U području ispod trojne točke u ravnoteži su led i vodena para. Vlažna tvar ili njezina otopina zamrzne se uz sniženi tlak pri niskoj temperaturi u liofilizatoru. Temperatura mora biti niža od eutektične točke smjese vode i tvari koja se liofilizira (Jalšenjak i sur., 1998).

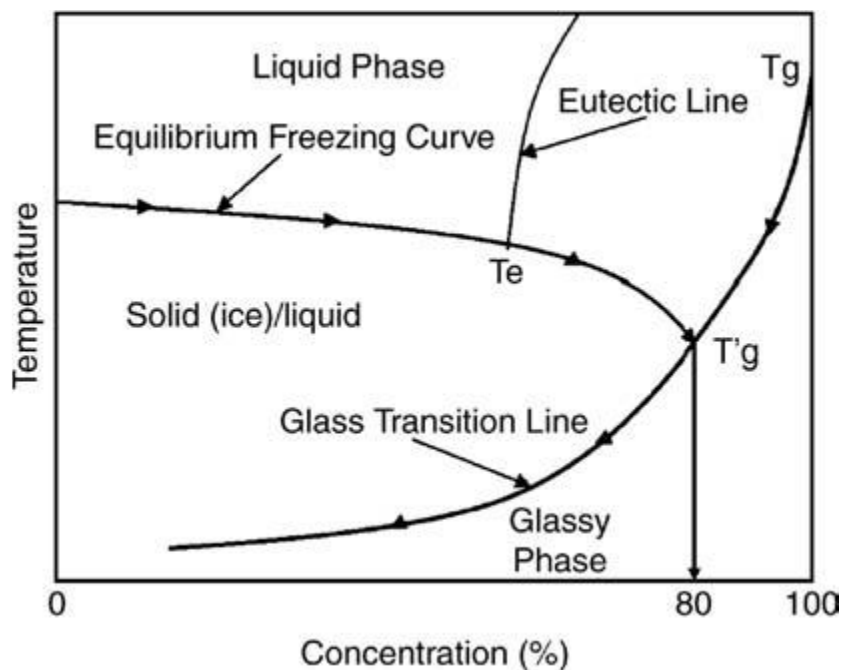


Slika 24: Fazni dijagram (ovisnost parcijalnog tlaka vodene pare o temperaturi) (lijevo), binarni dijagram eutektične smjese (desno) (preuzeto iz: www.wow.com)

Temperatura tališta bilo kojeg sustava smjese niža je od tališta pojedinih čistih supstancija. Eutektična temperatura je najniža temperatura taljenja i odgovara eutektičnom sastavu smjese. Tek kad se temperatura spusti ispod tališta eutektikuma kristaliziraju obje supstancije. Pri liofilizaciji se želi izbjeći voda pa se proces provodi pri temperaturama nižim od -30 °C jer voda stvara eutektične smjese sa supstancijama koje se liofiliziraju, a temperature eutektikuma se kreću od -20 °C do -30 °C. U liofilizatorima voda sublimira pri niskim tlakovima (vakuum) reda veličine 1,33 do 133 Pa. Sublimirana vodena para uklanja se iz prostora iznad tvari koju treba sušiti kemisorpcijom, adsorpcijom ili kondenzacijom na ohlađenim površinama. Za vrijeme liofilizacije potrebno je dovoditi toplinu sustavu jer se ona troši (toplina sublimacije analogna je latentnoj toplini isparavanja) (Jalšenjak i sur., 1998). Proces se provodi u tri koraka. Prvi korak je smrzavanje pri određenoj temperaturi. Postoje različite tehnike smrzavanja (programirano smrzavanje, korištenje unaprijed ohlađenih polica,

