



Research Article

Sustained Release In-situ Forming Liquid Crystal Gel Containing Risperidone: *In-vitro* Evaluation and Pharmacokinetics in Rabbits

Hossein Kamali¹ , Elham Khodaverdi² , Nazanin Jafarzadeh³, Elahe Rajabi Ziaoddin³, Seyedeh Nesa Rezaeian Shiadeh⁴ , Farzin Hadizadeh⁵ 

¹ Assistant Professor, Ph.D. in Pharmaceutics, Targeted Drug Delivery Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

² Professor, Ph.D. in Pharmaceutics, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ Student, Pharm.D, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁴ Assistant Professor, Ph.D. in Pharmaceutics, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar abbas, Iran

⁵ Professor, Ph.D. in Medicinal Chemistry, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

*Corresponding author: Seyedeh Nesa Rezaeian Shiadeh, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar abbas, Iran, E-mail: rezaeiann941@mums.ac.ir; Farzin Hadizadeh, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. E-mail: hadizadehf@mums.ac.ir

DOI: [10.32592/nkums.15.2.1](https://doi.org/10.32592/nkums.15.2.1)

How to Cite this Article:

Kamali H, Khodaverdi E, Jafarzadeh N, Rajabi Ziaoddin E, Rezaeian Shiadeh SN, Hadizadeh F. Sustained Release In-situ Forming Liquid Crystal Gel Containing Risperidone: In-vitro Evaluation and Pharmacokinetics in Rabbits. J North Khorasan Univ Med Sci. 2023;15(2):1-12. DOI: [10.32592/nkums.15.2.1](https://doi.org/10.32592/nkums.15.2.1)

Received: 29 Jan 2022

Accepted: 04 Mar 2023

Keywords:

Lipid liquid crystal

Risperidone

Glycerol mono-oleate

Glycerol-dioleate

Glycerol-trioleate

Abstract

Introduction: The present study aimed to extend a novel vehicle for sustained delivery of risperidone to improve schizophrenia therapy. Risperidone is used as an anti-psychotic drug to treat various psychological conditions. Lipid liquid crystal (LLC) gel containing various lipids, solvents, and stabilizers turns into a sustain-release gel in contact with the aqueous medium.

Method: Glycerol monooleate (GMO), glycerol dioleate (GDO), and glycerol trioleate (GTO) alongside several ratios of phosphatidylcholine (PC) to oil and N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) solvent percent (w/w %) were assessed for initial burst release (IBR) for LLC. Some In-vitro evaluations, pharmacokinetics assessments, and histopathological studies were done to gain optimal formulation.

Results: the GDO-based LLC showed lower IBR in comparison to other glycerol-based formulations. Pharmacokinetic data revealed that GDO at PC: oil = 2.2:1 and NMP = 30% made a sustained release for two months. Risperdal CONSTA® can reach the required therapeutic levels after 2–3 weeks; however, over the lag period, co-administration of oral risperidone is essential. The histopathology results indicated approximately no side effects in rabbits.

Conclusion: This study confirms the great potential of GDO-based LLC in comparison to Risperdal CONSTA®. Furthermore, the results showed that a single injection of GDO-based formulations could maintain drug release in both *in-vitro* and *in-vivo* for two months in the therapeutic range.



ژل کریستال مایع در جا تشکیل شونده آهسته رهش حاوی ریسپریدون؛ ارزیابی برون تن و فارماکوکینتیک در خرگوش

حسین کمالی^۱، الهام خداوردی^۲، نازنین جعفرزاده^۳، الهه رجبی ضیاءالدین^۳، سیده نساء رضائیان شیاذه^۴، فرزین هادی زاده^۵

^۱استادیار، متخصص دارورسانی هدفمند، مرکز دارورسانی هدفمند، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۲استاد، متخصص فارماسیوتیکس، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۳داروساز، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۴استادیار، متخصص فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران
^۵استاد، متخصص شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
*نویسنده مسئول: سیده نساء رضائیان شیاذه، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران. ایمیل: rezaeiann941@mums.ac.ir؛ فرزین هادی زاده، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. ایمیل: hadizadehf@mums.ac.ir

DOI: 10.32592/nkums.15.2.1

چکیده مقدمه: این مطالعه قصد توسعه یک سیستم دارورسانی تشکیل شونده در محل تزریق برای دارورسانی ریسپریدون به منظور بهبود روش های درمانی شیزوفرنی دارد. ریسپریدون به عنوان دارویی ضدسایکوز، برای درمان مشکلات روانی متعددی به کار می رود. ژل کریستال مایع لیپیدی حاوی لیپیدهای متعدد، حلال و پایدارکننده است و در تماس با محیط های آبی، به ژلی با خاصیت آهسته رهش تبدیل می شود. روش کار: آزادسازی ناگهانی اولیه برای کریستال مایع، شامل گلیسرول مونوالنات (GMO)، گلیسرول دی اولنات (GDO) و گلیسرول تری اولنات (GTO)، نسبت های مختلف فسفاتیدیل کولین به روغن و درصد های مختلف حلال ان-متیل-۲-پیرولیدون NMP بررسی شد. مطالعات برون تن، فارماکوکینتیک و بافت شناسی در خرگوش ها برای تعیین فرمولاسیون بهینه نهایی کریستال مایع انجام شد. یافته ها: فرمولاسیون حاوی GDO آزادسازی ناگهانی اولیه کمتری در مقایسه با سایر فرمولاسیون ها نشان داد. مقایسه مطالعات فارماکوکینتیکی نشان داد که پایه کریستال مایع در نسبت فسفاتیدیل کولین به روغن ۲/۲۱ و حلال NMP ۳۰ درصد، سطح آزادسازی یکنواخت تری در مطالعات درون تن و برون تن طی ۶۰ روز نشان داد. داروی Risperdal CONSTA® می تواند به سطح درمانی پس از دو تا سه هفته برسد، در طول زمان تأخیر، تجویز خوراکی دارو مهم است. نتایج حاصل از مطالعات بافت شناسی نیز هیچ گونه عارضه جانبی نشان نداد. نتیجه گیری: این مطالعه به اثر بهتر کریستال مایع بر پایه GDO، در مقایسه با فرمولاسیون تجاری Risperdal CONSTA® تأکید می کند، همچنین، نتایج نشان داد که با یک مرتبه تزریق فرمولاسیون با پایه GDO، آزادسازی دارو در هر دو شرایط برون تن و درون تن، برای مدت دو ماه، در محدوده درمانی باقی می ماند.	تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳
واژگان کلیدی: کریستال مایع لیپیدی ریسپریدون گلیسرول مونوالنات (GMO) گلیسرول دی اولنات (GDO) گلیسرول تری اولنات (GTO)	

مقدمه

مایع پتانسیل به کارگیری در زمینه های مختلفی را دارد. این زمینه ها عبارتند از: کشاورزی، صنایع غذایی، کاربردهای آرایشی و همچنین سیستم های دارورسانی [۱]. ساختار لیپوتروپیک تشکیل دهنده این سیستم ها به سه گروه، شامل لایه ای (La)، شش وجهی (HII) و مکعبی (Q2) تقسیم می شوند [۲]. GMO، GDO و GTO مثال هایی از لیپیدهای تشکیل دهنده کریستال مایع هستند که در تماس با محیط آبی، ژل تشکیل می دهند. لیپیدهای GMO و GDO در مقایسه با GTO

سیستم های کریستال مایع ویژگی های بینابینی مایعات و کریستال های جامد را دارند. این ترکیبات حاوی ملکول های ارگانیک با زنجیره بلند هستند که در محیط آبی، ساختارهای به خود جمع شونده تشکیل می دهند [۱]. کریستال های مایع حاوی لیپیدهای گوناگون، حلال و پایدارکننده هستند که در محیط آبی، به ژل آهسته رهش تبدیل می شوند و می توانند در ساخت فرمولاسیون طولانی اثر به کار گرفته شوند. با توجه به موجودیت منحصر به فرد این ساختارها، کریستال

بعلاوه، این دارو برای افرادی که دوزهای بالای دارو (۳ تا ۴ میلی گرم) را در روز دریافت می کنند، مناسب است [۱۷].

در این مطالعه، تلاش شد تا فرمولاسیون جدیدی بر پایه کریستال مایع لیپیدی با کمک پایه های گلیسرولی برای کنترل آزادسازی ریسپریدون طی دو ماه طراحی شود، همچنین، سه پایه گلیسرولی حاوی GDO، GDO، GTO و داروی Risperdal CONSTA® به صورت برون تن و درون تن با یکدیگر مقایسه شدند.

