

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANEJ STRLIČ

**ANALIZA SPROŠČANJA ZDRAVILNIH UČINKOVIN IZ
BIOKERAMIČNEGA MATERIALA**

ANALYSIS OF DRUG RELEASE FROM BIOCERAMIC
MATERIAL

ENOVITI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Eksperimentalni del Magistrske naloge sem opravljal v laboratoriju za farmakokinetiko in fizikalno farmacijo, na Fakulteti za farmacijo, Jagiellonian University, Krakov, Poljska kot del Erasmus+ izmenjave. Nalogo sem pripravil pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka mag farm. in somentorstvom prof. dr. Elzbiete Wyska.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji družini za dobre življenjske usmeritve ter izjemno podporo v vseh mojih prizadevanjih. Prav tako se zahvaljujem svojim prijateljem, ki so mi pomagali skozi viharne dni tako zasebnega kot tudi študijskega življenja. Najlepša hvala tudi mentorju in somentorici za vložen trud in potrpežljivost tekom nastajanja magistrske naloge.

~Zaupanje v prihodnost navdaja človeka z nepremagljivo močjo.~

-Martin Kojc

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka mag farm. in somentorstvom prof. dr. Elzbiete Wyska.

Ljubljana, november 2016

Predsednik komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Član komisije: asist. dr. Zoran Lavrič

VSEBINA

POVZETEK	vi
ABSTRACT	vii
SEZNAM OKRAJŠAV	viii
1 UVOD.....	1
1.1 BIOKERAMIČNI MATERIALI.....	1
1.2 BIOAKTIVNOST.....	2
1.3 BIORAZGRADNJA.....	2
1.4 KALCIJEVI ORTOFOSFATI V BIOKERAMIKAH.....	3
1.4.1 α -TCP.....	3
1.4.2 CEMENTI.....	5
1.5 KALCIJEV KARBONAT V BIOKERAMIKAH.....	7
1.6 NOVI KOMPOZITNI CEMENTI IZ KALCIJEVEGA KARBONATA IN KALCIJEVEGA FOSFATA	8
1.7 VGRADNJA UČINKOVIN V BIOKERAMIKE	9
1.8 ANTIBIOTIKI V VSADKIH	10
1.9 <i>IN VITRO</i> ŠTUDIJE IMPLANTOV	10
1.10 <i>IN VITRO</i> <i>IN VIVO</i> KORELACIJE.....	11
1.11 SPROŠČANE UČINKOVINE	12
1.11.1 CIPROFLOKSACIN.....	13
1.11.2 METRONIDAZOL	13
1.11.3 IBUPROFEN.....	14
1.11.4. CEFUROKSIM	15
2 NAČRT DELA IN DELOVNE HIPOTEZE.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 CEMENTNI BIOKERAMIČNI MATERIAL K	17
3.1.2 UČINKOVINE.....	17
3.1.3 OSTALI MATERIALI.....	17
3.1.4 NAPRAVE IN PRIBOR	17
3.2 PRIPRAVA BIOKERAMIČNEGA VSADKA.....	18
3.3 <i>IN VITRO</i> SPROŠČANJE	19
3.3.1 PRIPRAVA MEDIJA ZA <i>IN VITRO</i> SPROŠČANJE	19
3.3.2 <i>IN VITRO</i> SPROŠČANJE ZU IZ BIOKERAMIČNEGA MATERIALA.....	19

3.4	<i>IN VIVO</i> SPROŠČANJE.....	21
3.5	DOLOČANJE KONCENTRACIJE UČINKOVIN V VZORCIH <i>IN VITRO</i> POSKUSOV	22
3.5.1	UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIČNA METODA	22
3.5.2	METODA HPLC.....	23
3.6	DOLOČANJE KINETIKE IN MEHANIZMA SPROŠČANJA UČINKOVIN	25
3.7	DOLOČANJE <i>IN VITRO IN VIVO</i> KORELACIJE	26
4	REZULTATI.....	28
4.1	UMERITVENE KRIVULJE IN PROFILI <i>IN VITRO</i> SPROŠČANJA UČINKOVIN	28
4.1.1	CIPROFLOKSACIN.....	28
4.1.2	METRONIDAZOL	29
4.1.3	IBUPROFEN.....	30
4.1.4	CEFUROKSIM	31
4.2	KINETIKA IN MEHANIZEM <i>IN VITRO</i> SPROŠČANJA UČINKOVIN.....	32
4.3	<i>IN VIVO</i> ANALIZA CEFUROKSIMA	33
4.3.1	PLAZEMSKÉ KONCENTRACIJE CFU PO IV ADMINISTRACIJI IN FARMAKOKINETIČNE KONSTANTE.....	33
4.3.2	PLAZEMSKÉ KONCENTRACIJE CFU PO PODKOŽNI VSTAVITVI VSADKA	34
4.4	<i>IN VITRO IN VIVO</i> KORELACIJA ZA CEFUROKSIM	34
5	RAZPRAVA.....	36
5.1	<i>IN VITRO</i> SPROŠČANJE ZU	36
5.1.1	<i>IN VITRO</i> SPROŠČANJE CFU S STATIČNO METODO	36
5.1.2	OCENA USTREZNOSTI ZU ZA DOSTAVNI SISTEM S PODALJŠANIM SPROŠČANJEM.....	37
5.2	VPLIV FIZIKALNO KEMIJSKIH LASTNOSTI ZU NA SPROŠČANJE IZ MATERIALA K.....	38
5.3	UPORABNOST MATERIALA K KOT OGRODJA ZA DOSTAVNI SISTEM	39
5.4	<i>IN VITRO IN VIVO</i> KORELACIJA	40
6	SKLEP.....	41
7	LITERATURA	42

POVZETEK

Staranje prebivalstva in razširjeno ukvarjanje z rizičnimi športnimi aktivnostmi sooča zdravstvo na področju bolezni in zlomov kosti z novimi, višjimi izzivi. V želji po hitrejšem in popolnejšem okrevanju raziskovalci iščejo nove izboljšane materiale, ki se bodo sposobni zoperstaviti tem izzivom in omogočiti bolnikom kvalitetnejše življenje. Biokeramike so snovi, ki se v telesu uporabljajo za popravilo in obnovo obolelih ali poškodovanih delov telesa. V eno izmed skupin takšnih materialov uvrščamo keramike kalcijevih ortofosfatov, kamor spada tudi α -trikalcijev fosfat, ki je, poleg kalcijevega karbonata, glavna sestavina cementne biokeramike (material K) uporabljene v naših analizah. Želeli smo proučiti možnost vgradnje zdravilnih učinkovin v takšen material in sposobnost take farmacevtske oblike s podaljšanim lokalnim sproščanjem, da kontinuirano skozi daljše obdobje (do 10 dni) sprošča zdravilno učinkovino. V magistrski nalogi smo iz vsadkov pripravljenih iz materiala K *in vitro* sproščali ciprofloksacin, metronidazol, ibuprofen in cefuroksim ter z UV/VIS oziroma HPLC analiznimi postopki določili količino sproščene učinkovine v medij za sproščanje. Iz teh rezultatov smo za posamezne zdravilne učinkovine v odvisnosti od časa določili profile sproščanja, s pomočjo Higuchijevega modela izračunali konstante hitrosti sproščanja in določili mehanizem sproščanja posameznih učinkovin s Korsmeyer-Peppasovo metodo. Ibuprofen in cefuroksim sta se sprostila z višjo hitrostjo v približno 50 urah in v obsegu približno 50 % vgrajene učinkovine. Ciprofloksacin se je sprostil počasi v 32 urah in le v 3,1 % deležu. Metronidazol pa se je sprostil najpočasneje, a zelo konstantno tekom 9 dni, v obsegu 39 % vgrajene učinkovine. Ibuprofen in ciprofloksacin sta se sproščala s fickovo difuzijo, medtem ko za iz dobljenih rezultatov za preostali učinkovini nismo mogli sklepati na vrsto mehanizma sproščanja. Ocenili smo, da je naš biokeramični cement uporaben kot matriks dostavni sistema s podaljšanim lokalnim sproščanjem, a ima nekatere omejitve. Na osnovi *in vitro* ter *in vivo* podatkov meritev sproščanja cefuroksima linearne korelacije nismo uspeli dokazati. Ocenjujemo, da imajo dostavni sistemi iz biokeramičnih cementov za lokalno podaljšano sproščanje izjemen potencial in bi v prihodnosti lahko igrali pomembno vlogo v zdravljenju kostnih obolenj.

Ključne besede: *biokeramike, in vitro sproščanje, in vivo absorpcija, podaljšano sproščanje ciprofloksacin, metronidazol, ibuprofen, cefuroksim*

ABSTRACT

An ageing population and a democratization of high-risk sports are setting new challenges for health care providers regarding bone-related diseases and bone fractures. In order to face these challenges and to improve patient's quality of life, researchers are engineering new, improved materials, which will allow better and faster recovery. Bioceramics are substances which are used in patient's body to repair and recover the diseased or injured parts of body. One of the groups of bioceramics are calcium orthophosphates that include α -tricalcium phosphate, which is, beside the calcium carbonate, a major component of bioceramic cement used in our analyses (material K). We researched the possibility of incorporation of drugs in such material and the ability of such dosage forms to locally release the drug continuously over a longer period (up to 10 days). In master thesis we were testing the *in vitro* release of ciprofloxacin, metronidazole, ibuprofen and cefuroxime from implants prepared of material K. To determine the amount of drug released in the medium we used UV/VIS and HPLC analytical procedures. We prepared the concentration release profiles for each of the drugs, calculated release rates using the Higuchi's model and determined the release mechanism with Korsmeyer-Peppas method. Ibuprofen and cefuroxime were released at faster rate in approximately 50 hours and in approximately 50 % extent. Ciprofloxacin released slowly in 32 hours, but the extent of release was only 3.1 %. At the slowest rate was released metronidazole, however in a very constant manner over a period of 9 days. It was released in extent of 39 %. Ibuprofen and ciprofloxacin released with fickian diffusion, whereas we could not determine mechanism of release for the other drugs. We evaluated our bioceramic cement as a useful substance for a matrix of drug delivery system with prolonged local release, however it has its limitations. We failed to find linear *in vitro in vivo* correlation for cefuroxime. We estimate that the drug delivery systems of bioceramic cements for local sustained release have enormous potential and could in the future be able to play an important role in the treatment of bone diseases.

Key words: *bioceramics, in vitro release, in vivo absorption, prolonged release, ciprofloxacin, ibuprofen, metronidazole, cefuroxime*

SEZNAM OKRAJŠAV

ACP	Amorfni kalcijev fosfat
BCP	Dvofazni kalcijev fosfat, npr. HAp + β -TCP
BK	Biokeramika
BM	Biomaterial
Ca	Kalcij
CaP	Kalcijev fosfat
CC	Kalcijev karbonat, CaCO_3
CDHA	Nestehiometrični hidroksiapatit ali apatit
CFU	Cefuroksim
CO_3Ap	Karbonatni apatit
CPX	Ciprofloksacin
DCP	Dikalcijev fosfat, Ca_2HPO_4
DCPD	Dikalcijev fosfat dihidrat, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
DCPD	Dikalcijev fosfat dihidrat ali brušit
FP	0,1 M fosfatni pufer, pH 7,4
HAp	Hidroksiapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography)
IB	Ibuprofen
IVIVC	<i>In vitro in vivo</i> korelacija
MCPM	Monokalcijev fosfat monohidrat, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
MNZ	Metronidazol
P	Fosfat
PHA	Precipitiran hidroksiapatit, $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$
TCP	Trikalcijev fosfat
TTCP	Tetrakalcijev fosfat, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$
ZU	Zdravilna učinkovina

1 UVOD

1.1 BIOKERAMIČNI MATERIALI

Ena izmed najbolj zanimivih raziskovalnih področij znanosti o materialih vključuje različne aplikacije v zdravstvu. Primeri so šivanje, katetri, srčne zaklopke, srčni spodbujevalniki, prsni vsadki, pritrdilne ploščice pri zlomih, žebliji in vijaki v ortopediji, materiali zobnih zalivk, ortodontske žice, kot tudi celovite proteze za sklepe. Poleg tega je v zadnjih desetletjih staranje prebivalstva in ukvarjanje s športi z visokim tveganjem povzročilo val s kostmi povezanih bolezni in zlomov kosti s katerimi se pojavljajo novi izzivi v zdravstveni oskrbi. Da živ organizem sprejme tovrstne vsadke, morajo biti pripravljene iz posebnega razreda materialov, ki jih imenujemo biomedicinski materiali ali biomateriali (BM) (1).

Biomateriali so snovi, ki so bile razvite, da zavzamejo obliko, ki usmerja potek katerega koli terapevtskega ali diagnostičnega postopka v humani ali veterinarski medicini. Lahko je samostojna ali pa del kompleksnega sistema, proces pa je nadziran z interakcijami med BM in sestavinami živega sistema. Bistvena razlika med BM in drugimi vrstami materialov je njihova sposobnost, da ostanejo v biološkem okolju tekom določenega obdobja, ne da bi poškodovali okolico in ne da bi se sami poškodovali. Tako se biomateriali uporabljajo izključno v povezavi z zdravstvenim varstvom (1).

V zadnjih štirih desetletjih je prišlo do revolucije pri uporabi keramike za izboljšanje kakovosti življenja. Ta revolucija je inovativna uporaba posebej izdelanih keramik za popravilo in obnovo obolelih ali poškodovanih delov telesa. Keramike, ki se uporabljajo za ta namen, se imenujejo biokeramike (BK). To so lahko posamični kristali (safir), polikristalinične snovi (aluminijev oksid ali hidroksiapatit (HAp)), stekla (Biostekla), steklo-keramike (Ceravital ali apatit-volanit-steklokeramike), ali kompoziti (z vlakni nerjavečega jekla okrepljena Biostekla ali polietilen-hidroksiapatiti). Kljub na desetine testiranih keramičnih materialov, jih je le malo doseglo klinično uporabo. Danes je znano, da je za klinični uspeh potrebno hkratno doseganje stabilne stične površine s sosednjim tkivom in ujemanje mehanskega obnašanja vsadka s tkivom, ki ga nadomeščamo (2).

Mehanizem vezave tkiva na BM je neposredno povezan z vrsto odziva tkiva na stiku z vsadkom. Noben vsadek v živih tkivih ni inerten, saj vsi materiali izzovejo odziv živega tkiva. Pripenjanje protez na mišično-skeletni sistem lahko povzročijo štiri različne odzive: toksični materiali povzročijo odmiranje okoliškega tkiva; biološko neaktivni in netoksični materiali povzročijo nastanek fibroznega tkiva različnih debelin; biološko aktivni in netoksični materiali

povzročijo nastanek medfazne vezi; netoksični materiali se lahko raztopijo in jih nato nadomesti okoliško tkivo (2).

Mehanizme interakcije vsadka s tkivom delimo na morfološko pritrnitev, biološko pritrnitev in bioaktivno pritrnitev (2).

1.2 BIOAKTIVNOST

Bioaktivni materiali vstopajo v interakcijo z okoliško kostjo, kar ima za posledico tvorbo kemijske vezi do tega tkiva. Na bioaktivnost vplivajo tako kemičnimi dejavniki, kot so molekulska struktura in polimorfna oblika biomateriala, ter fizični dejavniki, kot so hrapavost površine in poroznost. Raziskovalci se strinjajo, da po do sedaj zbranim znanju, lahko sklepamo, da se novo nastala kost veže neposredno na biomateriale preko karbonatne plasti, ki se obarja na medfazi kost / biomaterial (1).

1.3 BIORAZGRADNJA

Kmalu po vstavitvi vsadka se prične proces zdravljenja začeni s spremembo sestave okoliških bioloških tekočin in adsorpcije biomolekul. Različne vrste celic kmalu dosežejo površino biokeramike in adsorbirana plast narekuje njihov odziv. S tem se prične biorazgradnja vsajene biokeramike. Ta proces je lahko posledica bodisi raztapljanja ali celične aktivnosti (bioresorpcija), kot tudi kombinacija obeh mehanizmov. Raztapljanje je fizikalno kemijski proces na katerega vplivajo dejavniki, kot so topnost ogrodja vsadka, razmerje med površino in prostornino, lokalni pH, pretok tekočine in temperatura. Bioresorpcija je biološki proces v katerem sodelujejo celice gostitelja, predvsem osteoklasti in v manjši meri tudi makrofagi. Odvisen je od odziva celic na njihovo spremenjeno okolje. Osteoklasti se močno pripnejo na vsadek in pričnejo raztapljanje (kalcijevih ortofosfatov) z izločanjem encima karbonatna anhidraza ali katerekoli druge kisline, kar vodi k znižanju lokalnega pH na 4-5. Poleg tega so lahko majhni delci kalcijevega ortofosfata fagocitirani, torej vključeni v citoplazmo osteoklastov, in tam raztopljeni s kislino oziroma encimskimi procesi. Biorazgradnja kalcijevih ortofosfatov je kombinacija različnih neravnotežnih procesov, ki potekajo istočasno in tekmujejo med seboj (1).

1.4 KALCIJEVI ORTOFOSFATI V BOKERAMIKAH

Na trgu poznamo keramične snovi na osnovi kalcijevih ortofosfatov kot kostne zamenjave in običajno vsebujejo keramike iz kalcijevega fosfata kot so trikalcijev fosfat (TCP) in HAp. Uporabljajo se različne faze kalcijevih fosfatov glede na to ali želimo bioaktiven material ali pa material, ki se v telesu resorbira (3). Uporaba keramik na osnovi kalcijevih fosfatov je široko razširjena za kostna polnila, razne nadomestke, in obloge na dentalnih in ortopedskih protezah. Trenutno se tovrstni materiali uporabljajo pri nadomestkih kolkov, kolen in zob, kakor tudi pri paradontalni bolezni, maksilofacialni rekonstrukciji, razširitvi in stabilizaciji čeljustnice, fuziji vretenc in kot polnilo kosti po kirurški odstranitvi kostnega tumorja. Zaradi kemične in strukturne podobnosti z anorganskim delom človeške kosti izkazujejo HAp in kalcijevi fosfati, kot sta α in β trikalcijev fosfat, odlično biokompatibilnost. V preteklem desetletju so se v klinični praksi uveljavili dvofazni materiali HAp/ β -TCP v različnih razmerjih in s silicijem substituiran HAp. Večina najpomembnejših lastnosti teh materialov, vključno z njihovim biološkim vplivom na tkiva in obnašanjem med razgrajevanjem, so pogojene z njihovo posebno kemično sestavo, morfologijo in površinsko topologijo. Zato pravilna zasnova ponuja številne možnosti uporabe kalcijevih fosfatov za nadomeščanje ali regeneracijo trdih tkiv. Običajno so kostni nadomestki v obliki granul, past, samo-strjevalnih cementov ali kot obloge in porozni medicinski pripomočki (1).