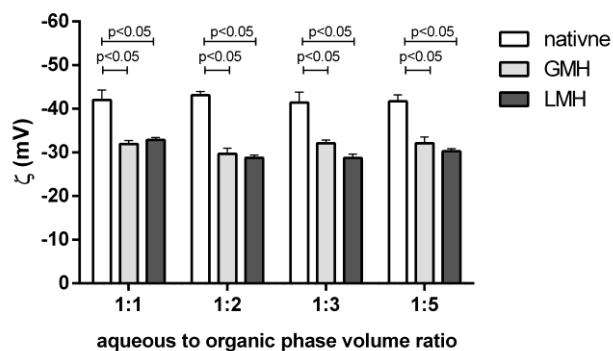
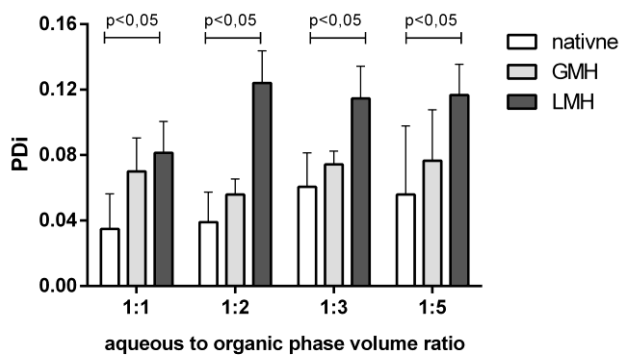
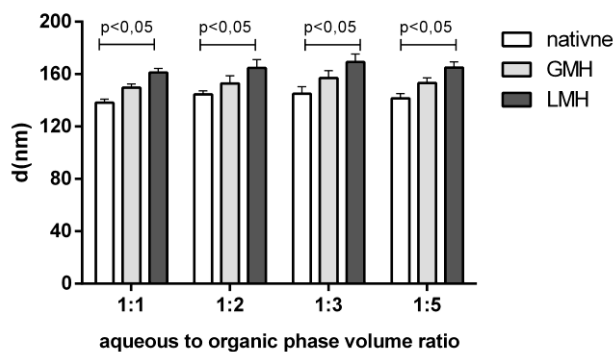
anealiranje, smrzavanje uranjanjem u tekući dušik ili propan). Zatim se materijal suši pri temperaturi od $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ u materijalu i $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ na površini kondenzatora. Taj se korak još naziva primarno sušenje, u kojem dolazi do sublimacije vode. Budući da je sublimacija proces koji se odvija na površini smrznute krutine jako je spor (približno 1 mm debljine leda sublimira po satu). Završni korak je naknadno sušenje pri povišenoj temperaturi i do $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz vakuum, odnosno sekundarno sušenje. Desorpcija (sekundarno sušenje) proces je uklanjanja molekula vode adsorbiranih na površini liofilizata, a traje trećinu do polovinu trajanja primarnog sušenja. Smrzavanjem pri višim temperaturama nastaju veći kristali koji brže sublimiraju pa je primarno sušenje kraće, a sekundarno sušenje duže. Obrnuto, smrzavanjem pri nižim temperaturama nastaju manji kristali koji stvaraju manje pore pa je primarno sušenje sporo, a sekundarno je brže zbog veće poroznosti. Za pripravke parenteralne namjene cijeli se proces liofilizacije provodi aseptički jer se materijal ne može naknadno sterilizirati (Jalšenjak i sur., 1998).

Proces liofilizacije ne smije utjecati na svojstva nanočestica (veličina, polidisperznost, površinski naboj, sadržaj i aktivnost djelatne tvari). Liofilizacija je stres koji može destabilizirati koloidnu suspenziju nanočestica (fuzija i udruživanje nanočestica, mehanički stres kristalima leda), stoga se suspenzijama nanočestica dodaju krioprotektanti koji štite nanočestice od stresa pri smrzavanju te lioprotektanti koji ih štite od stresa izazvanog sušenjem. Najčešći krioprotektanti su šećeri: trehaloza, saharoza, glukoza, fruktoza (Jalšenjak i sur., 1998). Ovi šećeri vitrificiraju pri određenoj temperaturi, T_g' (Pikal, 1999; Franks, 1982). Imobilizacija nanočestica unutar staklene matrice krioprotektanta štiti ih od agregacije i mehaničkog stresa ledenih kristala. Smrzavanje se mora provesti ispod T_g' ili ispod T_e (eutektična temperatura kristalizacije) (Tang i Pikal, 2004).



Slika 25: Fazni dijagram binarnog sustava sukroza-voda koji pokazuje T_g' (preuzeto iz: Abdelwahed i sur., 2006).

Postupak liofilizacije, kao što je ranije opisano u poglavlju, ne smije utjecati na svojstva nanočestica kao što su veličina, površinski naboj, polidisperznost, sadržaj i aktivnost djelatne tvari. Stoga, nakon postupka smrzavanja sušenjem ponovno su ispitivana svojstva nanočestica da bi se utvrdilo je li postupak liofilizacije utjecao na svojstva nanočestica. Budući da su korištena dva različita krioprotektanta, također su se dobiveni rezultati promatrali i u pogledu bolje učinkovitosti krioprotektanta. Dobiveni rezultati prikazani su na grafičkom prikazu 6. Iz dijagrama se može vidjeti da je nakon postupka liofilizacije došlo do porasta veličine nanočestica u svim preparacijama, u odnosu na krioprotektant veći porast veličine vidljiv je pri korištenju laktoze (laktoza monohidrat, LMH) kao krioprotektivnog sredstva. Indeks polidisperznosti (PDi) također je porastao nakon postupka liofilizacije u svim preparacijama, znatan porast indeksa polidisperznosti uočen je u preparacijama u kojima je kao krioprotektivno sredstvo korištena laktoza (laktoza monohidrat, LMH). Nadalje, došlo je do značajnih promjena i u zeta potencijalu čestica nakon procesa liofilizacije. S obzirom na reaktivnost anhidridnih polimera, može se zaključiti da je tijekom procesa smrzavanja došlo do vezanja šećera korištenih kao krioprotektanti na površinu čestica, uslijed čega su se promijenila i svojstva površine nanočestica. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je glukoza (glukoza monohidrat, GMH) bolji krioprotektant od laktoze (laktoza monohidrat, LMH), no svakako bi trebalo uzeti u obzir i druge krioprotektante, primjerice glicin.