روش کار

مواد

فسفولیپید S100 از شرکت Lipoid (آلمان) خریداری شد. GDO، GTO و Dinfen (چین) خریداری شدند. ریسپریدون را به عنوان هدیه، شرکت داروسازی پورسینا (ایران) تأمین کرد. Risperdal CONSTA® از شرکت داروسازی Janssen (آمریکا) خریداری شد. حلال N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) و سایر مواد از شرکت Merck (آلمان) خریداری شدند.

تعیین فرمولاسیون بهینه بر پایه حداقل آزادسازی ناگهانی اولیه

میزان آزادسازی ناگهانی اولیه داروی ریسپریدون (Y)، برای ۲۴ ساعت اول تزریق، از پایه فرمولاسیون به محیط آزادسازی به نوع روغن، نسبت فسفاتیدیل کولین به روغن و درصد حلال NMP (وزنی/وزنی) در فرمولاسیون بستگی دارد؛ بنابراین، متغیرها در سه سطح ارزیابی شدند (۱-، ۰، ۱) تا بهترین فرمولاسیون از نظر کنترل آزادسازی اولیه انتخاب شود. متغیر وابسته Y در معادله ۱ نشان داده شده است.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_1 X_1 + \sum \beta_{1j} X_1^2 + \sum \beta_{jk} X_1 \cdot X_k \quad \text{معادله ۱}$$

β_0 = intercept, β_1 = linear coefficients, β_{1j} = squared coefficients, β_{jk} = interaction coefficients

سطوح متغیرهای مستقل X_1 , X_1^2 , X_j , X_k = پاسخ Y

متغیرهای وابسته با کمک روش Box-Behnken (BBD) با استفاده از نرم افزار Design Expert به دست آمدند [۱۸]. سطوح حدود چهار متغیر در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. سطوح متغیر مستقل در ارزیابی آزادسازی برون تن با استفاده از روش the Box-Behnken

سطوح			متغیرهای مستقل
+1	0	-1	
GTO	GD O	GM O	نوع روغن (X_1)
3:1	2:1	1:1	نسبت فسفاتیدیل کولین به روغن (X_2)
50	40	30	NMP % (وزنی/وزنی) (X_3)

تهیه فرمولاسیون

فرمولاسیون کریستال مایع با ترکیب نسبت های مختلف فسفاتیدیل کولین به روغن (GDO، GTO و GTO) در حلال NMP طبق جدول ۱ به دست آمد. در انتها، داروی ریسپریدون با کمک سرنگ دوطرفه به

ساختار آمفیفیلک تری دارند [۴]. شکل ضمیمه ۱ نشان دهنده ساختار GDO، GTO و GTO است. به تازگی، GMO به منظور افزایش میزان انکپسولاسیون مواد زیست سازگار برای افزایش جذب پوستی و بهبود انتقال وکتورهای غیروپروسی استفاده شده است. مطالعات گسترده ای درباره GDO برای تعیین پایداری و میزان داروی بارگذاری شده انجام شده است [۵-۷]؛ مثلاً GDO نشان داد که بارگذاری فلاونوئیدهای زغال اخته و مواد شیمی درمانی در کریستال مایع حاوی GDO به بهبود اثر ضدسرطانی و افزایش فراهمی زیستی ترکیبات کم محلول منجر می شود [۵، ۸]. برای کاربردهای موضعی در داروسازی و موارد بهداشتی و آرایشی، GTO به علت زیست سازگاری بالا و توانایی حفظ محصولات فعال بیولوژیکی بسیار مناسب است [۹].

در مطالعه Lim و همکاران که درباره سیستم های کریستال مایع صورت گرفت، اثر اضافه کردن فسفولیپیدهای آنیونی با سورفکتانت کاتیونی به عنوان یک ماده متصل شونده ارزیابی شد. تداخل شارژ یک دارو و شارژ مخالف آن در یک ماده متصل، بارگذاری بالاتر دارو و ویژگی های آزادسازی طولانی را نشان داد [۱۰].

علاوه بر این، در مطالعه Otte و همکارانش، ذکر شد که سرعت آزادسازی دارو با کاهش قطر کانال های آبی و با افزایش چربی دوستی داروها کاهش یافت، همچنین، تغییر نسبت فازهای چربی، مانند فسفاتیدیل کولین و توکوفرول استات و ویژگی های فیزیکی این سیستم ها را تغییر داد. افزایش نسبت توکوفرول استات تا ۱۵ درصد الی ۱۰۰ درصد وزنی، توانست به تشکیل ساختارهای معکبی یا شش وجهی منجر شود. در این سیستم ها، فسفاتیدیل کولین، سوربیتان مونوولئات و توکوفرول استات مواد هسته ای بودند و توئین ۸۰ و اتانول مانع جدایی اجزای اصلی می شدند [۱۱].

ریسپریدون داروی ضدجنونی است که برای درمان شرایط متعدد روانی، مخصوصاً اسکیزوفرنی و فازهای حاد مانیا یا ترکیبی از اختلال نوع ۱ دوقطبی استفاده می شود [۱۲]. در این مطالعه، از این دارو به منظور بررسی کنترل سیستم های دارورسانی استفاده شده است. اشکال دارویی ریسپریدون که امروزه در بازار موجود است، شامل قرص، محلول خوراکی و اشکال جدید تزریقی می شود که با نام تجاری Risperdal CONSTA® و Perseris® استفاده می شود [۱۳]. پس از تزریق Risperdal CONSTA®، ریسپریدون پس از گذشت دو تا سه هفته می تواند به محدوده درمانی برسد و در این مدت، مصرف دارو به صورت خوراکی، ضروری است [۱۴]. همراهی نکردن بیماران مبتلا به اختلالات روانی و نیاز به مصرف خوراکی هم زمان با داروی تزریقی، به عدم پذیرش بیماران منجر شده است. تزریق داروی Perseris® می تواند آزادسازی آهسته رهش را برای داروی ریسپریدون به شکل ایمپلنت تشکیل شونده در محل تأمین کند. Perseris® حاوی پلیمر poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) است که در حلال NMP حل شده است [۱۵]. از معایب این سیستم ها، آزادسازی ناگهانی اولیه ۱۵ تا ۸۰ درصد کل داروی بارگذاری شده، مخصوصاً در ۲۴ ساعت ابتدای تزریق است [۱۶].

آزمایشگاهی نگهداری شدند (NIH Publications No. 8023, revised 1978). این آزمایش را کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد تأیید کرد (کد اخلاق IR.MUMS.PHARMACY.REC.1397.098).

گروه یک گروه کنترل بود. گروه دو یک میلی‌لیتر Risperdal® CONSTA حاوی ۲۵ میلی‌گرم ریسپریدون به‌صورت عضلانی دریافت کرد. گروه سه کریستال مایع بدون دارو و گروه چهار کریستال مایع حاوی ۲۵ میلی‌گرم ریسپریدون به‌صورت زیرجلدی در ناحیه پشت گردن خرگوش دریافت کرد (هر گروه شامل ۳ خرگوش). برای تعیین غلظت ریسپریدون در سرم خرگوش، یک میلی‌لیتر از خون خرگوش در فواصل زمانی ۴، ۸، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۲، ۳۶ ساعت و ۴، ۷، ۱۰، ۱۴، ۱۷، ۲۱، ۲۴، ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۳۵، ۳۸، ۴۲، ۴۵، ۴۹، ۵۲، ۶۰، ۶۵ و ۷۰ روز گرفته شد. سرم حاصل توسط HPLC ارزیابی شد.

به‌منظور جداسازی سرم خون خرگوش ۰/۵ میلی‌لیتر از سرم هر خرگوش به ۰/۵ میلی‌لیتر دی‌اتیل اتر اضافه شد و دو بار به‌مدت ۱۵ دقیقه سونیکه شد، سپس، لایه جدا شده بالایی جمع‌آوری شد و با گاز نیتروژن تبخیر شد. در نهایت، باقی‌مانده با متانول ترکیب شد و به دستگاه HPLC تزریق شد. با کمک نرم‌افزار PKSolver در اکسل، ویژگی‌های فارماکوکینتیکی، شامل سطح زیر نمودار (AUC)، حداکثر غلظت (C_{max})، زمان لازم برای رسیدن به حداکثر غلظت (T_{max}) و نیمه‌عمر حذف دارو ($t_{1/2}$) تعیین شدند [۲۲].

