

# In vitro ispitivanje nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom

---

**Topalović, Tamara**

**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:163:887580>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Tamara Topalović**

***In vitro* ispitivanje nazalne depozicije mikrosfera  
s donepezilom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, kolegiju Farmaceutika pod stručnim vodstvom prof. dr.sc. Anite Hafner. Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-4597.

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Aniti Hafner na pruženoj prlici, stručnom vodstvu, prenesenom znanju i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala i asistenticama Mirni Perkušić, mag. pharm. i Lauri Nižić Nodilo, mag. pharm. na prijateljskom pristupu i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.*

*Puno hvala i ostalim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju, posebno tehničkoj suradnici Vlatki Maričić na ljubaznosti i pomoći.*

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	Liječenje Alzheimerove bolesti.....	1
1.1.1.	Lijekovi koji djeluju na kolinergički sustav .....	1
1.1.2.	Donepezil.....	2
1.1.3.	Prepreke u dostavi lijeka u središnji živčani sustav .....	4
1.2.	Nazalna primjena lijeka.....	6
1.2.1.	Anatomija i fiziologija nosne šupljine.....	6
1.2.2.	Prednosti i nedostaci nazalne primjene lijeka .....	8
1.2.3.	Nazalna primjena lijeka s ciljem izravne isporuke u mozak .....	9
1.2.4.	Praškasti sustavi za nazalnu primjenu .....	15
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	18
3.	MATERIJALI I METODE .....	20
3.1.	Materijali .....	20
3.2.	Metode.....	20
3.2.1.	Priprava mikrosfera s donepezilom.....	20
3.2.2.	Određivanje uspješnosti uklapanja i sadržaja donepezila u mikrosferama ..	21
3.2.3.	Određivanje raspodjele veličina mikrosfera s donepezilom.....	21
3.2.4.	Ispitivanje reoloških svojstava mikrosfera s donepezilom.....	21
3.2.5.	Određivanje zeta potencijala mikrosfera s donepezilom.....	22
3.2.6.	Određivanje sadržaja ostatne vlage u mikrosferama s donepezilom.....	22
3.2.7.	Određivanje kuta raspršenja mikrosfera s donepezilom.....	23
3.2.8.	Određivanje profila nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom korištenjem 3D printanog modela nosne šupljine .....	23
3.2.9.	Kvantitativno određivanje donepezila.....	26
5.	REZULTATI I RASPRAVA .....	29
5.1.	Uspješnost uklapanja i sadržaj donepezila u mikrosferama.....	29
5.2.	Raspodjela veličina mikrosfera s donepezilom .....	29
5.3.	Reološka svojstva mikrosfera s donepezilom .....	30
5.4.	Zeta potencijal mikrosfera s donepezilom.....	31
5.5.	Sadržaj ostatne vlage u mikrosferama s donepezilom.....	31
5.6.	Kut raspršenja mikrosfera s donepezilom .....	31
5.7.	Profil nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom.....	32

7.	ZAKLJUČCI .....	36
8.	POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....	37
9.	LITERATURA .....	39
10.	SAŽETAK/SUMMARY .....	45

Temeljna dokumentacijska kartica/ Basic documentation card

## 1. UVOD

### 1.1. Liječenje Alzheimerove bolesti

Alzheimerova bolest (AB) je kronična i progresivna bolest središnjeg živčanog sustava s kompleksnim patološkim mehanizmima u podlozi. Progresivna kognitivna disfunkcija postupno dovodi do sve veće nesposobnosti za samostalan život te u konačnici rezultira smrću. AB uzrokuje oko 60-70% svih demencija. Oko 55 milijuna ljudi diljem svijeta živi s demencijom, a predviđa se da bi do 2050. godine broj oboljelih mogao porasti na 139 milijuna (Sood i sur., 2014; Gauthier i sur., 2021; [www.who.int](http://www.who.int)). Te brojke svrstavaju AB i druge demencije na 7. mjesto najčešćih uzroka smrti u svijetu i 9. mjesto u Hrvatskoj ([www.who.int](http://www.who.int)).

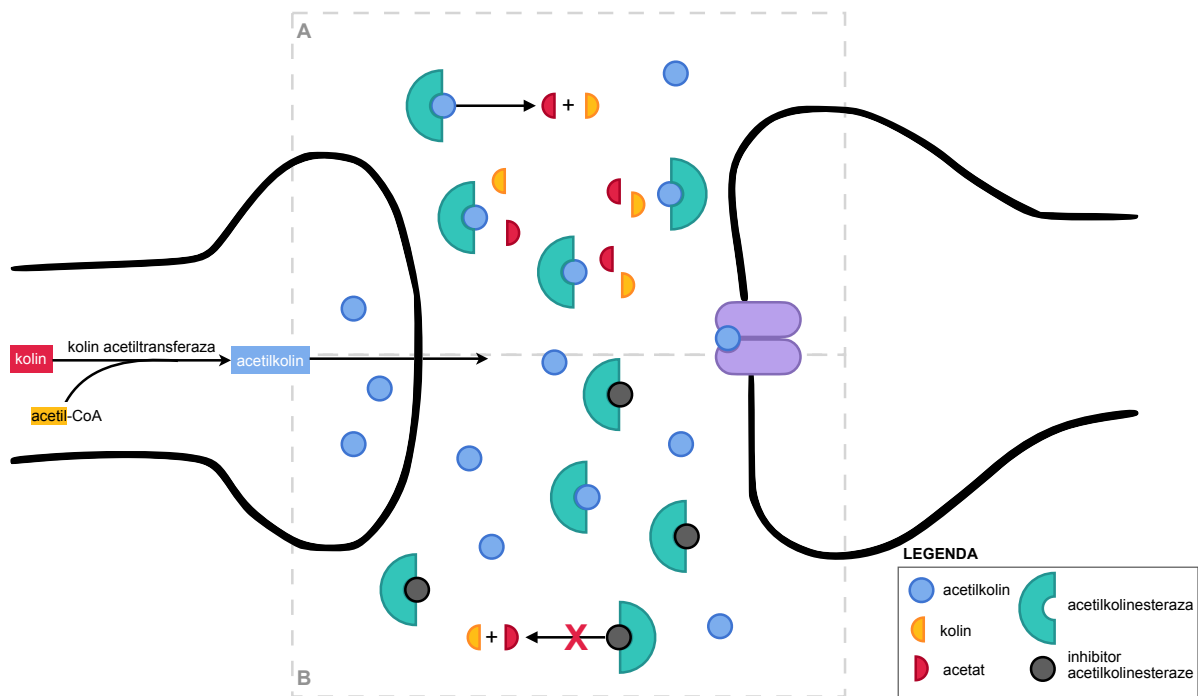
Mozak pacijenta s AB-om pokazuje nekoliko različitih neuropatoloških obilježja, uključujući pretjerano stvaranje i nakupljanje  $\beta$ -amiloidnih plakova i unutarstaničnih nakupina nepravilno fosforiliranog  $\tau$  proteina te degeneraciju kolinergičkih neurona u bazalnom dijelu prednjeg mozga (Auld i sur., 2002).

AB je vrlo teško liječiti zbog kasne dijagnostike, tj. započinjanja liječenja u već uznapredovanom stadiju bolesti, neučinkovite koncentracije lijeka u mozgu, poteškoća u primjeni lijeka i adherenciji bolesnika (Agrawal i sur., 2018; Espinoza i sur., 2019).

#### 1.1.1. Lijekovi koji djeluju na kolinergički sustav

Utvrđeno je da kolinergički deficit značajno pridonosi neuropsihijatrijskim manifestacijama AB-a poput kognitivnog deficita i nekognitivnih promjena u ponašanju. Propadanje kolinergičkih neurona u bazalnom dijelu prednjeg mozga smatra se jednim od najranijih patoloških događaja u AB-u s karakterističnim simptomima poput gubitka pamćenja i poremećaja u govoru (Auld i sur., 2002). Strukture bazalnog dijela prednjeg mozga (bazalni gangliji, Brocino područje i medijalna septalna jezgra) smatraju se glavnim mjestom proizvodnje acetilkolina koji se od tamo distribuira po cijelom mozgu. U AB-u se smanjuju aktivnosti kolin-acetiltransferaze, ponovni unos kolina, oslobađanje acetilkolina te afinitet vezanja acetilkolina za receptore (Auld i sur., 2002). Unatoč gubitku kolinergičkih neurona, postsinaptički kolinergički receptori ostaju relativno netaknuti pa je upotreba kolinomimetika (tvari koje povećavaju kolinergičku aktivnost) logično terapijsko rješenje (Shigeta i Homma, 2001).

Trenutno odobreni lijekovi za liječenje kognitivnih oštećenja u AB-u temelje se na modulaciji neurotransmitera ili enzima. Glavna skupina lijekova koji se koriste u liječenju AB-a su inhibitori acetilkolinesteraze. Djeluju na način da sprječavaju razgradnju acetilkolina u sinaptičkoj pukotini i tako osiguravaju veću raspoloživu koncentraciju acetilkolina te produljuju njegovo vrijeme poluživota u sinapsi (Slika 1.).

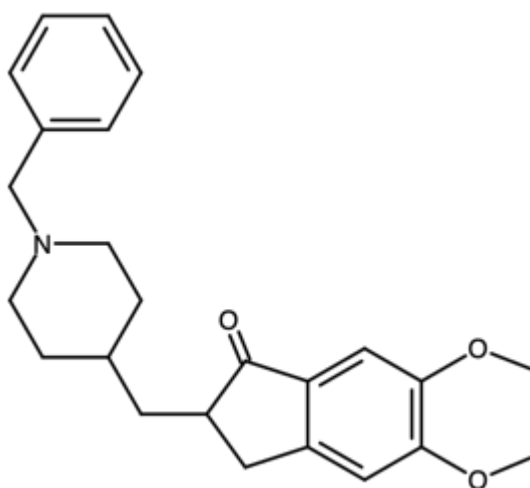


**Slika 1.** Sinteza i biotransformacija acetilkolina (A) i mehanizam djelovanja inhibitora acetilkolinesteraze (B). (CoA –koenzim A) Slika je izrađena po uzoru na ilustraciju iz rada Valles i sur. (2014).

Danas su odobrena tri lijeka pripadnika ove skupine: donepezil, galantamin i rivastigmin koji su dostupni uglavnom u oralnom obliku, osim rivastigmina koji dolazi i u obliku transdermalnog flastera ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

### 1.1.2. Donepezil

Donepezil (Slika 2.) je reverzibilni, nekompetitivni i selektivni inhibitor acetilkolinesteraze indiciran za simptomatsku terapiju blagog do umjerenog AB-a. Reverzibilno se veže na acetilkolinesterazu preko anionskog veznog mjesta na indolnom prstenu i na taj način smanjuje aktivnost enzima, povećava sadržaj acetilkolina u mozgu te poboljšava učinkovitost prijenosa živčanog signala i kognitivnu sposobnost pacijenta (Zhao i sur., 2021).



**Slika 2.** Kemijska struktura donepezila. Nacrtno pomoću programa Marvin JS, ChemAxon.

Osim pozitivnog učinka na prijenos živčanog signala, studije su pokazale da donepezil također može smanjiti nakupljanje  $\beta$  amiloidnih proteina u mozgu, prevenirati smanjeno vezanje za nikotinske receptore te smanjiti neurotoksičnost uzrokovanu glutamatom (Jacobson i Sabbagh, 2008; Čolović i sur., 2013). Donepezil je visoko selektivan za acetilkolinesterazu sa značajno nižim afinitetom za butirilkolinesterazu koja je pretežno prisutna na periferiji. Nije potrebna prilagodba doze kod starijih osoba te bolesnika sa zatajenjem bubrega i jetre (Shigeta i Homma., 2001; [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

U dugotrajnim ispitivanjima pokazalo se da je donepezil omogućio održavanje kognitivnih i globalnih funkcija, tj. usporio pogoršanje simptoma do godine dana i na taj način poboljšao kvalitetu života bolesnika i njihovih skrbnika (Shigeta i Homma, 2001).

Za razliku od svojih prethodnika, takrina i fizostigmina, koji su povučeni s tržišta zbog nuspojava i učestalog doziranja, donepezil se općenito dobro podnosi, a nuspojave koje se javljaju su kolinergičke prirode i povezane s gastrointestinalnim traktom. Uključuju proljev, mučninu, zatvor, abdominalne bolove, povraćanje, anoreksiju i nadutost (Shigeta i Homma, 2001; [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

Relativno dugo vrijeme poluživota donepezila (70-80 h) omogućuje doziranje jednom dnevno. Za usporedbu, rivastigmin i galantamin se moraju primjenjivati dva puta, a takrin četiri puta dnevno (Shigeta i Homma, 2001).

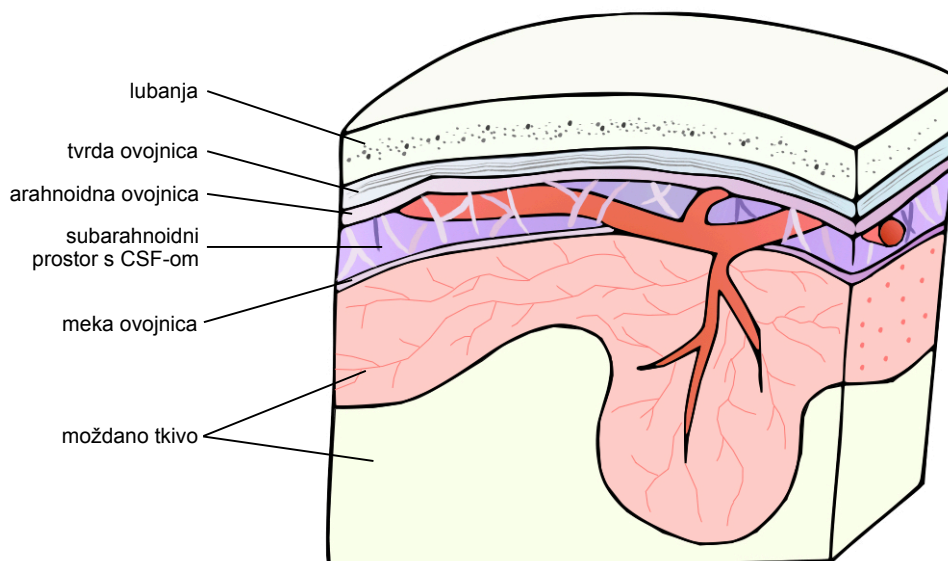
Moguće nove indikacije donepezila, osim AB-a, uključuju demenciju s Lewyjevim tjelešcima, ozljede mozga, hiperaktivnost s nedostatkom pažnje, multiplu sklerozu, Downov



sindrom, poremećaje raspoloženja, Huntingtonovu bolest, poremećaj govora kod djece s autizmom i poremećaje spavanja (Shigeta i Homma, 2001; Čolović i sur., 2013).

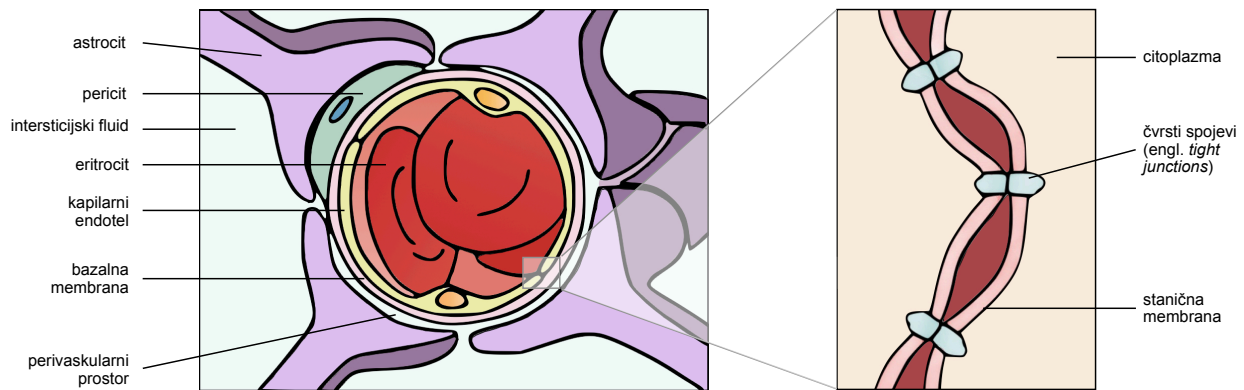
### 1.1.3. Prepreke u dostavi lijeka u središnji živčani sustav

Središnji živčani sustav (SŽS) je od oštećenja zaštićen pomoću lubanje koja okružuje mozak i kralježnice koja okružuje leđnu moždinu. Između lubanje i moždanog tkiva nalaze se tri zaštitne moždane ovojnice: tvrda ovojnica (lat. *dura mater*), arahnoidna ovojnica (lat. *arahnioidea mater*) i meka ovojnica (lat. *pia mater*). Prostor između arahnoidne i meke ovojnice naziva se subarahnoidni prostor i ispunjen je cerebrospinalnom tekućinom (engl. *cerebrospinal fluid*, CSF) (Illum, 2003). Postoje dvije fiziološke barijere koje odvajaju mozak od sistemske cirkulacije i na taj način kontroliraju ulazak i izlazak endogenih i egzogenih spojeva, održavajući homeostazu. Jedna od barijera je krvno moždana barijera (KMB), a druga barijera je između mozga i CSF-a (Scherrmann, 2002; Djupesland i sur., 2014) (Slika 3.).