Grafički prikaz 6: Utjecaj postupka sušenja smrzanjem te punila glukoe (GMH) i laktoze (LMH) na veličinu, polidisperznost (PDI) i zeta potencijal (ζ) pripremljenih nanočestica s cefiksimom.

5. ZAKLJUČCI

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

- Metoda jednostavne desolvacije polimera pokazala se vrlo učinkovitom za dobivanje nanočestica u laboratorijskim uvjetima.
- Veličina nanočestica dobivenih ovim postupkom bila je u rasponu od 138 do 144 nm.
- Izmjerene vrijednosti zeta potencijala manje od -30 mV (od -41,4 do -43,1) ukazuju na stabilne sustave nanočestica.
- Postotak uklapanja cefiksima u nanočestice najveći je kod 1:3 omjera organske faze i vode u preparaciji. Kod omjera 1:4 postotak je manji nego kod ostalih omjera što može biti posljedica agregacije polimera i nanočestica te zaostajanja otopljenog cefiksima u matičnici.
- Topljivost cefiksima je veća što je veći udio acetona u smjesi s vodom.
- Nakon postupka liofilizacije veličina i indeks polidisperznosti (PDI) nanočestica su se povećale. Korištenjem laktoza monohidrata (LMH) kao krioprotektanta porast veličine nanočestica veći je nego kod korištenja glukoza monohidrata (GMH) kao krioprotektanta dok je porast indeksa polidisperznosti (PDI) nanočestica znatan. Preparacije s glukoza monohidratom (GMH) kao krioprotektantom pokazuju blagi porast vrijednosti veličine i indeksa polidisperznosti (PDI) nanočestica. Primjenom oba šećera kao krioprotektanata dolazi do značajnije promjene zeta potencijala ispitivanih nanočestica. Glukoza monohidrat (GMH) je bolji krioprotektant za ove formulacije nanočestica jer najmanje utječe na fizikalna svojstva nanočestica, no svakako bi valjalo razmotriti i druge krioprotektante.

6. LITERATURA

- Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58, 1688–1713.
- Aka-Any-Grah A, Bouchemal K, Koffi A, Agnely F, Zhang M, Djabourov M, Ponchel G. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 76, 296–303.
- Akiyama Y, Nagahara N, Nara E, Kitano M, Iwasa S, Yamamoto I, Azuma J, Ogawa Y. Evaluation of oral mucoadhesive microspheres in man on the basis of the pharmacokinetics of furosemide and riboflavin, compounds with limited gastrointestinal absorption sites. *J Pharm Pharmacol*, 1998, 50, 159–166.
- Alexander A, Ajazuddin S, Mukesh S, Tripathi D. Polymers and permeation enhancers: specialized components of mucoadhesives. *Stamford J Pharm Sci*, 2011, 4(1), 91–95.
- Arbós P, Arangoa MA, Campanero MA, Irache JM. Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. *Int J Pharm*, 2002b, 242, 129-136.
- Arbós P, Wirth M, Arangoa MA, Gabor F, Irache JM. Gantrez AN as a new polymer for the preparation of ligand–nanoparticle conjugates. *J Contr Rel*, 2002a, 83, 321–330.
- Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280(5), 922–929.
- Bansil R, Stanley E, LaMont JT. Mucin biophysics. *Annu Rev Physiol*, 1995, 57, 635–657.
- Bansil R, Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2006, 11 (2–3), 164–170.
- Beck RCR, Haas SE, Guterres SS. Nanoparticle-coated organic-inorganic microprticles: experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation. *Quim Nova*, 2006, 29(5), 990-996.
- Berman JR, Bassuk J. Physiology and pathophysiology of female sexual function and dysfunction. *World J Urol*, 2002, 20, 111–118.