بافت‌شناسی

برای انجام تست بافت‌شناسی، خرگوش‌ها در پایان مطالعات فارماکوکینتیک (۷۰ روز) به‌مدت ۱۲ ساعت از غذا محروم شدند و در نهایت، با روش خفگی با گاز CO_2 کشته شدند. محل تزریق تراشیده و پوست محل تزریق جدا شد. به‌علاوه، قلب، کبد و کلیه خرگوش‌ها جدا شدند. بافت‌های جدا شده در فرمالین ۱۰ درصد فیکس و خشک شدند و در نهایت، با کمک رنگ هماتوکسیلین‌ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شد و آسیب‌شناس آن‌ها را ارزیابی کرد.

روش آنالیز

هر آزمایش سه مرتبه تکرار شد و نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شد. نتایج با کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پست‌تست (Tukey-Kramer post-test) با استفاده از GraphPad Prism 8.0 ارزیابی شدند. ارزش P کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

شناسایی فرمولاسیون بهینه

میزان آزادسازی اولیه برای ۱۵ تست در سه سطح ارزیابی شد (جدول ۲). حداقل آزادسازی ($4/8 \pm 0/28$ درصد)، نوع روغن (GMO، GDO و GTO)، نسبت فسفاتیدیل کولین به روغن و درصد حلال NMP (وزنی/وزنی) در حامل (GDO) به‌ترتیب ۳۰ درصد، ۱: ۲/۲ و ۳۰ درصد

پایه کریستال مایع به‌صورت سوسپانسیون اضافه شد (شکل ضمیمه ۲). برای تعیین تبدیل فاز روغنی به مزوفاز شبه ژل در تماس با محیط آبی، ۱۰۰ میکرولیتر از فرمولاسیون به ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین اضافه شد و تشکیل ژل از لحاظ ظاهری ارزیابی شد [۱۹].

ارزیابی برون‌تن؛ آزادسازی ریسپریدون / NMP و تخریب حامل

۱۰۰ میلی‌گرم از حامل حاوی دارو به ظرف حاوی ۷۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین با سرنگ ۲۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تزریق شد و فرمولاسیون به‌محض تزریق، به ژل تبدیل شد. برای حفظ شرایط سینک، ۲ میلی‌لیتر از بافر در فواصل زمانی ۴، ۸، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۲۸، ۳۲ و ۳۶ ساعت و ۴، ۷، ۱۰، ۱۴، ۱۷، ۲۱، ۲۴، ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۳۵، ۳۸، ۴۲، ۴۵، ۴۹، ۵۶ و ۶۰ روز گرفته شد و با ۲ میلی‌لیتر بافر تازه جایگزین شد. در انتها، نمونه‌ها برای آنالیز توسط HPLC (RID-20A, shimadzu, Japan) مجهز به شناساگر refractometric آماده شدند. نمودار کالیبراسیون برای تعیین غلظت‌های مختلف ریسپریدون (۲ تا ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) در بافر با کمک HPLC تعیین شد. ستون HPLC به‌کاررفته در این ارزیابی C18 با اندازه ذره ای ۵ میکرومتر، قطر ۴،۶ میکرومتر و طول ۲۵ سانتی‌متر (Sepachrome Adams® Italy) بود. فاز متحرک استونیتریل (۳۰ درصد حجمی/حجمی) و دی‌پتاسیم فسفات (۰/۳ درصد حجمی/حجمی) بود. سرعت جریان و حجم تزریق به‌ترتیب ۰/۶ میلی‌لیتر در دقیقه و ۲۰ میکرولیتر بودند [۲۰].

سطح NMP که از فرمولاسیون وارد فاز آبی اطراف می‌شود، توسط HPLC پس از نمونه‌گیری در فواصل زمانی ذکر شده تعیین شد. غلظت حلال بر اساس منحنی کالیبراسیون در غلظت‌های (۰/۰۶ تا ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تعیین شد. فاز متحرک مخلوطی از استونیتریل و تری‌فلوئورواستیک اسید (۳۲:۶۸) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. نوع ستون، سرعت جریان، حجم تزریق و طول موج به‌ترتیب C_{18} ، ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه، ۲۰ میکرولیتر و ۲۲۰ نانومتر بود [۲۱].

میزان تخریب فرمولاسیون بهینه کریستال مایع و Risperdal® در محیط درون‌تن در آب مقطر دیونیزه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور در دقیقه در فواصل زمانی ۱، ۲، ۳، ۴، ۷، ۱۰، ۱۴، ۱۷، ۲۱، ۲۴، ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۳۵، ۳۸، ۴۲، ۴۵، ۴۹، ۵۲، ۵۶ و ۶۰ روز بر اساس کاهش وزن تعیین شد. نمونه‌ها در فواصل زمانی ذکر شده از محیط آبی خارج شدند و در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان خشک کردن انجام دادی، به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سرعت تخریب به‌وسیله معادله ۲ تعیین شد که در آن W_i وزن اولیه و W_t وزن نهایی ژل است.

$$\text{معادله ۲. } \text{Degradation \%} = (W_i - W_t) / W_i \times 100$$

مطالعات فارماکوکینتیکی آزادسازی ریسپریدون

۱۲ خرگوش نر نیوزلندی با وزن $2 \pm 0/1$ کیلوگرم از مؤسسه انستیتو پاستور (ایران) خریداری شد. خرگوش‌ها در شرایط استاندارد طبق راهنمای مؤسسه ملی بهداشت برای مراقبت و استفاده از حیوانات

جدول ۲. پاسخ متغیرهای وابسته (آزادسازی ناگهانی اولیه در محیط برون تن در زمان ۲۴ ساعت ابتدای تزریق (Y%) به متغیرهای مستقل

ردیف	X ₁	X ₂	X ₃	Y
۱	GMO	۱	۴۰	۳۸/۶
۲	GDO	۲	۴۰	۱۹/۲
۳	GDO	۲	۴۰	۱۷/۲
۴	GTO	۳	۴۰	۲۴/۱
۵	GTO	۱	۴۰	۳۳/۵
۶	GMO	۲	۳۰	۲۰/۱
۷	GDO	۳	۳۰	۴/۸
۸	GTO	۲	۳۰	۱۲/۲
۹	GDO	۱	۳۰	۱۵/۵
۱۰	GMO	۳	۴۰	۳۴/۰
۱۱	GTO	۲	۵۰	۲۵/۳
۱۲	GMO	۲	۵۰	۳۹/۸
۱۳	GDO	۳	۵۰	۱۹/۷
۱۴	GDO	۱	۵۰	۳۲/۴
۱۵	GDO	۲	۴۰	۱۹/۸

X₁ نوع روغن (GMO, GDO, GTO); X₂ نسبت روغن به فسفاتیدیل کولین و X₃ NMP (w/w %)

درصد) آزادسازی ناگهانی اولیه کمتری نسبت به GMO (۰/۸۷ ± ۷/۳۷ درصد) و GTO (۰/۹۷ ± ۱۰/۹۶ درصد) (نسبت فسفاتیدیل کولین به روغن ۲/۲: ۱، درصد حلال NMP=۳۰ درصد) دارد؛ اما، کمترین میزان آزادسازی ناگهانی اولیه مربوط به Risperdal® CONSTA® (۰/۴۵ ± ۳/۰۵) بود. از آنجایی که معیار طراحی آزمایش برای فرمولاسیون بهینه بر مبنای حداقل آزادسازی بود، فرمولاسیون با بخش لیپیدی GDO به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب شد.

در نسبت فسفاتیدیل کولین به روغن بین ۱: ۱ تا ۲/۲: ۱، آزادسازی ناگهانی اولیه تا رسیدن به حداقل مقدار کاهش یافت. بالا بردن نسبت تا ۳:۱ اثری بر آزادسازی ناگهانی اولیه نداشت و نمودار به سطح صاف رسید (شکل A.۱).

آزادسازی ناگهانی اولیه با بالا رفتن درصد حلال NMP افزایش یافت؛ بنابراین، میزان ۳۰ درصد به عنوان درصد بهینه در نظر گرفته شد (شکل B.۱).