**Slika 3.** Zaštitne strukture u središnjem živčanom sustavu. Slika je izrađena po uzoru na Djupesland i sur. (2014) i [www.msd-prirucnici.placebo.hr](http://www.msd-prirucnici.placebo.hr).

KMB je najvažnija barijera koja ometa transport lijeka iz sistemske cirkulacije u mozak. To je dinamička barijera jer je čini skupina stanica: endotelne stanice kapilara sljubljene čvrstim spojevima (tzv. *tight junctions*) i obavijene bazalnom membranom, koju okružuju periciti, astrociti i mikroglije s okolnim neuronima tvoreći složenu neurovaskularnu jedinicu (Slika 4.).



**Slika 4.** Građa krvno-moždane barijere. Slika je izrađena po uzoru na Djupesland i sur. (2014) i [www.rit.edu](http://www.rit.edu).

Iz tog razloga za mnoge bolesti središnjeg živčanog sustava i dalje ne postoje učinkovite terapije. Naime, iako su poznati patofiziološki mehanizmi bolesti te postoje lijekovi kandidati, te molekule ne mogu proći KMB ni druge specijalizirane barijere u SŽS-u u količini dovoljnoj za djelovanje na specifične terapijske mete (Chen i Liu, 2012; Agrawal i sur., 2018).

Osim nedovoljne koncentracije lijeka na mjestu djelovanja i posljedične smanjene učinkovitosti, problem je i u prevelikoj koncentraciji lijeka koji zaostaje na periferiji rezultirajući neželjenim nuspojavama (Djupesland i sur., 2014).

Koliko je KMB velika prepreka raspodjeli lijeka u mozak ilustrira činjenica da do 2019. godine nije postojao niti jedan biološki lijek odobren za liječenje bolesti SŽS-a koji prolazi kroz KMB bez narušavanja integriteta KMB-a. Unatoč brojnim kliničkim ispitivanjima, niti brojne nove male molekule ne uspijevaju prijeći KMB, štoviše samo je 1 % svih lijekova aktivno u SŽS-u. Stoga razvoj novih terapijskih sustava za isporuku lijeka u SŽS postaje jednako važan kao i otkrivanje novih lijekova za bolesti SŽS-a (Pardridge, 2016; Pardridge, 2020).

Razvijene su brojne invazivne strategije dostave terapijskih sredstava u SŽS zaobilazeći KMB poput intraparenhimske, intraventricularne i intratekalne isporuke (Illum, 2003). Injekcija lijeka u CSF je najrašireniji postupak isporuke lijeka u mozak koji zaobilazi KMB.

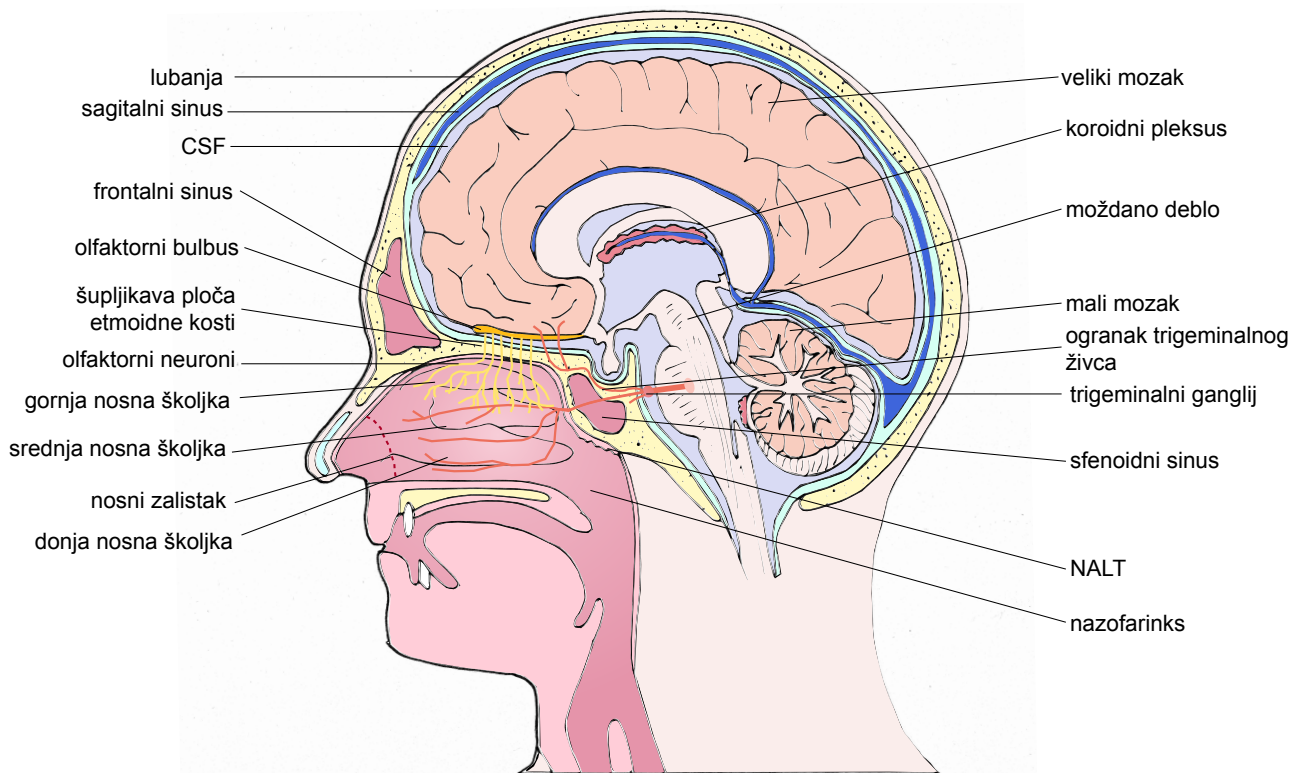
Međutim, takva primjena rezultira ograničenim prodiranjem lijeka u moždani parenhim zbog vrlo brzog efluksa CSF-a iz mozga u krv. Zbog toga je intratekalni put dostave lijeka u mozak prikladan samo za liječenje bolesti koje zahvaćaju njegovu površinu (npr. karcinomatozni meningitis), ali nije u mogućnosti dostaviti lijek u parenhim bez izlaganja površine mozga visokim i uglavnom toksičnim koncentracijama lijeka (Pardrige, 2020). Osim toga, invazivne tehnike nisu dobro prihvaćene od strane pacijenata, skupe su i upitne sigurnosti (Hanson i Frey, 2008).

S obzirom na neprihvatljivost invazivnih, kontinuirano se razvijaju i neinvazivne tehnike koje uključuju kemijsku modifikaciju lijeka, tvorbu prolijeka ili konjugata lijek-protutijelo ili lijek-ligand (Illum, 2003), ali i razvoj novih terapijskih (nano)sustava te istraživanje nazalnog puta primjene lijeka kojima je cilj zaobići, a ne prijeći KMB.

## **1.2. Nazalna primjena lijeka**

### **1.2.1. Anatomija i fiziologija nosne šupljine**

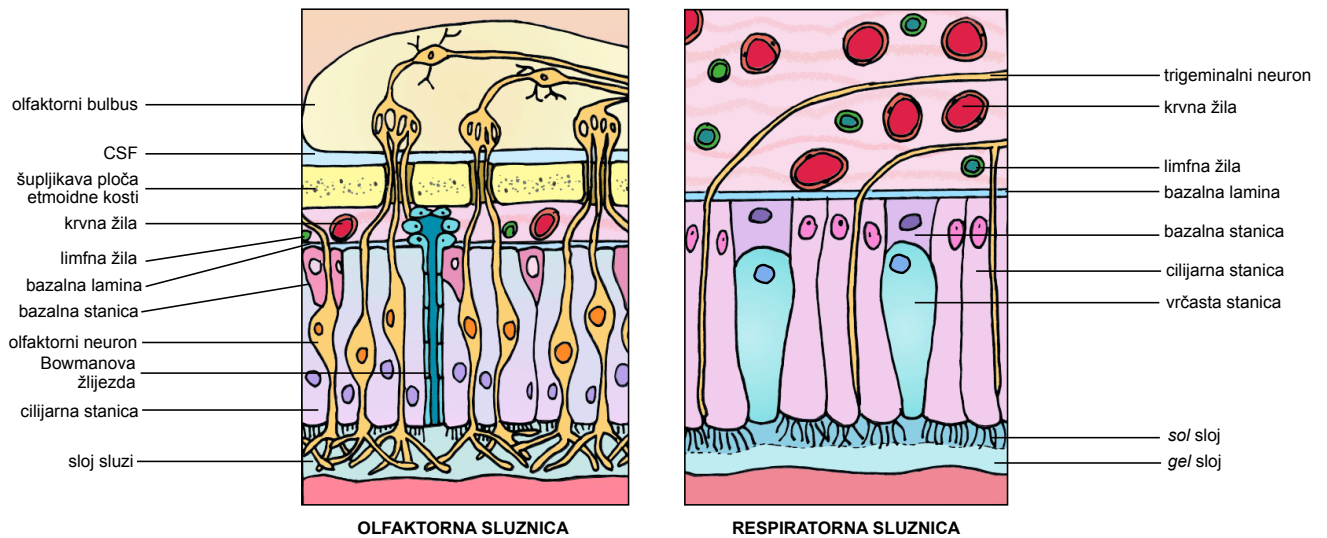
Nosna šupljina ima važnu zaštitnu ulogu jer filtrira, zagrijava i ovlažuje udahnuti zrak prije nego li dođe do donjih dišnih puteva (Illum, 2003). Osim toga, važna je i za proces olfakcije. Podijeljena je nosnim septumom na dva dijela, pri čemu svaka polovica sprijeda tvori nosnice, a straga se spaja s usnom šupljinom preko nazofarinksa. Predvorje, respiratorna i olfaktorna regija tri su glavna područja nosne šupljine (Slika 5.).



**Slika 5.** Shematski prikaz anatomske građe nosne šupljine i pridruženih struktura važnih za dostavu lijeka iz nosne šupljine u središnji živčani sustav. (CSF – cerebrospinalni fluid; NALT – limfno tkivno nazalne sluznice, engl. *Nasal-associated lymphoid tissue*). Slika je izrađena po uzoru na Djupesland i sur. (2014) i Agrawal i sur. (2018).

Središnji dio nosne šupljine čini turbinatna regija. Bočne stijenke tvore naborane strukture, tzv. nosne školjke koje se dijele na gornju, srednju i donju. Na njima se zbog stvaranja turbulentnog protoka zraka osigurava bolji kontakt između udahnutog zraka i površine sluznice. Epitelno tkivo unutar nosne šupljine je jako dobro prokrvljeno i predstavlja dobro mjesto za apsorpciju lijeka. Ono se sastoji od cilijarnih i necilijarnih cilindričnih stanica, vrčastih te bazalnih stanica, a njihov omjer varira u različitim regijama nosne šupljine (Slika 6.). Različiti tipovi stanica epitela međusobno su spojeni čvrstim spojevima (engl. *tight junctions*) (Bitter i sur., 2011). Cilijarne stanice olakšavaju transport sluzi prema nazofarinksu. Slabo diferencirane bazalne stanice djeluju kao matične stanice koje zamjenjuju druge epitelne stanice u procesima obnove nazalne sluznice. Vrčaste stanice sadrže brojne sekretorne granule ispunjene mucinom i proizvode izlučevine koje tvore zaštitni sloj sluzi (Constatino i sur., 2007). Sloj sluzi se sastoji od sloja niske viskoznosti (*sol*) koji okružuje cilije i viskoznijeg sloja (*gel*) na vrhu cilija. Materijal odložen na mukoznom sloju sluzi će se postupno iščistiti iz nosne šupljine pomoću

mehanizma mukocilijarnog čišćenja. Za konvencionalne formulacije to će rezultirati njihovom eliminacijom iz nosne šupljine u nazofarinks za 15-20 min (Illum, 2000).



**Slika 6.** Histološki prikaz građe olfaktorne i respiratorne sluznice. (CSF – cerebrospinalni fluid) Slika je izrađena po uzoru na Djupesland i sur. (2014) i Agrawal i sur. (2018).

Prednji, anteriorni dio nosne šupljine ili predvorje prekriven je višeslojnim pločastim epitelom koji je sličan onome kože. Posteriorno se on postupno mijenja u respiratorni epitel koji je pseudostratificiran (jednoslojni, ali s jezgrama stanica na različitim razinama) i prekriven mikrovresicama. Mikrovresice osiguravaju veliku površinu i apsorpcijski kapacitet pa je respiratorna regija nosne šupljine glavno mjesto apsorpcije lijekova u sistemsku cirkulaciju. Olfaktorna regija obuhvaća krov nosne šupljine, dio nosnog septuma te dijelove gornje i srednje turbinatne regije. U ljudi, olfaktorna sluznica čini tek 3-5 % ukupne površine nosne šupljine što je puno manje u usporedbi s 50 % kod štakora i 77 % kod pasa (Illum, 2003). Ovo područje nosne šupljine oslobođeno je inspiratornog protoka zraka i leži neposredno ispod rebraste ploče etmoidne kosti koja odvaja nosnu i kranijalnu šupljinu (Mathison, 1998).

### 1.2.2. Prednosti i nedostaci nazalne primjene lijeka

Konvencionalno se nazalni put primjene koristi za isporuku lijeka u liječenju lokalnih bolesti nosne sluznice poput alergija, kongestije i infekcija. Pokazano je da se osim toga, nazalna primjena može iskoristiti za sustavnu isporuku lijeka kada se želi premostiti nedostatak parenteralne primjene, a osigurati jednako brz početak djelovanja ili postići terapijsku koncentraciju lijeka koji se ne može primijeniti peroralno. Osim toga, brojne studije su dokazale mogućnost iskorištavanja nazalne primjene i za izravni prijenos lijeka iz nosne šupljine u mozak (Illum, 2003). Prednosti i nedostaci nazalne primjene lijeka prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Prednosti i nedostaci nazalne primjene lijeka (Pardeshi i Belgamwar, 2013).

Prednosti	Nedostaci
<ul style="list-style-type: none"><li>• izvrsna bioraspoloživost lijekova niske molekulske mase</li><li>• zaobilaženje razgradnje u gastrointestinalnom traktu i metabolizma prvim prolaskom kroz jetru</li><li>• alternativni put parenteralnoj primjeni, posebno lijekova velike molekulske mase (proteini, peptidi, matične stanice)</li><li>• zaobilaženje KMB-a osiguravajući ciljanu isporuku u SŽS, smanjenu sustavnu izloženost i nuspojave</li><li>• brza apsorpcija i početak djelovanja</li><li>• dobra suradljivost pacijenata zbog jednostavnosti i neinvazivnosti primjene</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• brza eliminacija iz nosne šupljine zbog mukocilijarnog čišćenja</li><li>• pojačivači apsorpcije koji se nalaze u formulaciji mogu djelovati toksično na nazalnu sluznicu</li><li>• neke djelatne tvari mogu izazvati iritaciju nazalne sluznice ili biti osjetljivi na razgradnju enzimima u nosnoj šupljini</li><li>• za postizanje željenih koncentracija lijeka na mjestu djelovanja važna je tehnika primjene lijeka i mjesto depozicije u nosnoj šupljini</li><li>• kongestija uslijed prehlade ili alergije može ometati isporuku lijeka</li><li>• česta primjena određenih lijekova nazalnim putem može uzrokovati infekciju, povratnu kongestiju ili anosmiju</li></ul>

Da bi lijek bio prikladan za nazalnu primjenu, mora biti odgovarajuće topljivosti u vodi, prikladnog stupnja nazalne apsorpcije, potentan tj. primjenjiv u niskoj dozi, minimalno iritabilan za nazalnu sluznicu, zadovoljavajuće stabilnosti i prikladnih gustatornih svojstava (Filipović-Grčić i Hafner, 2008).