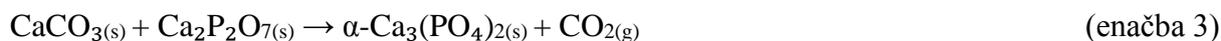
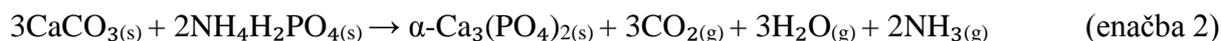
Biološki odziv na vsajene kalcijeve ortofosfate sledi kaskadi dogodkov podobnim tistim opaženim pri celjenju zloma. Ta kaskada vključuje tvorbo hematoma, vnetje, neovaskularizacijo, resorpcijo osteoklastov in tvorbo nove kosti. Vsadki kalcijevih ortofosfatov izkazujejo sposobnost za neposredno vezavo na kosti, ob tem pa nikoli ni bila opažena plast fibroznega tkiva med vsadki in kostjo (1).

1.4.1 α -TCP

α -TCP je polimorf trikalcijevega fosfata (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), ki se uveljavlja kot surovina za kostne cemente za injiciranje, biorazgradljive keramike in kompozite, ki se uporabljajo za popravilo kostnih poškodb (3).

Na trgu najdemo le malo proizvajalcev α -TCP, zato se raziskovalci povečini poslužujejo laboratorijske sinteze te surovine. Najpogosteje ga pridobivajo z toplotno pretvorbo njegovega predhodnika z molarnim razmerjem Ca/P 1,5 (nestehiometričen hidroksiapatit, $T > 1150^\circ\text{C}$; amorfni kalcijev fosfat, $T > 1130^\circ\text{C}$ ali β -TCP, $T > 1200^\circ\text{C}$) ali z reakcijo trdnih predhodnikov pri visokih temperaturah (3).

V literaturi dajejo prednost reakciji trdnih predhodnikov pri visokih temperaturah. Takšne reakcije sledijo splošnemu postopku. Ta se začne s skupnim mletjem predhodnikov, s čimer dosežemo zmanjšanje trdnih delcev, povečanje stične površine in dobro mešanje komponent. Pred segrevanjem lahko prahove stiskamo, da izboljšamo stike. Priporočena temperatura reakcije je 1250-1500 °C in čas 2-48h. Najpogosteje uporabljene reakcije so predstavljene z enačbami 1-4.



Za čist produkt s čim nižjim deležem neželenih produktov je zelo pomembno uporabiti reaktante s čim nižjo vsebnostjo nečistoč in v pravilnem stehiometričnem razmerju. Nečistoče magnezija, cinka in stroncija zamenjajo kalcijeve ione v strukturi in vodijo k večji količini β -TCP, medtem ko majhne količine silicija nadomestijo fosfatne ione v strukturi in stabilizirajo α strukturo TCP. Čeprav je α -TCP pri temperaturah nižjih od 1100°C v metastabilnem stanju, se tudi pod to temperaturo lahko ohrani v tem stanju, razen v primeru izjemno počasnega ohlajanja. Razlog za to tiči v precejšnji barieri aktivacijske energije, ki je potrebna za ponoven prehod v stabilno stanje (β -TCP) (3).

HAp je najstabilnejša oblika kalcijevih ortofosfatov pri fiziološkem pH (7,2-7,4). Precipitacija po raztapljanju α -TCP zato običajno poteka v smeri nastanka nestehiometričnega HAp (CDHA). Termodinamična pretvorba cementov z α -TCP med strjevanjem sledi enačbi 5 (3).



Vendar pa v praksi materiali ne sledijo vedno termodinamičnim predvidevanjem, zato so možni tudi drugi končni produkti. Reakcija med strjevanjem cementov je na začetku nadzirana s površinsko reaktivnostjo prahu materiala, ki je odvisna od hitrosti raztapljanja tega materiala. Hitrost te reakcije lahko nadziramo z različnimi pristopi, ki vplivajo na hitrost raztapljanja prahov:

- Sprememba stične površine med prahovi in tekočimi fazami cementov;
- Sprememba topnosti prahov v tekočih fazah cementov;
- Sprememba nasičenosti tekoče faze z α -TCP;
- Uporaba inhibitorjev raztapljanja in
- Modifikacija površine prahov (aktivna ali pasivna površina) (3).

Iz biološkega vidika je α -TCP netoksična, osteokonduktivna in bioaktivna snov tako *in vitro* kot *in vivo*. Glavni vzrok za povečano zanimanje za to snov pa je njena biorazgradljivost, saj se v telesu hitreje resorbira kot HAp, β -TCP in ostali dvofazne BK, ki so trenutno v klinični uporabi (3). Slabost te snovi je podobno kot pri večini cementov mehanska šibkost v primerjavi s kostnino, zato ji raziskovalci pogosto dodajajo različna polnila in vlakna (4).

α -TCP najdemo tudi v nekaterih komercialnih kostnih cementih, ki jih prikazuje razpredelnica I (3).

Razpredelnica I: Komercialno dostopni cementi z α -TCP (3).

Ime produkta	Proizvajalec	Sestava prahu
Cementek®	Teknimed SA, Francija	α -TCP + TTCP
Mimix®	Biomet, ZDA	α -TCP + TTCP
Calcibon®	Biomet, Europa	α -TCP + DCP + CC + PHA
Norian SRS®	Norian, ZDA	α -TCP + CC + MCPA
Biopex®	Mitsubishi Materials Co., Japonska	α -TCP + TTCP + DCPD + HAp
MCPC®	Biomatlante, Francija	α -TCP + ACP + BCP
Callos®	Skeletal Kintetics	α -TCP + CC + MCPM

TTCP, tetrakalcijev fosfat, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$; DCP, dikalcijev fosfat, Ca_2HPO_4 ; DCPD, dikalcijev fosfat dehidrat, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; CC, kalcijev karbonat, CaCO_3 ; HAp, hidroksiapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; MCPM, monokalcijev fosfat monohidrat, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; PHA, precipitiran HAp, $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$; ACP, amorfni kalcijev fosfat; BCP, dvofazni kalcijev fosfat-zmes hidroksiapatita in β trikalcijevega fosfata, HAp+ β -TCP.

1.4.2 CEMENTI

V želji po zmanjšanju operativne invazivnosti je napredek prinesel koncept samo-strjevalnih kostnih cementov, ki so lahko oblikovani med samim posegom ali pa celo injicirani. Cemente uvrščamo med BK katere pripravljamo pri nizkih temperaturah, specifično gre za precipitacijo kristalov končnega produkta. Poznamo več tipov cementov in kostnih polnil: polimetil metakrilatni cement, cink polikarboksilatni cementi, stekleni polialkenoat, biostekla, apatit/volastonit steklene keramike, sintetični HAp, cementi kalcijevih fosfatov, stekleni ionomeri z dodatki smol in kompozitni cementi (5).

Cemente uvrščamo med nizko-temperaturne biokeramike, ker ne zahtevajo visokih temperatur v postopkih priprave, kakršno je na primer sintranje ali zgoščevanje (1). Zaradi dobre bioresorpcije cementov iz kalcijevih ortofosfatov jih uvrščamo v drugo generacijo biomaterialov za kostne nadomestke. Ti cementi so mešanice amorfni in/ali kristaliničnih prahov kalcijevih ortofosfatov, ki jih zmešamo z vodno fazo. Ta je lahko destilirana voda, različni pufri ali pa raztopine različnih soli in hitosana. Ko zmešamo suhe prahove z raztopino dobimo mehko pasto, ki jo lahko oblikujemo. Ko postane masa deloma strjena jo apliciramo

na kost in oblikujemo glede na poškodbo, kjer se *in situ* dokončno strdi. Ena od možnih aplikacij je tudi injiciranje tovrstnih materialov v zlome in poškodbe, kjer se tesno oblikujejo glede na njeno obliko. Ti materiali dokazano izkazujejo osteokonduktivnost (usmerjanje obnavljanja kostnega tkiva), osteotransduktivnost (strjen material se tekom celjenja kosti nadomešča s kostnim tkivom), imajo zadovoljivo tlačno trdnost, so necitotoksični in tvorijo kemijsko vez s kostnim tkivom. Kemijska sestava je zelo podobna tisti, ki jo najdemo v anorganskem delu kosti, kar potrjujejo tudi rentgenske analize. Cilj teh materialov je obnašanje podobno kostnemu tkivu tekom obnove kosti in ob tem čim manj omejevati funkcije in lastnosti same kosti, zato bi jih lahko obravnavali tudi kot biomimetične materiale. Samo strjevalni cementi ponujajo možnost kostnih nadomestkov iz inertnih materialov, ki so dostopni v neomejenih količinah in ne izkazujejo tveganja za okužbe ali vnetja (6).

Cemente kalcijevih ortofosfatov delimo glede na njihovo reakcijo po stiku z vodo. V prvo skupino uvrščamo suhe zmesi dveh različnih kalcijevih ortofosfatov (kislo in bazično fazo) v katerih po dodajanju manjše količine vode poteče kislo bazična reakcija in strditev cementa. Druga skupina so cementi z le eno vrsto kalcijevega fosfata. Tipično sta to amorfni kalcijev fosfat (ACP) z molarnim razmerjem Ca/P znotraj 1,50-1,67 ali α -TCP. V stiku z vodo tvorita nestehiometrični hidroksiapatit (CDHA). Ta nastane, ko se po stiku z vodo relativno majhen delež začetnega materiala raztopi, čemur sledi lokalna prenasičenost raztopljenega materiala v mikrookolju in nadaljnje posledično obarjanje v končni stabilnejši produkt. Strjevanje je posledica zaporednih reakcij raztapljanja in obarjanja ter posledičnega prepletanja, povezovanja in rasti kristalov. Na hitrost strjevanja cementov iz obeh skupin zelo vpliva razmerje med trdno in tekočo fazo in tudi dodatki drugih sestavin. Cementi iz kalcijevih ortofosfatov se običajno ustalijo v roku prvih 6 ur. Medtem pride do približno 80% pretvorbe v končne produkte s tlačno trdnostjo 40-60 MPa (zdrava kost = 125-166MPa) (6).

Vsi cementi na osnovi kalcijevih ortofosfatov tvorijo enega od dveh končnih produktov: nestehiometrični hidroksiapatit (CDHA) ali dikalcijev fosfat dihidrat (DCPD). Vmesna stopnja pretvorbe sta lahko amorfni kalcijev fosfat (ACP) in oktakalcijev fosfat (OCP). Reakcija strjevanja cementa sestoji iz treh zaporednih faz:

1. raztapljanje prahov do nasičenja vodne faze z ioni kalcija in ortofosfata;
2. nastanek kristalnih jeder iz nasičenih raztopin;
3. rast kristalov (6).

Voda ne vstopa v reakcije z materiali, ki tvorijo apatit (CDHA), ampak je le medij v katerem poteče raztapljanje in nato obarjanje do končnega produkta. Za takšne materiale potrebujemo

zelo majhne količine vode. V materialih, ki tvorijo brušit (DCPD) pa se molekule vode vgrajujejo v njegovo kristalno strukturo (6).

Eden od pomembnih dejavnikov, ki ga moramo upoštevati pri razvoju cementov in biokeramik na splošno, je poroznost. Poroznost zmanjšuje trdnost in povečuje možnost pokanja strjenega materiala. Z povečano poroznostjo materialov njihova trdnost eksponentno pada. Današnji tehnološki postopki omogočajo razvoj samo-strjevalnih cementov s kalcijevimi ortofosfati, ki dosegajo skoraj vsakršno poroznost. Večina komercialnih materialov ima pore premera 8-12 μm pri 40-50% poroznosti po strjevanju. Pomembna je tudi medsebojna povezanost por, saj premajhne in nepovezane pore ne omogočajo hitrega vraščanja nove kosti v material. Zmanjšana stična površina osteoklastom omogoča le površinsko razgradnjo strjenega cementa, kar posledično podaljša čas potreben za popolno resorpcijo materiala. Na poroznost strjenih materialov se do določene mere da vplivati z velikostjo delcev prahov kalcijevih ortofosfatov in razmerjem med prahovi in vodno raztopino. Ob večjem dodatku vodne raztopine so si namreč trdni delci zmesi med strjevanjem bolj oddaljeni. Poroznost strjenega materiala pa lahko povečujemo tudi z dodatki NaHCO_3 , Na_2HPO_4 , CaSO_4 , NaCl , granule raznih polimerov in pa tudi kalcita (6).

Samo-strjevalni cementi iz kalcijevih ortofosfatov imajo sposobnost kratkoročnega zagotavljanja zaželenih bioloških lastnosti kosti in so nato zamenjani s svežo kostnino. Na hitrost celjenja in tvorbe nove kostnine vplivajo dejavniki kot so starost, spol, splošno zdravje bolnika, mesto vstavitve cementa, poroznosti in stopnje kristaliničnosti, kemijske sestave, velikosti delcev in razmerja prahov in vodne raztopine. Glede na te dejavnike je za popolno resorpcijo in nadomestitev s kostnim tkivom potrebnih od 3 do 36 mesecev (6).

Zaradi podobne strukture in sestave teh cementov in kostnine so zelo primerni za rekonstrukcijo poškodovanih kosti. Nekaterim cementi omogočajo tudi injiciranje v/na mesto aplikacije s čimer se občutno zmanjša invazivnost takšnega postopka. Med ostale prednosti štejemo še nizko temperaturo priprave, ustrezno togost materialov, enostavno oblikovanje in prilagodljivost glede na obliko poškodbe na kosti. Prvi cement na osnovi kalcijevih ortofosfatov je na trg prišel leta 1996 (6).

1.5 KALCIJEV KARBONAT V BIOKERAMIKAH

V naravi srečamo tri vrste kristaliničnega kalcijevega karbonata (kalcit, aragonit, vaterit) in amorfni kalcijev karbonat (CC). Termodinamično najbolj stabilna oblika je kalcit, ki mu sledita aragonit in vaterit. Naravni CC iz določenih koral predstavlja kristalno strukturo aragonita.

Dokazano je, da je CC iz koral bioaktiven in biokompatibilen material in je v uporabi v obliki prahov, poroznih keramik in gelov že več kot 20 let (7). Vendar pa je koralni CC neustrezen material za moderne klinične standarde. Problematična je biološka variabilnost tega materiala, prisotnost ostankov organskih snovi in možnost razvoja vnetij po aplikaciji, prav tako pa je omejena njegova dostopnost in s tem povezani vplivi na okolje (8).

Priprava klasičnih BK iz CC se je zaradi zahtevnega sintranja izkazala kot težek izziv, je pa CC toliko bolj zanimiv kandidat za pripravo cementov. Zaradi višje topnosti od apatita ima tak cement boljšo bioresorpcijo. Na trgu obstajajo cementi z nizkim deležem kalcijevega karbonata, toda cementi ki bi vsebovali večji delež ali izključno to snov odpirajo nove možnosti na tem področju. Priprava cementa z mešanjem različnih faz CC z vodno fazo je eden od izzivov s katerim se soočajo raziskovalci v zadnjih letih. Ideja je zasnovana na reaktivnosti dvokomponentnih mešanic prahov CC od katerih je ena visoko reaktivna amorfná in druga stabilnejša kristalinična oblika, ki služi kot jedra za termodinamično usmerjanje rekristalizacijskega postopka prve v prisotnosti majhne količine vode (7).

1.6 NOVI KOMPOZITNI CEMENTI IZ KALCIJEVEGA KARBONATA IN KALCIJEVEGA FOSFATA

Resorpcija mineralnih biomaterialov je po splošnem prepričanju povezana s topnostjo posameznih komponent. Eden izmed konceptov, ki je bil razvit na osnovi tega prepričanja so dvofazne biokeramike kalcijevih fosfatov. V teh materialih je najpomembnejše razmerje med stabilnejšim hidroksiapatitom in bolj topnim TCP, s čimer lahko nadziramo hitrost resorpcije materiala *in vivo*. Koncept sestavljenih cementov iz kalcijevih fosfatov in visokega deleža kalcijevega karbonata ($\geq 40\%$) je relativno sveža ideja, ki temelji na isti predpostavki. Resorpcija teh cementov je odvisna od deleža nezreagirane CC v končnem strjenem materialu, ta je namreč bolj topen od produkta reakcije strjevanja cementa, karbonatnega apatita (CO_3Ap , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_2)_x(\text{OH})_{2-x}$). CO_3Ap pa je bolje topen od nestehimetričnih apatitov, ki jih dobimo kot produkte pri cementih z izključno kalcijevimi ortofosfati (9). Možno je tudi, da komponenti popolnoma zreagirata do čistega CO_3Ap . Takšno zmožnost izkazuje zmes vaterit/dikalcijev fosfat anhidrat v razmerju 40%:60% (w/w) po omočitvi z 0,8 M raztopino natrijevega fosfata (10).

Prednost tega tipa cementov je torej pospešitev resorpcije, ki je pomemben dejavnik v razvoju materialov za polnjenje in ojačitev poškodovane kostnine, a imajo zaenkrat nizko tlačno trdnost ($< 13 \text{ MPa}$) (9).

