

# Priprava i karakterizacija in situ gelirajućih otopina donepezila za nazalnu primjenu

---

Župančić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:538856>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-02**



Repository / Repozitorij:

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



**Sara Župančić**

**Priprava i karakterizacija *in situ* gelirajućih  
otopina donepezila za nazalnu primjenu**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad prijavljen je Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, kolegiju Farmaceutika 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 stručnom savjetovanju, strpljenju i susretljivosti tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem asistentici Mirni Perkušić, mag. pharm. na pomoći i trudu tijekom izrade ovog rada te svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na lijepo provedenom vremenu u laboratoriju.*

*Posebno zahvaljujem svojoj obitelji, osobito roditeljima, nećakinjama i nećacima na stalnoj podršci i motivaciji.*

*Hvala svim prijateljicama, osobito Antoniji Tržić i svim dragim ljudima na pomoći, podršci i lijepim uspomenama tijekom studiranja.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Alzheimerova bolest.....	1
1.2. Donepezil.....	2
1.3. Nazalna primjena lijekova.....	3
1.3.1. Izravna dostava lijeka iz nosne šupljine u mozak.....	4
1.4. Nazalna primjena donepezila .....	6
1.5. <i>In situ</i> gelirajući sustavi.....	7
1.6. Kitozan .....	7
1.6.1. Derivati kitozana .....	9
1.6.2. Geliranje kitozana.....	9
1.6.3. Termoosjetljivi <i>in situ</i> gelirajući kitozanski sustavi .....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Materijali .....	14
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Priprema <i>in situ</i> gelirajućih otopina donepezila .....	14
3.2.2. UV-Vis spektrofotometrijsko određivanje koncentracije donepezila u <i>in situ</i> gelirajućim otopinama .....	15
3.2.3. Reološka karakterizacija <i>in situ</i> gelirajućih otopina donepezila.....	15
3.2.3.1. Određivanje temperature geliranja .....	16
3.2.3.2. Određivanje vremena geliranja.....	16
3.2.3.3. Određivanje krivulje tečenja.....	17
3.2.3.4. Određivanje viskoznosti u mirovanju.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	18
4.1. Priprema i osnovna karakterizacija <i>in situ</i> gelirajućih otopina donepezila .....	18
4.2. Vrijeme geliranja .....	19
4.3. Temperatura geliranja.....	21
4.4. Krivulja tečenja .....	22
4.5. Viskoznost u mirovanju.....	23
5. ZAKLJUČCI .....	25
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....	26
7. LITERATURA .....	27
8. SAŽETAK/SUMMARY .....	32

# 1. UVOD

## 1.1. Alzheimerova bolest

Najčešći uzrok demencije u starijih je Alzheimerova bolest. Bolest karakterizira prisutnost  $\beta$ -amiloidnih plakova i citoplazmatskih, a u uznapredovaloj fazi bolesti i ekstracelularnih neurofibrilarnih snopova koji su nakupine hiperfosforiliranog tau proteina (Atri, 2019). Naime, promjene u aktivnosti sekretaza koje cijepaju amiloidni prekursorski protein (APP; integralni protein stanične membrane) rezultiraju oligomerizacijom  $\beta$ -amiloidnih peptida što rezultira ometanjem prijenosa signala u sinaptičkoj pukotini. Posljedično nastaju netopljivi  $\beta$ -amiloidni plakovi koji se nakupljaju u različitim dijelovima mozga u kojima potiču upalni odgovor te uzrokuju propadanje neurona (Khan i sur., 2020; Tiwari i sur., 2019). Tau protein je mikrotubularni neuronalni protein koji ima fiziološku ulogu u održavanju integriteta citoskeleta. Vezanje na mikrotubule je regulirano fosforilacijom. Hiperfosforilirani tau protein ima smanjeni afinitet vezanja za mikrotubule te se taloži u citosolu. Time se narušava struktura stanice i ometa sinaptička transmisija signala pa stanica degenerira (Khan i sur., 2020).

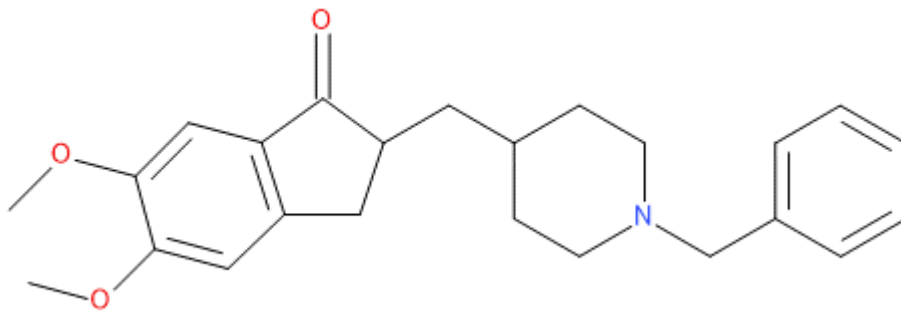
Navedeni procesi rezultiraju gubitkom sinapsi i neurona, gliozom, te smanjenom kolinergičkom aktivnosti u korteksu mozga. Patološka oštećenja koreliraju sa simptomima iako su u početku asimptomatska. U uznapredovaloj fazi Alzheimerove bolesti, pri pojavi simptoma demencije opažene su kortikalne ili kortiko-subkortikalne mikrohemoragije (Atri, 2019).

Simptomi se u početku očituju poteškoćama u pamćenju i prisjećanju nedavnih događaja, depresijom i apatijom, dok se u kasnijim stadijima bolesti javlja dezorijentiranost, smanjena sposobnost prosuđivanja, konfuzija i promjene ponašanja. Pacijenti u uznapredovaloj fazi mogu imati poteškoća s gutanjem, govorom i kretanjem (2020 Alzheimer's disease facts and figures).

Pojava bolesti povezana je s genskim čimbenicima. U najčešćem tipu Alzheimerove bolesti u pacijenata starijih od 65 godina zabilježena je povezanost apolipoproteina E, odnosno alela APO- $\epsilon$ 4, s ubrzanim odlaganjem  $\beta$ -amiloidnih plakova i pojavom simptoma. Mutacije prezentilina 1, APP-a i prezentilina 2 pojavljuju se kod familijarne autosomalno dominantne Alzheimerove bolesti. Ona se pojavljuje rjeđe, u manje od 1 % slučajeva, te su pacijenti s izraženim simptomima mlađi od 65 godina. Istraživanja su usmjerena prema uspostavljanju pouzdanih metoda ranog dijagnosticiranja bolesti (Atri, 2019).

## 1.2. Donepezil

U liječenju simptoma Alzheimerove bolesti najviše se koriste lijekovi inhibitori acetilkolinesteraze među koje se ubraja donepezil (Slika 1.). Ti lijekovi sprječavaju razgradnju acetilkolina te time povećavaju kolinergičku neurotransmisiju u mozgu (Birks i Harvey, 2018).



**Slika 1.** Struktura donepezila. Nacrtano pomoću programa Biovia draw 2017.

Donepezil je selektivniji prema acetilkolinesterazi u središnjem živčanom sustavu dok ima manji afinitet prema periferiji. Najčešće je korišten inhibitor acetilkolinesteraze u liječenju Alzheimerove bolesti ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Poboljšava kognitivne sposobnosti i ponašanje, ali nema dokaza da mijenja tijek bolesti (Zhang i sur., 2022).

Donepezil je u Hrvatskoj odobren u obliku filmom obloženih tableta i raspadljivih tableta. Ima dugo vrijeme polueliminacije (70 sati) što mu omogućava primjenu jednom dnevno u uobičajenoj dozi od 5 do 10 mg. Dnevna doza donepezila može se povećati na 23 mg. Dostupne su i filmom obložene tablete koje uz donepezil sadržavaju i memantin koji je antagonist N-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora u mozgu. Djelovanjem na spomenute receptore memantin pospješuje transmisiju živčanih signala i kognitivne funkcije ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

Donepezil se metabolizira preko CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 i CYP2C9 enzima u jetri. Utvrđen je utjecaj genskog polimorfizma CYP2D6 i CYP3A4 te alela za apolipoprotein E na djelovanje ovog lijeka (Pooladgar i sur., 2022). Rijetke su interakcije s drugim lijekovima od kojih se ističe interakcija s lijekovima koji djeluju na kolinergički sustav. Kronična primjena u dozama većim od 10 mg dnevno može rezultirati ozbiljnim nuspojavama (Agrawal i sur., 2018). Nuspojave su ovisne o dozi te su najčešće kolinergičke kao što su mučnina, povraćanje, dijareja, nesаница, umor, anoreksija te grčevi u mišićima. Druge potencijalne nuspojave su bradikardija, zatajenje srca, retencija urina, konvulzije, halucinacije i gastrointestinalno

krvarenje ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Kako bi se smanjila mogućnost razvoja nuspojava, razmatra se nazalna primjena donepezila kojom bi se reducirala sistemska izloženost lijeku (Espinoza i sur., 2019).

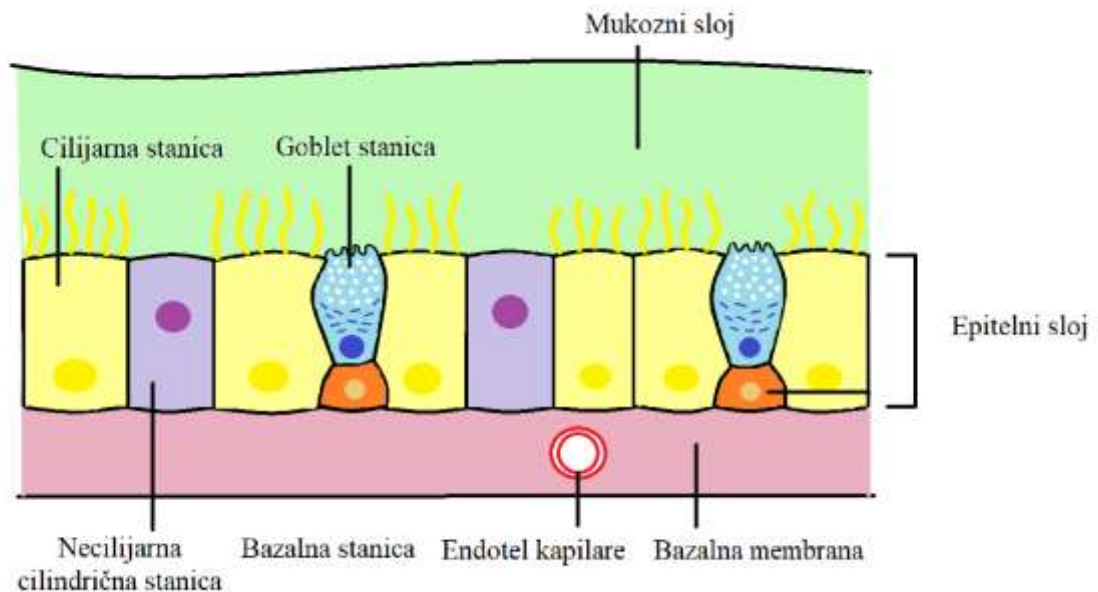
### **1.3. Nazalna primjena lijekova**

Nazalna primjena lijekova pruža mogućnost lokalne dostave (liječenja oboljenja nosne sluznice), sistemskog učinka (za lijekove koji se apsorbiraju preko nosne sluznice) te izravne dostave lijekova u mozak. Karakterizira je neinvazivnost, suradljivost pacijenata koji mogu jednostavno i samostalno uzimati lijek, relativno mala enzimaska aktivnost na mjestu primjene, prikladan profil apsorpcije te brz početak djelovanja. Potencijal izravne dostave nazalno primijenjenog lijeka u mozak uz zaobilaznje krvno-moždane barijere pruža mogućnost povećanja raspoloživosti lijeka na mjestu učinka u liječenju tumora mozga i degenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest i moždani udar. Nedostaci nazalnog puta primjene su relativno brza eliminacija lijeka s nosne sluznice, moguća niska bioraspoloživost te potencijalni štetni učinak na nosnu sluznicu. Doziranje je ograničeno, a za željeni učinak važna je pravilna primjena lijeka (Tai i sur., 2022).