Lipofilni lijekovi se općenito dobro apsorbiraju iz nosne šupljine s farmakokinetičkim profilom vrlo sličim onom dobivenom nakon intravenske injekcije. Međutim, unatoč velikoj nosnoj površini i opsežnoj cirkulaciji, apsorpcija polarnih molekula je obično niska (Illum, 2003). Dva su glavna razloga njihove slabe apsorpcije: mala propusnost nazalne sluznice i mehanizam mukocilijarnog čišćenja. Te probleme je moguće riješiti dodavanjem pojačivača apsorpcije i mukoadhezivnih tvari formulaciji lijeka.

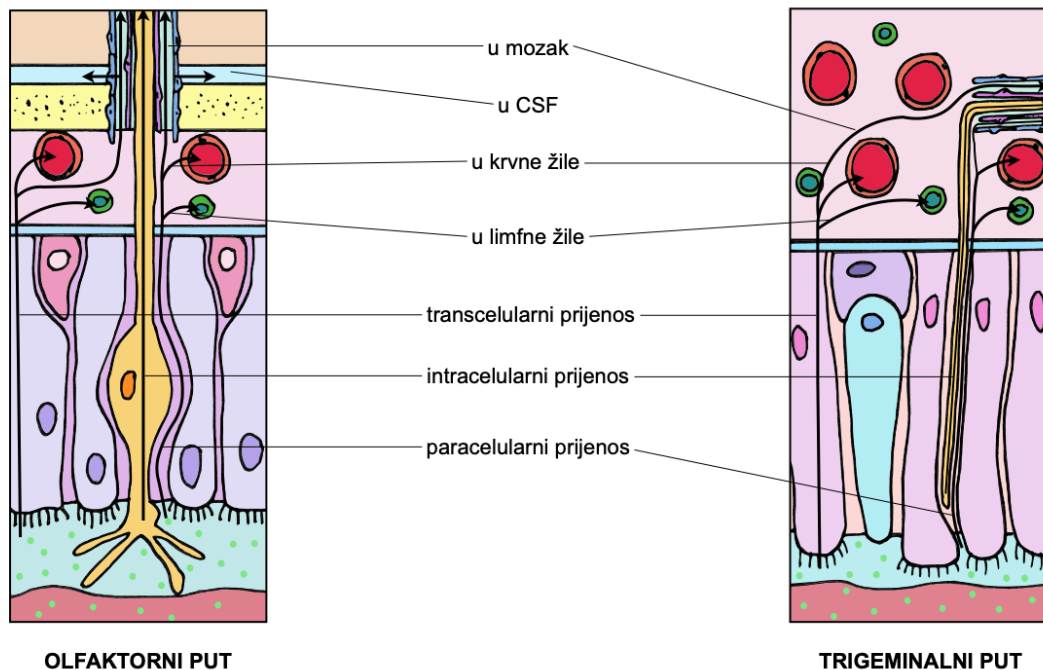
### **1.2.3. Nazalna primjena lijeka s ciljem izravne isporuke u mozak**

Nazalna primjena lijeka nije novost u isporuci lijeka u sistemska cirkulaciju, ali jest nova neinvazivna metoda brze i izravne dostave lijeka u SŽS. Nazalnu primjenu neutrotrfnih čimbenika s ciljem isporuke izravno u SŽS prvi je opisao Frey 1989. godine (Thorne i Frey, 2001). Nazalna primjena omogućuje liječenje bolesti SŽS-a uz minimiziranje sistemske izloženosti (Dhuria i sur., 2010). To je moguće jer je olfaktorna sluznica jedino mjesto u

organizmu na kojem je SŽS izravno povezan s vanjskim okruženjem zahvaljujući olfaktornim neuronima, pa se lijek iz nosa u mozak može prenijeti izravno, zaobilazeći KMB (Pardeshi i Belgamwar, 2013).

Dok precizni mehanizmi nazalne dostave lijeka u SŽS još uvijek nisu u potpunosti shvaćeni, veliki broj istraživanja pokazuje da su važni putovi koji uključuju neurone koji povezuju nosnu šupljinu s mozgom i leđnom moždinom. Nadalje, u transportu sudjeluju i putovi koji uključuju krvožilje, CSF i limfni sustav (Slika 7.). Vjerojatno je za transport odgovorna kombinacija putova, iako je moguće da neki put prevladava, a što ovisi o svojstvima lijeka, karakteristikama formulacije i/ili korištenom uređaju za isporuku (Pardeshi i Belgamwar, 2013).

Kako bi lijek mogao iz olfaktorne regije u nosnoj šupljini doći do CSF-a ili moždanog parenhima, mora proći kroz nosni olfaktorni epitel i, ovisno o putu koji slijedi, arahnoidnu ovojnica koja okružuje subarahnoidni prostor (Pardeshi i Belgamwar, 2013). Još jedan put koji povezuje nos i SŽS uključuje trigeminalni živac. Radi se o najvećem kranijalnom živcu koji inervira respiratorni i olfaktorni epitel, a u SŽS ulazi na dvama mjestima: kroz prednji foramen u blizini ponsa i kroz rebrastu ploču etmoidne kosti blizu olfaktornog bulbosa (Pardeshi i Belgamwar, 2013; Agrawal i sur., 2018). Prijenos lijeka iz nosne šupljine u mozak obično se na staničnoj razini opisuje intracelularnim, transcelularnim i paracelularnim putem (Slika 7.). Intracelularni put poznat je i kao intraneuronski i relativno je spor način prijenosa lijeka iz nosne šupljine u mozak jer je za postizanje učinkovite koncentracije lijeka u SŽS-u potrebno oko 24 h. Transcelularni put je odgovoran za prijenos lipofilnih molekula putem pasivne difuzije ili aktivnog transporta posredovanog receptorima. Paracelularni put prikladan je za dostavu hidrofilnih lijekova (npr. donepezilklorid), brži je od intracelularnog i transcelularnog puta, a odvija se kroz prostore između stanica, dakle uključuje prolaz između čvrstih spojeva (engl. *tight junctions*) (Agrawal i sur., 2018).



**Slika 7.** Pretpostavljeni prijenos lijekova iz nosne šupljine u SŽS olfaktornim i trigeminalnim putovima. (CSF – cerebrospinalni fluid) Slika je izrađena po uzoru na Djupesland i sur. (2014) i Agrawal i sur. (2018).

S obzirom na to da bolesti SŽS-a općenito ne uključuju patofiziološke procese u cijelom mozgu, potrebna su daljnja poboljšanja formulacija i procesa depozicije kako bi se unaprijedila učinkovitost dostave lijeka u specifičnu regiju mozga koja zahtijeva liječenje. Na primjer, razvojem formulacija koje specifično ciljaju trigeminalne neurone mogla bi se postići specifična isporuka lijeka u moždano deblo i mali mozak što je važno u liječenju Parkinsonove bolesti. S druge strane, formulacija koja bi ciljala olfaktorne neurone omogućila bi ciljanu dostavu lijeka u olfaktornu i frontalnu regiju kore velikog mozga što je važno u liječenju Alzheimerove bolesti, demencije i poremećaja ličnosti (Dhuria i sur., 2010).

Ispitivanje nazalne depozicije stoga je iznimno važno za klinički uspjeh nazalnih formulacija za ciljanu dostavu uklopljenog lijeka u mozak. Iako su za ispitivanje depozicije u početku korišteni animalni modeli, takva praksa uglavnom je napuštena jer je translacija rezultata s takvih modela na ljude uvelike diskutabilna, ne samo zbog anatomskih i fizioloških različitosti, već i zbog toga što različite vrste imaju različite obrasce udisanja (Maaz i sur., 2021). Način na koji bi se prevladala ograničenja animalnih modela je korištenje računalne dinamike fluida (engl. *Computational Fluid Dynamics*, CFD) ili *in vitro* modela ljudske nosne šupljine. Veliki napredak u tehnologijama 3D ispisa, uz poboljšanje kvalitativnih i kvantitativnih analitičkih metoda, omogućio je razvoj preciznih replikata nosne šupljine za



procjenu depozicije nazalnih formulacija i uređaja za isporuku. Takvi modeli nude mogućnost ispitivanja depozicije u nosnoj šupljini izbjegavajući pritom iscrpna ispitivanja u životinja i ljudi (Maaz i sur., 2021).

Iako je oralna primjena općenito jednostavan i brz način primjene lijeka, za pacijente s AB-om nije idealna opcija zbog prisutnih poteškoća u žvakanju i gutanju, slabe suradljivosti zbog gorčine i gastrointestinalnih nuspojava (proljevanje, mučnina, zatvor, abdominalni bolovi, povraćanje, anoreksija i nadutost) (Zhao i sur., 2021). Kako bi se prevladala navedena ograničenja, istražuju se drugi putovi primjene donepezila i razvijaju poboljšane formulacije (Espinoza i sur., 2019). Jedan od njih je nazalna primjena, čije su prednosti objašnjene ranije u tekstu. U Tablici 2. je prikazan pregled recentnih znanstvenih radova u području razvoja nazalnih formulacija donepezila s rezultatima *in vitro* i *in vivo* ispitivanja. Sumarno se može reći da su sve formulacije osigurale povećanu biorasploživost donepezila u mozgu i dokazale sigurnost primjene na modelnim životinjama.

**Tablica 2.** Sustavni pregled inovativnih nazalnih formulacija donepezila.

Pomoćne tvari	Doza/koncentracija donepezila*	<i>In vitro</i> ispitivanja	<i>Ex vivo/in vivo</i> ispitivanja	Literatura
nanoemulzija				
Capryol 90 Labrasol Transcutol-P	6,25 mg/ml*	pH: 5,82 veličina čestica: 128,50 ± 1,03 nm PDI: 0,12 ± 0,01 morfologija: jednolično raspršene male sferične kapljice EE: 94,32 ± 0,12 % viskoznost: 10,69 ± 0,04 mPas reološka svojstva: Newtonovsko oslobađanje lijeka: hiperbola stabilnost: > 45 dana	nazalna sluznica svinje mukoadhezivnost: 71,31 ± 1,53 % $k_p = 1,05 \times 10^{-3}$ cm/min humane stanice karcinoma nazalnog septuma RPMI 2650 toksičnost: nije opažena biorasploživost: 2,7×↑ u odnosu na p.o. primjenu	Espinoza i sur., 2019
Capryol 90 Labrasol Transcutol-P Pluronic F-127	6,25 mg/ml*	pH: 6,14 EE: 93,85 ± 0,095 % viskoznost: 315,40 ± 0,22 mPas reološka svojstva: pseudoplastično oslobađanje lijeka: hiperbola stabilnost: >45 dana	nazalna sluznica svinje mukoadhezivnost: 82,43 ± 1,72 % $k_p = 2,13 \times 10^{-3}$ cm/min humane stanice karcinoma nazalnog septuma RPMI 2650 toksičnost: nije opažena biorasploživost: 5,7×↑ u odnosu na p.o. primjenu	Espinoza i sur., 2019

Labrasol cetipiridinijev klorid glicerol	0,45 mg/kg	zeta potencijal: -10,7 mV veličina čestica: 65,36 nm PDI: 0,084 oslobađanje lijeka: 99,22 % nakon 4 h u fosfatnom puferu, 98 % nakon 2 h u umjetnom CSF-u, 96 % nakon 2 h u SNF-u	neuroblastoma stanična linija (Neuro 2a) toksičnost: o dozi ovisna  Sprague-Dawley štakori ↑ radioaktivnost u mozgu kod i.n. primjene nanoemulzije u odnosu na i.n. primjenu otopine, kao i i.v. i p.o. primjene ↑ $c_{max}$ , ↓ $t_{max}$ (1,5 h) i ↑AUC	Kaur i sur., 2020
nanosuspenzija				
kitozan Polisorbat-80	0,5 mg/ml*	pH: 7,4 veličina čestica: 150 - 200 nm PDI: 0,314 morfologija: sferične kapljice EE: 92 - 96 % DL: 40 - 48 % oslobađanje lijeka: bifazično, produljeno u odnosu na običnu suspenciju	Sprague-Dawley štakori toksičnost: nije opažena ↑ $c_{max}$ i AUC u odnosu na i.n.primjenu suspencije ↓ $t_{max}$ u odnosu na i.n. primjenu suspencije	Bhavna i sur., 2014
liposomalna formulacija				
kolesterol polietilen glikol 1,2-distearil-sn- glicero-3-fosfokolin (DSPC)	1 mg/kg	pH: 7,4 zeta potencijal: - 28,31 ± 0,85 mV veličina čestica: 102 ± 3,3 nm PDI: 0,28 ± 0,03 morfologija: glatke sferične čestice, unilamelarne građe EE: 84,91 ± 3,31 % oslobađanje lijeka: bifazično stabilnost: > 3 mjeseca pri temp. 4 i 25 °C	Wistar štakori toksičnost: nije opažena 2×↑ bioraspodjeljivost u odnosu na p.o. primjenu (značajan ↑ $c_{max}$ , kao i ↑AUC)	Al Asmari i sur., 2016
<i>in situ</i> gel				
CETETH-10 oleinska kiselina voda	25 mg/kg	reološka svojstva: pseudoplastični sustav, podliježe promjeni faza u kontaktu s malim količinama nazalnog fluida (mikroemulzija→heksagonalni kristali) tvrdoća, kompresibilnost i kohezivnost ovisna su o sadržaju vode u nosnom fluidu oslobađanje lijeka: produljeno, ne slijedi Fickov zakon difuzije	intestinalna sluznica svinje mukoadhezivnost: 76 % (u odnosu na 42 % za otopinu)  Wistar štakori 2×↑ $c_{max}$ i AUC u odnosu na i.n. primjenu otopine produljeno $t_{1/2}$ u odnosu na i.n. i p.o.primjenu otopine	De Souza i sur., 2021
glicerol monooleat Poloksamer 407 gelan guma konjac glukomanan	1 mg/kg	DL: 90,16 ± 1,02 % pH: 6,4 ± 1,29 zeta potencijal: - 40 mV	Sprague-Dawley štakori ↑ $c_{max}$ i ↑AUC za gel u odnosu na i.n. primjenu	Patil i sur., 2018

