

Biofarmaceutska karakterizacija in situ gelirajućeg sustava s flutikazonpropionatom na Calu-3 epitelnom staničnom modelu

Bobičanec, Stefanie

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:515374>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



Stefanie Bobičanec

**Biofarmaceutska karakterizacija *in situ*
gelirajućeg sustava s flutikazonpropionatom na
Calu-3 epitelnom staničnom modelu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmaceutika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Anite Hafner. Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-4592.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Aniti Hafner na prenesenom znanju, stručnom vodstvu, trudu i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem asistentici Lauri Nižić Nodilo, mag. pharm. na uloženom vremenu, trudu i savjetima oko izrade eksperimentalnog dijela ovog rada te svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.

Neizmjereno hvala cijeloj mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, ljubavi i razumijevanju tijekom cijelog života.

Hvala i svim mojim kolegama i prijateljima na potpori, ohrabrenjima i lijepim trenucima tijekom studiranja.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Nazalna primjena lijekova – mogućnosti i izazovi.....	1
1.2. Terapijski sustavi za nazalnu primjenu.....	3
1.3. Stanični modeli koji se koriste u ispitivanju biofarmaceutskih svojstava nazalnih terapijskih sustava <i>in vitro</i>	5
1.4. <i>In vitro</i> testovi za ispitivanje biokompatibilnosti	9
1.5. <i>In vitro</i> ispitivanje permeabilnosti.....	11
1.6. Flutikazonpropionat.....	13
2. Obrazloženje teme.....	15
3. Materijali i metode	17
3.1. Materijali.....	17
3.2. Metode.....	18
3.2.1. HPLC analiza	18
3.2.2. Priprava <i>in situ</i> gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom.....	19
3.2.3. Stanična linija i uvjeti uzgoja	19
3.2.4. Ispitivanje biokompatibilnosti <i>in situ</i> gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom <i>in vitro</i> ..	21
3.2.5. Ispitivanje permeabilnosti <i>in vitro</i>	23
4. Rezultati i rasprava.....	25
4.1. Validacija HPLC metode	25
4.2. Priprava <i>in situ</i> gelirajućih sustava flutikazonpropionata	26
4.3. Biokompatibilnost <i>in situ</i> gelirajućih sustava flutikazonpropionata.....	28
4.4. Ispitivanje permeabilnosti <i>in vitro</i>	30
5. Zaključci	35
6. Literatura.....	36
7. Sažetak/Summary	44

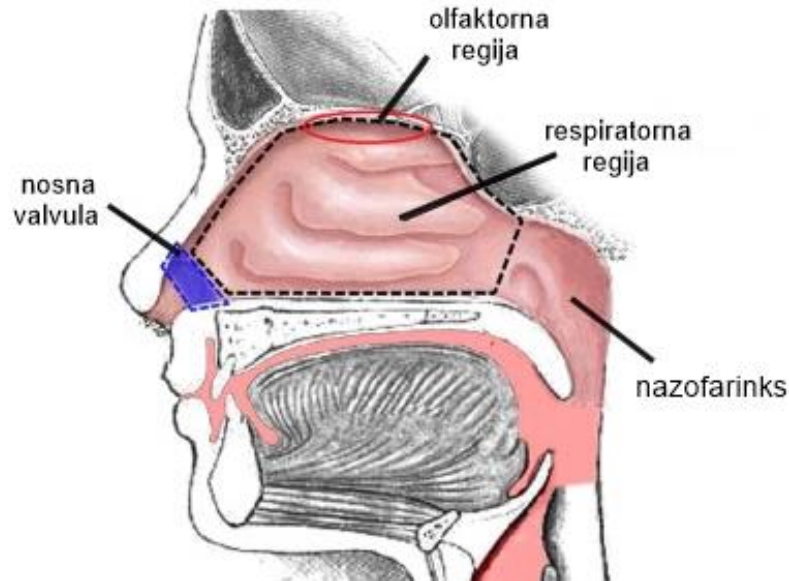
Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

1. Uvod

1.1. Nazalna primjena lijekova – mogućnosti i izazovi

Nazalna primjena lijekova uvelike je zastupljena u liječenju i prevenciji bolesti nosne sluznice kao što su alergijski rinitis, nosna kongestija ili infekcija (Hafner i sur., 2014). U novije vrijeme nazalna primjena istražuje se i kao novi put primjene lijekova različitog profila djelovanja s mnogo prednosti u odnosu na ostale putove primjene. Osim lijekova s lokalnim učinkom poput vazokonstriktora, antikolinergika, antihistaminika, antiseptika, antibiotika i kortikosteroida (Kublik i Vidgren, 1998; www.medicines.org.uk) te različitih bezreceptnih (engl. *Over-The-Counter*, OTC) pripravaka, na tržištu raste broj lijekova koji se primjenjuju nazalno s ciljem postizanja sistemske raspoloživosti/učinka. Primjeri takvih lijekova su zolmitriptan (Zomig[®]) i sumatriptan (Imitrex[®]) za liječenje migrene, fentanil (PecFent[®]) za liječenje probijajuće boli te estradiol hemihidrat (Aerodiol[®]) za liječenje simptoma menopauze (Illum, 2012). Nazalno se primjenjuju i peptidi, primjerice, kalcitonin (Miacalcin[®] nasal spray) za liječenje postmenopauzalne osteoporoze, desmopresin (Desmospray[®]) za liječenje nokturije te oksitocin (Syntocinon[®]) za poticanje izlučivanja majčinog mlijeka (Illum, 2012). Nazalna sluznica velike je površine (150 cm²) i dobre prokrvljenosti što može pridonijeti brzom apsorpciji lijekova (Mercier i sur., 2018; Tong i sur., 2016). Nazalnom primjenom lijeka zaobilazi se prvi prolazak kroz jetru te je za lijekove podložne metabolizmu u jetri bioraspoloživost nakon nazalne primjene veća u odnosu na biolaspoločivost oralno primijenog lijeka. Usto, nazalna primjena lijeka je neinvazivna te dobro prihvaćena od strane pacijenata (Mercier i sur., 2018).

Nazalni put primjene istražuje se i kao mogućnost zaobilaska krvno-moždane barijere pri čemu se lijek isporučuje izravno u mozak preko ogranaka olfaktornog i trigeminalnog živca u nosnoj šupljini (Slika 1.) (Katual i sur., 2017; Mainardes i sur., 2006).



Slika 1. Anatomija nosa (preuzeto i prilagođeno iz Tong i sur., 2016)

Osim navedenih prednosti, uz nazalnu primjenu vežu se i određeni izazovi koji usmjeravaju razvoj inovativnih nazalnih pripravaka (Tablica 1.).

Tablica 1. Prednosti i izazovi nazalne primjene lijekova (Davis i Illum 2003; Arora i sur., 2002)

PREDNOSTI	IZAZOVI
zaobilaznje prvog prolaska kroz jetru i enzimске razgradnje u probavnom sustavu pri sistemskeј dostavi lijeka	interindividualne razlike nazalne primjene
brza apsorpcija pri sistemskeј dostavi lijeka	efikasnost djelovanja lijeka ovisna o patološkim stanjima sluznice nosa
povećana bioraspoloživost	mukocilijarni klirens
neinvazivna primjena	anatomija nosa
mogućnost samostalne primjene	moguća iritacija uzrokovana djelatnom i pomoćnim tvarima
smanjenje mogućnosti predoziranja	
primjena lijekova različitog profila djelovanja	

Jedan od izazova pri nazalnoj primjeni lijeka predstavlja anatomija nosne šupljine (Slika 1.). Na ulazu u nosnu šupljinu nalazi se suženje u području nosne valvule s površinom presjeka od 3 cm² koje znatno otežava prolazak primijenjenog lijeka u većem obimu iza nosne valvule, odnosno u respiratornu regiju (Tong i sur., 2016; Mygind i Dahl, 1998). Jednako tako, različite bolesti sluznice nosa i kirurški zahvati mogu predstavljati problem učinkovitoj dostavi lijeka u ciljano područje uslijed promjene površine nazalne sluznice, uz stvaranje različitih suženja unutar nosnih hodnika respiratorne regije. Sljedeći limitirajući faktor predstavlja mukocilijarni klirens. Naime, trepetljikavi epitel unutar nosne šupljine služi kao obrambeni mehanizam koji svojim kretnjama uklanja strane čestice dospjele u nos prema stražnjem dijelu nosne šupljine, odakle prelaze preko nazofarinksa u probavni sustav (Inoue i sur., 2020). U razvoju inovativnih nazalnih pripravaka razmatra se mogućnost produljenja vremena zadržavanja na nosnoj sluznici mehanizmima mukoadhezivnosti i povećane viskoznosti, a također se svojstva pripravka moraju prilagoditi ograničenom kapacitetu nosne šupljine koja može primiti volumen od 25 µl do najviše 200 µl (Sousa i Castro, 2016; Arora i sur., 2002).

1.2. Terapijski sustavi za nazalnu primjenu

Za nadilaženje izazova postavljenih anatomijom i fiziologijom nosne šupljine, a kao rezultat povećanog interesa za nazalni put primjene lijekova, posljednjih su godina mnogobrojna istraživanja usmjerena na razvoj novih terapijskih sustava za nazalnu primjenu. Najzastupljeniji konvencionalni oblici za nazalnu primjenu lijekova su otopine i suspenzije. Problem takvih oblika je curenje iz nosa te refleksno „šmrncanje“ pri čemu lijek dospijeva u stražnje dijelove nosne šupljine, a posljedično preko nazofarinksa u probavni sustav gdje se apsorbira (Djupesland i sur., 2013).

S ciljem unaprjeđenja nazalne primjene lijekova, razvijeni su različiti terapijski sustavi poput liposoma, mikročestica (mikrosfera i mikrokapsula), nanočestica, nanoemulzija i *in situ* gelirajućih sustava.

a. Liposomi

Liposomi su vezikule sastavljene od jednog ili više fosfolipidnih dvoslojeva s hidrofilnom jezgrom. Budući da je membrana hidrofobna, a jezgra hidrofilna, liposomi mogu uklopiti i hidrofobne i hidrofilne lijekove, pri čemu hidrofobne molekule ulaze u dvoslojnu membranu, dok se hidrofilne smještaju u samu jezgru liposoma (Katual i sur., 2017). Zbog navedenih

svojstava, veličine samih vezikula i biokompatibilnosti, liposomi predstavljaju obećavajući terapijski sustav prikladan za mnoge strategije isporuke lijeka (Mainardes i sur., 2006).

b. Mikrosfere

Mikrosfere su sferične čestice mikrometarske veličine koje sadrže lijek dispergirani u polimernom matriksu. Polimeri koji se najčešće koriste u izradi mikrosfera kao nosača lijekova dobrih su bioadhezivnih svojstava te bubre u kontaktu s vodenim medijem stvarajući gel na površini sluznice, čime se produljuje zadržavanje lijeka na sluznici (Rathananand i sur., 2007).

c. Mikro kapsule

Mikro kapsule su sferične čestice mikrometarske veličine u kojima je lijek smješten u jezgri, a polimeri čine vanjsku ovojnicu. Polimerna ovojnica može djelovati kao propusna ili polupropusna membrana koja kontrolira oslobađanje lijeka (Lengyel i sur., 2019).

d. Nanočestice

Nanočestice su čestice veličine od 10 do 1000 nm, a dijele se na nanosfere i nanokapsule, ovisno o tome je li lijek dispergirani u polimernom matriksu (nanosfere) ili uklopljeni u jezgri čestice obavijene polimernom membranom (nanokapsule). Takvi sustavi omogućuju ciljanu dostavu i/ili produljeno oslobađanje lijeka, čime se povećava njegova bioraspodjeljivost na mjestu učinka i smanjuju nuspojave (Katual i sur., 2017).

e. Nanoemulzije

Nanoemulzije čine dvije tekuće faze koje se međusobno ne miješaju, pri čemu je unutarnja faza raspršena u vanjskoj kontinuiranoj fazi. Takav termodinamički nestabilan sustav stabiliziran je dodatkom različitih emulgatora (Jaiswal i sur., 2015). Zbog svoje lipofilne komponente i male veličine unutarnje faze, nanoemulzije predstavljaju sustave velikog potencijala za poboljšanje transporta lijeka kroz biološke barijere. Dodatak mukoadhezivnih pomoćnih tvari osigurava produljeno zadržavanje nanoemulzija na mjestu primjene (Katual i sur., 2017).

f. *In situ* gelirajući sustavi

In situ gelirajući sustavi tekući su farmaceutski oblici (otopine ili suspenzije) koji se kao takvi primjenjuju u nosnu šupljinu, a u dodiru s nosnom sluznicom geliraju stvarajući umreženi trodimenzionalni polimerni matriks uslijed nekog od fizioloških čimbenika poput promjene pH, temperature ili prisustva iona u nosnom fluidu (Kouchak, 2014). Formirani gel produljuje

vrijeme zadržavanja lijeka na nosnoj sluznici smanjenjem utjecaja mukocilijarnog klirensa i „curenja“ pripravka u prednji ili stražnji dio nosne šupljine (Nižić i sur., 2019).

1.3. Stanični modeli koji se koriste u ispitivanju biofarmaceutskih svojstava nazalnih terapijskih sustava *in vitro*

U procesu razvoja novih terapijskih sustava za nazalnu primjenu, opsežna fizičko-kemijska karakterizacija omogućuje probir onih s prepoznatim potencijalom za primjenu. *In vitro* biokompatibilnost razvijenih terapijskih sustava i permeabilnost uklopljenog lijeka ispituju se na staničnim modelima koji simuliraju fiziološka svojstva epitela sluznice nosa (Zhang i sur., 2016). U tu svrhu koriste se primarne stanice i imortalizirane stanične linije (Salade i sur., 2019). U Tablici 2. pregledno su prikazana ispitivanja terapijskih sustava na staničnim modelima relevantnim za nazalni put primjene.

Primarne nazalne epitelne stanice

Primarne nazalne epitelne stanice su stanice dobivene od donora koje su zatim kultivirane *in vitro* u definiranim uvjetima za *in vitro* uzgoj stanica. Ovisno o djelovanju lijeka koji se ispituje (lokalno, sistemski ili *nose-to-brain*) razlikuje se mjesto uzimanja uzorka iz nosne šupljine donora. Prednost ove kulture stanica je što one diferenciraju u tkivo s heterogenim staničnim sastavom histološki sličnim onom u nosnoj šupljini (Salade i sur., 2019) te predstavljaju najvjerniji *in vitro* model epitela dišnog sustava (Forbes, 2000), uz veću kliničku značajnost ispitivanja (Sousa i Castro, 2016). Nedostaci primarnih stanica su ograničena dostupnost tkiva, ograničeni broj subkultura, heterogenost unutar kulture i između kultura, značajan rizik od kontaminacije i upitna reproducibilnost ispitivanja (Salade i sur., 2019; Kreft i sur., 2014).