- Bhatta RS , Chandasana H, Chhonker YS, Rathi C, Kumar D, Mitra K i sur. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: in vitro and pharmacokinetics studies. *Int J Pharm*, 2012, 432 (1–2), 105–112.
- Biatry B. Cosmetic and/or dermatological use of a composition comprising at least one oxidation-sensitive hydrophilic active principle stabilized by at least one maleic anhydride copolymer. 2004. U.S. Patent,001,792A1.
- Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ, Moench TR. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod*, 2001, 16, 1809–1813.
- Boukari H, Brichacek B, Stratton P, Mahoney SF, Lifson JD, Margolis L, Nossal R. Movements of HIV virions in human cervical mucus. *Biomacromolecules*, 2009, 10, 2482-2488.
- Brown N, Rieley H, Smith I, Stockton J. Antiperspirant emulsion compositions. 2006. U.S. Patent,051,306A1.
- Brunton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton I. Goodman i Gilman's: Manual of Pharmacology and Therapeutics. New York, McGraw-Hill Professional, 2008, 741-748.
- Cao Q-R, Liu Y, Xu W-J, Lee B-J, Yang M, Cui J-H. Enhanced oral bioavailability of novel mucoadhesive pellets containing valsartan prepared by a dry powder-coating technique. *Int J Pharm*, 2012, 434 (1–2), 325–333.
- Chaussee J. Cleansing compositions containing alpha olefin/maleic anhydride terpoly- mers. 1986. U.S. Patent 4,603,005.
- Chemistry: vinyl ether polymers and copolymers, 2013, <http://www.ashland.com/industries/personal-and-home-care/oral-care/gantrez-an-polymers>, pristupljeno 18.5.2017.
- Chen EY, Wang YC, Chen CS, Chin WC. Functionalized positive nanoparticles reduce mucin swelling and dispersion. *PLoS One*, 2010, 15434.
- Chickering DE, Jacob JS, Desai TA, Harrison M, Morrell CN, Chaturvedi P, Mathiowitz E. Bioadhesive microspheres: III. An in vivo transit and bioavailability study drug-loaded alginate and poly(fumaric-co-sebacic anhydride) microspheres. *J Control Release*, 1997, 48, 35–46.

- Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61 (2), 75–85.
- Crater JS, Carrier RL. Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport. *Macromol Biosci*, 2010, 10(12), 1473–1483.
- Damge´ C, Vranckx H, Balschmidt P, Couvreur P. Poly- (alkyl cyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. *J Pharm Sci*, 1997, 86, 1403–1409.
- das Neves J, Amaral MH, Bahia MF. Performance of an in vitro mucoadhesion testing method for vaginal semisolids: influence of different testing conditions and instrumental parameters. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 69, 622–632.
- das Neves J, Amiji M, Sarmiento B. Mucoadhesive nanosystems for vaginal microbicide development: friend or foe? *John Wiley & Sons, Inc.*, 2011, 3(4), 389-399.
- Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73 (6), 1131–1141.
- Donnelly R, Mooney K, McCrudden M, Vicente-Pe´rez E, Belaid L, Gonza ´lez-Va ´zquez P, McElnay J, Woolfson A. Hydrogel-forming microneedles increase in volume during swelling in skin, but skin barrier function recovery is unaffected. *J Pharm Sci*, 2014, 103, 1478–1486.
- Donnelly R, Singh T, Garland M, Migalska K, Majithiya R, McCrudden C, Kole P, Mahmood T, McCarthy H, Woolfson A. Hydrogel-forming microneedle arrays for enhanced transdermal drug delivery. *Adv Funct Mater*, 2012, 22, 4879–4890.
- Ensign LM, Cone R, Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(6), 557–570.
- European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the safety of “Methyl Vinyl Ether-Maleic Anhydride Copolymer” (chewing gum base ingredient) as a Novel Food ingredient. *EFSA J*, 2013, 11(10), 3423.
- Franks F, *Water-a Comprehensive Treatise*, New York, Plenum press, 1982, str. 215–238.
- Fröhlich E, Roblegg E. Mucus as Barrier for Drug Delivery by Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 2014, 14, 126–136.
- Galindo-Rodriguez SA, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*, 2005, 22, 419–464.

- Gandhi RE, Robinson JR. Bioadhesion in drug delivery. *Ind J Pharm Sci*, 1988, 50, 145-152.
- Garg S, Anderson RA, Chany CJ II, Waller DP, Diao XH, Vermani K, Zaneveld LJ. Properties of a new acid-buffering bioadhesive vaginal formulation (ACIDFORM). *Contraception*, 2001, 64, 67–75.
- Greaves JL, Wilson CG. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 1993, 11, 349–383.
- Gregory J. Polymers at interfaces. *Polym Int*, 1995, 36(1), 102.
- Gupta KM, Barnes SR, Tangaro RA, Roberts MC, Owen DH, Katz DF, Kiser PF. Temperature and Ph sensitive hydrogels: an approach towards smart sementtriggered vaginal microbicidal vehicles. *J Pharm Sci*, 2007, 96, 670–681.
- Guterres S, Alves M, Pohlmann A. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, 2007, 2, 147–157.
- Harris D, Robinson JR. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. *J Pharm Sci*, 1992, 81, 1-10.
- Hehar SS, Mason JD, Stephen AB, Washington N, Jones NS, Jackson SJ, Bush D. Twenty-four hour ambulatory nasal pH monitoring. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 1999, 24, 24–25.
- Hood D, Musa O. Handbook of Maleic Anhydride Based Materials. New Jersey, Springer, 2016, str. 441-497.
- Innovative Ingredients for Oral Care: Expanding the Possibilities of Oral Care Formulations, 2013, <http://www.stobec.com/documents/data/8614.pdf>, pristupljeno 18.5.2017.
- Irache JM, Huici M, Konecny M, Espuelas S, Campanero MA i sur. Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. *Molecules*, 2005, 10, 126-145.
- Iskra.com, ISKRA (interdisciplinarna sekcija za kontrolu rezistencije na antibiotike) smjernice, pristupljeno 25.3.2017.
- Jelšenjak I, Jelšenjak V, Filipovi-Grčić J. Farmaceutika. Zagreb, Školska knjiga, 1998, str. 29-30.
- Johansson MEV. Fast renewal of the distal colonic mucus layers by the surface goblet cells as measured by in vivo labeling of mucin glycoproteins. *PLoS ONE* 7 (7), 2012, e41009.