		<p>veličina kubosoma: 137,8 – 231,4 nm  PDI: 0,38 – 0,48  morfologija: sferični kubosomi nepravilnih polikutnih oblika  EE: 30,85 – 48,48 %  viskoznost: 180 ± 9,5 cps  oslobađanje lijeka: bifazično</p>	kubosomalne disperzije i otopine DPZ-a	
Poloksamer 407 Poloksamer 188 hidroksipropil-β-cikodekstrin etilparaben	10 mg/kg	<p>temperatura geliranja: 32,5 °C  vrijeme geliranja: 40 s  pH: 7  oslobađanje lijeka: kinetika prema Weibullovom modelu</p>	<p>Sprague-Dawley štakori  ↑ C<sub>max</sub>, ↓ t<sub>max</sub> i ↑AUC u odnosu na i.g. primjenu otopine</p>	Gu i sur., 2020
liposomalni hidrogel				
tiolirani kitozan dipalmitoilfosfokolin (DPPC) kolesterol	5 mg	<p>veličina čestica: 45 – 58 μm  morfologija: ovalne i sferične unilamelarne vezikule  EE: 62,5 ± 0,6 %  viskoznost: manja u odnosu na gel s nemodificiranim kitozonom  oslobađanje lijeka: slijedi Korsmeyer-Peppasov model  stabilnost: bolja pri 4 °C nego pri 20 °C</p>	<p>nazalna sluznica ovce  mukoadhezivnost: ↑ u usporedbi s hidrogelovima s PVP i PEG  New Zealand bijeli zečevi  toksičnost: nije uočena  46%↑ C<sub>max</sub> i 39%↑AUC u odnosu na p.o. primjenu u obliku tablete  107%↑ sadržaja lijeka u mozgu u odnosu na p.o. primjenu u obliku tablete</p>	Al Harthi i sur., 2019
mikroemulzija				
Labrasol Transcutol-P propilenglikol ricinusovo ulje voda	12,5 mg/ml*	<p>pH: 6,38  veličina čestica: 58,9 ± 3,2 nm  PDI: 0,19 ± 0,04  morfologija: sferične čestice glatke i pravilne površine  viskoznost: 44,69 ± 6,286 × 10<sup>-2</sup> mPas  reološka svojstva: Newtonov model  oslobađanje lijeka: hiperbola  stabilnost: nisu opažene agregacija, sedimentacija i vrhnjenje u 24 h; nisu opažene promjene pri pohrani pri 4 i 40°C kroz 2 tjedna</p>	<p>nazalna sluznica svinje  mukoadhezivnost: 80 %</p>	Espinoza i sur., 2018
maslačno ulje	0,5 mg/kg	<p>pH: 6,2 ± 0,2  zeta potencijal: - 0,820 ± 0,070 mV  veličina čestica: 87,66 ± 5,23 nm  PDI: 0,318 ± 0,029  morfologija: sferične čestice  DL: 99,48 ± 0,40  viskoznost: 17,44 ± 0,21 cP</p>	<p>humane nazalne epitelne stanice RPMI 2650  toksičnost: nije opažena  Sprague-Dawley štakori  ↑ bioraspoloživost i C<sub>max</sub> nakon i.n. primjene u</p>	Khunt i sur., 2020

		odnosu na emulziju bez ulja i otopinu DPZ-a		
riblje ulje bogato omega-3 masnim kiselinama	0,5 mg/kg	pH: 6,1 ± 0,1 zeta potencijal: - 0,730 ± 0,065 mV veličina čestica: 88,59 ± 8,23 nm PDI: 0,413 ± 0,010 morfologija: sferične čestice DL: 99,52 ± 0,017 % viskoznost: 18,00 ± 0,13 cP	humane nazalne epitelne stanice RPMI 2650 toksičnost: nije opažena  Sprague-Dawley štakori ↑ bioraspodijeljenost i $C_{max}$ te AUC nakon i.n. primjene u odnosu na emulziju bez ulja, otopinu DPZ-a, te mikroemulziju s maslačnim uljem	Khunt i sur., 2020

#### čvrste lipidne nanočestice (engl. *solid lipid nanoparticles*, SLN)

gliceril monostearat Tween 80 Poloksamer 188	0,45 mg/kg	zeta potencijal: - 24,1 mV veličina čestica: 121,0 ± 5,27 nm PDI: 0,194 morfologija: sferične čestice EE: 67,95 ± 1,58 % DL: 12,15 ± 0,98 % oslobađanje lijeka: bifazično, prema Higushi-ju stabilnost: nisu opažene značajne promjene u formulaciji nakon 6 mj. pri 4 i 25 °C, ali je zamijećeno povećanje veličine čestica nakon 6 mj. pri 40 °C uslijed agregacije	Wistar štakori 2,61×↑AUC u odnosu na i.v. primjenu otopine i 2,26×↑AUC u odnosu na i.n. primjenu otopine  ↓ $t_{max}$ nakon i.n. primjene u odnosu na i.v. primjenu	Yasir i sur. 2018
--	------------	--	--	-------------------

AUC – površina ispod krivulje ovisnosti koncentracije lijeka o vremenu, engl. *area under the curve*;  $C_{max}$  – vršna koncentracija lijeka nakon jednokratnog doziranja; CSF – cerebrospinalni fluid; EE - učinkovitost uklapanja, engl. *entrapment efficiency*; DL – sadržaj lijeka, engl. *drug loading*; DPZ – donepezil; i.g. – intragastrično; i.n. – intranazalno; i.v. – intravenski;  $k_p$  – koeficijent permeabilnosti; PDI – indeks polidisperznosti; p.o. – peroralno; SNF - umjetni nazalni fluid, engl. *simulated nasal fluid*;  $t_{1/2}$  – vrijeme poluživota lijeka;  $t_{max}$  – vrijeme postizanja vršne koncentracije lijeka nakon jednokratnog doziranja.

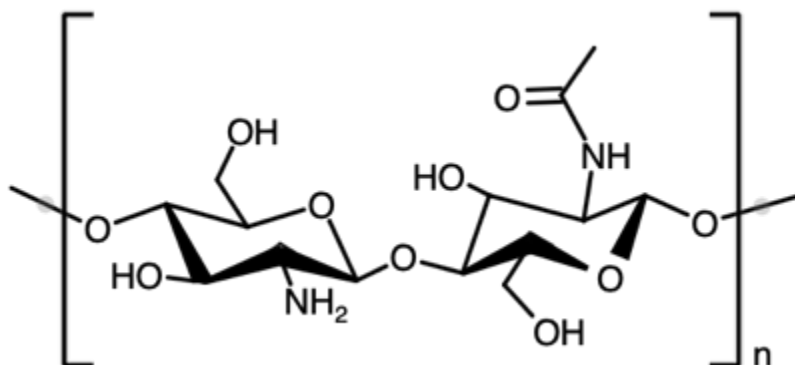
#### 1.2.4. Praškasti sustavi za nazalnu primjenu

Najčešći farmaceutski oblici za nazalnu primjenu su otopine i suspenzije, međutim njihova glavna ograničenja su kratko zadržavanje na nosnoj sluznici zbog brzog curenja i mukocilijarnog klirensa te problemi povezani sa stabilnošću formulacije (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Iako su praškasti sustavi uobičajeni u isporuci lijeka u pluća, za sada nisu mnogo zastupljeni u proizvodima za nazalnu isporuku. Međutim, praškaste formulacije nude niz prednosti u odnosu na konvencionalne tekuće formulacije za nazalnu primjenu. Neke od

prednosti su povećana stabilnost, smanjena potreba za pomoćnim tvarima i produljeno zadržavanje na nosnoj sluznici (Illum, 2003; Filipović-Grčić i Hafner, 2008).

Smjernice za proizvodnju formulacija za nazalnu primjenu donijele su Europska agencija za lijekove (eng. *European Medicines Agency*, EMA) i Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (eng. *US Food and Drug Administration*, FDA) i njima su određeni zahtjevi vezani uz veličinu kapljica/čestica nazalnih sprejeva, pomoćne tvari, osjetljivost na temperaturu i vlagu te svojstva uređaja za nazalnu primjenu (FDA, 2002; EMA, 2006). Kako bi praškasta formulacija bila prikladne raspodjele veličina čestica i svojstava tečenja, djelatna tvar se često miješa s pomoćnim tvarima povoljnih fizičko-kemijskih svojstava (Maaz i sur., 2021). Obično se količina od najviše 50 mg praškastog sustava smatra prihvatljivom za nazalnu primjenu jer nosna šupljina nije u mogućnosti primiti više sadržaja po aplikaciji (Filipović-Grčić i Hafner, 2008; Tiozzo Fassiolo i sur., 2018).

Kako bi se povećala mukoadhezivnost prašaka za nazalnu primjenu koriste se razni polimeri, među kojima se ističe kitozan (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Kitozan je biokompatibilni derivat hitina koji se sastoji od ponavljajućih jedinica N-acetilglukozamina i glukozamina (Slika 8.).



**Slika 8.** Kemijska struktura jedne polimerne jedinice kitozana. Nacrtano pomoću programa Marvin JS, ChemAxon.

Kitozan u odnosu na hitin ima bolji profil topljivosti i manju kristaličnost te ima mogućnost kemijske modifikacije zbog prisutnosti različitih reaktivnih funkcionalnih skupina. Kemijska modifikacija kitozana je od velikog interesa jer ne mijenja temeljnu strukturu kitozana, zadržavajući izvorna fizičko-kemijska i biokemijska svojstva, ali rezultira novim i poboljšanim svojstvima (Mourya i Inamdar, 2008). Prednosti formulacija s kitozanom u dostavi lijeka iz nosne šupljine u mozak pripisuju se povećanoj mukoadhezivnosti koja produljuje

vrijeme zadržavanja formulacije na mjestu primjene i povećanoj permeabilnosti epitela zbog utjecaja kitozana na čvrste spojeve (engl. *tight junctions*) između apikalnih stanica (Casettari i Illum, 2014). Pokazano je da praškaste formulacije s kitozonom u mnogim slučajevima mogu pružiti bolji učinak pospješivanja apsorpcije u odnosu na otopine s kitozonom (Illum, 2003).

Polimerne mikročestice pokazale su se kao uspješni praškasti sustavi za nazalnu dostavu lijeka zbog tehnoloških i terapijskih prednosti (Filipović-Grčić i Hafner, 2008; Lengyel i sur., 2019; Nižić i sur., 2020). Radi se o višečestičnim sustavima raspona veličina čestica 1-1000  $\mu\text{m}$  velikog omjera površine prema volumenu zbog čega mogu učinkovito uklopiti djelatnu tvar i djelovati kao nosači lijeka (Chowdary i Rao, 2004; Lengyel i sur., 2019). Osim toga, mogu zaštititi lijek od enzimske razgradnje, smanjiti mu toksičnost, pozitivno utjecati na stabilnost, produžiti zadržavanje na sluznici i omogućiti ciljanu dostavu te predvidljiv profil oslobađanja (Chowdary i Rao, 2004; Filipović-Grčić i Hafner, 2008).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Alzheimerova bolest (AB) je kronična i progresivna bolest središnjeg živčanog sustava s kompleksnim patološkim mehanizmima u podlozi. Progresivna kognitivna disfunkcija postupno rezultira sve većom nesposobnošću za samostalan život, a u konačnici rezultira smrću. Mozak pacijenta s AB-om pokazuje nekoliko različitih neuropatoloških obilježja, uključujući pretjerano stvaranje i nakupljanje beta-amiloidnih plakova i unutarstaničnih nakupina nepravilno fosforiliranog  $\tau$  proteina te degeneraciju kolinergičkih neurona u bazalnom dijelu prednjeg mozga (Auld i sur., 2002).

Učinak trenutno odobrenih lijekova za liječenje kognitivnih oštećenja u AB-u temelji se na modulaciji neurotransmitera ili enzima. Glavna skupina lijekova koji se koriste u liječenju AB-a su inhibitori acetilkolinesteraze. Djeluju na način da sprječavaju razgradnju acetilkolina u sinaptičkoj pukotini i tako osiguravaju veću raspoloživu koncentraciju acetilkolina te produljuju njegovo vrijeme poluživota u sinapsi. Danas su odobrena tri lijeka pripadnika ove skupine: donepezil, galantamin i rivastigmin.

Unatoč velikom napretku u neuroznanosti i istraživanim novim neuroterapeuticima, njihova učinkovitost u liječenju bolesti SŽS-a nakon sistemske primjene ponajprije je ograničena postojanjem krvno moždane barijere koja ograničava raspoloživost lijeka u mozgu.

Nazalna primjena lijeka nudi brojne prednosti u odnosu na druge konvencionalne putove primjene poput peroralne ili parenteralne. Nije ograničena samo na lokalnu primjenu, već nudi mogućnost izravne dostave u sistemska cirkulaciju i SŽS. Osim toga odlikuje se brzim nastupom djelovanja, neinvazivnošću te zaobilazanjem probavnog sustava i prvog prolaska kroz jetru.

Međutim, anatomija i fiziologija nosne šupljine nameću i neka ograničenja, poput malog volumena formulacije koji se može primjeniti i brzog mukocilijarnog klirensa (Salade i sur., 2019). Za lijekove koji se primjenjuju nazalno, svojstva farmaceutskog oblika i profil depozicije u nosnoj šupljini od velike su kliničke značajnosti. Raspoloživost nazalno primijenjenog lijeka na mjestu djelovanja ovisi o njegovoj raspodjeli u nosnoj šupljini, apsorpciji preko mukozne barijere i brzini eliminacije iz nosa (Pu i sur., 2014). Zbog toga, formulatori moraju provesti brojna ispitivanja kako bi procijenili učinkovitost i sigurnost novih terapijskih sustava za nazalnu primjenu.

Depozicija formulacije u respiratornom sustavu je funkcija veličine čestica i fiziološko-anatomskih karakteristika respiratornog sustava. Vrsta, gustoća, higroskopnost formulacije, raspodjela veličina čestica, kao i patološka stanja u nosnoj šupljini utječu na depoziciju, a ona na naknadne biološke odgovore. Mjesto odlaganja, osim o svojstvima formulacije, ovisi i o vrsti sustava za isporuku lijeka te korištenoj tehnici primjene formulacije. Poboljšanje sustava za isporuku lijeka neophodno je za postizanje boljih kliničkih ishoda i veće suradljivosti bolesnika (Vidgren i Kublik, 1998; Pardeshi i Belgamwar, 2013; Maaz i sur., 2021).

Cilj ovog rada bio je pripremiti i karakterizirati mikrosfere s donepezilom građene od kitozana i manitola te ispitati utjecaj parametara primjene (kut primjene uređaja u odnosu na horizontalnu ravninu i protok udahnutog zraka) na nazalnu depoziciju pripremljenih mikrosfera. Pri ispitivanju nazalne depozicije korišten je 3D printani model nosne šupljine, respiratorna pumpa (za stimuliranje disanja) te UDS Powder uređaj (Unit Dose System Powder, dalje u tekstu UDSP; Aptar Pharma Group, Francuska) razvijen za ciljanje olfaktorne regije, tj. glavnog područja od interesa za dostavu lijeka iz nosne šupljine izravno u mozak. UDSP uređaj dostavlja jediničnu dozu, a radi preko klipa spojenog s membranom koja se probuši nakon aktivacije uređaja. To stvara pozitivni tlak koji izbacuje praškastu formulaciju stvarajući aerosol (Salade i sur., 2018, [www.drug-dev.com](http://www.drug-dev.com)). Ispitivanje profila nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom uključivalo je određivanje frakcije primijenjene doze donepezila dostavljene u anteriornu regiju, turbinatnu regiju, olfaktornu regiju, septum (bez segmenta koji pripada olfaktornoj regiji) te posteriornu regiju nosne šupljine.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

Za izradu mikrosfera korišteni su: donepezilklorid (dalje u tekstu donepezil; Carbosynth Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo), kitozan male molekulske mase (dalje u tekstu kitozan; Sigma-Aldrich Chemie, Njemačka) i D-manitol (dalje u tekstu manitol; Lach-Ner, Češka).

Za izradu mobilne faze tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) korišteni su: natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Hrvatska), trietilamin (Fisher Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo), metanol (BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo) i otopina fosforne kiseline (0,1 M; Lach-Ner, Češka).

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Priprava mikrosfera s donepezilom

Mikrosfere s uklopljenim donepezilom pripravljene su sušenjem raspršivanjem vodenih otopina donepezila i pomoćnih tvari – kitozana i manitola. Svi sastojci formulacije su odabrani na temelju njihovog poznatog sigurnosnog profila za nazalni put primjene. Koncentrirana otopina kitozana (2 %, *m/V*) pripravljena je otapanjem kitozana u 0,5 % octenoj kiselini uz 24-satno miješanje na magnetskoj mješalici. Nakon otapanja, otopina je profiltrirana pomoću vakuumske pumpe. Koncentrirane otopine manitola i donepezila pripravljene su otapanjem u pročišćenoj vodi, uz miješanje na magnetskoj mješalici. Koncentrirana otopina kitozana pomiješana je u odgovarajućem omjeru s vodenim otopinama manitola i lijeka. Koncentracije kitozana, manitola i lijeka u otopini za sušenje iznosile su redom 1,5 % (*m/V*), 6,0 % (*m/V*) i 0,4 % (*m/V*).

Sušenje raspršivanjem provedeno je na uređaju Büchi B-290 Mini Spray Dryer (Büchi Labortechnik AG, Švicarska) opremljenom ultrazvučnom sapnicom (Büchi Labortechnik AG, Švicarska). Tijekom sušenja, aspirator je postavljen na 100 % kapaciteta, a pumpa za dopremu otopine za sušenje na 10 %, dok je snaga ultrazvučne sapnice iznosila 65 %. Kao medij za sušenje korišten je zrak. Ulazna temperatura zraka iznosila je 110 °C, dok se izlazna temperatura kretala između 60 i 62 °C. Iskorištenje postupka sušenja raspršivanjem izračunato je iz omjera mase dobivenih mikrosfera i mase sastavnica formulacije (donepezila, kitozana i manitola) korištenih za pripremu otopine za sušenje.

