

# In vitro karakterizacija nazalnog praškastog sustava s natrijevim deksametazon fosfatom na Calu-3 staničnom modelu respiratornog epitela

---

Šimović, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:102402>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-25**



Repository / Repozitorij:

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



Iva Šimović

***In vitro* karakterizacija nazalnog praškastog sustava s natrijevim deksametazon fosfatom na Calu-3 staničnom modelu respiratornog epitela**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

*Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Aniti Hafner na prenesenom znanju, stručnom vodstvu, trudu i strpljenju prilikom izrade i pisanja diplomskog rada.*

*Zahvaljujem asistentici Lauri Nižić Nodilo, mag.pharm. na savjetima, uloženom vremenu i pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada te ostalim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.*

*Hvala mojim prijateljima bez kojih studentski život ne bi bio isti. Posebno Heleni koja je bila najveća potpora za vrijeme pisanja ovog rada, kao i Eugeniu na bezuvjetnoj podršci i ljubavi.*

*Od srca želim zahvaliti svojoj obitelji koja je omogućila da danas budem gdje jesam. Ipak, najveće hvala ide mojim najmanjim ljudima, Maši, Mari i Evi, koji trenutno nisu ni svjesni kakvu veliku ulogu imaju.*

# Sadržaj

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>In vitro</i> ispitivanja biokompatibilnosti terapijskih sustava .....	1
1.1.1. Bojanje stanica .....	2
1.1.2. Kolorimetrijski testovi.....	2
1.1.3. Fluorimetrija.....	4
1.1.4. Luminometrija.....	5
1.2 <i>In vitro</i> ispitivanja biokompatibilnosti praškastih sustava za nazalnu primjenu.....	5
1.3. <i>In vitro</i> ispitivanja permeabilnosti.....	7
1.4. Utjecaj osmolalnosti ispitivanog sustava na njegovu biokompatibilnost i permeabilnost uklopljenog lijeka.....	12
<b>2. Obrazloženje teme.....</b>	<b>14</b>
<b>3. Materijali i metode .....</b>	<b>16</b>
3.1. Materijali .....	16
3.2. Metode.....	17
3.2.1. Priprava mikrosfera s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom (NDF-om) .....	17
3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja NDF-a u mikrosfere .....	17
3.2.3. Priprema praškastih sustava mikrosfera s uklopljenim NDF-om i inertnog nosača .....	18
3.2.4. Ispitivanje homogenosti praškastih sustava .....	18
3.2.5. Ispitivanja osmolalnosti disperzija praškastih sustava .....	19
3.2.6. Stanična linija i uvjeti uzgoja .....	19
3.2.7. <i>In vitro</i> ispitivanje biokompatibilnosti praškastih sustava .....	21
3.2.8. <i>In vitro</i> ispitivanje permeabilnosti NDF-a iz praškastih sustava.....	23
3.2.9. Određivanje sadržaja NDF-a.....	24
<b>4. Rezultati i rasprava.....</b>	<b>26</b>
4.1. Uspješnost uklapanja i sadržaj NDF-a u mikrosferama .....	26
4.2. Homogenost praškastih sustava .....	27
4.3. Osmolalnost praškastih sustava.....	29
4.4. <i>In vitro</i> biokompatibilnost praškastih sustava.....	30
4.5. <i>In vitro</i> permeabilnost NDF-a iz praškastih sustava .....	33
<b>5. Zaključci.....</b>	<b>40</b>

<b>6. Popis kratica, oznaka i simbola.....</b>	<b>41</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>44</b>
<b>8. Sažetak/Summary.....</b>	<b>51</b>
<b>Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card</b>	

# 1. Uvod

## 1.1. *In vitro* ispitivanja biokompatibilnosti terapijskih sustava

Novi potencijalni terapijski sustavi prolaze kroz biološku evaluaciju pri čemu je citotoksičnost, odnosno njihova biokompatibilnost, jedan od glavnih parametara (Aslantürk, 2018). Biokompatibilnost se može definirati kao svojstvo materijala da izazove benigni odgovor domaćina nakon određene aplikacije, odnosno da njegova primjena ne uzrokuje neželjene toksične ili imunosne reakcije u tijelu. Pretklinička ispitivanja na životinjama najprecizniji su model koji se koristi kao osnova za klinička testiranja toksičnosti. Međutim, upravo zbog korištenja životinja predstavljaju veliki trošak, kompleksna su za izvođenje te se postavlja pitanje etičnosti takvih ispitivanja. Zbog toga se provode pouzdana, reproducibilna i cijenom pristupačna *in vitro* ispitivanja akutne citotoksičnosti i stanične vijabilnosti kao probir za daljnja testiranja. Iako *in vitro* ispitivanja još uvijek nisu dovoljno istražena da bi zamijenila ispitivanja na životinjama, ponekad se smatraju i relevantnijima zbog mogućnosti korištenja humanih stanica (Aslantürk, 2018). Ispitivanja se provode na primarnim stanicama i imortaliziranim humanim staničnim linijama (Scherließ, 2011).

Kako toksični učinak na stanice može biti uzrokovan različitim mehanizmima i ovisiti o vremenu izloženosti toksinima, citotoksičnost se dokazuje različitim metodama koje otkrivaju dezintegraciju membrane, promjene u aktivnosti enzima ili indukciju enzima koji sudjeluju u apoptozi (Scherließ, 2011). Tehnike se mogu klasificirati prema metodi detekcije što je prikazano u Tablici 1., a važnije metode, kao i njihove prednosti i nedostaci navedeni su u nastavku. Temelj ispitivanja biokompatibilnosti terapijskih sustava je mjerenje relativnog smanjenja vijabilnosti stanica (broja živih stanica) kao indikatora akutne toksičnosti u usporedbi s kontrolnim stanicama koje nisu izložene ispitivanom sustavu. Rezultati se mogu izraziti kao  $LC_{50}$ , odnosno koncentracija terapijskog sustava pri kojoj je vijabilnost tretiranih stanica 50 % u odnosu na netretirane. Ukoliko nije moguće izvesti ispitivanja u cijelom rasponu toksičnosti sustava (0 - 100 % vijabilnosti stanica) može se navesti koncentracija ( $mg/cm^2$  ili mM) terapijskog sustava pri kojoj se ne vidi toksični učinak na stanične modele, odnosno koncentracija pri kojoj je vijabilnost tretiranih stanica barem 80 % vijabilnosti kontrolnih, netretiranih stanica (Scherließ, 2011).

**Tablica 1.** Klasifikacija metoda za određivanje biokompatibilnosti (Aslantürk, 2018)

Metoda detekcije	Primjeri metoda
Bojanje mrtvih stanica	bojanje tripan plavom, eozinom, kongo crvenom i eritrozinom B
Kolorimetrija	MTT test, MTS test, XTT test, WST test, LDH test, SRB test, NR test, CVS test
Fluorimetrija	redukcija resazurina, CFDA-AM test, GF-AFC test, dokazivanje ROS
Luminometrija	određivanje ATP-a, test vijabilnosti u stvarnom vremenu (ATP)

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolin bromid; MTS – 5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiazol)-3-(4-sulfofenil) tetrazolin; XTT – natrijeva sol 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-karboksianilid-2H-tetrazolina; WST – tetrazolijeve soli topljive u vodi (engl. *water-soluble tetrazolium salts*); LDH – laktat dehidrogenaza; SRB – sulforhodamin B; NR – neutralno crvena; CVS – bojanje kristalno ljubičastom (engl. *crystal violet staining*); CFDA-AM – 5-karboksifluorescein diacetat, acetoksimetil ester; GF-AFC – glicilfenilalanil-aminofluorokumarin; ROS – kisikovi reaktivni spojevi (engl. *reactive oxygen species*); ATP – adenozin 3-fosfat

### 1.1.1. Bojanje stanica

Najjednostavniji način određivanja udjela vijabilnih stanica u populaciji je bojanje metabolički neaktivnih stanica, dok aktivne stanice čiji je integritet membrane očuvan izbacuju boju. Najčešće se koristi bojanje tripan plavom pri čemu se pod svjetlosnim mikroskopom kao plave vide neaktivne stanice, dok je citoplazma aktivnih stanica prozirna. Postupak bojanja je jednostavan i ne zahtijeva veliki broj stanica. S druge strane, potrebna je velika količina vremena i postupak je namijenjen za stanice u suspenziji, dok se adherentne stanice moraju tripsinizirati. Također je potrebno uzeti u obzir da je ponekad potrebno više dana da bi se izgubio integritet membrane i da za to vrijeme stanice koje su preživjele proliferiraju, a istovremeno se stanice koje se raspadnu neće obojiti što sve može utjecati na dobivene rezultate. Problem predstavlja i obrada velikog broja uzoraka te niska osjetljivost tripan plave s obzirom da ne može diferencirati zdrave stanice od onih koje su aktivne, ali gube funkciju zbog čega se ne preporučuje primjena u ispitivanjima biokompatibilnosti novih terapijskih sustava (Aslantürk, 2018).

### 1.1.2. Kolorimetrijski testovi

Kolorimetrijski testovi zasnivaju se na spektrofotometrijskom određivanju boje koja se razvija u stanicama koje su metabolički aktivne i sposobne transformirati dodani reagens. Jednostavni

su za izvođenje, jeftini i primjenjivi na adherentne ili suspendirane stanice, dok je nedostatak mogućnost interferencija pomoćnih tvari tijekom mjerenja apsorbancije (Aslantürk, 2018).

#### *MTT test*

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) test je često korišteni kolorimetrijski test za ispitivanje vijabilnosti stanica. Temelji se na mjerenju aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza koje u metabolički aktivnim stanicama reduciraju žuti MTT u ljubičasto-plavi formazan uz NADH. S obzirom da je takav formazan netopljiv u vodi, taloži se u citosolu te nakon lize stanica može biti otopljen u organskim otapalima. Intenzitet obojenja nastale otopine koji se određuje spektrofotometrijski, proporcionalan je koncentraciji nastalog formazana, odnosno metaboličkoj aktivnosti stanica. Iako je MTT test osjetljiv s obzirom da toksični medijatori vrlo brzo utječu na katalitičku aktivnost enzima, treba uzeti u obzir da redukcija MTT u formazan može nastupiti i drugim mehanizmima (Scherließ, 2011).

#### *Neutral red test*

Neutral red (NR) test koristi svojstvo aktivnih stanica da pri fiziološkom pH internaliziraju boju neutralno crvenu (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) koja se zatim elektrostatski veže na negativno nabijenu unutrašnju površinu lizosoma budući da se u kiseloj unutrašnjosti lizosoma protonira. Kada stanica umre ili dođe do promjene u pH, boja ne može biti koncentrirana u lizosomima stoga je intenzitet obojenja mjera vijabilnosti stanica, odnosno oštećenja lizosoma. Boja se može kvantificirati spektrofotometrijski nakon ekstrakcije kiselom etanolnom otopinom (Aslantürk, 2018). NR test smatra se manje osjetljivim od MTT testa jer jedino stanice koje su potpuno izgubile funkciju, a time i negativan naboj membrane lizosoma ne vežu boju što se detektira kao smanjen intenzitet signala u odnosu na kontrolne stanice kod kojih je naboj očuvan (Scherließ, 2011).

#### *LDH test*

LDH test temelji se na kvantifikaciji citosolnog enzima laktat dehidrogenaze (LDH) u mediju nakon toksičnog učinka koji rezultira oštećenjem stanične membrane i curenjem staničnog sadržaja. LDH katalizira redukciju laktata u piruvat pri čemu nastaje NADH/H<sup>+</sup> čija se koncentracija može odrediti izravno spektrofotometrijski (Yang i sur., 2009) ili sekundarnom reakcijom gdje se NADH troši za redukciju tetrazolijeve soli (MTT ili INT (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolijev klorid) u formazan koji se također određuje



spektrofotometrijski (Scherließ, 2011; Aslantürk, 2018). Količina detektiranog formazana, odnosno nastalog NADH/H<sup>+</sup>, proporcionalna je količini LDH u mediju, odnosno oštećenju stanica. Kako bi se odredila maksimalna moguća koncentracija LDH u mediju, nužna je pozitivna kontrola, pri čemu se često koriste poznate membranolitičke tvari kao što je detergent Triton X-100 (Aslantürk, 2018). Budući da LDH ulazi u medij u kojemu se nalazi terapijski sustav, potrebno je utvrditi može li koja od sastavnica sustava ili medija ući u interakciju s enzimom koja bi dovela do pogrešnih rezultata (Scherließ, 2011).

#### *WST test*

WST kolorimetrijski test temelji se na redukciji tetrazolijevih soli u vodotopljive oblike formazana posredovanoj staničnim dehidrogenazama u metabolički aktivnim stanicama. Svijetlo crvena WST-1 sol (natrijev (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazolid) prelazi u tamno crveni formazan, dok blijedo žuta WST-8 sol (natrijev (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazolid) prelazi u narančasti oblik. Ovisno o dobivenom obliku, kvantifikacija formazana koji odražava broj aktivnih dehidrogenaza provodi se spektrofotometrijski pri različitim valnim duljinama (Scherließ, 2011). Test se koristi i za procjenu proliferacije stanica. WST-8 test je osjetljiviji, pogotovo pri neutralnom pH te korišteni reagens i dobiveni produkti nisu toksični što omogućava provedbu daljnjih testiranja na istoj kulturi. Za razliku od MTT testa, dobiveni formazan je topljiv tako da ne zahtjeva dodatan korak otapanja, ali kao i kod MTT testa redukcija može nastupiti i drugim mehanizmima (Aslantürk, 2018).

#### 1.1.3. Fluorimetrija

Fluorimetrijska mjerenja su široko primjenjiva, jednostavna i osjetljivija od kolorimetrijskih testova iako su temeljena na sličnom principu s razlikom što produkt nastao enzimskom reakcijom u aktivnim stanicama ne emitira boju, već fluorescira. Problem stvaraju fluorescirajuće interferencije te mogući toksični učinak na stanice (Aslantürk, 2018).

#### *Mjerenje oksidativnog stresa*

Kada su stanice izložene toksičnim medijatorima, opaženo je povećanje unutarstaničnog oksidativnog stresa. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) koji nastaju mogu se odrediti reakcijom s 2,7-diklorofluorescein diacetatom (DCFH-DA). U reakciji se stvara visoko fluorescentni

spoj diklorofluorescein (DCF) koji se kvantificira fluorospektrofotometrijski. Također se mogu odrediti i drugi unutarstanični medijatori oksidativnih oštećenja, kao što su glutation (GSH), superoksid dismutaza (SOD) i malondialdehid (MDA) (Yang i sur., 2009).

#### 1.1.4. Luminometrija

Luminometrijska mjerenja temelje se na brzom i jednostavnoj detekciji luminiscencije nakon dodatka reagensa i enzima luciferaze kulturama stanica sisavaca.

##### *ATP test*

ATP (adenozin 3-fosfat) je najvažniji izvor energije u stanicama. Produkcija ATP-a u stanicama naglo pada kada su letalno oštećene. Mjerenje se temelji na pretvorbi luciferina u luminiscirajući oksiluciferin uz pomoć luciferaze u prisutnosti magnezijevih iona i ATP-a. Jakost signala je linearno proporcionalna koncentraciji ATP-a, odnosno živih stanica. ATP test je najbrži, najosjetljiviji i najmanje sklon stvaranju artefakata (Aslantürk, 2018).

##### *Mjerenje vijabilnosti u realnom vremenu (engl. Real-time viability assay)*

Jedina metoda kojom se mjeri vijabilnost stanica u realnom vremenu temelji se na primjeni prosupstrata koji metabolički aktivne stanice pretvaraju u supstrat luciferaze. Smanjivanjem broja aktivnih stanica tijekom vremena, smanjuje se i intenzitet luminiscencije produkta luciferaze. Međutim, inkubacijsko vrijeme u kojem je signal proporcionalan broju aktivnih stanica ovisi o broju stanica po jažici i njihovoj metaboličkoj aktivnosti zbog čega se mora odrediti empirijski za svaku staničnu liniju i gustoću nasađivanja (Aslantürk, 2018).

## **1.2 *In vitro* ispitivanja biokompatibilnosti praškastih sustava za nazalnu primjenu**

Prednost praškastih sustava za nazalnu primjenu u odnosu na tekuće sustave je smanjena potreba za korištenjem pomoćnih tvari prilikom oblikovanja djelatne tvari što smanjuje rizik od toksičnih reakcija (Nižić Nodilo i sur., 2021). U takvom obliku može se primijeniti velika količina same djelatne tvari, što s druge strane može uzrokovati toksičnost ovisnu o koncentraciji tvari. Ispituje se i utjecaj praškastog sustava na sluznicu u ovisnosti o pH i osmolalnosti formulacije na mjestu primjene (Scherließ, 2011).

Terapijske sustave bi bilo najprikladnije testirati u obliku kako će biti primjenjivani od strane pacijenta, ali nanošenjem prašaka ne može se postići dovoljna homogenost (Gonçalves i sur.,

2016). Kako bi se postigla reproducibilnost rezultata, preporuča se dispergiranje praška u tekućem mediju ili nanošenje u obliku aerosola (Lim i sur., 2001). U Tablici 2. dan je pregled objavljenih *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti praškastih sustava koji su svi uključivali resuspendiranje testiranog sustava u mediju ili puferu i tretiranje stanica suspenzijom.

