

Prikladnost kitozanskog in situ gelirajućeg sustava s donepezilom za nazalnu primjenu u obliku spreja

Tržić, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:163:481108>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**



Repository / Repozitorij:

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



Antonija Tržić

**Prikladnost kitozanskog *in situ* gelirajućeg
sustava s donepezilom za nazalnu primjenu u
obliku spreja**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, kolegij Farmaceutika pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Anite Hafner. Ovaj rad sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP- 2017-05-4592.

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Aniti Hafner na stručnom vodstvu, prenesenom znanju te pomoći i susretljivosti prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem asistentici Mirni Perkušić, mag. pharm. na pomoći i strpljenju tijekom izvođenja ekperimentalnog dijela ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji, osobito svojoj majci, što su uvijek tu uz mene i podržavaju me u svemu.

Hvala svim prijateljima i kolegama na lijepim trenucima tijekom studiranja. Posebno zahvaljujem Sari Župančić i Ani Vrbanić koje su od samog početka bile sa mnom, motivirale me te uljepšavale i najteže trenutke tijekom studija.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Alzheimerova bolest	1
1.1.1. Terapijske opcije	2
1.2. Inhibitori acetilkolinesteraze	3
1.3. Donepezil	4
1.4. Nedostaci oralne primjene donepezila	4
1.5. Nazalna primjena donepezila	5
1.5.1. Nazalna primjena lijekova s ciljem izravne dostave u mozak	5
1.5.2. Inovativni farmaceutski oblici donepezila za nazalnu primjenu	6
1.6. Modeli nosne šupljine za ispitivanje nazalne depozicije	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Materijali	14
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Priprava kitozanskih <i>in situ</i> gelirajućih sustava s donepezilom	14
3.2.2. Reološka karakterizacija kitozanskih <i>in situ</i> gelirajućih sustava s donepezilom....	15
3.2.2.1. Test puzanja	15
3.2.2.2. Test promjene temperature	16
3.2.2.3. Vremenski test geliranja	16
3.2.3. Određivanje kuta raspršenja kitozanskih <i>in situ</i> gelirajućih sustava s donepezilom	16
3.2.4. Određivanje profila nazalne depozicije kitozanskih <i>in situ</i> gelirajućih sustava s donepezilom <i>in vitro</i>	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Priprava kitozanskih <i>in situ</i> gelirajućih sustava s donepezilom	19
4.2. Reološka svojstva kitozanskih <i>in situ</i> gelirajućih sustava s donepezilom	20
4.2.1. Viskoznost u mirovanju.....	21

4.2.2. Temperatura geliranja	21
4.2.3. Vrijeme geliranja.....	22
4.3. Kut raspršenja	24
4.4. Profil nazalne depozicije <i>in vitro</i>	24
5. ZAKLJUČCI	27
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	28
7. LITERATURA	29
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	36

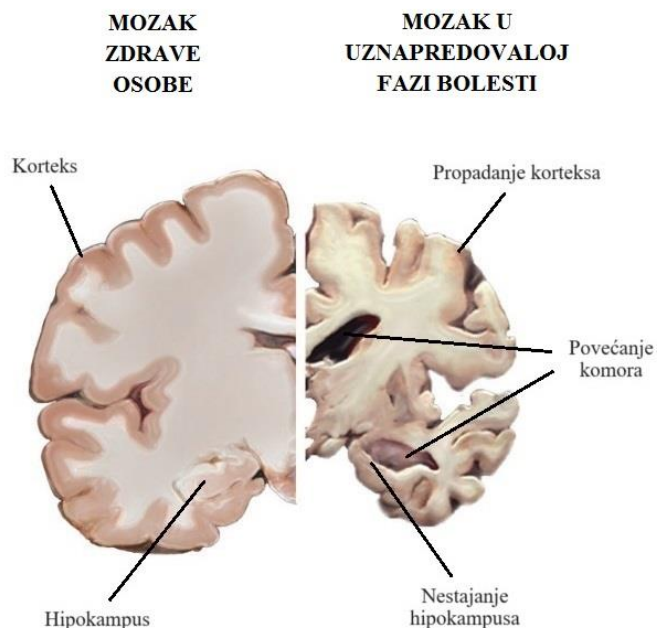
1. UVOD

1.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) neurodegenerativna je bolest mozga obilježena progresivnim gubitkom kognitivnih funkcija. Do pojave deterioracije pamćenja i jezičnih funkcija, kao glavnih simptoma bolesti, može proći 20 i više godina od nastanka prvotnih promjena u mozgu. Od ostalih simptoma javljaju se gubitak orijentacije, sposobnosti učenja i komuniciranja. AB utječe na osobnost i ponašanje oboljele osobe, a s trajanjem bolesti povećava se i prevalencija psihičkih simptoma poput depresije i anksioznosti (Alzheimer's Association, 2019).

Simptomi postaju vidljivi zbog oštećenja i gubitka neurona u dijelovima mozga zaduženim za kognitivne funkcije. S vremenom se simptomi pogoršavaju i ometaju osobu u svakodnevnom životu. Progresijom bolesti oštećuju se i gube neuroni drugih područja mozga što rezultira širim spektrom simptoma i problemima u izvršavanju osnovnih tjelesnih funkcija, primjerice hodanja, gutanja. U završnom stadiju bolesti, osoba je nepokretna i zahtijeva 24-satnu skrb (Alzheimer's Association, 2019).

Glavnim obilježjima AB-a smatraju se β -amiloidni plakovi, hiperfosforilirani tau protein i neurofibrilarni snopići. Međutim, na nastanak i razvoj bolesti značajno utječu neuroinflamacija, vaskularna patologija, integritet krvno-moždane barijere, periferni imunski sustav, a potencijalni utjecaj ima i mikrobiom probavnog sustava (Scheltens i sur., 2021). Nastali β -amiloidni plakovi ometaju komunikaciju među neuronima u sinapsama, potiču nastanak upale i aktivaciju imunskih stanica (mikroglia). Nakupljanje hiperfosforiliranog tau proteina i formiranje neurofibrilarnih snopića u neuronima blokira transport nutrijenata i drugih molekula unutar neurona. Naime, zbog gubitka stanica s vremenom nastupa atrofija mozga (Slika 1.) što dakako negativno utječe na njegovo funkcioniranje. S obzirom na važnost glukoze kao glavnog izvora energije za mozak, smanjena sposobnost metabolizma glukoze dodatno otežava normalno funkcioniranje mozga (Alzheimer's Association, 2019).



Slika 1. Mozak zdrave osobe i mozak osobe u uznapredovaloj fazi Alzheimerove bolesti (preuzeto i prilagođeno prema *National Institutes of Health* (NIH), [https://creativecommons.org/publicdomain/mark/1.0/?ref=openverse](https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/?ref=openverse)).

Rizik obolijevanja od AB-a najveći je za osobe starije životne dobi i raste s dobi. Češće obolijevaju žene, posebice među starijima od 80 godina. Više od 40 alela se smatra rizičnima za razvoj AB-a. Međutim, prisutnost APOE ε4 (apolipoprotein E) alela u genomu povećava taj rizik čak 3 – 4 puta. APOE ε4 alel povezan je s ubrzanom akumulacijom β-amiloida te se smatra rizičnim čimbenikom za raniji početak bolesti i razvoj simptoma bolesti. Na pojavu demencije značajan utjecaj imaju kardiovaskularni rizični čimbenici (dijabetes, hipertenzija, dislipidemija, metabolički sindrom i pretilost, pušenje duhana) te nezdrave životne navike (Scheltens i sur., 2021; Atri, 2019).

1.1.1. Terapijske opcije

Za liječenje AB-a koriste se inhibitori acetilkolinesteraze, nekompetitivni antagonist NMDA (N-metil-D-aspartat) receptora, a odnedavno i monoklonska protutijela. S obzirom na poremećaj neurotransmisije kolinergičkog sustava, u liječenju AB-a veliku ulogu imaju inhibitori acetilkolinesteraze. Uz donepezil, najčešće korišteni lijek za liječenje AB-a, u toj skupini nalaze se još rivastigmin i galantamin (Yadollahikhaies i Rojas, 2023; Alzheimer's Association, 2019).

Memantin, nekompetitivni antagonist NMDA glutaminskih receptora, blokira toksične učinke glutamata, glavnog ekscitacijskog neurotransmitera u mozgu. Onemogućavajući pretjeranu glutaminergičku stimulaciju posljedično pomaže u očuvanju sinaptičke funkcije i preživljavanju neurona. U bolesnika s AB-om, koncentracija glutamata u sinaptičkoj pukotini je povišena, što potiče nekompetitivno vezanje memantina za receptore. Zbog slabog afiniteta memantina za NMDA receptore, blokada receptora nije dugotrajna te nema negativan učinak na učenje i pamćenje (Križaj Grden i Mimica, 2019). Sustavni pregledi i meta-analize rezultirali su zaključkom da kombinacija memantina s inhibitorima acetilkolinesteraze ima povoljan učinak u terapiji AB-a (Alzheimer's Association, 2019).

Ti lijekovi djeluju na simptome, ali ne i na tijek bolesti stoga su daljnja istraživanja išla u smjeru lijekova koji utječu na tijek bolesti. U posljednjih nekoliko godina Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrila je dva nova lijeka za AB – adukanumab (2021.) i lekanemab (2023.). Radi se o IgG1 monoklonskim protutijelima za amiloid- β (Yadollahikhales i Rojas, 2023).

1.2. Inhibitori acetilkolinesteraze

Kolinergički sustav ima značajnu ulogu u raznim kognitivnim procesima, stoga je jedan od ciljeva liječenja AB-a očuvanje kolinergičke neurotransmisije. Inhibicija acetilkolinesteraze smanjuje razgradnju i povećava koncentraciju acetilkolina u sinaptičkoj pukotini. Povećana koncentracija neurotransmitera u mozgu rezultira poboljšanjem simptoma bolesti, međutim ne utječe na tijek bolesti (Atri, 2019).

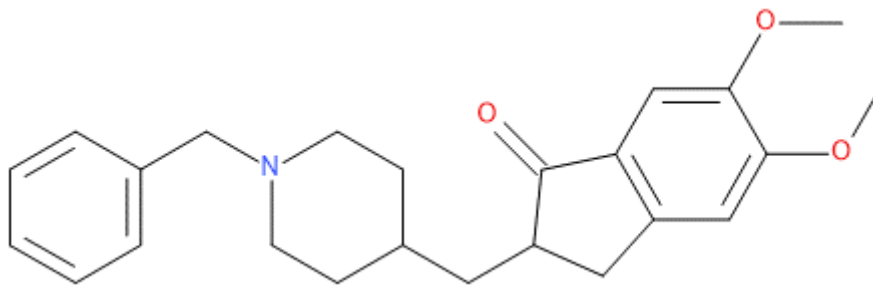
Prvi odobreni lijek u ovoj skupini bio je takrin, međutim više nije u uporabi zbog hepatotoksičnosti. Donepezil i galantamin su kratkodjelujući, odnosno reverzibilni inhibitori, dok rivastigmin ima srednje dugo djelovanje te se smatra pseudoireverzibilnim inhibitorom acetilkolinesteraze. Galantamin je indiciran kod blagog do umjerenog AB-a. Na tržištu je dostupan u obliku tableta s trenutnim i tableta s produljenim oslobađanjem te oralne otopine. Donepezil i rivastigmin koriste se i kod teškog AB-a. Rivastigmin je osim za oralnu primjenu u obliku kapsula dostupan i u obliku transdermalnog flastera. Donepezil je, uz oblike za oralnu primjenu, također dostupan u obliku transdermalnog flastera (Nunes i sur., 2022; Marucci i sur., 2021).