Problem ograničene dostupnosti tkiva nadilazi se komercijaliziranim modelima primarnih nazalnih epitelnih stanica poput MucilAir™. MucilAir™ je morfološki i funkcionalno diferenciran trodimenzionalni model epitelnih stanica dobiven od jednog ili više donora, uzgojen u ALI (engl. *Air-liquid interface*) uvjetima uzgoja, te se može nabaviti kao model nazalnih, trahealnih ili bronhalnih epitelnih stanica. Ovakav model može se koristiti u istraživanju patofiziologije nekih bolesti, ispitivanju metaboličke aktivnosti te transporta i biokompatibilnosti (www.epithelix.com).

Tablica 2. Pregled ispitivanja terapijskih sustava na primarnim nazalnim epitelnim stanicama i imortaliziranim staničnim linijama

		Terapijski sustav	Djelatna tvar	Ispitivanja	Literatura
Primarne nazalne epitelne stanice	<i>MucilAir</i> TM	nanočestice zlata	-	internalizacija čestica	Movia i sur., 2017
Imortalizirane stanične linije	<i>RPMI-2650</i>	mikročestice	ketoprofen	permeabilnost biokompatibilnost (MTT)	Gonçalves i sur., 2016
		nanočestice	titanijev dioksid	inkorporacija u stanice biokompatibilnost (MTT)	Tilly i sur., 2014
	<i>Caco-2</i>	<i>in situ</i> gelirajući sustav	deksametazon	permeabilnost biokompatibilnost (MTT)	Jurišić Dukovski i sur., 2017
		nanočestice	melatonin	permeabilnost biokompatibilnost (MTT, LDH)	Hafner i sur., 2009
	<i>16-HBE14o</i>	liposomi	-	permeabilnost biokompatibilnost (MTT)	Kudsova i Lawrence, 2007
		nanočestice	-	inkorporacija u stanice biokompatibilnost (LDH)	Brzoska i sur., 2004
	<i>Calu-3</i>	liposomi	grelin	permeabilnost	Salade i sur., 2018
		nanočestice	kumarin	biokompatibilnost (LDH, WST, ROS, GSH)	Shen i sur., 2011
		nanočestice	-	biokompatibilnost (MTT)	Sinani i sur., 2017
	<i>A549</i>	nanoemulzija	-	distribucija u stanice	Sravanthi i sur., 2015
<i>BEAS-2B</i>	nanočestice srebra	-	biokompatibilnost (ROS)	Kim i sur., 2011	

MTT-test redukcije 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolin bromida; LDH-test prisutnosti laktat dehidrogenaze; WST-test redukcije tetrazolijevih soli WST-1 i WST-8; ROS-test dokazivanja kisikovih reaktivnih spojeva; GSH-test dokazivanja glutaciona

Imortalizirane stanične linije

Alternativa primarnim stanicama su imortalizirane stanične linije. To su stanične linije najčešće dobivene iz tumorskih stanica. Mutacije i poremećaji u genetičkom nadzoru diobe stanica dovode do neograničenog rasta takve stanične linije, što ih čini prikladnima za korištenje u različitim istraživanjima (www.creative-bioarray.com). Njihova prednost je bolja standardizacija ispitivanja te jednostavnije korištenje u rutinskim ispitivanjima, budući da je lakši uzgoj stanica te održavanje kulture stanica dijeljenjem i presađivanjem (Mercier i sur., 2018; Kreft i sur., 2014). Uz navedeno, zbog gubitka u nadzoru diobe stanica, imortalizirane

stanice posjeduju sličan ili jednak fenotip i genotip u odnosu na roditeljske stanice (www.creative-bioarray.com).

Nekoliko je staničnih linija korištenih za ispitivanje lijekova/terapijskih sustava za nazalnu primjenu (Tablica 2.), a u nastavku su detaljnije opisane one najčešće korištene.

RPMI-2650

RPMI-2650 stanična linija potječe od anaplastičnih pločastih stanica karcinoma nosnog septuma te je time jedina stanična linija dobivena iz humanog nazalnog tkiva. Tijekom presađivanja i kontinuiranog uzgoja, stanična linija pokazuje visoku stabilnost bez promjena normalnog diploidnog kariotipa (Sibinovska i sur., 2019; Mercier i sur., 2018). Razlika između RPMI-2650 stanica i primarnih stanica nosnog epitela je odsustvo cilijarnih pokreta i višeslojni rast stanica, a sličnost pokazuju u stvaranju mukoznog materijala na staničnoj površini te postizanje integriteta nazalne barijere (Sibinovska i sur., 2019; Kreft i sur., 2014). Glavni nedostatak RPMI-2650 stanica leži u njihovoj slaboj sposobnosti diferencijacije (Mercier i sur., 2018). Svoju primjenu nalaze kod metaboličkih ispitivanja budući da pokazuju aktivnost aminopeptidaza usporedivu s aktivnošću u nazalnom tkivu (Sousa i Castro, 2016), a prikladne su i za ispitivanje permeabilnosti, nakon uzgoja stanične linije u ALI uvjetima uzgoja (Salade i sur., 2019; Sibinovska i sur., 2019).

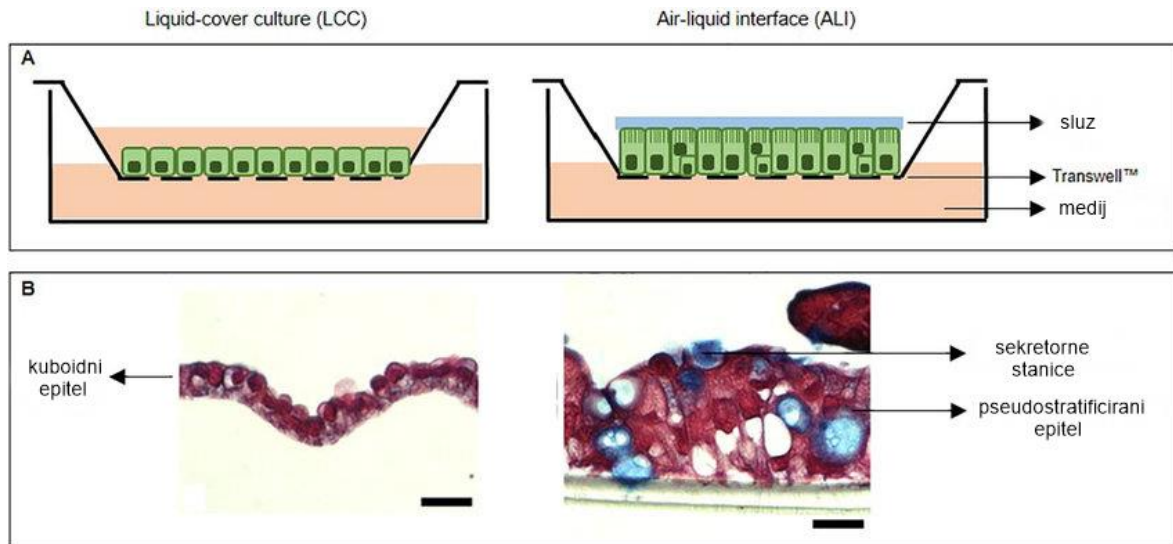
Calu-3

Calu-3 stanice izolirane su iz adenokarcinoma pluća i dijele se prema fenotipu na stanice s cilijarnim kretanjem i stanice koje izlučuju sluz. Zbog navedenih značajki, monosloj Calu-3 stanica morfološki je sličan nazalnom epitelu (Salade i sur., 2019; Sousa i Castro, 2016). Calu-3 stanice međusobno stvaraju čvrste spojeve, što ih čini prikladnima za ispitivanje permeabilnosti lijeka namijenjenog nazalnoj primjeni (Sinani i sur., 2017; Grainger i sur., 2006).

Calu-3 stanična linija može biti uzgojena temeljem dvaju različitih protokola, što rezultira razlikom u fenotipu stanica (Slika 2.). Po prvom protokolu, Calu-3 stanice se tijekom cijelog perioda uzgoja s obje strane drže u neposrednom kontaktu s tekućim medijem (engl. *Liquid-cover culture*, LCC), a po drugom protokolu, stanice se apikalnom stranom, nakon 24 sata uzgoja, izlažu zraku. Primijećeno je da ALI uzgoj Calu-3 stanica poboljšava ciliogenezu te povećava izlučivanje sluzi (Grainger i sur., 2006) uz poticanje diferenciranja i stvaranja

pseudostratificiranog staničnog sloja sličnog epitelu dišnih putova (Sousa i Castro, 2016; Kreft i sur., 2015; Ong i sur., 2013; Grainger i sur., 2006).

Calu-3 stanična linija korisna je za ispitivanja permeabilnosti i metabolizma lijekova (Cabrera-Perez i sur., 2016), a korištena je i u procjeni biokompatibilnosti različitih lijekova i pomoćnih tvari, istraživanju patofiziologije bolesti cistične fibroze te ispitivanju pulmonalne depozicije (Ihekwereme i sur., 2014; Ong i sur., 2013).



Slika 2. (A) Shematski prikaz promjene fenotipa stanica rastom u različitim uvjetima i (B) mikroskopski izgled Calu-3 stanica nakon tri tjedna uzgoja u različitim uvjetima (preuzeto i prilagođeno prema Lechanteur i sur., 2018)

Caco-2

Caco-2 stanična linija dobivena je iz kolorektalnog adenokarcinoma, a primjenjuje se kao stanični model za ispitivanje permeabilnosti, jer dobiveni rezultati dobro koreliraju s rezultatima ispitivanja u ljudi. U *in vitro* uzgojenim kulturama uspostavlja se polarizirani monosloj s karakteristikama enterocita tankog crijeva. Osim u ispitivanjima permeabilnosti oralno primijenjenog lijeka, nalazi svoju primjenu i u *in vitro* ispitivanjima permeabilnosti nazalno primijenjenog lijeka budući da je dokazana dobra povezanost između nazalne apsorpcije i permeabilnosti kroz Caco-2 stanični monosloj (Furubayashi i sur., 2020; Furubayashi i sur., 2007).

16-HBE14o stanična linija dobivena je izolacijom stanica iz ljudskog bronhalnog epitela, a čini je monosloj stanica s mikrovilima i cilijama. Stanice međusobno tvore čvrste spojeve (engl. *tight junctions*), uske prolaze (engl. *gap junctions*) i visoko organizirane aktinske filamente (Sousa i Castro, 2016). Koristi se u ispitivanju transporta lijeka i terapijskog sustava isporuke gena (Forbes, 2000).

1.4. *In vitro* testovi za ispitivanje biokompatibilnosti

In vitro testovi biokompatibilnosti omogućuju uspješan i jednostavan probir tvari i terapijskih sustava s potencijalom za daljnji razvoj i primjenu, smanjujući uporabu laboratorijskih životinja. Ispitivanje se može provesti na svim primarnim stanicama i imortaliziranim staničnim linijama (Tablica 2.). Biokompatibilnost/toksičnost terapijskih sustava može se ispitati *in vitro* različitim testovima poput MTT testa (test redukcije 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolin bromida), Neutral red testa, LDH testa (test prisutnosti laktat dehidrogenaze), resazurin i WST testa (test redukcije tetrazolijevih soli WST-1 i WST-8), zatim detekcijom kaspaza, reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i glutationa (GSH) u stanicama (Rotoli i sur., 2015; Scherließ, 2011; Shen i sur., 2011; Yang i sur., 2009). U nastavku su opisani najčešće primijenjivani testovi.

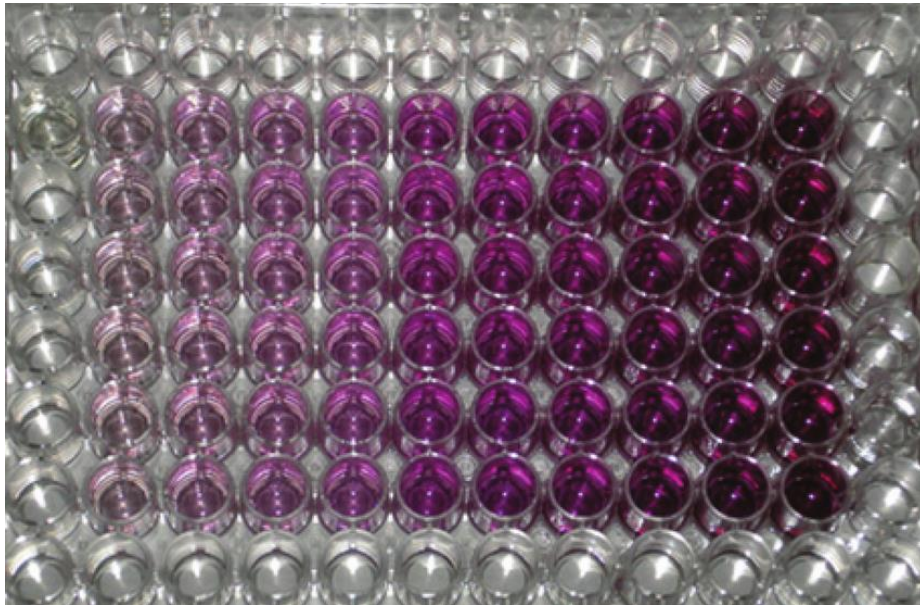
MTT test

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolin bromid] test je kolorimetrijski test za ispitivanje metaboličke aktivnosti stanica. Princip testa temelji se na redukcijskoj sposobnosti metabolički aktivnih stanica pomoću NAD(P)H – ovisne oksidoreduktaze, pri čemu žuti MTT reagens prelazi u ljubičaste, u vodi netopljive, kristale formazana. Kristali formazana topljivi su u organskom otapalu, a intenzitet obojenja otopine proporcionalan je koncentraciji nastalnog formazana (Slika 3.), odnosno metaboličkoj aktivnosti stanica (Scherließ, 2011).

Neutral red test

Neutral red test temelji se na svojstvu živih stanica da inkorporiraju i vežu neutralnu crvenu boju. Ova slabo pozitivno nabijena crvena boja (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) prolazi staničnu membranu neionskom pasivnom difuzijom i koncentrira se u

lizosomima gdje se elektrostatski hidrofobnim vezama veže za anionske skupine lizosomalnog matriksa. Boja se zatim ekstrahira iz stanica kiselom etanolnom otopinom te kvantificira spektrofotometrijski. Intenzitet obojenja proporcionalan je vijabilnosti stanica (Repetto i sur., 2008).



Slika 3. Intenzitet obojenja ovisan o koncentraciji nastalog formazana tijekom ispitivanja metaboličke aktivnosti stanica MTT testom (slika preuzeta iz Barkhordari i sur, 2014)

LDH test

LDH test temelji se na ispitivanju prisutnosti laktat dehidrogenaze (LDH) izvan stanica. Naime, LDH enzim nalazi se u citosolu živih stanica. Oštećenje membrane stanica rezultira izljevanjem sadržaja citosola u stanični medij, uključujući LDH enzim, pri čemu veća koncentracija LDH u staničnom mediju ukazuje na veće oštećenje stanica. Za detekciju LDH enzima u staničnom mediju koristi se njegova sposobnost konvertiranja laktata u piruvat, pri čemu NAD prelazi u NADH/H⁺. Nastajanje reduciranog oblika (NADH/H⁺) može se pratiti kontinuiranim mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm (Yang i sur., 2009).