1.7 VGRADNJA UČINKOVIN V BIOKERAMIKE

Glede na procese uporabljene v pripravi formulacije, lahko zdravilno učinkovino (ZU) vključimo bodisi med pripravo BK ali pa jo lahko vežemo nanjo na koncu tega procesa. Vse visoko-porozne keramike, ki imajo pore ustrezne velikosti za sprejemanje molekul ZU, so dobri kandidati za oblikovanje sistema za nadzorovano sproščanje zdravil. V prvem planu je zato zasnova por v keramičnem materialu. Pomembni dejavniki so ustrezno število por, njihove velikosti, oblike, porazdelitev, povezljivost in potencialna funkcionalnost površine, glede na ZU, ki bo uporabljena. Če keramične matrice pripravimo s termično obdelavo jih polnimo z ZU šele ob koncu procesa. Običajno to storimo z impregnacijskimi tehnikami v visoko koncentriranih raztopinah. Poleg tega je kinetika sproščanja pretežno odvisna od difuzije ZU in primerne velikosti por, da omogočajo prodiranje fizioloških tekočin vanje. Kontrola lastnosti materiala pri pripravi keramičnih materialov pri visokih temperaturah je zahtevna, vendar pa lahko s pravilno temperaturo in časom toplotne obdelave vplivamo na nekatere teksturne parametre. Na primer, volumen por lahko nadzorujemo s temperaturo sintranja, medtem ko so dimenzije por načeloma odvisne od sestave materiala ter časa toplotnega cikla in sintranja. Alternative za pripravo oblik iz kalcijevih fosfatov pri nizkih temperaturah so metode obarjanja (cementi), sol-gel postopki, biomimetične strategije ali modeliranje s supramolekularnimi strategijami (11).

Pri vgradnji ZU v cemente jo lahko dodamo prahovom cementa, tekoči fazi ali pa nanesimo šele na že strjen material. Slednje ni mogoče pri injiciranju oziroma oblikovanju materiala *in situ*. Z načinom vgradnje vplivamo na razporeditev ZU po matrici in na interakcije, ki bi lahko omejevale sproščanje. Po strditvi je ZU razporejena po porah trdne matrice, kjer se lahko nahaja v treh oblikah: raztopljen v preostankih tekoče faze; adsorbirana ali kemično vezana na površino kristalov matrice; ali v trdni obliki znotraj por. Tako kot pri klasičnih BK so za sproščanje pomembne pore strjenega materiala. Formulacije z zelo nizko poroznostjo sproščajo učinkovine mnogo počasneje kot tiste z visoko poroznostjo. Na lastnosti strjenega cementa vplivajo tudi nekatere ZU, ki lahko zavirajo reakcijo strjevanja, znižajo poroznost ali pa spremenijo reološke lastnosti cementa za injiciranje (6).

Med primernimi ZU za vgradnjo v BK se najpogosteje znajdejo terapevtski peptidi, antibiotiki, citostatiki, protivnetne učinkovine, hormoni in proteini za morfogenezo kosti (6). Večina bio-keramičnih dostavnih sistemov pa je zaenkrat osredotočena na kontrolirano dostavo rastnih faktorjev za pospeševanje celjenja in integracijo tkiva (12).

1.8 ANTIBIOTIKI V VSADKIH

Kljub trudu za zagotavljanje aseptičnih pogojev v operativnih prostorih, je še vedno najpogostejši pooperativni zaplet bakterijska okužba. Zato so pomembni sistemi z vgrajenimi ZU, ki preprečujejo tovrstne zaplete (12). Ker smo v magistrski nalogi poučevali predvsem sproščanje antibiotikov, si pogledjmo osnovni motiv za vgradnjo in lokalno nadzorovano sproščanje teh ZU.

Okužba je definirana kot homeostatično neravnotežje med tkivom gostitelja in prisotnostjo mikroorganizmov pri koncentraciji nad 10^5 na gram tkiva. Okužba resno omejuje celjenje in regeneracijsko sposobnost tkiva in ostaja glavna omejitev pri dolgoročni koristnosti ortopedskih vsadkov. Bakterije so povsod, saj so potencialni viri onesnaženja v čisti operacijski dvorani kljub skrbnim prizadevanjem za ohranitev aseptičnega okolja. Okužba (sepsa) in kasnejša obolevnost je povezana z visokimi stroški in se pojavlja pri 5% bolnikov po operacijah celotne zamenjave sklepa. Profilaktično jemanje antibiotikov se je izkazalo z zmanjšanjem nevarnosti za sepso za 81%. Toda običajno sistemsko odmerjanje antibiotikov ima velike pomanjkljivosti, kot so sistemska toksičnost, ledvični zapleti, jetrni zapleti in slaba penetracija tako v nekrotično tkivo kot tudi v slabše prekrvavljena kostna tkiva. Zapleti pogosto zahtevajo hospitalizacije bolnikov. V prizadevanju za preprečevanje teh sistemskih neželenih učinkov, raziskovalci intenzivno iščejo rešitve za lokalno sproščanje antibiotikov, na mestu poškodbe oziroma kirurškega posega. Čeprav je lokalna dostava antibiotikov zelo obetaven pristop, še vedno ostaja veliko izzivov. Problematična sta stabilnost antibiotika v vsadku in deaktivacija antibiotika med izdelavo oblike, ki jih je potrebno obravnavati, preden se lahko začnejo klinična preskušanja (12).

Najpogostejši biorazgradljivi dostavni sistemi so kombinacija polimera in antibiotika. Ogradja iz PLGA poli(mlečna glikolna) kislina z vgrajenimi antibiotiki, kot so ciprofloksacin, gentamicin in vankomicin, so v poskusih izkazala uspešno dolgoročno lokalno dostavo antibiotikov do 20 dni ali več tako *in vitro* kakor tudi v predkliničnih živalskih modelih. Vsekakor bi lahko podobne uspehe dosegali tudi z nadaljnjim raziskovanjem na področju bio-keramičnih modelov (12).

1.9 IN VITRO ŠTUDIJE IMPLANTOV

Razvoj vsadkov z namenom sproščanja učinkovin je v medicini postal nujen zaradi kratkega razpolovnega časa številnih učinkovin po parenteralni aplikaciji. Z daljšim obdobjem sproščanja učinkovine se izboljšuje sprejemljivost zdravljenja za bolnika, saj preprečuje

potrebo po pogostih invazivnih posegih z injekcijami. Vsadki so odmerne oblike, ki so subkutano dani s pomočjo kirurškega posega ali podkožne igle in so namenjeni za sprostitve učinkovin skozi daljše časovno obdobje (13).

Za *in vitro* študije sproščanja ZU iz vsadkov je najprimernejša aparatura s pretočno celico (aparatura 4, po US Farmakopeji) z morebitnimi spremembami (zmanjšanje notranjega premera celice, manjša pretočnost), saj predstavlja pogoje podobne tistim s katerimi se srečujejo *in vivo*. Glavna omejitev te metode je neposredna izpostavljenost vsadka v toku medija, kar ne predstavlja resničnega dogajanja *in vivo* okolja. Pri podkožni vsaditvi predvidevamo, da se učinkovina sprošča v neposredno bližino vsadka (sestavljen iz tkivne tekočine in celic), čemur sledi pasivna difuzija ali morda olajšan transport v celice in ožilja, preden končno doseže sistemski obtok. Z zelo nizkim pretokom medija skozi celico se lahko temu dogajanju *in vitro* precej približamo (13).

Glede na poročila iz podobnih analiz lahko *in vitro* sproščanje analizirano tudi s statično metodo. Spremlja se sproščanje učinkovine v medij brez mešanja ali pretoka pri fiziološki temperaturi. Vsadek v enotnem časovnem intervalu prenašamo v čaše z enako količino svežega medija (13).

1.10 IN VITRO IN VIVO KORELACIJE

Po FDA definiciji je *in vitro in vivo* korelacija (IVIVC) matematični model, ki opisuje odnos med *in vitro* lastnostjo farmacevtske oblike in relevantnim *in vivo* odzivom. Običajna *in vitro* lastnost je hitrost oziroma obseg raztapljanja/sproščanja, medtem ko je *in vivo* odziv koncentracija ZU v plazmi ali količina absorbirane ZU (14).

V FDA smernicah so definirali 5 nivojev IVIVC. Pojem teh nivojev je osnovan na zmožnosti posamezne korelacije, da odraža celovitost odnosa med *in vitro* sproščanjem/raztapljanjem in plazemskimi koncentracijami *in vivo* v odvisnosti od časa (15).

Korelacija nivoja A je najvišja kategorija in predstavlja večtočkovni odnos med hitrostjo *in vitro* sproščanja/raztapljanja in hitrostjo vstopanja ZU v *in vivo* model. Odstotek absorbirane učinkovine po navadi računamo z metodami po Wagner-Nelsonu, Loo-Riegelmanu ali pa z neodvisno numerično razčlenitvijo. Namen oblikovane korelacije A nivoja je možnost predvidevanja *in vivo* dogajanja iz *in vitro* analiz. Tako lahko *in vitro* profil sproščanja/raztapljanja služi kot nadomestek za *in vivo* teste in omogoča, da se ob manjših spremembah v proizvodnji, dobaviteljnih ali lokaciji izognemo potrebi po dodatnih kliničnih

študijah in z njimi povezanimi izdatki. Je tudi odlično orodje za kontrolo kvalitete produktov, saj lahko predvidevamo *in vivo* obnašanje farmacevtske oblike (15).

IVIVC B nivoja sloni na statistični analizi določenega trenutka. Pri tem nivoju korelacije primerjamo srednji čas raztapljanja *in vitro* s srednjim časom zadrževanja ali srednjim časom raztapljanja *in vivo*. Ta korelacija ne predstavlja večtočkovnega odnosa, saj lahko mnogi različni *in vivo* profili dajo podoben srednji čas zadrževanja. S takšno korelacijo ne moremo z gotovostjo predvidevati vpliva manjših sprememb v formulaciji ali proizvodnji na *in vivo* obnašanje izdelka, zato je njena uporabnost v praksi močno okrnjena (15).

IVIVC C nivoja primerja eno časovno točko raztapljanja ($t_{50\%}$, $t_{90\%}$, ipd.) s srednjo vrednostjo enega izmed farmakokinetičnim parametrom (AUC, t_{max} ali C_{max}). Predstavlja eno točkovno korelacijo in ne odraža oblike *in vivo* profila, ki je ključen pokazatelj kinetike absorpcije, še posebej pri farmacevtskih oblikah s prirejenim sproščanjem. Je najnižji nivo korelacije, saj predstavlja le delen odnos med absorpcijo *in vivo* in raztapljanjem *in vitro*. Ta nivo korelacije je v praksi lahko uporaben le v zgodnjih fazah razvoja farmacevtske oblike (15).

Večkratna korelacija C nivoja povezuje enega ali več farmakokinetičnih parametrov s količino sproščene/raztopljene ZU ob različnih časovnih točkah. C korelacijo v več točkah lahko uporabimo v primerih biowaiver-jev (za njih je dovoljeno nihanje biološke uporabnosti), če lahko najdemo korelacijo z enim ali več farmakokinetičnimi parametri skozi celotni profil sproščanja/raztapljanja. Dokazati moramo odnos med istimi parametri v vsaki časovni točki. Če je možna takšna korelacija, obstaja velika verjetnost tudi za korelacijo nivoja A. Korelacija nivoja C mora imeti vsaj tri časovne točke, ki obsegajo zgodnje, srednje in pozne faze profila sproščanja/raztapljanja (15).

Zadnja je korelacija nivoja D. Ta ni uporabna za regulatorne namene, saj predstavlja rangiranje in kvalitativno analizo. Lahko nam je v pomoč le pri razvoju farmacevtskih oblik ali proizvodnih postopkov (15).

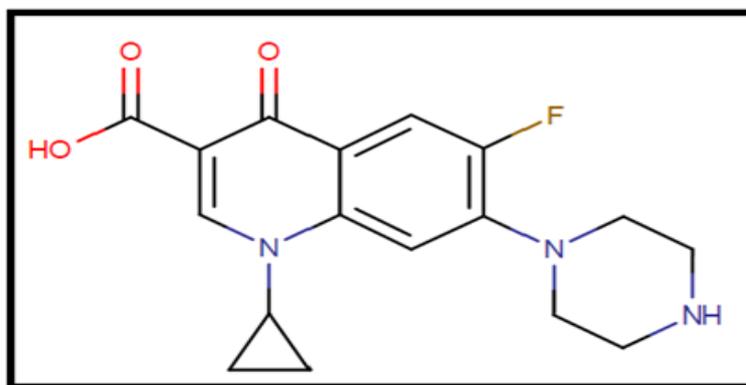
1.11 SPROŠČANE UČINKOVINE

V magistrski nalogi smo iz biokeramičnih vsadkov sproščali 4 različnih modelnih ZU. Uporabljene učinkovine so se razlikovale v mnogih fizikalnih in kemijskih lastnostih, ki lahko vplivajo na sproščanje iz matrice našega materiala. S tem smo želeli zaznati razlike, ki se pojavijo v njihovih *in vitro* profilih sproščanja. Učinkovine smo izbrali na podlagi njihove potencialne uporabnosti v lokalnem okolju kostnega tkiva, varnosti za rokovanje, ceni in dobavljivosti.

1.11.1 CIPROFLOKSACIN

Ciprofloksacin (CFX) je protinfekcijska učinkovina širokega spektra delovanja iz skupine fluorokinolonov. *In vitro* je aktiven proti širokemu spektru gram-negativnih in gram-pozitivnih mikroorganizmov. Ker ni poznanega primera navzkrižne odpornosti med CFX ter betalaktami, makrolidi, tetraciklini in aminoglikozidi. Delovanje fluorokinolonov je usmerjeno specifično na bakterijsko girazo in s tem zavira podvojevanje bakterijske DNK, povzroča pa tudi mutacije DNK. Zdravilo ima 100-krat večjo afiniteto za giraze bakterijske DNK kot za giraze sesalcev (16).

CFX je bil odkrit leta 1981 v podjetju Bayer in je bil prvi fluorokinolon na trgu. Leta 1987 je bil kot zdravilo z imenom Cipro® odobren s strani FDA kot prvi peroralni antibiotik širokega spektra tega razreda. Intravensko formulacija je sledila leta 1991. CFX so intenzivno proučevali in njegov varnost je dobro dokumentirana v več kot 32.000 publikacijah (17).



Slika 1: Molekulska struktura ciprofloksacina

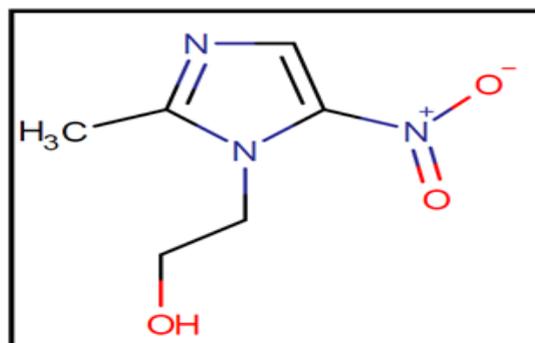
1.11.2 METRONIDAZOL

Metronidazol (MNZ) je sintetična antibakterijska in antiprotozoična učinkovina iz razreda nitroimidazolov in se uporablja proti praživalim kot *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* in *Giardia lamblia*. Metronidazol je zelo učinkovit proti anaerobnim bakterijskim okužbam in se uporablja tudi za zdravljenje crohnove bolezni, diareje povezane z antibiotiki in rozacee (16).

MNZ je predzdravilo. Neioniziran je selektiven za anaerobne bakterije zaradi njegove sposobnosti, da se intracelularno reducira do njegove aktivne oblike. Reducirana molekula se nato kovalentno veže na DNK, omejuje njeno vijačno strukturo, zavre sintezo bakterijskih nukleinskih kislin in ima za posledico smrt bakterijskih celic (16).

MNZ je prvi sintetiziral Francoski laboratorij Rhone-Poulenc in je bil predstavljen sredi leta 1950 pod blagovno znamko Flagyl. Je bil prvi član skupine zdravil imenovane nitroimidazoli.

Z začetkom leta 1959 se je začel uporabljati za zdravljenje kroničnih okužb s parazitom *Trichomonas vaginalis*. Antibakterijsko aktivnost te učinkovine so odkrili po naključju leta 1962, ko je ta ozdravil bolnico tako *trihomonadnega vaginitisa* kot bakterijskega vnetja dlesni. Učinkovit je proti gram-negativnim anaerobom kot so *Bacteroides* ali gram-pozitivnih anaerobov kot klostridije (17).

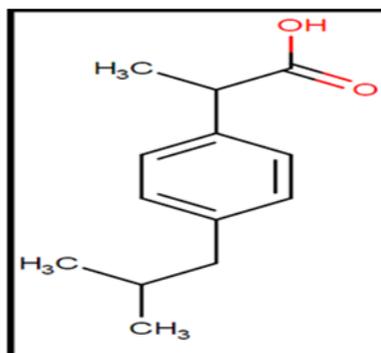


Slika 2: Molekulska struktura metronidazola

1.11.3 IBUPROFEN

Ibuprofen (IB) je nesteroidna protivnetna učinkovina z analgetičnim in antipiretičnim učinkom. Čeprav natančen mehanizem delovanja IB ni znan, vemo, da je neselektiven zaviralec ciklooksigenaze, encima, ki je vključen v sintezo prostaglandinov po poti arahidonske kisline. Njegovi farmakološki učinki naj bi bili posledica delovanja na ciklooksigenazo-2, kar se odraža v zmanjšanju sinteze prostaglandinov, ki sodelujejo pri posredovanju vnetja, bolečine, vročine in oteklin. Antipiretično delovanje bi lahko bilo posledica delovanja na hipotalamus, kar se odrazi v povečanem pretoku periferne krvi, vazodilatacijo in posledično izgubo toplote iz telesa. Inhibicija encima ciklooksigenaze-1 domnevno povzroči nekatere neželene učinke IB kot so razjede gastrointestinalnega trakta (16).

IB je bil razvit v Britanskem podjetju Boots Laboratories, ki ga je začel prodajati v Veliki Britaniji leta 1964 pod imenom Brufen, kot zdravilo na recept (18).