Nosna šupljina podijeljena je na vestibularnu, respiratornu i olfaktornu regiju. Vestibularna regija nalazi se u prednjem području nosne šupljine. Unutarnjom nosnom valvulom (mjestom najvećeg suženja) odijeljena je od dubljih dijelova nosne šupljine koji obuhvaćaju respiratornu i olfaktornu regiju (Sobieski i Munakomi, 2023). Respiratorna regija zauzima najveći dio nosne šupljine. Predstavlja ciljnu regiju za dostavu lijekova s lokalnim učinkom kao i za postizanje sistemske raspoloživosti lijeka. Olfaktorna regija nalazi se u gornjem dijelu nosne šupljine. To je glavno interesno područje preko kojeg se nazalno primijenjeni lijek najvećim dijelom izravno dostavlja do mozga (Agrawal i sur., 2018).

Nosnu sluznicu čini epitel ispod kojeg se nalaze bazalna membrana i lamina propria. Glavne stanice koje se nalaze u ovom području su bazalne stanice te vrčaste stanice, cilijarne i necilijarne cilindrične stanice koje se nalaze u apikalnom dijelu epitela. Bazalne stanice nalaze se iznad bazalne membrane te prema potrebi mogu rasti i sazrijevati u stanice svakog područja nosne šupljine. Vrčaste (goblet) stanice izlučuju sluz koja sadrži mucin na površinu sluznice, a cilijarne cilindrične stanice povećavaju apsorpcijsku površinu. Pri apsorpciji u cirkulaciju molekula mora proći sloj sluzi, epitel, stromu, bazalnu membranu i endotel kapilare (Slika 2.).

Potrebna je brza apsorpcija preko sluznice jer će u protivnom molekula biti odstranjena mukocilijarnim klirensom (Erdő i sur., 2018; Tai i sur., 2022).



**Slika 2.** Struktura nazalne sluznice (slika izrađena po uzoru na Tai i sur., 2022).

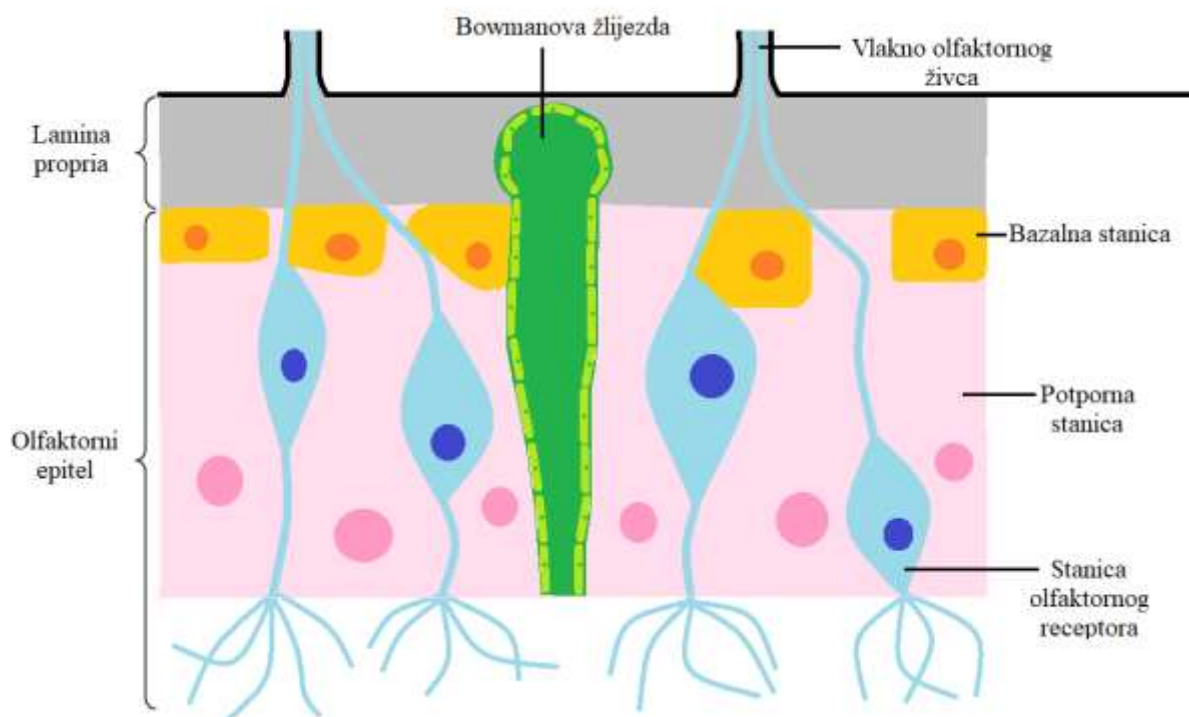
### 1.3.1. Izravna dostava lijeka iz nosne šupljine u mozak

Mozak je zaštićen od ostatka organizma intersticijskom tekućinom u parenhimu mozga i cerebrospinalnom tekućinom koja se nalazi u ventrikulima mozga i cerebrospinalnom subarahnoidalnom prostoru. Krvno-moždana barijera i krvno-cerebrospinalna barijera ograničavaju prolazak raznih endogenih i egzogenih tvari iz sistemske cirkulacije u mozak. Više od 98 % molekula male molekulske mase te oko 100 % molekula velike molekulske mase ne uspijeva prijeći navedene barijere (Rassu i sur., 2016).

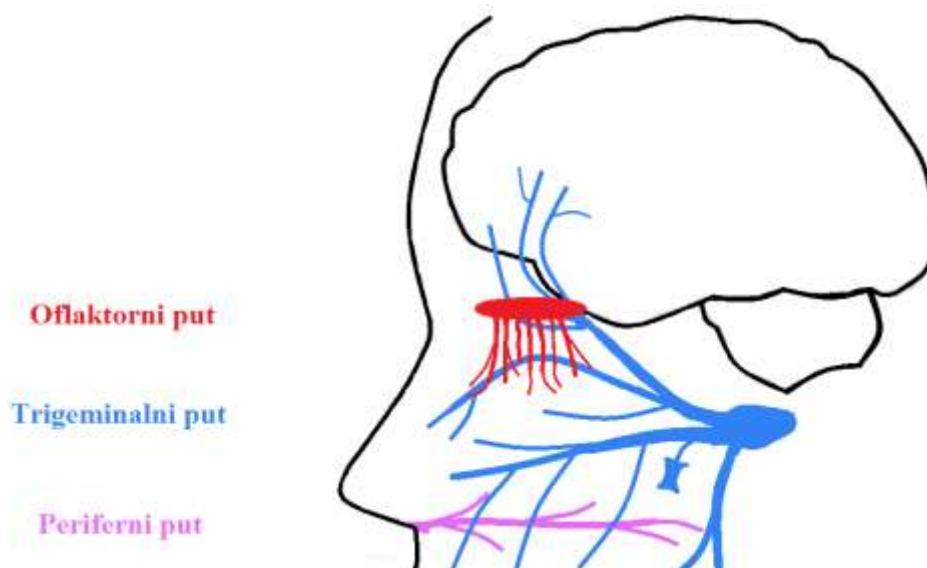
Nazalno primijenjeni lijek može doći do mozga preko olfaktornog živca (Slika 3.), trigeminalnog živca i perifernim putem preko sistemske cirkulacije (Slika 4.). Olfaktorni epitel sastoji se od bazalnih, potpornih i stanica olfaktornog živca. Molekula lijeka se preko olfaktornog živca transportira u olfaktorni bulbus. Moguć je transport ulaskom u neuron, ekstracelularni transport preko međustaničnog prostora te unutarstanični transport preko bazalnih epitelnih stanica. Neuralnim transportom molekula endocitozom ili pinocitozom dolazi do olfaktornog bulbosa nakon čega se egzocitozom doprema do različitih dijelova mozga. Ekstraneuralnim putem molekule lijeka prolaze međustaničnim prostorom između



stanica olfaktornog živca u olfaktornom epitelu. Nakon stizanja do olfaktornog bulbosa difuzijom prelaze u ostale dijelove mozga. Transport preko trigeminalnog živca koji inervira olfaktorni i respiratorni epitel nazalne sluznice je od manjeg značaja. Perifernim putem molekule lijeka ulaze u sistemska cirkulaciju te za prelazak u mozak trebaju prijeći krvno-moždanu barijeru. Nedostaci tog puta su potencijalna periferna djelovanja, vezanje lijeka na proteine plazme, razgradnja plazmatskim proteazama te izlučivanje putem bubrega. Takav put primjereniji je za lipofilne molekule male molekulske mase (Tai i sur., 2022).



**Slika 3.** Olfaktroni epitel (slika izrađena po uzoru na [www.britannica.com](http://www.britannica.com)).



**Slika 4.** Shematski prikaz putova dostave lijeka od nosne sluznice do mozga (slika izrađena po uzoru na Tai i sur., 2022).

#### 1.4. Nazalna primjena donepezila

Nazalna primjena donepezila istražuje se s ciljem povećanja raspoloživosti lijeka u mozgu. Ovaj bezbolni put primjene pogodniji je za starije pacijente koji mogu imati poteškoća s gutanjem oralnih oblika. Enzimaska razgradnja lijeka na mjestu primjene značajno je manja nego nakon oralne primjene, apsorpcija je brža te se izbjegava metabolizam prvog prolaska kroz jetru. Smanjena je mogućnost razvoja nuspojava jer se lijek primjenjuje lokalno pa je sistemska izloženost lijeku smanjena. Omogućena je ciljana dostava lijeka iz nosne šupljine preko olfaktornog i trigeminalnog živca u mozak. Na taj se način zaobilazi krvno-moždana barijera (Espinoza i sur., 2019).