### 3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja i sadržaja donepezila u mikrosferama

Točna masa mikrosfera (10 mg) izvagana je i kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 25 ml koja je nadopunjena pročišćenom vodom do oznake. Disperzija je ostavljena 2 sata u ultrazvučnoj kupelji i zatim miješana na magnetskoj miješalici 24 sata. Disperzije su prije analize profiltrirane kroz polietersulfonsku membranu veličine pora 0,20 µm (Chromafil® Xtra PES-20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka).

Uspješnost uklapanja i sadržaj donepezila u mikrosferama pripremljenim sušenjem raspršivanjem određen je HPLC metodom prema postupku opisanom u odjeljku 3.2.9.

Koncentracija donepezila u uzorku izračunata je iz prethodno određenog baždarnog dijagrama. Iz dobivenih je rezultata izračunata uspješnost uklapanja donepezila (engl. *entrapment efficiency*, EE (%)) u mikrosferama prema jednadžbi (1):

$$EE (\%) = \frac{\text{stvarni sadržaj lijeka (mg)}}{\text{teorijski sadržaj lijeka (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

Sadržaj donepezila u mikrosferama (eng. *drug loading*, DL (%)) izražen kao maseni udio lijeka u mikrosferama (*m/m*), određen je prema jednadžbi (2):

$$DL (\%) = \frac{\text{masa uklopljenog lijeka (mg)}}{\text{ispitivana masa mikrosfera (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.2.3. Određivanje raspodjele veličina mikrosfera s donepezilom

Raspodjela veličina čestica određena je metodom laserske difrakcije korištenjem uređaja Mastersizer 3000 opremljenog Hydro SV ćelijom (Malvern Instruments Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo). Žarišna duljina leće iznosila je 300 nm. Homogena suspenzija mikrosfera pripravljena je dispergiranjem 5 mg uzorka u 10 ml 96 % etanola (*V/V*), uz soniciranje. Napravljeno je pozadinsko očitavanje i potom je suspenzija mikrosfera dodavana u Hydro SV ćeliju s magnetskim mješačem sve do zatamnjenja od 10 - 20 %. Analiza je provedena u pentaplikatu. Rezultati su izraženi volumnim promjerima  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$ .

### 3.2.4. Ispitivanje reoloških svojstava mikrosfera s donepezilom

U svrhu kompletne karakterizacije dobivenog praškastog sustava, potrebno je poznavati njegova svojstva tečenja. U tu svrhu korištena je neizravna metoda, tj. određen je Hausnerov omjer mjerenjem gustoće prije i nakon potresivanja prema jednadžbi (3):

$$\text{Hausnerov omjer} = \frac{\text{nasipna gustoća nakon potresivanja}}{\text{nasipna gustoća prije potresivanja}} \quad (3)$$

Analiza je izvedena prema metodi Nižić Nodilo i sur. (2021). Masa od 300 mg mikrosfera prenesena je u začepljenu plastičnu brizgalicu volumena 5 ml te je markerom označen volumen. Brizgalica je zatvorena parafilmom i protresivana sve dok volumen između dva uzastopna protresivanja nije bio konstantan. Iz mase praška u brizgalici te volumena prije i nakon protresivanja izračunata je nasipna gustoća prije i nakon protresivanja. Mjerenje je provedeno u triplikatu.

Osim određivanja Hausnerova omjera, prilikom ispitivanja profila depozicije, kako je opisano u odjeljku 3.2.8. izmjeren je i udio praška zaostalog u UDSP uređaju nakon raspršivanja na način da je izvagana masa praška prije aktivacije uređaja (kao razlika mase punog i praznog spremnika;  $m_0$ ) i masa praška primijenjenog aktivacijom uređaja (kao razlika mase punog spremnika i spremnika nakon aktivacije;  $m_a$ ). Udio zaostalog praška (engl. *powder retention*, PR (%)) izračunat je prema jednadžbi (4):

$$\text{PR (\%)} = \frac{m_0 - m_a}{m_0} \times 100 \quad (4)$$

### 3.2.5. Određivanje zeta potencijala mikrosfera s donepezilom

Zeta potencijal mikrosfera s uklopljenim donepezilom određen je pomoću uređaja Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo) nakon dispergiranja 5 mg uzorka u 5 ml 10 mM otopine NaCl. Mjerenja su provedena pri 25 °C u elektroforetskoj ćeliji, u triplikatu.

### 3.2.6. Određivanje sadržaja ostatne vlage u mikrosferama s donepezilom

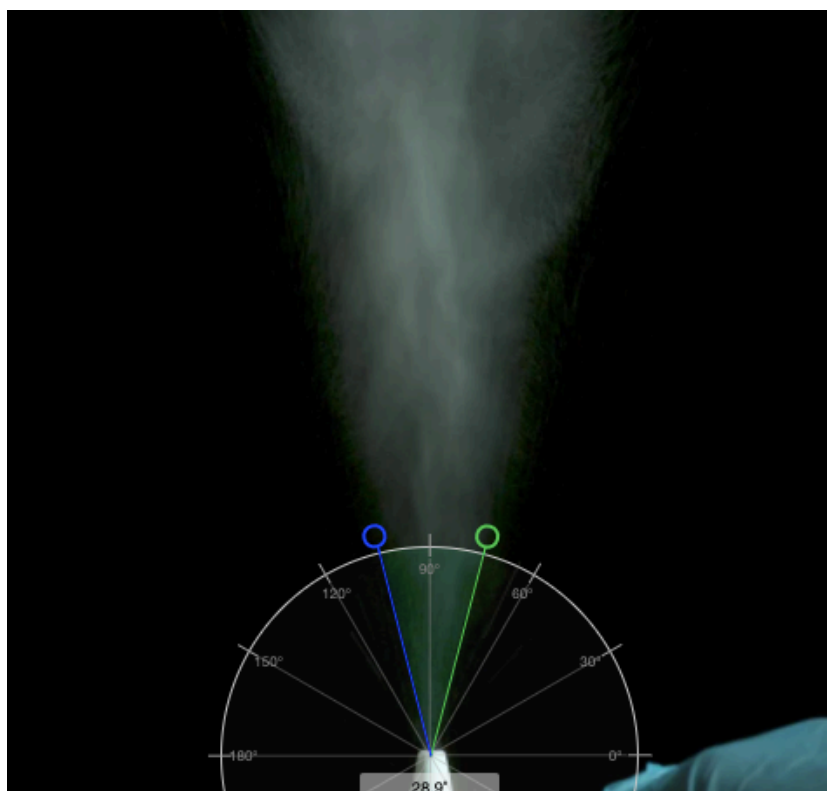
Sadržaj vlage u mikrosferama analiziran je termogravimetrijskom metodom pomoću uređaja TA Instruments Q500 (TA Instruments, USA, SAD). Izvagano je otprilike 5 mg praškastog uzorka (masa praška na početku eksperimenta,  $m_p$ ). Izvagani uzorak zagrijan je do 150 °C u atmosferi dušika protoka 25 ml/min. Brzina zagrijavanja uzorka iznosila je 10 °C/min. Nakon toga, uzorku je ponovno određena masa (masa na kraju eksperimenta,  $m_k$ ) Sadržaj vlage (engl. *moisture content*, MC(%)) izračunat je pomoću jednadžbe (5):

$$\text{MC (\%)} = \frac{m_p - m_k}{m_p} \times 100 \quad (5)$$

Analiza je provedena u triplikatu.

### 3.2.7. Određivanje kuta raspršenja mikrosfera s donepezilom

Kut raspršenja izmjeren je virtualnim kutomjerom nakon aktivacije uređaja nasuprot tamne podloge. Uzorci mikrosfera (15 mg) izvagani su u plastični uložak koji je stavljen u jednodozirni UDSP uređaj za dostavu prašaka u nosnu šupljinu. Kut nakon raspršenja snimljen je kamerom u obliku video zapisa s 120 sličica u sekundi nakon čega je bilo moguće izdvojiti sličicu u trenutku aktivacije i odrediti kut konusa raspršenja virtualnim kutomjerom (Slika 9.). Analiza je provedena u triplikatu.

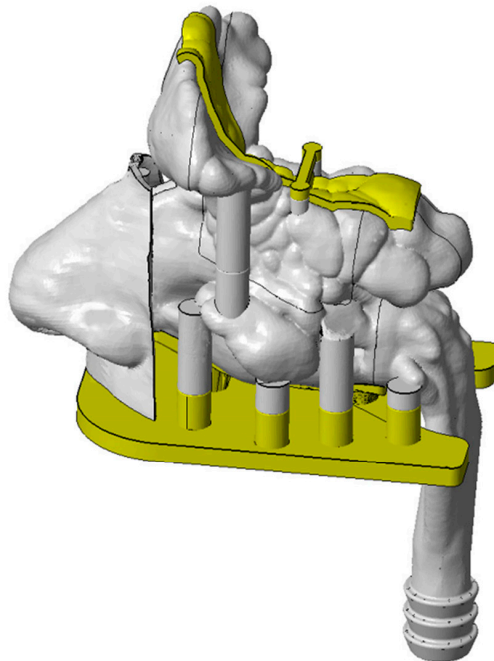


**Slika 9.** Prikaz mjerenja kuta raspršenja formulacije virtualnim kutomjerom.

### 3.2.8. Određivanje profila nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom korištenjem 3D printanog modela nosne šupljine

U svrhu ispitivanja nazalne depozicije mikrosfera s uklopljenim donepezilom, u ovom radu je korišten 3D printani model nosne šupljine razvijen za potrebe ispitivanja depozicije praškastog sustava deksametazona (Nižić Nodilo i sur., 2021). Model nosne šupljine (Slika 10.) izrađen je tehnikom 3D printanja na temelju CT (eng. *computed tomography*) snimke glave 62-godišnjeg pacijenta zdravih nosnih putova, dobivenog iz baze podataka Kliničkog bolničkog

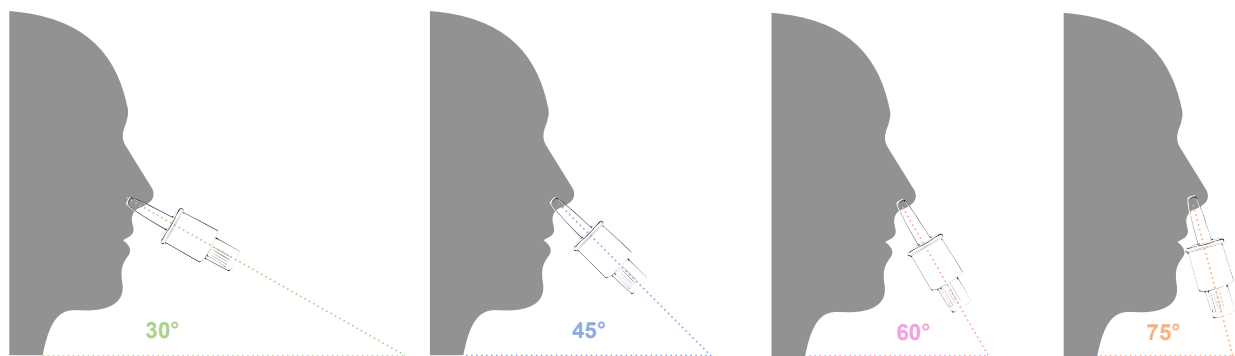
centra Sestre milosrdnice. 3D printani model nosne šupljine izrađen je u skladu s načelima Helsinške deklaracije, prema planu istraživanja odobrenom od strane Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice (predmet EP-9941/19-3) i Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (klasa 643-02/19-01/02, ur. broj 251-62-03-19-43). Izrađeni model ima mogućnost rastavljanja na pojedine regije pa se tako sastoji od anteriorne regije, turbinatne regije s odvojivim olfaktornim segmentom, septuma s odvojivim olfaktornim segmentom i posteriorne regije. Model također uključuje i paranazalne sinuse s otvorima u nosnu šupljinu.



**Slika 10.** Shematski prikaz *in vitro* modela nosne šupljine izrađenog 3D ispisom. Preuzeto iz Nižić Nodilo i sur., (2021).

Segmenti nosnog modela sastavljeni su na postolju i obloženi parafilmom. U eksperimentu su varirana dva parametara primjene formulacije u model nosne šupljine: (i) kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu, i (ii) protok udahnutog zraka. U svrhu simuliranja udaha, model nosne šupljine postavljen je na stalak i spojen s respiratornom pumpom (Large Animal Ventilator 613, Harvard Apparatus, SAD). Postavka pumpe pri protoku zraka od 0 l/min predstavljala je stanje bez udaha, a postavka pumpe pri protoku zraka od 20 l/min simulirala je umjereno duboko disanje (Trows i Scherließ, 2016). Volumetrijski protok praćen je pomoću nazalnog mjerača inspiracijskog protoka In-Check Nasal (Clement Clarke International Ltd.,

Ujedinjeno Kraljevstvo). Pri ispitivanju profila nazalne depozicije praškastog sustava donepezila, uređaj UDSP bio je umetnut u desnu nosnicu, dok je lijeva nosnica bila začepljena prilikom aktivacije uređaja, tj. inspiracije. To je u skladu s uputama za primjenu većine nazalnih sprejeva koje su odobrile FDA i EMA (Moraga-Espinoza i sur., 2018). Zatvaranje jedne nosnice rezultira povećanjem brzine udahnutog zraka koji prolazi kroz nosnu šupljinu uz održavanje konstantnog protoka zraka (Moraga-Espinoza i sur., 2018). Uređaj je bio umetnut u nosnicu do dubine od 5 mm, pod kutom  $0^\circ$  u odnosu na vertikalnu os i  $30^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $60^\circ$  ili  $75^\circ$  u odnosu na horizontalnu ravninu (Slika 11.). Kut uređaja podešen je pomoću prilagodljivog kutomjera.



**Slika 11.** Pojednostavljeni prikaz variranih kutova primjene uređaja u model nosa u odnosu na horizontalnu ravninu.

U svrhu kvantitativnog određivanja količine lijeka odloženog u pojedinoj regiji modela, nakon pažljivog raslagivanja, svaka regija modela nosne šupljine kvantitativno je isprana pročišćenom vodom. Eluati su profiltrirani kroz filter veličine pora  $0,2 \mu\text{m}$  (Chromafil® Xtra PES-20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka). Sadržaj lijeka u filtratima određen je HPLC metodom opisanom u odjeljku 3.2.3.4. Izračunat je udio doze lijeka dostavljen u svaku od regija nosne šupljine.

### 3.2.9. Kvantitativno određivanje donepezila

Kvantitativno određivanje donepezila provedeno je HPLC metodom prema Pappa i sur. (2001), uz manje modifikacije. Kromatografski uvjeti navedeni su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Kromatografski uvjeti prilikom kvantitativnog određivanja donepezila HPLC metodom.

parametar	vrijednost
detektor	UV-Vis
kolona	Kinetex C18 kolona, promjera pora 2,6 $\mu\text{m}$ , 250 $\times$ 4,6 mm, 100 Å (Phenomenex, SAD)
protok	1,0 ml/min
temperatura kolone	25 °C
volumen injektiranja	20 $\mu\text{l}$
eluiranje	izokratno
mobilna faza	metanol : 0,02M fosfatni pufer : trietilamin = 50:50:0,5 (V/V/V) $\text{pH}=2,7 \pm 0,5$
valna duljina detekcije	268 nm

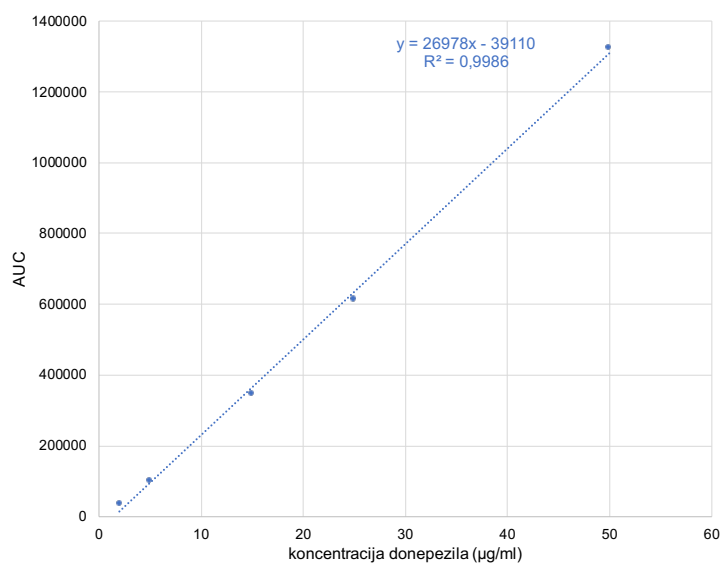
Kromatografski sustav sastojao se od autosamplera, kontrolera, pumpe, degazera, pećnice, kolone i detektora (sve sastavnice kromatografskog sustava su Series 200, PerkinElmer, SAD).