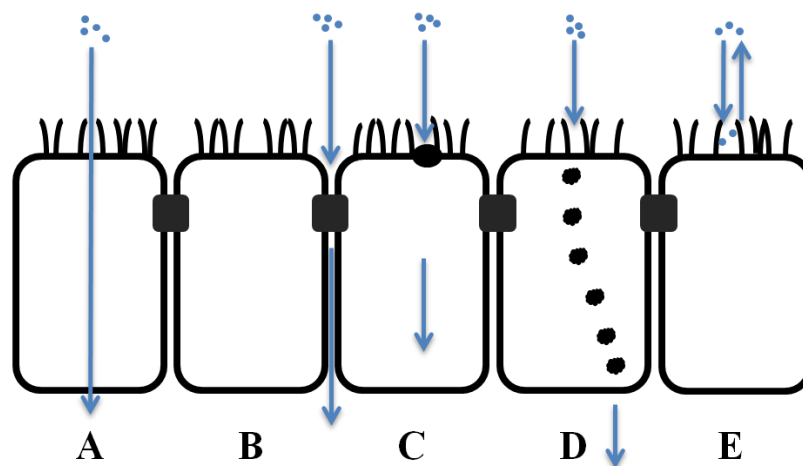
**Tablica 2.** Pregled *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti praškastih sustava za nazalnu primjenu

Tip sustava	Polimeri	Obrada	Zaključak	Literatura
Mikročestice s gentamicinom kao modelnim lijekom	HA, CH i mješavina HA/CH	Ispitivanje MTT testom na 16HBE14o-stanicama	Nema znakova toksičnosti niti jedne formulacije (mikročestice pripravljene od HA, CH te mješavine oba polimera).	Lim i sur., 2001
Liofilizirani praškasti sustav	HA-CL – SAP	Biokompatibilnost je ispitana MST testom na RPMI 2650 stanicama	Nije uočena toksičnost ispitanog polimera na staničnom modelu nazalnog epitela.	Fallacara i sur., 2019
Hibridne nanočestice s uklopljenim BSA za nazalnu imunizaciju	PbAE-PLGA	Ispitivanje toksičnosti MTT testom na Calu-3 i A549 staničnim linijama	Citotoksičnost PbAE polimera ovisna je o koncentraciji, dok hibridizacija s PLGA smanjuje toksičnost.	Sinani i sur., 2017
Mikročestice s granisetronom	HP-β-CD i CMC-Na	Ispitivanje MTS testom na HNE primarnim stanicama	Ispitane formulacije nisu pokazale toksičnost.	Cho i sur., 2010
Mikročestice s uklopljenim ropinirolom	PLGA / DPPC/ trimetil-kitozan	MTT test izveden na Calu-3 staničnom modelu	Formulacije nisu pokazale toksičnost čak ni pri koncentraciji od 1 mg/ml.	Karavasil i sur., 2015

HA – hijaluronan; CH – kitozan hidroglutamat; HA-CL – poprečno povezana hijaluronska kiselina; SAP – natrijev askorbil fosfat; BSA – svinjski serumski albumin; PbAE – poli(β-amino ester) polimer; PLGA – kopolimer mliječne i glikolne kiseline; HP-β-CD – hidroksipropil-β-ciklodekstrin; CMC-Na – natrijeva karboksimetilceluloza; HNE – humane nazalne epitelne; PLGA – kopolimer laktatne i glikolne kiseline; DPPC – dipalmitoilfosfatidilkolin; MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolin bromid; MTS – 5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetiltiazol)-3-(4-sulfofenil) tetrazolin sol

### 1.3. *In vitro* ispitivanja permeabilnosti

Primjena lijekova putem nazalne sluznice istražuje se kao neinvazivni način primjene, ne samo lijekova s lokalnim učinkom kao što su vazokonstriktori ili protuupalni lijekovi, već i lijekova sa sistemskim učinkom, posebno koji se inaktiviraju nakon oralne primjene. Također se istražuje i nazalna primjena lijekova s učinkom na središnji živčani sustav s ciljem izravne dostave zaobilazeći krvno-moždanu barijeru (Salade i sur., 2019; Trenkel i Scherließ, 2021). Nazalna apsorpcija lijekova učinkovita je zbog dobre vaskularizacije i velike površine nosne sluznice. Međutim, ograničena je eliminacijom lijeka s mjesta primjene putem mukocilijarnog klirensa (5 mm/min u zdravih ljudi), malim volumenom primjene (25 – 200  $\mu$ l) i prisustvom enzima. Jedan od glavnih čimbenika koji utječe na mogućnost nazalne primjene lijeka je i permeabilnost kroz epitelnu barijeru koja ovisi o svojstvima primijenjenog lijeka kao što su molekulska masa, disocijacijska konstanta ( $pK_a$ ), naboj, veličina čestica, polimorfizam, topljivost, brzina otapanja, koeficijent razdiobe ( $\log P$ ) između oktanol i vode, kao i o pH okolnog medija, površini, viskoznosti i naboju apsorpcijske membrane, duljini puta apsorpcije te interakciji lijeka s membranom (Bhise i sur., 2008; Bitter i sur., 2011; Sousa i Castro, 2016).



**Slika 1.** Mehanizmi transporta lijekova kroz epitelnu nazalnu membranu: A. transcelularna pasivna difuzija, B. paracelularna pasivna difuzija, C. transport posredovan nosačima, D. transcitoza, E. efluksni transport

Prilikom ekstravaskularne primjene lijek se mora apsorbirati kako bi dospio do mjesta učinka ili krvotoka. Prijenos kroz nazalni epitel može biti transcelularni (kroz stanice) ili paracelularni (između stanica) (Slika 1.). Paracelularni prijenos je zapravo pasivna difuzija

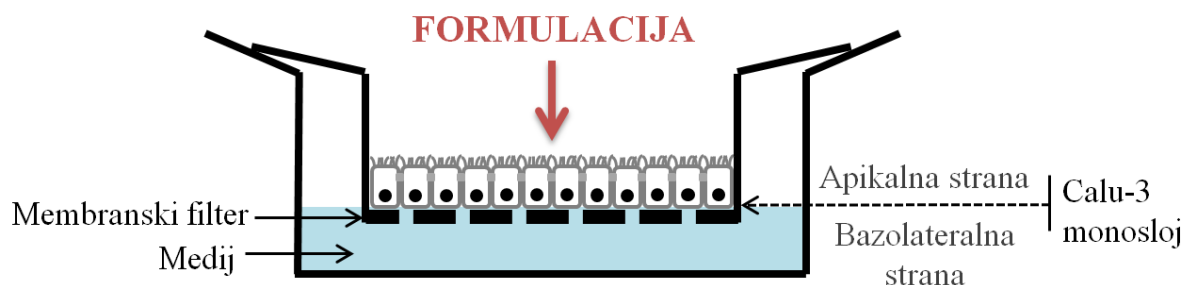
malih hidrofилnih molekula, dok transcelularni prijenos, uz pasivnu difuziju lipofilnih molekula obuhvaća i druge mehanizme kao što je prijenos pomoću nosača (aktivna ili olakšana difuzija) i transitoza. Pasivna difuzija je najvažniji mehanizam prijenosa za lijekove i uključuje prijenos molekula niz koncentracijski ili elektrokemijski gradijent bez utroška energije. Takav prijenos ne zahtijeva transporter, nije saturabilan niti specifičan, ali ovisi o molekulskoj masi i lipofilnosti molekule (Cabrera-Pérez, 2016; Sousa i Castro, 2016).

Ukoliko topljivost lijeka nije limitirajući čimbenik, njegova permeabilnost određuje uspješnost apsorpcije. Provođenje ispitivanja permeabilnosti lijeka korištenjem različitih *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* modela omogućuje predviđanje apsorpcije lijeka preko nazalnog epitela nakon primjene u ljudi. *In vitro* i *ex vivo* ispitivanja dijelom imitiraju uvjete prilikom primjene *in vivo* čime se može dobiti uvid u transport lijeka kroz epitel i kako na njega utječu pomoćne tvari u formulaciji. Međutim, utjecaj mukocilijarnog klirensa i lokalnog metabolizma unutar nosne šupljine ne uzima se u obzir te je korelacija s rezultatima *in vivo* slabija ukoliko se tvar prenosi transporterima ili je podvrgnuta efluksnim mehanizmima (Zhang, 2013). *Ex vivo* ispitivanjima, formulacije se testiraju na pravom nazalnom tkivu, no zbog varijacija u debljini tkiva, aktivnosti i tipu prisutnih enzima u različitim animalnih vrsta, dobiveni rezultati ne mogu se jednostavno uspoređivati. Pretklinički probir tvari/sustava prema svojstvu permeabilnosti može se provoditi kromatografijom na imobiliziranim umjetnim membranama (engl. *immobilised artificial membrane chromatography*) i testom propusnosti na umjetnim membranama (engl. *parallel artificial membrane permeability assay*, PAMPA) (Cabrera-Pérez, 2016). Međutim, slično kao i kod ispitivanja biokompatibilnosti, *in vitro* ispitivanja permeabilnosti na staničnim linijama predstavljaju jeftin i efikasan probir koji smanjuje potrebu za testiranjem na životinjama, time i količinu utrošenog lijeka, dok istovremeno omogućuje jednostavnu kontrolu i promjenu uvjeta ispitivanja (Sousa i Castro, 2016; Salade i sur., 2019). Ograničenje *in vitro* metoda u ispitivanju permeabilnosti je varijabilnost budući da rezultati ovise o mediju koji je korišten za uzgoj stanica, temperaturi, praćenim protokolima, staničnom soju, broju dijeljenja stanica (engl. *passage number*) i samom istraživaču što onemogućuje usporedbu rezultata iz različitih istraživanja (Cabrera-Pérez, 2016).

Kao standard u *in vitro* ispitivanjima permeabilnosti lijekova koristi se statični Transwell® sustav jažica s dva odjeljka (apikalni i bazalni) koji su međusobno odvojeni polupropusnom membranom. Membrana može biti različite površine te gustoće i veličine pora. Stanice koje

služe kao model *in vivo* barijere nasaduju se na membranu, a nakon što dosegnu zadovoljavajuću konfluentnost provodi se ispitivanje permeabilnosti nanošenjem farmaceutskog oblika u apikalni odjeljak. Sadržaj lijeka u bazolateralnom odjeljku u promatranom vremenu mjera je uspješnosti prijenosa lijeka kroz sloj stanica (Sousa i Castro, 2016; Frost i sur., 2019).

Kao *in vitro* modeli koriste se primarne ili besmrtno stanice. Odabir vrste primarnih stanica za pojedino istraživanje ovisi o djelovanju lijeka koji se ispituje – lokalno, sistemsko ili u središnjem živčanom sustavu. Korištenjem primarnih stanica mogu se *in vitro* uzgojiti tkiva s više vrsta stanica koja točnije predstavljaju stvarni sustav. Specifičnim probirom donora stanica moguće je uzgojiti one koje ispoljavaju traženu bolest zbog čega pružaju veću kliničku relevantnost. Stoga se primarne stanice preporučuju kao modeli za detaljnija ispitivanja, no ne i za probir potencijalnih djelatnih tvari/terapijskih sustava, s obzirom na kompleksnost modela i varijabilnost rezultata. S druge strane, besmrtno stanice su jeftinije, standardizirane i reproducibilne, lako se uzgajaju i dijele te brzo postižu konfluentnost kao polarizirani monoslojevi. Za ispitivanje permeabilnosti lijekova za nazalnu primjenu koriste se humane stanične linije RPMI 2650 (stanice humanog anaplastičnog karcinoma skvamoznih stanica nazalnog septuma) i 16HBE (epitelne stanice bronha pacijenta s transplahiranim srcem i plućima) te Calu-3 stanična linija adenokarcinoma pluća koja je korištena u ovom radu (Salade i sur., 2019). Iako se najčešće uzgaja jednostavna monokultura stanica koje su najbrojnije u mukoznoj membrani od interesa (u ovom slučaju epitelne stanice), kako bi se bolje simulirao stvarni sastav membrane i dobili realniji rezultati mogu se koristiti i kulture različitih vrsta stanica (Cabrera-Pérez, 2016).



**Slika 2.** Ilustracija Calu-3 stanične kulture na granici mediji – zrak

Kako bi kultura stanica odražavala nazalni epitel, potreban je uzgoj na granici „medij – zrak“ (engl. *air-liquid interface*, ALI). ALI označava da su stranice s apikalne strane izložene zraku,

dok su s bazolateralne uronjene u medij (Slika 2.) što rezultira polarizacijom stanica kao što se to događa u epitelu nosne šupljine. Calu-3 polarizirane stanice na apikalnoj strani imaju cilije i proizvode mukus, odnosno sličnije su morfologije stanicama nosnog epitela nego stanice uzgojene potpuno uronjene u hranidbeni medij (engl. *liquid-liquid culture*, LLC) (Sousa i Castro, 2016; Nižić Nodilo, 2021). Stanice u kulturi međusobno su vezane čvrstim vezama te monosloj ima barijerna svojstva slična nazalnom epitelu (Salade i sur., 2019). Navedene karakteristike Calu-3 staničnog monosloja čine ga idealnim modelom nazalne sluznice za ispitivanja permeabilnosti potencijalnih lijekova.

Prilikom ispitivanja permeabilnosti ključno je farmaceutski oblik nanijeti na apikalnu stranu monosloja homogeno i reproducibilno, bez oštećivanja staničnog sloja. Nehomogeno nanošenje uzoraka može utjecati na koncentracijski gradijent, a oštećenje monosloja izravno mijenja količinu transportiranog lijeka kroz membranu. Integritet monosloja prati se mjerenjem transepitelnog električnog otpora (engl. *transepithelial electrical resistance*, TEER). TEER je otpor između apikalnog i bazolateralnog odjeljka koji se računa iz sljedeće formule:

$$TEER (\Omega \times cm^2) = otpor (\Omega) \times površina membrane (cm^2) \quad (1)$$

Količina transportiranog lijeka određuje se u uzorcima koji se uzimaju iz receptorskog odjeljka u prethodno određenim intervalima. Iz dobivenih rezultata može se izračunati prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) prema formuli:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{PC_0} \quad (2)$$

gdje  $dQ/dt$  označava brzinu permeacije lijeka kroz membranu ( $\mu g/s$ ),  $P$  je površina permeacijske barijere ( $cm^2$ ), a  $C_0$  inicijalna koncentracija lijeka u donorskom odjeljku ( $\mu g/ml$ ).  $P_{app}$  opisuje efikasnost prolaska lijeka kroz membranu definirane površine (Salade i sur., 2019).

**Tablica 3.** Prikaz objavljenih *in vitro* ispitivanja permeabilnosti lijeka iz praškastih sustava za nazalnu primjenu.

Tip sustava	Polimeri	Obrada	Zaključak	Literatura
Anionski liposomi s uklopljenim grelinom	Liposomi obloženi kitozanom	Permeabilnost grelina kroz Calu-3 stanični monosloj iz praškastog i tekućeg sustava	Prašcasti sustav osigurava bolju permeabilnost lijeka od suspenzije zbog veće koncentracije lijeka na mjestu primjene.	Salade i sur., 2018
Mikrosfere HA s uklopljenim feksofenadinom za nazalnu primjenu sa ili bez natrijeva taurokolata	PEG 6000	Permeabilnost lijeka ispitana je na HNE staničnom monosloju	Bez natrijeva taurokolata nema razlike u permeabilnosti slobodnog i uklopljenog lijeka. Natrijev taurokolat pospješuje permeaciju paracelularnim putem zbog djelovanja na međustanične čvrste veze.	Huh i sur., 2010
Mikročestice s gentamicinom kao modelnim lijekom	HA, CH i njihova mješavina HACH	Provedeno je mjerenje TEER vrijednosti i fluorescentno bojanje membrana 16HBE14o- stanica izloženih farmaceutskom obliku.	HA i CH pokazali su se kao uspješni pospješivači permeacije lijeka s reverzibilnim učinkom.	Lim i sur., 2001
Mikročestice s granisetronom	HP-β-CD i CMC-Na	Monosloj HNE stanica uzgojene u ALI uvjetima	Uklapanje lijeka u mikrosfere značajno povećava njegovu permeaciju.	Cho i sur., 2010

PEG – polietilenglikol; HA – hijaluronan; CH – kitozan hidrog glutamat; HNE – humane nazalne epitelne; ALI – engl. *air liquid interface*; HP-β-CD – hidroksipropil-β-ciklodekstrin; CMC-Na – natrijeva karboksimetilceluloza;

Uz izmjerene vrijednosti TEER i  $P_{app}$  za lijek, može se zaključiti na koji način lijek prolazi kroz membranu (paracelularno ili transcelularno) te narušava li integritet membrane, odnosno kakav utjecaj ima na čvrste veze, kao i kakav utjecaj na permeabilnost lijeka imaju ostale tvari



u formulaciji. Idealno, terapijske sustave bi trebalo testirati na isti način kako će biti primjenjivani od strane pacijenta. Međutim, kod praškastih sustava pokazano je da se njihovim nanošenjem u izvornom obliku ne može postići dovoljna homogenost (Gonçalves i sur., 2016) te se preporuča dispergiranje praška u tekućem mediju ili nanošenje u obliku aerosola kako bi se postigla dovoljna reproducibilnost. Praškasti sustavi osiguravaju veću koncentraciju djelatne tvari na mjestu primjene, potičući njezinu apsorpciju (Jurišić Dukovski i sur., 2019). Povećanje bioraspoloživosti se može postići i uklapanjem lijeka u terapijske sustave kao što su nanočestice i liposomi, zatim korištenjem pospješivača permeacije (ciklodekstini, surfaktanti) ili mukoadhezivnih polimera koji bubrenjem osiguravaju dulje zadržavanje na mjestu primjene (karbopol, kitozan, derivati celuloze), dok kitozan i reverzibilno otvara međustanične čvrste veze potičući paracelularni transport (Bhise i sur., 2008). U Tablici 3. dan je prikaz objavljenih *in vitro* ispitivanja permeabilnosti lijeka iz praškastih sustava za nazalnu primjenu u kojima je opisan utjecaj primjene lijeka u obliku praška, kao i različitih pospješivača na transport lijeka kroz membrane.