Ograničavajući čimbenici nazalnog puta primjene nastoje se prevladati razvojem naprednih farmaceutskih oblika lijeka (Espinoza i sur., 2019). Primjerice, *in vivo* studijom u zečeva istraživana je nazalna primjena donepezilklorida uklopljenog u liposome obložene tioliranim kitozanom. Postignuta je veća koncentracija lijeka u krvi i mozgu u usporedbi s oralnom primjenom donepezilklorida u obliku tableta (Al Harthi i sur., 2019).

Ispitivane su i otopine donepezilklorida i kitozana (1 %, *m/m*) ili Pluronica F-127 (18 %, *m/m*) kao potencijalne formulacije za nazalnu primjenu. Proučavan je i utjecaj otapala Transcutola<sup>®</sup> P (20 %, *m/m*) na permeaciju donepezilklorida. Svaka je formulacija sadržavala donepezilklorid

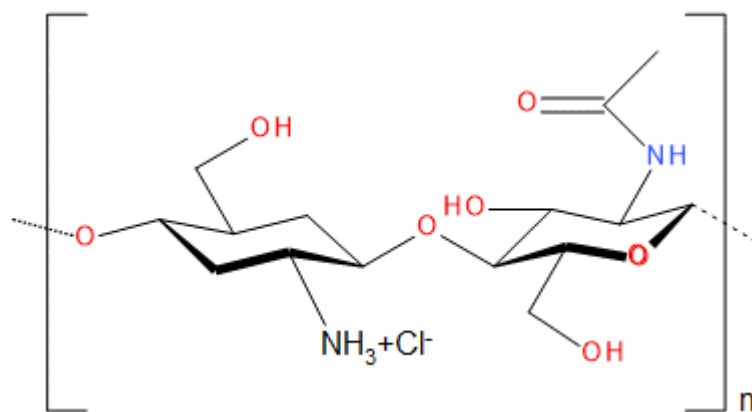
u koncentraciji od 6,25 mg mL<sup>-1</sup>. Temperatura geliranja formulacije koja je sadržavala Pluronic F-127 iznosila je 32,5 °C. Navedena formulacija je karakterizirana boljim svojstvima permeacije i oslobađanja lijeka u odnosu na onu koja je sadržavala kitozan. Uporabom otapala Transcutola® P poboljšana je permeacija lijeka *in vitro* kroz sluznicu nosa svinje. Ispitivane formulacije bile su stabilne pri temperaturi od 30 do 40 °C te nisu pokazale toksična svojstva za sluznicu (Espinoza i sur., 2022).

### 1.5. *In situ* gelirajući sustavi

*In situ* gelirajući sustavi (otopine i suspenzije) primjenjuju se u obliku tekućine koja gelira pri određenim fiziološkim uvjetima. Zbog stabilnosti, netoksičnosti, i potencijala dostave potrebne doze lijeka, navedeni sustavi sve više se istražuju. Osiguravaju precizno doziranje, dulje zadržavanje formulacije na mjestu primjene, smanjeno istjecanje niz nos ili u grlo i smanjenu nazalnu enzimsku razgradnju lijeka. Također pružaju mogućnost maskiranja okusa lijeka te je primjena olakšana čime se poboljšava suradljivost pacijenata. Geliranje na mjestu primjene može biti potaknuto temperaturom, promjenom pH vrijednosti, prisustvom određenih iona, enzima ili svjetlošću određene valne duljine. *In situ* gelirajući sustavi prikladni su za oblikovanje lijekova sa sistemskim i lokalnim učinkom (Laffleur i Bauer, 2021; Vigani i sur., 2020).

### 1.6. Kitozan

Kitozan (Slika 5.) je biokompatibilni, biorazgradljivi i netoksični linearni polisaharid D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina. Dobiva se deacetilacijom hitina, drugog najzastupljenijeg polisaharida u prirodi kojeg sadržavaju ljuštore morskih organizama (rakova i školjkaša) te insekti, alge, gljivice i plijesni (Sacco i sur., 2018; [www.pubchem.com](http://www.pubchem.com)).



**Slika 5.** Podjedinica strukture kitozana sastavljena od D-glukozamina i N-acetilglukozamina. Nacrtano pomoću programa Biovia draw 2017.

Svojstva kitozana ovise o stupnju deacetilacije, polidisperznosti i molekularnoj masi (Hamedi i sur., 2022). Kitozan nije topljiv u vodi, alkalijama i većini organskih otapala (Tang i sur., 2023).

Protonacija amino skupine čini ga topljivim u vodi pri kiselim uvjetima, a pKa vrijednost mu iznosi između 6,3 i 7,2 (Sacco i sur., 2018).

Kitozan i njegovi derivati pokazuju antibakterijsku, antitumorsku, antioksidativnu i antiviralnu aktivnost. Mogu potaknuti agregaciju eritrocita i aktivaciju trombocita te sustava komplementa (Wang i sur., 2020). Zbog utjecaja na zgrušavanje krvi kitozan se koristi u kontroli hemostaze (Notario-Pérez i sur., 2022). Antibakterijska svojstva se uglavnom objašnjavaju elektrostatskim interakcijama  $\text{NH}_3^+$  skupina kitozana i stanične stijenke bakterija koja je negativno nabijena. Mijenjanjem molekulske mase i koncentracije kitozana mogu se modulirati antimikrobni učinci (Sacco i sur., 2018). Zbog svojih dobrih svojstava ima široku primjenu, npr. u farmaceutskoj, prehrambenoj i kemijskoj industriji. U biomedicinskom području primjenjuje se u izradi obloga za rane te kao biokompatibilni materijal u kirurgiji, stomatologiji i tkivnom inženjerstvu. Ispituje se u izradi naprednih terapijskih sustava za primjenu lijekova kao mukoadhezivni polimer sa svojstvom poboljšanja permeacije i prilagođavanja oslobađanja lijeka iz nosača (Tang i sur., 2023). Proučava se primjena derivata kitozana kao adjuvanta i nosača cjepiva te u ciljanoj dostavi lijekova (Wang i sur., 2020).

U formulacijama s kitozonom problem mogu predstavljati prisutne nečistoće od kojih se izdvajaju teški metali, pepeo i proteini. Prisutni proteini mogu potaknuti imunski odgovor dok s pepelom mogu ometati otapanje kitozana (Georgieva i sur., 2023).

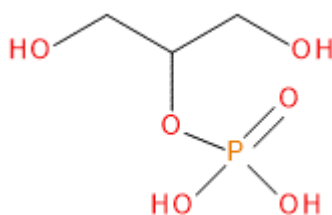
### 1.6.1. Derivati kitozana

Topljivost kitozana u vodi može se povećati uvođenjem alkilne skupine koja slabi međumolekulske vodikove veze. Tako modificiran kitozan se zbog svog antibakterijskog djelovanja i poticanja koagulacije može primijeniti za izradu obloga za rane. Moguća je i primjena u pročišćavanju vode jer zbog svog pozitivnog naboja može adsorbirati anionske surfaktante. Uvođenjem hidrofilne skupine kao što je karboksilna skupina poboljšava se topljivost kitozana u neutralnom i alkalnom mediju. Taj derivat kitozana primjenjuje se u mnogim područjima kao što su industrija, agronomija, biokemija i medicina. Bolje stvara film, zadržava toplinu i flokulira. Karboksimetilkitozan se odlikuje antibakterijskom aktivnošću koja ima pozitivan učinak na cijeljenje rana. Derivatizacija kitozana u kvaternu amonijevu sol rezultira slabljenjem vodikovih veza i povećanjem topljivosti u vodi. Poboljšavaju se i antibakterijska svojstva koja omogućuju njegovu primjenu u protuupalnim lijekovima i oblogama za rane. Taj derivat kitozana pokazuje i povećanu biokompatibilnost, biorazgradljivost, netoksičnost, biološki učinak te mukoadhezivnost. Esterifikacijom kitozana sumpornom kiselinom dobiva se derivat s poboljšanim antikoagulacijskim svojstvima zbog strukturne sličnosti s heparinom. Eteri kitozana topljivi su u vodi, nisu toksični te dobro zadržavaju vlagu. Pokazuju i bakteriostatski učinak koji im omogućuje primjenu u biomedicini. Dodavanjem acilne skupine u molekulu kitozana mijenja se pH vrijednost pri kojoj kitozanski sustavi geliraju što omogućava ciljano oslobađanje uklopljenog lijeka (Wang i sur., 2020). Derivati kitozana uzimani kao dodaci prehrani pokazuju hipoglikemijski učinak. Snižavaju razine ukupnog kolesterola i triglicerida u krvi i jetri (Ahn i sur., 2021).

### 1.6.2. Geliranje kitozana

Kitozanski gel nastaje uslijed elektrostatskih i hidrofobnih interakcija te vodikovih veza. Modifikacijom fizičkih i kemijskih čimbenika, kao što su pH, temperatura, ionska jakost i dodatak protuiona moguće je potaknuti prijelaz iz *sol* u *gel* stanje (Sacco i sur., 2018). U kiselom mediju (do pH 6,2) protoniraju se amino skupine kitozana. Neutralizacijom vodene otopine kitozana i povišenjem pH iznad 6,2 nastaje precipitat u obliku hidrogela (Zhou i sur., 2015). Poliolfosfati kao što su  $\beta$ -glicerofosfat (Slika 6.), glukoza-1-fosfat i glukoza-6-fosfat utječu na geliranje kitozana. Povećanjem poliolskog dijela molekule sprječavaju se interakcije među lancima kitozana što ometa geliranje.  $\beta$ -glicerofosfat pospješuje umrežavanje lanaca kitozana. Pod utjecajem topline protoni prelaze s kitozana na  $\beta$ -glicerofosfat što rezultira neutralizacijom naboja. Između polimernih lanaca kitozana uspostavljaju se hidrofobne

interakcije te nastaje gel pod utjecajem privlačnih unutarlančanih sila (Sacco i sur., 2018). Između kitozana (polikationa) i polianiona uspostavljaju se jake veze koje sprječavaju odvajanje polimernih lanaca, a veći stupanj umrežavanja lanaca osigurava bolju kontrolu oslobađanja lijeka i bolje prianjanje na mukoza (Cazorla-Luna i sur., 2021). Dodatkom  $\beta$ -glicerofosfata postiže se geliranje ovisno o temperaturi, pri fiziološkom pH (7,0-7,4) (Zhou i sur., 2015).



**Slika 6.** Struktura  $\beta$ -glicerofosfata. Nacrtano pomoću programa Biovia draw 2017.

### 1.6.3. Termoosjetljivi *in situ* gelirajući kitozanski sustavi

Kitozan pospešuje apsorpciju hidrofilnih lijekova male molekulske mase te peptida i proteina. Otopina kitozana, poliola i lijeka primijenjena u nosnu šupljinu gelira pri fiziološkoj temperaturi nosne sluznice (Tablica 1.). Posljedično smanjuje mukocilijarni klirens, istjecanje lijeka iz nosa ili u grlo te omogućava produljeno oslobađanje lijeka (Gholizadeh i sur., 2019a).