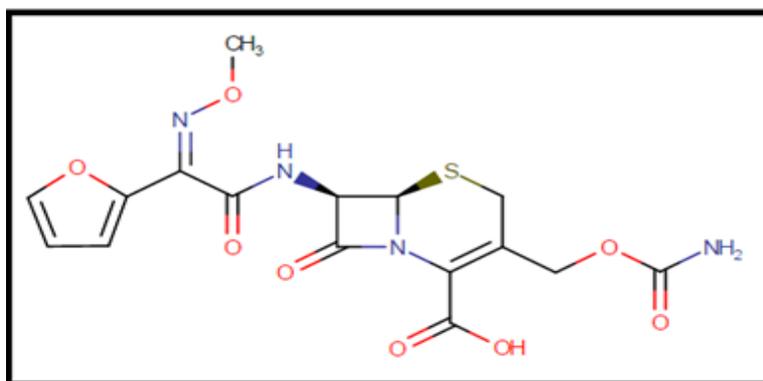


Slika 3: Molekulska struktura ibuprofena

1.11.4. CEFUROKSIM

Cefuroksim (CFU) je vrsta β -laktamskega antibiotika. Spada v drugo generacijo cefalosporinskih antibiotikov. Učinkovit je proti aerobnim, po gramu pozitivnim mikroorganizmom in aerobnim, po gramu negativnim mikroorganizmom (16).

Cefalosporini enako kot penicilini zavirajo končno transpeptidacijo in s tem onemogočajo prečno povezovanje peptidoglikanov v celični steni rastoče bakterije, kar ima za posledico celično smrt (baktericno delovanje) (16). CFU je bil razvit v podjetju Glaxo (danes GlaxoSmithKline) leta 1970 in patentiran v ZDA. CFU zahteva intravensko ali intramuskularno apliciranje, saj je zaradi slabe absorpcije iz gastrointestinalnega trakta njegova uporabnost omejena. Glaxo je pozneje sintetiziral celotno družino estrov CFU, ki so primerni za peroralno dajanje ter pridobil patent leta 1981 (18).



Slika 4: Molekulska struktura cefuroksima

2 NAČRT DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v laboratoriju za farmakokinetiko in fizikalno farmacijo, na Fakulteti za farmacijo, Jagiellonian University, Krakov, Poljska, kot del Erasmus+ prakse. Magistrsko delo je del projekta v okviru katerega se razvija nov cementni biokeramični material (Material K), ki bi se lahko uporabljal kot polnilo po poškodbah/odstranitvi obolelega kostnega tkiva, ki ni izpostavljeno visokim obremenitvam. Z vgradnjo učinkovin v takšen material dobimo farmacevtsko obliko s podaljšanim lokalnim sproščanjem, ki predstavlja pomembno dodatno vrednost pri celjenju poškodb in zdravljenju obolelega tkiva oziroma zmanjševanja pojavnosti pooperativnih zapletov.

Analizirali smo *in vitro* sproščanje ciprofloksacina, metronidazola, ibuprofena in cefuroksima iz vsadkov pripravljenih iz cementnega biokeramičnega materiala. Na osnovi primerjave *in vitro* profilov sproščanja učinkovin smo želeli poiskati ključne lastnosti učinkovin, ki vplivajo na sproščanje in oceniti primernost uporabljenega materiala kot osnovo za vgradnjo farmacevtskih učinkovin.

Na osnovi rezultatov vzporedne *in vivo* raziskave smo iskali tudi *in vitro in vivo* korelacijo za učinkovino cefuroksim.

V magistrski nalogi smo si zastavili sledeče hipoteze:

H1: Fizikalno-kemijske lastnosti ZU vplivajo na profil sproščanja *in vitro* iz materiala K.

H2: Material K je primeren nosilec za lokalno dostavo zdravilnih učinkovin z namenom podaljšane sproščanja.

H3: Obstaja linearna korelacija med *in vitro* sproščanjem ter *in vivo* absorpcijo cefuroksima.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 CEMENTNI BIOKERAMIČNI MATERIAL K

Material K je bil razvit in pripravljen na oddelku za Keramike in Ognjevzdržne Materiale, Fakulteta za znanost o Materialih in Keramikah, Univerza za Znanost in Tehnologijo, Krakov, Poljska.

Sestavljen je iz dveh trdnih komponent v točno določenem razmerju:

- 40 % (w/w) mletega kalcita, polimorfne oblike kalcijevega karbonata (CaCO_3), kupljen pri POCH, Avantor Performance Materials Poland S.A., Glivice in
- 60 % (w/w) α -TCP, kalcijevega (V) ortofosfata pripravljenega po patentiranem postopku zgoraj omenjenega razvijalca.

Sestavini sta bili v ustreznem razmerju zmešani v mlinu. Končnemu produktu je bila določena poroznost, ki je znašala 37,7 %.

3.1.2 UČINKOVINE

Ciprofloksacin hidroklorid, metronidazol in natrijev ibuprofenat so bili kupljeni pri Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija.

Natrijev cefuroksimat je bil kupljen pri Polpharma SA, Poljska.

3.1.3 OSTALI MATERIALI

Metanol, CH_3OH ; $M = 32,04 \text{ g/mol}$ (Merck, Darmstadt, Nemčija).

Hitosan, z nizko molekulsko maso (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

Ocetna kislina, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$; $M = 60,05 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

85 % ortofosforna kislina, H_3PO_4 ; $M = 98 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

Ultračista voda.

Kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 ; $M = 136,09 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

Dinatrijev hidrogen fosfat, Na_2HPO_4 ; $M = 141,96 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

3.1.4 NAPRAVE IN PRIBOR

Aparatura 4 po USP za analize sproščanja.

HPLC sistem Hitachi High-Technologies Corporation, sestavljen iz L-2130 črpalke, L-2200 avtomatskega vzorčevalnika, L-2455 UV detektor z diodnim nizom in L-2350 peči za kolono. (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokio, Japonska).

HPLC kolona: LiChrospher® 100RP-18 125 mm x 4 mm, 5µm (Merck, Darmstadt, Nemčija) sklopljena z

HPLC predkolono: LiChroCART® zaščitna kolona 4,0 mm x 4,0 mm, 5µm (Merck, Darmstadt, Nemčija).

Računalnik OptiPlex 745 Dell (Irska) z programom EZChrom Elite Client/Server version 3.2 (Scientific Software Inc. Agilent 2005-2006).

Programska oprema WinNonlin 5.2.

UV-Vis spektrofotometer UNICAM HELIOS β (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Združene države Amerike).

Elektronsko laboratorijsko tehtnico WPS 60 / C (Radwag, Radom, Poljska) .

Zamrzovalnik (Telstar, Terrassa, Španija).

pH meter S20 SevenEasy (Mettler toledo, Greinfensee, Švica).

Elektromagnetno mešalo (IKA, Staufen, Nemčija).

Centrifuga Universal 32 (Hettich, Nemčija).

Mešalnik na ekscenter VXR Vibrax (IKA, Staufen, Nemčija).

Ultrazvočna kadička (Bandelin Sonorex, Berlin, Nemčija).

Polavtomatske pipete 2-20 µl, 20-200 µl in 200-1000 µl (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija).

Filtri iz steklenih vlaken 0,45 µm (Supelco, Pennsylvania, Združene države Amerike).

Plastične epruvetke oziroma mikrocentrifugirke (Isolab Laborgeräte GmbH, Wertheim, Nemčija).

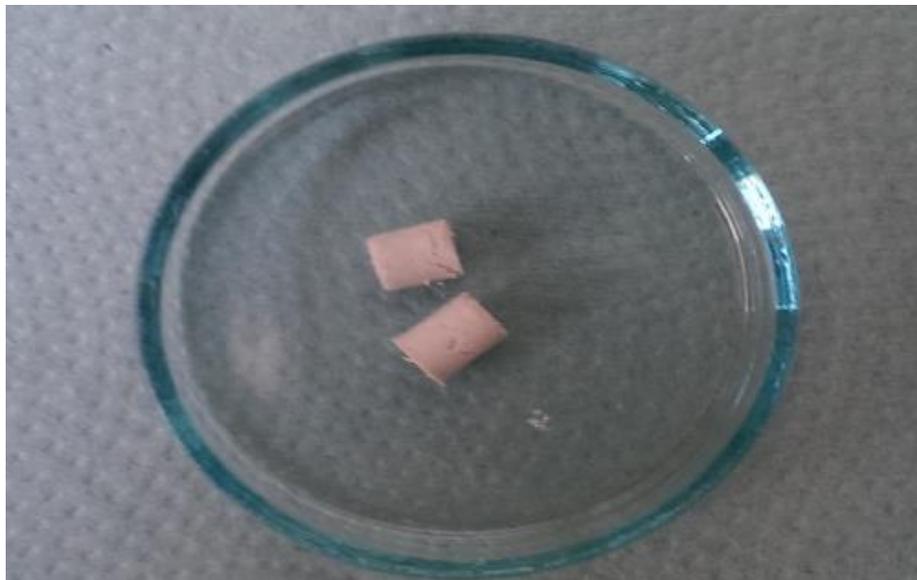
Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, tehtnički, merilni valji, viala, inserti za viala, presesalna buča, lij za presesalno bučo.

Ostali inventar: spatule, nastavki za pipete, palčke za mešanje, Parafilm® M.

3.2 PRIPRAVA BIOKERAMIČNEGA VSADKA

V mali terilnici smo 1 minuto mešali 180 mg materiala K in 50 mg ZU, da smo dosegli visoko homogenost zmesi. Nato smo ji dodali 50,4 µL 1 % (w/v) raztopine hitosana v 2,73 % (v/v)

očetni kislini in ponovili enominutno mešanje. Sledil je kvantitativen prenos v kalup iz pleksi stekla. Po 29 minutnem (skupno 30 min po omočitvi) sušenju smo cilindričen vsadek (slika5) (h= 7 mm, d= 5,9 mm) odstranili iz kalupa in ga pustili sušiti čez noč v temnem suhem prostoru. Testiranja sproščanja smo se praviloma lotili naslednje jutro.



Slika 1: Vsadki za sproščanje ZU.

3.3 IN VITRO SPROŠČANJE

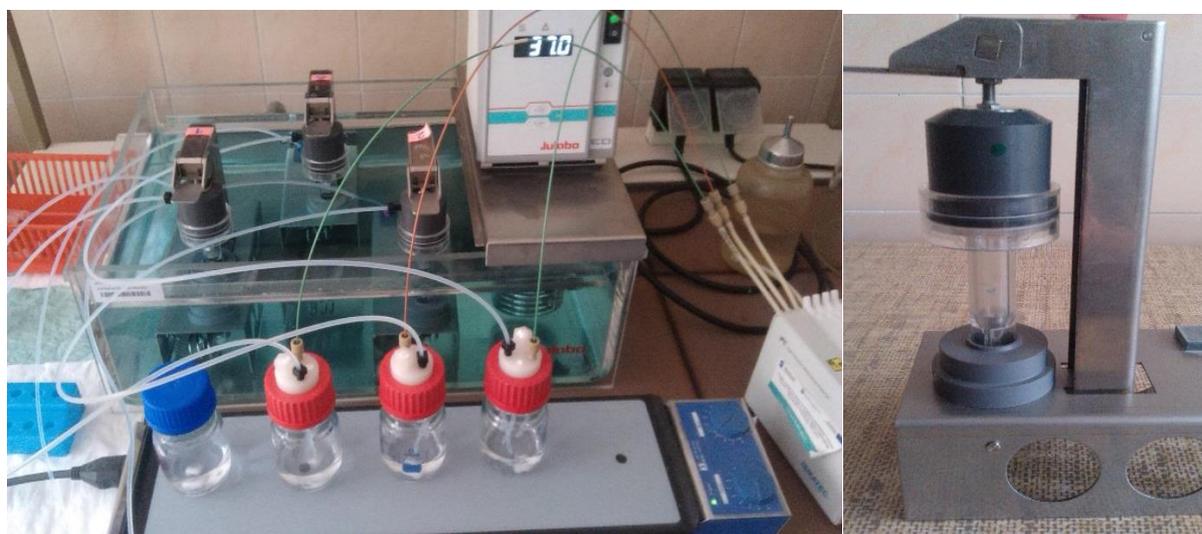
3.3.1 PRIPRAVA MEDIJA ZA IN VITRO SPROŠČANJE

Kot medij za *in vitro* sproščanje smo za vse učinkovine uporabili fosfatni pufer s pH 7,4 (FP). Pripravili smo ga iz raztopin 0,1 M dinatrijevega hidrogen fosfata (Na_2HPO_4) in 0,1 M kalijevega dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) v razmerju 818:182 (v/v). pH smo prilagodili na željeno vrednost z dodajanjem razredčene ortofosforne kisline. V vseh poizkusih smo uporabili sveže pripravljen medij.

3.3.2 IN VITRO SPROŠČANJE ZU IZ BIOKERAMIČNEGA MATERIALA

Za analizo *in vitro* sproščanja CPX, MNZ in IB smo se posluževali aparature 4 po USP (slika 6). Vsadek smo postavili v navpično nameščeno celico, ki omogoča vstop medija za raztapljanje na dnu. Medij iz zaprte celice izstopa skozi zgornje tesnilo, ki ob enem filtrira (filtri iz steklenih mikrovlaknen) tekočino in preprečuje odstranitev morebitnih neraztopljenih delcev iz celice. Medij za raztapljanje se črpa iz hranilnika in pred vstopom v celico potuje preko toplotnega izmenjevalca za regulacijo temperature. Ko medij zapusti celico se vrne v zbiralno posodo, iz katerega se ob v predhodno določenih časovnih točkah odvzame vzorčni

volumen, ki je sočasno nadomeščen s svežim medijem. Temperatura toplotnega izmenjevalca je bila vzdrževana pri 37 °C in hitrost medija skozi pretočno celico je bila tekom celotnega eksperimenta nastavljena na 1 mL/min. Tik pred začetkom eksperimenta smo v zbiralno posodo natočili točno 50 mL segretega medija in pred pričetkom z maksimalno hitrostjo pretoka iz celotnega sistema odstranili vse zračne mehurčke. Ko nam je to uspelo, smo pretok nastavili na 1 mL/min in pričeli analizo. Ob predhodno določenih časovnih točkah smo izklopili črpanje medija in iz zbiralnika s pipeto odstranili 0,5 mL vzorca, ga nadomestili z enakim volumenom svežega medija in ponovno vključili črpalčko. Vzorce smo zbirali do doseženega platoja v krivulji sproščanja (koncentracija ZU v mediju je bila konstantna). Vse vzorce smo takoj ustrezno redčili z medijem za sproščanje in z UV/VIS spektroskopijo določili njihovo koncentracijo. Za vsako ZU smo analizirali sproščanje iz treh vsadkov.



Slika 6: Aparatura 4 po USP levo in pretočna celica desno.

Vsadki s CFU so bili zaradi nestabilnosti te učinkovine v vodnem mediju analizirani s statično metodo (slika 7). Vsadek smo namestili v kovinsko kletko in ga na začetku poizkusa potopili v čašo z 50 ml medija za sproščanje, ki je bil predhodno segret in nato vzdrževan pri 37 °C na vodni kopeli. Kletko z implantatom smo v predvidenih intervalih prestavljali v čaše s svežim in segretim medijem, vzorce iz predhodne čaše pa takoj zamrznili na -80 °C. Prvim petim menjavam po 20 min, 40 min, 60 min, 90 min, 120 min je sledil konstanten enourni interval vse do konca sproščanja. Poskus smo zaključili, ko so koncentracije CFU v mediju padle pod najnižjo koncentracijo, ki je bila uporabljena za določitev umeritvene krivulje (1 µg/mL). Po določitvi koncentracije vzorcev vseh časovnih intervalov, smo profil sproščanja prikazali kot kumulativno količino sproščene učinkovine v odvisnosti od časa. Naredili smo analize sproščanja iz treh vsadkov.



Slika 7: Sproščanje CFU s statično metodo.

3.4 *IN VIVO* SPROŠČANJE

In vivo sproščanje CFU na modelu podgan je v svoji magisterski nalogi analizirala Joanna KUBASZEK (19). Na kratko, model za *in vivo* sproščanje so pripravili s predhodno vstavitvijo kanule v desno jugularno veno odraslega albino samca podgane. 24 ur po tem so v podkožje stegna podgane vstavili biokeramični vsadek (slika 8) s CFU kakršen je opisan zgoraj. V predhodno določenih časovnih točkah so 2 dni iz kanule odvzemali 0,3 mL vzorca krvi in ji injicirali enak volumen fiziološke raztopine. Vzorce so centrifugirali in plazmo do analize zamrznili na -80 °C. Naredili so poskuse na 4 različnih podganah.

Zato potrebe IVIVC smo uporabljali le rezultate v časovnih točkah v katerih smo imeli vsaj 3 vrednosti plazemskih koncentracij.



Slika 8: Vstavitve vsadka v podkožje stegna podgane (z dovoljenjem povzeto po (19)).

Vzorci so pred analizo odmrznili pri sobnih pogojih in 0,3 mL krvi dodali 70 μ L 0,53 M perklorne kisline (HClO_4), ki je oborila proteine. Po centrifugiranju so supernatant analizirali s HPLC z isto metodo kakor vzorce po *in vitro* sproščanju.

Podgani so tudi intravensko injicirali raztopino CFU (50 mg/kg telesne teže) in v predhodno določenih časovnih točkah odvzemali in analizirali vzorce po zgoraj opisanih postopkih. Iz plazemskih koncentracij učinkovine so s programom WinNonlin 5.2 izračunali farmakokinetične konstante.

3.5 DOLOČANJE KONCENTRACIJE UČINKOVIN V VZORCIH *IN VITRO* POSKUSOV

3.5.1 UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIČNA METODA

Koncentracije ciprofloksacina, metronidazola in ibuprofena v vzorcih *in vitro* poskusov smo določali z UV/VIS spektrofotometrično metodo.