#### **1.4. Utjecaj osmolalnosti ispitivanog sustava na njegovu biokompatibilnost i permeabilnost uklopljenog lijeka**

Djelatne tvari i pomoćne tvari koje se koriste u oblikovanju farmaceutskog oblika mogu utjecati na osmolalnost formulacije te mogu rezultirati iritacijom nosne sluznice. Opisano je kako hipertonični i izotonični sustavi uzrokuju minimalna stanična oštećenja tijekom nazalne primjene. S druge strane, hipotonični sustavi dovode do povećanog oslobađanja LDH iz stanica u okolni medij što ukazuje na izraženiji štetni utjecaj. Pretpostavlja se da je oslobađanje LDH iz stanica posljedica njihovog bubrenja uzrokovanog povećanom apsorpcijom vode iz hipotoničnog medija. Hipertonične otopine rezultiraju smežuravanjem stanica zbog gubitka vode kroz staničnu membranu što ne uzrokuje curenje staničnog sadržaja, već omogućuje preživljavanje stanice. Osmolalnost od 450 mOsm/kg je maksimalna vrijednost pri kojoj nije primijećeno smežuravanje stanica. Pri većim vrijednostima, elektronskim mikroskopom mogu se pratiti reverzibilne morfološke promjene unutar stanica koje mogu utjecati na terciarnu strukturu proteina koji su uključeni u kontakt između stanica

(Nilsson i sur., 2007). Zbog navedenog, za nazalnu primjenu preporuča se osmolalnost apliciranog sustava jednaka ili veća od 300 mOsm/kg (Pujara i sur., 1995). Hipertonične otopine se zbog sigurnosti ipak preporučuju samo za hitnu ili jednokratnu uporabu, dok se prednost uvijek daje izotoničnim pripravcima (Bitter i sur., 2011).

Osmolalnost utječe na apsorpciju supstancija kroz nazalni epitel. Hiperosmotski sustavi mogu uzrokovati pucanje ionskih veza unutar mukusa čime se smanjuje njegova viskoznost (Wark i sur., 2005) i olakšava kontakt primijenjenih tvari sa samim stanicama. Međutim, najviše je proučavan utjecaj hipertoničnih otopina na otvaranje čvrstih veza između epitelnih stanica (Högman, Mörk i Roomans, 2002; Relova i Roomans, 2001). Prema rezultatima studija, soli poput natrijeva klorida imaju jači utjecaj na čvrste veze u usporedbi s neionskim molekulama kao što su manitol ili ksilitol. Pad TEER vrijednosti pri izloženosti soli je izraženiji i događa se i pri nižim vrijednostima osmolalnosti sustava. To se može objasniti specifičnom interakcijom nabijenih čestica s proteinima čvrstih veza ili citoskeletom uz nespecifični učinak koji pokazuju i neionske molekule (Nilsson i sur., 2007). U istraživanju Nilsson i suradnika (2006) uočen je linearni odnos između osmolalnosti i broja otvorenih čvrstih veza, odnosno pada TEER vrijednosti. Procijenjeni koeficijent determinacije  $r^2 = 0,92$  potvrđuje veliki utjecaj osmolalnosti na otvaranje čvrstih veza (Nilsson i sur., 2006). Budući da se pri ponovnoj uspostavi izoosmolalnih uvjeta stanice morfološki oporavljaju te se TEER vrijednosti vraćaju na više razine, utjecaj hiperosmolalnih otopina na stanice smatra se reverzibilnim što je u skladu sa studijama o toksičnosti hiperosmolalnih otopina (Nilsson i sur., 2007).

## 2. Obrazloženje teme

Nazalni put primjene lijekova alternativni je način dostave lijekova s lokalnim i sistemskim učinkom, ali i potencijalni način dostave lijekova izravno u središnji živčani sustav. Na takav se način izbjegava krvno-moždana barijera te smanjuje rizik razvoja nuspojava u usporedbi sa sistemskom primjenom (Salade i sur., 2019).

Izazov kod nazalne primjene predstavlja brzi mukocilijarni klirens koji smanjuje zadržavanje lijeka na mjestu primjene (Hafner i sur., 2014). Kao rješenje istražuju se novi praškasti terapijski sustavi za nazalnu primjenu u obliku mikrosfera čija su osnova mukoadhezivni polimeri. Polimeri bubrenjem u dodiru sa sluznicom stvaraju mukoadhezivni gel čime se produljuje zadržavanje lijeka na mjestu depozicije (Nižić Nodilo i sur., 2021). Također, u usporedbi s tekućim pripravcima, praškasti sustavi pokazuju veću kemijsku, fizičku i mikrobiološku stabilnost bez potrebe za dodatkom pomoćnih tvari. Nadalje, pogodni su za dostavu teško topljivih lijekova te na mjestu depozicije u nosnoj šupljini osiguravaju veću koncentraciju lijeka (Jurišić Dukovski i sur., 2019).

Praškasti sustavi pokazuju značajan potencijal za nazalnu primjenu uz nužnu optimizaciju svojstava kao što su osmolalnost na mjestu primjene, reološka svojstva te profil nazalne depozicije što se može ostvariti miješanjem s inertnim nosačima odgovarajuće veličine. U ranoj fazi razvoja novih terapijskih sustava nužna su ispitivanja biokompatibilnosti, kao i utjecaj sustava na permeabilnost lijeka na *in vitro* modelima kao probir prije kompleksnijih *in vivo* testiranja na životinjama (Zhang i sur., 2016). Kao model za *in vitro* istraživanja koristi se Calu-3 stanična linija adenokarcinoma pluća koja stvara monosloj stanica međusobno povezanih čvrstim vezama što morfološki odgovara nazalnom epitelu (Salade i sur., 2019).

Cilj ovog rada bio je pripremiti praškaste sustave mikrosfera temeljenih na pektinu i hipromelozi s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom (NDF-om) i inertnog nosača (laktoze i manitol) te tako pripremljenim sustavima odrediti osmolalnost nakon dispergiranja u odgovarajućem mediju; nadalje, *in vitro* ispitivanjima na Calu-3 staničnom modelu nazalnog epitela odrediti biokompatibilnost pripremljenih sustava te ispitati permeabilnost uklopljenog NDF-a iz praškastih sustava kroz navedeni stanični model kao prediktor permeabilnosti kroz nosnu sluznicu. Planirana ispitivanja nastavak su na istraživanje Bobičanec i Kobaš (2020) prema kojem su se isti sustavi pokazali prikladnima za nazalnu primjenu prema reološkim svojstvima, kutu raspršenja i profilu nazalne depozicije *in vitro*. *In vitro* ispitivanja

biokompatibilnosti i permeabilnosti na staničnom modelu idući su korak u razvoju formulacije.

### *Specifični ciljevi*

- Pripraviti mikrosfere s NDF-om metodom sušenja raspršivanjem vodene otopine pektina, hipromeloze i NDF-a te odrediti uspješnost procesa
- Oblikovati praškaste sustave miješanjem inertnih nosača (laktoze i manitola) s pripremljenim mikrosferama s NDF-om te odrediti homogenost pripremljenih praškastih sustava
- Odrediti osmolalnost pripremljenih sustava nakon dispergiranja u odgovarajućem mediju
- Ispitati biokompatibilnost praškastih sustava s NDF-om *in vitro* na Calu-3 staničnom modelu nazalnog epitela
- Ispitati permeabilnost NDF-a iz pripremljenih praškastih sustava kroz Calu-3 stanični monosloj

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

Za izradu mikrosfera s uklopljenom djelatnom tvari korišteni su natrijev deksametazon fosfat (dalje u tekstu označen kao NDF; Carbosynth Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo), niskoamidirani visokometoksilirani pektin (dalje u tekstu označen kao pektin; Pectin Amid CF 005, ljubaznošću donirano od Herbstreith&Fox, Njemačka) i hipromeloza (hidroksipropilmetilceluloza; Metolose<sup>®</sup> SH 4000) Shin-Etsu Chemical Co. LTD, Japan). Mikrosfere su miješane s inertnim praškastim nosačima, laktoza monohidratom GranuLac<sup>®</sup> 200 (dalje u tekstu označen kao laktoza; Meggle, Njemačka) te manitolom (BDH Prolabo<sup>®</sup>, VWR International Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Tijekom ispitivanja biokompatibilnosti i permeabilnosti pripremljenih sustava korištena je humana stanična linija adenokarcinoma pluća Calu-3 (ATCC<sup>®</sup> HTB-55<sup>™</sup>, ATCC, SAD) za čiji je uzgoj korišten Dulbeccov modificirani Eaglov medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM; Sigma-Aldrich, Njemačka). Medij za uzgoj stanica sadržavao je fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS; 10 % V/V; Sigma-Aldrich, SAD) te antibiotike penicilin i streptomycin (1 % V/V, Lonza, Švicarska). Za odvajanje stanica od podloge korištena je otopina tripsina (0,25 %, m/V; Capricorn Scientific GmbH, Njemačka) i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina; 0,5 mM; Lonza Group Ltd, Švicarska).

Za izradu mobilne faze za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) korišteni su acetonitril (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific, SAD) i 5 mM acetatni pufer (pH 4,5). Za ispitivanja su također korišteni pufer balansirani Hankovim solima (engl. *Hank's balanced salt solution*, HBSS) pH 7,4, uz dodatak 5,3 mM Ca<sup>2+</sup> (HBSS-Ca<sup>2+</sup>), pripremljen otapanjem KCl (5,37 mM), NaHCO<sub>3</sub> (4,17 mM), NaCl (136,89 mM), D-glukoza monohidrata (5,55 mM) (svi dobavljeni od Kemig, Hrvatska), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,44 mM) (Kemika, Hrvatska), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O (0,34 mM) (Fluka Chemie AG, Švicarska) i CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O (5,3 mM) (Sigma-Aldrich, Njemačka) u pročišćenoj vodi te fiziološka otopina puferirana fosfatima (pH 7,4) (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS; Lonza, Švicarska). Za ispitivanje biokompatibilnosti korištena je otopina 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid (MTT; Sigma Aldrich, Njemačka).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprava mikrosfera s uklopljenim NDF-om

Mikrosfere s NDF-om pripravljene su sušenjem raspršivanjem otopine NDF-a, pektina i hipromeloze koja je pripravljena miješanjem koncentriranih otopina polimera i lijeka. Otopina pektina (1,4 %, *m/m*) pripremljena je otapanjem pektina u pročišćenoj vodi pri sobnoj temperaturi tijekom 24 sata uz stalno miješanje na magnetskoj miješalici nakon čega je otopina filtrirana. Otopina hipromeloze (1,2 %, *m/m*) pripravljena je dispergiranjem hipromeloze u pročišćenoj vodi zagrijanoj pri 80-85 °C te miješanjem na magnetskoj miješalici 24 sata pri sobnoj temperaturi te je zatim čuvana u hladnjaku 24 sata prije upotrebe. Otopina NDF-a (0,135 %, *m/m*) pripravljena je otapanjem krutine NDF-a u pročišćenoj vodi. Iz otopina polimera i lijeka pripravljeno je 250 g smjese otopina dodavanjem pročišćene vode do konačnog masenog udjela svake od otopljenih tvari (NDF-a, pektina te hipromeloze) od 0,2 % (maseni omjer sastavnica je 1:1:1).

Pripravljena smjesa otopina sušena je raspršivanjem na uređaju Büchi Mini Spray Dryer B-190 (Büchi, Švicarska). Korištena je sapnica promjera 0,7 mm dok su parametri sušenja bili sljedeći: ulazna temperatura 160 °C, izlazna temperatura 102 °C, protok komprimiranog zraka 650 NI/h, kapacitet aspiratora 50 % te brzina protoka otopine 2,5 g/min. Nakon vaganja dobivenih mikrosfera iskorištenje procesa izračunato je prema sljedećoj formuli:

$$I (\%) = \frac{\text{masa dobivenih mikrosfera (mg)}}{\text{masa suhe tvari u otopini za sušenje (mg)}} \times 100 \quad (3)$$

Masa suhe tvari u otopini za sušenje korištena u formuli izračunata je iz masenih udjela NDF-a, pektina i hipromeloze, te mase pripremljene vodene otopine koja je sušena raspršivanjem.

### 3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja NDF-a u mikrosfere

Količina NDF-a uklopljenog u mikrosfere određena je spektrofotometrijskom metodom. Uzorak je pripremljen dispergiranjem 10 mg mikrosfera s NDF-om u 50 ml pročišćene vode. Disperzija je miješana tijekom 24 sata na magnetnoj miješalici te nakon filtriranja (0,22 µm, Chromafil, Macherey-Nagel GmbH&Co, Njemačka) razrijeđena pročišćenom vodom u omjeru 1:5 (V/V). Sadržaj NDF-a određen je UV-Vis spektrofotometrom (UV-Visible

Spectrophotometer Cary 50 Probe, Varian, SAD) pri valnoj duljini od 241 nm. Postupak je proveden u triplicatu.

Iz dobivenih rezultata izračunata je koncentracija NDF-a pomoću prethodno izrađenog baždarnog pravca s jednadžbom  $A = 0,029 \times C$  (Bobičanec i Kobaš, 2020). Prethodno je ispitivanjima utvrđeno da prisutnost hipromeloze i pektina u mjerenom uzorku ne utječe na apsorbanciju NDF-a pri navedenoj valnoj duljini. Iz dobivenih rezultata izračunati su uspješnost uklapanja lijeka (engl. *entrapment efficiency*, EE) te sadržaj lijeka u mikrosferama (engl. *drug loading*, DL) prema sljedećim formulama:

$$EE (\%) = \frac{\text{stvarni sadržaj lijeka (mg)}}{\text{teorijski sadržaj lijeka (mg)}} \times 100 \quad (4)$$

$$DL (\%) = \frac{\text{masa lijeka u mikrosferama (mg)}}{\text{ispitivana masa mikrosfera (mg)}} \times 100 \quad (5)$$

### 3.2.3. Priprema praškastih sustava mikrosfera s uklopljenim NDF-om i inertnog nosača

Prašasti sustavi pripremljeni su miješanjem mikrosfera s uklopljenim NDF-om i inertnog nosača u masenom omjeru 1:9. Kao inertni nosači korišteni su manitol ili laktoza. Nosači su prije miješanja prosijani pomoću laboratorijskog vibracijskog sita (Vibratory Sieve Shaker AS 200, Retsch<sup>®</sup>, Njemačka). Korištena je frakcija koja je nakon 10 minuta prosijavanja pri amplitudi od 50 % (Nižić i sur., 2020.) zaostala između sita promjera otvora 45  $\mu\text{m}$  i 63  $\mu\text{m}$ .

Miješanje mikrosfera i nosača provedeno je u kiveti volumena 50 ml (Falcon<sup>®</sup>, Corning Inc, SAD) na miješalici MX-S vortex mixer (DLAB Scientific Co. Ltd., Kina) pri 1250 okretaja/min tijekom 5 minuta. Nakon toga prašci su preneseni u kivete od 1,5 ml (Eppendorf, Njemačka) te 10 minuta miješani pomoću mješača prašaka (Turbula<sup>®</sup> shaker mixer, WAB Group, Švicarska) pri 70 okretaja/min (Nižić Nodilo i sur., 2021).

### 3.2.4. Ispitivanje homogenosti praškastih sustava

Nakon miješanja mikrosfera s inertnim nosačem određena je homogenost pripremljenih praškastih sustava prilagodbom metode Lee i sur., 2018. Prašak je uzorkovan u triplicatu s vrha, sredine i dna kivete. Po 5 mg uzorka preneseno je u vijalu te dispergirano u 10 ml

pročišćene vode te miješano tijekom 2 sata na magnetskoj miješalici. Nakon miješanja, disperzije su filtrirane kroz filter pora 0,22  $\mu\text{m}$  (Chromafil, Macherey-Nagel GmbH&Co, Njemačka) te je zatim određen sadržaj NDF-a u uzorcima spektrofotometrijskom metodom opisanom u poglavlju 3.2.2.. Za praškasti sustav izračunata je srednja vrijednost postotnog omjera eksperimentalno određene i teorijske mase lijeka u uzetim uzorcima te relativna standardna devijacija (RSD).

### 3.2.5. Ispitivanja osmolalnosti disperzija praškastih sustava

Osmolalnost disperzija praškastih sustava s NDF-om određena je osmometrom OsmoTECH<sup>®</sup> Single-Sample Micro-Osmometer (Advanced Instruments, SAD). NDF te njegove smjese s laktozom i manitolom otopljene su u smjesi istih volumena pročišćene vode i HBSS-Ca<sup>2+</sup>. U istom mediju dispergirane su i mikrosfere, kao i smjese mikrosfera s laktozom i manitolom. Svi uzorci pripremljeni su u tri koncentracije koje odgovaraju koncentraciji NDF-a od 0,1, 0,4 i 1,2 mg/ml. Mjerenje je provedeno u duplikatu za svaku koncentraciju, a rezultat izražen kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Otopine/disperzije s navedenim koncentracijama NDF-a odgovaraju uzorcima nanošenim na stanice pri ispitivanju biokompatibilnosti i permeabilnosti.