- Johansson MV, Ambort D, Pelaseyed T, Schütte A, Gustafsson J, Ermund A i sur. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(22), 3635–3641.
- Kessler T, Dartt D. Neural stimulation of conjunctival goblet cell mucous secretion in rats. U: *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes Advances in Experimental Medicine and Biology*. Sullivan D, urednik, Saint Paul, Springer, 1994, str. 393–398.
- Kim YI, Fluckiger L, Hoffman M, Lartaud-Idjouadiene I, Atkinson J, Maincent P. The antihypertensive effect of orally administered nifedipine-loaded nanoparticles in hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 1997, 120, 399–404.
- Lai BE, Xie YQ, Lavine ML, Szeri AJ, Owen DH, Katz DF. Dilution of microbicide gels with vaginal fluid and semen simulants: effect on rheological properties and coating flow. *J Pharm Sci*, 2008, 97, 1028–1036.
- Lai SK, O’Hanlon DE, Harrold S, Man ST, Wang Y-Y, Cone R i sur. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(5), 1482–1487.
- Lai SK, Wang Y-Y, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(2), 158–171.
- Lai SK, Wang YY, Hida K, Cone R, Hanes J. Nanoparticles reveal that human cervicovaginal mucus is riddled with pores larger than viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107, 598–603.
- Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J Colloid Sci Biotechnol*, 2012, 1, 147–168.
- LDV- Laser Doppler Velocimetry, 2008., http://velocimetry.net/ldv_principles.htm, pristupljeno 12.5.2017.
- Lee CH, Wang Y, Shin SC, Chien YW. Effects of chelating agents on the rheological property of cervical mucus. *Contraception*, 2002, 65, 435–440.
- Lehr CM, Poelma FGJ, Junginger HE, Tukker JJ. An estimate of turnover time of intestinal mucus gel layer in the rat in situ loop. *Int J Pharm*, 1991, 70, 235–240.

- Lennernas H, Ahrenstedt Ö, Ungell AL. Intestinal drug absorption during induced net water absorption in man; a mechanistic study using antipyrine, atenolol and enalaprilat. *Br J Clin Pharmacol*, 1994, 37(6), 589–596.
- Loretz B, Thaler M, Bernkop-Schnurch A. Role of sulfhydryl groups in transfection? A case study with chitosan-NAC nanoparticles. *Bioconjug Chem*, 2007, 18(4), 1028–1035.
- Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2002, str. 222.-225.
- Malvern Instruments. Zetasizer Nano User Manual. Malvern, Malvern Instruments Ltd., 2013, str. 2-7.
- Mathiowitz E. Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems. *Nature*, 1997, 386, 410–414.
- McGill S, Smyth H. Disruption of the mucus barrier by topically applied exogenous particles. *Mol Pharm*, 2010, 7, 2280–2288.
- McMullen RL. Antioxidants and the skin. Carol Stream, Allured Books Media, 2013, str. 2-23.
- McMullen R, Jachowicz J. Thermal protection of hair keratin. 2001, U.S. Patent 6, 241,977 B1
- Miller CR, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA, O'Brien DF. Liposome–cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry*, 1998, 37(37), 12875–12883.
- Netsomboon K, Bernkop-Schnürch A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 98, 76–89.
- Neves Jd, Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A, Rodrigues F, Sarmiento B. Vaginal Mucosa and Drug Delivery, Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems. New York, John Wiley & Sons, 2014, str. 99–132.
- Nigović B, Jurešić-Grubešić R, Vuković-Rodríguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Praktikum iz analitike lijekova. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 135-137.