Najčešće nuspojave lijekova iz ove skupine su uzrokovane djelovanjem acetilkolina u gastrointestinalnom traktu (GIT). Periferno djelovanje acetilkolina u GIT-u dovodi do pojačane salivacije, mučnine i povraćanja, anoreksije, flatulencije, dijareje i abdominalnih

grčeva. Od ostalih nuspojava javljaju se abnormalni snovi i nesаница, а може доћи и до smanjenja srčane frekvencije te povećanja rizika od sinkope (Atri, 2019).

1.3. Donepezil

Donepezil (Slika 2.) je inhibitor acetilkolinesteraze te je jedan od najčešće korištenih lijekova za liječenje Alzheimerove bolesti (Marucci i sur., 2021). Indiciran je za simptomatsko liječenje blagog, umjerenog i teškog AB-a. U Hrvatskoj je dostupan u obliku filmom obloženih tableta te raspadljivih tableta za usta, u dozama od 5 i 10 mg. Може se koristiti u kombinaciji s memantinom (antagonist NMDA receptora) te je dostupan kao fiksna kombinacija u dozi od 10 mg donepezila s 10 ili 20 mg memantina. Preporučena dnevna doza donepezila je 5 ili 10 mg, primijenjena navečer, prije odlaska na spavanje (www.halmed.hr). Za liječenje umjerenog do teškog AB-a može se primijeniti 23 mg donepezila (Marucci i sur., 2021).



Slika 2. Struktura donepezila, nacrtana u programu BIOVIA Draw 2017.

1.4. Nedostaci oralne primjene donepezila

Glavni nedostatak oralne primjene donepezila je relativno mala koncentracija donepezila u mozgu zbog slabe propusnosti krvno-moždane barijere (Sutthapitaksakul i sur., 2021). Oralnu primjenu donepezila prati ekstenzivan metabolizam prvog prolaza kroz jetru (Asiri i Mostafa, 2010). S obzirom na navedeno, da bi se postigla učinkovita koncentracija donepezila u mozgu, doza lijeka koja se primjenjuje oralno je relativno velika. Najčešće prijavljivane nuspojave donepezila ovisne su o dozi te uključuju mučninu, povraćanje, dijareju, anoreksiju, grčenje mišića i umor. Gastrointestinalne nuspojave donepezila nastoje se smanjiti razvijanjem novih oblika za oralnu, transdermalnu i parenteralnu primjenu, te formulacija za nazalnu primjenu (Sutthapitaksakul i sur., 2021).

Otežano gutanje, kao mogući simptom AB-a ili posljedica starenja, predstavlja problem za primjenu čvrstih oralnih oblika donepezila. Stoga se razvijaju oblici koji se raspadaju u ustima. Međutim, dodatan problem stvara intenzivno gorak okus donepezila, koji nije zanemariv prilikom primjene u obliku koji se otapa ili raspada u ustima (Sutthapitaksakul i sur., 2021).

1.5. Nazalna primjena donepezila

Nazalnom primjenom donepezila pruža se mogućnost izravne dostave lijeka u mozak, zaobilazi se GIT, a samim time i nuspojave uzrokovane povišenom koncentracijom acetilkolina u GIT-u te ostale periferne nuspojave koje se javljaju prilikom oralne primjene donepezila (Sutthapitaksakul i sur., 2021).

1.5.1. Nazalna primjena lijekova s ciljem izravne dostave u mozak

Ograničavajući čimbenik za raspoloživost lijekova u središnjem živčanom sustavu (SŽS) je krvno-moždana barijera koja sprječava ulazak 95 % molekula u SŽS. Neki od načina zaobilaznja krvno-moždane barijere, odnosno izravne dostave lijeka u SŽS, predstavljaju intratekalne, intracerebroventrikularne te intraparenhimalne injekcije koje dostavljaju lijek u cerebrospinalnu tekućinu. Međutim, takav način primjene lijekova je izrazito invazivan te zahtijeva posebnu edukaciju zdravstvenih radnika, stoga se proučavaju druge mogućnosti izravne dostave lijekova u SŽS (Gänger i Schindowski, 2018).

Nosna šupljina sadrži vestibularnu, respiratornu i olfaktornu regiju. Unatoč činjenici da olfaktorna regija čini samo 5 % ukupne površine nosne šupljine, predstavlja važnu metu za primjenu lijekova jer omogućava izravnu dostavu lijekova u mozak, zaobilazeći krvno-moždanu barijeru (Javia i sur., 2021). Nadalje, osigurava se minimalna sistemska izloženost lijeku te se izbjegava metabolizam prvog prolaza kroz jetru i sistemska eliminacija (Dhuria i sur., 2010).

Olfaktorna regija smještena je na gornjoj turbinatnoj regiji nasuprot septuma, ispod kribiformne ploče etmoidne kosti. Olfaktorni epitel sadrži stanice olfaktornog živca, potporne i bazalne stanice. Transport lijeka putem stanica olfaktornog živca predstavlja glavni način izravne dostave lijeka u SŽS. Manji udio lijeka izravno se transportira u SŽS putem trigeminalnog živca. Olfaktorna i respiratorna regija dobro su prokrvljene što omogućava sistemska apsorpciju lijeka, te predstavlja još jedan od načina transporta lijeka u mozak, ali preko krvno-moždane barijere (Javia i sur., 2021; Agrawal i sur., 2018).

Mukocilijarni klirens uklanja strane čestice, uključujući i lijek, iz nosne šupljine, što uz slabu permeabilnost lijekova kroz sluznicu te enzimatsku razgradnju lijeka predstavlja neka od glavnih ograničenja nazalne primjene lijekova. Kako bi se osigurala apsorpcija lijeka te produljio kontakt formulacije s nosnom sluznicom, proučavaju se različiti farmaceutski oblici i pomoćne tvari koji bi to omogućili. Primjerice, razvijaju se nanosuspenzije djelatnih tvari (Bhavna i sur., 2014) te mukoadhezivni terapijski sustavi (Gu i sur., 2020; Agrawal i sur., 2018).

1.5.2. Inovativni farmaceutski oblici donepezila za nazalnu primjenu

Imajući na umu brojne nedostatke oralne primjene donepezila, nije iznenađujuće da se posljednjih godina istražuju načini izravne dostave donepezila u mozak. Najprikladniji način je nazalna primjena u olfaktorno područje. Pripravljeni su i ispitivani različiti inovativni farmaceutski oblici donepezila za nazalnu primjenu (Tablica 1.).

Tablica 1. Sustavni prikaz inovativnih farmaceutskih oblika donepezila za nazalnu primjenu

Inovativni farmaceutski oblik	Koncentracija/doza donepezila	Pomoćne tvari	Literatura
<i>in situ</i> gel	25 mg kg ⁻¹	CETETH-10 Oleinska kiselina	De Souza i sur., 2021
	10 mg kg ⁻¹	Poloksamer 407 Poloksamer 188 Hidroksipropil-β-ciklodekstrin Etilparaben	Gu i sur., 2020
	1 mg kg ⁻¹	Glicerol monooleat Poloksamer 407 Gelan guma Konjac glukomanan	Patil i sur., 2019
nanosuspenzija	0,5 – 1,5 mg mL ⁻¹	Kitozan Polisorbat-80	Bhavna i sur., 2014

nanoemulzija	6,25 mg mL ⁻¹	Capryol 90 Labrasol Transcutol-P	Espinoza i sur., 2019
		Capryol 90 Labrasol Transcutol-P Pluronic F-127	
	1 mg mL ⁻¹	Labrasol Cetilpiridinijev klorid Glicerol	Kaur i sur., 2020
mikroemulzija	12,5 mg mL ⁻¹	Ricinusovo ulje Labrasol Transcutol-p Propilen glikol	Espinoza i sur., 2018
	5 mg mL ⁻¹	Maslačno ulje Capmul MCM EP Tween 20 Transcutol P	Khunt i sur., 2020
Riblje ulje bogato omega-3 masnim kiselinama Capmul MCM EP Tween 20 Transcutol P			
liposomalna formulacija	1 mg kg ⁻¹	Kolesterol Polietilen glikol DSPC (1,2-distearil- sn-glicero-3- fosfokolin)	Al-Asmari i sur., 2016

čvrste lipidne nanočestice	0,45 mg kg ⁻¹	Gliceril monostearat Tween 80 Poloksamer 188	Yasir i sur., 2018
liposomalni hidrogel	5 mg	Tiolirani kitozan Dipalmitoilfosfokolin Kolesterol	Al Harthi i sur., 2019
nazalni film	0,45 – 0,5 mg	Hidroksipropil-metil- celuloza Polietilen glikol Metil-β-ciklodekstrin	Papakyriakopoulou i sur., 2022
mikrosfere	1,1 – 4 μg mg ⁻¹	Kitozan Manitol	Perkušić i sur., 2022

Jedan od nedostataka nazalne primjene lijeka je kratko zadržavanje na sluznici zbog mukocilijarnog čišćenja. S ciljem nadilaženja tog problema istraživani su farmaceutski oblici za dostavu lijeka koji su prilikom primjene u tekućem stanju, a na sluznici prelaze u gel koji produljuje kontakt lijeka i sluznice. Primjer takvog sustava je *in situ* gelirajuća mikroemulzija donepezila temeljena na liotropnim tekućim kristalima, pripravljena s oleinskom kiselinom kao uljnom fazom te surfaktantom CETETH-10. Fazni prijelaz proučavan je u prisutnosti umjetnog nazalnog fluida (De Souza i sur., 2021). Gu i suradnici (2020) pripravili su i ispitivali *in situ* gelirajući sustav donepezila čije geliranje ovisi o temperaturi, a kao gelirajuće agense koristili su poloksamer 407 i poloksamer 188. U svrhu pojačavanja permeacije lijeka korišteni su hidroksipropil-β-ciklodekstrin i etilparaben (Gu i sur., 2020). U istraživanju Patil i suradnika (2018) pripremljeni su kubosomalni mukoadhezivni *in situ* gelovi donepezila za nazalnu primjenu. Kubosomi su pripremljeni uz pomoć glicerol monooleata i poloksamera 407, a kao gelirajući agensi korišteni su gelan guma i konjac glukomanan (Patil i sur., 2019). Navedeni sustavi su u *in vivo* ispitivanjima u štakora pokazali produljeno zadržavanje na sluznici i povećanu bioraspoloživost donepezila u mozgu (De Souza i sur., 2021; Gu i sur., 2020; Patil i sur., 2019).

U istraživanju Bhavna i suradnici (2014) kitozanske nanočestice s deksametazonom pripravljene su umrežavanjem kitozana tripolifosfatom. Nazalnom primjenom suspenzije nanočestica s donepezilom u Sprague-Dawley štakora postignuta je značajno veća vršna koncentracija donepezila u mozgu, u odnosu na nazalnu primjenu konvencionalne suspenzije

donepezila. Također, nisu utvrđeni nikakvi toksični učinci razvijenih nanočestica nakon primjene (Bhavna i sur., 2014).