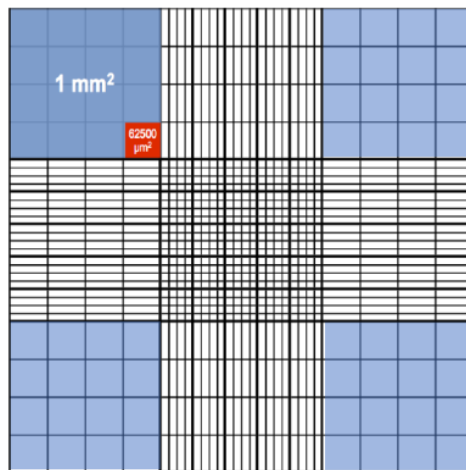
### 3.2.6. Stanična linija i uvjeti uzgoja

Za ispitivanja biokompatibilnosti i permeabilnosti pripremljenog praškastog sustava korištena je humana stanična linija adenokarcinoma pluća Calu-3 (ATCC<sup>®</sup> HTB-55<sup>™</sup>, SAD). Stanice su uzgojene u skladu s protokolom kojeg preporučuje proizvođač. Uzgajane su u sterilnim uvjetima u tikvicama za uzgoj veličina 25, 75 i 150  $\text{cm}^2$  te su inkubirane pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> i 95 % relativne vlažnosti (Sanyo CO<sub>2</sub> incubator, Japan). Hranidbeni medij je pripremljen prema Sinani i sur. (2017) dodavanjem 10 % FBS-a i 1 % smjese antibiotika penicilina i streptomocina u DMEM. Stanični medij mijenjan je svakih 48-72 sata kako bi se osigurao optimalni rast stanica i uklonile mrtve stanice koje se nalaze u mediju.

Rast stanica praćen je svakodnevno invertnim mikroskopom (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka). Stanice su presađivane u nove tikvice nakon postizanja 80-90 % konfluentnosti kada su dijeljene u omjerima od 1:3 do 1:6. Nakon odsisavanja hranidbenog medija sterilnom



pipetom (Falcon<sup>®</sup>, Corning Costar Inc, SAD), u tikvice je dodana smjesa otopina tripsina 0,25 % (*m/V*) i 0,5 mM EDTA te je tikvica inkubirana oko 10 minuta pri 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> kako bi se stanice odvojile od podloge. Djelovanje tripsina zaustavljeno je dodatkom hranidbenog medija u tikvicu. Dobivena suspenzija stanica iz tikvice je prebačena u kivetu za centrifugu (Falcon<sup>®</sup>, Corning Costar Inc, SAD) te centrifugirana 6 minuta pri 100 × g (Eppendorf<sup>®</sup> centrifuge, Sigma-Aldrich, Njemačka). Supernatant je uklonjen sterilnom pipetom, a stanice iz taloga resuspendirane u hranidbenom mediju.



**Slika 3.** Hemocitometar (preuzeto i prilagođeno s [www.hemocytometer.org](http://www.hemocytometer.org))

Prilikom ispitivanja biokompatibilnosti i permeabilnosti pripremljenih praškastih sustava, stanice su nasađivane na ploče s 95 ili 12 jažica u potrebnom broju. Koncentracija stanica u suspenziji dobivenoj odvajanjem stanica od podloge određena je koristeći hemocitometar. Hemocitometar je stakalce s 9 jednako velikih kvadrata, koji su podijeljeni u manje kvadratiće ili pravokutnike (Slika 3.).

Stanice su brojane pod invertnim mikroskopom (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka) u kvadratima u uglovima dva hemocitometra. Kako svaki plavi kvadrat označava bazu kočke volumena 0,1 mm<sup>3</sup>, koncentracija stanica u suspenziji izračunata je na sljedeći način:

$$\text{broj stanica u ml} = \text{prosjeak broja stanica u 8 plavih kvadrata} \times 10^4$$

Ovisno o dobivenom broju stanica u ml te potrebnoj koncentraciji stanica u pojedinoj jažici, suspenzija stanica je razrijeđena medijem ili ukoncentrirana ponovnim centrifugiranjem te resuspendiranjem u manjoj količini hranidbenog medija ([www.vanderbilt.edu](http://www.vanderbilt.edu)).

### 3.2.7. *In vitro* ispitivanje biokompatibilnosti praškastih sustava

Biokompatibilnost praškastih sustava s NDF-om ispitana je na Calu-3 stanicama koje su nakon brojanja na hemocitometru nasađene na ploču s 96 jažica (Corning Costar Inc, SAD) pri koncentraciji od  $4 \times 10^4$  stanica/jažici. Stanice su inkubirane 48 sati do postizanja odgovarajuće konfluentnosti nakon čega je hranidbeni medij uklonjen, a stanice isprane puferom HBSS-Ca<sup>2+</sup>.

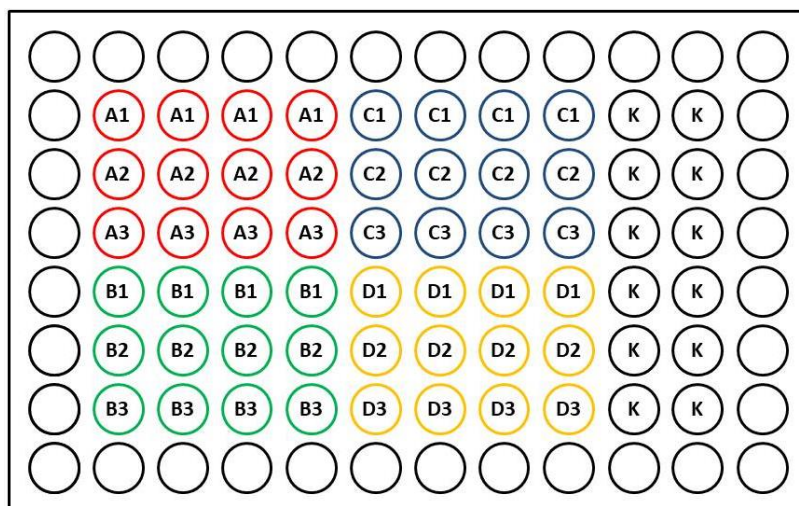
Mikrosfere i praškasti sustavi s manitolom i laktozom dispergirani su u pročišćenoj vodi tako da je koncentracija NDF-a u nastalim disperzijama bila u rasponu od 0,2 do 2,4 mg/ml. Otopine NDF-a i fizičke smjese NDF-a i inertnog nosača u pročišćenoj vodi u koncentracijama jednakim onima u disperzijama praškastih sustava korištene su kao kontrole. Svaki uzorak ispitan je u tri različite koncentracije te dodatno razrijeđen puferom HBSS-Ca<sup>2+</sup> (pH 7,4) u volumnom omjeru 1:1, čime su konačne koncentracije nanošenih uzoraka NDF-a između 0,1 i 1,2 mg/ml, odnosno između 3,4 i 34,2 mg/ml laktoze i manitola (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Prikaz uzoraka i njihovih konačnih koncentracija korištenih u ispitivanjima.

Uzorak	Koncentracija (mg/ml)	Oznaka
Otopina smjese inertnog nosača (laktoze ili manitola) i NDF-a	34,2	A1
	10,3	A2
	3,4	A3
Disperzija mikrosfera s uklopljenim NDF-om	3,8	B1
	1,1	B2
	0,4	B3
Disperzija smjese mikrosfera s uklopljenim NDF-om i inertnim nosačem (laktozom ili manitolom) (1:9)	38,0	C1
	11,4	C2
	3,8	C3
Otopina NDF-a	1,2	D1
	0,4	D2
	0,1	D3

Uzorci su nanoseni u količini od 100  $\mu$ l u jažice ploče u kvadriplikatu za svaku koncentraciju prema rasporedu na Slici 4. Stanice u jažicama u koje je nanosen samo pufer HBSS-Ca<sup>2+</sup>

korištene su kao negativna kontrola. Ploče su inkubirane s uzorcima 2 sata pri 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> nakon čega su ispitivani uzorci uklonjeni, a stanice dva puta isprane puferom HBSS-Ca<sup>2+</sup>. Nakon inkubacije stanica u hranidbenom mediju 24 sata pri 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>, provedeno je ispitivanje biokompatibilnosti MTT testom.



**Slika 4.** Shematski prikaz nanošenja uzoraka na ploču s 96 jažica pri ispitivanju biokompatibilnosti korištenjem Calu-3 stanica. Sastav uzoraka naveden je u Tablici 4. Uzorci su pomiješani s puferom HBSS-Ca<sup>2+</sup> u volumnom omjeru 1:1. Stanice izložene samo puferu HBSS-Ca<sup>2+</sup> (K) služile su kao kontrola.

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) test je kolorimetrijski test za ispitivanje metaboličke aktivnosti stanica. Reagens je pripravljen pri koncentraciji od 2,5 mg/ml otapanjem MTT reagensa u PBS-u (pH 7,4) miješanjem na Vortex miješalici. Konačna koncentracija MTT reagensa u jažicama bila je 0,5 mg/ml.

Nakon dodatka MTT reagensa, stanice su inkubirane 3 sata pri 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>. Nakon toga, MTT reagens je uklonjen aspiratorom (Gilson, SAD), a nastali kristalići formazana otopljeni su dodatkom 100 µl izopropanola po jažici uz protresivanje ploče zaštićene od svjetla na orbitalnoj tresalici. Apsorbancija otopine kristala formazana određena je pri valnoj duljini od 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Multilabel counter VICTOR3, PerkinElmer, SAD). Vijabilnost stanica izračunata je kao relativna metabolička aktivnost stanica prema kontrolnim (izloženim samo puferu HBSS-Ca<sup>2+</sup>) prema jednadžbi:

$$vijabilnost (\%) = \frac{A_{(uzorka)} - A_{(izopropanol)}}{A_{(kontrola)} - A_{(izopropanol)}} \times 100 \quad (6)$$

gdje se od apsorbancije otopine kristala formazana nastalog u stanicama tretiranim uzorkom,  $A_{(\text{uzorak})}$ , i u stanicama izloženim puferu HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ ,  $A_{(\text{kontrola})}$ , oduzima apsorbancija čistog izopropanola,  $A_{(\text{izopropanol})}$ , kako bi se isključio utjecaj matriksa na rezultate.

### 3.2.8. *In vitro* ispitivanje permeabilnosti NDF-a iz praškastih sustava

*In vitro* permeabilnost uklopljenog NDF-a iz praškastih sustava ispitana je na Calu-3 staničnom modelu prema proceduri opisanoj u Matilainen i sur. (2008). Nakon brojanja na hemocitometru, stanice su nasađene na Transwell<sup>®</sup> polikarbonatne membrane srednje veličine pora 0,4  $\mu\text{m}$  i površine 1,12  $\text{cm}^2$  (Corning Costar Inc., SAD). Stanice su nasađene pri gustoći od  $5,5 \times 10^5$  stanica po jažici, odnosno 500  $\mu\text{l}$  suspenzije stanica u hranidbenom mediju gustoće  $1,1 \times 10^6$  stanica/ml je dodano u apikalni (donorski) odjeljak membrane, dok je u bazolateralni (receptorski) odjeljak dodano 1500  $\mu\text{l}$  samog hranidbenog medija. Nakon 48 sati inkubacije pri 37 °C i 5 %  $\text{CO}_2$  hranidbeni medij je odsisan iz donorskog i receptorskog odjeljka. U receptorski odjeljak dodano je 800  $\mu\text{l}$  svježeg hranidbenog medija dok je donorski odjeljak ostao prazan kako bi stanice s apikalne strane ostale izložene zraku. Medij u receptorskom odjeljku mijenjan je svakih 48 – 72 sata, a rast stanica praćen je mjerenjem transepitelnog električnog otpora (engl. *transepithelial electrical resistance*, TEER) pomoću epitelnog volt/ohm metra EVOM (WPI Inc., SAD) na tri različita mjesta u svakoj jažici. Potpunu konfluentnost stanica označava postizanje platoa prosjeka TEER vrijednosti izmjerenih na tri mjesta unutar jedne jažice.

Nakon 13-16 dana kada je postignuta potpuna konfluentnost (iznad 1000  $\Omega \text{ cm}^2$ ), nakon ispiranja stanica puferom HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  ispitana je permeabilnost NDF-a iz pripremljenih praškastih sustava kroz Calu-3 stanični monosloj u receptorski medij. Kako bi se odredio profil permeabilnosti, pripremljene su otopine/disperzije pripremljenih praškastih sustava (mikrosfera s uklopljenim NDF-om te smjesa mikrosfera s NDF-om s inertnim nosačima, laktozom i manitolom, u masenom omjeru 1:9), zatim samog NDF-a kao i fizičkih smjesa NDF-a i navedenih inertnih nosača u istom omjeru. Otopine/disperzije su pripremljene u pročišćenoj vodi te razrijeđene puferom HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  u volumnom omjeru 1:1 do konačne koncentracije od 0,1, 0,4 i 1,2 mg/ml NDF-a. Tako pripremljeni uzorci nanoseni su u volumenu od 500  $\mu\text{l}$  u donorski odjeljak, dok je u receptorski odjeljak nanoseno 1500  $\mu\text{l}$  HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ . Ispitivanje za svaki sustav je provedeno u triplikatu, a stanice izložene samom HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  služile su kao negativna kontrola za mjerenje TEER vrijednosti i stanične

vijabilnosti. Stanice s nanesenim uzorcima inkubirane su 2 sata pri 37 °C uz kontinuirano miješanje na orbitalnoj tresilici pri 50 okretaja po minuti. Mjerene su TEER vrijednosti Calu-3 monosloja prije samog eksperimenta, 30, 70 i 120 minuta te 24 sata nakon početka eksperimenta u svrhu praćenja integriteta staničnog monosloja. Medij (500 µl) je uzorkovan iz receptorskog odjeljka na početku eksperimenta te nakon 20, 40, 60, 80, 100 i 120 minuta. Isti je volumen svježeg termostatiranog pufera HBSS-Ca<sup>2+</sup> (37 °C) svaki put vraćen u receptorski odjeljak. Na kraju eksperimenta uzorkovan je i medij iz apikalnog odjeljka. U uzetim uzorcima određen je sadržaj NDF-a HPLC metodom opisanom u odjeljku 3.2.8. Iz dobivenih rezultata izračunat je prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) prema formuli (2) navedenoj u odlomku 1.2.

Nakon ispitivanja permeabilnosti, uzorci i pufer HBSS-Ca<sup>2+</sup> uklonjeni su te je u receptorski odjeljak dodan hranidbeni medij. Nakon 24 sata inkubacije s medijem proveden je test biokompatibilnosti pri čemu je pripravljena otopina MTT reagensa u PBS-u koncentracije 2,5 mg/ml. Otopina je razrijeđena hranidbenim medijem do konačne koncentracije MTT reagensa od 0,5 mg/ml. Nakon uklanjanja hranidbenog medija iz receptorskog odjeljka, po 700 µl razrijeđenog MTT reagensa dodano je u donorski i receptorski odjeljak te su stanice inkubirane 3 sata pri 37 °C. Otopina MTT reagensa je zatim odsisana, a u donorski i receptorski odjeljak dodano je po 700 µl izopropanola. Sustav je zaštićen od svjetlosti i miješan na orbitalnoj tresilici pri 350 okretaja po minuti kako bi se nastali kristalići formazana otopili. Otopine formazana iz receptorskog i donorskog odjeljka membrana su sjedinjene, a sjedinjena otopina nanescena je u triplicatu za svaku membranu u količini od 100 µl na mikrotitarsku ploču s 96 jažica. Određena je apsorbancija otopine kristala formazana pri valnoj duljini od 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Multilabel counter VICTOR3). Kao kontrola korišten je čisti izopropanol, a vijabilnost stanica izračunata je kako je opisano u odjeljku 3.2.7.

### 3.2.9. Određivanje sadržaja NDF-a

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) primijenjena je za kvantitativnu analizu NDF-a u sklopu ispitivanja permeabilnosti. Kromatografski sustav sastavljen je od automatskog sustava za uzimanje uzoraka, kontrolora sustava, pumpe, sustava za uklanjanje plinova, UV-VIS detektora i pećnice (Series 200, PerkinElmer). Odgovarajuće razdvajanje postignuto je na obrnuto-faznoj

koloni Kinetex C18, promjera pora 2,6  $\mu\text{m}$ , dimenzije 100  $\times$  4,6 mm, 100  $\text{\AA}$  (Phenomenex, SAD).

Mobilna faza pripremljena je miješanjem 5 mM acetatnog pufera (pH 4,5) i acetonitrila u volumnom omjeru 68:32. Analiza je provedena izokratnim eluiranjem pri temperaturi od 55  $^{\circ}\text{C}$ . Brzina protoka bila je 0,7 ml/min, volumen injektiranog uzorka 20  $\mu\text{l}$ , vrijeme analize 7 minuta. NDF je detektiran pri valnoj duljini od 241 nm. Metoda je prethodno validirana prema uputama Q2 (R1) Internacionalne konferencije o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH) (Nižić Nodilo i sur., 2021).

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Uspješnosti uklapanja i sadržaj NDF-a u mikrosferama

U ovom radu pripravljene su polimerne mikrosfere s uklopljenim NDF-om namjenjene direktnoj dostavi lijeka u središnji živčani sustav nakon nazalne primjene. Deksametazon se u obliku prolijeka (NDF) može primijeniti u većoj dozi i postiže se veća bioraspoloživost zbog bolje permeacije i konverzije u aktivni oblik *in vivo*. Topljivost u vodi takvog oblika omogućuje izvođenje formulacijskih procesa kao što je sušenje raspršivanjem vodene otopine, a također i smanjuje uporabu potencijalno toksičnih pomoćnih tvari (Nižić Nodilo i sur., 2021).