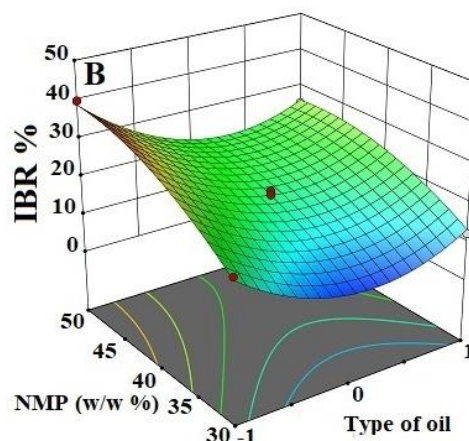
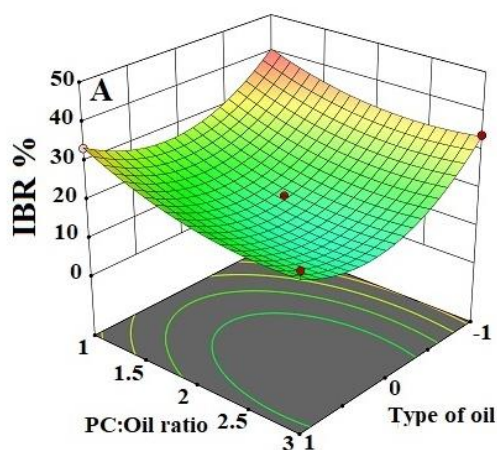
بود. برای تخمین میزان آزادسازی ناگهانی اولیه، یک معادله چندجمله ای درجه دوم پیش بینی شد (معادله ۳):

معادله ۳:

$$Y = + 18.75 - 4.68 X_1 - 4.67 X_2 + 8.04 X_3 + 10.01 X_1^2 + 3.76 X_2^2 - 4.42 X_3^2$$

نوع روغن (GMO, GDO و GTO) X₁ =نسبت روغن به فسفاتیدیل کولین X₂ =درصد حلال NMP% X₃ =

با آنالیز باقی مانده ها، سطوح مدل سطح پاسخ حاصل شد. اعداد ضریب رگرسیون و عدد P برای مدل ها در جدول ضمیمه ۱ آورده شده است. برای آزادسازی ناگهانی اولیه، ضریب رگرسیون مساوی ۰/۹۸۴۹ بود. شکل A.۱ نشان دهنده اثر نوع روغن (GMO, GDO و GTO) و نسبت فسفاتیدیل به روغن در آزادسازی ناگهانی اولیه ریسپریدون در ۲۴ ساعت ابتدای تزریق است. فرمولاسیون حاوی GDO (۰/۲۴ ± ۵/۱۱)



شکل ۱. (A): نمودار سطح پاسخ درصد آزادسازی ناگهانی اولیه (IBR%) در برابر نوع روغن و نسبت فسفاتیدیل کولین به روغن، (B) نمودار سطح پاسخ IBR در برابر نوع روغن و درصد حلال NMP.

شناسایی خصوصیات فرمولاسیون ها

همان گونه که در شکل A.۲ دیده می شود، فرمولاسیون حاوی GMO، GDO و GTO فوراً در تماس با محیط آبی ($pH=7/4$)، به مزوفاز شبه ژل مات در دمای اتاق تبدیل می شود، همچنین، شکل A.۲ نشان دهنده تغییرات ساختار کریستال مایع پس از گذشت ۱، ۲۱ و ۶۰ روز است. شکل B.۲ نیز بیانگر تشکیل ژل کریستال مایع در روز اول پس از تزریق به بدن خرگوش و تغییرات ژل بعد از گذشت ۶۰ روز است.

شکل های A و B نشان دهنده آزادسازی تجمعی برون تن داروی ریسپریدون برای فرمولاسیون های ارزیابی شده است. زمان لازم برای رسیدن به آزادسازی ۱۰۰ درصدی کریستال مایع حاوی GMO، کریستال مایع بهینه GDO و GTO به ترتیب ۵۲، ۶۰ و ۳۸ روز بود. این نتایج نشان داد که حامل GDO آزادسازی یکنواخت و آهسته ای در طی دو ماه داشته است. آزادسازی دارو در محیط برون تن با آزادسازی حلال و تخریب کریستال مایع نیز در تطابق خوبی بودند.

میزان آزادسازی تجمعی حلال NMP از کریستال مایع حاوی GDO در روز

اول ($0/87 \pm 17/50$ درصد) به میزان درخور توجهی ($P < 0/05$) کمتر از میزانی بود که از کریستال مایع حاوی GMO ($25/17 \pm 2/16$ درصد) و GTO ($43/51 \pm 3/62$ درصد) آزاد شد. در این مطالعه، زمان لازم برای آزادسازی ۱۰۰ درصد حلال برای فرمولاسیون های حاوی GMO، GDO و GTO به ترتیب ۱۴، ۲۴ و ۱۰ روز بود (شکل C.۳).

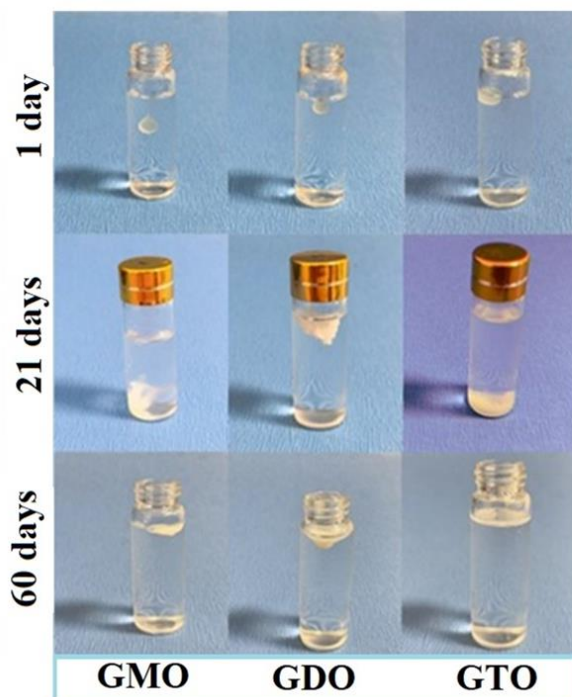
میزان تخریب برون تن فرمولاسیون بهینه حامل کریستال مایع حاوی GDO در طول دو ماه $43/95 \pm 3/68$ درصد بود که به طور معناداری ($P < 0/05$)، کمتر از کریستال مایع حاوی GMO ($57/01 \pm 5/61$ درصد) و GTO ($67/1 \pm 4/46$ درصد) بود (شکل D.۳).

فارماکوکینتیک آزادسازی ریسپریدون از کریستال مایع بهینه و

Rispedal CONSTA®

کریستال مایع بهینه حاوی GDO سطحی یکنواخت و پیوسته از آزادسازی دارو طی دو ماه در برون تن نشان داد؛ بنابراین، در این مطالعه، فرمولاسیون حاوی GDO برای مطالعات درون تن با Rispedal CONSTA® مقایسه شد. کروماتوگرام HPLC سرم خرگوش حاوی ریسپریدون و نمونه خون خرگوش در هفته چهارم در شکل ضمیمه ۳ نشان داده شده است.

A



B



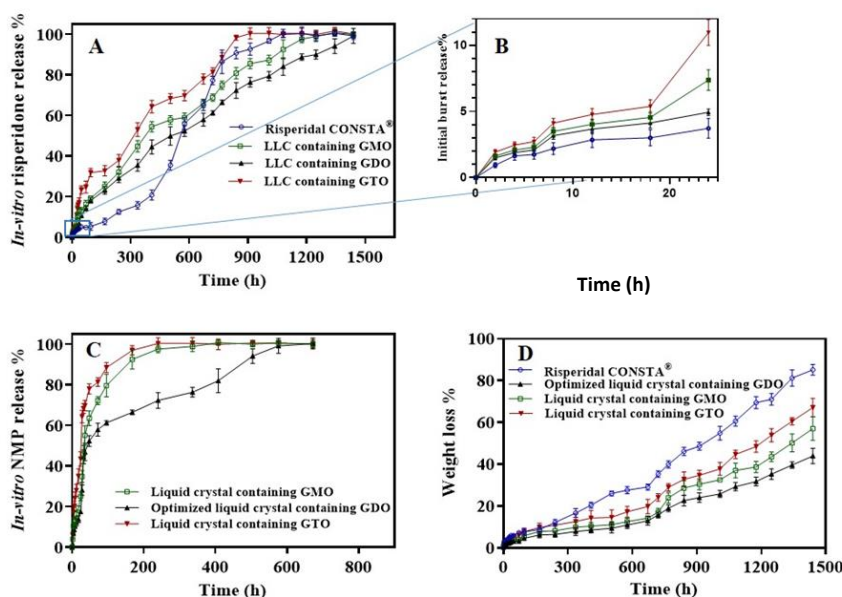
شکل ۲. A: تشکیل ساختار کروی و یکنواخت از فرمولاسیون حاوی GMO، GDO و GTO. B: ژل کریستال مایع بهینه در محل تزریق پس از ۲۴ ساعت و ۶۰ روز

سطح سرمی ریسپریدون حاصل از تزریق زیرجلدی فرمولاسیون آهسته‌رهش کریستال مایع حاوی GDO و Risperdal CONSTA® در شکل ۴ نشان داده شده است.

