

Utjecaj molekulske mase kitozana na svojstva mikrosfera s donepezilom pripremljenih sušenjem raspršivanjem

Potočki, Ivana

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:948161>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



Ivana Potočki

**Utjecaj molekulske mase kitozana na svojstva
mikrosfera s donepezilom pripremljenih sušenjem
raspršivanjem**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

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

Hvala asistenciji Mirni Perkušić, mag. pharm. na prijateljskom pristupu, savjetima, uloženoj trudu i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada te hvala svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.

Posebno hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci tijekom života.

Hvala kolegama i prijateljima na svim savjetima i lijepim trenucima tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Alzheimerova bolest.....	1
1.2. Liječenje Alzheimerove bolesti	1
1.2.1. Antagonisti receptora N-metil-D-aspartata	1
1.2.2. Inhibitori acetilkolinesteraze	1
1.2.3. Donepezil	2
1.2.4. Otežana ciljna dostava lijeka u središnji živčani sustav	3
1.3. Nazalna primjena lijekova	3
1.3.1. Građa nosne šupljine.....	4
1.3.2. Izravna dostava lijeka iz nosne šupljine u mozak.....	5
1.3.3. Praškasti sustavi za nazalnu primjenu	5
1.4. Sušenje raspršivanjem	6
1.5. Kitozan	6
1.5.1. Utjecaj kemijskih modifikacija kitozana na svojstva terapijskih sustava	7
1.6. Svojstva tečenja prašaka.....	9
1.7. Zeta potencijal.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME	10
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijali	12
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Priprema otopina za sušenje raspršivanjem	12
3.2.2. Određivanje reoloških svojstava otopina	13
3.2.3. Izrada mikrosfera sušenjem raspršivanjem	14
3.2.4. Određivanje uspješnosti uklapanja i sadržaja donepezila u mikrosferama.....	15
3.2.5. Određivanje raspodjele veličina mikrosfera.....	15
3.2.6. Određivanje svojstava tečenja prašaka	16
3.2.7. Određivanje ostatka u kapsuli	16
3.2.8. Određivanje kuta raspršenja	17
3.2.9. Mjerenje zeta potencijala	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Priprema otopina za sušenje raspršivanjem.....	19
4.2. Reološka svojstva otopina za sušenje raspršivanjem	19
4.2.1. Viskoznost pri mirovanju	19
4.2.2. Krivulje viskoznosti.....	20

4.3. Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem	21
4.4. Uspješnost uklapanja i sadržaj donepezila u mikrosferama	21
4.5. Raspodjela veličina mikrosfera s donepezilom	22
4.6. Svojstva tečenja mikrosfera s donepezilom.....	23
4.7. Kut raspršenja mikrosfera s donepezilom	24
4.8. Ostatna masa mikrosfera s donepezilom u kapsuli nakon raspršivanja	25
4.9. Zeta potencijal mikrosfera s donepezilom.....	26
5. ZAKLJUČCI.....	27
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	29
7. LITERATURA.....	30
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	36
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest je progresivna neurodegenerativna bolest i predstavlja glavni uzrok demencije u svijetu (Khan i sur., 2020). Obično se pojavljuje u srednje zreloj dobi, brzo napreduje i vodi do kliničkih simptoma koji uključuju gubitak pamćenja, poremećaje govora, teško snalaženje u prostoru, a u kasnijim stadijima poremećaje hoda, napadaje grčeva, poremećaje ponašanja i neuropsihijatrijske simptome. Kako bolesnici ne mogu samostalno obavljati svakodnevne aktivnosti, često im je potrebna stalna skrb (Hall, 2016). Procjenjuje se da više od 55 milijuna ljudi živi s demencijom, a do 2050. ta bi brojka mogla dosegnuti 139 milijuna (www.who.int).

Istraživanja su pokazala da su u mozgu osoba s Alzheimerovom bolešću prisutni izvanstanični amiloidni plakovi i unutarstanični neurofibrilarni snopovi. Prvi su povezani s nakupljanjem beta amiloidnog peptida, a drugi s nepravilnom fosforilacijom tau proteina. Pokazano je da se s akumulacijom plakova i snopova pogoršavaju bihevioralni simptomi bolesti zbog oštećenja i uništavanja neurona, ali i da beta amiloidni peptid i tau protein neovisno o svojoj akumulaciji potiču obolijevanje neurona (Bloom, 2014; Hall, 2016).

1.2. Liječenje Alzheimerove bolesti

1.2.1. Antagonisti receptora N-metil-D-aspartata

Pretjerana aktivacija receptora N-metil-D-aspartata (NMDA) glutamatom dovodi do ekscitotoksičnosti i promovira staničnu smrt. Kako to predstavlja potencijalni mehanizam neurodegeneracije u Alzheimerovoj bolesti, razvijen je antagonist NMDA receptora memantin (Wang i Reddy, 2017).