Espinoza i suradnici (2019) ispitivali su nanoemulzije donepezila sa i bez polimera Pluronic F-127. Usporedbom rezultata *ex vivo* studija permeacije, utvrđeno je da nanoemulzija koja sadrži Pluronic F-127 omogućava produljeno zadržavanje na mjestu apsorpcije i povećava bioraspoloživost lijeka te je zaključeno da nanoemulzije s pojačivačima permeacije imaju potencijal kao oblik za nazalnu primjenu s izravnom dostavom lijeka u mozak (Espinoza i sur., 2019). U jednom drugom istraživanju, nanoemulzija donepezila za nazalnu primjenu pripravljena je uz pomoć Labrasola, cetilpiridinijevog klorida i glicerola (Kaur i sur., 2020). Uz nanosuspenzije i nanoemulzije, za nazalnu primjenu donepezila proučavana je i formulacija u obliku mikroemulzije. Uljnu fazu, s donepezilom, činilo je ricinusovo ulje, a za pripremu formulacije su korišteni još Labrasol, Transcutol P, propilenglikol i voda (Espinoza i sur., 2018). Slične formulacije su pripravili Khunt i suradnici (2020). Uljnu fazu predstavljao je Capmul MCM EP, a smjesu surfaktanta i kosurfaktanta činili su Tween 20 i Transcutol P. Svrha istraživanja bila je ispitati utjecaj maslačnog ulja i ribljeg ulja bogatog omega-3 masnim kiselinama na dostavu lijeka. Nakon optimizacije sastava mikroemulzija, pokazano je da oba ulja imaju pozitivan utjecaj na permeabilnost nosne sluznice i bioraspoloživost donepezila u mozgu (Khunt i sur., 2020).

Još neke od formulacija za nazalnu primjenu donepezila uključuju liposomalnu formulaciju pripravljenu klasičnom film metodom (Al-Asmari i sur., 2016) te čvrste lipidne nanočestice s donepezilom pripravljene metodom difuzije otapala (Yasir i sur., 2018). *In vivo* ispitivanjima navedenih formulacija u štakora utvrđena je značajno veća bioraspoloživost donepezila u mozgu u usporedbi s bioraspoloživošću donepezila iz otopine (Yasir i sur., 2018; Al-Asmari i sur., 2016). Al Harthi i suradnici su razvili liposomalni hidrogel s tioliranim kitozanom za nazalnu primjenu donepezila te proveli *in vivo* farmakokinetička ispitivanja u novozelandskih bijelih kunića. Nazalna primjena razvijene formulacije rezultirala je 107 % većim sadržajem donepezila u mozgu u odnosu na oralnu primjenu donepezila u obliku tablete (Al Harthi i sur., 2019).

S obzirom da je depozicija lijeka u olfaktorno područje od ključne važnosti za uspješnu dostavu lijeka u SŽS nazalnim putem, Perkušić i suradnici su u istraživanju mikrosfera s donepezilom proveli ispitivanje profila nazalne depozicije *in vitro*. Kitozansko-manitolske mikrosfere s donepezilom pripravljene su sušenjem raspršivanjem. Ispitivanje

profila nazalne depozicije provedeno je korištenjem višedijelnog 3D printanog modela nosne šupljine. Najveći udio primijenjene doze u olfaktornoj regiji postignut je pri kutu primjene od 30° u odnosu na horizontalnu ravninu i protok zraka od 0 L min⁻¹, a iznosio je čak 65,5 % (Perkušić i sur., 2022).

1.6. Modeli nosne šupljine za ispitivanje nazalne depozicije

U razvoju novih nazalnih farmaceutskih oblika, važna su ispitivanja nazalne depozicije pri različitim uvjetima primjene. Anatomija i fiziologija nosne šupljine vrlo je kompleksna pa je unatoč brojnim metodama *in vitro* karakterizacije i usporedbe nazalnih farmaceutskih oblika teško predvidjeti gdje će lijek dospjeti prilikom primjene *in vivo*. *In vivo* ispitivanja profila nazalne depozicije bila bi najbolji izbor, međutim ona su zahtjevna i dugotrajna. Korištenje modela nosne šupljine u svrhu ispitivanja nazalne depozicije cjenovno je prihvatljivije i traje kraće u odnosu na *in vivo* ispitivanja (Djupesland i sur., 2020).

Modeli nosne šupljine oponašaju anatomiju nosne šupljine čovjeka, što ih čini korisnim *in vitro* pomagalom u ispitivanju nazalne depozicije lijekova. Međutim imaju i određene ograničavajuće čimbenike. Nemaju sposobnost predstavljanja varijabilnosti površine nosne sluznice i mukocilijarnog klirensa (Williams i Suman, 2022; Le Guellec i sur., 2021). Biološku značajnost modela povećalo bi korištenje mekanijih i fleksibilnijih materijala te stanica i umjetne sluzi kako bi se simulirali fiziološki uvjeti i površinske karakteristike sluznice (Forbes i sur., 2020).

Postojeći anatomske modeli razlikuju se prema razini kompleksnosti kojom prikazuju nosnu šupljinu (Tablica 2.). Le Guellec i suradnici su u svom radu istražili postojeće anatomske modele te ih prema geometriji podijelili na modele pojednostavljene geometrije, sofisticirane ali nepotpune geometrije, sofisticirane i potpune geometrije te ljudske geometrije. U ranijim laboratorijskim istraživanjima korištene su glave kadavera za predstavljanje ljudske geometrije, međutim konzervacija i retrakcija tkiva ograničava njihovo korištenje. Postupkom plastinacije glava kadavera riješen je problem konzervacije i retrakcije tkiva modela (Williams i Suman, 2022; Le Guellec i sur., 2021).

Tablica 2. Anatomski modeli nosne šupljine

Kompleksnost geometrije	Proizvođač/model	Materijal	Mogućnost rastavljanja na dijelove	Literatura
Ljudska geometrija	glava kadavera		-	Hilton i sur., 2008
	plastirana glava	voda i lipidi zamijenjeni polimerima	-	Durand i sur., 2001
Pojednostavljena geometrija	PARI model sinusa	polioksimetilen	+	Thieme i sur., 2012
Sofisticirana ali nepotpuna geometrija	Kokenov model	silikon	-	Kundoor i Dalby, 2011
	Bespakov model	Duraform PA	+	Hughes i sur., 2008
Sofisticirana i potpuna geometrija	Model Aptar Pharme	epoksi smola	+	Williams i Suman, 2022
	SAINT model	tekuća monomerna smola (Stereocool®)	-	Janssens i sur., 2001

Razvoj 3D printanih modela nosne šupljine omogućio je detaljniji i precizniji prikaz geometrije nosne šupljine. Izrada višedijelnih modela pridonosi istraživanjima s fokusom na određene regije nosne šupljine. Još jedna od prednosti 3D printanih modela je mogućnost prikaza nosne anatomije specifične za određene skupine ljudi, primjerice pedijatrijsku populaciju (Williams i Suman, 2022; Janssens i sur., 2001).

Ovisno o ciljevima istraživanja i svojstvima modela, za kvantitativnu analizu profila nazalne depozicije koriste se različite metode. Gravimetrijska metoda odnosi se na vaganje pojedinačnih dijelova modela. Za analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) i spektroskopiju, uzorak je nakon depozicije potrebno isprati s modela kako bi se mogao odrediti profil nazalne depozicije. Kvantifikacija distribucije tekuće formulacije može se provesti i korištenjem gela koji mijenja

boju u kontaktu s tekućinom (npr. Sar-gel[®]) pri čemu intenzitet boje ukazuje na količinu uzorka na tom mjestu. Korištenjem radioaktivno obilježenog lijeka profil depozicije se dobije iz intenziteta zračenja u određenim dijelovima modela (Deruyver i sur., 2021).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Alzheimerova bolest najčešći je oblik demencije te predstavlja čak 60 – 70 % od ukupnog broja slučajeva demencije. Pretpostavlja se da će se broj oboljelih od demencije, koji je trenutno oko 50 milijuna ljudi, utrostručiti do 2050. godine. S obzirom na rastuću prevalenciju, demencija predstavlja javnozdravstveni problem (Križaj Grden i Mimica, 2019).

Donepezil, jedan od najčešće korištenih lijekova u liječenju AB-a, trenutno je dostupan samo u formulacijama za oralnu primjenu i u obliku transdermalnog flastera. Mala bioraspoloživost lijeka u mozgu dovodi do potrebe za primjenom velike dnevne doze lijeka (5 – 10 mg) kako bi se postigla učinkovita koncentracija u mozgu. Način primjene lijeka kojim se zaobilazi krvno-moždana barijera omogućava postizanje učinkovite koncentracije lijeka u mozgu primjenom manje doze, čime se smanjuje sistemska izloženost i vjerojatnost za razvoj nuspojava (Nunes i sur., 2022).

Neinvazivnost primjene lijeka nazalnim putem predstavlja značajnu prednost u odnosu na ostale načine primjene lijeka s ciljem izravne dostave u SŽS. Osim toga, bolesnik može sam sebi primijeniti lijek, brži je početak djelovanja i veća bioraspoloživost lijeka u mozgu (Erdő i sur., 2018).

Cilj ovog rada bio je pripremiti kitozanske *in situ* gelirajuće sustave s donepezilom te ispitati njihovu prikladnost za nazalnu primjenu s obzirom na viskoznost u mirovanju, temperaturu geliranja, vrijeme geliranja i kut raspršenja. Provedeno je *in vitro* ispitivanje profila nazalne depozicije radi određivanja kuta primjene koji ima najveći potencijal depozicije formulacije u olfaktorno područje, što je ključno za izravnu dostavu lijeka iz nosne šupljine u mozak.

Specifični ciljevi:

- Pripremiti *in situ* gelirajuće sustave koje sadržavaju donepezil, kitozan i β -glicerofosfat.
- Ispitati utjecaj koncentracije kitozana u *in situ* gelirajućim sustavima na viskoznost u mirovanju, temperaturu i vrijeme geliranja te kut raspršenja.
- Ispitati utjecaj kuta primjene odabranog *in situ* gelirajućeg sustava na profil nazalne depozicije *in vitro*, korištenjem višedijelnog 3D printanog modela nosne šupljine.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za izradu nazalnih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom korišteni su: kitozan niske molekulske mase (dalje u tekstu kitozan; Sigma Aldrich Chemie, Njemačka), donepezilklorid (dalje u tekstu donepezil; Carbosynth Limited, Ujedinjeno Kraljevstvo) i dinatrijev β -glicerofosfat pentahidrat (dalje u tekstu β -GP; Biosynth s.r.o., Slovačka).

3.2. Metode

3.2.1. Priprava kitozanskih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom

Koncentrirana otopina β -GP-a (490 mg mL^{-1}) pripremljena je otapanjem krutine β -GP-a u pročišćenoj vodi, uz miješanje na magnetskoj miješalici i soniciranje na ultrazvučnoj kupelji (Bandelin, Sonorex digiplus, Njemačka). Koncentrirane otopine kitozana (10 , $12,5$ i 15 mg mL^{-1}), pripravljene su otapanjem kitozana u $0,5 \%$ -tnoj octenoj kiselini (V/V), uz miješanje na magnetskoj miješalici 24 sata. Tako pripravljene otopine kitozana su filtrirane uz pomoć vakuum pumpe.