مقایسه نتایج حاصل از فارماکوکینتیک دو فرمولاسیون در جدول ۳ نشان داده شده است. زمان $t_{1/2}$ به صورت قابل ملاحظه‌ای از ۴/۲۶ ± ۳۸۹/۲۲ ساعت برای Risperdal CONSTA® به ۷/۲۲ ± ۳۸۹/۲۲ ساعت برای کریستال مایع بهینه (P < ۰/۰۵) افزایش یافت. نتایج داده‌های فارماکوکینتیک نشان داد که T_{max} در فرمولاسیون بهینه حاوی GDO کمتر از Risperdal® CONSTA بود.

زمان ظهور پیک از سرم حاوی ریسپریدون $0/12 \pm 3/126$ دقیقه و نمونه گرفته شده از خون خرگوش $0/12 \pm 3/076$ دقیقه بود. همچنین، نمودار کالبراسیون با ضریب رگرسیون $0/9944$ و $0/87$ LOD = $3/43 \pm 1/19$ میلی‌لیتر و $1/36$ و $10/19 \pm$ نانوگرم در میلی‌لیتر بود (شکل ضمیمه ۴).

همان‌گونه که در شکل B.۲ نشان داده شده است، کریستال مایع فوراً به مزوفاز شبه ژل در تماس با محیط آبی زیرجلد تبدیل می‌شود، همان‌گونه که در برون‌تن دیده شد. شکل B.۲ همچنین، نشان‌دهنده تغییرات ساختار کریستال مایع بعد از ۶۰ روز و بیانگر ۷۰ درصد از تخریب است.

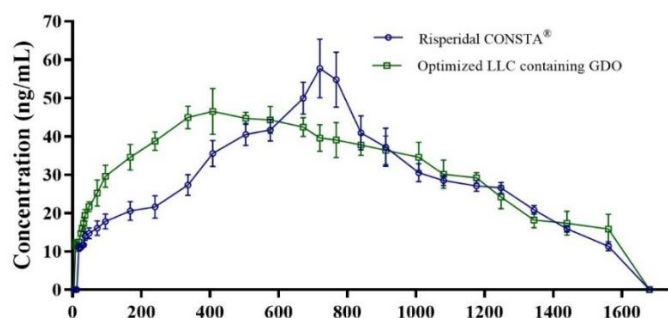


شکل ۳. A: نمودار فراوانی تجمعی برون‌تن آزادسازی ریسپریدون برای کریستال مایع حاوی GMO، کریستال مایع بهینه حاوی GDO و کریستال مایع حاوی GTO و Risperdal CONSTA®. B: فراوانی تجمعی آزادسازی ناگهانی اولیه در مدت ۲۴ ساعت. C: آزادسازی تجمعی حلال NMP برای کریستال مایع حاوی GMO، GDO و GTO. D: تخریب برون‌تن ژل کریستال مایع برای Risperdal CONSTA®, GDO، GTO و Risperdal CONSTA®.

جدول ۳. پارامترهای فارماکوکینتیک ریسپریدون به‌دست‌آمده از نرم‌افزار PK solver پس از تجویز فرمولاسیون‌های حاوی ۲۵ میلی‌گرم ریسپریدون به خرگوش‌ها (تعداد = ۳).

گروه‌ها	AUC _{0-t} (ng.h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	MRT (h)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)
کریستال مایع حاوی GDO	۵۷۵۲۳/۹۰	۳۸۹/۲۲	۸۵۰/۵۱	۳۶۶/۱۵	۴۷/۳۱
	± ۴۹/۷۶	± ۷/۲۲	± ۱۰/۴۸	± ۴/۱۸	± ۳/۱۲
Risperdal CONSTA® (II)	۴۶۹۴۸/۱۲	۲۴۶/۳۹	۸۵۱/۱۲	۷۲۰/۴۱	۵۷/۷۲
	± ۴۸/۵۴	± ۴/۲۶	± ۷/۳۴	± ۶/۴۸	± ۴/۲۴

AUC: سطح زیر نمودار، T_{max} : زمان لازم برای رسیدن به حداکثر غلظت، C_{max} : حداکثر غلظت، $t_{1/2}$: زمان لازم برای نصف شدن غلظت، MRT: متوسط زمان اقامت.

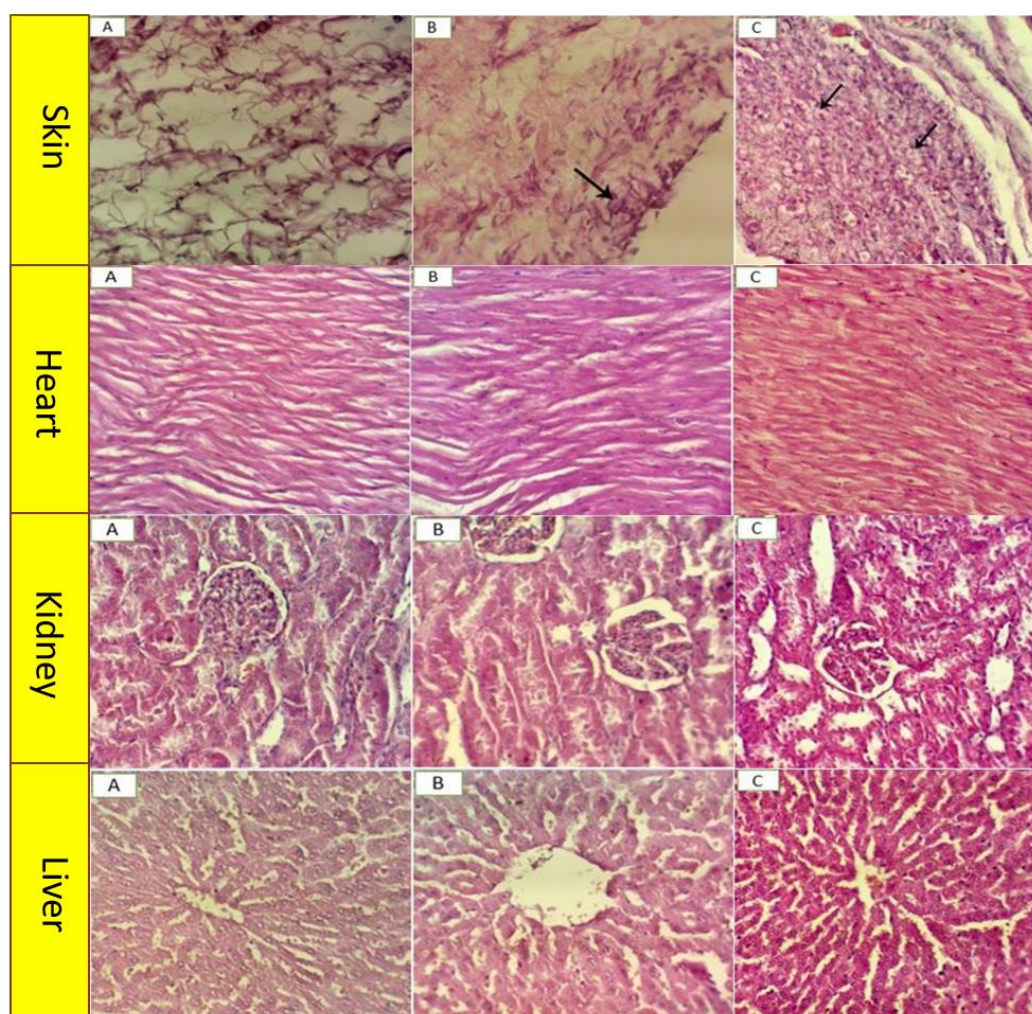


شکل ۴. پروفایل غلظت داروی ریسپریدون پس از تزریق کریستال مایع حاوی GDO و Risperdal CONSTA® حاوی ۲۵ میلی‌گرم دارو

بافت‌شناسی

شکل ۵ نشانگر ساختار پوست، قلب، کبد و کلیه در سه گروه ارزیابی شده است. بافت پوست در گروه کنترل (شکل A.۵) کاملاً سالم و نرمال بود. هیچ نکروز یا خون‌ریزی در گروه دریافت‌کننده کریستال مایع بهینه بدون ریسپریدون مشاهده نشد (شکل B.۵)؛ اما نفوذ اندکی از سلول‌های لکوسیت به بافت زیرجلد نشان داده شد. گروه دریافت‌کننده کریستال مایع بهینه حاوی داروی ریسپریدون ۲۵ میلی گرم (شکل C.۵) نشان‌دهنده نکروز بافت

چربی زیرجلدی با تظاهر سلول‌های التهابی تک‌هسته ای (لکوسیت) بود (جدول ضمیمه ۲). بافت میوکارد قلب به خوبی تراز شده است و هیچ خون‌ریزی، نکروز و التهابی مشاهده نشد و کاملاً سالم به نظر می‌رسید (جدول ضمیمه ۳). توپول‌های گلومرول کلیه کاملاً طبیعی بود و هیچ نکروز، فساد، خون‌ریزی و سلول‌های التهابی مشاهده نشد (جدول ضمیمه ۴). بافت کبد کاملاً سالم و نرمال به نظر می‌رسید، توپول مرکزی کاملاً واضح بود و هیچ نکروز، فساد یا سلول‌های التهابی مشاهده نشد (جدول ضمیمه ۵).