Prema literaturnim podacima, mikronizirani prašci su najviše proučavani oblik nazalnih čvrstih formulacija. Ukoliko su mikrosfere građene od vodotopljivih tvari, rapidno se otapaju u nosnoj sluzi osiguravajući brzo djelovanje djelatne tvari. S druge strane, mikrosfere mogu biti građene od polimera koji usporavaju oslobađanje djelatne tvari (Fasiolo i sur., 2018) što je slučaj u ovom radu. Kao konstituenti pri izradi mikrosfera korišteni su pektin i hipromeloza. Oba mukoadhezivna polimera uvrštena su na GRAS listu (engl. *Generally Recognized as Safe*) pomoćnih tvari ([www.ecfr.gov](http://www.ecfr.gov)). Koriste se kao pomoćne tvari u tekućim nazalnim oblicima koji su već prisutni na tržištu kao što su PecFent® (nazalni terapijski sustav fentanila) ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)) i Vivispray® (nazalni sprej azelastina) ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Interakcijom s kalcijevim ionima u nazalnom fluidu, niskometoksilirani pektinski lanci se umrežavaju. Nastali viskozni hidrogel omogućava dulje zadržavanje lijeka na mjestu primjene jer pruža veći otpor mukocilijarnom klirensu. Kombiniranjem hipromeloze s pektinom poboljšavaju se svojstva polimernog matriksa što optimizira bubrenje u kontaktu s nazalnim fluidom i omogućava oslobađanje lijeka kontroliranom brzinom. Fasiolo i sur. (2018) uočili su da se s povećanjem molekulske mase polimera produljuje vrijeme zadržavanja formulacije na mjestu primjene, što pozitivno utječe na apsorpciju slabo permeabilnih lijekova. Maseni omjer

NDF-a, pektina i hipromeloze u smjesi koja je sušena raspršivanjem bio je 1:1:1 (koncentracija svake od tvari u otopini iznosila je 0,2 % *m/m*) budući da se u prethodnim istraživanjima takav omjer pokazao optimalnim (Nižić i sur., 2021).

Mikrosfere su uspješno pripravljene metodom sušenja raspršivanjem smjese NDF-a, pektina i hipromeloze u pročišćenoj vodi bez dodatka organskih otapala. Metoda omogućuje

optimizaciju svojstava čestica kao što su veličina, oblik i gustoća (Fasiolo i sur., 2018). Uz formulacijske parametre, na svojstva dobivenih mikrosfera utječu i procesni parametri kao što su medij za sušenje, veličina sapnice, tlak na sapnici, ulazna i izlazna temperatura, relativna vlažnost i protok komprimiranog zraka, kapacitet aspiratora te protok otopine (Filipović-Grčić i Hafner, 2010).

U ovom radu, pri opisanim uvjetima, iskorištenje procesa sušenja iznosilo je 74,4 % što je u usporedbi s literaturnim podacima relativno visok stupanj iskorištenja (Fasiolo i sur., 2018; Filipović-Grčić i Hafner, 2010; Jurišić Dukovski i sur., 2019). Smanjeno iskorištenje procesa može biti posljedica adhezije čestica na stjenke uređaja i gubitaka sitnih čestica kroz ispuh uređaja te netemeljito sakupljanje produkta (Maury i sur., 2005).

Sušenjem raspršivanjem pri opisanim uvjetima postignuta je uspješnost uklapanja NDF-a u polimerne mikrosfere od  $95,7 \pm 2,1$  % što se prema dostupnim literaturnim podacima smatra relativno visokim stupanjem uklapanja (Barišić, 2019; Nižić i sur., 2020), odnosno metoda se pokazala prikladnom za uklapanje NDF-a u mikrosfere građene od pektina i hipromeloze. Sadržaj lijeka u pripremljenim mikrosferama od  $31,6 \pm 1,5$  % također je veći u usporedbi s postojećim praškastim sustavima za nazalnu primjenu NDF-a (Maury i sur., 2005). Veći sadržaj lijeka u mikrosferama omogućava miješanje mikrosfera s inertnim praškastim nosačima. Takav postupak ima za cilj omogućiti reproducibilnu primjenu terapijske doze lijeka te optimirati reološka svojstva i nazalnu depoziciju praška, odnosno umanjiti mogućnost depozicije dijela primijenjene doze u nižim dijelovima dišnog sustava (Nižić i sur., 2020; Fasiolo i sur., 2018).

#### **4.2. Homogenost praškastih sustava**

Praškaste formulacije stabilnije su od tekućih i zahtijevaju manje pomoćnih tvari što omogućava primjenu veće doze lijeka (Fasiolo i sur., 2018). Miješanjem s inertnim nosačima moguće je poboljšati im disperzibilnost i profil nazalne depozicije (Nižić i sur., 2021). Postoje i literaturni podaci o povoljnom učinku praškastih sustava na bioraspoloživost određenih lijekova (Tanaka i sur., 2017).

U ovom radu, kao nosači mikrosfera s NDF-om odabrani su manitol i laktoza koji su svrstani na GRAS listu i za koje postoje literaturni dokazi o sigurnosti primjene putem dišnog sustava



([www.ecfr.gov](http://www.ecfr.gov)). Oba polimera imaju ulogu u hidrataciji izbubrenog gela čime se prevenira stvaranje suhog sloja polimera koji mogu iritirati sluznicu (Nižić i sur., 2021). S obzirom da su vodotopljivi i osmotski aktivni, brzo se otapaju i privlače vodu iz epitelnih stanica što povećava apsorpciju slabo topljivih lijekova (Fasiolo i sur., 2018).

Temeljem literaturnih podataka o optimalnoj veličini čestica prašaka u pripravcima za nazalnu primjenu, korištena je prosijana frakcija nosača veličina od 45 do 63  $\mu\text{m}$  (Trows i Scherließ, 2016; Fasiolo i sur., 2018). Nosač je miješan s mikrosferama u omjeru 1:9 (*m/m*) po uzoru na rad Nižić i sur. (2020) u kojem su uočena bolja reološka svojstva u odnosu na ostale proučavane omjere sastavnica. Omjer u korist nosača važan je kako se površina nosača ne bi prezasičila mikrosferama što bi moglo rezultirati njihovim slabijim vezanjem i posljedičnim odvajanjem mikrosfera od površine nosača uslijed protoka zraka pri raspršivanju ili udahu. Time bi se povećao udio mikrosfera koje se odlažu u donje dišne putove, a nehomogenost praška dovela bi do neujednačenosti doziranja lijeka (Trows i Scherließ, 2016).

Kako bi se osigurala isporuka terapijske doze lijeka mora se ostvariti odgovarajuća homogenost praškastog sustava mikrosfera i inertnog nosača. Testiranje homogenosti pripremljenih praškastih sustava procjena je učinkovitosti miješanja mikrosfera s inertnim nosačem. Oba praškasta sustava (smjesa mikrosfera s manitolom i smjesa mikrosfera s laktozom) uzorkovana su s vrha, sredine i dna kivete te je u uzetim uzorcima određen sadržaj lijeka. Homogenost sustava izražena je kao srednja vrijednost postotnog omjera eksperimentalno određene i teorijske mase lijeka u uzetim uzorcima uz prikaz relativne standardne devijacije (RSD). Dobivene su vrijednosti za sustav s manitolom od  $96,4 \pm 2,3$  %, dok je homogenost sustava s laktozom  $95,3 \pm 1,8$  %. Prema tome, praškasti sustavi mikrosfera i inertnog nosača uspješno su pripremljeni jer se srednje vrijednosti postotnog omjera eksperimentalno određene i teorijske mase NDF-a u uzetim uzorcima unutar raspona  $100 \pm 5,5$  %, uz RSD vrijednost  $\pm 5,5$  % smatraju zadovoljavajućim, odnosno karakteriziraju homogene praškaste sustave (Lee i sur., 2018). Kriterij homogenosti praškastog sustava iznimno je bitan u ovom radu s obzirom da se radi o formulaciji s niskim udjelom djelatne tvari.

Potrebno je uzeti u obzir da je u svaku nosnicu moguće dostaviti 10 – 25 mg praška koji sadržavaju odgovarajuću dozu lijeka (Fasiolo i sur., 2018; Jurišić Dukovski i sur., 2019). S obzirom na ostvarenu uspješnost uklapanja NDF-a u mikrosfere ( $95,7 \pm 2,1$  %) i omjer mikrosfera i nosača (1:9 *m/m*), 15 mg mješavine prašaka sadrži  $478,02 \pm 10,49$   $\mu\text{g}$  lijeka, što

je u skladu s radom Nižić i sur. (2020) prema kojem je prilagođena metoda pripreme mješavina prašaka. Kako je dnevna doza deksametazona 400 – 800 µg (Jurišić Dukovski i sur., 2019), pripravljeni sustav je prikladan za osiguravanje terapijske doze lijeka uz odgovarajući režim doziranja.

### 4.3. Osmolalnost praškastih sustava

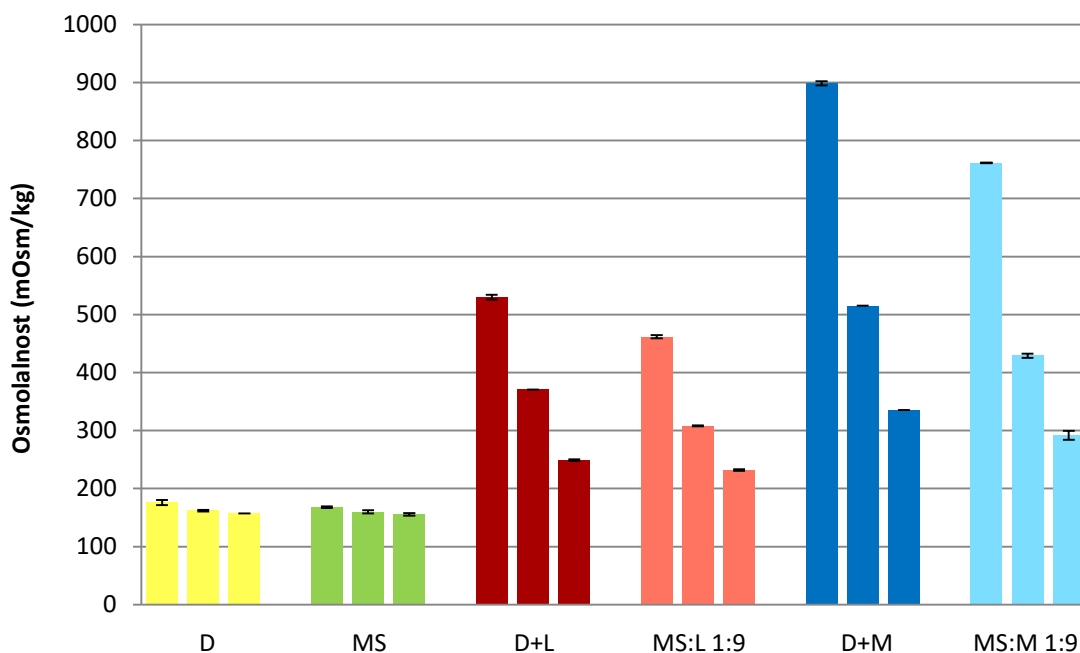
Osmolalnost primijenjenih sustava ima veliki utjecaj na sigurnost primjene i apsorpciju lijeka (Bhise i sur., 2008). Prema Scherließ (2011) optimalna osmolalnost za Calu-3 stanični model je između 290 i 390 mOsm/kg što je u skladu s Bitter i sur. (2011) prema kojima je sigurna vrijednost za nazalnu primjenu *in vivo* 290 – 500 mOsm/kg.

U ovom radu određena je osmolalnost: (i) otopine NDF-a, (ii) otopine NDF-a i laktoze, (iii) otopine NDF-a i manitola, (iv) disperzije mikrosfera, (v) disperzije smjese mikrosfera s laktozom i (vi) disperzije smjese mikrosfera s manitolom. Maseni omjer mikrosfera i inertnog nosača (laktoze ili manitola) je 1:9. Maseni omjer NDF-a i inertnog nosača u otopini jednak je masenom omjeru NDF-a i inertnog nosača u disperziji smjese mikrosfera s inertnim nosačem. Svi sustavi pripravljeni su u pročišćenoj vodi pri tri koncentracije NDF-a (0,2, 0,8 i 2,4 mg/ml) te su prije mjerenja pomiješani s HBSS-Ca<sup>2+</sup> u istom volumenu kako bi se simulirali *in vivo* uvjeti. Rezultati su prikazani na Slici 5.

Otopine deksametazona i disperzije mikrosfera imaju malu osmolalnost (manje od 290 mOsm/kg) zbog čega voda ulazi u stanice koje zatim pucaju. Hipoosmotsko djelovanje na stanice uzrokuje slabljenje epitelne membrane što može utjecati na permeabilnost lijeka (Nižić Nodilo i sur., 2021). Prema podacima u literaturi (Bitter i sur., 2011) ne preporučuje se njihova primjena na nazalnu sluznicu u ispitanom obliku.

Otopine NDF-a i laktoze ili manitola te disperzije smjese mikrosfera s laktozom ili manitolom pokazuju optimalnu osmolalnost za Calu-3 stanični model u srednjoj i nižoj koncentraciji NDF-a. Testirani praškasti sustavi u visokoj koncentraciji NDF-a stvaraju hiperosmotske otopine koje mogu nespecifično smanjiti staničnu vijabilnost. Takav utjecaj osmolalnosti smatra se dijelom toksičnih svojstava samog sustava (Scherließ, 2011). Laktoza i manitol male su molekule koje se brzo otapaju u vodenom mediju. Zbog toga se osmotski tlak povećava i voda izlazi iz stanica što može uzrokovati dodatno otapanje slabo topljivog lijeka

(Fasiolo, 2018). Izlaskom vode stanice se smežuraju i slabi epitelna barijera što može rezultirati povećanjem pasivnog paracelularnog transporta lijeka. Primjenom hiperosmotskih sustava *in vivo* dolazi do trenutne reakcije epitelnih stanica što pacijenti mogu osjećati kao iritaciju i peckanje u nosu te povećanje nagona za kihanjem što smanjuje njihovu adheziju (Koskela i sur., 2000).



**Slika 5.** Osmolalnost otopine NDF-a (D), disperzije mikrosfera (MS), otopine NDF-a i laktoze (D+L), disperzije mikrosfera i laktoze u masenom omjeru 1:9 (MS:L 1:9), otopine NDF-a i manitola (D+M) te disperzije mikrosfera i manitola u masenom omjeru 1:9 (MS:M 1:9). Maseni omjer NDF-a i inertnog nosača u otopini jednak je masenom omjeru NDF-a i inertnog nosača u disperziji smjese mikrosfera s inertnim nosačem. Svi sustavi pripremljeni su u pročišćenoj vodi pri tri koncentracije NDF-a (0,2, 0,8 i 2,4 mg/ml; slijeva na desno) te su prije mjerenja pomiješani s HBSS-Ca<sup>2+</sup> u volumnom omjeru 1:1. Prikazana je srednja vrijednost ± SD (n=2).

#### 4.4. *In vitro* biokompatibilnost praškastih sustava

*In vitro* ispitivanje biokompatibilnosti jeftin je i brz probir terapijskih sustava prema standardiziranim protokolima uz dobivanje reproducibilnih rezultata prije pretkliničkih

testiranja na životinjama i primjene u ljudi. Osim gotove formulacije, nužno je ispitati biokompatibilnost svih sastavnica budući da individualno mogu pokazivati toksičnost (Inayat-Hussain, Rajab i Siew, 2009). Testiranjem na staničnim modelima u ranijoj fazi razvoja novog terapijskog sustava smanjuje se mogućnost odbacivanja formulacije zbog problema sa sigurnosti u kasnijim fazama razvoja (Scherließ, 2011).

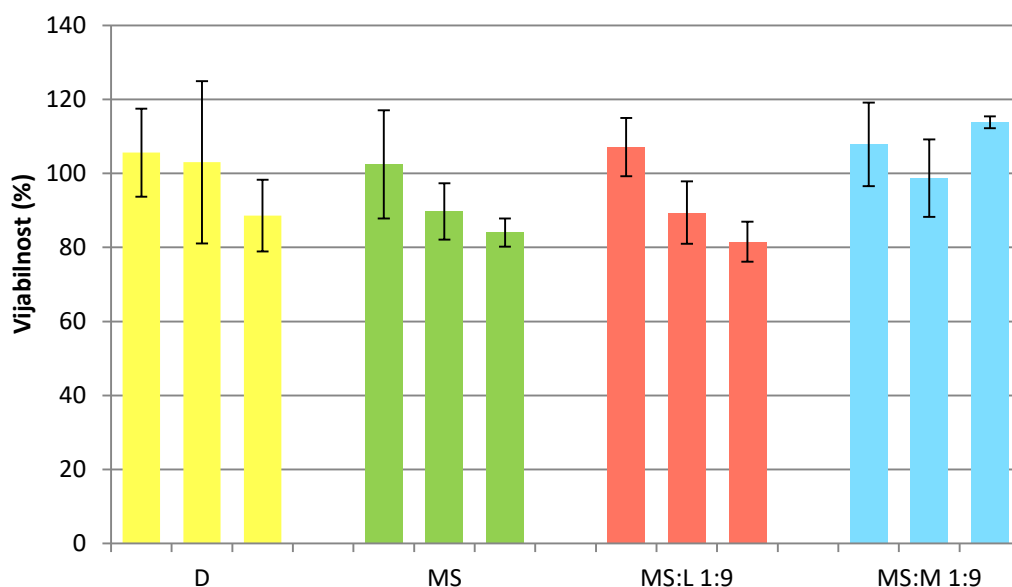
Stanični modeli koji se koriste u *in vitro* testiranjima biokompatibilnosti jednostavni su za uzgajanje, brzorastući i osjetljivi na toksičnu iritaciju. U ovom radu predstavljena su testiranja praškastih terapijskih sustava s NDF-om na Calu-3 stanicama adenokarcinoma pluća koje se koriste kao stanični model respiratornih epitelnih stanica (Scherließ, 2011). Prema ispitivanju Ihekwereme i suradnika (2014), Calu-3 stanični model primjeren je za ispitivanje akutnog toksičnog i iritabilnog učinka tvari na respiratornu sluznicu MTT testom. Prethodno je dokazana visoka osjetljivost MTT testa pri ispitivanju biokompatibilnosti na Calu-3 stanicama. Naime, katalitička aktivnost dehidrogenaza vrlo je osjetljiva na toksični utjecaj (Scherließ, 2011) stoga se MTT test smatra prikladnim za evaluaciju akutne toksičnosti na Calu-3 modelu.