**Tablica 1.** Termoosjetljivi kitozanski nazalni *in situ* gelirajući sustavi s poliolima

Djelatna tvar	Komentar	Literatura
Ibuprofen	Geliranje postignuto unutar 2 do 7 minuta pri 30-35 °C	(Gholizadeh i sur., 2019a)
Traneksamična kiselina	Geliranje postignuto unutar približno 5 minuta pri 32 °C	(Gholizadeh i sur., 2019b)
Doksepin	Geliranje postignuto nakon 7 minuta pri 37 °C	(Naik i Nair, 2014)

Kitozan ostvaruje elektrostatske interakcije sa sijalinskom kiselinom u nazalnoj mukozi te omogućuje reverzibilno otvaranje međustaničnih čvrstih spojeva (engl. *tight junctions*) čime povećava permeaciju lijeka, odnosno paracelularni transport hidrofилnih molekula kroz epitel nosne sluznice (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012; Gholizadeh i sur., 2019a). Kapljice raspršenog spreja trebaju biti veće od 10  $\mu\text{m}$  kako ne bi dospjele do pluća (Casettari i Illum, 2014).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Porastom udjela starijeg stanovništva raste broj oboljelih od Alzheimerove bolesti koja je jedan od vodećih uzroka demencije (Atri, 2019). Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj novih lijekova i novih farmaceutskih oblika u svrhu poboljšanja ishoda liječenja Alzheimerove bolesti. Među odobrenim lijekovima trenutno su najzastupljeniji inhibitori acetilkolinesteraze koji djeluju samo na simptome bolesti, dok njihov utjecaj na tijek bolesti nije utvrđen. Navedeni lijekovi sprječavaju razgradnju acetilkolina te time povećavaju kolinergičku neurotransmisiju u mozgu, poboljšavajući kognitivne funkcije. Donepezil je najčešće korišteni selektivni i reverzibilni inhibitor acetilkolinesteraze, a na našem tržištu dostupan je u obliku tableta (Colovic i sur., 2013, [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

*In situ* gelirajući sustavi razmatraju se kao inovativni farmaceutski oblici za nazalnu primjenu donepezila, s potencijalom povećane bioraspoloživosti, smanjene doze i olakšane primjene u odnosu na oralnu primjenu, koja može biti otežana zbog problema s gutanjem. *In situ* gelirajući sustavi su tekući pri sobnoj temperaturi, a geliraju prilikom kontakta sa sluznicom nosa. Zahvaljujući geliranju, lijek se dulje zadržava na mjestu primjene, odnosno smanjuje se istjecanje formulacije izvan interesnog područja. Nazalna primjena lijeka smanjuje rizik od nuspojava te omogućuje zaobilazak krvno-moždane barijere i izravnu dostavu lijeka u mozak. Pritom je najznačajniji put izravne dostave preko olfaktornog živca (Espinoza i sur., 2019).

Cilj ovog rada bio je pripremiti i karakterizirati *in situ* gelirajuće sustave za nazalnu primjenu donepezila, temeljene na kitozanu kao gelirajućem polimeru. Kitozan i njegovi derivati široko se primjenjuju u biomedicini te se koriste u istraživanju i razvoju naprednih formulacija za nazalnu primjenu (Desai i sur., 2023). Gelirani kitozanski sustavi bolje adheriraju na sluznicu i pružaju bolju kontrolu oslobađanja lijeka (Cazorla-Luna i sur., 2021). Geliranje kitozana pri fiziološkoj temperaturi i pH nosne sluznice moguće je postići dodatkom beta-glicerofosfata (Zhou i sur., 2015). Kombinacija niskomolekulskog kitozana s beta-glicerofosfatom je u dosadašnjim ispitivanjima rezultirala *in situ* gelirajućim sustavima prikladnih reoloških svojstava za nazalnu primjenu (Gholizadeh i sur., 2019a).



Specifični ciljevi ovog rada bili su:

- pripremiti *in situ* gelirajuće otopine donepezila pri različitim koncentracijama donepezila i niskomolekulskog kitozana
- odrediti pH i sadržaj donepezila u pripremljenim *in situ* gelirajućim otopinama
- ispitati utjecaj koncentracije donepezila i kitozana u *in situ* gelirajućim otopinama na:
  - temperaturu geliranja,
  - vrijeme geliranja,
  - krivulju tečenja,
  - viskoznost u mirovanju.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korišteni su donepezilklorid (dalje u tekstu donepezil; Carbosynth Limited, Ujedinjeno Kraljevstvo), dinatrijev beta-glicerofosfat pentahidrat (dalje u tekstu  $\beta$ -GP; Biosynth s.r.o., Slovačka) i niskomolekulski kitozan molekulske mase 50 – 190 kDa uz stupanj deacetilacije 75–85 % (dalje u tekstu kitozan; Sigma Aldrich Chemie, Njemačka). Sve ostale tvari korištene u ovom istraživanju bile su visoke čistoće i nabavljene su od Kemike, Hrvatska.

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Priprema *in situ* gelirajućih otopina donepezila

Koncentrirana otopina  $\beta$ -GP-a ( $490 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pripravljena je otapanjem krutine u pročišćenoj vodi na magnetskoj miješalici, te je otopina sonicirana na ultrazvučnoj kupelji (Bandelin, Sonorex digiplus, Njemačka) još 30 minuta do potpunog otapanja. Koncentrirane otopine kitozana ( $10$  i  $15 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pripravljene su u 0,5 % (V/V) octenoj kiselini, uz miješanje tijekom 24 sata na magnetskoj miješalici. Pripravljene otopine kitozana profiltrirane su pomoću vakuumske pumpe te je u filtriranim otopinama kitozana otopljen donepezil. Otopini kitozana i lijeka je pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (u ledenoj kupelji) pipetom, kap po kap, dodavana ohlađena otopina  $\beta$ -GP-a u volumnom omjeru 1:1,6, te su tako pripravljene formulacije miješane u ledenoj kupelji još 10 minuta. Konačni sastav otopina prikazan je u Tablici 2. Uzorcima je izmjerena pH vrijednost korištenjem S47 SevenMulti pH metra (Mettler Toledo GmbH, Švicarska).

**Tablica 2.** Sastav *in situ* gelirajućih otopina donepezila

Formulacija	Koncentracija kitozana ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Koncentracija $\beta$ -GP-a ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Koncentracija donepezila ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Maseni omjer kitozan : $\beta$ -GP
1	6,15	188,46	0,40	1 : 30
2	9,23	188,46	0,40	1 : 20
3	6,15	188,46	0,50	1 : 30
4	9,23	188,46	0,50	1 : 20
5	6,15	188,46	0,60	1 : 30
6	9,23	188,46	0,60	1 : 20

### 3.2.2. UV-Vis spektrofotometrijsko određivanje koncentracije donepezila u *in situ* gelirajućim otopinama

UV-Vis spektrofotometrijom određena je koncentracija donepezila u pripremljenim *in situ* gelirajućim otopinama. Alikvot uzorka (0,5 mL) pipetiran je u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopunjen otopinom octene kiseline (0,5 %, V/V) do oznake. Dobivena otopina je profiltrirana kroz membranski filter veličine pora 0,20 µm (Chromafil® Xtra PES27 20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka). Izmjerena je apsorbancija (A) UV-Vis spektrofotometrom (Slika 7.) (UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Probe, Varian, SAD) pri valnoj duljini od 271 nm. Apsorbancija je mjerena u triplikatu. Iz prethodno eksperimentalno određenog baždarnog dijagrama izračunata je koncentracija ( $c$ , µg mL<sup>-1</sup>) lijeka prema jednadžbi pravca (Dvorski, 2022):

$$A = 0,0288 c - 0,0068$$



Slika 7. UV-Vis spektrofotometar Cary 50 Probe (Varian, SAD)

### 3.2.3. Reološka karakterizacija *in situ* gelirajućih otopina donepezila

Reološka ispitivanja provedena su na modularnom kompaktnom reometru MCR 102 koji je prikazan na Slici 8. (Anton Paar GmbH, Austrija). Uzorci su prije samih mjerenja bili temperirani na sobnu temperaturu te su sva ispitivanja izvedena u duplikatu. Podaci prikupljeni reološkim ispitivanjima obrađeni su i analizirani softverom RheoCompass™ (Anton Paar GmbH, Austrija).



Slika 8. Reometar MCR 102 (Anton Paar GmbH, Austrija)

### 3.2.3.1. Određivanje temperature geliranja

Oscilacijskim testom promjene temperature (engl. *temperature sweep test*) određena je temperatura prijelaza pripremljenih *in situ* gelirajućih otopina donepezila iz *sol* u *gel* stanje. Testom se prati ovisnost modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) o temperaturi. Temperatura geliranja određena je iz točke križanja krivulja  $G'$  i  $G''$ , odnosno iz točke u kojoj vrijedi  $G'=G''$  (Ramli i sur., 2022). Pri mjerenju je korišten mjerni sustav paralelnih ploča PP50 (engl. *parallel plate*, promjera 50 mm) pri udaljenosti gornje i donje mjerne ploče od 0,5 mm. Test je proveden pri kutnoj frekvenciji od  $6,28 \text{ rad s}^{-1}$  i smičnoj deformaciji od 1 %. Promatrane su promjene  $G'$  i  $G''$  u temperaturnom intervalu od 20 do 40 °C s linearnim povećanjem temperature od 1 °C po minuti. Pojedinačno mjerenje je trajalo 20 minuta.

### 3.2.3.2. Određivanje vremena geliranja

Oscilacijskim testom vremena geliranja (engl. *gelation time test*) određeno je vrijeme do prelaska *in situ* gelirajućih otopina donepezila iz *sol* u *gel* stanje pri fiziološkoj temperaturi nosne sluznice. Testom se prati ovisnost modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) o vremenu. Vrijeme geliranja je određeno iz točke za koju vrijedi  $G'=G''$  (Ramli i sur., 2022). Pri mjerenju je korišten mjerni sustav PP50 promjera 50 mm pri udaljenosti gornje i donje mjerne ploče od 0,5 mm. Kutna frekvencija iznosila je  $6,28 \text{ rad s}^{-1}$ , a smično naprežanje 1 %. Temperatura je bila postavljena na 34 °C što odgovara prosječnoj temperaturi sluznice nosa te simulira uvjete primjene lijeka (Keck i sur., 2000). Mjerenje je trajalo 20 minuta.

### 3.2.3.3. Određivanje krivulje tečenja

Rotacijskim testom ispitana je ovisnost viskoznosti ( $\eta$ , mPa s) *in situ* gelirajućih otopina donepezila o brzini smicanja ( $\dot{\gamma}$ ; s<sup>-1</sup>). Mjerenje je provedeno korištenjem mjernog sustava stožac-ploča CP50 (engl. *cone plate*, promjera 50 mm, nagiba 1°), pri udaljenosti gornjeg mjernog tijela (stošca) od donje mjerne ploče od 0,102 mm. Temperatura je bila konstantna te je iznosila 25 °C što odgovara temperaturi raspršivanja. Promatrane su promjene viskoznosti u intervalu brzine smicanja od 0,1 do 100 s<sup>-1</sup>.