Mjerenje unutarstaničnog ROS

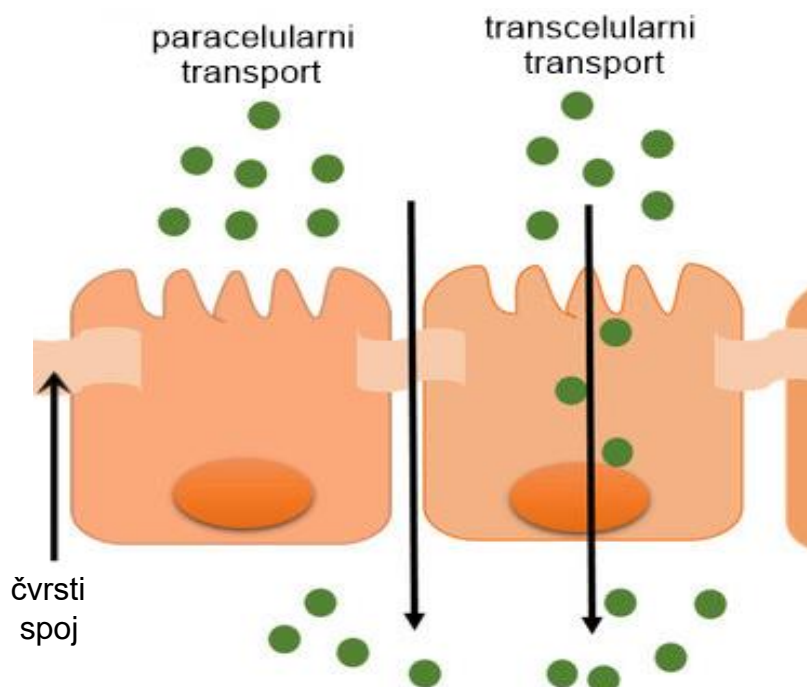
Unutarstanični kisikovi reaktivni spojevi (ROS) određuju se pomoću 2,7-diklorofluorescein diacetata (DCFH-DA). DCFH-DA prolazi staničnu membranu pasivnom difuzijom, te reagira s ROS molekulama pri čemu nastaje visoko fluorescentni spoj diklorofluorescein (DCF). Fluorescencija se zatim određuje fluorospektrofotometrom (Yang i sur., 2009).

WST test

WST test je kolorimetrijski test koji se temelji na redukciji tetrazolijevih soli u formazan pomoću stanične dehidrogenaze u metabolički aktivnih stanica. WST-1 tetrazolijeva sol prelazi iz svijetlo crvene u tamno crveni formazan s maksimalnom apsorbancijom pri valnoj duljini od 440 nm (www.sigmaaldrich.com). WST-8 tetrazolijeva sol prelazi iz blijedo žute u narančasti formazan s maksimalnom apsorbancijom pri valnoj duljini od 450 nm (www.promocell.com).

1.5. *In vitro* ispitivanje permeabilnosti

Ispitivanje permeabilnosti djelatne tvari uklopljene u terapijski sustav kroz stanični model epitelne barijere *in vitro* važan je vid biofarmaceutske karakterizacije tijekom razvoja terapijskog sustava. Transport lijeka može biti transcelularni ili paracelularni (Slika 4.), ovisno o lipofilnosti lijeka. Transcelularni put karakterističan je za lipofilne molekule i odvija se pasivnom difuzijom, aktivnim transportom pomoću transportera ili endocitozom. Paracelularni put vodi preko čvrstih međustaničnih spojeva i karakterističan je za hidrofilne molekule koje se kreću niz koncentracijski gradijent (Cabrera-Perez i sur., 2016; Sousa i Castro, 2016).



Slika 4. Paracelularni i transcelularni transport lijeka (preuzeto i prilagođeno iz Mohammed i sur., 2017)

Modeli za ispitivanje permeabilnosti mogu biti dobiveni iz tkiva animalnog ili humanog porijekla (lat. *ex vivo*), ili temeljeni na uzgojenim stanicama u kulturi (lat. *in vitro*) (Salade i sur., 2019; Sousa i Castro, 2016). Ispitivanje se provodi na konfluentnom sloju stanica na polupropusnim nosačima koji omogućuju transport molekula s apikalne na bazolateralnu stranu i obratno (Sousa i Castro, 2016; Forbes, 2000). Najčešće korišteni nosači su Transwell® umetci (Sousa i Castro, 2016). Ispitivanje se provodi ravnomjernim nanošenjem terapijskog sustava na apikalnoj strani monosloja stanica bez narušavanja integriteta staničnog sloja. Integritet staničnog sloja praćen je određivanjem transepitelnog električnog otpora (engl. *transepithelial electrical resistance*, TEER), uz pomoć sljedeće jednačbe (Salade i sur., 2019):

$$TEER (\Omega * cm^2) = otpor (\Omega) \times površina membrane Transwell umetka (cm^2)$$

Na integritet stanica utječu protokoli rada s kulturom stanica, gustoća nasađivanja te broj subkulture stanica, kao i karakteristike formulacije poput sastava, pH i osmolalnosti (Bunchongprasert i Shao, 2020). Zbog navedenog, otpor staničnog sloja ionskom toku mjeri se prije, tijekom te nakon ispitivanja permeabilnosti.

Terapijski sustav se prije nanošenja na apikalnu stranu monosloja (donorski odjeljak) miješa s određenim volumenom transportnog medija definiranog pH. U receptorski odjeljak, s bazolateralne strane monosloja stanica, stavlja se isti transportni medij. Ovisno o očekivanoj permeabilnosti djelatne tvari koja se ispituje, u definiranim vremenskim intervalima kroz određeni period uzimaju se uzorci transportnog medija iz receptorskog odjeljka, a volumen uzetog uzorka nadomješta se transportnim medijem. Količina permeirane djelatne tvari određuje se prikladnom analitičkom metodom. Na temelju izmjerenih vrijednosti izračunava se prividni koeficijenti permeabilnosti djelatne tvari prema sljedećoj jednačbi:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt \times A \times C_0}$$

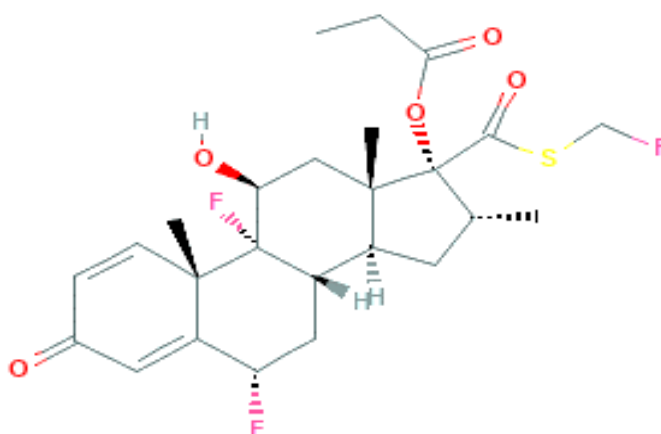
pri čemu je dQ/dt brzina permeacije lijeka kroz monosloj stanica, A površina monosloja (Transwell® umetka), C_0 početna koncentracija lijeka u donorskom odjeljku (Sousa i Castro, 2016).

Pregled literature ukazuje na upotrebu različitih medija za *in vitro* ispitivanje permeabilnosti. Najčešće korišteni transportni medij je pufer HBSS (engl. *Hank's balanced salt solution*), a koriste se još pufer DPBS (engl. *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) te sami mediji za uzgoj stanica (Bunchongprasert i Shao, 2020; Furubayashi i sur., 2020; Sibinovska i sur., 2019; Kreft i sur., 2014; Hafner i sur., 2009).

In vitro ispitivanja permeabilnosti uglavnom pokazuju dobru korelaciju *in vivo-in vitro*, iako su uočene razlike u rezultatima kada su ispitivanja provedena na različitim *in vitro* modelima i/ili u različitim laboratorijima (Cabrera-Perez i sur., 2016). S ciljem minimiziranja razlika važno je definirati uvjete uzgoja i protokole rada s pojedinim staničnim linijama kako bi se dobili reproducibilni rezultati (Sousa i Castro, 2016). Unatoč razlikama u rezultatima, *in vitro* ispitivanjima daje se prednost pred *in vivo* ispitivanjima na laboratorijskim životinjama, jer osim etičke prihvatljivosti imaju i druge prednosti: (i) potrebna je manja količina lijeka za ista ispitivanja, (ii) pružaju mogućnost ispitivanja više uzoraka, (iii) pružaju mogućnost ispitivanja mehanizma transporta i metabolizma, te na kraju (iv) jednostavnija su, reproducibilnija i jeftinija od *in vivo* ispitivanja permeabilnosti (Cabrera-Perez i sur., 2016).

1.6. Flutikazonpropionat

Flutikazonpropionat (Slika 5.) je kortikosteroid ATK šifre R01AD08, što ga svrstava u nazalne dekonjestive za lokalnu primjenu, u svrhu liječenja bolesti nosa. Flutikazonpropionat koristi se u nazalnim pripravcima za profilaksu i liječenje sezonskog alergijskog rinitisa i cjelogodišnjeg alergijskog rinitisa, sam ili u kombinaciji s antihistaminikom, te za redovitu terapiju u bolesnika s nosnim polipima (Tablica 3.).



Slika 5. Struktura flutikazonpropionata (www.pubchem.com)

Nalazi svoju širu primjenu u terapiji astme. Mehanizam djelovanja temelji se na agonističkom djelovanju na glukokortikoidne receptore (www.pubchem.com). Mnogo je nuspojava s kojima se povezuje kod sistemske primjene, no pri nazalnoj primjeni minimalan je rizik sistemskih nuspojava kako je sistemska bioraspodijelivost svega 0,06 % (SPC Flixonase). Od lokalnih nuspojava moguće su epistaksa, iritacija grla i nosa, suhoća grla i nosa, glavobolja, neugodan okus i miris. Svi nazalni pripravci flutikazonpropionata odobreni u RH formulirani su u obliku suspenzije, a primjenjuju se kao sprej ili kapi za nos (www.halmed.hr).

Tablica 3. *Nazalni pripravci flutikazonpropionata odobreni u RH*

Tržišno ime lijeka	Djelatna tvar	Farmaceutski oblik
Flixonase	flutikazonpropionat	suspenzija (sprej i kapi za nos)
Rinoco	flutikazonpropionat	suspenzija (sprej za nos)
Synaze	flutikazonpropionat + azelastin hidroklorid	suspenzija (sprej za nos)
Dymista	flutikazonpropionat + azelastin hidroklorid	suspenzija (sprej za nos)

2. Obrazloženje teme

Alergijski rinitis, rinosinitis i nosne polipoze predstavljaju veliki zdravstveni problem na globalnoj razini. S obzirom da je u osnovi tih bolesti upala nazalne sluznice, u njihovom liječenju indicirana je primjena nazalnih kortikosteroida (Gelardi i sur., 2013.; Cantone i Iengo, 2016.). Svi odobreni pripravci nazalnih kortikosteroida u Republici Hrvatskoj u obliku su suspenzije (www.halmed.hr). Konvencionalni tekući oblici podložniji su djelovanju mukocilijarnog klirensa, refleksnom šmrcaju ili curenju iz nosa (Inoue i sur., 2020; Djupesland i sur., 2013). Iz navedenog razloga, suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj *in situ* gelirajućih sustava koji uslijed geliranja na mjestu primjene omogućuju dulje zadržavanje na sluznici nosa (Nižić i sur., 2019). *In situ* gelirajući sustav za nazalnu primjenu raspršuje se u nosnu šupljinu kao tekući farmaceutski oblik (otopina ili suspenzija), a u dodiru s nosnom sluznicom prelazi u gel.

U procesu razvoja novih terapijskih sustava, provodi se sveobuhvatna fizičko-kemijska karakterizacija, s ciljem probira onih s najvećim potencijalom za primjenu. U ranim fazama istraživanja provode se i *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti i permeabilnosti na staničnim modelima koji simuliraju uvjete barijere epitelnih stanica (Zhang i sur., 2016). Calu-3 stanice adenokarcinoma pluća prikladne su za provođenje ispitivanja terapijskih sustava za nazalnu primjenu. Calu-3 stanice međusobno stvaraju čvrste spojeve (Sinani i sur., 2017; Grainger i sur., 2006) čineći monosloj koji pokazuje morfološku sličnost epitelu nosne sluznice (Salade i sur., 2019).

Cilj ovog rada je pripremiti *in situ* gelirajuće sustave s flutikazonpropionatom koji sadrže površinski aktivnu tvar polisorbat 80, polimere pektin, natrijev hijaluronat i gelan gumu te manitol kao sredstvo za izotonizaciju i ispitati njihovu biokompatibilnost te permeabilnost uklopljenog flutikazonpropionata korištenjem Calu-3 epitelnog staničnog modela. Planirana ispitivanja nastavak su na istraživanje Nižić i suradnika (2019) prema kojem su se isti sustavi pokazali prikladnima za nazalnu primjenu prema osmolalnosti, reološkim svojstvima, kutu raspršenja i profilu nazalne depozicije *in vitro* (Nižić i sur., 2019). Ispitivanja biokompatibilnosti i permeabilnosti na staničnom modelu *in vitro* predstavljaju daljnji korak u razvoju formulacije.

Specifični ciljevi:

- Pripraviti *in situ* gelirajuće sustave s flutikazonpropionatom različitog sadržaja polisorbata, natrijevog hijaluronata i/ili gelan gume
- Ispitati biokompatibilnost pripremljenih *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom *in vitro* na Calu-3 epitelnom staničnom modelu
- Ispitati permeabilnost flutikazonpropionata iz pripremljenih *in situ* gelirajućih sustava kroz Calu-3 stanični monosloj

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Tijekom eksperimentalnog rada za pripremu *in situ* gelirajućih sustava korišteni su flutikazonpropionat (Carbosynth Ltd, UK), polisorbitat 80 (Sigma-Aldrich, SAD), niskometoksilirani amidirani pektin CF 025, stupnja esterifikacije 23-28% i stupnja amidacije 22-25% (Herbstreith & Fox, Njemačka), natrijev hijaluronat molekulske mase 0,8 MDa (Contipro, Češka) i gelan guma (Phytagel, Sigma-Aldrich, SAD). Za izotonizaciju sustava korišten je D(-)manitol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka), a pH je podešen pomoću 0,1 M otopine NaOH (Kemig, Hrvatska).

Za ispitivanje biokompatibilnosti pripremljenih sustava korištena je humana stanična linija adenokarcinoma pluća (Calu-3; ATCC[®] HTB-55[™], ATCC, SAD) za čiji je uzgoj korišten Eagleov minimalni esencijalni medij (engl. *Eagle's Minimum Essential Medium*, EMEM) (ATCC[®], SAD) uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (engl. *foetal bovine serum*, FBS; Sigma-Aldrich, SAD) i antibiotika penicilina i streptomicina (Capricorn Scientific GmbH, Njemačka). Za odvajanje stanica od podloge korištene su otopine tripsina (0,25%, *m/m*; Capricorn Scientific GmbH, Njemačka) i EDTA (0,5 mM; Lonza Group Ltd, Švicarska). Za pripremu mobilne faze tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) dobavljeni su acetonitril (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific, SAD), metanol (J. T. Baker[™], VWR International Ltd., UK), amonijev dihidrogenfosfat (NORMAPUR[®] BDH Prolabo[®], VWR International Ltd., UK) i otopina fosforne kiseline (0,1 M; Lach-Ner, Češka).