Calu-3 stanice nasađene na ploču s 96 jažica izložene su dva sata disperzijama praškastih sustava s laktozom i manitolom, otopini NDF-a i disperziji samih mikrosfera razrijeđenima puferom HBSS-Ca<sup>2+</sup> u volumnom omjeru 1:1 do konačne koncentracije NDF-a od 0,1 do 1,2 mg/ml. Svi uzorci pomiješani su s prije nanošenja na stanice. Miješanjem sustava s puferom HBSS i dodanim Ca<sup>2+</sup> u odgovarajućoj koncentraciji simuliraju se *in vivo* uvjeti, odnosno potiče geliranje polimernih lanaca mikrosfera umrežavanjem kalcijevim ionima koji su prisutni u nosnom fluidu *in vivo*. Također, HBSS pufer sadrži optimalne soli za Calu-3 stanice te se pripremanjem sustava u puferima izbjegava utjecaj pH na staničnu varijabilnost. Korišteni pufer održava pH oko 7, što je optimalno za Calu-3 stanični model (Scherließ, 2011).

MTT testom ispitana je metabolička aktivnost stanica izloženih ispitivanim sustavima, a vijabilnost stanica izražena je kao relativna metabolička aktivnost u odnosu na stanice tretirane puferom HBSS-Ca<sup>2+</sup>. Vijabilnost tretiranih stanica određena u odnosu na negativnu kontrolu nalazi se u rasponu u od  $81,5 \pm 5,4 \%$  do  $113,8 \pm 1,6 \%$  (Slika 6.).

Veliki utjecaj na aktivnost stanica ima osmolalnost medija u kojem se nalaze. Optimalna osmolalnost za Calu-3 stanični sustav iznosi 290-390 mOsm/kg. Uzorci najviših koncentracija

i osmolalnosti veće od 390 mOsm/kg nisu uzrokovali smanjenje vijabilnosti stanica, što je u skladu s literaturnim podacima (Matilainen i sur., 2008; Nilsson i sur., 2007). Granične vrijednosti vijabilnosti stanica opažene su pri najmanjim koncentracijama NDF-a i mikrosfera što se može povezati s niskom osmolalnošću pripremljenih uzoraka. U hipoosmotskom mediju voda ulazi u stanice, one bubre te pucaju što se opaža kao smanjenje vijabilnosti stanica.



**Slika 6.** Vijabilnost Calu-3 stanica tretiranih otopinom NDF-a (D), disperzijom mikrosfera s uklopljenim desametazonom (MS), te disperzijom praškastih sustava mikrosfera s laktozom (MS:L 1:9) i manitolom (MS:M 1:9). Maseni omjer mikrosfera i manitola ili laktoze u praškastim sustavima iznosio je 1:9. Svi uzorci pripremljeni su u pročišćenoj vodi te pomiješani s puferom HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  u volumnom omjeru 1:1 do konačne koncentracije NDF-a od 0,1, 0,4 i 1,2 mg/ml. Vijabilnost stanica ispitivana je MTT testom te je izražena u postotku u odnosu na vijabilnost stanica tretiranih puferom HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ . Prikazana je srednja vrijednost vijabilnosti svakog uzorka u tri koncentracije (od veće do manje)  $\pm$  SD ( $n \geq 4$ ).

Vijabilnost svih uzorcima tretiranih stanica bila je iznad 80 % u usporedbi s kontrolom. Rezultati ukazuju na optimalna svojstva biokompatibilnosti pomoćnih tvari u ispitivanim koncentracijama što je u skladu s literaturnim podacima (Scherließ, 2011). Treba uzeti u obzir da je Calu-3 stanični model monokultura stanica koja ne može u potpunosti oponašati epitel. Kako bi se točnije simulirali uvjeti *in vivo* moguća su testiranja na ko-kulturi s makrofagima i dendritima koji bi mogli drugačije reagirati na ispitivane sustave/tvari (Scherließ, 2011).

Ispitivanja biokompatibilnosti mogu se smatrati i osnovom za provođenje ispitivanja permeabilnosti budući da su barijerna svojstva staničnog monosloja izravno povezana s metaboličkom aktivnosti stanica. Utvrđivanjem netoksičnih uvjeta primarnim testovima biokompatibilnosti isključuje se utjecaj vijabilnosti stanica na permeaciju lijeka.

#### **4.5. *In vitro* permeabilnost NDF-a iz praškastih sustava**

Primjenom praškastih sustava na nazalnu sluznicu lijek se otapa u maloj količini nazalnog fluida te je efektivna koncentracija lijeka na mjestu apsorpcije značajno veća nego, primjerice, kod oralne primjene gdje se lijek otapa u puno većem volumenu (tekućini s kojom je uzet kao i fluidima probavnog sustava). Zbog toga nazalna apsorpcija može biti brza i opsežna, ukoliko je ne ograničava permeabilnost lijeka kroz nazalni epitel (Tanaka i sur., 2017). Osnovna funkcija čvrstih spojeva je regulacija paracelularne permeacije tvari kroz epitelnu barijeru (Högman, Mörk i Roomans, 2002). Paracelularni prijenos preko epitela bitan je za hidrofilne molekule koje se ne mogu prenositi nosačima (Inokuchi i sur., 2009).

Mogućnost nazalne primjene NDF-a u obliku praškastih sustava procijenjena je ispitivanjem permeabilnosti NDF-a kroz Calu-3 stanični model nazalnog epitela. Calu-3 stanice mogu se uzgojiti na granici „zrak-medij“ (ALI uvjeti) kao konfluentan polarizirani sloj s jednoličnim slojem mukusa i čvrstim vezama koje funkcionalno odgovaraju stanicama nazalnog epitela (Sinani i sur., 2017). Tako uzgojeni Calu-3 stanični monosloj ima najbližnju morfologiju i svojstva nazalnom epitelu, a ispitivanja permeabilnosti kroz Calu-3 stanični model mogu biti pokazatelj permeacije lijeka *in vivo* te dobiveni rezultati služe kao relevantan probir za daljnje istraživanje (Inoue i sur., 2020; Sousa i Castro, 2016). Uz navedeno, Calu-3 stanična linija pokazala se jednostavnom za uzgoj, genetski homogenom, reproducibilnom te može biti podvrgnuta velikom broju dijeljenja (engl. *passage number*) (Sibinovska i sur., 2020; Nižić Nodilo i sur., 2021). Sibinovska i sur. (2020) utvrdili su prikladnost Calu-3 staničnog monosloja uzgojenog pri ALI uvjetima za ispitivanje nazalne permeabilnosti lijekova te ustanovili dobru korelaciju s drugim modelima nazalnog epitela (stanična linija RPMI 2650) (Sibinovska i sur., 2022.), kao i staničnim modelom intestinalne permeabilnosti Caco-2 (Inokuchi i sur., 2009).

U ovom radu ispitana je permeabilnost NDF-a iz pripremljenih praškastih sustava mikrosfera i inertnih nosača kroz Calu-3 stanični monosloj nakon nanošenja u obliku vodene disperzije na

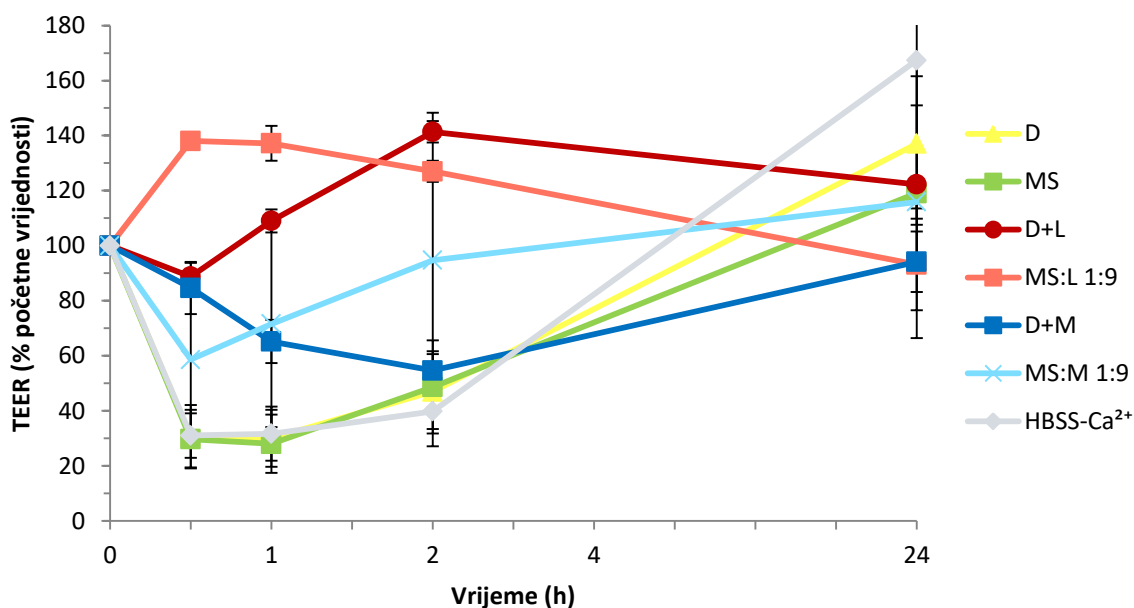
apikalnu stranu Transwell<sup>®</sup> sustava. Također su ispitane i vodene disperzije samih mikrosfera, te otopine NDF-a i smjese NDF-a s nosačima kako bi se proučio utjecaj svake komponente na čvrste veze staničnog monosloja, kao i međusobni utjecaj komponenti na permeabilnost kroz Calu-3 stanični monosloj. Otopine/disperzije su pripravljene u pročišćenoj vodi te pomiješane s puferom HBSS-Ca<sup>2+</sup> u volumnom omjeru 1:1 do konačne koncentracije koja odgovara 0,4 mg/ml NDF-a. Tako pripremljeni uzorci nanoseni su u donorski odjeljak sustava, dok je u receptorski odjeljak nanesen HBSS-Ca<sup>2+</sup> pufer.

### *TEER vrijednost*

Ispitivanje permeabilnosti lijeka kroz stanični monosloj provodi se nakon dostizanja potpune konfluentnosti monosloja na Transwell<sup>®</sup> membranama. Ustaljena TEER vrijednost dostiže se kad su čvrsti međustanični spojevi potpuno razvijeni, odnosno proteini spoja potpuno ekspimirani. Mjerenje TEER vrijednosti služi kao vrlo osjetljivi marker integriteta monosloja stanica (Scherließ, 2011). Povećanje TEER vrijednosti ukazuje na stvaranje funkcionalnih čvrstih veza i očuvanje stanične barijere (Jeong i sur., 2019), a pad se opaža prilikom prekida sloja (Sousa i Castro, 2016). Ovisno o opsegu, prekid može biti reverzibilan ili ireverzibilan te može rezultirati povećanjem prolaska lijeka u receptorski odjeljak (Sivadas i sur., 2008).

TEER vrijednosti staničnog monosloja mjerene su neposredno prije samog ispitivanja permeabilnosti, kao i 30, 70 i 120 min i 24 sata nakon početka ispitivanja kako bi se pratile moguće promjene integriteta staničnog monosloja uzrokovane izlaganjem uzorcima. Izmjerene su TEER vrijednosti monoslojeva na membranama u rasponu od  $120,0 \pm 12,8$  do  $898,2 \pm 146,4 \Omega\text{cm}^2$  (Slika 7.).

U ovom radu ispitivana je permeabilnost NDF-a iz hipoosmotske otopine (162 mOsm/kg) pri čemu se TEER vrijednost staničnog monosloja smanjila za 70 % u odnosu na početnu. Sličan pad TEER vrijednosti nakon izlaganja hipoosmotskim otopinama uočen je i u radu Nižić Nodilo i sur. (2021) kao i u ispitivanju na Caco-2 staničnom monosloju (Noach i sur., 1994). Posljedica je to ulaska vode iz medija u stanice što može rezultirati staničnom smrću pri čemu dolazi do prekida integriteta staničnog monosloja (Noach i sur., 1994). Kod disperzije mikrosfera s uklopljenim NDF-om opaža se isti učinak što je očekivano s obzirom na izmjerenu osmolalnost ( $160,0 \pm 2,8$  mOsm/kg). Osjetan pad TEER vrijednosti uočava se i kod kontrolnih stanica izloženih samo hipoosmolalnom puferu HBSS-Ca<sup>2+</sup>.



**Slika 7.** TEER vrijednosti Calu-3 staničnog monosloja tijekom ispitivanja permeabilnosti NDF-a iz uzoraka izražene kao postotak u odnosu na TEER vrijednost Calu-3 staničnog monosloja prije ispitivanja permeabilnosti. Otopine NDF-a (D) i smjese NDF-a i laktoze (D+L), kao i disperzije mikrosfera s uklopljenim NDF-om (MS) i smjese mikrosfera s manitolom (MS:M 1:9) i laktozom (MS:L 1:9) pripravljene su u pročišćenoj vodi i razjeđene puferom HBSS- Ca<sup>2+</sup> u volumnom omjeru 1:1 do konačne koncentracije NDF-a od 0,4 mg/ml. Maseni omjer mikrosfera i manitola ili laktoze u praškastim sustavima iznosio je 1:9. Maseni omjer NDF-a i inertnog nosača u otopini jednak je masenom omjeru NDF-a i inertnog nosača u disperziji smjese mikrosfera s inertnim nosačem. Stanice izložene puferu HBSS- Ca<sup>2+</sup> služile su kao kontrola. Prikazana je srednja vrijednost ± SD (n=3).

Pad TEER vrijednosti prilikom izlaganja stanica disperziji praškaste smjese mikrosfera i manitola može se objasniti suprotnim mehanizmom. Otopina NDF-a i manitola te disperzija smjese mikrosfera s manitolom hiperosmotske su za Calu-3 sustav zbog čega voda izlazi iz stanica te se one smežuraju što narušava integritet monosloja. Takav učinak manitola na stanice opisan je u prethodnim istraživanjima na drugim staničnim i *in vivo* modelima (Högman, Mörk i Roomans, 2002; Horvát i sur., 2009). S obzirom da se vijabilnost stanica ne smanjuje, učinak manitola može biti posljedica izravnog djelovanja na čvrste veze. U vremenu od 24 sata nakon početka eksperimenta TEER vrijednosti svih uzoraka vraćaju se na



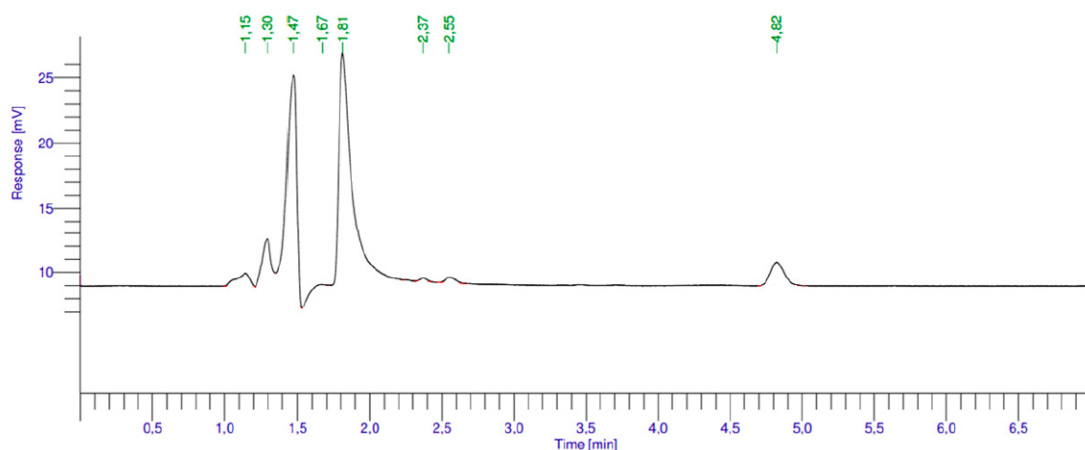
početne zbog čega se može zaključiti da je djelovanje testiranih uzoraka na stanice privremeno te da njihovim uklanjanjem dolazi do oporavka stanica i integriteta monosloja.

Kod monosloja stanica tretiranih praškastom smjesom mikrosfera i laktoze kao inertnog nosača (1:9 *m/m*) uočeno je povećanje TEER vrijednosti što ne odgovara postavljenim zahtjevima za razvijani praškasti sustav. Budući da je manitol pokazao bolja svojstva kao nosač mikrosfera s uklopljenim NDF-om (Nižić Nodilo i sur., 2021), praškasti sustavi s manitolom odabrani su za daljnja ispitivanja.

### *Analiza sadržaja NDF-a*

Uspješnost prolaska NDF-a kroz Calu-3 stanični monosloj određena je analizom sadržaja NDF-a u receptorskom odjeljku Transwell<sup>®</sup> sustava tijekom dva sata. Receptorski medij je uzorkovan u određenim vremenskim intervalima uz vraćanje iste količine svježeg medija (pufera HBSS-Ca<sup>2+</sup>) u bazolateralni odjeljak sustava.