- Owen DH, Katz DF. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J Androl*, 2005, 26, 459–469.
- Owen DH, Katz DF. A vaginal fluid simulant. *Contraception*, 1999, 59, 91–95.
- Photon Correlation Spectroscopy (PCS), 2016., <http://pssnicomp.com/glossary/photon-correlation-spectroscopy-pcs/>, pristupljeno 13.5.2017.
- Pikal MJ. Mechanisms of protein stabilization during freeze drying and storage: the relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics. U: *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, Rey L, May JC, urednici, New York, Marcel Dekker, 1999, str. 161–198.
- Ponchel G, Irache J. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 34, 191–219.
- Popovici I, Ochiuz L, Popa EA, Saramet G, Dorneanu V i sur. Swellable matrices with carbopols for benzydamine HCl delivery from bioadhesive oromucosal tablets. *Farmacia*, 2008, 56(1), 83-91.
- Prabu P, Chaudhari AA, Aryal S, Dharmaraj N, Park SY i sur. In vitro evaluation of poly(caprolactone) grafted dextran (PGD) nanoparticles with cancer cell. *J Mater Sci: Mater Med*, 2008, 19(5), 2157-2163.
- Quan Y, Yao F, Weiyuan JK, Damir J, Hu Y. Transbuccal Delivery of CNS Therapeutic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and In Vitro Permeation Studies. *ACS Chem Neurosci*, 2011, 2 (11), 676–683.
- Rathbone M, Drummond B, Tucker I. Oral cavity as a site for systemic drug delivery. *Adv Drug Del Rev*, 1994, 13, 1-22.
- Rençber S, Karavana SY, Yilmaz FFM, Erac B, Nenni M, Ozbal S, Pekcetin C, Gurer-Orhan H, Hosgör-Limoncu M, Güneri P, Ertan G. Development, characterization, and in vivo assessment of mucoadhesive nanoparticles containing fluconazole for the local treatment of oral candidiasis. *Int. J Nanomedicine*, 2016, 11, 2641-53
- Rieley H, Smith K. Antiperspirant products. *NYSCC*, 2002, 1-6.
- Rigoletto R, Zhou Y. Mending hair damage with polyelectrolyte complexes. 2010. U.S. Patent 14,773,038.

- Rigoletto R, Zhou Y, Foltis L. Semi-permanent split end mending with a polyelectrolyte complex. *J Cosmet Sci*, 2007, 58, 451–476.
- Robbins C. Chemical and physical behavior of hair, Heidelberg, Springer, 2012. str. 1-7.
- Roh M, Han M, Kim D, Chung K. Sebum output as a factor contributing to the pore size of facial pores. *Cutan Biol*, 2006, 155, 890–894.
- Roy S, Prabhakar B. Bioadhesive polymeric platforms for transmucosal drug delivery systems – a review. *Trop J Pharm Res*, 2010, 9(1), 91–104.
- Rubinstein A, Tirosh B. Mucus gel thickness and turnover in the gastrointestinal tract of the rat: response to cholinergic stimulus and implication for mucoadhesion. *Pharm Res*, 1994, 11(6), 794–799.
- Sakuma S, Sudo R, Suzuki N, Kikuchi H, Akashi M, Hayashi M. Mucoadhesion of polystyrene nanoparticles having surface hydrophilic polymeric chains in the gastrointestinal tract. *Int J Pharm*, 1999, 177, 161–172.
- Schreiber S, Scheid P. Gastric mucus of the guinea pig: proton carrier and diffusion barrier. *Am J Physiol*, 1997, 272, 63–70.
- Serra L, Doménech J, Peppas N. Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 71(3), 519–528.
- Shahani K, Jonnalagadda S, Handa H, Mao G, Panyam J. Phospholipid Nanoparticles: Process Optimization Using Factorial Design and Atomic Force Microscopy. *J Biomed Nanotechnol*, 2007, 3(4), 394-400.
- Sheehan JK, Oates K, Carlstedt I. Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins. *Biochem J*, 1986, 239, 147–153.
- Shroff K, Vidyasagar A. Polymer nanoparticles: newer strategies towards targeted cancer therapy. *J Phys Chem Biophys*, 2013, 3, 125.
- Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(11), 1556-68.
- Smith DJ, Gaffney EA, Blake JR. Modelling mucociliary clearance. *Respir Physiol Neurobiol*, 2008, 163(1-3), 178–188.