Pufer balansiran Hankovim solima (engl. *Hank's balanced salt solution*, HBSS) pH 7,4, uz dodatak 5,3 mM Ca²⁺ (HBSS-Ca²⁺) pripremljen je otapanjem KCl (5,37 mM), NaHCO₃ (4,17 mM), NaCl (136,89 mM), D-glukoza monohidrata (5,55 mM) (svi dobavljeni od Kemig, Hrvatska), KH₂PO₄ (0,44 mM) (Kemika, Hrvatska), Na₂HPO₄ × 2H₂O (0,34 mM) (Fluka Chemie AG, Švicarska) i CaCl₂ × 2H₂O (5,3 mM) (Sigma-Aldrich, Njemačka) u redestiliranoj vodi. Za ispitivanje biokompatibilnosti pripremljenih sustava korišten je 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid (MTT; Sigma Aldrich, Njemačka).

3.2. Metode

3.2.1. HPLC analiza

Za kvantitativno određivanje sadržaja flutikazonpropionata korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Korišten je kromatografski sustav za analizu Agilent 1200 Series opremljen detektorom s nizom dioda (engl. *diode-array detector*, Agilent, SAD) i kolonom Kinetex C18, promjera pora 2,6 µm, dimenzije 100 × 4,6 mm, 100 Å (Phenomenex, SAD).

Fosfatni pufer korišten za izradu mobilne faze pripremljen je otapanjem 1,15 g amonijevog dihidrogenfosfata u 1000 ml deionizirane vode te je dodatkom fosforne kiseline (0,1 M) pH podešen na 3,5 mjerenjem uz pomoć pH-metra (Mettler Toledo, SAD). Tako pripremljen pufer podvrgnut je ultrafiltraciji na uređaju Büchi Rotavapor R-200 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska) kroz filter od regenerirane celuloze veličine pora 0,20 µm (Sartorius GmbH, Njemačka) pri sniženom tlaku. Mobilna faza je zatim pripremljena miješanjem acetonitrila, metanola i fosfatnog pufera (pH 3,5) u volumnom omjeru 50:15:35. Prije upotrebe mobilna faza je degazirana.

Za izradu baždarnog pravca pripremljena je osnovna standardna otopina flutikazonpropionata koncentracije 1000 µg/ml, otapanjem 50 mg flutikazonpropionata u metanolu u odmjernoj tikvici od 50,0 ml. Iz osnovne standardne otopine pripremljene su radne standardne otopine u koncentraciji od 1, 3, 5, 10, 15, 20 i 30 µg/ml. Pripremljene otopine filtrirane su kroz filter pora 0,22 µm (Chromafil® Xtra PES-22/25, Macherey-Nagel GmbH & Co, Njemačka) te injektirane u volumenu od 100 µl. Mjerenje je provedeno u triplicatu za svaku pripremljenu radnu standardnu otopinu.

Iz dobivenih površina pikova radnih standardnih otopina u ovisnosti o njihovoj koncentraciji određena je jednadžba regresijskog pravca. Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) i granica određivanja (engl. *limit of quantification*, LOQ) izračunate su prema sljedećim jednadžbama (Sengül, 2016):

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{s}$$

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

σ – standardna devijacija linearnog regresijskog pravca; s – nagib regresijskog pravca

Parametri analize flutikazonpropionata su sljedeći: izokratni protok 1 ml/min, tlak 232-240 bara, temperatura kolone 40°C te vrijeme analize 7 minuta. Flutikazonpropionat detektiran je pri valnoj duljini od 236 nm, s retencijskim vremenom 2,9 minuta.

3.2.2. Priprava *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom

Za izradu *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom pripravljene su inicijalne otopine polimera pektina, gelan gume i natrijeva hijaluronata, redom pri koncentracijama od 1,4 % (*m/m*), 0,6% (*m/m*) i 0,5% (*m/m*). Navedene otopine pripremljene su otapanjem krutina u pročišćenoj vodi uz miješanje na magnetskoj miješalici. Pripremljena otopina pektina je profiltrirana. Za otapanje gelan gume pročišćena voda zagrijana je na temperaturu od 80°C.

U svrhu izrade *in situ* gelirajućih sustava, pripravljene su smjese otopina polimera prema Tablici 4., uz miješanje na magnetskoj miješalici. Za svaki uzorak A-F, flutikazonpropionat je rastavljen s polisorbatom 80 pomoću staklenog štapića. Pripravljenoj smjesi lijeka i površinski aktivne tvari postupno je dodana smjesa otopina polimera uz neprestano miješanje. Pripravljene sustavi potom su izotonizirani dodatkom manitola pri koncentraciji od 4% (*m/m*), a pH vrijednost prilagođena je na $6,0 \pm 0,1$ dodatkom 0,1 M NaOH.

Tablica 4. Sastav *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom

Uzorak	Flutikazonpropionat (%; <i>m/m</i>)	Polisorbat 80 (%; <i>m/m</i>)	Pektin (%; <i>m/m</i>)	Natrijev hijaluronat (%; <i>m/m</i>)	Gelan guma (%; <i>m/m</i>)
A	0,058	0,031	0,66	0,05	-
B	0,058	0,031	0,66	-	-
C	0,058	0,031	0,66	0,05	0,1
D	0,058	0,031	0,66	0,05	0,2
E	0,058	0,01	0,66	0,05	-
F	0,058	0,05	0,66	0,05	-

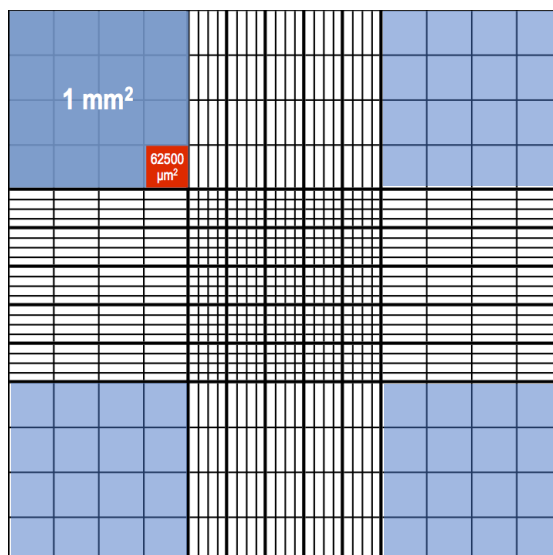
3.2.3. Stanična linija i uvjeti uzgoja

U radu je korištena humana stanična linija adenokarcinoma pluća Calu-3 (ATCC® HTB-55™). Stanice su uzgojene u skladu s protokolom kojeg preporučuje proizvođač te su nasadene u sterilnim uvjetima u tikvicama za uzgoj od 25, 75 i 150 cm². Uzgajane su u

inkubatoru (Sanyo CO₂ incubator, Japan) pri 37°C, 5% CO₂ i 95% relativne vlažnosti. Za uzgoj Calu-3 stanica korišten je hranidbeni medij koji je pripremljen prema Sinani i suradnicima (2017) dodatkom 10% FBS-a i 1% antibiotika penicilina/streptomicina u medij EMEM (Sinani i sur., 2017). Hranidbeni medij mijenjan je svakih 48-72 sata za osiguravanje optimalnog rasta stanica i istovremenog uklanjanja mrtvih stanica koje se nalaze u mediju, odvojene od podloge. Konfluentnost stanica kontrolirana je svakodnevno invertnim mikroskopom (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka).

Nakon postizanja 80-90% konfluentnosti, stanice su presađivane u nove tikvice. Prilikom presađivanja hranidbeni medij je odsisan, a stanicama je dodana smjesa otopina tripsina 0,25 % (*m/m*) i 0,5 mM EDTA. Stanice su zatim inkubirane u periodu od 10 minuta pri 37°C i 5% CO₂. Nakon odvajanja stanica od podloge učinak tripsina inhibiran je dodatkom hranidbenog medija u volumnom omjeru 1:1 u odnosu na smjesu otopina tripsina i EDTA. Suspenzija stanica iz tikvice prebačena je u kivetu za centrifugu (Falcon[®], Corning Costar Inc, SAD) te centrifugirana 6 minuta pri 100 × g (Eppendorf[®] centrifuge, Sigma-Aldrich, Njemačka). Supernatant je uklonjen sterilnom staklenom pipetom (Falcon[®], Corning Costar Inc, SAD), a stanice resuspendirane u hranidbenom mediju. Količina hranidbenog medija za resuspendiranje stanica ovisila je o omjeru dijeljenja stanica.

Za provođenje ispitivanja biokompatibilnosti i permeabilnosti pripremljenih *in situ* gelirajućih sustava, Calu-3 stanice nasadene su redom na ploče s 96 jažica (Corning Costar Inc, SAD) i Transwell[®] polikarbonatne membrane srednje veličine pora 0,4 μm i površine 1,12 cm² (Corning Costar Inc, SAD), u potrebnom broju. Metoda brojanja stanica pomoću hemocitometra pogodna je za određivanje koncentracije stanica u suspenziji stanica. Hemocitometar je stakalce s 9 jednako velikih kvadrata, koji su podijeljeni u manje kvadratiće ili pravokutnike (Slika 6.). U ovom radu za brojanje stanica korišteni su kvadrati u uglovima, koji sadrže 16 pravilnih manjih kvadrata. Stanice su izbrojene koristeći invertni mikroskop (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka).



Slika 6. Hemocitometar (preuzeto i prilagođeno s www.hemocytometer.org)

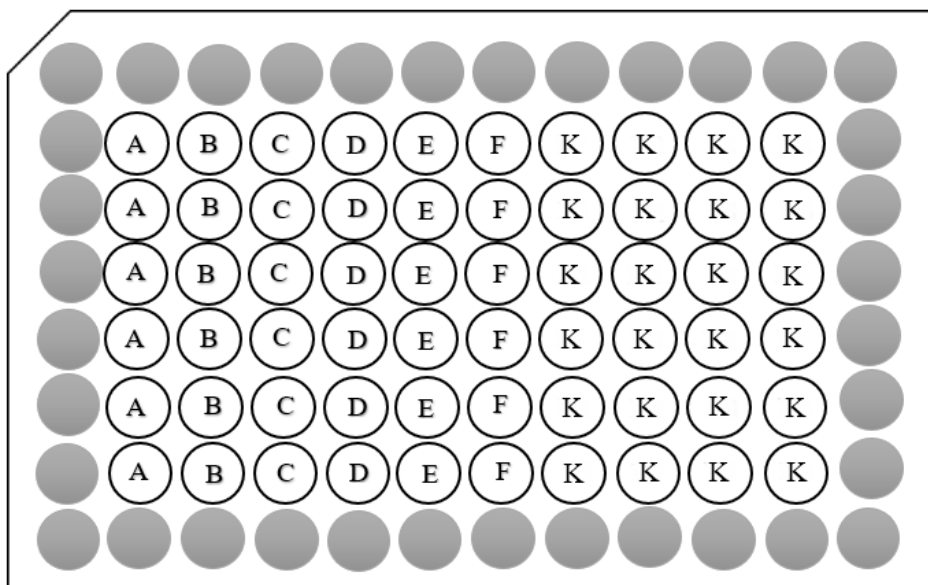
Koncentracija stanica u mediju određena je na sljedeći način:

$$\text{broj stanica u ml} = \text{prosjeak broja stanica u 4 plava kvadrata} \times 10^4$$

pri čemu je volumen kocke čija je baza plavi kvadrat jednak $0,1 \text{ mm}^3$. Ovisno o koncentraciji stanica u suspenziji te potrebnoj koncentraciji stanica u pojedinoj jažici, suspenzija stanica je razrijeđena ili ukoncentrirana ponovnim centrifugiranjem te resuspendiranjem u manjoj količini hranidbenog medija (www.vanderbilt.edu).

3.2.4. Ispitivanje biokompatibilnosti *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom *in vitro*

U svrhu određivanja biokompatibilnosti *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom, Calu-3 stanice nasadene su na ploču s 96 jažica (Corning Costar Inc, SAD) pri gustoći od 4×10^4 stanica/jažici. Do postizanja odgovarajuće konfluentnosti bilo je potrebno 48 sati, nakon čega je hranidbeni medij uklonjen, a stanice isprane puferom HBSS- Ca^{2+} . *In situ* gelirajući sustavi pomiješani su s puferom HBSS- Ca^{2+} u volumnom omjeru 1:1. Tako pripremljeni uzorci su prema Slici 7. nanoseni u odgovarajuće jažice ploče.



Slika 7. Shematski prikaz ploče s 96 jažica i redosljed tretiranja Calu-3 stanica ispitivanim *in situ* gelirajućim sustavima pomiješanim s HBSS-Ca²⁺puferom u volumnom omjeru 1:1 (A-F) te samim HBSS-Ca²⁺puferom (K)

U određeni broj jažica nanesen je sami pufer HBSS-Ca²⁺. Stanice su potom inkubirane 2 sata pri 37°C i 5% CO₂. Po isteku vremena inkubiranja stanice su isprane puferom HBSS-Ca²⁺ i inkubirane uz dodatak hranidbenog medija 24 sata pri 37°C i 5% CO₂, nakon čega je rađeno ispitivanje vijabilnosti stanica MTT testom. Kontrolu (K) su predstavljale stanice tretirane samim puferom HBSS-Ca²⁺.

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) test je kolorimetrijski test za ispitivanje metaboličke aktivnosti stanica. Otopina MTT reagensa pri koncentraciji od 5 µg/ml pripravljena je otapanjem MTT reagensa u fosfatnom puferu pH 7,4 (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) miješanjem na Vortex miješalici te je dodana u jažice sa stanicama u omjeru prema hranidbenom mediju od 1:10 (10 µl otopine prema 100 µl medija).

Stanice su inkubirane 3 sata pri 37°C. Nakon inkubacije, reagens je uklonjen, a nastali kristalići formazana otopljeni su dodatkom 25 µl izopropanola.

Apsorbancija otopine kristala formazana određena je pri valnoj duljini od 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Multilabel counter VICTOR3, PerkinElmer, SAD). Vijabilnost stanica izračunata je prema jednadžbi:

$$\text{Vijabilnost (\%)} = \frac{A(\text{uzorka}) - A(\text{izopropanol})}{A(\text{kontrola}) - A(\text{izopropanol})} \times 100$$

pri čemu je A(uzorka) apsorbancija otopine kristala formazana nastalih u stanicama tretiranim ispitivanim uzorcima, A(kontrola) apsorbancija otopine kristala formazana nastalih u kontrolnim (netretiranim) stanicama (stanicama izloženim puferu HBSS-Ca²⁺) te A(izopropanol) apsorbancija čistog izopropanola.