3.5.1.1 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN

Za pripravo osnovne standardne raztopine (R_0 , 300 $\mu\text{g/mL}$) smo točno natehtali približno 30 mg posamezne ZU. Po kvantitativnem prenosu v 100 mL bučko smo ZU raztopili v približno 50 mL 0,1M fosfatnega pufru pH 7,4 (FP) ter nato z istim pufrom dopolnili do oznake. Po 5 minutni inkubaciji na ultrazvočni kadički z ledom smo raztopino termostatirali na sobno temperaturo in z redčenjem pripravili kalibracijske standardne raztopine. Primer postopka prikazuje preglednica II. Po vsaki redčitvi smo raztopine 30 sekund mešali na mešalu na ekscenter. Pripravili smo tri paralelke vsake raztopine. Območja koncentracij ZU znotraj katerih vlada linearna odvisnost med absorbanco in koncentracijo (absorbanca nižja od 1) je za posamezne ZU različno, zato smo redčitve prilagodili temu območju.

Preglednica II: Prikaz primera priprave kalibratorjev za določeno ZU.

Raztopina	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8
Priprava	3,0 mL	8,0 mL	1,5 mL	1,25 mL	1,0 mL	0,75 mL	0,5 mL	1,0 mL
	R_0	R_0	R_0	R_0	R_0	R_0	R_0	R_5
	+	+	+	+	+	+	+	+
	7,0 mL	8,0 mL	1,9 mL	8,75 mL	9,0 mL	9,25mL	9,5 mL	9,0 mL
	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP
c [$\mu\text{g/ml}$]	30,0	20,0	15,0	12,5	10,0	7,5	5,0	1,0

3.5.1.3 POGOJI METODE

Vzorci smo merili v kivetah iz kvarčnega stekla. Pot svetlobnega žarka skozi vzorec je bila dolga 1 cm. Analizna valovna dolžina posamezne ZU je bil absorpcijski maksimum UV/VIS spektra te ZU. Vzorci smo redčili do koncentracij linearne odvisnosti med absorbanco in koncentracijo ZU (območje skrajnih točk umeritvene krivulje). Pogoje meritev za posamezne učinkovine prikazuje preglednica III. Ponovljivost smo podali kot največjo izračunano vrednost relativne standardne deviacije posameznih točk in točnost kot največji odmik posamezne določitve od prave vrednosti koncentracije.

Preglednica III: Analizne valovne dolžine, ponovljivost, točnost in linearno območje metode za določanje koncentracij ZU.

Učinkovina	Analizna valovna dolžina (nm)	Ponovljivost (%)	Točnost (%)	Linearno območje ($\mu\text{g/mL}$)
ibuprofen	223	3,56	2,98	5,0-30
ciprofloksacin	271	1,32	5,72	1,0-12,5
metronidazol	320	0,36	2,14	2,5-20

3.5.1.4 UMERITVENA KRIVULJA

Za izračun koncentracij ZU v vzorcih smo potrebovali umeritveno krivuljo, ki poda neposredno odvisnost odziva detektorja od koncentracije analita v vzorcu. Za določitev umeritvene krivulje smo uporabili 6-7 standardnih raztopin z naraščajočimi koncentracijami ZU. Vsako standardno raztopino smo pripravili v treh paralelkah.

Podatke smo analizirali v programu Microsoft Excel s pomočjo linearne regresije in po metodi najmanjših kvadratov določili enačbo umeritvene premice. Za oceno ustreznosti umeritvene premice smo izračunali kvadrate Pearsonovih koeficientov korelacije (r^2).

Koncentracije ZU v vzorcih poskusov sproščanja smo izračunali iz umeritvene krivulje.

3.5.2 METODA HPLC

Koncentracije CFU smo določali po metodi, ki so jo razvili in validirali v predhodnih analizah s to ZU. Uporabili smo analitsko metodo HPLC, analite pa smo detektirali z UV detektorjem z diodnim nizom (DAD).

3.5.2.1 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN

Za pripravo prve standardne raztopine (R_1 , 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) smo točno natehtali približno 40 mg CFU. Po kvantitativnem prenosu v 100 mL bučko smo CFU raztopili v približno 50 mL 0,1M fosfatnega pufru s pH 7,4 (FP) ter nato z istim pufrom dopolnili do oznake. Po 5 minutni inkubaciji na ultrazvočni kadički z ledom smo raztopino termostatirali na sobno temperaturo in z redčenjem pripravili preostale standardne raztopine. Postopek prikazuje preglednica IV. Po vsaki redčitvi smo raztopine 30 sekund mešali na mešalu na ekscenter. Pripravili smo tri paralelke vsake raztopine.

Preglednica IV: Prikaz priprave sekundarnih raztopin.

Raztopina	R_2	R_3	R_4
Priprava	1 mL R_1 +1 mL FP	0,1 mL R_2 +1,9 mL FP	0,2 mL R_3 +1,8 mL FP
c [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	200	10	1

3.5.2.2 PRIPRAVA MOBILNE FAZE

Za vodni del mobilne faze smo uporabili dnevno pripravljen 20 mM fosfatni pufer. Ustrezno maso kalijevega dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) smo raztopili v 1 L prečiščene vode. Pufri smo med stalnim mešanjem z ortofosforjevo kislino uravnali pH na 4,5. Pripravljeno pufersko raztopino smo prefiltrirali ter razplinjevali 10 minut. Kot organski del mobilne faze smo uporabili metanol. Razmerje organske in vodne faze je bil 20:80 (v/v).

3.5.2.3 POGOJI METODE

Ustrezno ločbo analitov smo dosegli s kolono LiChrospher® 100RP-18 (125 mm x 4 mm, 5 μm) in izokratsko mobilno fazo, ki je bila sestavljena iz 80 % fosfatnega pufru (20 mM) s pH 4,5 in 20 % metanola. Z DAD detektorjem smo izmerili najvišje odzive pri valovni dolžini 275 nm. Pretok mobilne faze je bil konstanten pri 0,9 mL/min, kolono smo termostatirali na 25°C in avtomatski vzorčevalnik na 4°C, v HPLC sistem pa smo injicirali 10 μL vzorca.

Vzorci in vitro sproščanja smo pred nanosom na kolono 10 krat redčili z vodnim delom mobilne faze.

3.5.2.4 UMERITVENA KRIVULJA

Za izračun koncentracije CFU v vzorcih smo potrebovali umeritveno krivuljo, ki poda neposredno odvisnost odziva detektorja od koncentracije analita v vzorcu. Za določitev

umeritvene krivulje smo uporabili standardne raztopine (R_1 - R_4) z naraščajočimi koncentracijami CFU. Za vsako koncentracijo smo pripravili in izmerili odziv treh paralelnih standardnih raztopin.

Podatke smo analizirali v programu Microsoft Excel s pomočjo linearne regresije in po metodi najmanjših kvadratov določili enačbo umeritvene premice. Za oceno ustreznosti umeritvene premice smo izračunali kvadrate Pearsonovih koeficientov korelacije (r^2).

3.6 DOLOČANJE KINETIKE IN MEHANIZMA SPROŠČANJA UČINKOVIN

Za oceno kinetike sproščanja ZU iz vsadka smo se posluževali Higuchijevega modela, ki je primeren za keramične dostavne sisteme s homogeno razporeditvijo ZU po celotnem volumnu. Poenostavljeno enačbo tega modela podaja enačba 6. Uporabljene so bile le časovne točke, ki so v profilu sproščanja v linearnem odnosu (brez začetnih in končnih točk).

$$M_t = K_H \sqrt{t} \quad (\text{enačba 6})$$

Kjer je:

- M_t =količina sproščene učinkovine do časa t
- K_H =Higuchijeva konstanta kinetike sproščanja ZU
- t =čas

Za oceno mehanizma sproščanja ZU iz materiala pa smo uporabili model Korsmeyer-Peppas (enačba 7). Glede na n vrednost tega modela lahko sklepamo na različne mehanizme sproščanja (razpredelnica V). Za izračune smo uporabili le točke do 60 % celotne sproščene učinkovine v skladu z uporabljenim modelom.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (\text{enačba 7})$$

Kjer je:

- M_t =količina sproščene učinkovine v času t
- M_∞ =količina celokupne sproščene učinkovine
- t =čas
- n =vrednost tega parametra podaja mehanizem sproščanja ZU iz materiala

Razpredelnica V: Pomen n vrednosti (20).

Vrednost n	Mehanizem sproščanja	Hitrost kot funkcija časa
0,5	Fickova difuzija	$t^{-0,5}$
$0,5 < n < 0,89$	»Non-Fickova« difuzija	t^{n-1}

0,89	»Case II« transport	Sproščanje ničtega reda
>0,89	»Super case II« transport	t^{n-1}

Iskane spremenljivke smo dobili s pomočjo programa MS Excel, v katerem smo izbrane podatke vnesli v graf in iz enačbe linearne trendne premice odčitali strmino (K_H), oziroma odsek na ordinati (n).

3.7 DOLOČANJE *IN VITRO* *IN VIVO* KORELACIJE

Za *in vitro in vivo* korelacijo smo določali deleže celokupnega absorbiranega (f_a) CFU do časovne točke vzorčenja za *in vivo* in deleže sproščene učinkovine (f_r) iz implantata *in vitro*. Vrednosti f_a in f_r smo nanesti na graf v odvisnosti od časa za primerjavo profilov in iskali možnost odvisnosti, ki bi jo lahko pripisali krivuljama. Iskali smo korelacijo nivoja A.

Za izračun deleža celokupnega absorbiranega CFU do časa t smo se posluževali enačbe 8.

$$f_a = \frac{x_{at}}{x_{\infty}} = \frac{C_{pt} + C_{tt} + k_{el} * AUC_{0 \rightarrow t}}{AUC_{0 \rightarrow \infty}} \quad (\text{enačba 8})$$

Kjer je:

- f_a =delež celokupne absorbirane učinkovine do časa t
- X_{at} =celokupna ZU absorbirana do časa t
- X_{∞} = $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ =količina celotne absorbirane ZU v času poskusa
- C_{pt} =koncentracija ZU v centralnem prostoru ob času t
- C_{tt} =koncentracija ZU v perifernem prostoru ob času t
- $k_{el} * AUC_{0 \rightarrow t}$ =količina iz modela izločene učinkovine do časa t

Za izračun koncentracij v perifernem prostoru v časovnih točkah smo se posluževali Loo-Riegelmanove metode z uporabo enačbe 9.

$$(C_t)_{t_n} = \frac{k_{12} \Delta C_p \Delta t}{2} + \frac{k_{12}}{k_{21}} (C_p)_{t_{n-1}} (1 - e^{-k_{12} \Delta t}) + (C_t)_{t_{n-1}} e^{-k_{21} \Delta t} \quad (\text{enačba 9})$$

Kjer je:

- C_t =koncentracija ZU v tkivu
- t_n =čas vzorčenja za vzorec n
- t_{n-1} =čas vzorčenja zadnjega vzorca pred vzorcem n
- $(C_p)_{t_{n-1}}$ =koncentracija ZU v centralnem prostoru za vzorec $n-1$

- ΔC_p =razlika v koncentraciji v centralnem prostoru med dvema zaporednima vzorčenjema
- Δt =časovna razlika me dvema vzorčenjema
- k_{12} =konstanta porazdeljevanja ZU iz centralnega v periferni prostor modela
- k_{21} =konstanta porazdeljevanja ZU iz periferni v centralni prostor modela

Za izračun deleža sproščene učinkovine (%st) iz implanta pri *in vitro* sproščanju smo uporabljali enačbo 10.

$$f_r = \frac{C_t}{C_\infty} \text{ (enačba 10)}$$

Kjer je:

- C_t =količina sproščene ZU do časa t
- C_∞ =celotna količina iz implanta sproščene ZU

4 REZULTATI

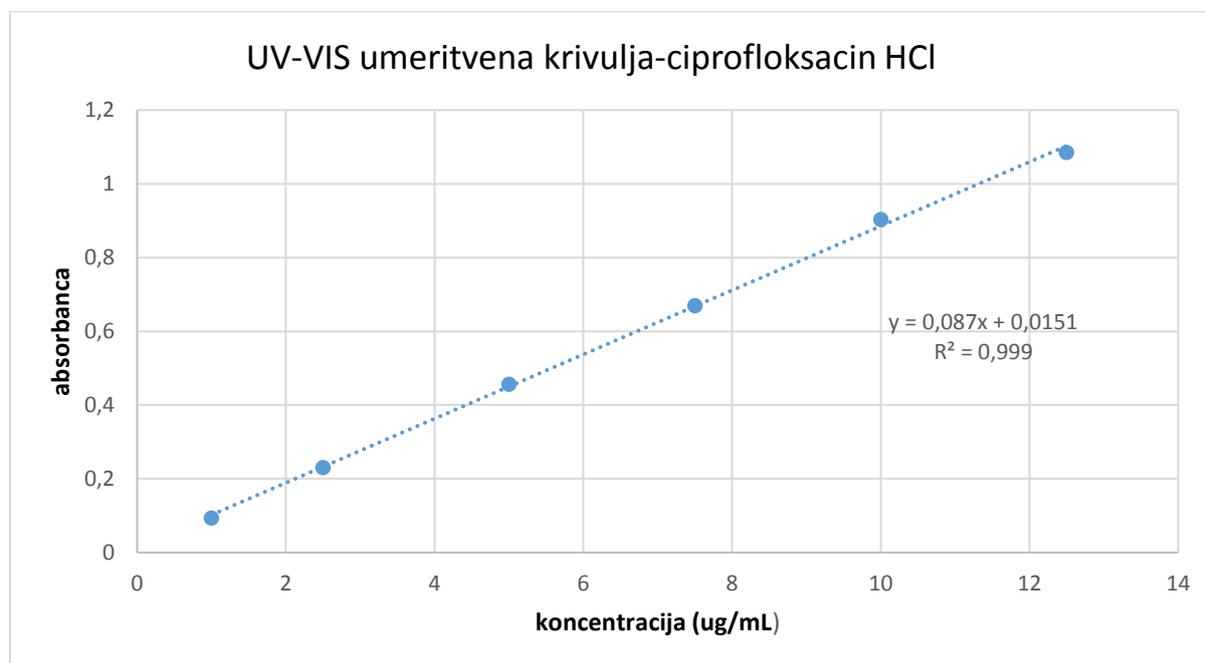
4.1 UMERITVENE KRIVULJE IN PROFILI *IN VITRO* SPROŠČANJA UČINKOVIN

Ponovljivost UV/VIS metod je podana kot največja izračunana vrednost relativne standardne deviacije posameznih točk umeritvene krivulje in točnost kot največji odmik posamezne določitve od prave vrednosti koncentracije.

Profile sproščanja ZU iz naših implantatov smo podali glede na delež sproščene učinkovine od celotne vgrajene učinkovine v odvisnosti od časa. Tako lahko ob enem pokažemo tudi izkoristek in posledično smiselnost vgradnje ZU v naš material. Posamezne časovne točke so predstavljene s standardno napako izračunano iz rezultatov treh paralelnih poskusov, ki so bili narejeni za vsako ZU.

4.1.1 CIPROFLOKSACIN

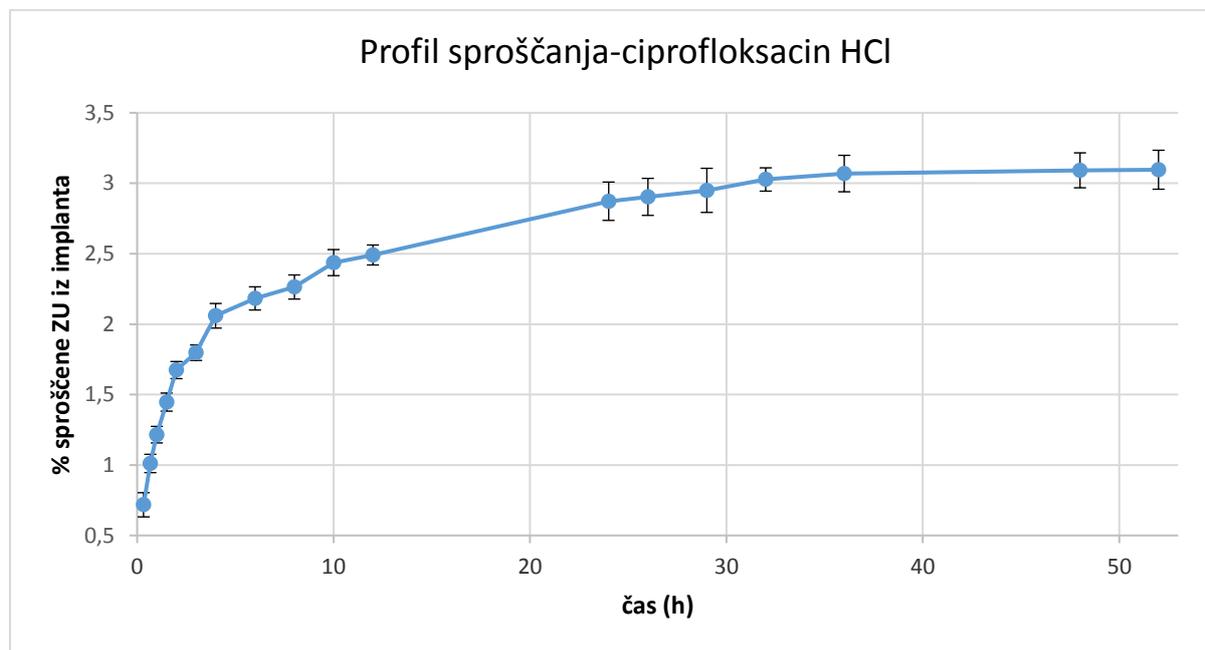
Slika 9 prikazuje umeritveno krivuljo za UV/VIS metodo določanja koncentracij CPX. Linearno območje metode je med 1,0 in 12,5 µg/mL CPX, ponovljivost je bila 1,32 % in točnost 5,72 %. Pearsonov koeficient korelacije je bil 0,999.



Slika 9: Umeritvena krivulja za UV-VIS analize CPX HCl.