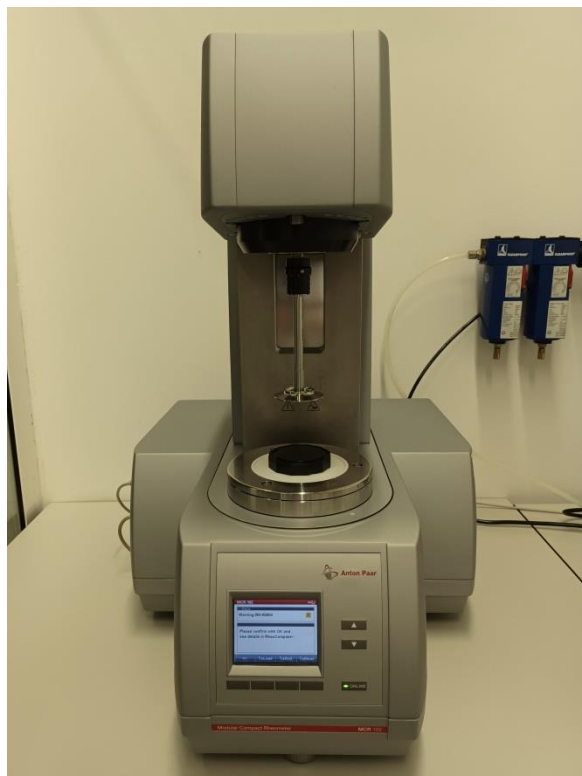
In situ gelirajući sustavi s donepezilom pripremljeni su postupnim dodavanjem koncentrirane otopine β -GP-a (490 mg mL^{-1}) koncentriranoj otopini kitozana, u kojoj je prethodno otopljen donepezil. Volumni omjer korištene koncentrirane otopine kitozana i koncentrirane otopine β -GP-a iznosi 4:2,5. Naime, otopinama kitozana dodana je točno određena količina donepezila kako bi koncentracija lijeka u završnim formulacijama iznosila $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$. Obje otopine su prije miješanja bile ohlađene u ledenoj kupelji na $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Pripremljena formulacija miješana je u ledenoj kupelji još 10 minuta. Sastav pripremljenih kitozanskih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom prikazan je u Tablici 3.

Tablica 3. Sastav pripremljenih kitozanskih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom

Formulacija	Koncentracija β -GP-a (mg mL^{-1})	Koncentracija donepezila (mg mL^{-1})	Koncentracija kitozana (mg mL^{-1})
1	188,46	0,30	6,15
2	188,46	0,30	7,69
3	188,46	0,30	9,23

3.2.2. Reološka karakterizacija kitozanskih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom

Pripravljene kitozanske *in situ* gelirajuće sustave s donepezilom reološki su karakterizirani rotacijskim i oscilacijskim testovima. Testovi su provedeni na reometru MCR 102 (Anton Paar GmbH, Austrija; Slika 3.), a rezultati su obrađeni i analizirani pomoću softvera RheoCompass™ (Anton Paar GmbH, Austrija). Za svaku formulaciju mjerenja su provedena u triplikatu.



Slika 3. Reometar MCR 102 (Anton Paar GmbH, Austrija)

3.2.2.1. Test puzanja

Rotacijski test puzanja (engl. *creep test*) proveden je u svrhu određivanja viskoznosti u mirovanju (engl. *zero shear viscosity*) kitozanskih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom. Testom se ispituje ovisnost smične deformacije (γ) o vremenu. Udaljenost između korištenog mjernog tijela, CP50-1 (engl. *cone plate*, promjera 50 mm, nagiba 1°), i donje mjerne ploče postavljena je na 0,102 mm. Mjerenje je trajalo 5 minuta te je provedeno pri konstantnoj temperaturi 25°C i smičnom naprežanju 0,1 Pa.

3.2.2.2. Test promjene temperature

Test promjene temperature (engl. *temperature sweep test*) prikazuje ovisnost modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') o temperaturi. Oscilacijski test promjene temperature proveden je u svrhu određivanja temperature faznog prijelaza uzorka iz *sol* u *gel* stanje, odnosno temperature pri kojoj je modul pohrane (G') jednak modulu gubitka (G'') (Supper i sur., 2013). Korišten je sustav paralelnih ploča - mjereno tijelo PP50 (engl. *parallel plate*), promjera 50 mm, pri fiksnoj udaljenosti 0,5 mm od donje mjerne ploče. Test je proveden u rasponu temperatura od 20 °C do 40 °C. Trajanje testa iznosilo je 20 minuta, uz linearni porast temperature od 1 °C/min. Kutna frekvencija iznosila je 6,28 rad s⁻¹, a smična deformacija 1 %.

3.2.2.3. Vremenski test geliranja

Oscilacijskim testom vremena geliranja (engl. *time sweep test*) praćena je ovisnost modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') o vremenu s ciljem određivanja vremena koje je potrebno za fazni prijelaz uzorka iz *sol* u *gel* stanje (Supper i sur., 2013). Korišteno je mjereno tijelo PP50 (promjera 50 mm). Udaljenost između mjernog tijela i donje mjerne ploče prilikom mjerenja postavljena je na 0,5 mm. Kutna frekvencija iznosila je 6,28 rad s⁻¹, a smična deformacija 1 %. Test je trajao 20 min, prilikom čega je održavana konstantna temperatura od 34 °C, što odgovara prosječnoj temperaturi nosne sluznice (Keck i sur., 2000).

3.2.3. Određivanje kuta raspršenja kitozanskih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom

Kitozanski *in situ* gelirajući sustav s donepezilom raspršen je VP7 raspršivačem namijenjenim za nazalnu primjenu (Aptar Pharma, Francuska). Korišteni VP7 raspršivač bio je opremljen 232 NE aktuatorom i postavljen ispred tamne pozadine. Raspršivanje formulacije snimljeno je kamerom mobitela (Samsung Galaxy A22) s konstantne udaljenosti. Iz snimke su izdvojene slike u trenutku aktivacije raspršivača, a kut raspršenja izmjeren je virtualnim kutomjerom, u triplikatu za sve tri formulacije.

3.2.4. Određivanje profila nazalne depozicije kitozanskih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom *in vitro*

Pri određivanju profila nazalne depozicije korišten je višedijelni 3D printani model nosne šupljine (Slika 4.), izrađen prema CT (engl. *computed tomography*) snimci anonimnog 62-godišnjeg pacijenta iz baze podataka Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Model je razvijen za potrebe ispitivanja nazalne depozicije praškastog sustava s

deksametazonom (Nižić Nodilo i sur., 2021). Korišteni model nosne šupljine izrađen je u skladu s načelima Helsinške deklaracije, prema planu istraživanja odobrenom od strane Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice (predmet EP-9941/19-3) i Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (klasa 643-02/19-01/02, ur. broj 251-62-03-19-43). Model se sastoji od anteriorne regije, turbinatne regije s mogućnošću odvajanja olfaktornog dijela, septuma s mogućnošću odvajanja olfaktornog dijela te posteriorne regije koja se može spojiti s respiratornom pumpom (Respiratory Pump Model 613, Harvard Apparatus, SAD). S obzirom da se lijeva i desna strana nazalne šupljine međusobno razlikuju, na temelju podataka o modelu opisanih u radu Nižić Nodilo i suradnici (2021), za potrebe izrade ovog diplomskog rada profil nazalne depozicije ispitan je na desnoj strani modela (Nižić Nodilo i sur., 2021).

Vizualizacija profila depozicije omogućena je korištenjem Sar-gel[®] paste (Arkema, Francuska) koja u kontaktu s formulacijom postaje ružičasta. Profil depozicije također je određen gravimetrijski uz pomoć analitičke vage (preciznost 0,01 mg; Mettler Toledo, Švicarska). S ciljem određivanja udijela formulacije dostavljene u pojedinu regiju modela nosne šupljine, dijelovi modela su premazani pastom te izvagani prije sastavljanja modela i nakon raspršivanja formulacije.

U svrhu osiguranja optimalnih uvjeta za izvođenje ispitivanja nazalne depozicije, nakon sastavljanja, model je dodatno omotan parafilmom. Profil nazalne depozicije ispitan je pri tri različita kuta primjene (α , kut koji uređaj zatvara s horizontalnom ravninom): 45°, 60° i 75°, te je ispitivanje provedeno u duplikatu. Prilikom aktivacije uređaja druga nosnica je bila začepljena po uzoru na ranija istraživanja profila nazalne depozicije (Perkušić i sur., 2022; Nižić Nodilo i sur., 2021). Ispitivanje je provedeno pri simuliranju zadržavanja daha (protok zraka od 0 L min⁻¹) te je otvor posteriornog dijela također omotan parafilmom.

Formulacija je u model primijenjena višedoznim VP7 nazalnim raspršivačem (Aptar Pharma, Francuska), koji, opremljen korištenim 232 NE aktuatorom, po jednom potisku isporučuje 0,1 mL formulacije. Vaganjem raspršivača prije i nakon raspršivanja doze određena je točna masa formulacije raspršene u model nosne šupljine. Udio formulacije dostavljene u pojedinu regiju dobiven je iz omjera mase formulacije u pojedinoj regiji i mase raspršene formulacije.



Slika 4. Višedijelni 3D printani model nosne šupljine

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava kitozanskih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom

Uspješno su pripravljena tri *in situ* gelirajuća sustava koji su sadržavali donepezil (0,3 mg mL⁻¹), β-glicerofosfat (188 mg mL⁻¹) i kitozan (6,15-9,23 mg mL⁻¹; Tablica 3.) Pripravljene sustavi prikladni su za nazalnu primjenu donepezila s obzirom na dozu koja se dostavi po potisku. Naime, korištenjem VP7 nazalnog raspršivača isporuči se volumen od 100 μL otopine (uobičajen za nazalnu primjenu), odnosno 0,03 mg donepezila, što odgovara 0,3 % oralne dnevne doze donepezila (10 mg). Navedeni postotak, zbog potencijala izravne dostave donepezila iz nosne šupljine u mozak, smatra se dovoljnim za postizanje terapijskog učinka donepezila nakon nazalne primjene (Perkušić i sur., 2023).

Vrijednost pH ispitivanih formulacija iznosila je između 7,31 i 7,41 što je unutar raspona podnošljivosti nosne sluznice (Javia i sur., 2021).

Za pripravu *in situ* gelirajućih sustava korišten je kitozan, polisaharid dobiven parcijalnom deacetilacijom hitina. Kitozan u strukturi sadrži glukozamin i N-acetilglukozamin. Razlikuje se prema molekularnoj masi i stupnju acetilacije. Biokompatibilan je i biorazgradljiv, a produkti razgradnje nisu toksični ni imunogeni (Ahmadi i sur., 2015).

Mukoadhezivnost je još jedno od značajnih svojstava kitozana koje ga čini prikladnim za pripravu farmaceutskih oblika za nazalnu primjenu. Naime, mukoadhezivni farmaceutski oblici usporavaju mukocilijarno čišćenje - mehanizam uslijed kojeg se sluz koja prekriva nosnu sluznicu u potpunosti zamijeni novom svakih 10 – 20 minuta. Sporije mukocilijarno čišćenje omogućuje produljeno zadržavanje formulacije na sluznici što rezultira većom apsorpcijom lijeka (Gänger i Schindowski, 2018). Kitozan također otvara čvrste veze među epitelnim stanicama omogućavajući bolju apsorpciju hidrofilnih lijekova međustaničnim transportom (Illum, 2010).

Kitozan je topljiv u pH području nižem od pK_a vrijednosti kitozana (< 6,2). Porastom pH vrijednosti otopine kitozana iznad 6,2 formiraju se precipitati (Cho i sur., 2005). S obzirom da fiziološka vrijednost pH nosne sluznice iznosi 5,5 – 6,5 (Beule, 2010) geliranje kitozana ovisno o pH nije prikladno za nazalnu primjenu.

Sustavi kitozana i poliolfosfata pokazuju temperaturom potaknuto geliranje. Naime, za formiranje kitozanskog gela zaslužne su elektrostatske interakcije, vodikove veze i hidrofobne interakcije. Dodatkom poliolfosfata (β-GP-a) smanjuju se interakcije između lanaca kitozana, neovisno o pH. Dodatak β-GP-a kao slabe baze rezultira porastom pH vrijednosti otopine, bez pojave precipitacije pri fiziološki prihvatljivim pH vrijednostima. Povećanje temperature pri

takvim uvjetima potiče agregaciju lanaca kitozana i posljedično formiranje gela (Agrawal i sur., 2020; Chenite i sur., 2000).