### 3.2.3.4. Određivanje viskoznosti u mirovanju

Rotacijskim testom puzanja (engl. *creep test*) ispitana je ovisnost smične deformacije ( $\gamma$ ) o vremenu. Iz dobivene krivulje određena je viskoznost u mirovanju. Pri mjerenju je korišten mjerni sustav CP50-1 (promjer 50 mm i nagib 1°), pri udaljenosti gornjeg mjernog tijela (stošca) od donje mjerne ploče od 0,102 mm. Smično naprezanje bilo je konstantno te je iznosilo 0,1 Pa. Temperatura je iznosila 25 °C, mjerenje je trajalo 5 minuta.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Priprema i osnovna karakterizacija *in situ* gelirajućih otopina donepezila

U okviru razvoja naprednog tekućeg farmaceutskog oblika za nazalnu primjenu donepezila, u ovom radu pripravljeni su *in situ* gelirajući sustavi kao vodene otopine koje su sadržavale donepezil ( $0,4 - 0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ ), kitozan ( $6,15$  i  $9,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i  $\beta$ -GP ( $188,46 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Formulacije s kitozansom, donepezilom i  $\beta$ -GP-om odgovarajućih su svojstva raspršivanja i geliranja za nazalnu primjenu (Perkušić i sur., 2023). Prema literaturnim navodima, srednje i visokomolekularni kitozan u istom tipu formulacije rezultirali su precipitacijom i lošim svojstvima raspršivanja dok primijenjeni u nižim koncentracijama nisu gelirali (Perkušić i sur., 2023). Također, niskomolekularni kitozan korišten je za pripravu kitozansko-manitoljskih mikrosfera s uklopljenim donepezilom, kao praškastog oblika za nazalnu primjenu (Potočki, 2022).

U istraživanju Gholizadeh i suradnika, prilikom razvoja nazalne *in situ* gelirajuće formulacije ibuprofena korišteni su kitozani istog stupnja deacetilacije (98 %) te različite molekulske mase ( $110 - 150 \text{ kDa}$ ,  $150 - 250 \text{ kDa}$  i  $250 - 300 \text{ kDa}$ ). Najpogodnijim se pokazao sustav koji je sadržavao kitozan molekulske mase  $110 - 150 \text{ kDa}$  te  $\beta$ -GP u koncentraciji od  $190 \text{ g mL}^{-1}$  (Gholizadeh i sur., 2019a). U drugom istraživanju iste grupe istraživača uspoređivana su reološka svojstva *in situ* gelirajućih nazalnih formulacija traneksamične kiseline s kitozansom i  $\beta$ -GP-om. Korišten je kitozan molekulske mase  $110 - 150 \text{ kDa}$  i stupnja deacetilacije 98 %. Ispitivane formulacije pripremljene su miješanjem otopine kitozana (2 %, *m/V*) i  $\beta$ -GP-a (49 %, *m/V*) u volumnom omjeru 4 : 2,5. Rezultati su pokazali prihvatljiva svojstva geliranja na sluznici nosa uz produljenje vremena zadržavanja i prikladnost za primjenu u obliku nazalnog spreja (Gholizadeh i sur., 2019b).

U ovom radu, koncentracija donepezila u pripravljenim *in situ* gelirajućim otopinama izračunata je prema izmjerenim vrijednostima apsorbancije (Tablica 3.) i jednadžbi iz poglavlja 3.2.2. Uočeno je da su otopine pripravljene pri najvećoj koncentraciji donepezila ( $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ ; formulacije 5 i 6) stajanjem pri sobnoj temperaturi tijekom sat vremena postale zamućene što upućuje na stvaranje taloga te su navedeni uzorci isključeni iz daljnjih ispitivanja.

Omjer izmjerenih i teorijskih koncentracija donepezila u rasponu je od  $98,0 \pm 2,6$  do  $102,4 \pm 0,8$  %, iz čega je razvidno da izmjerene koncentracije odgovaraju teorijskim vrijednostima.

**Tablica 3.** Koncentracija donepezila u pripravljenim *in situ* gelirajućim otopinama

Uzorak	1	2	3	4
c (mg mL <sup>-1</sup> )	0,4±0,2	0,4±2,6	0,5±0,2	0,5±0,2
c <sub>exp</sub> /c <sub>teor</sub>	102,4±0,8	98,0±2,6	101,4±3,0	99,2±0,8

Omjer eksperimentalno dobivene koncentracije i teorijske koncentracije prikazan je u tablici pod c<sub>exp</sub>/c<sub>teor</sub>. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n=3).

Izmjerene pH vrijednosti *in situ* gelirajućih otopina donepezila pripravljenih u ovom radu kretale su se u rasponu od 7,36 – 7,46. Pripravljene otopine su blago alkalne, ali unutar prihvatljivog intervala pH za nosnu sluznicu (Needham, 2022). Naime, vrijednost pH sluznice nosa u intervalu je od 5,5 do 6,5. U slučaju upale, pH raste te može poprimiti vrijednosti od 7,2 do 8,3 (England et al., 1999). Kitozan je topljiv u kiselom mediju, a dodatkom β-GP-a omogućeno je geliranje pri višim fiziološkim vrijednostima pH. Dodatkom poliolfosfata, u ovom radu β-GP-a, postiže se geliranje ovisno i o temperaturi, dok je geliranje otopine samog kitozana ovisno o pH. Opisana formulacija pri fiziološkom pH predstavlja otopinu koja prelazi u gel pri temperaturi nosne sluznice (Chenite i sur., 2000).

#### 4.2. Vrijeme geliranja

Kao mehanizam zaštite donjih dišnih putova od udahnutih čestica i mikroorganizama, sluz koja prekriva nosnu sluznicu kontinuirano se čisti i obnavlja. Ovisno o području nosa potrebno je od 10 do 20 minuta za mukocilijarno čišćenje (Carlson i sur., 2018). Razvoj *in situ* gelirajućih sustava za nazalnu primjenu karakteriziranih vremenom geliranja kraćim od vremena mukocilijarnog čišćenja omogućava dulje zadržavanje u nosnoj šupljini prije uklanjanja normalnim zaštitnim fiziološkim procesima na nosnoj sluznici.

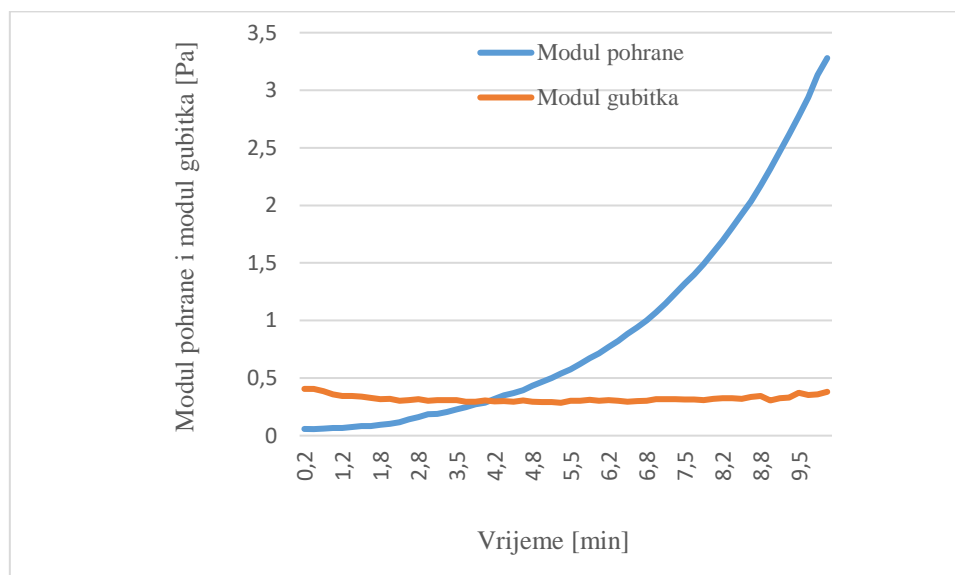
Vrijeme geliranja u ovom radu pripravljenih *in situ* gelirajućih otopina donepezila prikazano je u Tablici 4. Mjerenje je provedeno pri temperaturi sluznice nosa, odnosno pri 34 °C.

**Tablica 4.** Vrijeme geliranja *in situ* gelirajućih otopina donepezila pri 34 °C

Formulacija	1	2	3	4
Vrijeme geliranja (min)	4,4±0,4	4,2±0,0	4,9±0,1	Trenutno geliranje

Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n=2).

Formulacije 1, 2 i 3 gelirale su u vremenskom intervalu od  $4,2 \pm 0,0$  do  $4,9 \pm 0,1$  min (Slika 9.). Iz toga je razvidno da bi primijenjene na nazalnu sluznicu gelirale prije uklanjanja uobičajenim fiziološkim mehanizmima. Formulacija 4 je gelirala trenutno pri 34 °C što je čini najpovoljnijom za nazalnu primjenu.



**Slika 9.** Graf ovisnosti modula pohrane i gubitka o vremenu za *in situ* gelirajuću otopinu kitozana ( $6,15 \text{ mg mL}^{-1}$ ),  $\beta$ -GP-a ( $188,46 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i donepezila ( $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (formulacija 1).

Vremena geliranja ispitivanih *in situ* gelirajućih otopina donepezila u skladu su s literaturnim podacima o geliranju sličnih sustava razvijanih za nazalnu primjenu drugih djelatnih tvari. Primjerice, ispitan je nazalni *in situ* gelirajući sustav traneksamične kiseline pripremljen miješanjem otopine kitozana (110 - 150 kDa, 2 %, *m/V*) i  $\beta$ -GP-a (0,49 %, *m/V*) u volumnom omjeru 4:2,5. Za formulacije koje su sadržavale 0,1 %, 1% i 2 % (*m/V*) traneksamične kiseline, vrijeme geliranja iznosilo je redom  $7,99 \pm 0,38$ ,  $4,96 \pm 0,44$  i  $16,90 \pm 2,23$  min (Gholizadeh i sur., 2019b).



Proučavan je i termoosjetljivi gelirajući sustav za nazalnu primjenu doksepina. Ispitivana otopina doksepina (2 %, *m/V*), kitozana (stupanj deacetilacije 98%; 2 %, *m/V*) i  $\beta$ -GP-a (10 %, *m/m*) gelirala je nakon 7,32 minute (Naik i Nair, 2014).