شکل ۵. بافت پوست، قلب، کبد و کلیه. گروه کنترل (A)، فرمولاسیون کریستال مایع بدون ریسپریدون (B)، فرمولاسیون کریستال مایع حاوی ۲۵ میلی گرم ریسپریدون (C)، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

بحث

همان‌گونه که از نتایج استنباط می‌شود، اولتات یک اسید چرب با خاصیت چربی‌دوستی است؛ بنابراین، پیش‌بینی می‌شود که با بالا رفتن تعداد زنجیره‌های این اسید چرب، توانایی پایه برای اتصال به داروهای چربی‌دوست بیشتر شود که می‌تواند در آزادسازی آهسته‌رهش آن مؤثر باشد. درحالی‌که GTO توانایی کنترل آزادسازی ناگهانی اولیه را دارد، با تشکیل امولسیون روغن در آب برای تشکیل سیستم آهسته‌رهش مناسب نیست؛ اما GMO و GDO توانایی ایجاد ژل تشکیل‌شونده در

محل با خاصیت کنترل آزادسازی را دارند.

در بخش بهینه سازی نیز مشاهده شد که افزایش نسبت بخش فسفاتیدیل کولین به بخش GDO به بالا رفتن درصد فاز چربی‌دوست منجر می‌شود، در مقابل، میزان پائین تر فسفاتیدیل کولین به کاهش چربی‌دوستی منجر می‌شود که افزایش چربی‌دوستی، آزادسازی آهسته تر و کنترل شده را به دنبال خواهد داشت. با مقایسه فرمولاسیون بهینه و Risperdal CONSTA[®]، این گونه نتیجه‌گیری می‌شود که تفاوت بین میزان آزادسازی ناگهانی اولیه در فرمولاسیون بهینه و Risperdal

سطح سرمی یکنواخت تری فراهم کند. داده های $t_{1/2}$ نشان داد که آزادسازی ریسپریدون از کریستال مایع به صورت آهسته رهش صورت گرفته است و برای مدت زمان طولانی در جریان خون باقی ماند [۲۵]. MRT کریستال مایع به Risperdal CONSTA® بسیار نزدیک بود که نشان دهنده توانایی ایجاد سطح مشابهی از دارو در جریان خون بود. این نتایج همچنین، آزادسازی آهسته رهش ریسپریدون را پس از گنجاندن در حامل کریستال مایع، با فراهمی زیستی بالاتر (AUC بالاتر) نسبت به میکروسفر Risperdal CONSTA® نشان داد.

نتایج بافت شناسی حاصل از این مطالعه و مطالعه ای که Liang و همکارانش در سال ۲۰۱۹ صورت دادند، مشابه بود [۲۶]. در این مطالعه، گروه دریافت کننده داروی بارگذاری شده در حامل کریستال مایع نتایجی یکسان با گروه کنترل در مطالعات بافت شناسی نشان دادند و هیچ تخریبی در بافت ها مشاهده نشد. در مطالعه Ki و همکارانش در سال ۲۰۱۴، مطالعات بافت شناسی گروه دریافت کننده کریستال مایع که با سوربیتان مونوالثات تهیه شده بود نیز نتایجی شبیه به نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد [۲۷].

نتیجه گیری

در این مطالعه، توانایی کنترل آهسته دارو توسط ژل کریستال مایع حاوی GDO، GDO، و Risperdal CONSTA® ارزیابی و مقایسه شد. نتایج نشان دادند که کنترل بیشتر و آزادسازی ناگهانی اولیه کمتر برای فرمولاسیون حاوی GDO بود، همچنین، نتایج نشان داد که یک تزریق از فرمولاسیون حاوی حامل GDO می تواند آزادسازی دارو را برای دو ماه در مطالعات برون تن و درون تن در پنجره درمانی حفظ کند؛ بنابراین، فرمولاسیون کریستال مایع حاوی GDO پتانسیل بهتری نسبت به GDO، GDO، و Risperdal CONSTA® دارد. فرمولاسیون کریستال مایع به تجویز داروی خوراکی هم زمان با داروی تزریقی نیازی ندارد. مطالعات بیشتری برای تأیید توانایی کریستال مایع حاوی GDO برای آزادسازی آهسته رهش دارو نیاز است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از شرکت داروسازی پورسینا به علت تأمین ماده مؤثر دارویی ریسپریدون برای انجام این مطالعه تقدیر و تشکر به عمل می آید.

تعارض منافع

در اظهارات این متن، هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد و نویسندگان هیچ گونه منفعت مالی از نتایج مطالعه پیشنهادی نمی برند.

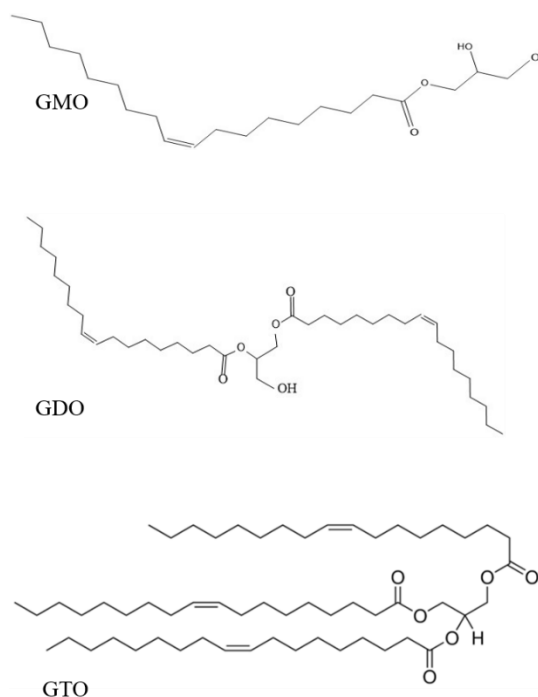
CONSTA® درخور توجه نبود. حلال NMP با درصد ۳۰، کنترل بهتری بر روند آزادسازی دارو داشت.

نتایج این مطالعه با نتایج حاصل از مطالعه Zhang و همکارانش در یک راستا بود که GTO در محل تزریق، ژل ایجاد نمی کند و بیشتر رفتار ایزوتروپیک شبه امولسیون از خود نشان می دهد [۲۳]. نتایج نشان داد که فرمولاسیون حاوی GTO حلال NMP را تندتر از سایر فرمولاسیون ها آزاد می کند که به آزادسازی سریع تر داروی ریسپریدون منجر می شود. از آنجایی که GTO بیشترین چربی دوستی را دارد، حلال تمایل دارد تا به محیط آبی اطراف وارد شود؛ بنابراین، حلال موجود در حامل GTO نسبت به GDO و GDO به محیط اطراف سریع تر وارد می شود. با مقایسه حامل GDO و GDO، می توان چنین برداشت کرد که به علت اینکه حامل GDO چربی دوستی کمتری دارد، سریع تر در محیط آبی حل می شود و حلال NMP را سریع تر آزاد می کند که خود به آزادسازی ناگهانی اولیه بالاتر منجر می شود؛ درحالی که GDO حامل مناسب تری بود و کمترین میزان اختلاط با آب و آزادسازی NMP را نشان داد.