3.2.5. Ispitivanje permeabilnosti *in vitro*

Za ispitivanje permeabilnosti, Calu-3 stanice nasadene su na Transwell[®] polikarbonatne membrane srednje veličine pora 0,4 μm i površine 1,12 cm² (Corning Costar Inc., SAD). Stanice su nasadene pri gustoći od 5,5×10⁵ stanica po membrani, i inkubirane uz 500 μl hranidbenog medija u apikalnom (donorskom) odjeljku i 1500 μl u bazolateralnom (receptorskom) odjeljku Transwell[®] sustava. Nakon 48 sati, hranidbeni medij je odsisan iz donorskog i receptorskog odjeljka, te je dodano 800 μl svježeg hranidbenog medija u receptorski odjeljak. Donorski odjeljak ostao je prazan, čime su stanice s apikalne strane ostale izložene zraku. Medij u receptorskom odjeljku mijenjan je svakih 48-72 sata. Rast stanica praćen je mjerenjem transepitelnog električnog otpora (engl. *transepithelial electrical resistance*, TEER) pomoću epitelnog volt/ohm metra Millicell[®] ERS-2 (Merck KGaA, Njemačka). Otpor je izmjereno na 3 različita mjesta u svakoj jažici te je praćena prosječna vrijednost. Postizanje platoa u TEER vrijednosti označava potpunu konfluentnost. Za postizanje potpune konfluentnosti stanica bilo je potrebno 13-16 dana, nakon čega je ispitana permeabilnost flutikazonpropionata iz *in situ* gelirajućeg sustava kroz Calu-3 stanični monosloj u receptorski medij.

Nakon postignute konfluentnosti stanice su prvo isprane HBSS-Ca²⁺ puferom. Za ispitivanje permeabilnosti *in situ* gelirajući sustavi A, C, E i F pomiješani su s puferom HBSS-Ca²⁺ na magnetskoj miješalici u volumnom omjeru 1:1 do ukupnog volumena od 500 μl te su nanoseni u donorski odjeljak. U receptorski odjeljak nanoseno je 1500 μl HBSS-Ca²⁺. Ispitivanje svakog *in situ* gelirajućeg sustava provedeno je u duplikatu uz sami pufer HBSS-Ca²⁺ kao kontrolu. Transwell[®] sustav s nanesenim uzorcima inkubiran je 2 sata pri 37°C uz kontinuirano miješanje na orbitalnoj tresilici pri 50 rpm. Uzimanje uzorka receptorskog medija iz receptorskog odjeljka provedeno je na početku eksperimenta, te nakon 20, 40, 60, 80, 100 i 120 minuta: pipetom je uzeto 500 μl receptorskog medija te je isti volumen svježeg pufera HBSS-Ca²⁺ vraćen u receptorski odjeljak. TEER vrijednost Calu-3 monosloja mjerena je prije samog eksperimenta te 30, 70 i 120 minuta nakon početka eksperimenta. Uzeti uzorci receptorskog medija

analizirani su na sadržaj flutikazonpropionata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti prema metodi opisanoj u odjeljku 3.2.1.

Određivanje vijabilnosti Calu-3 stanica u monosloju po završetku ispitivanja permeabilnosti

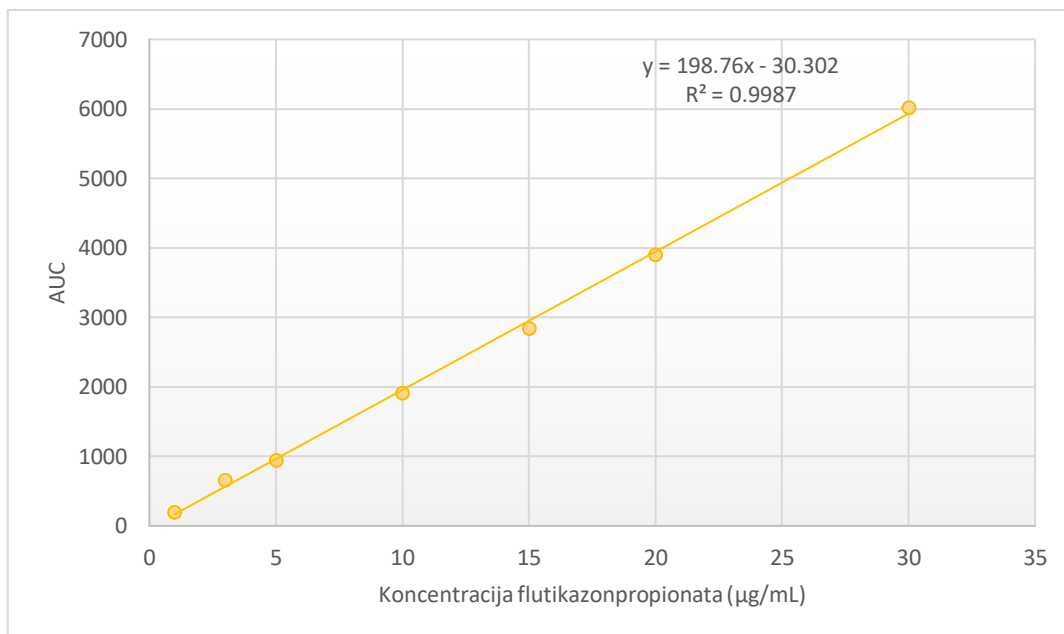
Po završetku ispitivanja permeabilnosti, ispitivani uzorci i pufer HBSS-Ca²⁺ uklonjeni su iz donorskog i receptorskog odjeljka te je u receptorski odjeljak dodan hranidbeni medij. Transwell® sustav sa stanicama na Transwell® polikarbonatnoj membrani inkubiran je pri 37°C, 5% CO₂ i 95% relativne vlažnosti 24 sata, nakon čega je proveden test biokompatibilnosti. Otopina MTT-a, koncentracije 5 µg/ml, pripravljena je u PBS-u te je razrijeđena hranidbenim medijem do konačne koncentracije MTT reagensa od 0,5 mg/ml. Uklonjen je hranidbeni medij iz receptorskog odjeljka te je dodano po 700 µl razrijeđenog MTT reagensa (0,5 mg/ml) u donorski i receptorski odjeljak Transwell® sustava. Transwell® sustav sa stanicama na polikarbonatnoj membrani inkubiran je 3 sata pri 37°C s razrijeđenom otopinom MTT reagensa nakon čega je ista odsisana, a u donorski i receptorski odjeljak dodano je po 700 µl izopropanola za otapanje nastalih kristalića formazana. Otapanje kristalića formazana provedeno je uz miješanje na orbitalnoj tresilici pri 350 okr/min. Uzorak sjedinjene otopine formazana iz receptorskog i donorskog odjeljka nanesen je u triplicatu na mikrotitarsku ploču s 96 jažica. Na ploču je za kontrolu nanesen i čisti izopropanol. Apsorbancija otopine kristala formazana određena je pri valnoj duljini od 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Multilabel counter VICTOR3, PerkinElmer, SAD). Vijabilnost stanica izračunata je kako je opisano u odjeljku 3.2.4.

4. Rezultati i rasprava

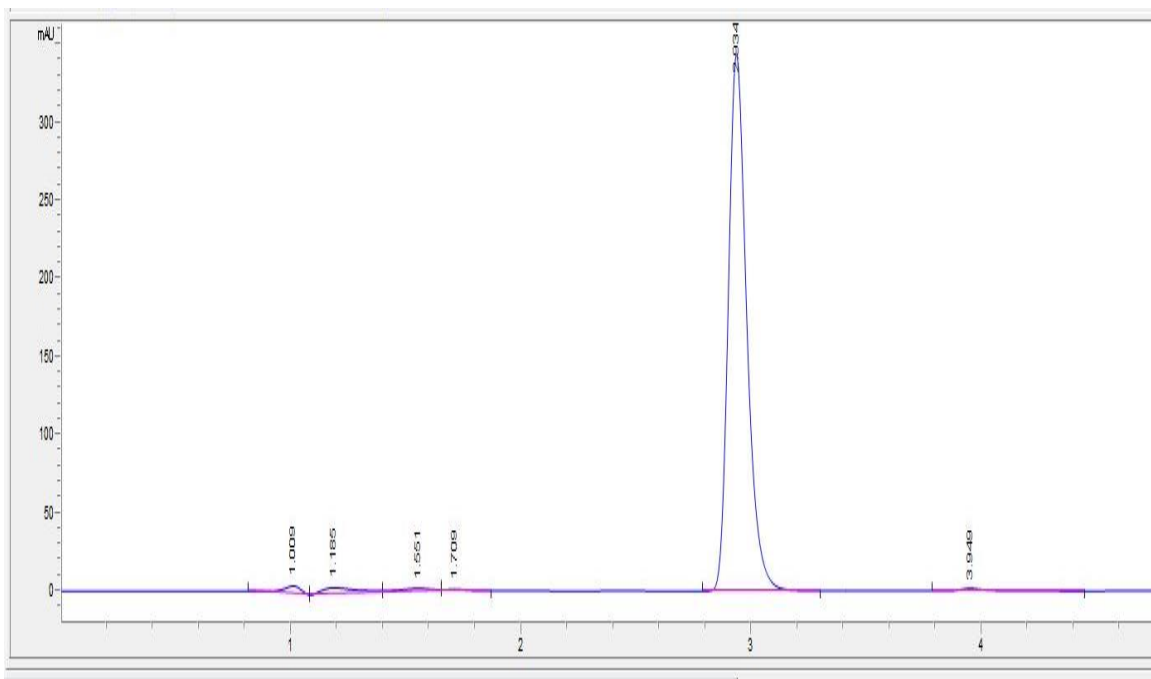
4.1. Validacija HPLC metode

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) jedna je od najvažnijih metoda u analitici lijekova. Princip metode temelji se na odjeljivanju sastojaka u smjesi injektiranoj u uređaj, pri protoku mobilne tekuće faze kroz kolonu (stacionarnu fazu) pod visokim tlakom. Odvajanje sastavnica uzorka temelji se na različitoj brzini prolaska pojedinih sastavnica kroz stacionarnu fazu (Gupta i sur., 2012).

Za kasnije određivanje sadržaja flutikazonpropionata u ispitivanju permeabilnosti, napravljen je baždarni pravac radnih standardnih otopina flutikazonpropionata u koncentracijama od 1, 3, 5, 10, 15, 20 i 30 µg/ml. Iz odnosa izmjerene površine pika i pripadajuće koncentracije radne standardne otopine određen je baždarni pravac jednadžbe $y = 198,76x - 30,302$ i koeficijent korelacije $r = 0,9993$ (koeficijent determinacije $R^2 = 0,9987$) prikazan na Slici 8. Na Slici 9. prikazan je odziv detektora pri koncentraciji flutikazonpropionata od 10 µg/ml, pri valnoj duljini 236 nm.



Slika 8. Baždarni pravac flutikazonpropionata



Slika 9. Odziv detektora na sadržaj flutikazonpropionata u radnoj standardnoj otopini koncentracije 10 µg/ml

Razvijenu metodu potrebno je validirati prema smjernicama Međunarodnog vijeća za harmonizaciju (engl. *International Council for Harmonization, ICH*) (Gupta i sur., 2012). Tako je, osim linearnosti, određena granica dokazivanja $LOD = 0,08 \mu\text{g/ml}$ i granica određivanja $LOQ = 0,25 \mu\text{g/ml}$, što je prihvatljivo za planirano ispitivanje permeabilnosti.

4.2. Priprava *in situ* gelirajućih sustava flutikazonpropionata

In situ gelirajući sustavi inovativno su rješenje za nadilaženje nedostataka konvencionalnih nazalnih pripravaka na tržištu. Značajan limitirajući faktor nazalne primjene lijeka je mukocilijarni klirens koji u kratkom vremenskom razdoblju odstranjuje tekuće farmaceutske oblike s nosne sluznice. Iz navedenog razloga povećan je interes istraživača za razvojem *in situ* gelirajućih sustava, koji uslijed geliranja na mjestu primjene omogućuju dulje zadržavanje na sluznici nosa (Nižić i sur., 2019). *In situ* gelirajući sustav za nazalnu primjenu raspršuje se u nosnu šupljinu kao tekući farmaceutski oblik (otopina ili suspenzija), a u dodiru s nosnom sluznicom, potaknut fiziološkim uvjetima, prelazi u gel. Ovisno o strukturnim značajkama gela, modificirano je oslobađanje lijeka i permeacija kroz biološku barijeru, što je od iznimne važnosti za postizanje lokalnog djelovanja lijeka uz minimalnu sistemsku raspoloživost (Nižić i sur., 2019; Jurišić Dukovski i sur., 2017).

Flutikazonpropionat je netopljiv u vodi (www.drugbank.ca), stoga se nazalno primjenjuje u obliku suspenzije. U ovom radu pripravljene su *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata koje sadrže površinski aktivnu tvar polisorbit 80, polimere pektin, natrijev hijaluronat i gelan gumu te manitol kao sredstvo za izotonizaciju. Takve suspenzije su se u prethodnim ispitivanjima pokazale prikladnima za nazalnu primjenu prema osmolalnosti, reološkim svojstvima, kutu raspršenja i profilu nazalne depozicije (Brozović i Mrše, 2019; Čurt, 2019; Nižić i sur., 2019).

Površinski aktivne tvari sastoje se od polarnog i nepolarnog dijela što im omogućuje specifični smještaj na površini između polarne i nepolarne faze sustava. Polisorbit 80 je neionski surfaktant, HLB (engl. *hydrophilic-lipophilic balance*) vrijednosti 15 te se najčešće koristi kao emulgator u emulzijama tipa ulje/voda. U ovom radu korišten je kao stabilizator *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata.

Kako bi pripremljeni terapijski sustav gelirao na mjestu primjene, suspenziji flutikazonpropionata pripravljenoj s polisorbitom 80 dodana je otopina polimera pektina i gelan gume. Pektin je prirodni polisaharid biljnog porijekla, dobro poznat i uvršten na GRAS listu (engl. *Generally regarded as safe*) pomoćnih tvari (www.ecfr.gov). Najčešći izvori industrijski dobivenog pektina su različiti agrumi i jabuke, ali dobiva se i iz drugih biljaka. Ovisno o biljci iz koje je dobiven, razlikuje se njegova molekularna struktura, no najčešće se radi o polimeru D-galakturonske kiseline povezane α (1 \rightarrow 4) vezama (Schmidt, 2016; Watts i Smith, 2009). Razlikuju se dva osnovna tipa pektina, ovisno o stupnju esterifikacije: niskometoksilirani pektin sa zastupljenošću esterifikacije < 50% i visokometoksilirani pektin sa zastupljenošću esterifikacije > 50%. Niskometoksilirani pektin, korišten u ovom radu, u dodiru s nosnom sluznicom gelira uslijed interakcije s kalcijevim ionima iz nosnog fluida. Vezanjem kalcijevih iona na karboksilne skupine pektinskih lanaca stvara se trodimenzionalna struktura nazvana „egg-box“ model (Chan i sur., 2017; Watts i Smith, 2009).

Gelan guma je anionski deacetilirani polisaharid kojeg izlučuje *Pseudomonas elodea*. Građena je od ponavljajućih jedinica tetrasaharida koji se sastoji redom od β -D-glukoze, β -D-glukuronske kiseline, β -D-glukoze i L-ramnoze. Princip geliranja temelji se na formiranju uzvojnica koje interakcijom s ionima iz nosnog fluida i stvaranjem vodikovih veza s vodom, grade trodimenzionalnu strukturu (Cao i sur., 2009).