Mobilna faza izrađena je miješanjem metanola, 0,02 M fosfatnog pufera i trietilamina u volumnom omjeru 50:50:0,5. Pufer je pripremljen otapanjem 3,12 g natrijevog dihidrogenfosfata dihidrata u 900 ml deionizirane vode, miješanjem s 10 ml trietilamina, te je nadopunjeno vodom do oznake 1000 ml.  $\text{pH}$  pufera podešen je na  $2,7 \pm 0,5$  pomoću fosforne kiseline. Mobilna faza je potom profiltrirana kroz filter od regenerirane celuloze veličine pora 0,20  $\mu\text{m}$  (Sartorius GmbH, Njemačka) pri sniženom tlaku.

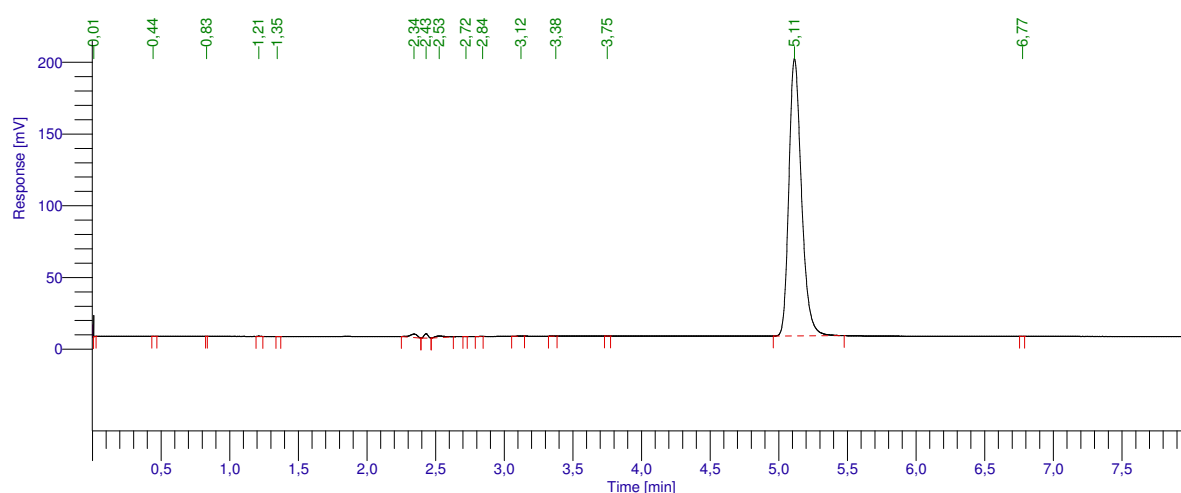
Standardna otopina donepezila koncentracije 1 mg/ml pripremljena je otapanjem 50 mg lijeka u deioniziranoj vodi u odmjernoj tikvici od 50 ml. Potom su pripravljene radne standardne otopine za izradu kalibracijskog pravca iz osnovne standardne otopine u koncentracijama 2, 5, 15, 25 i 50  $\mu\text{g/ml}$ . Izrađene su pipetiranjem odgovarajućih volumena osnovne standardne otopine i nadopunjivanjem deioniziranom vodom u odmjernim tikvicama od 25 ml. Pripremljene otopine su filtrirane kroz filter veličine pora 0,20  $\mu\text{m}$  (Chromafil® Xtra PES-

20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka) te injektirane u volumenu od 20 µl. Mjerenje je provedeno u triplikatu za svaku radnu standardnu otopinu.

Jednadžba kalibracijskog pravca određena je iz dobivenih površina pikova radnih standardnih otopina u ovisnosti o njihovoj koncentraciji:  $y = 26987x - 39110$ , koeficijent korelacije  $r = 0,9993$ . Kalibracijski pravac donepezila prikazan je na Slici 12. Na Slici 13. prikazan je odziv detektora na sadržaj donepezila u radnoj standardnoj otopini koncentracije 5 µg/ml, pri valnoj duljini 268 nm.



Slika 12. Kalibracijski pravac donepezila.



Slika 13. Odziv detektora na sadržaj donepezila u radnoj standardnoj otopini koncentracije 5 µg/ml.



Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) i granica određivanja (engl. *limit of quantification*, LOQ) izračunate su prema sljedećim jednadžbama (6 i 7) u kojima  $\sigma$  označava standardnu devijaciju linearnog regresijskog pravca, a  $s$  nagib regresijskog pravca:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \sigma}{s} \quad (6)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \sigma}{s} \quad (7)$$

U eksperimentu određena granica dokazivanja iznosila je  $\text{LOD} = 1,86 \mu\text{g/ml}$ , a granica određivanja  $\text{LOQ} = 2,82 \mu\text{g/ml}$ .

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

### 5.1. Uspješnost uklapanja i sadržaj donepezila u mikrosferama

Uspješnost uklapanja i sadržaj donepezila u mikrosferama određeni su HPLC metodom. Uspješnost uklapanja (EE) određena je prema jednadžbi (1) iz odjeljka 3.2. i za mikrosfere pripravljene u ovom radu iznosila je  $97,5 \pm 2,6$  %. U usporedbi s drugim istraživanim formulacijama donepezila za nazalnu primjenu (Tablica 2.), mikrosfere pripravljene u ovom radu karakterizirane su najvećom uspješnošću uklapanja donepezila.

Sadržaj donepezila (DL) izražen je kao maseni udio lijeka u mikrosferama ( $m/m$ ), a određen je prema jednadžbi (2) iz odjeljka 3.2. Sadržaj lijeka u mikrosferama pripremljenim u ovom radu iznosio je  $4,9 \pm 0,1$  %. S obzirom da je količina praška koja se može primijeniti jednim potiskom UDSP uređaja 15 mg, te da je prosječna dnevna doza oralno primjenjenog donepezila 5-10 mg, uklopljeni sadržaj donepezila u mikrosferama osigurao je približno 7,5% oralne doze što je prikladno za nazalnu primjenu ove formulacije (Erdo i sur., 2018; www.halmed.hr).

### 5.2. Raspodjela veličina mikrosfera s donepezilom

Depozicija čestica u dišnom sustavu opisuje se trima mehanizmima: inercijom, sedimentacijom i difuzijom, a među njima, inercija je glavni mehanizam depozicije u nosnoj šupljini (Vidgren i Kublik, 1998). Za učinkovitu nazalnu dostavu praškaste formulacije, važan čimbenik je veličina čestica. Kako čestice praškastog sustava odstupaju od idealnog sferičnog oblika, za opisivanje njihove veličine koristi se ekvivalentni sferični promjer. Ekvivalentni sferični promjer je promjer sferične čestice koja odgovara mjerenoj čestici po jednom od svojstava, npr. volumenu. Volumni promjeri koji se najčešće koriste u opisivanju raspodjele veličina čestica u uzorku su  $D_v10$ ,  $D_v50$  i  $D_v90$ . Broj 10, 50 ili 90 označava volumni postotni udio čestica koje su manje od navedenog promjera u odnosu na ukupni volumen svih čestica u uzorku. Dakle, promjer  $D_v10$  je onaj od kojeg manje čestice čine 10 % ukupnog volumena svih čestica u ispitivanom uzorku (Salade i sur., 2019).

Veličina mikrosfera pripremljenih u ovom radu određena je metodom laserske difrakcije, a rezultati izraženi volumnim promjerima  $D_v10$ ,  $D_v50$  i  $D_v90$ . Izmjerene su vrijednosti  $D_v10$ ,  $D_v50$  i  $D_v90$  redom od  $12,2 \pm 0,53$   $\mu\text{m}$ ,  $32,3 \pm 0,71$   $\mu\text{m}$  i  $72,1 \pm 0,74$   $\mu\text{m}$ .

Prema zahtjevima EMA-e većina čestica aerosoliziranih nazalnih pripravaka mora biti veličine veće od 10  $\mu\text{m}$  kako bi se osigurala depozicija u nosnoj šupljini, a spriječila inhalacija čestica u donje dišne putove (Europska agencija za lijekove, 2006). Za ispitivani uzorak vidljivo je da je većina mikrosfera veća od 10  $\mu\text{m}$  što odgovara zahtjevima.

Ranijim ispitivanjima je utvrđeno da se kapljice/čestice promjera 50-60  $\mu\text{m}$  odlažu uglavnom u srednjoj regiji nosne šupljine (Cheng i sur., 2001; Guo i Doub, 2006; Kundoor i Dalby, 2011). Međutim, ako je promjer kapljica/čestica prevelik, one se mogu odložiti u anteriornoj regiji nosa i brzo ukloniti kihanjem ili curenjem iz nosa. Kako bi to spriječili, bolesnici znaju jako udahnuti prilikom primjene, međutim to uzrokuje prijenos formulacije u posteriorne dijelove nosne šupljine, tj. u nazofarinks. Osim što se tako ne osigurava željena depozicija lijeka u nosnoj šupljini, to često uzrokuje i osjećaj neugodnog gorkog okusa što negativno utječe na suradljivost bolesnika (Djupesland i Skretting, 2012).

### 5.3. Reološka svojstva mikrosfera s donepezilom

Reološka svojstva praškastog sustava jako su važna jer o njima ovisi punjenje formulacije u uređaj kao i depozicija praška u nosnoj šupljini, tj. kut konusa raspršivanja i zaostajanje formulacije u uređaju nakon njegove aktivacije. Prema vrijednosti Hausnerova omjera Europska farmakopeja klasificira praške s obzirom na njihova svojstva tečenja u sedam kategorija kao što je prikazano u Tablici 4.

**Tablica 4.** Vrijednosti Hausnerovog omjera s odgovarajućim svojstvima tečenja (Ph. Eur. 9.0, 2016).

Hausnerov omjer	Tečenje
1,00 – 1,11	odlično
1,12 – 1,18	dobro
1,19 – 1,25	zadovoljavajuće
1,26 – 1,34	moguće
1,35 – 1,45	loše
1,46 – 1,59	vrlo loše
> 1,60	vrlo, vrlo loše

Za mikrosfere pripravljene u ovom radu, Hausnerov omjer iznosio je  $1,24 \pm 0,04$ . Stoga prema Europskoj farmakopeji spada u kategoriju prašaka sa zadovoljavajućim tečenjem.

Udio zaostalog praška (PR) u UDSP uređaju nakon njegove aktivacije kretao se između  $2,3 \pm 1,3 \%$  i  $3,5 \pm 1,9 \%$  ovisno o tome je li depozicija provedena pri udahu (20 l/min) ili bez udaha (0 l/min). Navedeni rezultati potvrđuju da UDSP uređaj omogućuje isporuku točne doze praškaste formulacije bliske nominalnoj dozi i realni su pokazatelji zadovoljavajućih svojstava tečenja ispitivane praškaste formulacije.

#### **5.4. Zeta potencijal mikrosfera s donepezilom**

Zeta potencijal pokazatelj je površinskog naboja na česticama formulacije. Zeta potencijal mikrosfera s donepezilom iznosio je  $38,3 \pm 1,3$  mV. Pozitivni zeta potencijal posljedica je prisustva pozitivno nabijenih amino skupina kitozana na površini mikrosfera. Kitozan je široko istraživani kationski mukoadhezivni polimer, čija mukoadhezivna svojstva proizlaze iz elektrostatske interakcije s negativno nabijenim skupinama mucina (Casettari i Illum, 2014).

#### **5.5. Sadržaj ostatne vlage u mikrosferama s donepezilom**

Sadržaj ostatne vlage u praškastim sustavima ima značajan utjecaj na svojstva tečenja i stabilnost prašaka. Svojstva tečenja praškastog sustava mogu se poboljšati prisutstvom male količine preostale vlage jer voda djeluje kao lubrikant smanjenjem elektrostatičkog naboja. Međutim, višak vode može uzrokovati stvaranje aglomerata i tako ograničiti učinkovitost raspršivanja formulacije (Crouter i Briens, 2014). Isto tako, višak vode može pogodovati hidrolitičkim reakcijama, ali i mikrobiološkoj kontaminaciji što bi negativno utjecalo na stabilnost pripravka.

Udio ostatne vlage manji od 10 % prihvatljiv je kod prašaka pripremljenih iz hidrofilnih polimera (Sander i sur., 2013; Shan i sur., 2016). U ovom radu korištene su mikrosfere čiji je sadržaj ostatne vlage (MC) iznosio  $3,8 \pm 0,3 \%$  što odgovara navedenom zahtjevu.

#### **5.6. Kut raspršenja mikrosfera s donepezilom**

Kut raspršenja mikrosfera iz UDSP uređaja iznosio je  $26,9 \pm 1,4^\circ$ . Kao što je ranije spomenuto, kut raspršenja povezan je sa svojstvima tečenja, tj. što je Hausnerov omjer manji, to su svojstva tečenja bolja i kut raspršenja uži (Nižić Nodilo i sur., 2021).

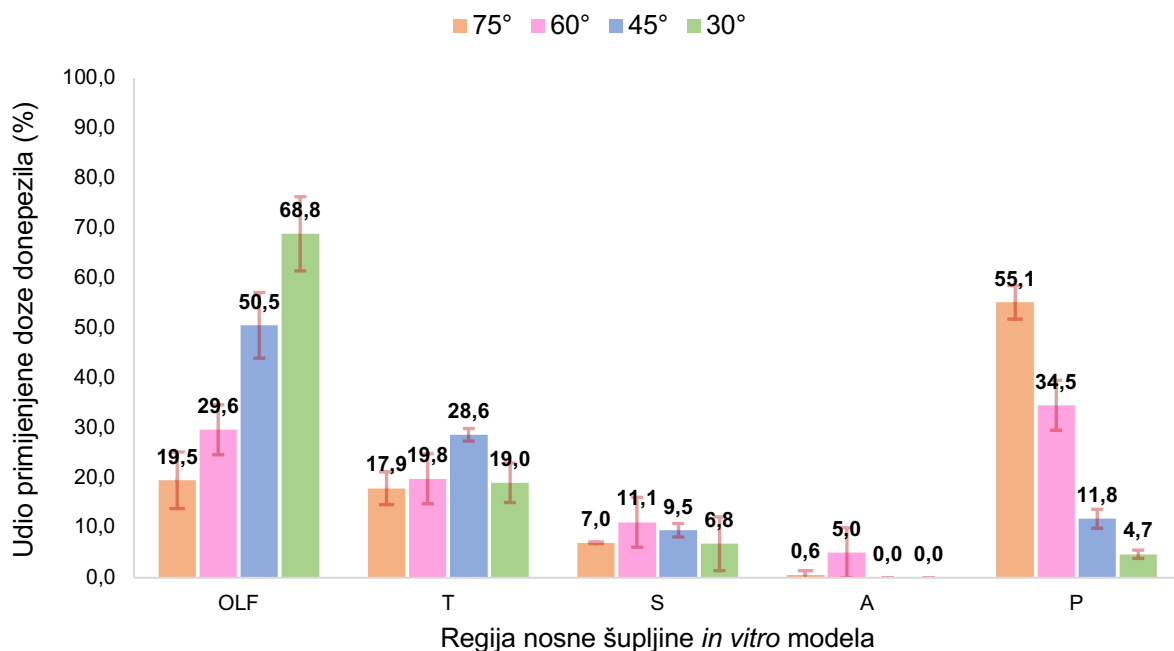
Kut raspršenja važan je i u pogledu ciljane dostave formulacije u olfaktornu i turbinatnu regiju nosne šupljine. Istraživanjima je utvrđeno da manji kut raspršenja pogoduje depoziciji u navedene regije, dok veći kut uzrokuje veću depoziciju u vestibularnoj/anteriornoj regiji nosa. (Cheng i sur., 2001; Foo i sur., 2007; Pu i sur., 2014; Nižić i sur., 2019). Razlog tome je nosna

valvula, područje nosne šupljine oko 3 cm distalno od otvora nosnica, koja predstavlja regiju najmanjeg poprečnog presjeka u cijeloj nosnoj šupljini. Nosna valvula, zbog suženja i turbulentnog protoka zraka, predstavlja prepreku učinkovitoj dostavi formulacije u distalnije regije nosne šupljine (Newman i sur., 1988; Dowley i Homer, 2001).