### 4.3. Temperatura geliranja

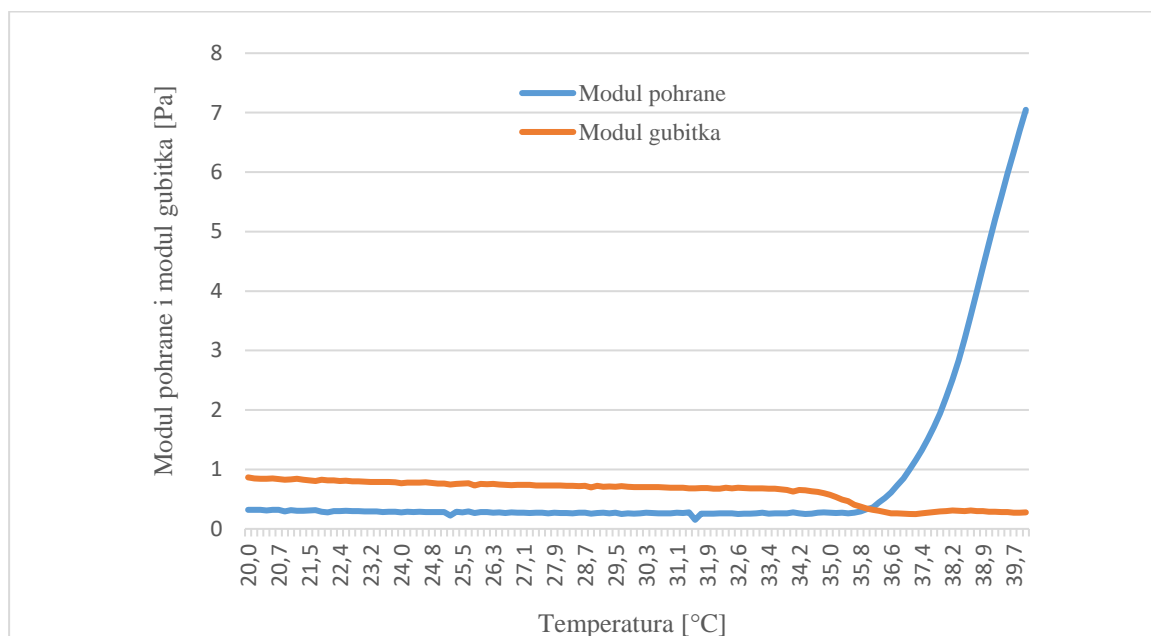
Prosječna temperatura sluznice nosa iznosi oko 34 °C. Temperatura logaritamski raste približavanjem posteriornom dijelu nosa. Najveći porast temperature udahnutog zraka odvija se između vestibularnog dijela i nazalne valvule te iznosi oko 4,5 °C (Keck i sur., 2000).

Temperatura geliranja pripremljenih *in situ* gelirajućih otopina donepezila bila je u rasponu od  $33,0 \pm 0,6$  do  $36,5 \pm 0,1$  °C (Tablica 5.; Slika 10.), što okvirno odgovara uobičajenom temperaturnom intervalu sluznice nosa (Gholizadeh i sur., 2019).

**Tablica 5.** Temperatura geliranja *in situ* gelirajućih otopina donepezila

Formulacija	1	2	3	4
Temperatura geliranja (°C)	35,1±0,1	35,9±0,1	33,0±0,6	36,5±0,1

Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=2).



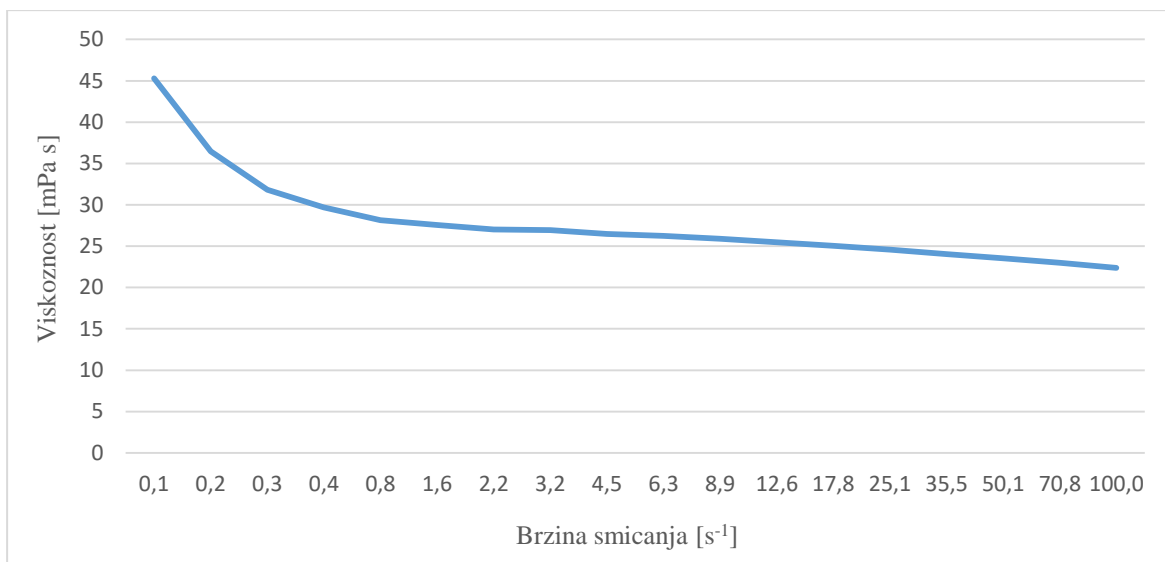
**Slika 10.** Ovisnost modula pohrane i gubitka o temperaturi za *in situ* gelirajuću otopinu kitozana (9,23 mg mL<sup>-1</sup>),  $\beta$ -GP-a (188,46 mg mL<sup>-1</sup>) i donepezila (0,4 mg mL<sup>-1</sup>) (formulacija 2).

Temperature geliranja ispitivanih *in situ* gelirajućih otopina donepezila u skladu su s literaturnim podacima o sličnim sustavima pripremljenim s drugim djelatnim tvarima. Primjerice, temperatura geliranja otopine ibuprofena ( $2284,67 \pm 152 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), kitozana (molekulske mase 110 – 150 kDa; 1,23 %, *m/V*) i  $\beta$ -GP-a ( $190 \text{ mg mL}^{-1}$ ) bila je  $35,33 \pm 0,29$  °(Gholizadeh i sur., 2019a). U ranije spomenutom istraživanju koje su proveli Naik i Nair, otopina doksepina ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), kitozana (2%, *m/V*) i  $\beta$ -GP-a (10 %, *m/m*) gelirala je pri 37,4 °C (Naik i Nair, 2014).

#### 4.4. Krivulja tečenja

Odgovarajuća reološka i mehanička svojstva *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu od velike su važnosti. Takvi sustavi bi trebali pokazivati plastična ili pseudoplastična svojstva s tiksotropijom. Dodatak kitozana formulaciji povećava viskoznost te uzrokuje pseudoplastičnost sustava. Povećana viskoznost formulacije uzrokuje smanjeno istjecanje i produljeno zadržavanje farmaceutskog oblika na nosnoj sluznici (Lee i sur., 2009).

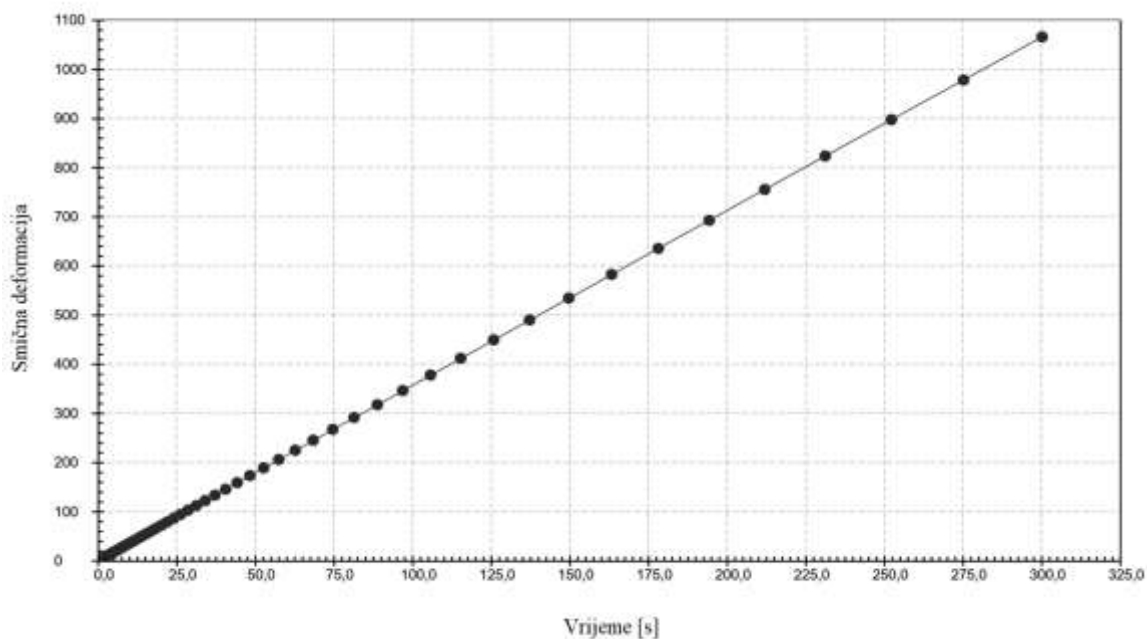
Rotacijskim testom ispitana je ovisnost viskoznosti *in situ* gelirajućih otopina donepezila o brzini smicanja. Rezultati su prikazani na Slici 11. Iz dobivenih krivulja tečenja vidljivo je da viskoznost pada s porastom brzine smicanja, odnosno s porastom smičnog naprežanja. Prema tome slijedi da su pripravljene otopine pseudoplastične. Pri graničnim vrijednostima brzine smicanja razmataju se lanci polimera te se viskoznost smanjuje (Ramli i sur., 2022). Takvo ponašanje sustava očekuje se i prilikom primjene smičnog naprežanja potrebnog za raspršenje *in situ* gelirajuće otopine, što olakšava primjenu i pogoduje generiranju kapljica prikladne veličine za nazalnu primjenu (Perkušić i sur., 2023).



**Slika 11.** Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za *in situ* gelirajuću otopinu kitozana ( $9,23 \text{ mg mL}^{-1}$ ),  $\beta$ -GP-a ( $188,46 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i donepezila ( $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (formulacija 2). Mjerenje je provedeno pri temperaturi od  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Prikazani trend reprezentativan je za sve četiri ispitivane formulacije.

#### 4.5. Viskoznost u mirovanju

Rezultati određivanja viskoznosti u mirovanju *in situ* gelirajućih otopina donepezila dobiveni iz grafa ovisnosti smične deformacije o vremenu (Slika 12.) prikazani su u Tablici 6.



**Slika 12.** Ovisnost smične deformacije o vremenu za *in situ* gelirajuću otopinu kitozana ( $6,15 \text{ mg mL}^{-1}$ ),  $\beta$ -GP-a ( $188,46 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i donepezila ( $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (formulacija 1). Mjerenje je provedeno pri temperaturi od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tablica 6.** Viskoznost u mirovanju *in situ* gelirajućih otopina donepezila

Formulacija	1	2	3	4
Viskoznost u mirovanju (mPa s)	$22,5 \pm 0,1$	$111,6 \pm 0,4$	$22,3 \pm 0,4$	$113,6 \pm 0,8$

Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD ( $n=2$ ).