Dodatkom otopine natrijeva hijaluronata i manitola optimiran je pripremljen terapijski sustav. Natrijev hijaluronat biorazgradljivi je polimer, neimunogen, neiritirajući i

biokompatibilan (Kim i Kim, 2016), s izraženim svojstvom stvaranja hidrogelova zbog hidroksilnih skupina u strukturi (Ström i sur., 2015). Usto, natrijev hijaluronat ima važnu ulogu u procesu cijeljenja i obnavljanja nosne sluznice kao što je istaknuto u radu Nižić i sur., 2019. Naime, u kombinaciji s nazalnim kortikosteroidima, pokazuje povoljan učinak na smanjenje simptoma povezanih s alergijskim i nealergijskim rinitisom (Gelardi i sur, 2013) te kroničnim rinosinusitisom uz nazalnu polipozu (Cantone i Iengo, 2016).

Dodatak manitola (4,0%, *m/m*) u pripremljene *in situ* gelirajuće sustave osigurava prikladnu osmolalnost pripravka za nazalnu primjenu (Ćurt, 2019).

4.3. Biokompatibilnost *in situ* gelirajućih sustava flutikazonpropionata

Ispitivanje biokompatibilnosti *in vitro* neizostavno je ispitivanje u ranijem stadiju razvoja novog terapijskog sustava. *In vitro* ispitivanja na stanicama omogućuju jeftin i učinkovit probir terapijskih sustava prikladnih za daljnja ispitivanja. Mehanizmi stanične toksičnosti mogu biti različiti, a ovisi i o vremenu izlaganja stanica ispitivanim terapijskim sustavima, pa se tako metodama ispituje dezintegracija membrane, metabolička aktivnost enzima i prisutnost enzima specifičnih za apoptozu (Scherließ, 2011).

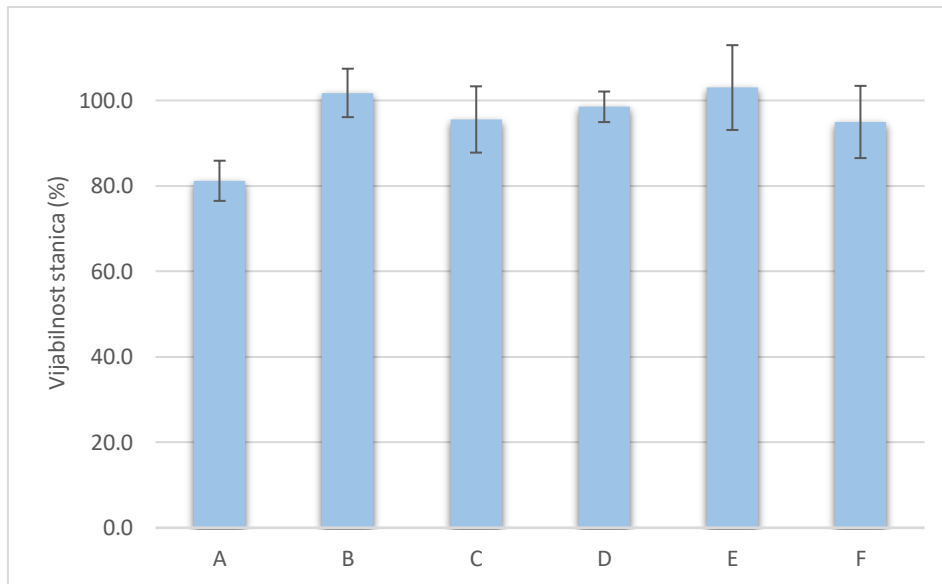
U ovom radu *in vitro* biokompatibilnost *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom ispitivana je na Calu-3 stanicama adenokarcinoma pluća. U ispitivanju Ihekwereme i suradnika (2014) ta se stanična linija pokazala prikladna kao *in vitro* model za ispitivanje toksičnog i iritabilnog učinka tvari na respiratornu sluznicu (Ihekwereme i sur., 2014).

Stanice uzgojene na ploči s 96 jažica tretirane su 2 sata *in situ* gelirajućim sustavima s flutikazonpropionatom pomiješanim s puferom HBSS- Ca^{2+} u volumnom omjeru 1:1. Koncentracija Ca^{2+} u pripremljenom HBSS puferu odgovara koncentraciji Ca^{2+} u nosnom fluidu, čime se simuliraju uvjeti *in vivo*. Miješanjem terapijskog sustava s puferom HBSS- Ca^{2+} simulirano je geliranje razvijenih sustava *in vivo* umrežavanjem polimernih lanaca kalcijevim ionima.

Metabolička aktivnost stanica tretiranih ispitivanim sustavima određena je MTT testom, a vijabilnost stanica izražena je kao relativna u odnosu na stanice tretirane puferom HBSS- Ca^{2+} .

Vijabilnost stanica tretiranih ispitivanim sustavima kretala se od $81,2 \pm 4,7$ % do $103,0 \pm 9,9$ % (Slika 10.) u odnosu na negativnu kontrolu, što pokazuje da su razvijeni *in situ* gelirajući sustavi s flutikazonpropionatom biokompatibilni s Calu-3 modelnim stanicama respiratornog

epitela. Zabilježena varijabilnost metaboličke aktivnosti stanica pri ponovljenim ispitivanjima (razvidna iz vrijednosti standardne devijacije, Slika 10.) očekivana je s obzirom da se ispitivanje provodi na živom sustavu (Scherließ, 2011).



Slika 10. Vijabilnost Calu-3 stanica tretiranih *in situ* gelirajućim sustavima s flutikazonpropionatom (A-F) pomiješanim s puferom HBSS-Ca²⁺ u volumnom omjeru 1:1. Vijabilnost stanica ispitivana je MTT testom te je izražena u postotku u odnosu na vijabilnost stanica tretiranih puferom HBSS-Ca²⁺. Prikazana je srednja vrijednost ± SD (n=6).

Rezultati ispitivanja biokompatibilnosti razvijenih *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom temelj su i za provođenje ispitivanja permeabilnosti, s obzirom da su ispitivanjem biokompatibilnosti utvrđeni uvjeti izlaganja stanica ispitivanim sustavima pri kojima nema uočenih toksičnih učinaka koji bi mogli utjecati na vijabilnost stanica, a time i na barijerna svojstva staničnog monosloja.

4.4. Ispitivanje permeabilnosti *in vitro*

Rinosinusitis, nosne polipoze i kronični alergijski rinitis u visokom su postotku prisutni u populaciji. U osnovi tih bolesti upala je nazalne sluznice te se stoga liječi lokalnom primjenom kortikosteorida (Cantone i Iengo, 2016; Gelardi i sur., 2013). Iako je oralna primjena kortikosteroida učinkovita, zbog sistemske raspoloživosti moguće su mnogobrojne sistemske nuspojave (Jurišić Dukovski i sur., 2017). Kako bi se iste izbjegle, nazalna primjena kortikosteroida s ciljem postizanja lokalnog učinka odgovarajuća je opcija.

Potencijal za lokalni učinak nakon nazalne primjene procijenjen je ispitivanjem permeabilnosti flutikazonpropionata iz razvijenih *in situ* gelirajućih sustava kroz Calu-3 stanični model respiratornog epitela u receptorski medij. Naime, prema istraživanju Inoue i suradnika (2020) permeabilnost lijeka kroz Calu-3 stanični monosloj može se upotrijebiti kao pokazatelj permeabilnosti kroz epitelnu barijeru *in vivo* (Inoue i sur., 2020).

Za *in vitro* ispitivanje permeabilnosti flutikazonpropionata iz *in situ* gelirajućih sustava, bilo je potrebno osigurati uvjete geliranja slične onima *in vivo*. U tu svrhu, *in situ* gelirajući sustavi A, C, E i F pomiješani su s HBSS-Ca²⁺ puferom u omjeru 1:1 na magnetskoj miješalici uslijed čega je formiran gel. Gelirani sustavi s flutikazonpropionatom naneseni su u donorski odjeljak Transwell® sustava.

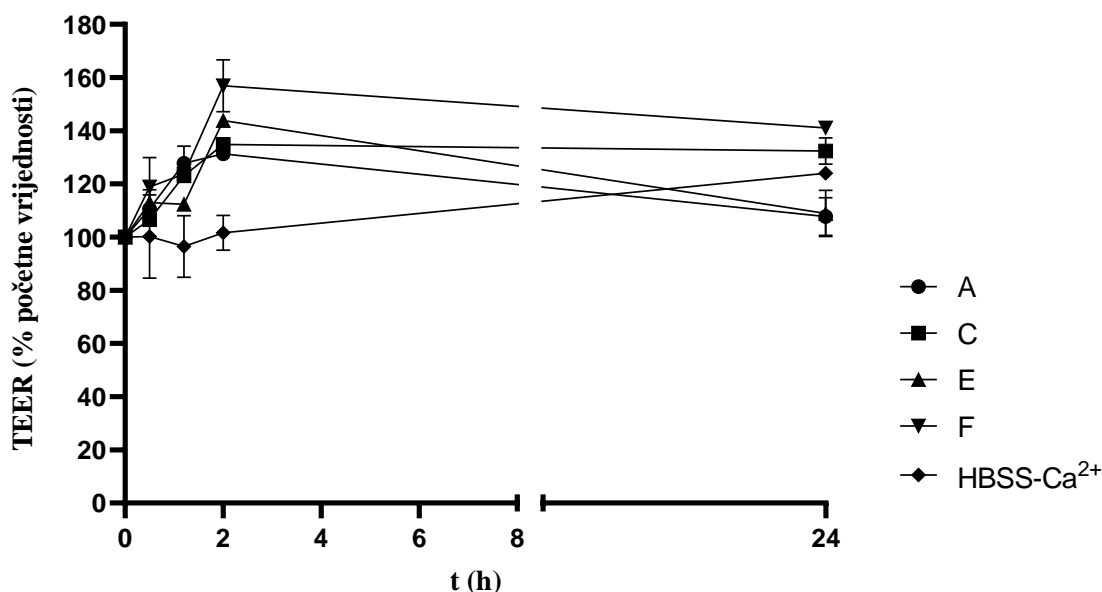
Flutikazonpropionat je kortikosteroid značajne djelotvornosti na mjestu primjene uz izrazito malu sistemsku bioraspoloživost nakon nazalne primjene terapijske doze (Daley-Yates i Baker, 2001). Uklapanjem flutikazonpropionata u *in situ* gelirajući sustav moguće je očekivati dulje zadržavanje oblika na sluznici nosa, kontrolirano oslobađanje lijeka te manju apsorpciju lijeka u odnosu na konvencionalne tekuće oblike (Jurišić Dukovski i sur., 2017). Permeabilnost flutikazonpropionata iz *in situ* gelirajućeg sustava kroz Calu-3 stanični monosloj ispitivana je tijekom 2 sata. Receptorski medij uzorkovan je iz receptorskog odjeljka Transwell® sustava u određenim vremenskim intervalima, uz vraćanje svježeg medija u istoj količini u receptorski odjeljak.

Za ispitivanje permeabilnosti odabrani su uzorci A, C, E i F (Tablica 4.) s ciljem procjene utjecaja polisorbata 80 (0,01, 0,03 i 0,05%, *m/m*, redom u E, A i F uzorku) uz različiti sadržaj gelan gume (0 ili 0,1%, *m/m*, redom u A i C uzorku) na permeaciju flutikazonpropionata iz *in situ* gelirajućih sustava kroz Calu-3 stanični monosloj. Polisorbat 80, kao površinski aktivna tvar, može mijenjati barijerna svojstva respiratornog epitela. Usto, polisorbat 80 može tvoriti

micelle u vodenom mediju iznad kritične micelizacijske koncentracije, što bi moglo pridonijeti prijenosu flutikazonpropionata kroz Calu-3 stanični monosloj i njegovoj solubilizaciji u receptorskom odjeljku. Naime, micelle mogu uklopiti hidrofoban lijek te intaktne proći kroz epitelnu barijeru (Pepić i sur., 2013). Polisorbat 80 može se koristiti kao pospješivač apsorpcije (Davis i Illum, 2003), no često je povezan s iritacijom i citotoksičnim djelovanjem (Scherließ, 2011).

Ispitivanje permeabilnosti kroz stanični model epitelne barijere provodi se nakon uspostavljanja integriteta i dostizanja odgovarajućih barijernih svojstava modela. Vrijednost TEER mjerena za svaki stanični monosloj služi kao vrlo osjetljiv marker konfluentnosti monosloja stanica (Scherließ, 2011). Naime, stvaranje funkcionalnih čvrstih spojeva uzrokuje povećanje TEER vrijednosti, ukazujući na postojani integritet stanične barijere (Jeong i sur., 2019). Pad TEER vrijednosti označava određeni prekid konfluentnosti koji može biti reverzibilnog i ireverzibilnog karaktera te može rezultirati povećanim prolaskom lijeka u receptorski odjeljak (Sivadas i sur., 2008).

U ovom radu TEER Calu-3 staničnog monosloja mjeren je prije, tijekom ispitivanja (30, 70 i 120 min nakon početka ispitivanja) te 24 sata nakon početka ispitivanja permeabilnosti. TEER vrijednosti stanica na Transwell[®] membranama bile su u rasponu od $526,3 \pm 11,7$ do $657,3 \pm 15,2 \Omega \text{ cm}^2$. Promjena TEER vrijednosti tijekom eksperimenta korištena je za procjenu učinka geliranog sustava na čvrste spojeve Calu-3 staničnog monosloja. Kod svih ispitivanih geliranih sustava zabilježen je porast TEER vrijednosti staničnog monosloja tijekom ispitivanja permeabilnosti (Slika 11.).



Slika 11. TEER vrijednosti Calu-3 staničnog monosloja tijekom ispitivanja permeabilnosti flutikazonpropionata iz *in situ* gelirajućih sustava (A, C, E i F) pomiješanih s puferom HBSS-Ca²⁺ u volumnom omjeru 1:1, izražene kao postotak u odnosu na TEER vrijednost Calu-3 staničnog monosloja prije ispitivanja permeabilnosti.

Prikazana je srednja vrijednost ± SD (n=2).