Formulacije sličnog sastava su 2019. okarakterizirali Gholizadeh i suradnici (2019a, 2019b). Istraživali su termoosjetljive *in situ* gelirajuće otopine ibuprofena i traneksamične kiseline za nazalnu primjenu. Za pripremu formulacija s ibuprofenom (0,2 %, *m/V*) koristili su kitozan različitih molekulskih masa (110 – 150, 150 – 250, 250 – 300 kDa) i stupnja deacetilacije 98 %. Koncentracija kitozana u ispitivanim otopinama bila je u rasponu 0,6 – 1,3 %, a koncentracija β -GP-a u rasponu 8 – 19 % (Gholizadeh i sur., 2019a). *In situ* gelirajuće otopine traneksamične kiseline (0,1 %, 1 %, 2 %, *m/V*) sadržavale su kitozan (110 – 150 kDa) u koncentraciji od 1,3 % (*m/V*) i β -GP u koncentraciji od 19 % (*m/V*) (Gholizadeh i sur., 2019b).

4.2. Reološka svojstva kitozanskih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom

U svrhu ispitivanja utjecaja koncentracije kitozana na reološka svojstva *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom, od reoloških testova provedeni su test puzanja, test promjene temperature i vremenski test geliranja, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 4. Prilikom razvoja *in situ* gelirajućih sustava za nazalnu primjenu potrebno je odrediti viskoznost u mirovanju i termogelirajuća svojstva (vrijeme i temperatura geliranja) formulacija kako bi se ispitala njihova prikladnost za primjenu u obliku spreja te za primjenu na nosnu sluznicu (Perkušić i sur., 2023).

Tablica 4. Reološka svojstva kitozanskih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom

Formulacija	1	2	3
Viskoznost u mirovanju (mPa s)	35,03 ± 0,82	88,30 ± 1,81	206,37 ± 1,46
Temperatura geliranja (°C)	34,9 ± 0,6	34,2 ± 0,8	33,7 ± 0,1
Vrijeme geliranja (min)	1,0 ± 0,4	1,2 ± 1,0	0,0 ± 0,0

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (n=3).

4.2.1. Viskoznost u mirovanju

Određivanje viskoznosti u mirovanju provedeno je rotacijskim testom puzanja pri konstantnoj temperaturi (25 °C) i konstantnom smičnom naprezanju (0,1 Pa). Viskoznost u mirovanju određena je iz grafa ovisnosti smične deformacije (γ) o vremenu (t). Rezultati ispitivanja prikazani su u Tablici 4. Ispitivanim *in situ* gelirajućim sustavima s donepezilom viskoznost u mirovanju rasla je povećanjem koncentracije kitozana te je iznosila između $35,03 \pm 0,82$ mPa s i $206,37 \pm 1,46$ mPa s (Tablica 4.). Porastom koncentracije polimera zbog intermolekularnih interakcija povećava se viskoznost otopine (Sato, 2017).

Rezultati su u skladu s prethodno ispitivanim *in situ* gelirajućim sustavima donepezila ($0,4 - 0,5$ mg mL⁻¹) pripremljenim na identičan način, s niskomolekulskim kitozonom ($6,15 - 9,23$ mg mL⁻¹) i β -GP-om ($188,46$ mg mL⁻¹), kojima je viskoznost u mirovanju iznosila između $22,3 \pm 0,4$ mPa s i $113,6 \pm 0,8$ mPa s (Župančić, 2023).

Prema rezultatima istraživanja Perkušić i suradnika (2023), *in situ* gelirajući sustavi donepezila istog reda veličine viskoznosti u mirovanju kao i u ovom radu, karakterizirani su prikladnom raspodjelom veličina kapljica pri raspršivanju VP7 nazalnim raspršivačem, što ih svrstava među prikladne za nazalnu primjenu u obliku spreja (Perkušić i sur., 2023).

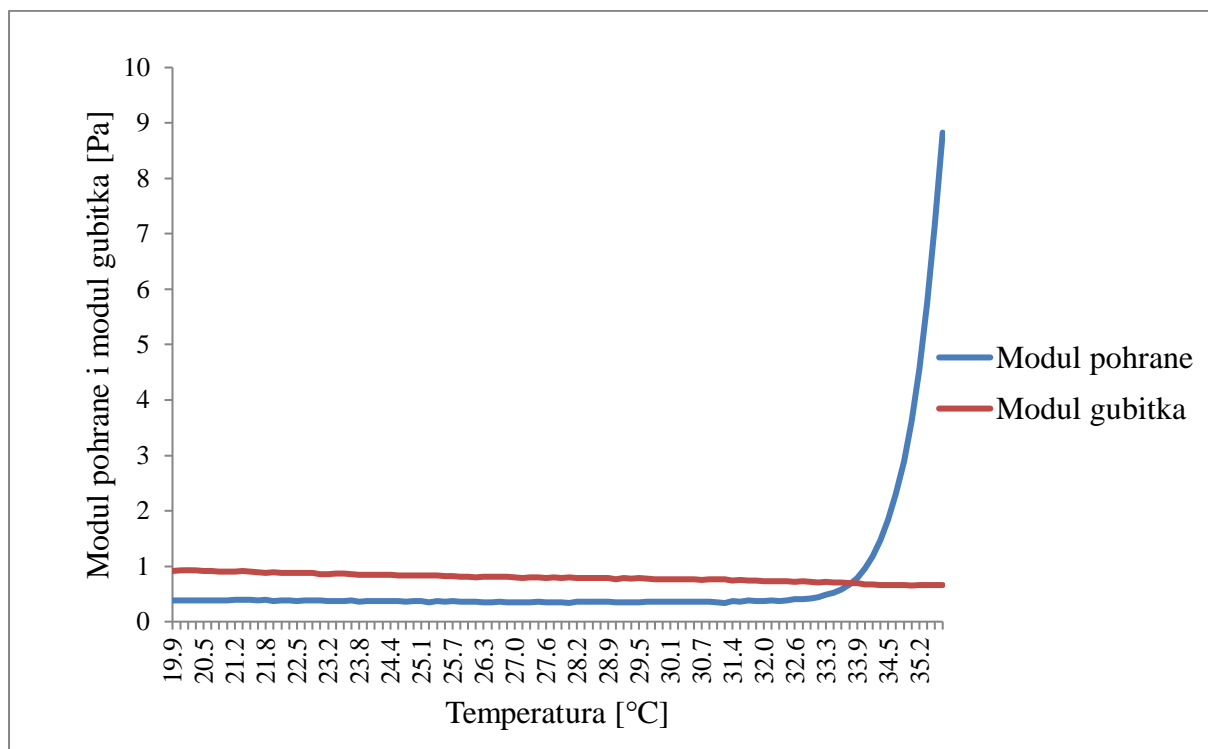
4.2.2. Temperatura geliranja

S ciljem provjere hoće li pripremljeni kitozanski *in situ* gelirajući sustavi s donepezilom gelirati pri temperaturi nosne sluznice, proveden je oscilacijski test promjene temperature u rasponu 20 – 40 °C. Temperatura geliranja ispitivanih formulacija iznosila je između $33,7 \pm 0,1$ °C i $34,9 \pm 0,6$ °C (Tablica 4.; Slika 5.), što je unutar raspona fiziološke temperature nosne sluznice (32 – 35 °C) (Gholizadeh i sur., 2019b).

U ranijem istraživanju, temperatura geliranja *in situ* gelirajućih sustava donepezila ($0,4 - 0,5$ mg mL⁻¹) s kitozonom ($6,15 - 9,23$ mg mL⁻¹) i β -GP-om ($188,46$ mg mL⁻¹) nalazila se u rasponu od $33,0 \pm 0,6$ °C do $36,5 \pm 0,1$ °C (Župančić, 2023).

Prema podacima iz literature, ranije je istraživana termoosjetljivi *in situ* gelirajući sustav za izravnu dostavu doksepina iz nosne šupljine u mozak. Navedena otopina doksepina (0,5 %, *m/V*) s kitozonom (2 %, *m/V*) i β -GP-om (10 %, *m/m*) gelirala je pri temperaturi od 37,4 °C (Naik i Nair, 2014). Također, temperatura geliranja *in situ* gelirajućih otopina ibuprofena (0,2 %, *m/V*) s kitozonom (1,3 %, *m/V*) različitih molekulskih masa i β -GP-om (19 %, *m/V*) bila je u temperaturnom rasponu koji odgovara geliranju na nosnoj sluznici. Određene temperature geliranja iznosile su $30,33 \pm 2,52$ °C, $31,33 \pm 4,51$ °C i $35,33 \pm 0,29$ °C za otopine pripravljene s kitozonom molekulskih masa redom 250 – 300 kDa, 150 – 250 kDa i

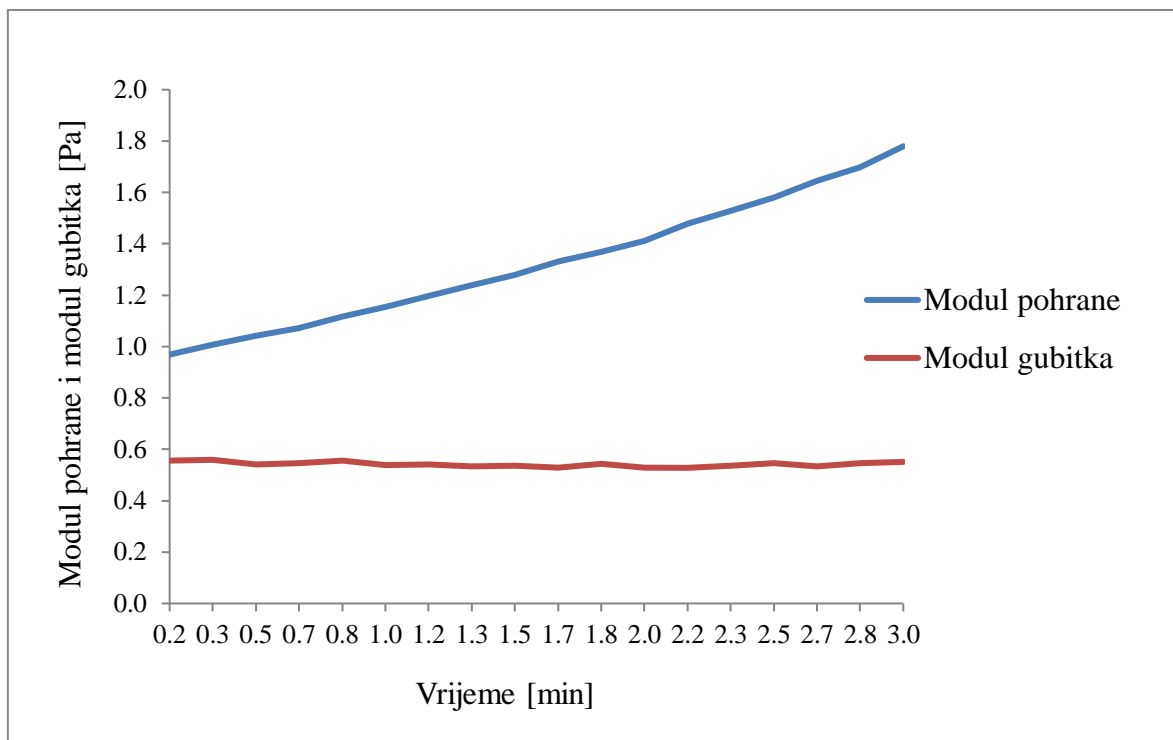
110 – 150 kDa (Gholizadeh i sur., 2019a). Slični rezultati (32 °C) dobiveni su i za *in situ* gelirajuću otopinu traneksamične kiseline za nazalnu primjenu (koncentracija kitozana 1,3 %, *m/V*, 110 – 150 kDa; koncentracija β -GP-a 19 %, *m/V*) (Gholizadeh i sur., 2019b).