- Soppimath K, Aminabhavi T, Kulkarni A, Rudzinski W. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*, 2001, 70, 1–20.
- Spicer SS, Schulte BA, Chakrin LW. Ultrastructural and histochemical observations of respiratory epithelium and gland. *Exp Lung Res*, 1983, 4(2), 137–156.
- Strugala V, Allen A, Dettmar PW, Pearson JP. Colonic mucin: methods of measuring mucus thickness. *Proc Nutr Soc*, 2003, 62(01), 237–243.
- Suh J, Dawson M, Hanes J. Real-time multiple-particle tracking: applications to drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 63–78.
- Szentkuti L, Lorenz K. The thickness of the mucus layer in different segments of the rat intestine. *Histochem J*, 1995, 27(6), 466–472.
- Sweetman SC. Martindale: The complete drug reference (36). London, *Pharmaceutical Press*, 2009, str. 159.-225.
- Swift J. The structure and chemistry of human hair. U: Practical modern hair science, Wickett R, Evans T, urednici, Carol Stream, Allured Books, 2012, str. 1-38.
- Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol*, 1982, 11, 1-17.
- Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm Res*, 2004, 21, 191–200.
- Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(1), 39–54.
- Toxicological studies of poly (anhydride) nanoparticles for oral drug delivery, 2008, <http://www.ecopa.eu/>, pristupljeno 18.5.2017.
- Travedi B, Culbertson B. Maleic anhydride. New York, Springer, 1982, str. 479-480.
- Valenta C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 1692–1712.
- Wang YY, Lai SK, Suk JS, Pace A, Cone R, Hanes J. Addressing the PEG mucoadhesivity paradox to engineer nanoparticles that “slip” through the human mucus barrier. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47, 9726–9729.
- Willits RK, Saltzman WM. Synthetic polymers alter the structure of cervical mucus. *Biomaterials*, 2001, 22, 445–452.

- Wolf DP, Sokoloski JE, Litt M. Composition and function of human cervical mucus. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 630, 545–558.
- Woodley J. Bioadhesion: new possibilities for drug administration? *Clin Pharmacokinet*, 2001, 40, 77–84.
- Xing J, Deng L, Li J, Dong A. Amphiphilic poly {[α -maleic anhydride- ω -methoxy-poly(ethylene glycol)]-co-(ethyl cyanoacrylate)} graft copolymer nanoparticles as carriers for transdermal drug delivery. *Int J Nanomed*, 2009, 4, 227–232.
- Yang S, Zhu J, Lu Y, Liang B, Yang C. Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. *Pharm Res*, 1999, 16, 751–757.
- Zhang H, Shahbazi M-A, Almeida PV, Santos HA. Mucus as a barrier for biopharmaceuticals and drug delivery systems. U: *Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals: Biology, Challenges and Strategies*. Neves Jd, Sarmiento B, urednici, New York, Springer, 2014, str. 3-4.
- Zhang Y, Wei W, Lv P, Wang L, Ma G. Preparation and evaluation of alginate–chitosan microspheres for oral delivery of insulin. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 77(1), 11–19.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Mukoadhezivne nanočestice oblik su novog terapijskog sustava s velikim potencijalom za primjenu u lokalnoj i sistemske dostavi lijekova. U odnosu na konvencionalnu terapiju nude niz prednosti kao što su ciljana dostava lijeka, produljeno djelovanje, zaštita lijeka od razgradnje te smanjenje nuspojava. Cilj ovog rada bila je izrada mukoadhezivnih nanočestica cefiksima, njihova fizikalna karakterizacija, optimizacija uvjeta pripreme, ispitivanje fizikalnih svojstava nanočesticanakon postupka liofilizacije te ispitivanje uklapanja lijeka u nanočestice. Za potrebe eksperimentalnog dijela rada proveden je razvoj i validacija HPLC metode. Mukoadhezivne nanočestice cefiksima pripravljene su metodom jednostavne desolvacije te su im određeni veličina, indeks polidisperznosti, zeta potencijal i postotak uklopljenog lijeka. Zeta potencijal čestica kretao se u rasponu od -41,4 do -43,1 mV što ukazuje na stabilnost disperzija nanočestica. Dobiveni rezultati pokazali su da volumen dodane vode utječe na veličinu i indeks polidisperznosti nanočestica. Sadržaj uklopljenog lijeka u nanočestice određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Iz dobivenih rezultata 1:3 omjer organske i vodene faze dao je najveći postotak uklapanja lijeka u nanočestice. Nakon postupka liofilizacije nanočestica s dva različita krioprotektanta ponovno su određeni veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencijal nanočestica. Premda je uklapanje lijeka u nanočestice nisko, ciljana isporuka i bolja bioraspoloživost lijeka omogućuju bolju učinkovitost u odnosu na konvencionalne sustave. U skladu s rezultatima ranijih studija te vlastitim dobivenim eksperimentalnim podacima može se zaključiti da mukoadhezivne nanočestice pokazuju velik potencijal u razvoju novih terapijskih sustava.