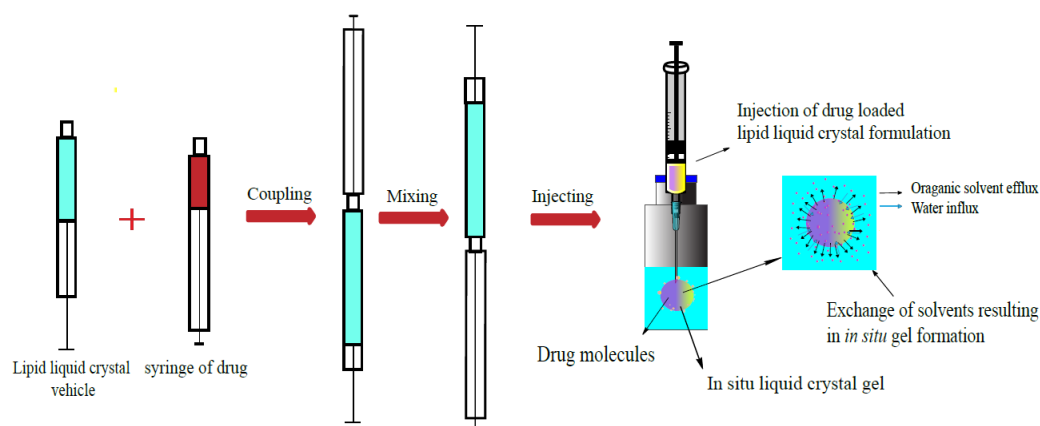
علاوه بر این، نتایج آزادسازی آهسته تر دارو از فرمولاسیون حاوی GDO را نشان داد: تخریب کمتر آزادسازی آهسته تری، برای مدت زمان طولانی تری، ایجاد می کند. از آنجایی که آب به آسانی به فرمولاسیون حاوی GDO وارد می شود، این پایه به سرعت تخریب می شود. GTO نیز کریستال مایع پایدار با ویسکوزیته مناسب تشکیل نداد و بنابراین، ریسپریدون به سرعت آزاد شد؛ درحالی که فرمولاسیون بهینه (GDO) ساختارش را برای مدت طولانی تری با تشکیل ساختار کریستال مایع مناسب با ویسکوزیته بالا و چربی دوستی متعادل حفظ می کند.

نتایج داده های فارماکوکینتیک نشان داد که T_{max} در فرمولاسیون بهینه حاوی GDO کمتر از Risperdal CONSTA® بود؛ به علاوه، کریستال مایع می تواند به غلظت درمانی مؤثرتر، سریع تر و با کنترل بهتری برسد. از معایب Risperdal CONSTA® می توان به تأخیر و نایکنواختی در آزادسازی دارو برای مدت دو هفته اشاره کرد؛ بنابراین، بیمار به مصرف داروی خوراکی در روزهای ابتدایی پس از تزریق نیاز دارد [۱۸].

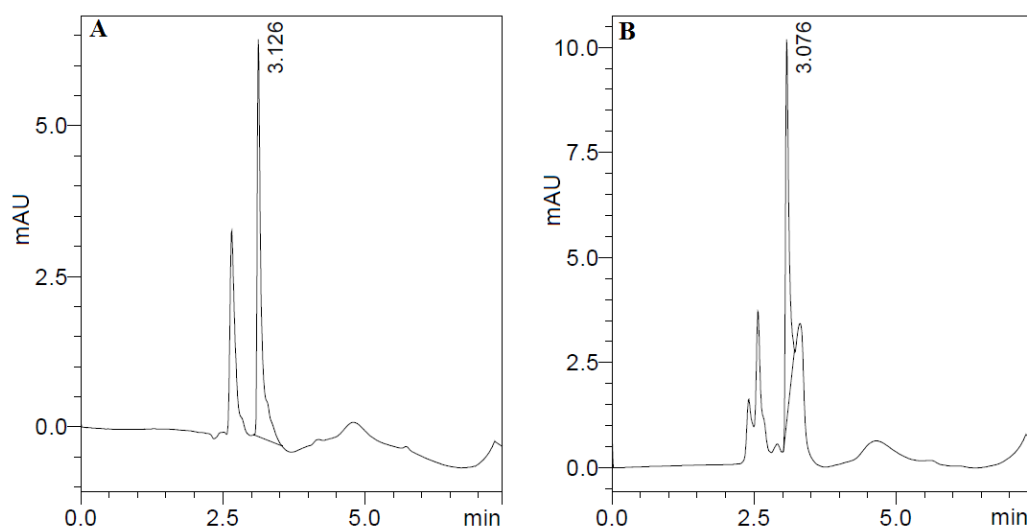
بین ویسکوزیته حامل کریستال مایع و سرعت تغییر فاز و آزادسازی برون تن و درون تن دارو ارتباطی وجود دارد [۱۱]. در مطالعه ای که Said و Elmenoufy صورت دادند، نتیجه گرفتند که آزادسازی آهسته رهش با کاهش C_{max} به کاهش اثر و به دنبال آن، بهبود اثربخشی دارو و فراهمی زیستی منجر می شود [۲۴]. اگرچه فرمولاسیون بهینه کریستال مایع C_{max} کمتری دارد، زمان لازم برای رسیدن به $t_{1/2}$ بیشتری نسبت به Risperdal CONSTA® دارد و نشان داد که می تواند



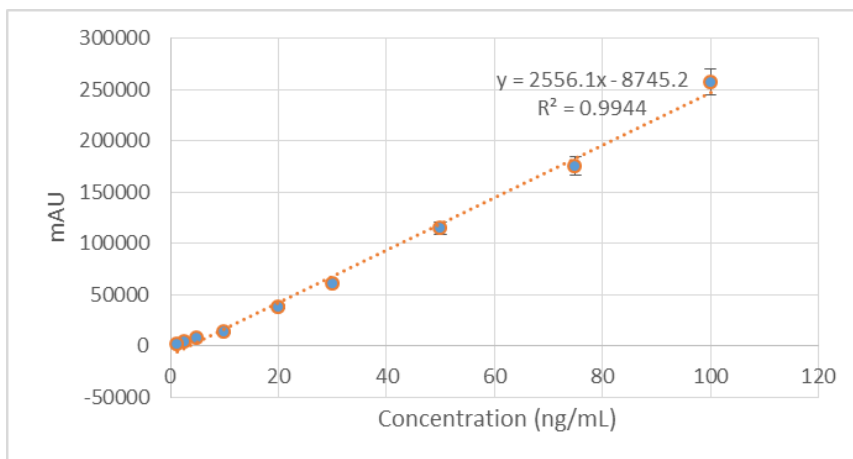
شکل تکمیلی ۱. ساختار شیمیایی GMO، GDO و GTO



شکل تکمیلی ۲. مراحل آماده سازی فرمولاسیون با کمک سرنگ دوطرفه



شکل تکمیلی ۳. کروماتوگرام HPLC سرم خرگوش حاوی ریسپریدون (A) و نمونه خون گرفته شده از خرگوش در هفته چهارم (B)



شکل تکمیلی ۴. منحنی کالیبراسیون ریسپروند با غلظت های مختلف در سرم خرگوش

جدول تکمیلی ۱. ضرایب رگرسیون و ارزش P

درصد آزادسازی ناگهانی اولیه		
ضریب رگرسیون	ارزش P	عدد ثابت
+۱۸/۷۵	-	X ₁ [*]
-۴/۶۸	<۰/۰۰۱۴	X ₂ ^{**}
-۴/۶۷	۰/۰۰۱۴	X ₃ ^{***}
+۸/۰۴	<۰/۰۰۰۱	X ₁ ²
۱۰/۰۱	۰/۰۰۰۲	X ₂ ²
۳/۷۶	<۰/۰۱۷۴	X ₃ ²
-۴/۴۲	<۰/۰۰۹۳	X ₁ × X ₂
-۱/۲۱	۰/۲۹۵۵	X ₁ × X ₃
-۱/۶۶	۰/۱۶۹۲	X ₂ × X ₃
-۰/۵۰	۰/۶۴۹۲	

X₁, نوع روغن (GMO, GDO) و X₂, ** (GTO) نسبت فسفاتیدیل کولین به روغن (NMP (w/w%); ***X₃, (PC: oil);

جدول تکمیلی ۲. درجه بندی میزان تخریب بافت پوست. خفیف +، متوسط ++، شدید +++، عدم تخریب -

گروه	Calcification	Fibrosis	SC fat necrosis	Leukocyte infiltration	Hemorrhage
کریستال مایع بدون دارو	-	-	++	++	-
کریستال مایع حاوی دارو	-	-	-	+	-
کنترل	-	-	-	-	-

جدول تکمیلی ۳. درجه بندی میزان تخریب بافت قلب. خفیف +، متوسط ++، شدید +++، عدم تخریب -