Ciprofloksacin hidroklorid ima pKa 5,76 in pKb 8,68, topnost v vodi je 1,35 mg/mL (16). Konstanta hitrosti sproščanja je bila prvi 2 uri 0,56 mg/h^{1/2} in nato 0,13 mg/h^{1/2} do 32 ure

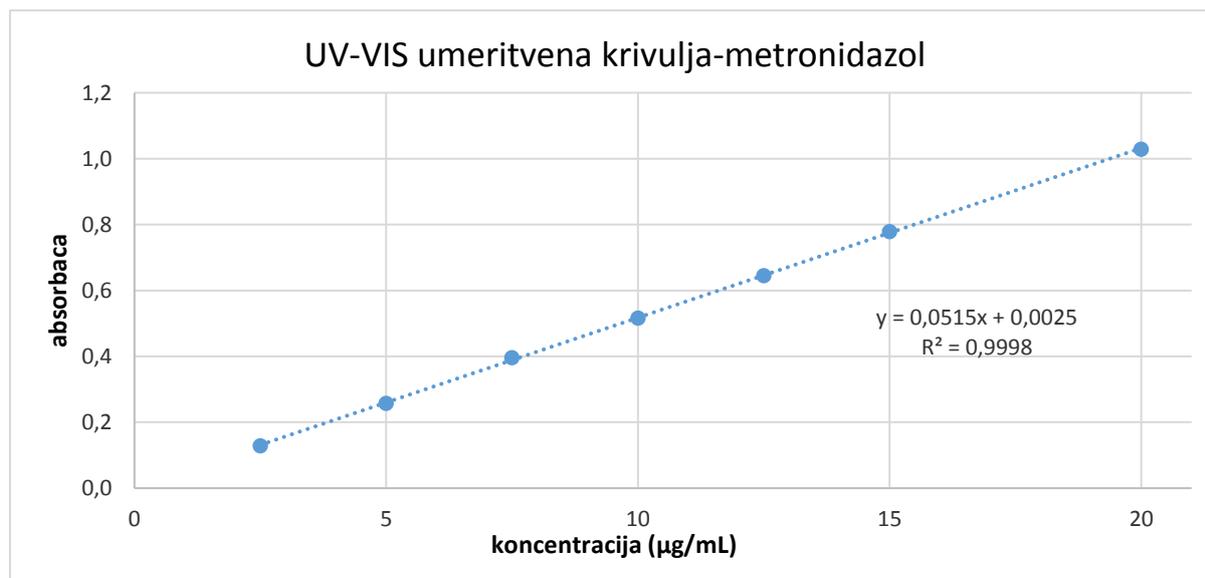
sproščanja, ko je v profilu nastopil plato. Sprostilo se je le 3,2 % vgrajenega CPX hidroklorida (slika 10).



Slika 10: Profil *in vitro* sproščanja CPX HCl. Podani so % sproščene ZU od celotne vgrajene v vsadku v odvisnosti od časa.

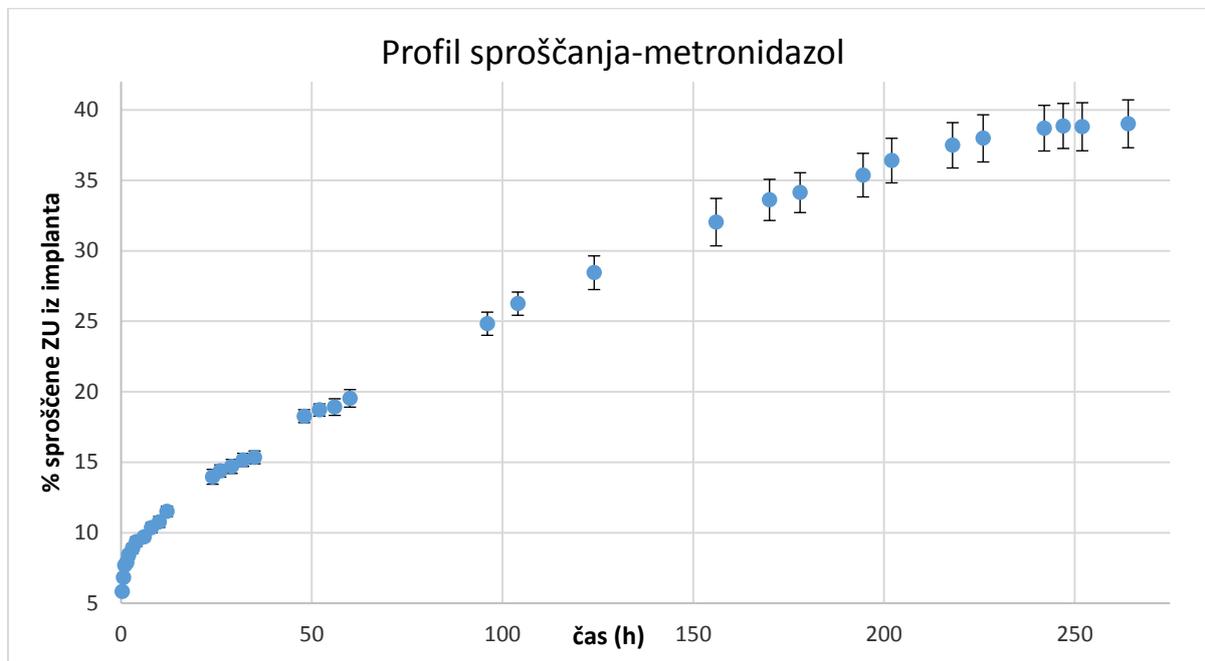
4.1.2 METRONIDAZOL

Slika 11 prikazuje umeritveno krivuljo za UV/VIS metodo določanja koncentracij MNZ. Linearno območje metode je med 2,5 in 20 $\mu\text{g/mL}$ CPX, ponovljivost je bila znotraj 0,36 % in točnost 2,14 %. Pearsonov koeficient korelacije je bil 0,999.



Slika 11: Umeritvena krivulja za UV-VIS analize MNZ.

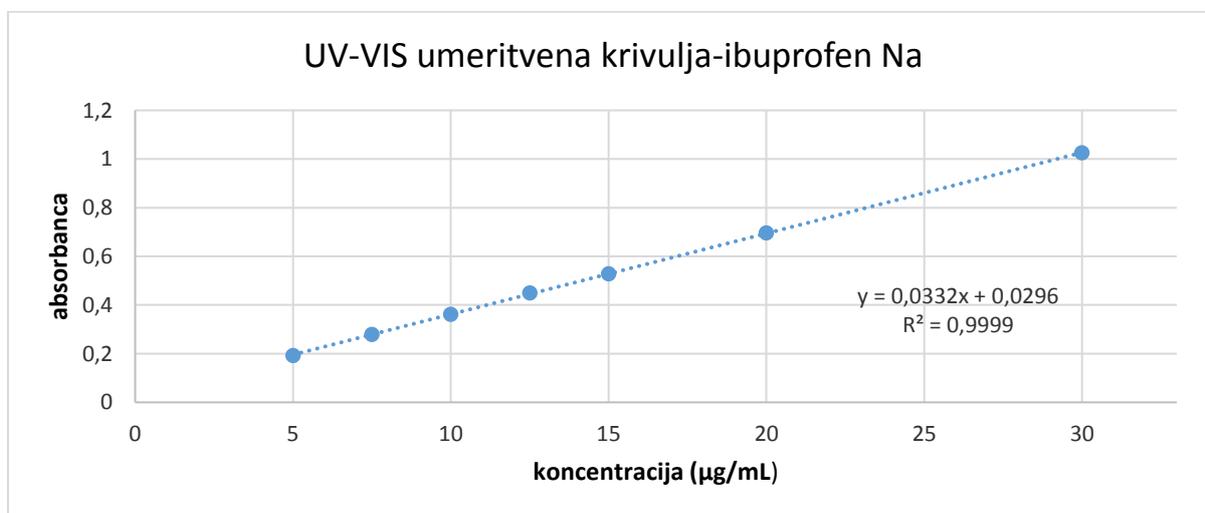
MNZ kot nevtralna učinkovine ima pKa 3,09 in topnost v vodi 9,5 mg/mL (16). Konstanta hitrosti sproščanja je bila do 202. ure 0,19 mg/h^{1/2}, potem pa se je hitrost sproščanja postopoma zmanjševala vse do 242 ure, ko je v profilu nastopil plato (slika12). Sprostilo se je 39% vgrajene ZU.



Slika12: Profil *in vitro* sproščanja MNZ. Podani so % sproščene ZU od celotne vgrajene v vsadku v odvisnosti od časa.

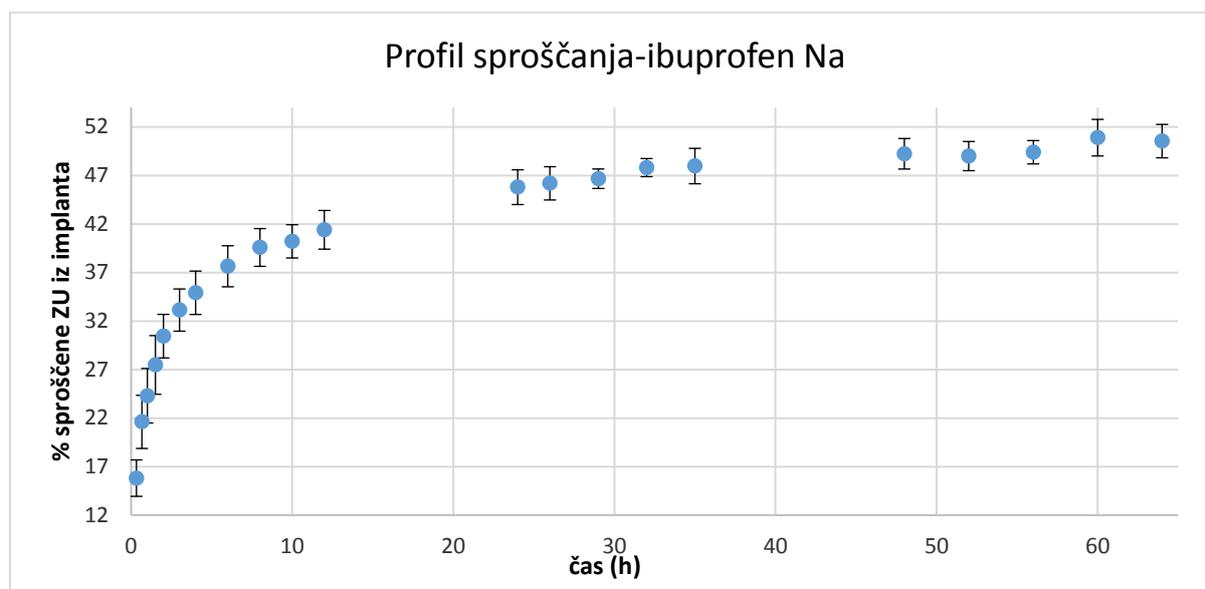
4.1.3 IBUPROFEN

Slika 13 prikazuje umeritveno krivuljo UV/VIS metode določanja koncentracij IB. Linearno območje metode je med 5,0 in 30 µg/mL CPX, ponovljivost je bila znotraj 3,56 % in točnost 2,98 %. Pearsonov koeficient korelacije je bil 0,999.



Slika 13: Umeritvena krivulja za UV-VIS analize IB Na.

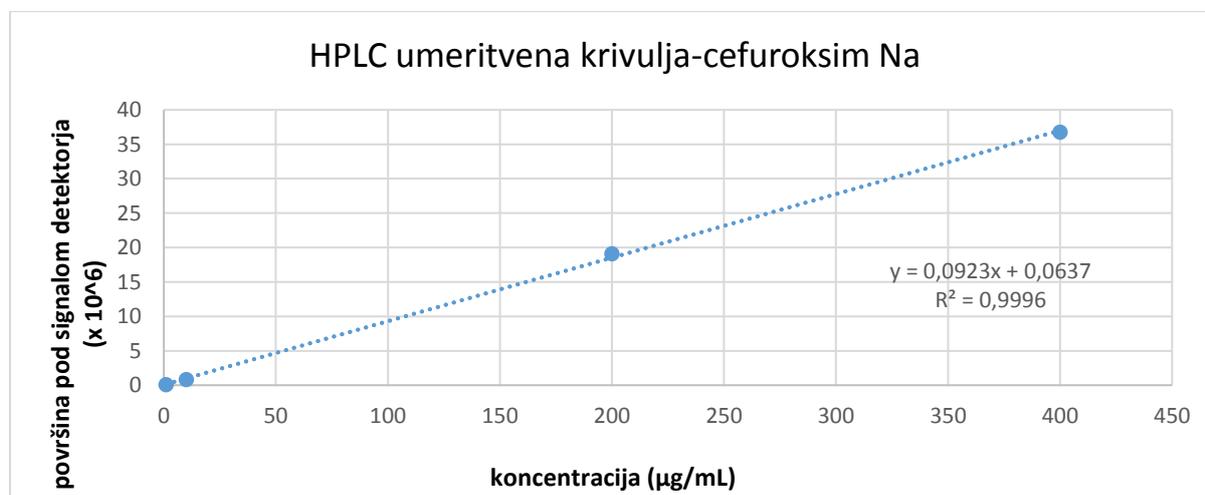
IB ima pKa 4,91 (16) in je v obliki natrijeve soli prosto topen v vodi, 100 mg/mL (21). Po Higuchijevem modelu smo pri njem zaznali dve precej različni hitrostni konstanti. V prvih dveh urah se je sproščal s hitrostjo $8,45\text{mg/h}^{1/2}$ in nato med 3. in 32. uro s hitrostjo $1,77\text{mg/h}^{1/2}$ (slika 14). Po tem času je hitrost začela upadati do doseženega platoja v profilu sproščanja, ki ga zaznamo po 48. uri sproščanja. Tekom poskusa se je sprostilo 50% celotne vgrajene ZU, kar je največ med vsemi testnimi ZU (slika 14).



Slika 14: Profil *in vitro* sproščanja IB Na. Podani so % sproščene ZU od celotne vgrajene v vsadku v odvisnosti od časa.

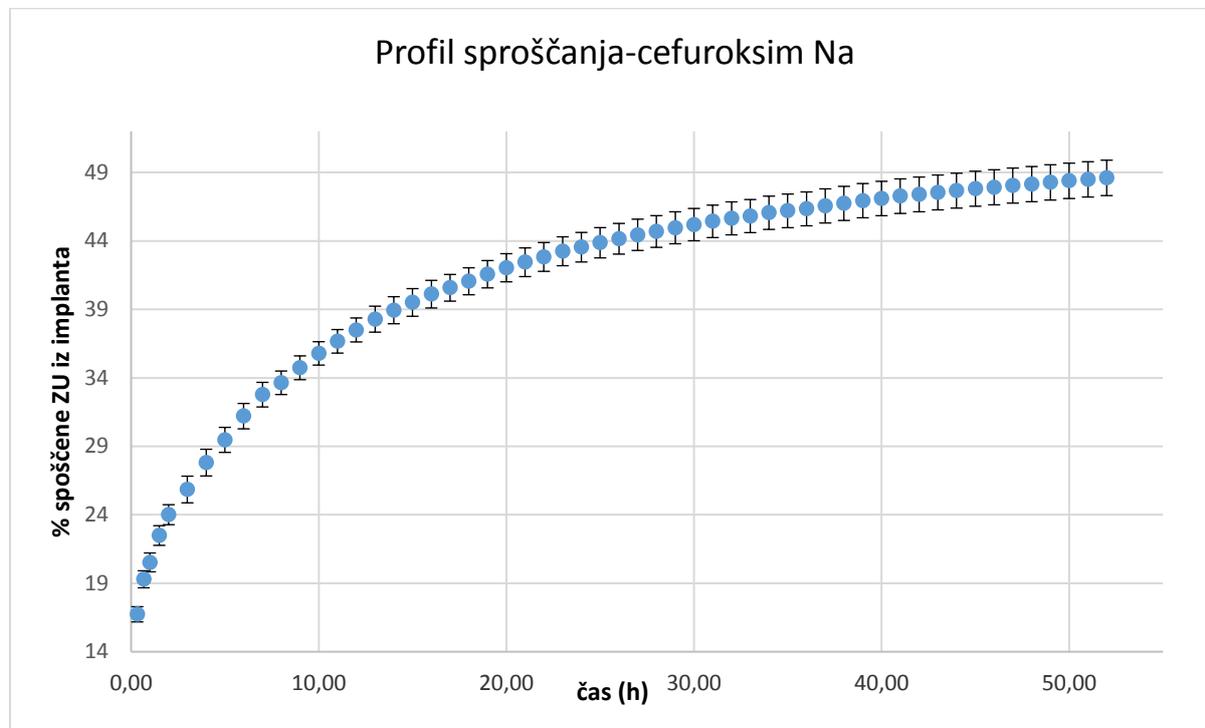
4.1.4 CEFUROKSIM

Uporabljena HPLC metoda je bila v preteklosti znotraj delovne skupine validirana, zato tukaj podajamo le Pearsonov koeficient korelacije, ki je bil 0,999. Vzorce smo redčili tako, da so bile vrednosti koncentracije znotraj območja umeritvene krivulje (1 - 400 $\mu\text{g/mL}$).



Slika 15: Umeritvena krivulja za HPLC analize CFU Na.

Cefuroksim ima pKa 3,15 (16) in njegova natrijeva sol je v vodi prosto topna, 146 mg/mL (16). Konstanta hitrosti sproščanja je bila prvih 16 ur konstantna z vrednostjo 3.38 mg/h^{1/2}, pozneje pa je zelo postopoma upadala vse do končne točke pri 52 urah do katere se je sprostil 49 % vgrajene učinkovine (slika 16).



Slika16: Profil *in vitro* sproščanja CFU Na. Podani so % sproščene ZU od celotne vgrajene v vsadku v odvisnosti od časa.