### 5.7. Profil nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom

Ispitivanja nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom provedena su na 3D printanom multisekcijskom modelu nazalne šupljine izrađenom na temelju CT snimke zdravih nazalnih putova 62-godišnjeg pacijenta. Multisekcijski model omogućio je precizno određivanje donepezila dostavljenog u različite dijelove nosne šupljine, s naglaskom na regije od interesa za ciljanu dostavu donepezila u mozak. Ciljana regija je olfaktorna, koju čini gornja turbinatna regija s malim dijelom srednje turbinatne regije i pripadajućim segmentom nazalnog septuma.

Profili depozicije mikrosfera s donepezilom u *in vitro* modelu nosne šupljine pri različitim kutovima primjene u odnosu na horizontalnu ravninu (30 °, 45 °, 60 ° i 75 °) i pri protoku udahnutog zraka od 0 l/min prikazani su na Slici 14.



**Slika 14.** Profil depozicije mikrosfera s donepezilom u modelu nosne šupljine pri primjeni UDSP uređajem pri različitim kutovima primjene u odnosu na horizontalnu ravninu (30 °, 45 °, 60 ° i 75 °) i pri protoku udahnutog zraka od 0 l/min. (OLF – olfaktorna regija, T – turbinatna regija, S – septum (bez segmenta koji pripada olfaktornoj regiji), A – anteriorna regija, P – posteriorna regija).

Depozicija mikrosfera s donepezilom u anteriornoj regiji nosne šupljine je vrlo mala i zanemariva iz čega je razvidna prikladnost razvijene formulacije za dostavu lijeka u područje iza nosne valvule.

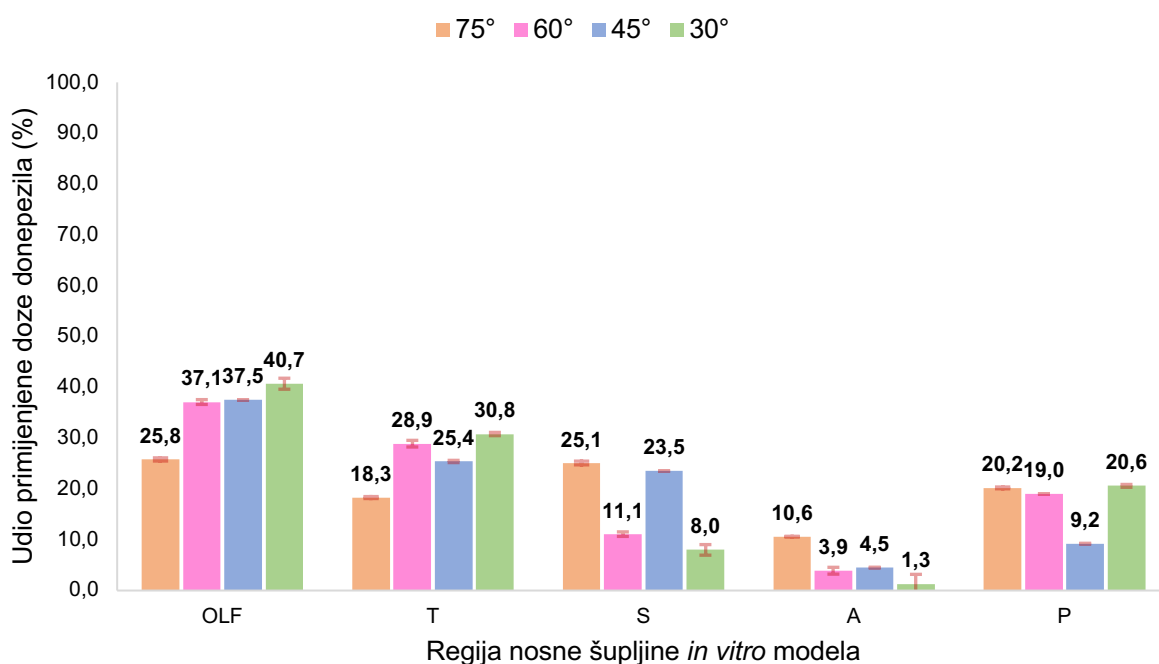
Udio donepezila dostavljenog u olfaktornu regiju kretao se između  $19,5 \pm 5,6$  % i  $68,8 \pm 7,4$  %, što potvrđuje potencijal razvijene formulacije za ciljanu dostavu lijeka u olfaktornu regiju. Udio donepezila koji je dosegao turbinatnu regiju kretao se između  $17,9 \pm 3,3$  % i  $28,6 \pm 1,3$  %. Ranije ispitivanje profila depozicije praškastog sustava natrijevog deksametazon fosfata, provedeno na istom modelu nosne šupljine, uz raspršivanje formulacije korištenjem uređaja MIAT rezultiralo je manjim udjelom lijeka dostavljenog u olfaktornu (maksimalnih  $17,0 \pm 1,6$  %) i turbinatnu regiju (maksimalnih  $17,0 \pm 1,8$  %) (Nižić Nodilo i sur., 2021). U radu Salade i suradnika (2018), ispitivanje depozicije nazalne formulacije grelina provedeno uz raspršivanje uređajem UDSP te primjenom različitog modela nosne šupljine, rezultiralo je depozicijom grelina u olfaktornoj regiji od 52 %, a u turbinatnoj regiji od 25 % što je sličnije rezultatima ostvarenima u ovom radu.

U provedenom ispitivanju nazalne depozicije najveći udio donepezila dostavljen u olfaktornu regiju ( $68,8 \pm 7,4$  %) postignut je pri kutu primjene od  $30^\circ$  u odnosu na horizontalnu ravninu. Pri *in vitro* ispitivanju depozicije *in situ* gelirajuće formulacije flutikazona pokazano je da se smanjenjem kuta primjene u odnosu na horizontalnu ravninu (od  $75^\circ$  do  $30^\circ$ ) povećava depozicija u turbinatnoj regiji (Nižić i sur., 2019). Do sličnog zaključka došli su i Warnken i sur. (2018) u ispitivanju depozicije otopine kromolin natrija u 3D printanim modelima nosne šupljine (Warnken i sur., 2018). Udio lijeka dostavljen u turbinatnu regiju može doprinjeti isporuci lijeka u SŽS putem trigeminalnog puta, ali je dostupan i za sistemsku apsorpciju zbog visoke prokrvljenosti respiratorne sluznice. Stoga je poželjno umjereno odlaganje lijeka u ovoj regiji, kako sistemski učinci lijeka ne bi bili preizraženi (Nižić Nodilo i sur., 2021). Dodatno, zanimljivo je primijetiti kako se depozicija u posteriornoj regiji nosne šupljine smanjivala sa smanjenjem kuta primjene u odnosu na horizontalnu ravninu.

U istraživanju profila nazalne depozicije triju komercijalno dostupnih sprejeva za nos na modelu nosne šupljine, kutovi primjene veći od  $60^\circ$  rezultirali su najvećom depozicijom u anteriornoj regiji, tj. području nosne valvule, dok su kutovi manji od  $45^\circ$  osigurali veću depoziciju u središnjim dijelovima nosne šupljine (Kundoor i Dalby, 2011). Također, sa smanjenjem kuta primjene u odnosu na horizontalnu ravninu, smanjivala se i površina nosne šupljine u kojoj je lijek odložen (Kundoor i Dalby, 2011).

Slične rezultate dobili su i Lungare i suradnici (2016) koji su u svojem istraživanju depozicije *in situ* gelirajuće formulacije amantadina u modelu nosne šupljine potvrdili anteriornu depoziciju pri većim kutovima u odnosu na horizontalnu ravninu (80 °), dok su kutovi od 60 ° i 70 ° rezultirali većom depozicijom u olfaktornoj regiji (Lungare i sur., 2016).

Profili depozicije mikrosfera s donepezilom u *in vitro* modelu nosne šupljine pri različitim kutovima primjene u odnosu na horizontalnu ravninu (30 °, 45 °, 60 ° i 75 °) i pri protoku udahnutog zraka od 20 l/min prikazani su na Slici 15.



**Slika 15.** Profil depozicije mikrosfera s donepezilom u modelu nosne šupljine pri primjeni UDSP uređajem pri različitim kutovima primjene u odnosu na horizontalnu ravninu (30 °, 45 °, 60 ° i 75 °) i pri protoku udahnutog zraka od 20 l/min. (OLF – olfaktorna regija, T – turbinatna regija, S – septum (bez segmenta koji pripada olfaktornoj regiji), A – anteriorna regija, P – posteriorna regija)

Protok udahnutog zraka od 20 l/min smanjio je odlaganje donepezila u ciljanoj regiji nosne šupljine u odnosu na primjenu istog sustava pri protoku udahnutog zraka od 0 l/min. Tako je najveći postotni udio dostavljene doze u olfaktornu regiju uz udah (20 l/min) iznosio  $40,7 \pm 0,3$  %, što je značajno manje u odnosu na odgovarajući udio doze dostavljen u olfaktornu regiju uz zadržavanje daha (0 l/min;  $68,8 \pm 7,4$  %). Ispitivanjem profila depozicije praškastog sustava natrijevog deksametazon fosfata na istom modelu nosne šupljine korištenjem uređaja MIAT također je utvrđeno smanjenje odlaganja lijeka u ciljnoj regiji nosne šupljine pri udahu, u odnosu na zadržavanje daha (Nižić Nodilo i sur., 2021).

Profili depozicije mikrosfera s donepezilom uz udah (20 l/min) karakterizirani su većim odlaganjem donepezila u regijama koje nisu od interesa za dostavu lijeka iz nosne šupljine u SŽS, odnosno u regijama koje rezultiraju gubitkom lijeka bilo u probavni/dišni sustav (odlaganje u posteriornoj regiji) bilo izvan organizma (odlaganje u anteriornoj regiji). Kao i kod primjene formulacije uz zadržavanje daha (0 l/min), tako je i pri udahu (20 l/min) najveći udio donepezila dostavljen u olfaktornu regiju ( $40,7 \pm 0,3$  %) pri kutu primjene od  $30^\circ$  u odnosu na horizontalnu ravninu.

Povoljniji profil depozicije donepezila u uvjetima bez udaha može biti koristan i iz pozicije pacijenta jer pojednostavljuje primjenu formulacije što može povećati suradljivost i kliničke ishode. Primjena je pojednostavljena jer su izbjegnuti problemi vezani uz koordinaciju potiska uređaja i udaha, kao i uz optimizaciju povoljne brzine udaha za odgovarajuće odlaganje lijeka u nosnoj šupljini (Nižić Nodilo i sur., 2021).



## 7. ZAKLJUČCI

- Sušenjem raspršivanjem uspješno su pripravljene mikrosfere s uklopljenim donepezilom, te kitozanom i manitolom kao pomoćnim tvarima.
- Postignuta je vrlo visoka uspješnost uklapanja lijeka ( $97,5 \pm 2,6 \%$ ). Sadržaj uklopljenog lijeka iznosio je  $4,9 \pm 0,1 \%$  pa je omogućena dostava prikladne doze lijeka u nosnu šupljinu, a s obzirom na ograničenu masu formulacije koja se može primijeniti u nosnicu.
- Veličina mikrosfera s donepezilom odgovarala je zahtjevima za nazalnu primjenu. Volumni promjeri  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$  iznosili su redom  $12,2 \pm 0,53 \mu\text{m}$ ,  $32,3 \pm 0,71 \mu\text{m}$  i  $72,1 \pm 0,74 \mu\text{m}$ .
- Mikrosfere s donepezilom pozitivnog su površinskog naboja (zeta potencijal iznosio je  $38,3 \pm 1,3 \text{ mV}$ ) te odgovarajućeg sadržaja ostatne vlage ( $3,8 \pm 0,3 \%$ ).
- Mikrosfere s donepezilom zadovoljavajućih su svojstava tečenja. Hausnerov omjer za ispitivani praškasti sustav iznosio je  $1,24 \pm 0,04$ . Udio zaostalog praška u UDSP uređaju nakon aktivacije iznosio je redom  $2,3 \pm 1,3 \%$  i  $3,5 \pm 1,9 \%$ , pri primjeni uz udah ( $20 \text{ l/min}$ ) i bez udaha ( $0 \text{ l/min}$ ). Navedeni rezultati potvrđuju da UDSP uređaj omogućuje isporuku točnih doza praškaste formulacije bliskih nominalnoj dozi.
- Kut raspršenja mikrosfera iz UDSP uređaja iznosio je  $26,9 \pm 1,4^\circ$  i omogućuje ciljanu dostavu formulacije iza nosne valvule.
- Najučinkovitija dostava donepezila u olfaktornu regiju nosne šupljine ( $68,8 \pm 7,4 \%$  primijenjene doze) postignuta je pri primjeni mikrosfera s donepezilom UDSP uređajem uz zadržavanje daha te pri kutu primjene prema horizontalnoj ravnini od  $30^\circ$ .
- Protok zraka od  $20 \text{ l/min}$  smanjio je odlaganje donepezila u olfaktornoj regiji, a povećao odlaganje formulacije u regijama koje nisu od interesa za dostavu lijeka iz nosne šupljine u SŽS. Najveći udio donepezila dostavljen u olfaktornu regiju ( $40,7 \pm 0,3 \%$ ) i uz udah je postignut pri kutu primjene od  $30^\circ$  u odnosu na horizontalnu ravninu.
- Povoljniji rezultati depozicije donepezila u uvjetima bez udaha mogu biti korisni i iz pozicije pacijenta jer pojednostavljaju primjenu formulacije što može povećati suradljivost i poboljšati kliničke ishode.

## 8. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

° - stupanj

3D – trodimenzionalni

AB - Alzheimerova bolest

AUC – površina ispod krivulje ovisnosti koncentracije lijeka o vremenu, engl. *area under the curve*

CFD - računalna dinamika fluida, engl. *computational fluid dynamics*

$c_{\max}$  – vršna koncentracija lijeka nakon jednokratnog doziranja

CoA - koenzim A

CSF - cerebrospinalni fluid

CT - računalna tomografija, engl. *computed tomography*

DL - sadržaj uklopljenog lijeka, engl. *drug loading*

DPZ - donepezil

EE - uspješnost uklapanja, engl. *entrapment efficiency*

EMA - Europska agencija za lijekove, engl. *European Medicines Agency*

FDA - Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država, engl. *US Food and Drug Administration*

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. *High Performance Liquid Chromatography*

i.g. - intragastrično

i.n. - intranazalno

i.v. - intravenski

KMB - krvno moždana barijera

$k_p$  – koeficijent permeabilnosti

LOD – granica dokazivanja, engl. *limit of detection*

LOQ – granica određivanja, engl. *limit of quantification*

$m_0$  - masa praška prije aktivacije uređaja

$m_a$  – masa praška primijenjenog aktivacijom uređaja

$m_k$  – masa na kraju eksperimenta

$m_p$  - masa praška na početku eksperimenta

MC - sadržaj vlage, engl. *moisture content*

MIAT - *Monodose inhaler attenuator*

NALT – limfno tkivo nazalne sluznice, engl. *Nasal-associated lymphoid tissue*

p.o. - peroralno

PDI - indeks polidisperznosti

PR - udio zaostalog praška, engl. *powder retention*

$s$  - nagib regresijskog pravca

SLP – čvrste lipidne nanočestice, engl. *solid lipid nanoparticles*

SNF - umjetni nazalni fluid, *simulated nasal fluid*

SŽS - središnji živčani sustav

$t_{1/2}$  - vrijeme poluživota lijeka

$t_{max}$  – vrijeme postizanja vršne koncentracije lijeka nakon jednokratnog doziranja

UDSP - *Unit Dose System Powder*

$\beta$  – beta

$\sigma$  - standardnu devijaciju linearnog regresijskog pravca

$\tau$  – tau

## 9. LITERATURA

Agrawal M et al. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *J Control Release*, 2018, 281, 139-177.