گروه	Inflammatory cells infiltration	Necrosis	Hemorrhage	Edema	Hyperemia
کریستال مایع بدون دارو	-	-	-	-	-
کریستال مایع حاوی دارو	-	-	-	-	-
کنترل	-	-	-	-	-

جدول تکمیلی ۴. درجه بندی میزان تخریب بافت کلیه. خفیف +، متوسط ++، شدید +++، عدم تخریب -

گروه	Fibrosis	Inflammatory cells infiltration	Tubular degeneration or necrosis	Hyperemia (Congestion)	Hemorrhage
کریستال مایع بدون دارو	-	-	-	-	-
کریستال مایع حاوی دارو	-	-	-	-	-
کنترل	-	-	-	-	-

جدول تکمیلی ۵. درجه بندی میزان تخریب بافت کبد. خفیف +، متوسط ++، شدید +++، عدم تخریب -

گروه	Hemorrhage	Hepatocytes necrosis	Sinusoidal dilation and congestion	Portal vein congestion	Vacuolar degeneration of hepatocytes	Inflammatory cells infiltration in the portal triads
کریستال مایع بدون دارو	-	-	-	-	-	-
کریستال مایع حاوی دارو	-	-	-	-	-	-
کنترل	-	-	-	-	-	-

References

- Ma H, Kang Q, Wang T, Xiao J, Yu LJC, Biointerfaces SB. Liquid crystals-based sensor for the detection of lithocholic acid coupled with competitive host-guest inclusion. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;**173**:178-184. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.09.071 PMID: 30292930
- Jákli A. One-and two-dimensional fluids: properties of smectic, lamellar and columnar liquid crystals: CRC Press; 2006.
- Nilsson C, Edwards K, Eriksson J, Larsen SW, Østergaard J, Larsen C, et al. Characterization of oil-free and oil-loaded liquid-crystalline particles stabilized by negatively charged stabilizer citrem. *Langmuir*. 2012;**28**(32):11755-11766. DOI: 10.1021/la3021244 PMID: 22831645
- Zhen G, Hinton TM, Muir BW, Shi S, Tizard M, McLean KM, et al. Glycerol monooleate-based nanocarriers for siRNA delivery in vitro. *Mol Pharm*. 2012;**9**(9):2450-2457. DOI: 10.1021/mp200662f PMID: 22794355
- Cervin C, Tinzl M, Johnsson M, Abrahamsson PA, Tiberg F, Dizayi N. Properties and effects of a novel liquid crystal nanoparticle formulation of docetaxel in a prostate cancer mouse model. *Eur J Pharm Sci*. 2010;**41**(2):369-375. DOI: 10.1016/j.ejps.2010.07.003 PMID: 20633647
- Cervin C, Vandoolaeghe P, Nistor C, Tiberg F, Johnsson M. A combined in vitro and in vivo study on the interactions between somatostatin and lipid-based liquid crystalline drug carriers and bilayers. *Eur J Pharm Sci*. 2009;**36**(4-5):377-385. DOI: 10.1016/j.ejps.2008.11.001 PMID: 19041716
- Wadsater M, Barauskas J, Nylander T, Tiberg F. Formation of highly structured cubic micellar lipid nanoparticles of soy phosphatidylcholine and glycerol dioleate and their degradation by triacylglycerol lipase. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;**6**(10):7063-7069. DOI: 10.1021/am501489e PMID: 24779728
- Linkevičiūtė A, Būdienė J, Naujalis E, Katelnikovas A, Barauskas J. Characterization and stability study of cranberry flavonoids in lipid liquid crystalline systems. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2017;**119**(8):1600373.
- Pan L, Pei X, He R, Wan Q, Wang J. Multiwall carbon nanotubes polycaprolactone composites for bone tissue engineering application. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;**93**:226-234. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.01.011 PMID: 22305638
- Lim JL, Ki MH, Joo MK, An SW, Hwang KM, Park ES. An injectable liquid crystal system for sustained delivery of entecavir. *International journal of pharmaceutics*. *Int J Pharm X*. 2015;**490**(1-2):265-272. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.049 PMID: 26004002
- Otte A, Báez-Santos YM, Mun EA, Soh BK, Lee YN, Park K. The in vivo transformation and pharmacokinetic properties of a liquid crystalline drug delivery system. *Int J Pharm X*. 2017;**532**(1):345-351. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.098 PMID: 28844902
- Shah B, Khunt D, Misra M, Padh H. Non-invasive intranasal delivery of quetiapine fumarate loaded microemulsion for brain targeting: formulation, physicochemical and pharmacokinetic consideration. *Eur J Pharm Sci*. 2016;**91**:196-207. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.05.008 PMID: 27174656
- Navarro G, Hradsky J, Lluís C, Casadó V, McCormick PJ, Kreutz MR, et al. NCS-1 associates with adenosine A2A receptors and modulates receptor function. *Front Mol Neurosci*. 2012;**5**:53. DOI: 10.3389/fnmol.2012.00053 PMID: 22529776
- Yerragunta B, Jogala S, Chinnala KM, Aukunuru J. Development of a novel 3-month drug releasing risperidone microspheres. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;**7**(1):37-44. DOI: 10.4103/0975-7406.148777 PMID: 25709335
- Kamali H, Atamanesh M, Kaffash E, Mohammadpour F, Khodaverdi E, Hadizadeh F, et al. Elimination of residual solvent from PLGA microspheres containing risperidone using supercritical carbon dioxide. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020;**57**:101702. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101702
- Liu H, Venkatraman S. Cosolvent effects on the drug release and depot swelling in injectable in situ depot-forming systems. *J Pharm Sci*. 2012;**101**(5):1783-1793. DOI: 10.1002/jps.23065 PMID: 22318766
- Andorn AC, Graham JA, Fava M, Csernansky J, Newcomer JW, Walling DP, et al. Efficacy of monthly extended-release risperidone injections (RBP-7000) for the treatment of schizophrenia: an analysis of individual PANSS items. *EOS*. 2019;**42**(2):264-265.
- Ibrahim TM, El-Megrab NA, El-Nahas. Optimization of injectable PLGA in-situ forming implants of anti-psychotic risperidone via Box-Behnken design. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020;**58**:101803. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101803
- Kojima R, Hidaka S, Taira M, Kohri M, Taniguchi T, Kishikawa K, et al. Preparation of liquid crystal nanocapsules by polymerization of oil-in-water emulsion monomer droplets. *J Colloid Interface Sci*. 2020;**563**:122-130. DOI: 10.1016/j.jcis.2019.12.050 PMID: 31869583
- Chaurasia S, Mounika K, Bakshi V, Prasad V. 3-month parenteral PLGA microsphere formulations of risperidone: Fabrication, characterization and neuropharmacological assessments. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;**75**:1496-1505. DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.065 PMID: 28415443
- Kamali H, Khodaverdi E, Hadizadeh F, Mohajeri S. In-vitro, ex-vivo, and in-vivo evaluation of buprenorphine HCl release from an in situ forming gel of PLGA-PEG-PLGA using N-methyl-2-pyrrolidone as solvent. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;**96**:561-575. DOI: 10.1016/j.msec.2018.11.058 PMID: 30606566
- Liu Y, Tao W, Wen S, Li Z, Yang A, Deng Z, et al. In vitro CRISPR/Cas9 system for efficient targeted DNA editing. *mBio*. 2015;**6**(6):1714-1715. DOI: 10.1128/mBio.01714-15 PMID: 26556277
- Zhang P, Chen D, Tian Y, Li H, Gong T, Luo J, et al. Comparison of three in-situ gels composed of different oil types. *Int J Pharm*. 2020;**587**:119707. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119707 PMID: 32739391
- Said M, Elmenoufy GA. Evaluation of quetiapine fumarate and its solid lipid nanoparticles as antipsychotic drug in rat model of schizophrenia. *Biomedpress*. 2017;**4**(08):1480-1497.
- Gao P, Nie X, Zou M, Shi Y, Cheng G. Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system. *J Antibiot*. 2011;**64**(9):625-634. DOI: 10.1038/ja.2011.58 PMID: 21811264
- Liang X, Chen Y, Wu L, Maharjan A, Regmi B, Zhang J, et al. In situ hexagonal liquid crystal for intra-articular delivery of sinomenine hydrochloride. *Biomed Pharmacother*. 2019;**117**:108993. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108993 PMID: 31228805
- Ki MH, Lim JL, Ko JY, Park SH, Kim JE, Cho HJ, et al. A new injectable liquid crystal system for one month delivery of leuprolide. *J Control Release*. 2014;**185**:62-70. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.04.034 PMID: 24794897