4.2 KINETIKA IN MEHANIZEM *IN VITRO* SPROŠČANJA UČINKOVIN

Preglednica VI prikazuje zbrane podatke konstant hitrosti, ki smo jih za vse ZU izračunali po Higuchijevem modelu in mehanizme sproščanja po Korsmejer-Peppasovem modelu. Slednji model ne predvideva n vrednosti nižjih od 0,5, zato zaključka glede mehanizma sproščanja MNZ in CFU ne moremo podati. CPX in IB se iz matriksa našega vsadka sproščata s fickovo difuzijo.

Preglednica VI: Kinetika sproščanja ZU po Higuchijevemu modelu (K_H) in mehanizem sproščanja po Korsmejer-Peppas modelu (glede na vrednost n).

Zdravilna Učinkovina	K_H (mg/h ^{1/2})	n	Mehanizem sproščanja
ciprofloksacin HCl	0,56 in 0,13*	0,466	fickova difuzija
metronidazol	0,19	0,186	brez zaključka**
ibuprofen Na	8,45 in 1,77*	0,365	fickova difuzija
cefuroksim Na	3,38	0,206	brez zaključka**

*Iz grafa modela lahko izločimo dve različni hitrosti.

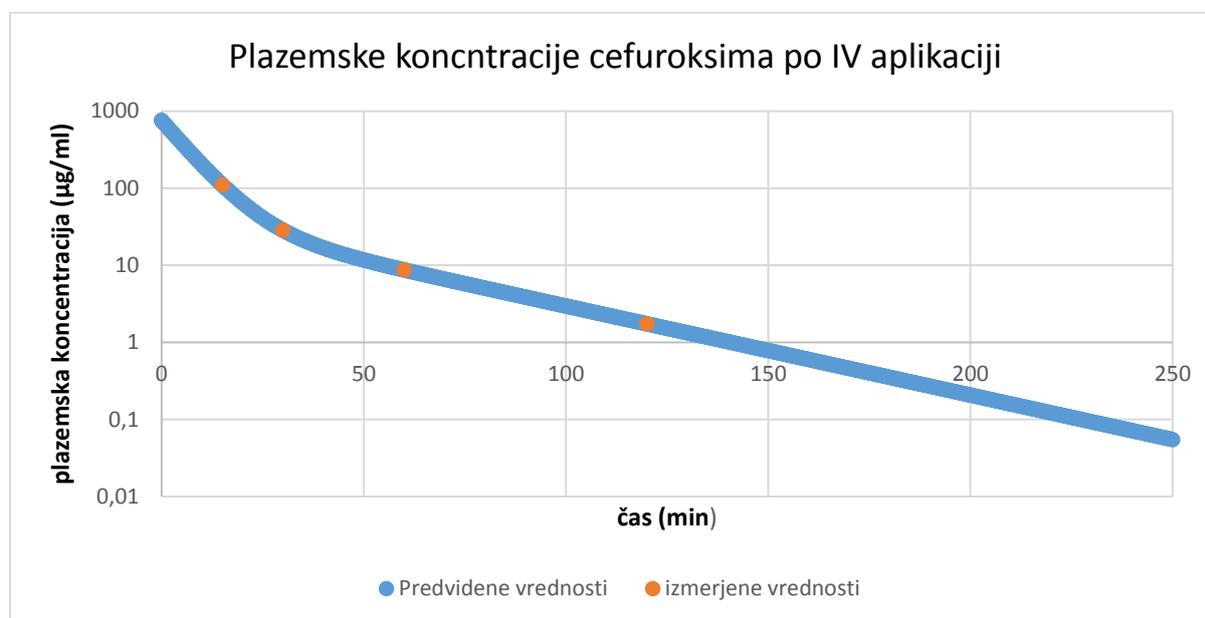
**Glede na uporabljen model ne moremo sklepati na mehanizem sproščanja.

4.3 IN VIVO ANALIZA CEFUROKSIMA

In vivo analiza sproščanja oziroma absorpcije CFU je delala Joanna Kubaszek v svoji magistrski nalogi (19). Njene rezultate smo povzeli za potrebe iskanja IVIVC.

4.3.1 PLAZEMSKÉ KONCENTRACIJE CFU PO IV ADMINISTRACIJI IN FARMAKOKINETIČNE KONSTANTE

Slika 17 podaja izmerjene vrednosti (oranžne točke) plazemskih koncentracij po intravenski aplikaciji 50 mg/kg telesne teže CFU (ordinatna os ima logaritemsko skalo). Na osnovi teh točk je računalniški program WinNonlin konstruiral krivuljo predvidenih vrednosti plazemskih koncentracij CFU (modre vrednosti). Iz oblike krivulje predvidenih vrednosti lahko razberemo, da se ZU v modelu podgane porazdeljuje dvoprostorsko.



Slika17: Vrednosti plazemskih koncentracij cefuroksima po IV aplikaciji 50mg/kg telesne teže te učinkovine (z dovoljenjem (19)).

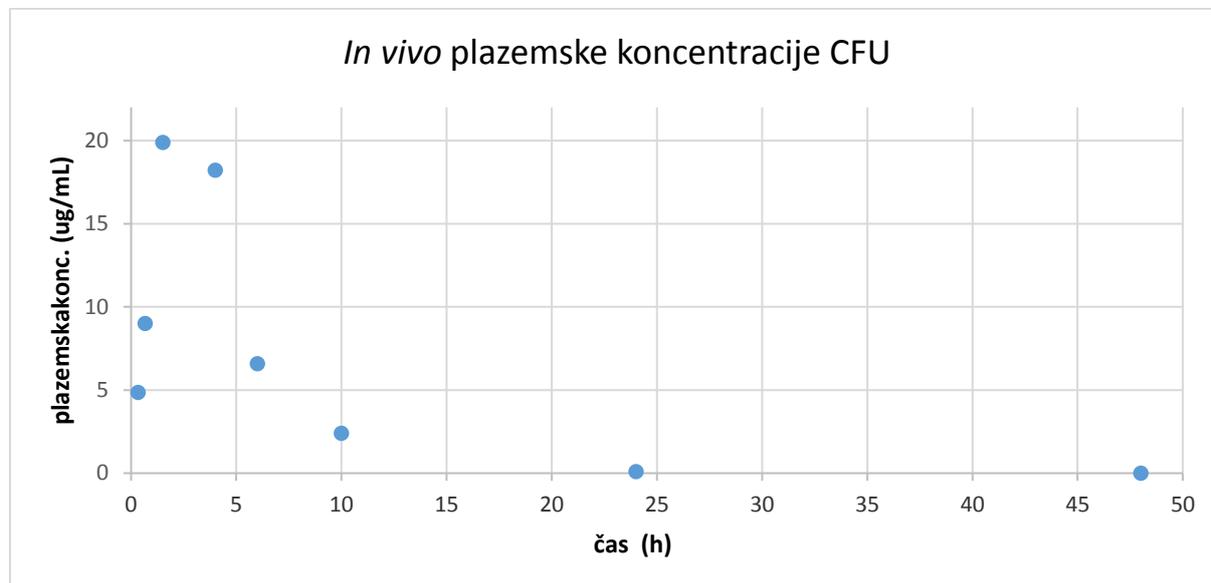
Preglednica VII podaja konstanti porazdeljevanja med obema prostoroma modela podgane in konstanto eliminacije CFU. Te farmakokinetične konstante smo izračunali s pomočjo programa WinNonlin na osnovi podatkov predstavljenih na sliki 17. Podatke smo pozneje potrebovali za izračun deleže *in vivo* absorbiranega CFU (fa).

Preglednica VII: Farmakokinetične konstante.

Predvidena konstanta	Vrednost konstante (min ⁻¹)
k ₁₀ – konstanta eliminacije	0,1156
k ₁₂ – konstanta porazdeljevanja iz centralnega v periferni prostor	0,0219
k ₂₁ – konstanta porazdeljevanja iz perifernega v centralni prostor	0,0331

4.3.2 PLAZEMSKKE KONCENTRACIJE CFU PO PODKOŽNI VSTAVITVI VSADKA

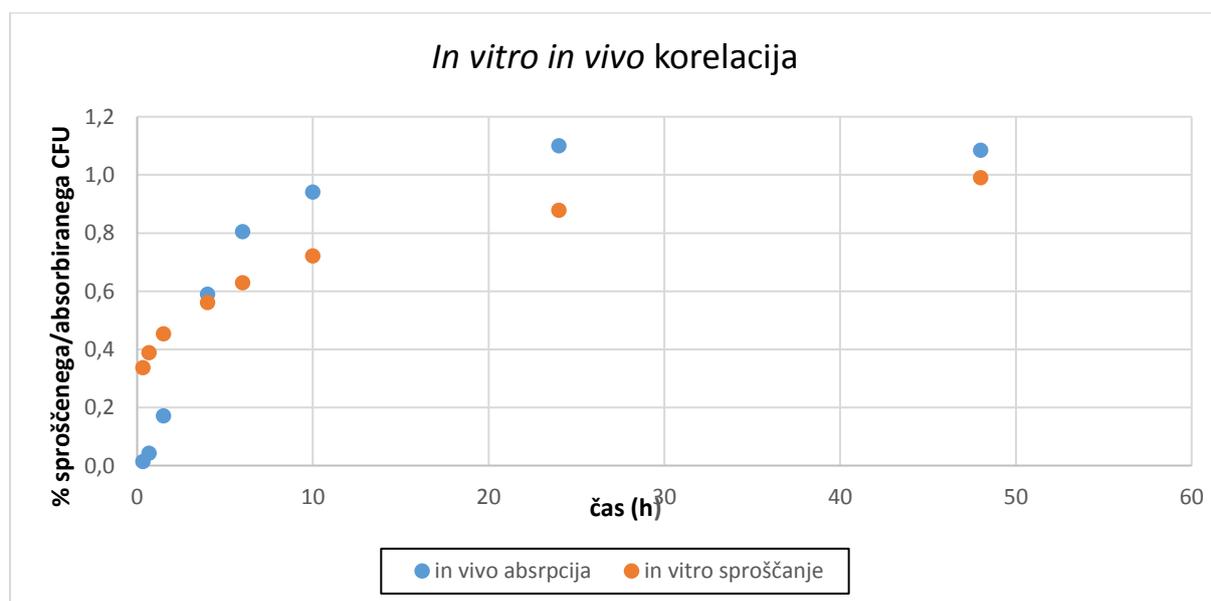
Slika 18 prikazuje gibanje plazemskih vrednosti CFU po vstavitvi vsadka v podkožje stegna modela podgane. Med rezultati so le časovne točke v katerih so bile zbrane vsaj 3 izmerjene plazemske koncentracije CFU.



Slika 18: plazemske koncentracije CFU v odvisnosti od časa (povzeto po (19)).

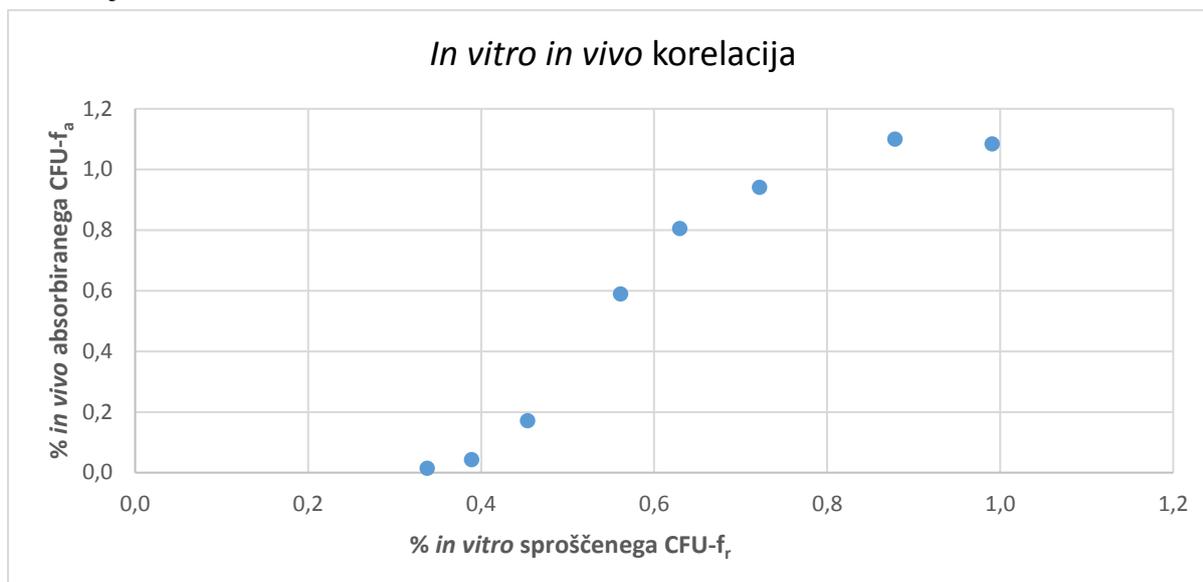
4.4 IN VITRO IN VIVO KORELACIJA ZA CEFUROKSIM

Slika 19 prikazuje krivulji deleža *in vivo* absorbiranega (f_a) in deleža *in vitro* sproščenega (f_r) CFU v odvisnosti od časa. Parametra smo izračunali po računskih metodah predstavljenih v točki 3.7.



Slika 19: Profila deleža *in vivo* absorbiranega (f_a) in deleža *in vitro* sproščenega (f_r) CFU v odvisnosti od časa.

fa in fr nista v linearni odvisnosti (slika 20), ki bi predstavljala zanesljivo IVIVC, zato takšno korelacijo ovržemo.



Slika 20: Odvisnost med *in vivo* absorpcijo ter *in vitro* sproščanjem CFU.

5 RAZPRAVA

V nalogi smo želeli na več nivojih oceniti potencial materiala K za nadaljnje raziskave in razvoj sistema za lokalno (kostno tkivo) podaljšano sproščanje ZU. Ne glede na to kakšne materiale vsadimo v telo, bo vedno to telesu predstavljalo tujek in s tem povezano tveganje neželenih vnetnih odzivov okoliškega tkiva ter posledično povečano dovzetnost za okužbe. Ta pojav se pogosto odraža v kliničnih zapletih, ki jih obravnavajo po zamenjavi celotnih sklepov. Kostno tkivo je slabše prekrvavljeno in prodiranje antibiotikov oziroma vseh zdravil v kostna tkiva je zelo omejeno. Zato je zagotavljanje zadostnih koncentracij ZU na mestu delovanja brez sistemske toksičnosti praktično nemogoče. Najpogosteje se za preprečevanje okužb poslužujejo vsaditve poli-metilmetakrilatnih sfer z vgrajenim gentamicin sulfatom v okuženo tkivo. Težava poli-metilmetakrilata je, da se v telesu ne resorbira in mora biti kirurško odstranjen (22). Zaradi popolne resorpcije kalcijevih fosfatov je vse večje povpraševanje po cementnih materialih, ki vsebujejo antibiotike. Še vedno je na tržišču zelo malo takšnih materialov (npr. OSTEOSETVR T itd.), ki pa prevečkrat prehitro sprostijo učinkovino, kar omejuje njihovo učinkovitost skozi daljše obdobje (klinični cilj po takšni operaciji je sproščanje 6-8 tednov). Takšno podaljšano lokalno sproščanje antibiotika je potrebno kadar želimo omejiti patogene, ki so odporni na krajšo prisotnost antibiotika (23).

Z *in vitro* analizami različnih ZU smo iskali primerne kandidate za nadaljnji razvoj sistema z lokalnim podaljšanim sproščanjem iz biokeramičnega cementa in poskušali izluščiti ključne lastnosti, ki jih takšna ZU premore v nasprotju z ostalimi. Na podlagi preteklih uspešnih poskusov s cefuroksimom, je bila ta ZU izbrana kot modelna učinkovina za *in vivo* sproščanje na podlagi katerih smo poskušali določiti IVIVC. Ta korelacija bi omejila nadaljnje poskuse na živalih in olajšala raziskovanje sistema sproščanja iz materiala K.

5.1 *IN VITRO* SPROŠČANJE ZU

5.1.1 *IN VITRO* SPROŠČANJE CFU S STATIČNO METODO

Cefuroksim v vodnih raztopinah zaradi hidrolize zelo hitro razpade na razgradne produkte (24, 25). Pred začetkom *in vitro* analiz sproščanja te ZU smo zato želeli poiskati medij v katerem je stabilen skozi daljše obdobje.

Študije stabilnosti smo izvajali v različnih medijih:

- Fosfatni pufer s pH 7,4 (FP)
- FP z dodatkom NaCl (9 g/L)

- FP z dodatkom NaCl (9 g/L) in glukoze (50 g/L)
- FP z dodatkom NaCl (9 g/L) in albumina (50 g/L)

Poskus je potekal tako, da smo pripravili sveže raztopine CFU različnih koncentracij (300 µg/mL, 100 µg/mL, 20 µg/mL in 5 µg/mL) v zgornjih medijih. 50 mL teh raztopin smo na začetku poskusa natočili v zbiralne posode aparature 4 po USP in vklopili črpalko (pretočna celica je bila prazna). Celoten postopek testa vključno z vzorčenjem je potekal po identičnem postopku in istih pogojih kakor so opisani za *in vitro* analize sproščanja. Poskus je potekal 72 ur. Koncentracije CFU smo določili s HPLC (albumin smo oborili enako kot proteine krvi pri *in vivo* študiji). Izračunali smo razpolovne čase posameznih koncentracij CFU v vseh medijih. Vsi razpolovni časi CFU so bili nižji od 12 ur in noben od dodatkov k FP ni prispeval k izboljšanju stabilnosti učinkovine v vodni raztopini. Vse analize stabilnosti CFU smo delali le v eni paralelki, zato rezultati v nalogi niso predstavljeni.

Na podlagi zbranih podatkov o stabilnosti CFU smo se odločili, da za analizo *in vitro* sproščanja uporabimo metodo statičnega sproščanja. Prav tako smo na podlagi teh podatkov ugotovili, da je enurni interval za zamenjavo medija pri tej metodi ustrezen in ne predstavlja prevelikega odstopanja od prave vrednosti (v 1 uri razpade <10 % CFU). Ker bi z UV-VIS spektroskopijo zaznavali tudi razpadne produkte CFU, smo se za potrebo analiz vzorcev sproščanja s to ZU posluževali HPLC.