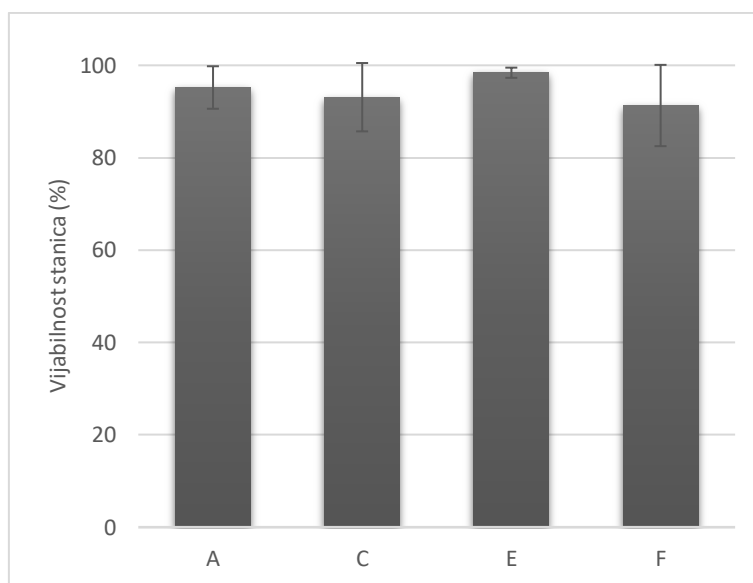
Pretpostavka je da su povećanju TEER vrijednosti pridonijeli flutikazonpropionat i natrijev hijaluronat. Flutikazonpropionat, jednako kao i ostali glukokortikoidi, poboljšava integritet barijere Calu-3 stanica redistribucijom proteina čvrstih spojeva (Sekiyama i sur., 2012). Hijaluronska kiselina pak utječe na povećanje funkcije uskih prolaza (Park i Tsuchiya, 2002) koji bi prema istraživanju Nagasawa i suradnika (2006) mogli imati funkciju u promicanju barijerne funkcije čvrstih spojeva (Nagasawa i sur., 2006). Pad vrijednosti nakon prestanka izlaganja stanica ispitivanim geliranim sustavima upućuje na zaključak da je učinak geliranog sustava na barijerna svojstva staničnog monosloja reverzibilan (Sivadas i sur., 2008).

Tijekom dvosatnog ispitivanja permeabilnosti, nije uočena ovisnost permeacije flutikazonpropionata kroz Calu-3 stanični monosloj o sastavu ispitivane formulacije. Najveća detektirana koncentracija flutikazonpropionata u receptorskom odjeljku iznosila je 0,16 µg/ml, što je vrijednost između LOD i LOQ. S obzirom da je prema literaturnim podacima topljivost flutikazonpropionata u vodenom mediju u rasponu od 0,1 do 0,7 µg/ml (Umerska i sur., 2015; Haghi i sur., 2013; Högger i Rohdewald, 1994), može se zaključiti da polisorb 80 nije utjecao na permeabilnost flutikazonpropionata opisanim mehanizmima .

Konačno, može se zaključiti da ispitivani gelirani sustavi s flutikazonpropionatom nisu narušavali integritet i barijerna svojstva Calu-3 epitelnog staničnog modela te da pokazuju potencijal za lokalni učinak uklopljenog flutikazonpropionata.

Vijabilnost Calu-3 stanica u monosloju nakon ispitivanja permeabilnosti

Calu-3 stanični monoslojevi izloženi geliranim sustavima s flutikazonpropionatom tijekom dvosatnog ispitivanja permeabilnosti korišteni su i za još jednu procjenu biokompatibilnosti ispitivanih sustava. Rezultati ispitivanja biokompatibilnosti odabranih *in situ* gelirajućih sustava prikazani su na Slici 12.



Slika 12. Vijabilnost Calu-3 stanica u staničnom monosloju nakon provedenog ispitivanja permeabilnosti flutikazonpropionata iz *in situ* gelirajućih sustava (A, C, E i F) pomiješanih s puferom HBSS-Ca²⁺ u volumnom omjeru 1:1, izražene kao postotak u odnosu na vijabilnost Calu-3 stanica u staničnom monosloju izloženom samo puferu HBSS-Ca²⁺. Ispitivanje vijabilnosti provedeno je MTT testom. Prikazana je srednja vrijednost ± SD (n=2).

Koncentracija polisorbata 80 u ispitivanim uzorcima redom je iznosila 0,31 mg/ml (0,2365 mM) za uzorke A i C, 0,1 mg/ml (0,0765 mM) za E te 0,5 mg/ml (0,3815 mM) za F. Prema rezultatima analize, neovisno o koncentraciji polisorbata 80, *in situ* gelirajući sustavi s flutikazonpropionatom biokompatibilni su s Calu-3 stanicama, budući da je vijabilnost stanica >80 % kod svih ispitivanih uzoraka (Scherließ, 2011). Time su potvrđeni i rezultati ispitivanja biokompatibilnosti opisani u odjeljku 4.3.

Ostvareni rezultati u skladu su s literaturnim podacima. Naime, u istraživanju citotoksičnog učinka različitih pomoćnih tvari na Calu-3 stanice određena je LC₅₀ (vrijednost kod koje je

vijabilnost stanica 50 %) za polisorbat 80 koja iznosi 7,95 mM (Scherließ, 2011), što je značajno veća koncentracija od naznačenih u ovom radu.

U istraživanju citotoksičnog učinka polisorbata 80 na staničnu liniju BEAS-2B, koja predstavlja bronhalne epitelne stanice, uočeno je značajnije smanjenje vijabilnosti (< 80 %) pri koncentracijama polisorbata 80 od 4 % (Lindenberg i sur., 2019).

5. Zaključci

- Uspješno su pripremljeni *in situ* gelirajući sustavi s flutikazonpropionatom (0,058%, *m/m*), koji sadrže površinski aktivnu tvar polisorbata 80 (0,01-0,05%, *m/m*), polimere pektin (0,66%, *m/m*), natrijev hijaluronat (0-0,05%, *m/m*) i gelan gumu (0-0,2%, *m/m*) te manitol (4%, *m/m*) kao sredstvo za izotonizaciju.
- Calu-3 stanice adenokarcinoma pluća prikladne su za provođenje biofarmaceutskih ispitivanja *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom.
- Razvijeni *in situ* gelirajući sustavi s flutikazonpropionatom biokompatibilni su s Calu-3 modelnim stanicama respiratornog epitela. Vijabilnost stanica nakon dvosatnog izlaganja ispitivanim sustavima bila je u rasponu od $81,2 \pm 4,7$ % do $103,0 \pm 9,9$ %.
- Za sve ispitivane sustave s flutikazonpropionatom zabilježen je reverzibilan pozitivni učinak na TEER vrijednosti staničnog monosloja tijekom ispitivanja permeabilnosti.
- Permeabilnost flutikazonpropionata kroz Calu-3 stanični monosloj nije ovisila o sadržaju polisorbata 80 u *in situ* gelirajućim sustavima.
- Pripremljeni *in situ* gelirajući sustavi s flutikazonpropionatom pokazali su potencijal za nazalnu primjenu prema utvrđenoj biokompatibilnosti i permeabilnosti lijeka *in vitro*.

6. Literatura

Arora P, Sharma S, Garg, S. Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discovery Today*, 2002, 7, 967–975.

Barkhordari A, Barzegar S, Hekmatimoghaddam H, Jebali A, Moghadam SR, Khanjani, N. The toxic effects of silver nanoparticles on blood mononuclear cells. *International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2014, 5, 164–168.

Brozović M, Mrše A. Nazalna depozicija *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata pri dvosmjernoj dostavi *in vitro*. 2019, Rad za rektorovu nagradu.

Brzoska M, Langer K, Coester C, Loitsch S, Wagner TOF, Malilinkrodt CV. Incorporation of biodegradable nanoparticles into human airway epithelium cells - *In vitro* study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 318, 562–570.

Bunchongprasert K, Shao, J. Impact of media in transport study on cell monolayer integrity and permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. American Pharmacists Association, 2020, 109, 1145–1152.

Cabrera-Pérez MÁ, Sanz MB, Sanjuan VM, Alvarez MG, Alvarez IG. Importance and applications of cell-and tissue-based *in vitro* models for drug permeability screening in early stages of drug development. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue based In Vitro Culture Models*, 2016, 3–29.

Cantone E, Iengo M. Effect of sodium hyaluronate added to topical corticosteroids in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *American Journal of Rhinology and Allergy*, 2016, 30, 340–343.

Cao SL, Ren XW, Zhang QZ, Chen E, Xu F, Chen J, Liu LC, Jiang XG. *In situ* gel based on gellan gum as new carrier for nasal administration of mometasone furoate. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 365, 109–115.

Cell Culture Basics, www.vanderbilt.edu, pristupljeno 05.09.2020.

Chan SY, Choo WS, Young DJ, Loh XJ. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 161, 118–139.

Ćurt, E. Razvoj *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata za nazalnu primjenu. 2019, Diplomski rad.

Daley-Yates PT, Baker RC. Systemic bioavailability of fluticasone propionate administered as nasal drops and aqueous nasal spray formulations. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2001, 51, 103–105.

Davis SS, Illum L. Absorption enhancers for nasal drug delivery. *Clinical Pharmacokinetics*, 2003, 42, 1107–1128.

Djupesland PG, Messina JC, Mahmoud RA. Breath powered nasal delivery: A new route to rapid headache relief. *Headache*, 2013, 53, 72–84.

Fluticasone propionate, <https://www.drugbank.ca>, pristupljeno 12.07.2020.

Fluticasone propionate, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 29.06.2020.

Flutikazonpropionat, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 12.06.2020.

Forbes B. Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 2000, 3, 18–27.

Furubayashi T, Inoue D, Nishiyama N, Tanaka A, Yutani R, Kimura S, Katsumi H, Yamamoto A, Sakane T. Comparison of various cell lines and three-dimensional mucociliary tissue model systems to estimate drug permeability using an in vitro transport study to predict nasal drug absorption in rats. *Pharmaceutics*, 2020, 12.

Furubayashi T, Kamaguchi A, Kawaharada K, Masaoka Y, Kataoka M, Yamashita S, Higashi Y, Sakane T. Evaluation of the contribution of the nasal cavity and gastrointestinal tract to drug absorption following nasal application to rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30, 608–611.

Gelardi M, Iannuzzi L, Quaranta N. Intranasal sodium hyaluronate on the nasal cytology of patients with allergic and nonallergic rhinitis. *International Forum of Allergy and Rhinology*, 2013, 3, 807–813.

Gonçalves VSS, Matias AA, Poejo J, Serra AT, Duarte CMM. Application of RPMI 2650 as a cell model to evaluate solid formulations for intranasal delivery of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 515, 1–10.

Grainger CI, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP, Forbes B. Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharmaceutical Research*, 2006, 23, 1482–1490.

Gupta V, Jain ADK, Gill NS, Gupta K. Development and validation of HPLC method - a review. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 2012, 2, 17–25.

Hafner A, Škrinjar D, Filipović-Grčić J. Mogućnosti nazalne primjene lijekova. *Farmaceutski Glasnik*, 2014, 70, 303–321.

Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grčić J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 381, 205–213.

Haghi M, Traina D, Postma DS, Bebawy M, Young PM. Fluticasone uptake across Calu-3 cells is mediated by salmeterol when deposited as a combination powder inhaler. *Respirology*, 2013, 18, 1197–1201.

Hemocitometar, <https://www.hemocytometer.org>, pristupljeno 27.04.2020.

Högger P, Rohdewald P. Binding kinetics of fluticasone propionate to the human glucocorticoid receptor. *Steroids*, 1994, 59, 597–602.

Ihekwereme C, Esimone C, Shao D, Agu RU. Preliminary studies on validation of Calu-3 cell line as a model for screening respiratory mucosa irritation and toxicity. *Pharmaceutics*, 2014, 6, 268–280.

Illum L. Nasal drug delivery - Recent developments and future prospects. *Journal of Controlled Release*, 2012, 161, 254–263.

Immortalized cell culture, <https://www.creative-bioarray.com>, pristupljeno 30.08.2020.

Inoue D, Furubayashi T, Tanaka A, Sakane T, Sugano K. Quantitative estimation of drug permeation through nasal mucosa using *in vitro* membrane permeability across Calu-3 cell layers for predicting *in vivo* bioavailability after intranasal administration to rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2020, 149, 145–153.

Jaiswal M, Dudhe R, Sharma P. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, 2015, 5, 123–127.

Jeong MH, Kim HR, Bang IJ, Yoo SH, Lee SJ, Lee KH, Chung KH. In vitro model for predicting acute inhalation toxicity by using a Calu-3 epithelium cytotoxicity assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2019, 98.

Jurišić Dukovski B, Plantić I, Čunčić I, Krtalić I, Juretić M, Pepić I, Lovrić J, Hafner A. Lipid/alginate nanoparticle-loaded in situ gelling system tailored for dexamethasone nasal delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 533, 480–487.

Katual MK, Kaur S, Sharma R, Kaur G, Harikumar SL. Novel frontiers in naso-brain drug delivery; Challenges and opportunities: an outlook. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2017, 6, 777–791.

Kim HR, Kim MJ, Lee SY, Oh SM, Chung KH. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2011, 726, 129–135.

Kim SJ, Kim, CW. Development and characterization of sodium hyaluronate microparticle-based sustained release formulation of recombinant human growth hormone prepared by spray-drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 105, 613–622.

Kouchak M. *In situ* gelling systems for drug delivery. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*, 2014, 9

Kreft ME, Jerman UD, Lašić E, Hevir-Kene N, Rižner TL, Peternel L, Kristan K. The characterization of the human nasal epithelial cell line RPMI 2650 under different culture conditions and their optimization for an appropriate in vitro nasal model. *Pharmaceutical Research*, 2015, 32, 665–679.

Kreft ME, Jerman UD, Lasič E, Rižner TL, Hevir-Kene N, Peternel L, Kristan K. The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized in vitro model to investigate bronchial epithelial function. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 69, 1–9.

Kublik H, Vidgren MT. Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, 29, 157-177.

Kudsiova L, Lawrence MJ. A comparison of the effect of chitosan and chitosan-coated vesicles on monolayer integrity and permeability across Caco-2 and 16HBE14o-cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, 97, 3998-4010.

Lechanteur A, das Neves J, Sarmiento B. The role of mucus in cell-based models used to screen mucosal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018, 124, 50–63.

Lengyel M, Kallai-Szabo N, Antal V, Laki AJ, Antal I. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Scientia Pharmaceutica*, 2019, 87.

Lindenberg F, Sichel F, Lechevrel M, Respaund R, Saint-Lorant G. Evaluation of lung cell toxicity of surfactants for inhalation route. *Journal of Toxicology and Risk Assessment*, 2019, 5, 1–4.

Mainardes RM, Urban MCC, Cinto PO, Chaud MV, Evangelista RC, Gremião MPD. Liposomes and micro / nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. *Current Drug Delivery*, 2006, 3, 275–285.

Matilainen L, Toropainen T, Vihola H, Hirvonen J, Järvinen K. *In vitro* toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. *Journal of Controlled Release*, 2008, 126, 10–16.

Mercier C, Perek N, Delavenne X. Is RPMI 2650 a suitable *in vitro* nasal model for drug transport studies?. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2018, 43, 13–24.

Mohammed MA, Syeda JTM, Wasan KM, Wasan EK. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*, 2017, 9.

Movia D, Di Cristo L, Alnemari R, McCarthy JE, Moustou H, de la Chapelle ML, Spadavecchia J, Volkov Y, Prina-Mello A. The curious case of how mimicking physiological complexity in *in vitro* models of the human respiratory system influences the inflammatory responses. A preliminary study focused on gold nanoparticles. *Journal of Interdisciplinary Nanomedicine*, 2017, 2, 110–130.

MucilAir, <http://www.epithelix.com>, pristupljeno 29.08.2020.

Mygind N, Dahl R. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, 29, 3–12.