Mucoadhesive nanoparticles are the form of a new therapeutic system with great potential for local and systemic drug delivery. Compared to conventional therapy, they offer a number of advantages such as targeted drug delivery, prolonged action, drug degradation protection and side effect reduction. The aim of this study was to prepare mucoadhesive nanoparticles of the antibiotic cefixime and perform their physical characterization, optimize the conditions of preparation, to examine the physical properties of nanoparticles after the lyophilization process and to test the drug incorporation. For the experimental part of work, the development and validation of the HPLC method was carried out. The mucoadhesive nanoparticles of cefixime were prepared by a simple desolvation method and their size, index of polydispersity, zeta potential and percentage of the incorporated drug were determined. The zeta potential of the particles ranged from -41,4 to -43,1 mV, which indicates the stability of nanoparticle dispersion. The results obtained showed that the volume of added water influences the size and index of polydispersity of nanoparticles. The content of the drug in nanoparticles was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). From the results obtained 1:3 the ratio of organic and aqueous phases gave the highest percentage of drug incorporation into nanoparticles. After the lyophilization process of nanoparticles with two different cryoprotectants, the size, index of polydispersity and zeta potential of nanoparticles were again determined. Although drug incorporation into nanoparticles is low, target drug delivery and better bioavailability allow better effect than conventional systems. According to the results of earlier studies and our own experimental data, mucoadhesive nanoparticles shows great potential in the development of new therapeutic systems.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Mukoadhezivne nanočestice cefiksima

Ana Bajo

SAŽETAK

Mukoadhezivne nanočestice oblik su novog terapijskog sustava s velikim potencijalom za primjenu u lokalnoj i sistemske dostavi lijekova. Cilj ovog rada bila je izrada mukoadhezivnih nanočestica cefiksima, njihova fizikalna karakterizacija, optimizacija uvjeta pripreme, ispitivanje fizikalnih svojstava nanočestica nakon postupka liofilizacije te ispitivanje uklapanja lijeka u nanočestice. Za potrebe eksperimentalnog dijela rada proveden je razvoj i validacija HPLC metode. Mukoadhezivne nanočestice cefiksima pripravljene su metodom jednostavne desolvacije te su im određeni veličina, indeks polidisperznosti, zeta potencijal i postotak uklopljenog lijeka. Zeta potencijal čestica kretao se u rasponu od -41,4 do -43,1 mV što ukazuje na stabilnost disperzija nanočestica. Dobiveni rezultati pokazali su da volumen dodane vode utječe na veličinu i indeks polidisperznosti nanočestica. Sadržaj uklopljenog lijeka u nanočestice određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Iz dobivenih rezultata 1:3 omjer organske i vodene faze dao je najveći postotak uklapanja lijeka u nanočestice. Nakon postupka liofilizacije nanočestica s dva različita krioprotektanta ponovno su određeni veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencijal nanočestica. Premda je uklapanje lijeka u nanočestice nisko, ciljana isporuka i bolja bioraspoloživost lijeka omogućuju bolju učinkovitost u odnosu na konvencionalne sustave. U skladu s rezultatima ranijih studija te vlastitim dobivenim eksperimentalnim podacima može se zaključiti da mukoadhezivne nanočestice pokazuju velik potencijal u razvoju novih terapijskih sustava.

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

Rad sadrži: 63 stranica, 6 grafičkih prikaza, 9 tablica i 118 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Mukoadhezivne nanočestice, Gantrez AN, sluznica, cefiksim, uklapanje lijeka

Mentor: **Dr. sc. Mario Jug**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mario Jug**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Željka Vanić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Jasna Jablan, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Diploma thesis

Mucoadhesive nanoparticles of cefixime

Ana Bajo

SUMMARY

Mucoadhesive nanoparticles are the form of a new therapeutic system with great potential for local and systemic drug delivery. Compared to conventional therapy, they offer a number of advantages such as targeted drug delivery, prolonged action, drug degradation protection and side effect reduction. The aim of this study was to prepare mucoadhesive nanoparticles of the antibiotic cefixime and perform their physical characterization, optimize the conditions of preparation, to examine the physical properties of nanoparticles after the lyophilization process and to test the drug incorporation. For the experimental part of work, the development and validation of the HPLC method was carried out. The mucoadhesive nanoparticles of cefixime were prepared by a simple desolvation method and their size, index of polydispersity, zeta potential and percentage of the incorporated drug were determined. The zeta potential of the particles ranged from -41,4 to -43,1 mV, which indicates the stability of nanoparticle dispersion. The results obtained showed that the volume of added water influences the size and index of polydispersity of nanoparticles. The content of the drug in nanoparticles was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). From the results obtained 1:3 the ratio of organic and aqueous phases gave the highest percentage of drug incorporation into nanoparticles. After the lyophilization process of nanoparticles with two different cryoprotectants, the size, index of polydispersity and zeta potential of nanoparticles were again determined. Although drug incorporation into nanoparticles is low, target drug delivery and better bioavailability allow better effect than conventional systems. According to the results of earlier studies and our own experimental data, mucoadhesive nanoparticles shows great potential in the development of new therapeutic systems.

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

Thesis includes: 63 pages, 6 figures, 9 tables and 118 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Mucoadhesive nanoparticles, Gantrez AN, mucus, cefixime, drug incorporation

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

Reviewers: **Mario Jug, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vanić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasna Jablan Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2017.