Za potrebe primerjave *in vitro* sproščanja vseh štirih ZU smo predpostavili, da sta obe metodi, tako sproščanje s pretočno celico kot sproščanje s statično metodo, enakovredni.

5.1.2 OCENA USTREZNOSTI ZU ZA DOSTAVNI SISTEM S PODALJŠANIM SPROŠČANJEM

CPX se je zaradi preslabe topnosti sprostil v prenizkem odstotku in ni primeren kandidat za oblikovanje želenega dostavnega sistema. Soli IB in CFU sta prosto topni, zato sta se v 90 % (glede na celotno sproščeno ZU) sprostila že v prvih 24 urah. Takšna kinetika sproščanja bi lahko bila ustrezna v protibolečinskem in protivnetnem zdravljenju, ni pa zaželeno v antibiotičnem zdravljenju. Poleg tega tako hitro sproščanje lahko povzroča lokalno toksičnost ZU, kar lahko vodi v dodatne poškodbe obolelega mesta (22). Za učinkovito antibiotično zdravljenje smernice predpisujejo 7 do 10 dnevno zdravljenje. V nekaterih primerih, kot je profilaktično dajanje po operacijah bi lahko bilo zadostno tudi skrajšanje tega obdobja na 3 dni (26), po zamenjavi celotnega sklepa pa vse do 8 tednov (23). Želimo si torej enakomernega lokalnega sproščanja tekom daljšega obdobja, ki ne posega v toksične koncentracije in ob enem

dosega minimalno inhibitorno koncentracijo. MNZ je edina ZU, ki se je v naši *in vitro* analizi sproščala v ustreznem časovnem območju (>3 dni). Iz vsadka s to ZU se je v prvi uri sprostito 19 % od celotne sproščene učinkovine. Nato se je z enakomerno kinetiko učinkovina sproščala vse do 9. dne. Podobno kinetiko je MNZ izkazoval tudi v *in vitro* analizi sproščanja iz kopolimera poli mlečne in poli glikolne kisline (27). Za nadaljnjo raziskovanje primernosti te ZU bi bile potrebne dodatne analize, ki bi pokazale kakšen je vpliv različnih razmerij med MNZ in cementnim materialom in vpliv velikosti vsadka. A le ob predpostavki, da je hitrost takšnega sproščanja zadostno za lokalno učinkovitost te ZU oziroma da začetna hitrejša kinetika sproščanja ne presega meje lokalne toksičnosti. Na podlagi *in vitro* rezultatov bi bil MNZ najboljša izbira za *in vivo* poskuse, vendar pa zaradi že v naprej določene modelne učinkovine to ni bilo mogoče

5.2 VPLIV FIZIKALNO KEMIJSKIH LASTNOSTI ZU NA SPROŠČANJE IZ MATERIALA K

Ogrodje našega vsadka je biorazgradljivo, toda za popolno razgradnjo potrebuje relativno dolgo časa (več let), zato dostavne sisteme iz večine BK materialov uvrščamo med nerazgradljive oblike dostavnih sistemov s podaljšanim sproščanjem. Poznamo dve vrsti takšnih sistemov: prvi imajo »rezervoar« ZU in druge imajo ZU vgrajeno v matriks dostavnega sistema. Med prve štejemo sisteme, ki imajo membrano skozi katero se ZU nadzirano in konstantno sprošča. Kinetika sproščanja je odvisne predvsem od prepustnosti in debeline membrane. Medtem pa se ZU iz matriks sistemov večinoma sproščajo s fickovo difuzijo, ki je odvisna od koncentracijskega gradienta, razdalje in morebitnega nabrekanja materiala (28, 29). Vsadek iz materiala K predstavlja matriks ogrodje iz katerega se z difuzijo sprošča ZU.

Iz profilov sproščanja lahko opazimo precejšnje razlike v praktično vseh vidikih. Pri enakih pogojih in iz enakega vsadka so se učinkovine iz našega materiala sproščale v različnih časovnih obdobjih in obsegih ter z različnimi hitrostmi. V primerih vseh ZU smo uporabljali enak material in iste pogoje tako za pripravo vsadkov, kakor tudi za teste sproščanja. Zato iz rezultatov lahko sklepamo na pomembnost fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovin.

Soli IB in CFU sta prosto topni, zato sta se v 90 % (glede na celotno sproščeno ZU) sprostila že v prvih 24 urah. CPX je z namenom izboljšanja topnosti v obliki soli hidroklorida. Soli šibko bazičnih ZU in močne kisline, kakršna je ciprofloksacin hidroklorid, imajo najboljšo topnost pri pH 4-5. Pri nevtralnem pH pa jim topnost pade skoraj do intrinzične (topnost nevtralne učinkovine, ki ni v obliki soli) (30). ZU konjugirane z močnimi kislinami in nizko intrinzično

topnostjo zato, razen v izjemnih primerih, niso primerna za sproščanje iz vsadkov pri fiziološkem pH. MNZ se je sproščal s hitrejšo kinetiko od CPX in počasneje od IB in CFU. Opazili smo, da je kinetika sproščanja povezana s topnostjo ZU v vodi. Sklepamo, da je to bistven podatek za predvidevanje kinetike sproščanja iz materiala K, ki je skupen vsem učinkovinam neglede na to ali so v obliki soli ali pa v nevtralnem stanju.

Obstaja tudi možnost, da se ZU zaradi interakcij adsorbirajo na matriks sistema za sproščanje. Raziskovalci o takšnem obnašanju za antibiotične učinkovine še niso poročali (22), zato ne pričakujemo, da prihaja do kakršnihkoli interakcij med materiala K in analiziranimi ZU.

5.3 UPORABNOST MATERIALA K KOT OGRODJA ZA DOSTAVNI SISTEM

Snov, ki služi kot ogrodje dostavnega sistema potrebuje ustrezne lastnosti, da omogoča vgradnjo ZU, ki se znotraj ogrodja zadržuje in se počasi tekom časa sprošča v okoliško tkivo (6). Največji izkoristek sproščene ZU je bil pri skromnih 50 odstotkih. Ker sta IB in CFU v obliki natrijeve soli prosto topni v vodi, lahko sklepamo, da topnost ni bila omejitveni dejavnik. Edini logičen zaključek je sklepanje, da je preostanek učinkovine ostal ujet v porah, ki niso medsebojno povezane s tistimi na površini. Znano je, da imajo ogrodni sistemi z visoko poroznostjo boljšo predispozicijo za oblikovanje dostavnega sistema s podaljšanim sproščanjem. Večina komercialnih samo-strjevalnih materialov ima poroznost po strditvi med 40 % in 50 % (6), medtem ko ima naš material nižjo (37,7 %) poroznost. BK vsadek iz našega cementnega materiala torej nima optimalne poroznosti oziroma povezljivosti por, ki je ena izmed izjemno zaželenih lastnosti, ki jih potrebujemo za uspešno sproščanje ZU iz materiala. Med preostale želene lastnosti cementnih ogrodij za dostavni sistem uvrščamo še možnost injiciranja materiala, biorazgradljivost, strjevanje pri telesni temperaturi, pH blizu nevtralnega in veliko površino (6). Za material K lahko z gotovostjo potrdimo biorazgradljivost in veliko površino, medtem ko sta obe sestavini materiala bazični in je zato neprimeren za vgradnjo pH nestabilnih ZU. Prav tako materiala K ni mogoče injicirati, saj po omočitvi z uporabljeno količino tekoče faze nima ustreznih reoloških lastnosti, ki bi omogočala takšno apliciranje.

Material K je po svoji sestavi eden novejših vrst cementnih BK materialov, zato na področju raziskovanja sproščanja ZU iz primerljivih matriksov nismo zasledili. Verjamemo pa, da bi z raziskovanjem procesnih možnosti pridelave tega materiala in optimizacije razmerja med prahovi in tekočo fazo lahko izboljšali lastnosti materiala, ki ključno vplivajo na sproščanje ZU (velikost por, njihova povezljivost in celokupna poroznost).

Razvoj dostavnega sistema na osnovi BK cementov je zahteven in večplasten izziv. Zahteva načrtovanje lastnosti matriks materiala in izbiro ustrezne ZU, ki je znotraj materiala stabilna, ne poruši njegovih lastnosti (učinkovina ali njene soli ne ovirajo reakcij strjevanja) ter ima ob enem ustrezne fizikalno kemijske lastnosti, ki omogočajo raztapljanje in difuzijo. Imajo pa takšni sistemi izjemen potencial v zdravljenju osteomielitisa, kostnih tumorjev, osteoporoze itd. (22, 31).

5.4 IN VITRO IN VIVO KORELACIJA

Iz izmerjenih koncentracij CFU v venski krvi po intravenski injekciji 50 mg CFU na kg telesne teže podgane, smo s pomočjo programa WinNonlin konstruirali krivuljo predvidenih plazemskih koncentracij CFU (z logaritetskimi vrednostmi plazemskih koncentracij). Iz te krivulje lahko vidimo, da se ZU porazdeljuje dvoprostorsko. To je pomembna informacija, saj je v tem primeru potrebno *in vivo* podatke obravnavati z Loo-Riegelmanovo metodo in ne Wagner Nelsonovo kot je to običajno pri ZU z enoprostorskim porazdeljevanjem. Po obravnavi podatkov z računskimi operacijami opisanimi v metodah smo dobili profila deleža *in vivo* absorbiranega (f_a) in deleža *in vitro* sproščenega (f_r) CFU v odvisnosti od časa (slika 19).

Z našo analizo smo želeli poiskati IVIVC z večtočkovno odvisnostjo, torej korelacijo nivoja A. Na sliki 20 vidimo, da f_r in f_a nista v linearnem odnosu, ki bi ga lahko matematično definirali. V primerljivi literaturi se avtorji *in vivo* večinoma osredotočajo na izboljšanje obolenja lokalnega kostnega tkiva oziroma zaznavanje bakterij v tkivu po vsaditvi vsadka s sproščanjem antibiotika (31, 29). So pa Otsuka et al (32) pokazali, da je mogoče doseči linearen odnos (korelacijo) med *in vitro* ter *in vivo* sproščanjem indometacina iz cementa kalcijevega fosfata, a so naleteli na težave s ponovljivostjo.

6 SKLEP

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko potrdimo prvo hipotezo.

Fizikalno-kemijske lastnosti ZU vplivajo na profil sproščanja *in vitro* iz materiala K:

Pri vgradnji ZU v naše vsadke je izmed fizikalno kemijskih lastnosti potrebna pozornost predvsem na topnost v vodi. Iz naših rezultatov lahko sklepamo, da je primerne kandidate za antibiotično terapijo potrebno iskati v območju topnosti MNZ. To so učinkovine, ki so v zgornjem območju zmerno topnih oziroma spodnjem območju težko topnih ZU (okrog 100 mL vode za 1g ZU).

Drugo hipotezo smo uspeli le delno potrditi.

Material K je primeren nosilec za lokalno dostavo zdravilnih učinkovin z namenom podaljšanega sproščanja:

Z materialom K je mogoče oblikovati dostavni sistem s podaljšanim sproščanjem ZU, toda zaradi nekaterih njegovih slabosti, kot prenizka poroznost, ni večje verjetnosti, da bi bil v tej obliki kdaj s tem namenom uporabljan v klinični praksi.

Tretje hipoteze na podlagi rezultatov ne moremo potrditi.

Obstaja korelacija med *in vitro* sproščanjem ter *in vivo* absorpcijo cefuroksima:

IVIVC iz podatkov zbranih v naših *in vitro* analizah in podatkih iz vzporedne *in vivo* študije ne moremo določiti. *In vitro* sproščanje ter *in vivo* absorpcija nista v (linearnem) odnosu, ki bi ga lahko matematično definirali in bi nam v prihodnosti na osnovi *in vitro* podatkov dajal zanesljive posredne informacije o dogajanju *in vivo*.

Industrija cementov kalcijevih fosfatov in podobnih materialov, ki bi sproščali ZU je slabo razširjena iz dveh poglavitnih razlogov. Podjetja, ki se ukvarjajo z razvojem in prodajo vsadkov in biokeramičnih cementov nimajo znanja o ZU, medtem ko imajo farmacevtska podjetja omejena znanja na področju BK materialov in jim ta slabo razširjen trg ne vzbuja interesa. Drugi razlog je v tem, da različna obolenja zdravimo z različnimi ZU (22). Zato bi bil razvoj dostavnega sistema s podaljšanim lokalnim sproščanjem, ki bi lahko deloval v kombinaciji s poljubno ZU, izjemnega pomena.

7 LITERATURA

1. Sergey V. Dorozhkin: Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art. *Journal of Functional Biomaterials* 2010; 1: 22-107.
2. Larry L. Hench: Bioceramics: From concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 1991; 74(7): 1487-1510.
3. R.G. Carrodegua, S. De Aza: α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomaterialia* 2011; 7: 3536-3546.
4. Loreley Morejón-Alonso, Raúl García Carrodegua, Luis Alberto dos Santos: Development and characterization of α -tricalcium phosphate/monocalcium aluminate composite bone cement. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 2012; 5(8): 448-456.
5. Kenny, S.M., Buggy, M.: Bone cements and fillers: A review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2003; 14: 923-938.
6. Sergey V. Dorozhkin: Self-Setting Calcium Orthophosphate Formulations. *Journal of Functional Biomaterials* 2013; 4: 209-311.
7. C. Combes, B. Miao, R. Bareille, C. Rey: Preparation, physical-chemical characterisation and cytocompatibility of calcium carbonate cements. *Biomaterials* 2006; 27(9): 1945-1954.
8. Fupo He, Fanwen Yang, Jixiang Zhu, Ye Peng, Xiumei Tian, and Xiaoming Chen: Fabrication of a Novel Calcium Carbonate Composite Ceramic as Bone Substitute. *Journal of the American Ceramic Society* 2015; 98(1): 223-228.
9. C. Combes, R. Bareille, C. Rey: Calcium carbonate-calcium phosphate mixed cement compositions for bone Reconstruction. *Wiley InterScience* 2006; 79A: 318-328.
10. Cahyanto A, Maruta M, Tsuru K, Matsuya S, Ishikawa K: Fabrication of bone cement that fully transforms to carbonate apatite. *Dental Materials Journal* 2015; 34(3): 394-401.
11. Daniel Arcos, Maria Vallet-Regi: Bioceramics for drug delivery. *Acta Materialia* 2013; 61: 890–911.
12. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC: Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology Progress* 2009; 25(6): 1539-1560.

13. Iyer SS, Barr WH, Karnes HT: Profiling in vitro drug release from subcutaneous implants: a review of current status in potential implications on drug product development. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 2006; 27(4): 157-170.
14. FDA: Guidance for industry, extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of an in vitro/in vivo correlation, The Center for Drug Evaluation and Research, 1997.
15. Jaber Emami: In vitro - In vivo Correlation: From Theory to Applications. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 2006; 9(2): 169-189.
16. www.drugbank.ca (18.8.2016).
17. www.emedexpert.com (18.8.2016).
18. www.discoveriesinmedicine.com (18.8.2016).
19. Joanna Kubaszek, dr hab. Elżbiety Wyski, Beata Mycek: Badanie uwalniania leku z implantów bioceramicznych w warunkach in vivo, Krakov, 2015.
20. Suvakanta Dash, Padala Narasimha Murthy, Lilakanta Nath and Prasanta Chowdhury: Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 2010; 67: 217-223.
21. www.chemicalbook.com (23.8.2016).
22. M.P. Ginebra, T. Traykova, J.A. Planell: Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *Journal of Controlled Release* 2006; 113: 102–110.
23. Benjamin D. Brooks, Kristofer D. Sinclair, Sherry N. Davidoff, Scott Lawson, Alex G. Williams, Brittany Coats, David W. Grainger, Amanda E. Brooks: Molded polymer-coated composite bone void filler improves tobramycin controlled release kinetics. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied biomaterials* 2014; 102B(5): 1074-1083.
24. Gupta V.D.: Chemical Stability of Cefuroxime Sodium After Reconstitution in 0.9% Sodium Chloride Injection and Storage in Polypropylene Syringes for Pediatric Use. *International Journal of Pharmaceutical Compounding* 2003; 7(4): 310-312.
25. Wang D., Notari RE.: Cefuroxime hydrolysis kinetics and stability predictions in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1994; 83(4): 577-581.
26. John Paul: Commentary: What is the optimal duration of antibiotic therapy?. *British Medical Journal* 2006; Vol.332: 1358.
27. Fu-Ying Lee, Dave W. Chen, Chih-Chien Hu, Yu-Te Hsieh, Shih-Jung Liu and Err-Cheng Chan: In Vitro and In Vivo Investigation of Drug-Eluting Implants for the Treatment of Periodontal Disease. *AAPS PharmSciTech* 2011; 12(4): 1110–1115.

28. Yao Fu and Weiyuan John Kao: Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non-degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2010; 7(4): 429–444.
29. Samit K. Nandi, Biswanath Kundu, Prasenjit Mukherjee, Tapan K. Mandal, Someswar Datta, Dipak K. De, Debabrata Basu: In vitro and in vivo release of cefuroxime axetil from bioactive glass as an implantable delivery system in experimental osteomyelitis. *Ceramics International* 2009; 35: 3207–3216.
30. David B. Troy, Paul Beringer: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 732-733.
31. Tomoyuki Sasaki, Yasuyuki Ishibashi, Hiroshi Katano, Akira Nagumo, and Satoshi Toh: In Vitro Elution of Vancomycin from Calcium Phosphate Cement. *The Journal of Arthroplasty* 2005; 20(8): 1055-1059.
32. Makoto Otsuka, Yoshinori Nakahigashi, Yoshihisa Matsuda, Jeffrey L. Fox, William I. Higuchi, Yuichi Sugiyama: A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement VIII: the relationship between in vitro and in vivo drug release from indomethacin-containing cement. *Journal of Controlled Release* 1997; 43(2–3): 115–122.