Slika 5. Grafički prikaz ovisnosti modula pohrane i modula gubitka [Pa] o temperaturi [°C] za kitozanski *in situ* gelirajući sustav s donepezilom pripremljen pri koncentraciji donepezila, kitozana i β -GP-a redom od 0,3 mg mL⁻¹, 9,23 mg mL⁻¹ i 188,46 mg mL⁻¹.

4.2.3. Vrijeme geliranja

Vremenski test geliranja proveden je pri 34 °C, odnosno pri temperaturi nosne sluznice. Formulacija pripravljena pri koncentraciji kitozana od 9,23 mg mL⁻¹ gelirala je trenutno (Slika 6.), što se moglo i pretpostaviti s obzirom da joj je temperatura geliranja bila manja od 34 °C, zbog čega je najpovoljnija za nazalnu primjenu. Vrijeme geliranja za ostale formulacije iznosilo je približno jednu minutu (Tablica 4.). Sve tri formulacije geliraju u vremenu kraćem od očekivanog vremena eliminacije s nosne sluznice mukocilijarnim čišćenjem. Formiranje gela na mjestu primjene pruža potencijal povećanja apsorpcije lijeka osiguravajući produljeni kontakt formulacije sa sluznicom te koncentriranje lijeka na mjestu depozicije (Grassin-Delyle i sur., 2012).



Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti modula pohrane i modula gubitka [Pa] o vremenu [min] za kitozanski *in situ* gelirajući sustav s donepezilom pripremljen pri koncentraciji donepezila, kitozana i β -GP-a redom od $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$, $9,23 \text{ mg mL}^{-1}$ i $188,46 \text{ mg mL}^{-1}$. Mjerenje je provedeno pri $34 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ranije su istraživani istovrsni *in situ* gelirajući sustavi s donepezilom pripremljeni pri većim koncentracijama donepezila ($0,4$ i $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$), uz iste koncentracije kitozana ($6,15 - 9,23 \text{ mg mL}^{-1}$) i β -GP-a ($188,46 \text{ mg mL}^{-1}$) (Župančić, 2023). Jedino je sustav pripremljen pri koncentraciji donepezila od $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ i koncentraciji kitozana od $9,23 \text{ mg mL}^{-1}$ gelirao trenutno pri $34 \text{ }^\circ\text{C}$, dok su ostali sustavi gelirali u vremenu između $4,2 \pm 0,0 \text{ min}$ i $4,9 \pm 0,1 \text{ min}$ (Župančić, 2023).

U ranijim istraživanjima, formulacijama sličnog sastava također je utvrđeno vrijeme geliranja prikladno za nazalnu primjenu. Vrijeme geliranja prethodno spomenute *in situ* gelirajuće otopine doksepina ($0,5 \%$, m/V) s kitozonom (2% , m/V) i β -GP-om (10% , m/m) iznosilo je $7,32$ minute (Naik i Nair, 2014). Vremena geliranja u ovom radu ispitivanih *in situ* gelirajućih otopina donepezila bila su kraća od vremena geliranja *in situ* gelirajućih otopina ibuprofena za nazalnu primjenu koje su ispitivali Gholizadeh i suradnici (2019a). S obzirom na vrijeme geliranja, najboljim su se pokazale *in situ* gelirajuće otopine ibuprofena pripremljene pri koncentraciji kitozana od $1,3 \%$ (m/V) i koncentraciji β -GP-a od 19% (m/V). Najbrže (4 min) je gelirala formulacija pripremljena s kitozonom molekulske mase $250 - 300$

kDa. Vrijeme geliranja formulacija koje su sadržavale kitozan molekularnih masa 150 – 250 kDa i 110 – 150 kDa iznosilo je redom 6 minuta i 4 minute (Gholizadeh i sur., 2019a). U ispitivanju *in situ* gelirajuće otopine traneksamične kiseline za nazalnu primjenu, pripravljene pri koncentraciji kitozana od 1,3 % (*m/V*) (110 – 150 kDa) i koncentraciji β -GP-a od 19 % (*m/V*), najbrže je gelirala otopina koja je sadržavala 1 % (*m/V*) traneksamične kiseline. Vrijeme geliranja navedene otopine iznosilo je $4,96 \pm 0,44$ minuta, dok je za otopine pri koncentraciji traneksamične kiseline 0,1 % i 2 % (*m/V*), vrijeme geliranja iznosilo redom $7,99 \pm 0,38$ i $16,90 \pm 2,23$ min (Gholizadeh i sur., 2019b).

4.3. Kut raspršenja

Kutovi raspršenja ispitivanih kitozanskih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom, izmjereni virtualnim kutomjerom nakon raspršivanja VP7 raspršivačem opremljenim 232 NE aktuatorom, prikazani su u Tablici 5. Povećanje koncentracije kitozana u ispitivanim *in situ* gelirajućim sustavima s donepezilom rezultiralo je smanjenjem kuta raspršenja. Navedeno zapažanje u skladu je s dostupnim podacima iz literature, prema kojima su viskoznije otopine povezane s manjim kutovima raspršenja (Kundoor i Dalby, 2011).

Izmjereni kutovi raspršenja manji su od 30° , što pogoduje depoziciji značajne količine aerosolizirane formulacije u turbinatnoj regiji (Foo i sur., 2018). Naime, kut raspršenja bitno je svojstvo spreja o kojem ovisi profil njegove nazalne depozicije. S obzirom na anatomiju nosa, odnosno uske nosne prolaze, formulacije užih kutova raspršenja smatraju se prikladnijim za dostavu lijeka u dublje dijelove nosne šupljine (Gao i sur., 2020).

Tablica 5. Kut raspršenja kitozanskih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom izmjeren virtualnim kutomjerom nakon raspršivanja nazalnim VP7 raspršivačem opremljenim 232 NE aktuatorom.

Formulacija	1	2	3
Kut raspršenja ($^\circ$)	$25,5 \pm 0,7$	$19,6 \pm 0,1$	$15,5 \pm 0,4$

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD (n=3).

4.4. Profil nazalne depozicije *in vitro*

Temeljem rezultata provedene reološke karakterizacije, za ispitivanje profila nazalne depozicije izabran je *in situ* gelirajući sustav s donepezilom pripremljen pri najvećoj

koncentraciji kitozana ($9,23 \text{ mg mL}^{-1}$). Naime, navedena formulacija pokazala se najboljom za nazalnu primjenu jer gelira trenutno pri temperaturi nosne sluznice, a uz viskoznost u mirovanju od $206,37 \pm 1,46 \text{ mPa s}$, karakterizirana je i najmanjim kutom raspršivanja.

Profil nazalne depozicije odabrane formulacije ispitan je *in vitro*, korištenjem višedijelnog 3D printanog modela nosne šupljine, pri protoku zraka od 0 L min^{-1} i uz začepljenu drugu nosnicu. Formulacija je primijenjena višedozirnim VP7 nazalnim raspršivačem opremljenim 232 NE aktuatorom. Po jednom potisku u model je isporučen volumen od $0,1 \text{ mL}$ formulacije pod kutom od 45° , 60° i 75° u odnosu na horizontalnu ravninu.

Kut primjene nazalne formulacije uvelike utječe na profil nazalne depozicije. Za formulacije u tekućem obliku, nazalna primjena pod kutom od $60^\circ - 75^\circ$ u odnosu na horizontalnu ravninu ima najveći potencijal za depoziciju u olfaktornom području nosne šupljine (Kundoor i Dalby, 2011). Rezultati ispitivanja profila nazalne depozicije odabranog kitozanskog *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom ($9,23 \text{ mg mL}^{-1}$ kitozana) prikazani su u Tablici 6. Povećanje kuta primjene od 45° do 75° rezultiralo je povećanjem depozicije u olfaktorno područje modela nosne šupljine. Najveći udio formulacije dostavljen u olfaktorno područje (čak $58,1 \pm 8,9 \%$) dobiven je pri primjeni spreja pod kutom od 75° . Iz toga proizlazi da je kut primjene od 75° najprikladniji za nazalnu primjenu *in situ* gelirajuće otopine donepezila s ciljem dostave lijeka u mozak.

Dobiveni rezultati su u skladu s literaturnim podacima. U istraživanju Pina Costa i sur. (2023.) razvijeni su i proučavani nazalni *in situ* gelirajući sustavi s nanostrukturiranim lipidnim nosačima diazepama, s ciljem izravne dostave lijeka iz nosne šupljine u mozak. Za ispitivanje profila depozicije korišten je 3D-printani model nosne šupljine na kojem je ispitan i profil depozicije *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom u ovom radu. Formulacija je primijenjena višedozirnim VP7 nazalnim raspršivačem opremljenim 232 N2B aktuatorom. Primjenom razvijene formulacije s pektinom CF025 pod kutom od 60° i 75° , u odnosu na horizontalnu ravninu, i pri protoku zraka 0 L min^{-1} , depozicija u olfaktornom području iznosila je redom $35,37 \%$ i $47,11 \%$ (Pina Costa i sur., 2023).

Tablica 6. Postotni udio raspršenog kitozanskog *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom dostavljen u pojedinu regiju višedijelnog 3D printanog modela nosne šupljine. Ispitivani sustav pripremljen je pri koncentraciji donepezila, kitozana i β -GP-a redom od 0,3 mg mL⁻¹, 9,23 mg mL⁻¹ i 188,46 mg mL⁻¹.

Regija	Udio uzorka (%) ($\alpha = 45^\circ$)	Udio uzorka (%) ($\alpha = 60^\circ$)	Udio uzorka (%) ($\alpha = 75^\circ$)
Anteriorna regija	0,0 \pm 0,0	4,6 \pm 0,8	1,4 \pm 1,4
Turbinatna regija (bez olfaktornog dijela)	44,4 \pm 1,6	17,5 \pm 3,1	10,1 \pm 2,7
Olfaktorni dio turbinatne regije	2,5 \pm 3,5	11,4 \pm 1,5	30,9 \pm 3,1
Olfaktorni dio koji pripada septumu	0,7 \pm 1,0	27,3 \pm 3,4	27,2 \pm 5,8
Ostatak septuma	43,3 \pm 4,4	27,9 \pm 0,8	22,6 \pm 7,1

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD (n=2). α predstavlja kut koji uređaj zatvara s horizontalnom ravninom.