Formulacije pripravljene pri koncentraciji kitozana od  $6,15 \text{ mg mL}^{-1}$  imaju vrijednosti viskoznosti u mirovanju  $22,3 \pm 0,4$  i  $22,5 \pm 0,1 \text{ mPa s}$ . Formulacije koje sadržavaju kitozan u koncentraciji  $9,23 \text{ mg mL}^{-1}$  imaju veće vrijednosti viskoznosti u mirovanju koje iznose  $111,6 \pm 0,4$  i  $113,6 \pm 0,8 \text{ mPa s}$ . Poznato je da viskoznost vodenih otopina polimera raste s porastom koncentracije polimera (Cho i sur., 2006). S obzirom na pseudoplastično ponašanje pripremljenih sustava, može se očekivati pad viskoznosti pri raspršivanju, što omogućuje adekvatnu nazalnu primjenu i koncentriranijih polimernih otopina. Prema literaturnim podacima, formulacije donepezila pripravljene s niskomolekulskim kitozonom u rasponu viskoznosti u mirovanju od  $35,03 \pm 0,82$  do  $232,21 \pm 2,30 \text{ mPa}$  bile su prikladne za primjenu u obliku spreja (Perkušić i sur., 2023).

## 5. ZAKLJUČCI

- Uspješno su pripravljene *in situ* gelirajuće otopine donepezila ( $0,4 - 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , *m/V*), s kitozonom ( $6,15$  i  $9,23 \text{ mg mL}^{-1}$ , *m/V*) i  $\beta$ -GP-om ( $188,46 \text{ mg mL}^{-1}$ , *m/V*) kao pomoćnim tvarima.
- Pripravljene *in situ* gelirajuće otopine donepezila imale su pH u rasponu od  $7,36$  do  $7,46$ , prikladan za nazalnu primjenu.
- Vrijeme geliranja pripremljenih *in situ* gelirajućih otopina donepezila ovisilo je o koncentraciji donepezila i kitozana. Variranjem formulacijskih parametara prepoznate su *in situ* gelirajuće otopine donepezila s prikladnim vremenom geliranja u odnosu na očekivani mukocilijarni klirens (formulacije s trenutnim geliranjem te geliranjem u vremenskom intervalu od  $4,2 \pm 0,0$  do  $4,9 \pm 0,1$  min).
- Temperatura geliranja pripremljenih *in situ* gelirajućih otopina donepezila bila je u rasponu od  $33,0 \pm 0,6$  do  $36,5 \pm 0,1$  °C.
- Pripravljene *in situ* gelirajuće otopine donepezila su pseudoplastični sustavi.
- Viskoznost u mirovanju pripremljenih *in situ* gelirajućih otopina donepezila bila je u rasponu od  $22,3 \pm 0,4$  do  $113,6 \pm 0,8$  mPa s te je rasla s povećanjem koncentracije kitozana.
- Provedena ispitivanja pokazala su potencijal *in situ* gelirajuće otopine donepezila, kitozana i  $\beta$ -GP-a kao prikladne tehnološke platforme za nazalnu primjenu donepezila.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

°C – Celzijev stupanj

A – apsorbancija

APP – amiodni prekursorski protein

APO-ε4 – alel ε4 za apolipoprotein E

c - koncentracija

$c_{\text{exp}}$  – eksperimentalna koncentracija

$c_{\text{teor}}$  – teorijska koncentracija

CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 – enzimi citokrom 450

G' – modul pohrane

G'' – modul gubitka

NMDA - N-metil-D-aspartat

pH - negativan dekadski logaritam aktiviteta vodikovih iona u otopini

pK<sub>a</sub> - negativan logaritam konstante disocijacije elektrolita

SD – standardna devijacija

t – vrijeme

T - temperatura

β-GP - dinatrijev beta-glicerofosfat pentahidrat

γ – smična deformacija

$\dot{\gamma}$  - brzina smicanja

η – viskoznost

## 7. LITERATURA

2020 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's Association report. *Alzheimer's Dement*, 2020, 16, 391-460. Dostupno na: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/alz.12068>, doi: 10.1002/alz.12068.

Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Antimisiaris SG, Chougule MB, Shoyele SA, Alexander A. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, 2018, 281, 139–177.

Ahn S-I, Cho S, Choi N-J. Effectiveness of Chitosan as a Dietary Supplement in Lowering Cholesterol in Murine Models: A Meta-Analysis. *Mar. Drugs*, 2021, 19, 26.

Al Harthi S, Alavi SE, Radwan MA, El Khatib MM, AlSarraf IA. 2019. Nasal delivery of donepezil HCl-loaded hydrogels for the treatment of Alzheimer's disease. *Sci. Rep.*, 2019, 9, 9563.

Atri A. 2019. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med. Clin. North Am.*, 2019, 103, 263–293.

Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV*, 2012, 81, 463–469.

Birks JS, Harvey RJ. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2018, 6, CD001190.

Carlson TL, Lock JY, Carrier RL. Engineering the Mucus Barrier. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2018, 20, 197–220.

Casettari L, Illum L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, 2014, 190, 189–200.

Cazorla-Luna R, Martín-Illana A, Notario-Pérez F, Ruiz-Caro R, Veiga M-D. Naturally Occurring Polyelectrolytes and Their Use for the Development of Complex-Based Mucoadhesive Drug Delivery Systems: An Overview. *Polymers*, 2021, 13, 2241.

Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, Leroux JC, Atkinson BL, Binette F, Selmani A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, 2000, 21, 2155–2161.

Chitosan, 2023, [www.pubchem.com](http://www.pubchem.com), pristupljeno 5.6.2023.

Cho J, Heuzey, M-C, Bégin A, Carreau PJ. Chitosan and glycerophosphate concentration dependence of solution behaviour and gel point using small amplitude oscillatory rheometry. *Food Hydrocoll.*, 2006, 20, 936–945.

Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr. Neuropharmacol.*, 2013, 11, 315–335.

Desai N, Rana D, Salave S, Gupta R, Patel P, Karunakaran B, Sharma A, Giri J, Benival D, Kommineni N. Chitosan: A Potential Biopolymer in Drug Delivery and Biomedical Applications. *Pharmaceutics*, 2023, 15, 1313.

Donepezil, 2023, <https://www.halmed.hr>, pristupljeno 3.5.2023.

Dvorski T, 2022, Utjecaj ulazne temperature na svojstva mikrosfera s donepezilom pripremljenih sušenjem raspršivanjem, Diplomski rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

England RJ, Homer JJ, Knight LC, Ell SR. Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.*, 1999, 24, 67–68.

Erdő F, Bors LA, Farkas D, Bajza Á, Gizurarson S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Res. Bull.*, 2018, 143, 155–170.

Espinoza LC, Guaya D, Calpena AC, Perotti RM, Halbaut L, Sosa L, Brito-Llera A, Mallandrich M. 2022. Comparative Study of Donepezil-Loaded Formulations for the Treatment of Alzheimer's Disease by Nasal Administration. *Gels Basel Switz.*, 2022, 8, 715.

Espinoza LC, Silva-Abreu M, Clares B, Rodríguez-Lagunas MJ, Halbaut L, Cañas M-A, Calpena AC. Formulation Strategies to Improve Nose-to-Brain Delivery of Donepezil. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 64.

Georgieva D, Nikolova D, Vassileva E, Kostova B. Chitosan-Based Nanoparticles for Targeted Nasal Galantamine Delivery as a Promising Tool in Alzheimer's Disease Therapy. *Pharmaceutics*, 2023, 15, 829.

Gholizadeh H, Cheng S, Pozzoli M, Messerotti E, Traini D, Young P, Kourmatzis A, Ong HX. Smart thermosensitive chitosan hydrogel for nasal delivery of ibuprofen to treat neurological disorders. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2019a, 16, 453–466.



Gholizadeh H, Messerotti, E, Pozzoli M, Cheng S, Traini D, Young P, Kourmatzis A, Caramella C, Ong HX. Application of a Thermosensitive In Situ Gel of Chitosan-Based Nasal Spray Loaded with Tranexamic Acid for Localised Treatment of Nasal Wounds. *AAPS PharmSciTech*, 2019b, 20, 299.

Rassu G, Soddu E, Cossu M, Gavini E, Giunchedi P, Dalpiaz A. Particulate formulations based on chitosan for nose-to-brain delivery of drugs. A review. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 32, 2016, part B, 77–87.

Hamedi H, Moradi S, Hudson SM, Tonelli AE, King MW. Chitosan based bioadhesives for biomedical applications: A review. *Carbohydr. Polym.*, 2022, 282, 119100.

Keck T, Leiacker R, Riechelmann H, Rettinger G. Temperature profile in the nasal cavity. *The Laryngoscope*, 2000, 110, 651–654.

Khan S, Barve KH, Kumar MS. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.*, 2020, 18, 1106-1125.

Laffleur F, Bauer B. Progress in nasal drug delivery systems. *Int. J. Pharm.*, 2021, 607, 120994.

Lee CH, Moturi V, Lee Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J. Controlled Release*, 2009, 136, 88–98.

LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. [elektronička knjiga] Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2021. Dostupno na: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), pristupljeno 10.5.2023.

Naik A, Nair H, Formulation and Evaluation of Thermosensitive Biogels for Nose to Brain Delivery of Doxepin. *BioMed Res. Int.*, 2014, 2014, 1–10.

Needham D. The pH Dependence of Niclosamide Solubility, Dissolution, and Morphology: Motivation for Potentially Universal Mucin-Penetrating Nasal and Throat Sprays for COVID19, its Variants and other Viral Infections. *Pharm. Res.*, 2022, 39, 115–141.

Notario-Pérez F, Martín-Illana A, Cazorla-Luna R, RuizCaro R, Veiga MD. Applications of Chitosan in Surgical and Post-Surgical Materials. *Mar. Drugs*, 2022, 20, 396.

Perkušić M, Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Jakobušić Brala C, Pepić I, Lovrić J, Safundžić Kučuk M, Trenkel M, Scherließ R, Zadavec D, Kalogjera L, Hafner A. Chitosan-Based Thermogelling System for Nose-to-Brain Donepezil Delivery: Optimising Formulation Properties and Nasal Deposition Profile. *Pharmaceutics*, 2023, 15, 1660.

Pooladgar P, Sakhabakhsh M, Taghva A, Soleiman-Meigooni S. Donepezil Beyond Alzheimer's Disease? A Narrative Review of Therapeutic Potentials of Donepezil in Different Diseases. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR*, 2022, 21, e128408.

Potočki I, 2022. Utjecaj molekulske mase kitozana na svojstva mikrosfera s donepezilom pripravljenih sušenjem raspršivanjem, Diplomski rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Ramli H, Fatahah N, Asyqin Zainal NF, Hess M, Chan CH. Basic principle and good practices of rheology for polymers for teachers and beginners. *Chem. Teach. Int.*, 2022, 4, 307–326.