Sadržaj NDF-a u uzorcima određen je HPLC metodom koja se temelji na odjeljivanju sastojaka u smjesi injektiranoj u uređaj pri protoku mobilne tekuće faze kroz kolonu (stacionarnu fazu) pod visokim tlakom. Do odvajanja dolazi zbog različitih brzina putovanja sastavnica ovisno o afinitetu prema stacionarnoj/mobilnoj fazi (Gupta i sur., 2012).



**Slika 8.** Kromatogram uzorka receptorskog medija pri 241 nm prikupljenog tijekom ispitivanja permeabilnosti NDF-a iz disperzije smjese mikrosfera s inertnim nosačem preko Calu-3 staničnog monosloja. Pik koji je zabilježen nakon 1,81 minute odgovara NDF-u (Nižić Nodilo i sur., 2021).

Koncentracija NDF-a u uzorcima iz receptorskog medija izračunata je iz površine odgovarajućih pikova kromatograma pri 241 nm (Slika 8.) koristeći prethodno određeni baždarni pravac izračunat iz odnosa izmjerene površine pika i pripadajuće koncentracije standardne otopine NDF-a (Nižić Nodilo i sur., 2021).

### *Prividni koeficijent permeabilnosti*

Uklapanjem lijeka u polimerne mikrosfere moguće je osigurati dulje zadržavanje formulacije na sluznici nosa te kontrolirano oslobađanje i apsorpciju lijeka u odnosu na konvencionalne tekuće oblike (Jurišić Dukovski i sur., 2017). Pozitivan učinak mukoadhezivnih tvari na apsorpciju najvećim dijelom vezan je uz produljenje zadržavanja formulacije na mjestu primjene zbog povećanja viskoznosti, a time i otpora mukocilijarnom klirensu (Trenkel i Scherließ, 2021). Anionski polimeri također vežu kalcijeve ione iz nazalnog fluida što slabi čvrste veze između epitelnih stanica i olakšava permeaciju tvari, a isto tako slabi i kretanje cilija koje ovisi o koncentraciji kalcija što posljedično smanjuje klirens (Fasiolo i sur., 2018). Iako bi usporavanje kretanja cilija imao veliki učinak na klirens *in vivo*, isto se ne može dokazati na Calu-3 statičnom modelu nazalnih stanica.

Koncentracija NDF-a u vodenim otopinama/disperzijama nakon razrjeđenja HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  puferom u volumnom omjeru 1:1 bila je 0,4 mg/ml. Izračunata  $P_{\text{app}}$  vrijednost za NDF iz otopine (Uzorak D) iznosi  $2,05 \times 10^{-6}$  cm/s što ga svrstava u lijekove srednje permeabilnosti ( $0,2 \times 10^{-6}$  do  $0,6 \times 10^{-6}$  cm/s) prema Sibinovska i sur. (2020). Smatra se da NDF prolazi nazalnu barijeru paracelularnim putem što je vidljivo i u ovom radu budući da dolazi do višestrukog povećanja  $P_{\text{app}}$  vrijednosti NDF-a prilikom izlaganja monosloja hipoosmotskim uvjetima koji dovode do značajnog smanjenja TEER vrijednosti (Tablica 5.).

Sličan učinak opisan je u radu Noach i sur. (1994) na Caco-2 staničnom modelu gdje je nakon primjene hipoosmolalnih otopina došlo do pada TEER vrijednosti (do  $29,2 \pm 3,4$  % inicijalnih vrijednosti) i znatnog povećanja paracelularnog transporta hidrofилnih tvari (natrijev fluorescein i dekstran obilježen fluorescein-izotiocijanatom). Navedeni rezultati slažu se s radom Nižić Nodilo i sur. (2021), gdje dobivena vrijednost  $P_{\text{app}}$  iz otopine koncentracije 0,9 mg/ml preko Calu-3 staničnog monosloja ( $3,43 \times 10^{-6}$  cm/s) također svrstava NDF u lijekove srednje permeabilnosti. U radu je isto tako opisan pad TEER vrijednosti ( $29,2 \pm 3,4$  %

početnih vrijednosti) nakon primjene hipoosmolalnih otopina i posljedično povećanje paracelularne permeabilnosti NDF-a.

**Tablica 5.** Sumarni prikaz  $P_{app}$  vrijednosti NDF-a za sve uzorke uz njihovu osmolalnost te pad TEER vrijednosti Calu-3 staničnog monosloja tijekom ispitivanja permeabilnosti.

Uzorak	$P_{app}$ * ( $10^{-6}$ cm/s)	Faktor atenuacije u usporedbi s D	Osmolalnost * u $H_2O:HBSS-Ca^{2+}$ 1:1 (mOsm/kg)	TEER % * početne vrijednosti nakon 30 i 120 minuta
D	$2,05 \pm 0,19$		$162,0 \pm 1,4$	$31 \pm 11 - 47 \pm 14$
MS	$1,75 \pm 0,10$	0,85	$160,0 \pm 2,8$	$30 \pm 11 - 49 \pm 17$
D+M	$0,34 \pm 0,04$	0,17	$515,0 \pm 3,5$	$85 \pm 10 - 55 \pm 7$
MS:M 1:9	$1,18 \pm 0,06$	0,58	$429,0 \pm 0,0$	$59 \pm 29 - 95 \pm 38$

$P_{app}$  – prividni koeficijent permeabilnosti; TEER – transepitelni električni otpor

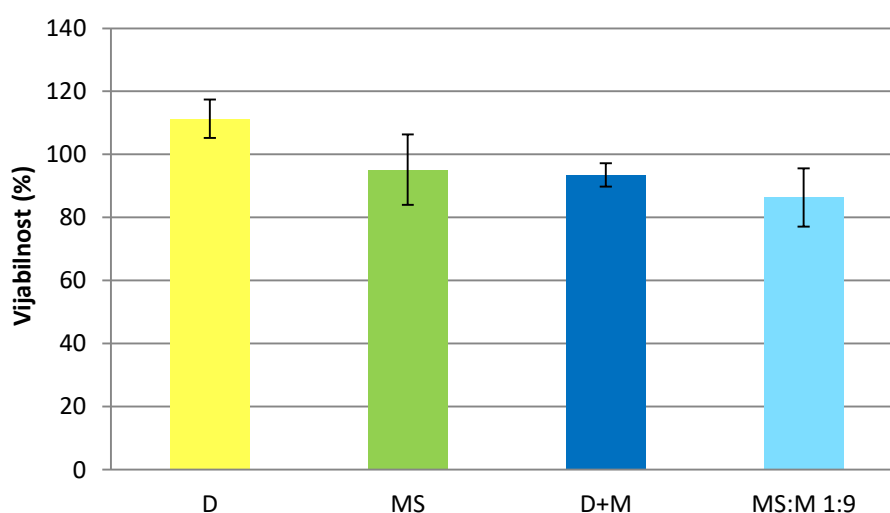
\*Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=3).

Osmolalnost disperzije smjese mikrosfera s manitolom (Uzorak MS:M 1:9) i otopine NDF-a i manitola (Uzorak D+M) nešto je veća od izoosmotskih vrijednosti za Calu-3 staničnu liniju, ali se i dalje smatra sigurnom za korištenje (Bitter i sur.; 2011). Dobivene vrijednosti  $P_{app}$  NDF-a iz otopine s manitolom odgovara vrijednostima za izoosmotsku otopinu NDF-a u HBSS- $Ca^{2+}$  od  $0,38 \times 10^{-6}$  cm/s (Nižić Nodilo i sur., 2021). Vrijednosti  $P_{app}$  3,4 puta su veće za smjesu s NDF-om uklopljenim u mikrosfere u odnosu na smjesu slobodnog NDF-a i manitola, što dokazuje potencijal mikrosfera da povećaju apsorpciju lijeka.

Rezultati odgovaraju radu Nižić Nodilo i sur. (2021) gdje je  $P_{app}$  NDF-a iz mikrosfera građenih od pektina i hipromeloze u smjesi s manitolom (maseni omjer 1:19) iznosio  $0,65 \times 10^{-6}$  cm/s te je praćen padom TEER Calu-3 staničnog monosloja na  $63 \pm 2$  % inicijalnih vrijednosti. S obzirom na dobivene rezultate utjecaja pripremljenog sustava na permeabilnost NDF-a i mukoadhezivno djelovanje polimera (nije moguće dokazati na ovom modelu), povećanje apsorpcije NDF-a preko nazalnog epitela može se očekivati i *in vivo*.

### Vijabilnost stanica

Nakon ispitivanja permeabilnosti, određena je vijabilnost Calu-3 stanica u korištenim monoslojevima s ciljem vrednovanja utjecaja ispitivanih sustava na njihovu aktivnost (Slika 9.). S obzirom da je vijabilnost stanica u odnosu na kontrolne stanice izložene samo puferu HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  veća od 80 % kod svih ispitivanih uzoraka, zaključeno je da su praškasti sustavi s NDF-om biokompatibilni s Calu-3 staničnim modelom. Navedeno potvrđuju i rezultati ispitivanja biokompatibilnosti opisani u odjeljku 4.4. kao i povratak TEER vrijednosti na početne 24 sata nakon ispitivanja permeabilnosti. Utjecaj pripremljenih sustava na integritet staničnog sloja prolazan je i reverzibilan.



**Slika 9.** Vijabilnost Calu-3 stanica određena MTT testom nakon provedenog ispitivanja permeabilnosti NDF-a iz otopine NDF-a (D) i smjese mikrosfera i manitola (D+M) te disperzija mikrosfera (MS) i njihove smjese s manitolom (MS:M 1:9). Maseni omjer mikrosfera i manitola ili laktoze u praškastim sustavima iznosio je 1:9. Maseni omjer NDF-a i inertnog nosača u otopini jednak je masenom omjeru NDF-a i inertnog nosača u disperziji smjese mikrosfera s inertnim nosačem. Prikazana je vijabilnost stanica kao srednja vrijednost relativne metaboličke aktivnosti tretiranih stanica u odnosu na aktivnost stanica izloženih samo puferu HBSS- $\text{Ca}^{2+} \pm \text{SD}$  (n=9).

## 5. Zaključci

- Uspješno su pripravljene mikrosfere metodom sušenja raspršivanjem vodene otopine koja sadrži 0,2 % natrijevog deksametazon fosfata (NDF-a), pektina i hipromeloze (maseni omjer sastavnica 1:1:1). Sadržaj NDF-a određen u suhom praškastom produktu iznosio je  $31,6 \pm 1,5$  %.
- Pripravljene su praškasti sustavi miješanjem mikrosfera s uklopljenim NDF-om s inertnim nosačima manitolom i laktozom u masenom omjeru 1:9 uz zadovoljavajuće parametre homogenosti.
- Disperzije praškastih sustava u smjesi pročišćene vode i HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  (1:1, V/V) u ispitivanim koncentracijama NDF-a (0,1-1,2 mg/ml) ogovarajuće su osmolalnosti za Calu-3 stanični model nazalnog epitela.
- Razvijeni praškasti sustavi mikrosfera s uklopljenim NDF-om i manitolom ili laktozom kao inertnim nosačem biokompatibilni su s Calu-3 modelnim stanicama respiratornog epitela. Vijabilnost stanica nakon dvosatnog izlaganja ispitivanim sustavima bila je u rasponu od  $81,5 \pm 5,4$  % do  $113,8 \pm 1,6$  %.
- Budući da je manitol pokazao bolja svojstva kao nosač mikrosfera s uklopljenim NDF-om u odnosu na laktozu, praškasti sustavi s manitolom odabrani su za daljnja ispitivanja.
- Za sustave s manitolom zabilježeno je reverzibilno smanjenje transepitelnog električnog otpora (TEER) staničnog monosloja tijekom ispitivanja permeabilnosti.
- Prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{\text{app}}$ ) NDF-a uklopljenog u mikrosfere preko Calu-3 staničnog monosloja iz praškastog sustava s manitolom iznosio je  $1,18 \pm 0,06 \times 10^{-6}$  cm/s što predstavlja povećanje od 3,4 puta u odnosu na  $P_{\text{app}}$  NDF-a iz otopine.
- Pripravljene praškasti sustav mikrosfera s uklopljenim NDF-om i manitolom kao inertnim nosačem pokazao je potencijal za nazalnu primjenu prema utvrđenoj biokompatibilnosti i permeabilnosti lijeka *in vitro*.

## 6. Popis kratica, oznaka i simbola

A	apsorbancija otopine
$A_{(\text{izopropanol})}$	apsorbancija čistog izopropanola
$A_{(\text{kontrola})}$	apsorbancija otopine kristala formazana nastalog u stanicama izloženim puferu HBSS- $\text{Ca}^{2+}$
$A_{(\text{uzorak})}$	apsorbancija otopine kristala formazana nastalog u stanicama tretiranim uzorkom
ALI	uzgoj stanica na granici „medij – zrak“ (engl. <i>air-liquid interface</i> )
ATP	adenozin 3-fosfat
BSA	svinjski serumski albumin
C	koncentracija tvari u otopini
$C_0$	inicijalna koncentracija lijeka u donorskom odjeljku ( $\mu\text{g/ml}$ )
CFDA-AM	5-karboksifluorescein diacetat, acetoksimetil ester
CH	kitozan hidrog glutamat
CMC-Na	natrijeva karboksimetilceluloza
CVS	bojanje kristalno ljubičastom (engl. <i>crystal violet staining</i> )
D	otopina natrijeva deksametazon fosfata
D+L	otopina fizičke smjese natrijeva deksametazon fosfata i laktoze
D+M	otopina fizičke smjese natrijeva deksametazon fosfata i manitola
DCF	diklorofluorescein
DCFH-DA	2,7-diklorofluorescein diacetat
DL	sadržaj lijeka u mikrosferama (engl. <i>drug loading</i> )
DMEM	Dulbeccov modificirani Eaglov medij (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DPPC	dipalmitoilfosfatidilkolin
$dQ/dt$	brzina permeacije lijeka kroz membranu ( $\mu\text{g/s}$ )
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EE	uspješnost uklapanja lijeka (engl. <i>entrapment efficiency</i> ) (%)
FBS	fetalni goveđi serum (engl. <i>fetal bovine serum</i> )
GF-AFC	glicilfenilalanil-aminofluorokumarin
GRAS	(engl. <i>Generally Recognized As Safe</i> )
GSH	glutation
HA	hijaluronan

HA-CL	poprečno povezana hijaluronska kiselina
HBSS-Ca <sup>2+</sup>	pufer balansirani Hankovim solima (engl. Hank's balanced salt solution) uz dodatak iona kalcija (pH 7,4)
HNE	humane nazalne epitelne (stanice)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HP-β-CD	hidroksipropil-β-ciklodekstrin
I	iskorištenje procesa
INT	2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolijev klorid
K	kontrola
LC <sub>50</sub>	koncentracija sustava pri kojoj je vijabilnost tretiranih stanica 50 % u odnosu na netretirane.
LDH	laktat dehidrogenaza
LLC	uzgoj stanica potpuno uronjenih u tekućinu (engl. liquid-liquid culture)
log P	koeficijent razdiobe između oktanola i vode
m/m	maseni udio
m/V	omjer mase tvari i volumena tekućine
MDA	malondialdehid
MS	disperzija mikrosfera s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom
MS:L 1:9	disperzija smjese mikrosfera s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom i laktozom u masenom omjeru 1:9
MS:M 1:9	disperzija smjese mikrosfera s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom i manitolom u masenom omjeru 1:9
MTS	5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiazol)-3-(4-sulfofenil) tetrazolin
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolin bromid
NADH/H <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid
NDF	Natrijev deksametazon fosfat
NR	neutralno crvena
P	površina permeacijske barijere
PAMPA	test propusnosti na umjetnim membranama (engl. <i>parallel artificial membrane permeability assay</i> )
P <sub>app</sub>	prividni koeficijent permeabilnosti (cm/s)
PbAE	poli(β-amino ester) polimer

PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatima (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> ) (pH 7,4)
PEG	polietilenglikol
<i>pH</i>	mjera kiselosti otopine; negativan dekadski logaritam množinske koncentracije vodikovih iona u otopini
<i>pK<sub>a</sub></i>	disocijacijska konstanta
PLGA	kopolimer laktatne i glikolne kiseline
<i>r</i> <sup>2</sup>	koeficijent determinacije
RDS	relativna standardna devijacija
ROS	kisikovi reaktivni spojevi (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
SAD	Sjedinjene Američke Države
SAP	natrijev askorbil fosfat
SD	standardna devijacija
SOD	superoksid dismutaza
SRB	sulforhodamin B
TEER	transepitelni električni otpor (engl. <i>transepithelial electrical resistance</i> )
<i>V/V</i>	volumni udio
WST-1	tetrazolijeva sol topljive u vodi (engl. <i>water-soluble tetrazolium salt</i> ); natrijev (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazolid)
WST-8	tetrazolijeva sol topljive u vodi (engl. <i>water-soluble tetrazolium salt</i> ); natrijev (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazolid
XTT	natrijev 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-karboksianilid-2H tetrazolin



## 7. Literatura

Ali MY, Tariq I, Sohail MF, Amin MU, Ali S, Pinnapireddy SR, Bakowsky U. Selective anti-ErbB3 aptamer modified sorafenib microparticles: *in vitro* and *in vivo* toxicity assessment. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 145, 42-53.

Aslantürk, ÖS. *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. U: Genotoxicity-A predictable risk to our actual world. Larramendy ML, Soloneski S, urednici, London, IntechOpen, 2018, str. 64-80.

Barišić A. Primjenjivost pektina i hipromeloze u pripravi mikrosfera u flutikazonpropionatom za nazalnu primjenu. 2019, Diplomski rad.

Bhise SB, Yadav AV, Avachat AM, Malayandi R. Bioavailability of intranasal drug delivery system. *Asian J Pharm*, 2014, 2, 201-215.