Nagasawa K, Chiba H, Fujita H, Kojima T, Saito T, Endo T, Sawada N. Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 2006, 208, 123–132.

Naseptin Nasal Cream, <https://www.medicines.org.uk>, pristupljeno 30.08.2020

Nižić L, Ugrina I, Špoljarić D, Saršon V, Kučuk MS, Pepić I, Hafner A. Innovative sprayable *in situ* gelling fluticasone suspension: Development and optimization of nasal deposition. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 563, 445–456.

Ong HX, Traini D, Young PM. Pharmaceutical applications of the Calu-3 lung epithelia cell line. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2013, 10, 1287–1302.

Park JU, Tsuchiya T. Increase in gap-junctional intercellular communications (GJIC) of normal human dermal fibroblasts (NHDF) on surfaces coated with high-molecular-weight hyaluronic acid (HMW HA). *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, 60, 541–547.

Pektin, <https://www.ecfr.gov>, pristupljeno 21.07.2020.

Pepić I, Lovrić J, Filipović-Grčić J. How do polymeric micelles cross epithelial barriers?. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 50, 42–55.

Rathananand M, Kumar DS, Shirwaikar A, Kumar R, Kumar DS, Prasad RD. Preparation of mucoadhesive microspheres for nasal delivery by spray drying. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, 69, 651–657.

Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 2008, 3, 1125–1131.

Rotoli BM, Gatti R, Movia D, Bianchi MG, Di Cristo L, Fenoglio I, Sonvico F, Bergamaschi E, Prina-Mello A, Bussolati O. Identifying contact-mediated, localized toxic effects of MWCNT aggregates on epithelial monolayers: A single-cell monitoring toxicity assay. *Nanotoxicology*, 2015, 9, 230–241.

Salade L, Wauthoz N, Goole J, Amighi K. How to characterize a nasal product. The state of the art of *in vitro* and *ex vivo* specific methods. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 561, 47–65.

Salade L, Wauthoz N, Vermeersch M, Amighi K, Goole J. Chitosan-coated liposome dry-powder formulations loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2018, 129, 257–266.

Scherließ R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity *in vitro* on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 411, 98–105.

Schmidt US. Citrus pectin as a hydrocolloid emulsifier: Emulsifying and emulsion stabilizing properties, 2016, Disertacija, Karlsruher Institut für Technologie

Sekiyama A, Gon Y, Terakado M, Takeshita I, Kozu Y, Maruoka A, Matsumoto K, Hashimoto S. Glucocorticoids enhance airway epithelial barrier integrity. *International Immunopharmacology*, 2012, 12, 350–357.

Sengül Ü. Comparing determination methods of detection and quantification limits for aflatoxin analysis in hazelnut. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2016, 24, 56-62.

Shen Y, Chen J, Liu Q, Feng C, Gao X, Wang L, Zhang Q, Jiang X. Effect of wheat germ agglutinin density on cellular uptake and toxicity of wheat germ agglutinin conjugated PEG-PLA nanoparticles in Calu-3 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 413, 184–193.

Sibinovska N, Žakelj S, Kristan K. Suitability of RPMI 2650 cell models for nasal drug permeability prediction. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2019, 149, 85-95.

Sinani G, Sessevmez M, Gök K, Özgümüş S, Okyar A, Alpar HO, Cehver E. Nasal vaccination with poly(β -amino ester)-poly(D,L-lactide-co-glycolide) hybrid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 529, 1–14.

Sivadas N, O'Rourke D, Tobin A, Buckley V, Ramtoola Z, Kelly JG, Hickey AJ, Cryan SA. A comparative study of a range of polymeric microspheres as potential carriers for inhalation of proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 358, 159-167.

Sousa F, Castro P. Cell-based *in vitro* models for nasal permeability studies. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue based In Vitro Culture Models*, 2016, 83–100.

Sravanthi V, Pallavi MCP, Bonam SR, Sathyabama S, Kumar HMS. Oleic acid nanoemulsion for nasal vaccination: Impact on adjuvanticity based immune response. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2015, 28, 56–63.

Ström A, Larsson A, Okay O. Preparation and physical properties of hyaluronic acid-based cryogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 2015, 132, 1–11.

Tilly TB, Kerr LL, Braydich-Stolle K, Schlager JJ, Hussain SM. Dispersions of geometric TiO₂ nanomaterials and their toxicity to RPMI 2650 nasal epithelial cells. *Journal of Nanoparticle Research*, 2014, 16.

Tong X, Dong J, Shang Y, Inthavong K, Tu J. Effects of nasal drug delivery device and its orientation on sprayed particle deposition in a realistic human nasal cavity. *Computers in Biology and Medicine*, 2016, 77, 40–48.

Umerska A, Mouzouvi CRA, Bigot A, Saulnier P. Formulation and nebulization of fluticasone propionate-loaded lipid nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 493, 224–232.

Watts P, Smith A. PecSys: *In situ* gelling system for optimised nasal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2009, 6, 543–552.

WST-1 Assay, <https://www.sigmaldrich.com>, pristupljeno 30.08.2020.

WST-8, <https://www.promocell.com>, pristupljeno 30.08.2020.

Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. *Journal of Applied Toxicology*, 2009, 29, 69–78.

Zhang L, Du SY, Lu Y, Liu C, Tian ZH, Yang C, Wu HC, Wang Z. Puerarin transport across a Calu-3 cell monolayer – an in vitro model of nasal mucosa permeability and the influence of paeoniflorin and menthol. *Drug Design, Development and Therapy*, 2016, 10, 2227–2237.

7. Sažetak/Summary

Nazalna primjena lijeka prvi je izbor u liječenju i prevenciji oboljenja sluznice nosne šupljine, ali se pokazuje i kao perspektivan alternativni put dostave lijeka u sistemsku cirkulaciju te izravno u središnji živčani sustav. S ciljem unaprjeđenja nazalne dostave, razvijaju se mnogi novi terapijski sustavi, čiji je utjecaj na permeabilnost lijeka i biokompatibilnost potrebno ispitati *in vitro* u ranoj fazi njihova razvoja.

Cilj ovog rada bio je pripremiti *in situ* gelirajuće sustave s flutikazonpropionatom i ispitati njihovu biokompatibilnost te permeabilnost uklopljenog flutikazonpropionata korištenjem Calu-3 epitelnog staničnog modela.

Uspješno su pripremljeni *in situ* gelirajući sustavi s flutikazonpropionatom (0,058%, *m/m*), koji sadrže površinski aktivnu tvar polisorbata 80 (0,01-0,05%, *m/m*), polimere pektin (0,66%, *m/m*), natrijev hijaluronat (0-0,05%, *m/m*) i gelan gumu (0-0,2%, *m/m*) te manitol (4%, *m/m*) kao sredstvo za izotonizaciju. Calu-3 stanice uzgojene su pri uvjetima 37°C, 5% CO₂ i 95% relativne vlažnosti uz Eagleov minimalni esencijalni medij (EMEM) s 10% fetalnog govedeg seruma i 1% antibiotika penicilina i streptomcina. Utvrđena je biokompatibilnost razvijenih *in situ* gelirajućih sustava s Calu-3 modelnim stanicama respiratornog epitela. Vijabilnost stanica nakon dvosatnog izlaganja ispitivanim sustavima bila je u rasponu od 81,2 ± 4,7 % do 103,0 ± 9,9 %. Za sve sustave s flutikazonpropionatom zabilježen je reverzibilan pozitivan učinak na TEER vrijednosti staničnog monosloja tijekom ispitivanja permeabilnosti. Sadržaj polisorbata 80 u *in situ* gelirajućim sustavima nije utjecao na permeabilnost flutikazonpropionata kroz Calu-3 stanični monosloj.

Zaključno, pripremljeni *in situ* gelirajući sustavi s flutikazonpropionatom pokazali su potencijal za nazalnu primjenu prema utvrđenoj biokompatibilnosti i permeabilnosti lijeka *in vitro*. Rezultati ovoga rada mogu se primijeniti za daljnja istraživanja u području nazalne primjene *in situ* gelirajućih sustava.

Nasal drug administration is the first choice in treatment and prevention of diseases of the nasal mucosa. It also proves to be a promising alternative route for systemic drug delivery and offers possibility of direct nose-to-brain delivery. Versatile drug delivery systems are being developed to improve the therapeutic effect of nasally administered drugs, however, their impact on drug permeability and biocompatibility *in vitro* need to be evaluated in the early stage of their development.

The aim of this study was to prepare *in situ* gelling fluticasone propionate delivery systems and to evaluate their biocompatibility as well as permeability of incorporated fluticasone propionate using a Calu-3 epithelial cell model.

In situ gelling delivery systems for fluticasone propionate (0.058%, w/w), containing surfactant polysorbate 80 (0.01-0.05%, w/w), polymers pectin (0.66%, w/w), sodium hyaluronate (0-0.05%, w/w) and gellan gum (0-0.2%, w/w), and mannitol (4%, w/w) as isotonicizing agent, were successfully prepared. Calu-3 cells were grown at 37°C, 5% CO₂, and 95% relative humidity, using Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and 1% of antibiotics penicillin and streptomycin. *In situ* gelling fluticasone propionate delivery systems were shown to be biocompatible with Calu-3 model cells of respiratory epithelium. Cell viability after two-hour exposure to the tested systems ranged from 81.2 ± 4.7% to 103.0 ± 9.9%. For all *in situ* gelling systems, a reversible positive effect on the TEER values of the cell monolayer was observed during the permeability assay. Polysorbate 80 showed no concentration-related effect on fluticasone propionate permeability across Calu-3 cell monolayer.

In conclusion, *in situ* gelling fluticasone propionate delivery systems showed the potential for nasal administration considering their *in vitro* biocompatibility and drug permeability. The results of this study can be applied for further research in the field of nasal application of *in situ* gelling systems.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Biofarmaceutska karakterizacija *in situ* gelirajućeg sustava s flutikazonpropionatom na Calu-3 epitelnom staničnom modelu

Stefanie Bobičanec

Nazalna primjena lijeka prvi je izbor u liječenju i prevenciji oboljenja sluznice nosne šupljine, ali se pokazuje i kao perspektivan alternativni put dostave lijeka u sistemsku cirkulaciju te izravno u središnji živčani sustav. S ciljem unaprjeđenja nazalne dostave, razvijaju se mnogi novi terapijski sustavi, čiji je utjecaj na permeabilnost lijeka i biokompatibilnost potrebno ispitati *in vitro* u ranoj fazi njihova razvoja.

Cilj ovog rada bio je pripremiti *in situ* gelirajuće sustave s flutikazonpropionatom i ispitati njihovu biokompatibilnost te permeabilnost uklopljenog flutikazonpropionata korištenjem Calu-3 epitelnog staničnog modela.

Uspješno su pripremljeni *in situ* gelirajući sustavi s flutikazonpropionatom (0,058%, *m/m*), koji sadrže površinski aktivnu tvar polisorbat 80 (0,01-0,05%, *m/m*), polimere pektin (0,66%, *m/m*), natrijev hijaluronat (0-0,05%, *m/m*) i gelan gumu (0-0,2%, *m/m*) te manitol (4%, *m/m*) kao sredstvo za izotonizaciju. Calu-3 stanice uzgojene su pri uvjetima 37°C, 5% CO₂ i 95% relativne vlažnosti uz Eagleov minimalni esencijalni medij (EMEM) s 10% fetalnog goveđeg seruma i 1% antibiotika penicilina i streptomocina. Utvrđena je biokompatibilnost razvijenih *in situ* gelirajućih sustava s Calu-3 modelnim stanicama respiratornog epitela. Vijabilnost stanica nakon dvosatnog izlaganja ispitivanim sustavima bila je u rasponu od 81,2 ± 4,7 % do 103,0 ± 9,9 %. Ispitivanjem permeabilnosti nije evidentiran prolazak flutikazonpropionata iz geliranih sustava kroz Calu-3 stanični monosloj u receptorski odjeljak. Za sve sustave s flutikazonpropionatom zabilježen je reverzibilan pozitivan učinak na TEER vrijednosti staničnog monosloja tijekom ispitivanja permeabilnosti. Uočena je manja permeabilnost flutikazonpropionata iz *in situ* gelirajućih sustava kroz Calu-3 stanični monosloj u odnosu na konvencionalne oblike (suspenzija i prašak) flutikazonpropionata za koje su podaci o permeabilnosti pronađeni u literaturi.

Zaključno, pripremljeni *in situ* gelirajući sustavi s flutikazonpropionatom pokazali su potencijal za nazalnu primjenu prema utvrđenoj biokompatibilnosti i permeabilnosti lijeka *in vitro*. Rezultati ovoga rada mogu se primijeniti za daljnja istraživanja u području nazalne primjene *in situ* gelirajućih sustava.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 12 grafičkih prikaza, 4 tablice i 85 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nazalna primjena, *in situ* gelirajući sustavi, flutikazonpropionat, Calu-3, biokompatibilnost, permeabilnost

Mentor: **Dr. sc. Anita Hafner**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Mario Jug, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Biopharmaceutical characterisation of *in situ* gelling fluticasone propionate delivery system using Calu-3 epithelial cell model

Stefanie Bobičanec

Nasal drug administration is the first choice in treatment and prevention of diseases of the nasal mucosa. It also proves to be a promising alternative route for systemic drug delivery and offers possibility of direct nose-to-brain delivery. Versatile drug delivery systems are being developed to improve the therapeutic effect of nasally administered drugs, however, their impact on drug permeability and biocompatibility *in vitro* need to be evaluated in the early stage of their development.

The aim of this study was to prepare *in situ* gelling fluticasone propionate delivery systems and to evaluate their biocompatibility as well as permeability of incorporated fluticasone propionate using a Calu-3 epithelial cell model.

In situ gelling delivery systems for fluticasone propionate (0.058%, w/w), containing surfactant polysorbate 80 (0.01-0.05%, w/w), polymers pectin (0.66%, w/w), sodium hyaluronate (0-0.05%, w/w) and gellan gum (0-0.2%, w/w), and mannitol (4%, w/w) as isotonicizing agent, were successfully prepared. Calu-3 cells were grown at 37°C, 5% CO₂, and 95% relative humidity, using Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and 1% of antibiotics penicillin and streptomycin. *In situ* gelling fluticasone propionate delivery systems were shown to be biocompatible with Calu-3 model cells of respiratory epithelium. Cell viability after two-hour exposure to the tested systems ranged from 81.2 ± 4.7% to 103.0 ± 9.9%. For all *in situ* gelling systems, a reversible positive effect on the TEER values of the cell monolayer was observed during the permeability assay. Polysorbate 80 showed no concentration-related effect on fluticasone propionate permeability across Calu-3 cell monolayer.

In conclusion, *in situ* gelling fluticasone propionate delivery systems showed the potential for nasal administration considering their *in vitro* biocompatibility and drug permeability. The results of this study can be applied for further research in the field of nasal application of *in situ* gelling systems.

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

Thesis includes: 45 pages, 12 figures, 4 tables and 85 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nasal delivery, *in situ* gelling system, fluticasone propionate, Calu-3, biocompatibility, permeability

Mentor: **Anita Hafner, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Hafner, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Mario Jug, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dubravka Vitali Čepo, Ph.D., Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2020.