Sacco P, Furlani F, De Marzo G, Marsich E, Paoletti S, Donati I. Concepts for Developing Physical Gels of Chitosan and of Chitosan Derivatives. *Gels Basel Switz.*, 2018, 4, 67.

Sobiesk JL, Munakomi S. Anatomy, Head and Neck, Nasal Cavity. [elektronička knjiga] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544232/>, pristupljeno 25.6.2023.

Tai J, Han M, Lee D, Park I-H, Lee SH, Kim TH. Different Methods and Formulations of Drugs and Vaccines for Nasal Administration. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 1073.

Tang W, Wang J, Hou H, Li Y, Wang J, Fu J, Lu L, Gao D, Liu Z, Zhao F, Gao X, Ling P, Wang F, Sun F, Tan H. Review: Application of chitosan and its derivatives in medical materials. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2023, 240, 124398.

Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int. J. Nanomedicine*, 2019, 14, 5541–5554.

Vigani B, Rossi S, Sandri G, Bonferoni MC, Caramella CM, Ferrari F. Recent Advances in the Development of In Situ Gelling Drug Delivery Systems for Non-Parenteral Administration Routes. *Pharmaceutics*, 2020, 12, 859.

Wang W, Meng Q, Li Q, Liu J, Zhou M, Jin Z, Zhao K. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21, 487.

Zhang X, Lian S, Zhang Y, Zhao Q. Efficacy and safety of donepezil for mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 2022, 213, 107134.

Zhou HY, Jiang LJ, Cao PP, Li JB, Chen XG. Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications. *Carbohydr. Polym.*, 2015, 117, 524–536.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

Usljed porasta broja oboljelih od Alzheimerove bolesti (AB) te nedostataka oralne primjene donepezila kao glavnog lijeka u liječenju simptoma AB-a, javlja se potreba za razvojem inovativnih farmaceutskih oblika donepezila za druge putove primjene. Nazalna primjena lijeka smanjuje rizik od nuspojava te omogućuje zaobilazak krvno-moždane barijere i izravnu dostavu lijeka u mozak. *In situ* gelirajući sustavi inovativni su farmaceutski oblici za nazalnu primjenu lijekova, s potencijalom povećane bioraspoloživosti, smanjene doze i olakšane primjene u odnosu na oralnu primjenu, koja može biti otežana u Alzheimerovoj bolesti zbog problema s gutanjem.

Cilj ovog rada bio je pripremiti i karakterizirati *in situ* gelirajuće sustave za nazalnu primjenu donepezila, temeljene na kitozanu kao gelirajućem polimeru. U okviru istraživanja uspješno su pripravljene *in situ* gelirajuće otopine donepezila ( $0,4 - 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , *m/V*), s kitozanom ( $6,15$  i  $9,23 \text{ mg mL}^{-1}$ , *m/V*) i  $\beta$ -GP-om ( $188,46 \text{ mg mL}^{-1}$ , *m/V*) kao pomoćnim tvarima. Pripravljene *in situ* gelirajuće otopine prikladnog su pH za nazalnu primjenu (pH u rasponu od 7,36 do 7,46). Variranjem formulacijskih parametara postignuto je prikladno vrijeme geliranja u odnosu na očekivani mukocilijarni klirens (formulacije s trenutnim geliranjem te geliranjem u vremenskom intervalu od  $4,2 \pm 0,0$  do  $4,9 \pm 0,1$  min). Temperatura geliranja *in situ* gelirajućih otopina donepezila bila je u rasponu od  $33,0 \pm 0,6$  do  $36,5 \pm 0,1$  °C. Pripravljene otopine bile su pseudoplastičnog karaktera. Viskoznost u mirovanju otopina bila je u rasponu od  $22,3 \pm 0,4$  do  $113,6 \pm 0,8$  mPa s te je rasla s povećanjem koncentracije kitozana. Provedena ispitivanja pokazala su potencijal *in situ* gelirajuće otopine donepezila, kitozana i  $\beta$ -GP-a kao prikladne tehnološke platforme za nazalnu primjenu donepezila.

Due to the increasing incidence of Alzheimer's disease (AD) and the lack of oral administration of donepezil as first-line treatment of AD symptoms, there is a need to develop innovative donepezil pharmaceutical forms for other routes of administration. Nasal drug delivery decreases a side effect risk, enables a bypass of the blood-brain barrier and a direct transport of the drug to the brain. *In situ* gelling systems are innovative pharmaceutical forms for nasal drug delivery with the potential to enhance bioavailability, decrease the dose, and simplify administration compared to oral delivery, which can be difficult for Alzheimer's disease patients due to swallowing problems.

The aim of this study was to prepare and characterize *in situ* gelling systems for nasal administration of donepezil, based on chitosan as a gelling polymer. Within this study, *in situ* gelling donepezil solutions (0.4 – 0.5 mg mL<sup>-1</sup>, w/v) were successfully prepared with chitosan (6.15 – 9.23 mg mL<sup>-1</sup>, w/v) and  $\beta$ -GP (188.46 mg mL<sup>-1</sup>, w/v) used as excipients. Prepared *in situ* gelling solutions were characterised by adequate pH value for nasal administration (pH interval 7.36 – 7.46). Appropriate gelation time considering mucocilliary clearance was obtained by varying formulation parameters (formulations with instant gelation and gelation within the interval of  $4.2 \pm 0.0$  to  $4.9 \pm 0.1$  min). Gelation temperature of *in situ* gelling donepezil solutions was in the range of  $33.0 \pm 0.6$  to  $36.5 \pm 0.1$  °C. Prepared solutions showed pseudoplastic behavior. The zero-shear viscosity of solutions was in the range of  $22.3 \pm 0.4$  to  $113.6 \pm 0.8$  mPa s, and it increased with the increase in chitosan concentration. This study has shown the potential of *in situ* gelling solution of donepezil, chitosan, and  $\beta$ -GP as an appropriate technological platform for nasal delivery of donepezil.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA *IN SITU* GELIRAJUĆIH OTOPINA DONEPEZILA ZA NAZALNU PRIMJENU

Sara Župančić

#### SAŽETAK

Uslijed porasta broja oboljelih od Alzheimerove bolesti (AB) te nedostataka oralne primjene donepezila kao glavnog lijeka u liječenju simptoma AB-a, javlja se potreba za razvojem inovativnih farmaceutskih oblika donepezila za druge putove primjene. Nazalna primjena lijeka smanjuje rizik od nuspojava te omogućuje zaobilazak krvno-moždane barijere i izravnu dostavu lijeka u mozak. *In situ* gelirajućí sustavi inovativni su farmaceutski oblici za nazalnu primjenu lijekova, s potencijalom povećane bioraspoloživosti, smanjene doze i olakšane primjene u odnosu na oralnu primjenu, koja može biti otežana u Alzheimerovoj bolesti zbog problema s gutanjem.

Cilj ovog rada bio je pripremiti i karakterizirati *in situ* gelirajuće sustave za nazalnu primjenu donepezila, temeljene na kitozanu kao gelirajućem polimeru. U okviru istraživanja uspješno su pripravljene *in situ* gelirajuće otopine donepezila ( $0,4 - 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $m/V$ ), s kitozanom ( $6,15$  i  $9,23 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $m/V$ ) i  $\beta$ -GP-om ( $188,46 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $m/V$ ) kao pomoćnim tvarima. Pripravljene *in situ* gelirajuće otopine prikladnog su pH za nazalnu primjenu (pH u rasponu od  $7,36$  do  $7,46$ ). Variranjem formulacijskih parametara postignuto je prikladno vrijeme geliranja u odnosu na očekivani mukocilijarni klirens (formulacije s trenutnim geliranjem te geliranjem u vremenskom intervalu od  $4,2 \pm 0,0$  do  $4,9 \pm 0,1$  min). Temperatura geliranja *in situ* gelirajućih otopina donepezila bila je u rasponu od  $33,0 \pm 0,6$  do  $36,5 \pm 0,1$  °C. Pripravljene otopine bile su pseudoplastičnog karaktera. Viskoznost u mirovanju otopina bila je u rasponu od  $22,3 \pm 0,4$  do  $113,6 \pm 0,8$  mPa s te je rasla s povećanjem koncentracije kitozana. Provedena ispitivanja pokazala su potencijal *in situ* gelirajuće otopine donepezila, kitozana i  $\beta$ -GP-a kao prikladne tehnološke platforme za nazalnu primjenu donepezila.

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

Rad sadrži: 33 stranica, 12 grafičkih prikaza, 6 tablica i 47 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *In situ* gelirajuća otopina; donepezil; kitozan; nazalna primjena; reološka svojstva

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. Maja Ortner Hadžiabdić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Laura Nižić Nodilo**, poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz, 2023.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### PREPARATION AND CHARACTERISATION OF *IN SITU* GELLING DONEPEZIL SOLUTIONS FOR NASAL ADMINISTRATION

Sara Župančić

#### SUMMARY

Due to the increasing incidence of Alzheimer's disease (AD) and the lack of oral administration of donepezil as first-line treatment of AD symptoms, there is a need to develop innovative donepezil pharmaceutical forms for other routes of administration. Nasal drug delivery decreases a side effect risk, enables a bypass of the blood-brain barrier and a direct transport of the drug to the brain. *In situ* gelling systems are innovative pharmaceutical forms for nasal drug delivery with the potential to enhance bioavailability, decrease the dose, and simplify administration compared to oral delivery, which can be difficult for Alzheimer's disease patients due to swallowing problems.

The aim of this study was to prepare and characterize *in situ* gelling systems for nasal administration of donepezil, based on chitosan as a gelling polymer. Within this study, *in situ* gelling donepezil solutions ( $0.4 - 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ , *w/v*) were successfully prepared with chitosan ( $6.15 - 9.23 \text{ mg mL}^{-1}$ , *w/v*) and  $\beta$ -GP ( $188.46 \text{ mg mL}^{-1}$ , *w/v*) used as excipients. Prepared *in situ* gelling solutions were characterised by adequate pH value for nasal administration (pH interval 7.36 – 7.46). Appropriate gelation time considering mucocilliary clearance was obtained by varying formulation parameters (formulations with instant gelation and gelation within the interval of  $4.2 \pm 0.0$  to  $4.9 \pm 0.1$  min). Gelation temperature of *in situ* gelling donepezil solutions was in the range of  $33.0 \pm 0.6$  to  $36.5 \pm 0.1$  °C. Prepared solutions showed pseudoplastic behavior. The zero-shear viscosity of solutions was in the range of  $22.3 \pm 0.4$  to  $113.6 \pm 0.8$  mPa s, and it increased with the increase in chitosan concentration. This study has shown the potential of *in situ* gelling solution of donepezil, chitosan, and  $\beta$ -GP as an appropriate technological platform for nasal delivery of donepezil.

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

Thesis includes: 33 pages, 12 figures, 6 tables and 47 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *In situ* gelling solution; donepezil; chitosan; nasal delivery; rheological properties

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

**Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Laura Nižić Nodilo, Ph.D.** Postdoctoral Researcher, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2023