5. ZAKLJUČCI

- Uspješno su pripremljeni kitozanski *in situ* gelirajući sustavi s donepezilom, otapanjem donepezila ($0,30 \text{ mg mL}^{-1}$), kitozana ($6,15$, $7,69$ i $9,23 \text{ mg mL}^{-1}$) i β -GP-a ($188,46 \text{ mg mL}^{-1}$) u pročišćenoj vodi.
- Vrijednost pH pripremljenih *in situ* gelirajućih sustava nalazio se u rasponu $7,31$ i $7,41$ što se smatra prihvatljivim za nazalnu primjenu.
- Viskoznost u mirovanju ispitivanih *in situ* gelirajućih sustava rasla je povećanjem koncentracije kitozana te se nalazila u rasponu od $35,03 \pm 0,82 \text{ mPa}$ do $206,37 \pm 1,46 \text{ mPa}$ s.
- *In situ* gelirajući sustavi s donepezilom gelirali su u temperaturnom rasponu između $33,7 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ i $34,9 \pm 0,6 \text{ }^\circ\text{C}$. S obzirom na temperaturu nosne sluznice i temperature geliranja određene ispitivanjem, sustavi će gelirati prilikom nazalne primjene.
- Pri temperaturi $34 \text{ }^\circ\text{C}$, formulacija pripravljena pri koncentraciji kitozana od $9,23 \text{ mg mL}^{-1}$ gelirala je trenutno, dok su formulacije pripravljene pri koncentraciji kitozana od $6,15 \text{ mg mL}^{-1}$ i $7,69 \text{ mg mL}^{-1}$ gelirale redom za $1,0 \pm 0,4 \text{ min}$ i $1,2 \pm 1,0 \text{ min}$. Vrijeme geliranja svih formulacija kraće je od očekivanog vremena mukocilijarnog čišćenja s nosne sluznice.
- Kut raspršenja ispitivanih formulacija iznosio je između $15,5 \pm 0,4^\circ$ i $25,5 \pm 0,7^\circ$, te se smanjivao s porastom koncentracije kitozana u ispitivanim otopinama.
- Među ispitivanim *in situ* gelirajućim sustavima s donepezilom, najbolja svojstva za nazalnu primjenu s ciljem dostave lijeka u olfaktorno područje zabilježena su za sustav pripremljen pri koncentraciji kitozana od $9,23 \text{ mg mL}^{-1}$ te je s tim sustavom provedeno ispitivanje profila nazalne depozicije.
- U svrhu određivanja profila nazalne depozicije korišten je višedijelni 3D printani model nosne šupljine. Ispitivanje je provedeno pod kutovima 45° , 60° i 75° u odnosu na horizontalnu ravninu te pri simuliranju zadržavanja daha. Najveći udio formulacije dostavljen u olfaktorno područje ($58,1 \pm 8,9 \%$) dobiven je pri primjeni spreja pod kutom od 75° , iz čega proizlazi da je on najprikladniji za nazalnu primjenu *in situ* gelirajućeg sustava s ciljem izravne dostave donepezila iz nosne šupljine u mozak.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

° – stupanj

°C – Celzijev stupanj

3D – trodimenzionalno

AB – Alzheimerova bolest

APOE $\epsilon 4$ – alel $\epsilon 4$ za apolipoprotein E

CP50-1 – mjerno tijelo promjera 50 mm i nagiba 1° (engl. *cone plate*)

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

G' – modul pohrane

G'' – modul gubitka

GIT – gastrointestinalni trakt

IgG1 – imunoglobulin G1

NIH – engl. *National Institutes of Health*

NMDA – N-metil-D-aspartat

pH – negativan dekadski logaritam aktiviteta vodikovih iona u otopini

pKa – negativan logaritam konstante disocijacije elektrolita

PP50 – mjerno tijelo promjera 50 mm (engl. *parallel plate*)

SAINT model – engl. *Sophia anatomical infant nose-throat model*

SD – standardna devijacija

SŽS – središnji živčani sustav

t – vrijeme

T – temperatura

α – kut koji uređaj zatvara s horizontalnom ravninom

β -GP – dinatrijev β -glicerofosfat pentahidrat

γ – smična deformacija

η – viskoznost

7. LITERATURA

Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Dubey SK, Puri A, Gupta U, Kesharwani P, Ravichandiran V, Kumar P, Naidu VGM, Murty US, Ajazuddin, Alexander A. Stimuli-responsive In situ gelling system for nose-to-brain drug delivery. *J. Controlled Release*, 2020, 327, 235–265.

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. Controlled Release*, 2018, 281, 139–177.

Ahmadi F, Oveisi Z, Samani SM, Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res. Pharm. Sci.*, 2015, 10, 1–16.

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

Al-Asmari A, Ullah Z, Tariq M, Fatani A. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of intranasally administered liposomal formulation of donepezil. *Drug Des., Dev. Ther.*, 2016, 10, 205-215.

Alzheimer's Association. 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dementia*, 2019, 15, 321–387.

Asiri YA, Mostafa GAE. Donepezil. U: Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. Brittain HG, urednik, Academic Press, 2010, str. 117–150.

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

Beule AG. Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.*, 2010, 9, Doc07.

Bhavna, Md S, Ali M, Ali R, Bhatnagar A, Baboota S, Ali J. Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: In vitro and in vivo safety evaluation. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014, 67, 418–425.

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.

Cho J, Heuzey M-C, Bégin A, Carreau PJ. Physical Gelation of Chitosan in the Presence of β -Glycerophosphate: The Effect of Temperature. *Biomacromolecules*, 2005, 6, 3267–3275.

De Souza IFF, Dos Santos TQ, Placido RV, Mangerona BA, Carvalho FC, Boralli VB, Ruela ALM, Pereira GR. The liquid crystalline phase behaviour of a nasal formulation modifies the brain disposition of donepezil in rats in the treatment of Alzheimer's disease. *Colloids Surf., B*, 2021, 203, 111721.

Deruyver L, Rigaut C, Lambert P, Haut B, Goole J. The importance of pre-formulation studies and of 3D-printed nasal casts in the success of a pharmaceutical product intended for nose-to-brain delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2021, 175, 113826.

Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. *J. Pharm. Sci.*, 2010, 99, 1654–1673.

Djupesland PG, Messina JC, Mahmoud RA. Role of nasal casts for *in vitro* evaluation of nasal drug delivery and quantitative evaluation of various nasal casts. *Ther. Deliv.*, 2020, 11, 485–495.

Donepezil, 2023, <https://www.halmed.hr>, pristupljeno 17.9.2023.

Durand M, Rusch P, Granjon D, Chantrel G, Prades JM, Dubois F, Esteve D, Pouget J-F, Martin C. Preliminary Study of the Deposition of Aerosol in the Maxillary Sinuses Using a Plastinated Model. *J. Aerosol Med.*, 2001, 14, 83–93.

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, 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.

Espinoza LC, Vacacela M, Clares B, Garcia ML, Fabrega M-J, Calpena AC. Development of a Nasal Donepezil-loaded Microemulsion for the Treatment of Alzheimer's Disease: in vitro and ex vivo Characterization. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets*, 2018, 17, 43–53.

Foo MY, Sawant N, Overholtzer E, Donovan MD. A Simplified Geometric Model to Predict Nasal Spray Deposition in Children and Adults. *AAPS PharmSciTech*, 2018, 19, 2767–2777.

Forbes B, Bommer R, Goole J, Hellfritsch M, De Kruijf W, Lambert P, Caivano G, Regard A, Schiaretti F, Trenkel M, Vecellio L, Williams G, Sonvico F, Scherließ R. A consensus research agenda for optimising nasal drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2020, 17, 127–132.

Gänger S, Schindowski K. Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics*, 2018, 10, 116.

Gao M, Shen X, Mao S. Factors influencing drug deposition in the nasal cavity upon delivery via nasal sprays. *J. Pharm. Investig.* 2020, 50, 251–259.

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*, 2019, 20, 299.

Grassin-Delye S, Buenestado A, Naline E, Faisy C, Blouquit-Laye S, Couderc L-J, Le Guen, M. Fischler M, Devillier P. Intranasal drug delivery: An efficient and non-invasive route for systemic administration. *Pharmacol. Ther.*, 2012, 134, 366–379.

Gu F, Fan H, Cong Z, Li S, Wang Y, Wu C. Preparation, characterization, and *in vivo* pharmacokinetics of thermosensitive *in situ* nasal gel of donepezil hydrochloride. *Acta Pharm.*, 2020, 70, 411–422.

Hilton C, Wiedmann T, St Martin M, Humphrey B, Schleiffarth R, Rimell F. Differential Deposition of Aerosols in the Maxillary Sinus of Human Cadavers by Particle Size. *Am. J. Rhinol.*, 2008, 22, 395–398.

Hughes R, Watterson J, Dickens C, Ward D, Banaszek A. Development of a nasal cast model to test medicinal nasal devices. *Proc. Inst. Mech. Eng., Part H*, 2008, 222, 1013–1022.

Illum, L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J. Pharm. Pharmacol.*, 2010, 56, 3–17.

Janssens HM, De Jongste JC, Fokkens WJ, Robben SGF, Wouters K, Tiddens HAWM. The Sophia Anatomical Infant Nose-Throat (Saint) Model: A Valuable Tool to Study Aerosol Deposition in Infants. *J. Aerosol Med.*, 2001, 14, 433–441.

Javia A, Kore G, Misra A. Polymers in Nasal Drug Delivery: An Overview, U: Applications of Polymers in Drug Delivery. Misra A, Shahiwala A, urednici, Elsevier, 2021, str. 305–332.

Kaur A, Nigam K, Bhatnagar I, Sukhpal H, Awasthy S, Shankar S, Tyagi A, Dang S, Treatment of Alzheimer's diseases using donepezil nanoemulsion: an intranasal approach. *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2020, 10, 1862–1875.

Keck T, Leiacker R, Riechelmann H, Rettinger G. Temperature Profile in the Nasal Cavity. *The Laryngoscope*, 2000, 110, 651–654.

Khunt D, Shrivastava M, Polaka S, Gondaliya P, Misra M. Role of Omega-3 Fatty Acids and Butter Oil in Targeting Delivery of Donepezil Hydrochloride Microemulsion to Brain via the Intranasal Route: a Comparative Study. *AAPS PharmSciTech*, 2020, 21, 45.

Križaj Grden A, Mimica N. Treatment Approach to Alzheimer's Disease. *Soc. Psihijatr.*, 2019, 47, 325–334.

Kundoor V, Dalby RN. Effect of Formulation- and Administration-Related Variables on Deposition Pattern of Nasal Spray Pumps Evaluated Using a Nasal Cast. *Pharm. Res.*, 2011, 28, 1895–1904.

Le Guellec S, Ehrmann S, Vecellio L. In vitro – in vivo correlation of intranasal drug deposition. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2021, 170, 340–352.

Marucci G, Buccioni M, Ben DD, Lambertucci C, Volpini R, Amenta F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 2021, 190, 108352.

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

Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Amidžić Klarić D, Jakobušić Brala C, Perkušić M, Pepić I, Lovrić J, Saršon V, Safundžić Kučuk M, Zadravec D, Kalogjera L, Hafner A. A Dry Powder Platform for Nose-to-Brain Delivery of Dexamethasone: Formulation Development and Nasal Deposition Studies. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 795.

Nunes D, Loureiro JA, Pereira MC, Drug Delivery Systems as a Strategy to Improve the Efficacy of FDA-Approved Alzheimer's Drugs. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 2296.

Papakyriakopoulou P, Rekkas DM, Colombo G, Valsami G. Development and In Vitro-Ex Vivo Evaluation of Novel Polymeric Nasal Donepezil Films for Potential Use in Alzheimer's Disease Using Experimental Design. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 1742.

Patil RP, Pawara DD, Gudewar CS, Tekade AR. Nanostructured cubosomes in an *in situ* nasal gel system: an alternative approach for the controlled delivery of donepezil HCl to brain. *J. Liposome Res.*, 2019, 29, 264–273.

Perkušić M, Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Jakobušić Brala C, Pepić I, Lovrić J, Matijašić G, Gretić M, Zadravec D, Kalogjera L, Hafner A. Tailoring functional spray-dried

powder platform for efficient donepezil nose-to-brain delivery. *Int. J. Pharm.*, 2022, 624, 122038.

Perkušić M, Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Jakobušić Brala C, Pepić I, Lovrić J, Safundžić Kučuk M, Trenkel M, Scherließ R, Zadravec 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.

Pina Costa C, Nižić Nodilo L, Silva R, Martins E, Zadravec D, Kalogjera L, Nuno Moreira J, Manuel Sousa Lobo J, Hafner A, Catarina Silva A. In situ hydrogel containing diazepam-loaded nanostructured lipid carriers (DZP-NLC) for nose-to-brain delivery: development, characterization and deposition studies in a 3D-printed human nasal cavity model. *Int. J. Pharm.*, 2023, 644, 123345.