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

Al Harthi S et al. Nasal delivery of donepezil HCl-loaded hydrogels for the treatment of Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 2019, 9, 9563.

Aptar Pharma's Nasal Unidose Device Approved by US FDA, 2018., [www.drug-dev.com](http://www.drug-dev.com), pristupljeno 1.3.2022.

Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol*, 2002, 68, 209-245.

Baza lijekova, 2022., [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr), pristupljeno 20.2.2022.

Bhavna et al. Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: In vitro and in vivo safety evaluation. *Int J Biol Macromol*, 2014, 67, 418-425.

Bitter C, Suter-Zimmermann K, Surber C. Nasal drug delivery in humans. *Curr Probl Dermatol*, 2011, 40, 20-35.

Blood-brain barrirer, 2011., [www.rit.edu](http://www.rit.edu), pristupljeno 5.3.2022.

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

Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64, 640-665.

Cheng YS et al. Characterization of nasal spray pumps and deposition pattern in a replica of the human nasal airway. *J Aerosol Med*, 2001, 14, 267-280.

Chowdary KP, Rao YS. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27, 1717-1724.

Čolović MB et al. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*, 2013, 11, 315-335.

Costantino HR et al. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm*, 2007, 337, 1-24.

Crouter A, Briens L. The effect of moisture on the flowability of pharmaceutical excipients. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2014, 15, 65-74.

de Souza IFF et al. The liquid crystalline phase behaviour of a nasal formulation modifies the brain disposition of donepezil in rats in the treatment of Alzheimer's disease. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021, 203, 111721.

Dementia, 2021., [www.who.int](http://www.who.int), pristupljeno 1.3.2022.

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

Djupesland PG, Messina JC, Mahmoud RA. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview. *Ther Deliv*, 2014, 5, 709-733.

Djupesland PG, Skretting A. Nasal deposition and clearance in man: comparison of a bidirectional powder device and a traditional liquid spray pump. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2012, 25, 280-289.

Dowley AC, Homer JJ. The effect of inferior turbinate hypertrophy on nasal spray distribution to the middle meatus. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 2001, 26, 488-490.

Erdő F et al. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Res Bull*, 2018, 143, 155-170.

Espinoza LC et al. Development of a Nasal Donepezil-loaded Microemulsion for the Treatment of Alzheimer's Disease: in vitro and ex vivo Characterization. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2018, 17, 43-53.

Espinoza LC et al. Formulation Strategies to Improve Nose-to-Brain Delivery of Donepezil. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 64.

European Medicines Agency. Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products. European Medicines Agency: London, UK, 2006, 1–27.

European Pharmacopoeia 9.0, Methods of Analysis, Flowability, 01/2008:20916, (2016) 321-322; Powder flow, 01/2010:20936, (2016) 362- 365.

Filipović- Grčić J, Hafner A. Nasal powder drug delivery. U: Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes. Gad SH, New Jersey, John Wiley and Sons, 2008, str. 651-681.

Foo MY, Cheng YS, Su WC, Donovan MD. The influence of spray properties on intranasal deposition. *J Aerosol Med*, 2007, 20, 495-508.

Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Nasal Spray and Inhalation Solution, Suspension, and Spray Drug Products — Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. Food and Drug Administration: Rockville, SAD, 2002, 1-49.

Gauthier S, Rosa-Neto P, Morais JA, Webster C. World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia. London, Alzheimer's Disease International, 2021, str. 19-29.

Global health estimates: Leading causes of death, 2019., [www.who.int](http://www.who.int), pristupljeno 1.3.2022.

Gu F et al. Preparation, characterization, and in vivo pharmacokinetics of thermosensitive in situ nasal gel of donepezil hydrochloride. *Acta Pharm*, 2020, 70, 411-422.

Guo C, Doub WH. The influence of actuation parameters on in vitro testing of nasal spray products. *J Pharm Sci*, 2006, 95, 2029-2040.

Hanson LR, Frey WH II. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci*, 2008, 9, S5.

Illum L. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *J Control Release*, 2003, 87, 187-198.

Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11, 1-18.

Jacobson SA, Sabbagh MN. Donepezil: potential neuroprotective and disease-modifying effects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008, 4, 1363-1369.

Johnson NJ, Hanson LR, Frey WH. Trigeminal pathways deliver a low molecular weight drug from the nose to the brain and orofacial structures. *Mol Pharm*, 2010, 7, 884-893.

Kaur A et al. Treatment of Alzheimer's diseases using donepezil nanoemulsion: an intranasal approach. *Drug Deliv Transl Res*, 2020, 10, 1862-1875.

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

Kundoor V, Dalby RN. Effect of formulation- and administration-related variables on deposition pattern of nasal spray pumps evaluated using a nasal cast. *Pharm Res*, 2011, 28, 1895-1904.

Lengyel M et al. Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica*, 2019, 87, 20.

Lungare S, Bowen J, Badhan R. Development and Evaluation of a Novel Intranasal Spray for the Delivery of Amantadine. *J Pharm Sci*, 2016, 105, 1209-1220.

Maaz A, Blagbrough IS, De Bank PA. In Vitro Evaluation of Nasal Aerosol Depositions: An Insight for Direct Nose to Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 1079.

Mathison S, Nagilla R, Kompella UB. Nasal route for direct delivery of solutes to the central nervous system: fact or fiction? *J Drug Target*, 1998, 5, 415-441.

Moraga-Espinoza D et al. A modified USP induction port to characterize nasal spray plume geometry and predict turbinate deposition under flow. *Int J Pharm*, 2018, 548, 305-313.

Mourya VK, Inamdar NN. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *React Funct Polym*, 2008, 68, 1013-1051.

Mozak, 2014., [www.msd-prirucnici.placebo.hr](http://www.msd-prirucnici.placebo.hr), pristupljeno 5.3.2022.

Newman SP, Morén F, Clarke SW. Deposition pattern of nasal sprays in man. *Rhinology*, 1988, 26, 111-120.

Nižić L et al. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 141, 105-115.

Nižić L et al. Innovative sprayable in situ gelling fluticasone suspension: Development and optimization of nasal deposition. *Int J Pharm*, 2019, 563, 445-456.

Nižić Nodilo L et al. A Dry Powder Platform for Nose-to-Brain Delivery of Dexamethasone: Formulation Development and Nasal Deposition Studies. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 795.

Pappa H et al. A new HPLC method to determine Donepezil hydrochloride in tablets. *J Pharm Biomed Anal*, 2002 Jan, 27, 177-182.

Pardeshi CV, Belgamwar VS. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opin Drug Deliv*, 2013, 10, 957-972.

Pardridge WM. Blood-Brain Barrier and Delivery of Protein and Gene Therapeutics to Brain. *Front Aging Neurosci*, 2020, 10, 373.

Pardridge WM. CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 13, 963-975.

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

Pu Y, Goodey AP, Fang X, Jacob K. A Comparison of the Deposition Patterns of Different Nasal Spray Formulations Using a Nasal Cast, *Aerosol Sci Technol*, 2014, 48, 930-938.

Salade L et al. 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.

Sander C et al. Characterization of spray dried bioadhesive metformin microparticles for oromucosal administration. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85, 682-688.

Scherrmann JM. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol*, 2002, 38, 349-354.



Shan L et al. Formulation, optimization, and pharmacodynamic evaluation of chitosan/phospholipid/ $\beta$ -cyclodextrin microspheres. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10, 417-429.

Shigeta M, Homma A. Donepezil for Alzheimer's disease: pharmacodynamic, pharmacokinetic, and clinical profiles. *CNS Drug Rev*, 2001, 7, 353-368.

Sood S, Jain K, Gowthamarajan K. Intranasal therapeutic strategies for management of Alzheimer's disease. *J Drug Target*, 2014, 22, 279-294.

Thorne RG, Frey WH II. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet*, 2001, 40, 907-946.

Tiozzo Fasiolo L et al. Opportunity and challenges of nasal powders: Drug formulation and delivery. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 113, 2-17.

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

Vidgren MT, Kublik H. Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 29, 157-177.

Warnken ZN et al. Personalized Medicine in Nasal Delivery: The Use of Patient-Specific Administration Parameters To Improve Nasal Drug Targeting Using 3D-Printed Nasal Replica Casts. *Mol Pharm*, 2018, 15, 1392-1402.

Yasir M et al. Solid lipid nanoparticles for nose to brain delivery of donepezil: formulation, optimization by Box–Behnken design, in vitro and in vivo evaluation. *Artif Cells, Nanomed, Biotechnol*, 2018, 46, 1838-1851.

Zhao ZQ et al. An Update on the Routes for the Delivery of Donepezil. *Mol Pharm*, 2021, 18, 2482-2494.

## 10. SAŽETAK/SUMMARY

Alzheimerova bolest (AB) je kronična i progresivna bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS) s kompleksnim patološkim mehanizmima u podlozi. Glavna skupina lijekova koji se koriste u liječenju AB-a su inhibitori acetilkolinesteraze (donepezil, rivastigmin, galantamin). Unatoč velikom napretku u neuroznanosti i novim neuroterapeuticima, učinkovitost liječenja bolesti SŽS-a je ograničena postojanjem krvno moždane barijere. Iz tog razloga je smanjena učinkovitost sistemski primijenjenog lijeka u mozgu. Nazalna primjena lijekova pruža mogućnost izravne dostave u SŽS. Odlikuju ju brz nastup djelovanja, neinvazivnost te zaobilaženje probavnog sustava i prvog prolaska kroz jetru.

Cilj ovog rada bio je pripremiti i karakterizirati mikrosfere s donepezilom građene od kitozana i manitola te ispitati utjecaj parametara primjene (kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu i protok udahnutog zraka) na nazalnu depoziciju pripremljenih mikrosfera. Mikrosfere s donepezilom zadovoljile su kriterije za primjenu u nosnoj šupljini s obzirom na prikladnu uspješnost uklapanja, sadržaj lijeka, sadržaj vlage, površinski naboj i reološka svojstva. Pri ispitivanju depozicije u nosnoj šupljini, korišten je 3D printani model nosne šupljine, respiratorna pumpa (za simulaciju disanja) i UDSP uređaj razvijen za ciljanje olfaktorne regije. Mikrosfere s donepezilom uspješno su dostavljene u ciljnu (olfaktornu) regiju nosne šupljine. Smanjenjem kuta primjene uređaja u odnosu na horizontalnu ravninu rastao je udio lijeka dostavljen u olfaktornu regiju. Primjena UDSP uređaja uz zadržavanje daha rezultirala je većom depozicijom lijeka u ciljnoj olfaktornoj regiji, te manjom depozicijom u anteriornoj i posteriornoj regiji, u odnosu na primjenu uz udah.

Alzheimer's disease (AD) is a chronic and progressive disease of the central nervous system (CNS) with complex underlying pathological mechanisms. The main group of medications used in the AD treatment are acetylcholinesterase inhibitors (donepezil, rivastigmine, galantamine). Despite great advances in neuroscience and new neurotherapeutics, the effectiveness of CNS disease treatment is primarily limited by the existence of a blood-brain barrier. Thus, brain bioavailability of a systemically administered drug is reduced. Nasal administration enables direct CNS delivery of the drug. It is characterized by rapid onset of action, non-invasiveness, bypass of the gastrointestinal tract and first-pass metabolism.

The aim of this study was to prepare and characterize chitosan/mannitol based donepezil-loaded microspheres and to examine the influence of administration parameters (administration angle in relation to the horizontal plane and inspiratory flow rate) on nasal deposition of prepared microspheres. Donepezil-loaded microspheres met the criteria for nasal application with respect to appropriate entrapment efficiency, drug loading, moisture content, surface charge, and rheological properties. In nasal deposition studies, a 3D printed nasal cavity model, a respiratory pump (for simulating breathing) and a UDSP delivery device were used. Donepezil-loaded microspheres were successfully delivered to the targeted (olfactory) region of the nasal cavity. By reducing the administration angle in relation to the horizontal plane, the proportion of drug delivered to the olfactory region increased. The use of the device at breath-hold resulted in higher drug deposition in the targeted olfactory region, and lower deposition in the anterior and posterior regions, compared to application under breathing conditions.

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## **IN VITRO ISPITIVANJE NAZALNE DEPOZICIJE MIKROSFERA S DONEPEZILOM**

**Tamara Topalović**

### **SAŽETAK**

Alzheimerova bolest (AB) je kronična i progresivna bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS) s kompleksnim patološkim mehanizmima u podlozi. Glavna skupina lijekova koji se koriste u liječenju AB-a su inhibitori acetilkolinesteraze (donepezil, rivastigmin, galantamin). Unatoč velikom napretku u neuroznanosti i novim neuroterapeuticima, učinkovitost liječenja bolesti SŽS-a je ograničena postojanjem krvno moždane barijere. Iz tog razloga je smanjena učinkovitost sistemski primijenjenog lijeka u mozgu. Nazalna primjena lijekova pruža mogućnost izravne dostave u SŽS. Odlikuju ju brz nastup djelovanja, neinvazivnost te zaobilazanje probavnog sustava i prvog prolaska kroz jetru. Cilj ovog rada bio je pripremiti i karakterizirati mikrosfere s donepezilom građene od kitozana i manitola te ispitati utjecaj parametara primjene (kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu i protok udahnutog zraka) na nazalnu depoziciju pripremljenih mikrosfera. Mikrosfere s donepezilom zadovoljile su kriterije za primjenu u nosnoj šupljini s obzirom na prikladnu uspješnost uklapanja, sadržaj lijeka, sadržaj vlage, površinski naboj i reološka svojstva. Pri ispitivanju depozicije u nosnoj šupljini, korišten je 3D printani model nosne šupljine, respiratorna pumpa (za simulaciju disanja) i UDSP uređaj razvijen za ciljanje olfaktorne regije. Mikrosfere s donepezilom uspješno su dostavljene u ciljnu (olfaktornu) regiju nosne šupljine. Smanjenjem kuta primjene uređaja u odnosu na horizontalnu ravninu rastao je udio lijeka dostavljen u olfaktornu regiju. Primjena UDSP uređaja uz zadržavanje daha rezultirala je većom depozicijom lijeka u ciljnoj olfaktornoj regiji, te manjom depozicijom u anteriornoj i posteriornoj regiji, u odnosu na primjenu uz udah.

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

Rad sadrži: 46 stranica, 15 grafičkih prikaza, 4 tablice i 73 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nazalna primjena, donepezil, mikrosfere, nazalna depozicija, model nosne šupljine

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ivan Pepić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### ***IN VITRO* EVALUATION OF NASAL DEPOSITION OF DONEPEZIL-LOADED MICROSPHERES**

**Tamara Topalović**

#### **SUMMARY**

Alzheimer's disease (AD) is a chronic and progressive disease of the central nervous system (CNS) with complex underlying pathological mechanisms. The main group of medications used in the AD treatment are acetylcholinesterase inhibitors (donepezil, rivastigmine, galantamine). Despite great advances in neuroscience and new neurotherapeutics, the effectiveness of CNS disease treatment is primarily limited by the existence of a blood-brain barrier. Thus, brain bioavailability of a systemically administered drug is reduced. Nasal administration enables direct CNS delivery of the drug. It is characterized by rapid onset of action, non-invasiveness, bypass of the gastrointestinal tract and first-pass metabolism. The aim of this study was to prepare and characterize chitosan/mannitol based donepezil-loaded microspheres and to examine the influence of administration parameters (administration angle in relation to the horizontal plane and inspiratory flow rate) on nasal deposition of prepared microspheres. Donepezil-loaded microspheres met the criteria for nasal application with respect to appropriate entrapment efficiency, drug loading, moisture content, surface charge, and rheological properties. In nasal deposition studies, a 3D printed nasal cavity model, a respiratory pump (for simulating breathing) and a UDSP delivery device were used. Donepezil-loaded microspheres were successfully delivered to the targeted (olfactory) region of the nasal cavity. By reducing the administration angle in relation to the horizontal plane, the proportion of drug delivered to the olfactory region increased. The use of the device at breath-hold resulted in higher drug deposition in the targeted olfactory region, and lower deposition in the anterior and posterior regions, compared to application under breathing conditions.

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

Thesis includes: 46 pages, 15 figures, 4 tables and 73 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nasal drug administration, donepezil, microspheres, nasal deposition, nasal cast

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

**Ivan Pepić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2022.