Bitter C, Suter-Zimmermann K, Surber C. Nasal drug delivery in humans. U: Topical Applications and the Mucosa. Surber C, Elsner P, Farage MA, urednici, Basel, Karger, 2011, str. 20-35.

Bobičanec S. Biofarmaceutska karakterizacija *in situ* gelirajućeg sustava s flutikazonpropionatom na Calu-3 epitelnom staničnom modelu. 2020, Diplomski rad

Bobičanec S, Kobaš M. Mikrosfere s deksametazonom u praškastom inertnom nosaču: karakterizacija farmaceutskog oblika i depozicija u silikonskom modelu nosne šupljine, rad za dodjelu rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu, 2020

Cabrera-Pérez MÁ, Sanz MB, Sanjuan VM, González-Álvarez M, Álvarez IG. Importance and applications of cell-and tissue-based *in vitro* models for drug permeability screening in early stages of drug development. U: Concepts and Models for Drug Permeability Studies. Surber C, Elsner P, Farage MA, urednici, Basel, Karger, 2016, str. 3-29.

Cell Culture Basics, [www.vanderbilt.edu](http://www.vanderbilt.edu), pristupljeno 3.9.2021.

Chan SY, Choo WS, Young DJ, Loh XJ. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydr Polym*, 2017, 161, 118–139.

Cho HJ, Balakrishnan P, Shim WS, Chung SJ, Shim CK, Kim DD. Characterization and in vitro evaluation of freeze-dried microparticles composed of granisetron–cyclodextrin complex and carboxymethylcellulose for intranasal delivery. *Int J Pharm*, 2010, 400, 59-65.

Dexamethasone, <https://www.drugbank.ca>, pristupljeno 2.9.2021.

Dexamethasone, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 2.9.2021.

Deksametazon, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 2.9.2021.

Fallacara A, Busato L, Pozzoli M, Ghadiri M, Ong HX, Young PM, Traini D. *In vitro* characterization of physico-chemical properties, cytotoxicity, bioactivity of urea-crosslinked hyaluronic acid and sodium ascorbyl phosphate nasal powder formulation. *Int J Pharm*, 2019, 558, 341-350.

Fasiolo LT, Manniello MD, Tratta E, Buttini F, Rossi A, Sonvico F, Colombo G. Opportunity and challenges of nasal powders: Drug formulation and delivery. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 113, 2-17.

Filipović-Grčić J, Hafner A. Nasal powder drug delivery. U: *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*, Gad SC, urednik, New York, John Wiley and Sons, 2010, str. 1-32.

Frost TS, Jiang L, Lynch RM, Zohar, Y. Permeability of epithelial/endothelial barriers in transwells and microfluidic bilayer devices. *Micromachines*, 2019, 10, 533.

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

GRAS list, <http://www.ecfr.gov>, pristupljeno 2.10.2021.

Gupta V, Jain ADK, Gill NS, Gupta K. Development and validation of HPLC method - a review. *Int Res J Pharm Appl Sci*, 2012, 2, 17–25.

Hafner A, Škrinjar D, Filipović-Grčić J. Mogućnosti primjene lijekova. *Farm Glas*, 2014, 70, 303-322.

Hemocytometer protocol – filling sheet, <http://www.hemocytometer.org>, pristupljeno 3.9.2021.

Horváth T, Bartos C, Bocsik A, Kiss L, Veszelka S, Deli MA, Ambrus R. Cytotoxicity of different excipients on RPMI 2650 human nasal epithelial cells. *Molecules*, 2016, 21, 658.

Högman M, Mörk AC, Roomans GM. Hypertonic saline increases tight junction permeability in airway epithelium. *Eur Respir J*, 2002, 20, 1444-1448.

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

Inayat-Hussain S, Rajab NF, Siew EL. *In vitro* testing of biomaterials toxicity and biocompatibility. U: Cellular Response to Biomaterials. Di Silvio L, urednik, Cambridge, Woodhead Publishing, 2009., str. 508-537.

Inokuchi H, Takei T, Aikawa K, Shimizu M. The effect of hyperosmosis on paracellular permeability in Caco-2 cell monolayers. *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 2009, 73, 328-334.

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

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

Jurišić Dukovski B, Mrak L, Winnicka K, Szekalska M, Juretić M, Filipović-Grčić J, Pepić I, Lovrić J, Hafner A. Spray-dried nanoparticle-loaded pectin microspheres for dexamethasone nasal delivery. *Drying Technol*, 2019, 37.

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

Karavasili C, Bouropoulos N, Sygellou L, Amanatiadou EP, Vizirianakis IS, Fatouros DG. PLGA/DPPC/trimethylchitosan spray-dried microparticles for the nasal delivery of ropinirole hydrochloride: *in vitro*, *ex vivo* and cytocompatibility assessment. *Mater Sci Eng*, 2016, 59, 1053-1062.

Koskela H, Di Sciascio MB, Anderson SD, Andersson M, Chan HK, Gadalla S, Katelaris C. Nasal hyperosmolar challenge with a dry powder of mannitol in patients with allergic rhinitis. Evidence for epithelial cell involvement. *Clin Exp Allergy*, 2000, 30, 1628-1636.

Lee HJ, Lee HG, Kwon YB, Kim JY, Rhee YS, Chon J, Park CW. The role of lactose carrier on the powder behavior and aerodynamic performance of bosentan microparticles for dry powder inhalation. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 117, 279-289.

Lim ST, Forbes B, Martin GP, Brown MB. *In vivo* and *in vitro* characterization of novel microparticulates based on hyaluronan and chitosan hydroglutamate. *AAPS PharmSciTech*, 2001, 2, 1-12.

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

Maury M, Murphy K, Kumar S, Shi L, Lee G. Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 59, 565-573.

Nilsson H, Dragomir A, Ahlander A, Ljungkvist M, Roomans GM. A modified technique for the impregnation of lanthanum tracer to study the integrity of tight junctions on cells grown on a permeable substrate. *Microsc Res Tech*, 2006, 69, 776-783.

Nilsson H, Dragomir A, Ahlander A, Johannesson M, Roomans GM. Effects of hyperosmotic stress on cultured airway epithelial cells. *J Cell Tissue Res*, 2007, 330, 257-269.

Nižić L, Potaš J, Winnicka K, Szekalska M, Erak I, Gretić M, Jug M, Hafner A. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 141, 105-115.

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

Noach AB, Sakai M, Blom-Roosemalen MC, De Jonge HR, de Boer AG, Breimer DD. Effect of anisotonic conditions on the transport of hydrophilic model compounds across monolayers of human colonic cell lines. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 270, 1373-1380.

Pačarić M. Mikrosfere temeljene na pektinu i hipromelozi za nazalnu primjenu natrijevog deksametazon fosfata. 2020, Diplomski rad

Pepić I, Lovrić J, Filipović-Grčić J. How do polymeric micelles cross epithelial barriers?. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 50, 42–55.

Pujara CP, Shao Z, Duncan MR, Mitra AK. Effects of formulation variables on nasal epithelial cell integrity: Biochemical evaluations. *Int J Pharm*, 1995, 114, 197-203.

Relova AJ, Roomans GM. Effect of luminal osmolarity on ion content of connective tissue in rat trachea after epithelial damage. *Eur Respir J*, 2001, 18, 810-816.

Salade L, Wauthoz N, Vermeersch M, Amighi K, Goole J. Chitosan-coated liposome dry-powder formulations loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 129, 257–266.

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

Sažetak opisa svojstava lijeka, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/pecfent-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/pecfent-epar-product-information_en.pdf), pristupljeno: 15.10.2021

Sažetak opisa svojstava lijeka, <https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Vivispray-SPC.pdf> pristupljeno: 15.10.2021.

Scherließ R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity *in vitro* on respiratory epithelial cells. *Int J Pharm*, 2011, 411, 98-105.

Schmidt MC, Peter H, Lang SR, Ditzinger G, Merkle HP. *In vitro* cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Adv Drug Delivery Rev*, 1998, 29, 51-79.

Sibinovska N, Žakelj S, Trontelj J, Kristan K. Applicability of RPMI 2650 and Calu-3 Cell Models for Evaluation of Nasal Formulations. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 369.

Sinani G, Sessevmez M, Gök K, Özgümüş S, Okyar A, Alpar HO, Cehver E. Nasal vaccination with poly( $\beta$ -amino ester)-poly(D,L-lactide-co-glycolide) hybrid nanoparticles. *Int J Pharm*, 2017, 529, 1–14.

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

Sousa F, Castro P. Cell-based *in vitro* models for nasal permeability studies. U: Concepts and Models for Drug Permeability Studies. Surber C, Elsner P, Farage MA, urednici, Basel, Karger, 2016. str. 83-100.

Tanaka A, Furubayashi T, Enomura Y, Hori T, Shimomura R, Maeda C, Yamamoto A. Nasal drug absorption from powder formulations: effect of fluid volume changes on the mucosal surface. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40, 212-219.

Trenkel M, Scherließ R. Nasal Powder Formulations: *In-vitro* characterisation of the impact of powders on nasal residence time and sensory effects. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 385.

Trows S, Scherließ R. Carrier based dry powder formulation for nasal delivery of vaccines utilizing BSA as model drug. *Powder Technol*, 2016, 292, 223-231.

Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, Davies DE. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med*, 2005, 201, 937-947.

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

Zhang H, Lin CW, Donovan MD. Correlation between nasal membrane permeability and nasal absorption rate. *AAPS PharmSciTech*, 2013, 14, 60-63.

## 8. Sažetak/Summary

Nazalna primjena lijekova istražuje se u svrhu izravne dostave u središnji živčani sustav. Razvijanjem novih praškastih terapijskih sustava poboljšava se efikasnost takve primjene. U ranoj fazi razvoja ispituju se biokompatibilnost i utjecaj sustava na permeabilnost lijeka na *in vitro* modelima.

Cilj rada bio je pripremiti praškaste sustave mikrosfera s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom (NDF-om) i inertnog nosača (laktoze i manitola) te odrediti osmolalnost disperzije sustava, kao i biokompatibilnost sustava te permeabilnost uklopljenog NDF-a korištenjem Calu-3 staničnog modela nazalnog epitela.

Metodom sušenja raspršivanjem uspješno su pripravljene mikrosfere građene od pektina i hipromeloze, sa sadržajem uklopljenog NDF-a od  $31,6 \pm 1,5$  %. Miješanjem mikrosfera s inertnim nosačem (laktozom i manitolom) u omjeru 1:9 (*m/m*) uspješno su pripravljene praškasti sustavi. Određena je osmolalnost disperzije sustava nakon suspendiranja u smjesi pročišćene vode i HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  (1:1, *V/V*). Vijabilnost Calu-3 staničnog modela nakon izlaganja ispitivanim sustavima bila je u rasponu od  $81,5 \pm 5,4$  % do  $113,8 \pm 1,6$  %. Manitol je pokazao bolja svojstva kao nosač u odnosu na laktozu. Za praškaste sustave s manitolom zabilježeno je reverzibilno smanjenje transepitelnog električnog otpora staničnog monosloja tijekom ispitivanja permeabilnosti te značajno veći prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{\text{app}}$ ) NDF-a kroz Calu-3 stanični monosloj u odnosu na  $P_{\text{app}}$  NDF-a iz otopine.

Zaključno, pripravljene praškasti sustav mikrosfera s uklopljenim NDF-om i manitolom kao inertnim nosačem pokazao je potencijal za nazalnu primjenu prema utvrđenoj biokompatibilnosti i permeabilnosti lijeka *in vitro*.



Nasal drug administration is being examined as a direct delivery path to the central nervous system. The development of new powder drug delivery systems improves the effectiveness of such applications. Biocompatibility and impact of system on drug permeability are evaluated early in the development using *in vitro* models.

The aim of this study was to prepare powder systems of microspheres with entrapped sodium dexamethasone phosphate (NDF) and inert carrier (lactose and mannitol), and to determine the osmolality of the dispersion of the systems, their biocompatibility and permeability of the incorporated NDF using a Calu-3 cell model of the nasal epithelium.

Microspheres made of pectin and hypromellose with a drug loading of  $31.6 \pm 1.5$  %, were successfully prepared by spray-drying. Powder systems were successfully prepared by mixing microspheres with lactose and mannitol in ratio of 1:9 (*w/w*). The osmolality of the dispersion of powder systems was determined after suspending in a mixture of purified water and HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  (1:1, *V/V*). Calu-3 cell viability after exposure to the systems ranged from  $81.5 \pm 5.4$  % to  $113.8 \pm 1.6$  %. Mannitol showed better properties as the carrier compared to lactose. For systems with mannitol, a reversible decrease in transepithelial electrical resistance of the cell monolayer and significantly higher apparent permeability coefficient ( $P_{\text{app}}$ ) of NDF across the Calu-3 monolayer in comparison to  $P_{\text{app}}$  of NDF in solution were observed.

In conclusion, prepared powder system composed of NDF loaded microspheres and mannitol showed potential for nasal administration considering determined *in vitro* biocompatibility and drug permeability.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### **IN VITRO KARAKTERIZACIJA NAZALNOG PRAŠKASTOG SUSTAVA S NATRIJEVIM DEKSAMETAZON FOSFATOM NA CALU-3 STANIČNOM MODELU RESPIRATORNOG EPITELA**

Iva Šimović

Nazalna primjena lijekova istražuje se u svrhu izravne dostave u središnji živčani sustav. Razvijanjem novih praškastih terapijskih sustava poboljšava se efikasnost takve primjene. U ranoj fazi razvoja ispituju se biokompatibilnost i utjecaj sustava na permeabilnost lijeka na *in vitro* modelima.

Cilj rada bio je pripremiti praškaste sustave mikrosfera s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom (NDF-om) i inertnog nosača (laktoze i manitola) te odrediti osmolalnost disperzije sustava, kao i biokompatibilnost sustava te permeabilnost uklopljenog NDF-a korištenjem Calu-3 staničnog modela nazalnog epitela.

Metodom sušenja raspršivanjem uspješno su pripravljene mikrosfere građene od pektina i hipromeloze, sa sadržajem uklopljenog NDF-a od  $31,6 \pm 1,5$  %. Miješanjem mikrosfera s inertnim nosačem (laktozom i manitolom) u omjeru 1:9 (*m/m*) uspješno su pripravljene praškasti sustavi. Određena je osmolalnost disperzije sustava nakon suspendiranja u smjesi pročišćene vode i HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  (1:1, *V/V*). Vijabilnost Calu-3 staničnog modela nakon izlaganja ispitivanim sustavima bila je u rasponu od  $81,5 \pm 5,4$  % do  $113,8 \pm 1,6$  %. Manitol je pokazao bolja svojstva kao nosač u odnosu na laktozu. Za praškaste sustave s manitolom zabilježeno je reverzibilno smanjenje transepitelnog električnog otpora staničnog monosloja tijekom ispitivanja permeabilnosti te značajno veći prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) NDF-a kroz Calu-3 stanični monosloj u odnosu na  $P_{app}$  NDF-a iz otopine.

Zaključno, pripravljene praškasti sustav mikrosfera s uklopljenim NDF-om i manitolom kao inertnim nosačem pokazao je potencijal za nazalnu primjenu prema utvrđenoj biokompatibilnosti i permeabilnosti lijeka *in vitro*.

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

Rad sadrži: 52 stranice, 9 grafičkih prikaza, 5 tablica i 63 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nazalna primjena, praškasti sustavi, natrijev deksametazon fosfat, Calu-3, biokompatibilnost, permeabilnost

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

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

**Dr.sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Bisera Jurišić Dukovski**, asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: ožujak 2022.

## Basic documentation card

Diploma thesis

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

### **IN VITRO CHARACTERISATION OF NASAL POWDER DELIVERY SYSTEM OF SODIUM DEXAMETHASONE PHOSPHATE USING CALU-3 RESPIRATORY EPITHELIAL CELL MODEL**

Iva Šimović

Nasal drug administration is being examined as a direct delivery path to the central nervous system. The development of new powder drug delivery systems improves the effectiveness of such applications. Biocompatibility and impact of system on drug permeability are evaluated early in the development using *in vitro* models.

The aim of this study was to prepare powder systems of microspheres with entrapped sodium dexamethasone phosphate (NDF) and inert carrier (lactose and mannitol), and to determine the osmolality of the dispersion of the systems, their biocompatibility and permeability of the incorporated NDF using a Calu-3 cell model of the nasal epithelium.

Microspheres made of pectin and hypromellose with a drug loading of  $31.6 \pm 1.5$  %, were successfully prepared by spray-drying. Powder systems were successfully prepared by mixing microspheres with lactose and mannitol in ratio of 1:9 (*w/w*). The osmolality of the dispersion of powder systems was determined after suspending in a mixture of purified water and HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  (1:1, *V/V*). Calu-3 cell viability after exposure to the systems ranged from  $81.5 \pm 5.4$  % to  $113.8 \pm 1.6$  %. Mannitol showed better properties as the carrier compared to lactose. For systems with mannitol, a reversible decrease in transepithelial electrical resistance of the cell monolayer and significantly higher apparent permeability coefficient ( $P_{\text{app}}$ ) of NDF across the Calu-3 monolayer in comparison to  $P_{\text{app}}$  of NDF in solution were observed.

In conclusion, prepared powder system composed of NDF loaded microspheres and mannitol showed potential for nasal administration considering determined *in vitro* biocompatibility and drug permeability.

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

Thesis includes: 52 pages, 9 figures, 5 tables and 63 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nasal delivery, powder systems, sodium dexamethasone phosphate, Calu-3, biocompatibility, permeability

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

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

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

**Bisera Jurišić Dukovski, Ph.D.** *Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2022.