Sato T. Zero-Shear Viscosities of Polysaccharide Solutions. U: Rheology of Biological Soft Matter, Soft and Biological Matter. Kaneda, I, urednik, Tokyo, Springer Japan, 2017, str. 39–68.

Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, Cummings, J, Van Der Flier WM. Alzheimer's disease. *The Lancet*, 2021, 397, 1577–1590.

Supper S, Anton N, Seidel N, Riemenschnitter M, Schoch C, Vandamme T. Rheological Study of Chitosan/Polyol-phosphate Systems: Influence of the Polyol Part on the Thermo-Induced Gelation Mechanism. *Langmuir*, 2013, 29, 10229–10237.

Sutthapitaksakul L, Dass CR, Sriamornsak P. Donepezil—an updated review of challenges in dosage form design. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2021, 63, 102549.

Thieme SF, Möller W, Becker S, Schuschnig U, Eickelberg O, Helck AD, Reiser MF, Johnson TRC. Ventilation imaging of the paranasal sinuses using xenon-enhanced dynamic single-energy CT and dual-energy CT: a feasibility study in a nasal cast. *Eur. Radiol.*, 2012, 22, 2110–2116.

Williams G, Suman JD. In Vitro Anatomical Models for Nasal Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 1353.

Yadollahikholes G, Rojas JC. Anti-Amyloid Immunotherapies for Alzheimer's Disease: A 2023 Clinical Update. *Neurotherapeutics*, 2023, 20, 914–931.

Yasir M, Sara UVS, Chauhan I, Gaur PK, Singh AP, Puri D, Ameenuzzafar. Solid lipid nanoparticles for nose to brain delivery of donepezil: formulation, optimization by Box–Behnken design, in vitro and in vivo evaluation. *Artif. Cells, Nanomed., Biotechnol.*, 2018, 46, 1838–1851.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Alzheimerova bolest neurodegenerativna je bolest mozga s brojem oboljelih koji ubrzano raste. Donepezil (inhibitor acetilkolinesteraze), najčešće korišteni lijek za liječenje Alzheimerove bolesti, dostupan je u oblicima za oralnu primjenu (samostalno i u kombinaciji s memantinom) te u obliku transdermalnog flastera. Krvno-moždana barijera je slabo propusna pa je potrebna visoka doza lijeka kod primjene *per os*, što dovodi do brojnih nuspojava uzrokovanih perifernim djelovanjem acetilkolina. Nazalna primjena donepezila osigurava dostavu lijeka izravno u mozak, pri čemu je potrebna značajno manja doza za postizanje terapijskog učinka u usporedbi s oralno primijenjenom dozom te se posljedično očekuje značajno smanjenje incidencije nuspojava.

Cilj ovog rada bio je pripremiti kitozanske *in situ* gelirajuće sustave s donepezilom te ispitati utjecaj koncentracije kitozana na viskoznost u mirovanju (η), temperaturu (T) faznog prijelaza otopina iz *sol* u *gel* stanje te vrijeme (t) potrebno za fazni prijelaz otopina iz *sol* u *gel* stanje pri 34 °C. *In situ* gelirajući sustavi donepezila (0,30 mg mL⁻¹) pripremljeni su s kitozansom (6,15-9,23 mg mL⁻¹) i β -glicerofosfatom (β -GP; 188,46 mg mL⁻¹) koji osiguravaju geliranje otopine ovisno o temperaturi. Temeljem rezultata reoloških ispitivanja ($\eta = 206,37 \pm 1,46$ mPa s; T = 33,7 \pm 0,1 °C; t = 0,0 \pm 0,0 min) i kuta raspršenja (15,5 \pm 0,4°), najboljim za nazalnu primjenu pokazao se *in situ* gelirajući sustav pripremljen pri koncentraciji kitozana od 9,23 mg mL⁻¹, stoga je taj sustav izabran za ispitivanje profila nazalne depozicije. Profil nazalne depozicije ispitan je *in vitro*, pomoću višedijelnog 3D printanog modela nosne šupljine, pod kutovima 45°, 60° i 75° u odnosu na horizontalnu ravninu te pri simuliranju zadržavanja daha. Najveći udio formulacije dostavljen je u ciljano olfaktorno područje (58,1 \pm 8,9 %) pri primjeni spreja pod kutom od 75°. Ostvareni rezultati upućuju na potencijal kitozanskog *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu donepezila.

Alzheimer's disease is a neurodegenerative brain disease with an increasing prevalence. Donepezil (acetylcholinesterase inhibitor), the most commonly used drug for the treatment of Alzheimer's disease, is available in oral dosage forms (monotherapy and in combination with memantine) and as transdermal patch formulation. The blood-brain barrier is poorly permeable, so a high dose of the drug is required when administered *per os*, which leads to numerous side effects caused by the peripheral action of acetylcholine. Nasal administration of donepezil ensures delivery of the drug directly to the brain, where a significantly lower dose is required to achieve a therapeutic effect when compared to an orally administered dose, and consequently a significantly reduced incidence of side effects is expected.

The aim of this study was to prepare chitosan *in situ* gelling systems for donepezil nasal delivery and to examine the influence of chitosan concentration on the zero shear viscosity (η), the temperature (T) of the phase transition of the sample from sol to gel state and the time (t) required for the phase transition from sol to gel state at 34 °C. Donepezil loaded *in situ* gelling systems (0.30 mg mL⁻¹) were prepared with chitosan (6.15-9.23 mg mL⁻¹) and β -glycerophosphate (β -GP; 188.46 mg mL⁻¹) which ensure gelation of the solution depending on the temperature. Based on the results of the rheological tests ($\eta = 206.37 \pm 1.46$ mPa s; T = 33.7 \pm 0.1 °C; t = 0.0 \pm 0.0 min) and spray cone angle (15.5 \pm 0.4°), *in situ* gelling system prepared at chitosan concentration of 9.23 mg mL⁻¹ proved to be the best for nasal administration, therefore it was chosen for testing the nasal deposition profile. Nasal deposition profile was tested *in vitro*, using a multi-sectional 3D printed nasal cavity model, at spray administration angle of 45°, 60° and 75° from the horizontal plane, and simulating breath holding. The largest proportion of the formulation was delivered to the targeted olfactory area (58.1 \pm 8.9 %) when the spray was applied at an angle of 75°. The obtained results indicate the potential of the chitosan *in situ* gelling system for the nasal donepezil delivery.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

PRIKLADNOST KITOZANSKOG *IN SITU* GELIRAJUĆEG SUSTAVA S DONEPEZILOM ZA NAZALNU PRIMJENU U OBLIKU SPREJA

Antonija Tržić

SAŽETAK

Alzheimerova bolest neurodegenerativna je bolest mozga s brojem oboljelih koji ubrzano raste. Donepezil (inhibitor acetilkolinesteraze), najčešće korišteni lijek za liječenje Alzheimerove bolesti, dostupan je u oblicima za oralnu primjenu (samostalno i u kombinaciji s memantinom) te u obliku transdermalnog flastera. Krvno-moždana barijera je slabo propusna pa je potrebna visoka doza lijeka kod primjene per os, što dovodi do brojnih nuspojava uzrokovanih perifernim djelovanjem acetilkolina. Nazalna primjena donepezila osigurava dostavu lijeka izravno u mozak, pri čemu je potrebna značajno manja doza za postizanje terapijskog učinka u usporedbi s oralno primijenjenom dozom te se posljedično očekuje značajno smanjenje incidencije nuspojava.

Cilj ovog rada bio je pripremiti kitozanske *in situ* gelirajuće sustave s donepezilom te ispitati utjecaj koncentracije kitozana na viskoznost u mirovanju (η), temperaturu (T) faznog prijelaza otopina iz *sol* u *gel* stanje te vrijeme (t) potrebno za fazni prijelaz otopina iz *sol* u *gel* stanje pri 34 °C. *In situ* gelirajući sustavi donepezila (0,30 mg mL⁻¹) pripremljeni su s kitozonom (6,15-9,23 mg mL⁻¹) i β -glicerofosfatom (β -GP; 188,46 mg mL⁻¹) koji osiguravaju geliranje otopine ovisno o temperaturi. Temeljem rezultata reoloških ispitivanja ($\eta = 206,37 \pm 1,46$ mPa s; T = 33,7 \pm 0,1 °C; t = 0,0 \pm 0,0 min) i kuta raspršenja (15,5 \pm 0,4°), najboljim za nazalnu primjenu pokazao se *in situ* gelirajući sustav pripremljen pri koncentraciji kitozana od 9,23 mg mL⁻¹, stoga je taj sustav izabran za ispitivanje profila nazalne depozicije. Profil nazalne depozicije ispitan je *in vitro*, pomoću višedijelnog 3D printanog modela nosne šupljine, pod kutovima 45°, 60° i 75° u odnosu na horizontalnu ravninu te pri simuliranju zadržavanja daha. Najveći udio formulacije dostavljen je u ciljano olfaktorno područje (58,1 \pm 8,9 %) pri primjeni spreja pod kutom od 75°. Ostvareni rezultati upućuju na potencijal kitozanskog *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu donepezila.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 6 grafičkih prikaza, 6 tablica i 57 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *In situ* gelirajući sustav; donepezil; kitozan; nazalna primjena; reološka svojstva; nazalna depozicija

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. Dubravka Vitali Čepo, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Laura Nižić Nodilo, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan, 2024.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

SUITABILITY OF DONEPEZIL-LOADED CHITOSAN-BASED *IN SITU* GELLING SYSTEM FOR NASAL ADMINISTRATION IN THE FORM OF SPRAY

Antonija Tržić

SUMMARY

Alzheimer's disease is a neurodegenerative brain disease with an increasing prevalence. Donepezil (acetylcholinesterase inhibitor), the most commonly used drug for the treatment of Alzheimer's disease, is available in oral dosage forms (monotherapy and in combination with memantine) and as transdermal patch formulation. The blood-brain barrier is poorly permeable, so a high dose of the drug is required when administered per os, which leads to numerous side effects caused by the peripheral action of acetylcholine. Nasal administration of donepezil ensures delivery of the drug directly to the brain, where a significantly lower dose is required to achieve a therapeutic effect when compared to an orally administered dose, and consequently a significantly reduced incidence of side effects is expected.

The aim of this study was to prepare chitosan *in situ* gelling systems for donepezil nasal delivery and to examine the influence of chitosan concentration on the zero shear viscosity (η), the temperature (T) of the phase transition of the sample from sol to gel state and the time (t) required for the phase transition from sol to gel state at 34 °C. Donepezil loaded *in situ* gelling systems (0.30 mg mL⁻¹) were prepared with chitosan (6.15-9.23 mg mL⁻¹) and β -glycerophosphate (β -GP; 188.46 mg mL⁻¹) which ensure gelation of the solution depending on the temperature. Based on the results of the rheological tests ($\eta = 206.37 \pm 1.46$ mPa s; T = 33.7 \pm 0.1 °C; t = 0.0 \pm 0.0 min) and spray cone angle (15.5 \pm 0.4°), *in situ* gelling system prepared at chitosan concentration of 9.23 mg mL⁻¹ proved to be the best for nasal administration, therefore it was chosen for testing the nasal deposition profile. Nasal deposition profile was tested *in vitro*, using a multi-sectional 3D printed nasal cavity model, at spray administration angle of 45°, 60° and 75° from the horizontal plane, and simulating breath holding. The largest proportion of the formulation was delivered to the targeted olfactory area (58.1 \pm 8.9 %) when the spray was applied at an angle of 75°. The obtained results indicate the potential of the chitosan *in situ* gelling system for the nasal donepezil delivery.

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

Thesis includes: 37 pages, 6 figures, 6 tables and 57 references. Original is in Croatian language.

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

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

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

Laura Nižić Nodilo, Ph.D. Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2024.