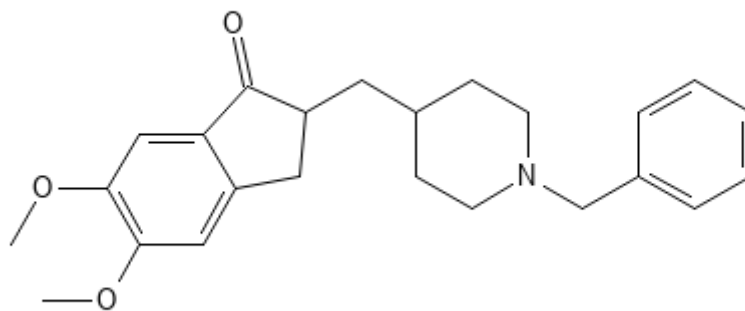
1.2.2. Inhibitori acetilkolinesteraze

Acetilkinolin ima važnu ulogu u kognitivnim funkcijama poput pamćenja, pažnje i učenja. Otkriveno je da degeneracija kolinergičkih neurona u mozgu uzrokuje smanjenje kognitivnih funkcija i gubitak pamćenja. Zbog toga su razvijani inhibitori acetilkolinesteraze koji sprječavaju razgradnju acetilkolina, što rezultira povećanjem njegove koncentracije u sinapsi. Inhibitori acetilkolinesteraze, kao i antagonisti NMDA receptora, ne liječe bolest niti sprječavaju njenu progresiju, već smanjuju simptome bolesti (Breijyeh i Karaman, 2020). Trenutno su iz ove skupine odobreni lijekovi donepezil, rivastigmin i galantamin, od kojih se

svi navedeni na tržištu nalaze u oblicima za oralnu primjenu, dok je rivastigmin dostupan i u obliku transdermalnog flastera (www.halmed.hr).

1.2.3. Donepezil

Donepezil je visokoselektivni reverzibilni inhibitor acetilkolinesteraze (Slika 1.). Od njegovih učinaka najvažnije je povećanje kolinergičke transmisije, a uz to smanjuje neuralnu toksičnost β -amiloidnih proteina i neurotoksičnost posredovanu glutamatom. Zbog svoje farmakološke aktivnosti donepezil se često koristi za smanjenje neuropsihijatrijskih simptoma, ali i poboljšanje kognitivne funkcije pacijenata s blagom do umjerenom Alzheimerovom bolesti (Espinoza i sur., 2019).



Slika 1. Struktura donepezila nacrtana pomoću Draw Structure alata dostupnog na stranici www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

Nakon oralne primjene, postiže vršne koncentracije u plazmi za otprilike 3 do 4 sata. Hrana ne utječe na apsorpciju donepezila. Stanje dinamičke ravnoteže postiže se u roku 2 do 3 tjedna od početka terapije (Shigeta i Homma, 2001). Vrijeme polueliminacije iznosi približno 70 sati (www.halmed.hr).

Oralna primjena donepezila ima nekoliko nedostataka. Jedan nedostatak je metabolizam prvog prolaska kroz jetru jer je donepezil supstrat jetrenih enzima CYP2D6 i CYP3A4. Drugi su gastrointestinalne nuspojave, npr. dijareja, mučnina, povraćanje, abdominalni bolovi, anoreksija i smetnje u abdomenu. Problem predstavlja i niska bioraspodivnost u mozgu jer lijek slabo prolazi krvno-moždanu barijeru (Espinoza i sur., 2019; Shigeta i Homma, 2001).

Primjena tablete s dozom donepezila od 5 ili 10 mg jedanput dnevno za pacijente s otežanim gutanjem nije idealna. Kad se tome pridodaju navedene gastrointestinalne nuspojave, uočava

se važnost razvijanja novih farmaceutskih oblika koji se ne primjenjuju oralno (Bhavna i sur., 2014).

1.2.4. Otežana ciljna dostava lijeka u središnji živčani sustav

Liječenje bolesti središnjeg živčanog sustava je posebno izazovno zbog otežane dostave lijekova do mozga i leđne moždine.

Krvno-moždana barijera predstavlja važnu prepreku prolazu molekula djelatne tvari iz sistemske cirkulacije u mozak (Al Asmari i sur., 2016). Pod pojmom krvno-moždana barijera podrazumijevaju se jedinstvena svojstva kapilara u središnjem živčanom sustavu (engl. *central nervous system*, CNS). Krvne žile u CNS-u građene su tako da reguliraju prolazak molekula, iona i stanica iz krvi u CNS. To omogućava ispravno funkcioniranje CNS-a, ali i njegovu zaštitu od toksina, patogena, upale i bolesti (Daneman i Prat, 2015). Glavne značajke krvno-moždane barijere su prisutnost čvrstih spojeva (engl. *tight junctions*) među endotelnim stanicama, stanica mikroglije, pericita, astrocita te smanjena propusnost i smanjena pinocitoza (Al Asmari i sur., 2016). Na luminalnoj strani endotelnih stanica P-glikoprotein (transportni protein ovisan o adenozin-trifosfatu (ATP-u) smanjuje nakupljanje mnogih molekula u mozgu tako što ih izbacuje iz mozga natrag u krvotok. Kako su stanice tijesno povezane, paracelularni prijenos je vrlo ograničen pa molekule moraju prelaziti biološku barijeru transcitozom (ako su visoke lipofilnosti i molekulske mase manje od 450 Da) ili transportom posredovanim nosačima, odnosno receptorima (Battaglia i sur., 2018).

Razvijene su različite strategije kako zaobići krvno-moždanu barijeru, od invazivnih izravnih injekcija ili infuzija, preko modifikacija djelatnih tvari, do transporta posredovanog nosačima. No, nazalna primjena pokazala se kao obećavajući, neinvazivni pristup za izravnu dostavu lijeka do mozga zaobilazeći krvno-moždanu barijeru (Chen i sur., 2014).

1.3. Nazalna primjena lijekova

Lijekovi se mogu dobro apsorbirati nakon nazalne primjene zbog razvijene vaskularne mreže u nosnoj šupljini, ali većina apsorbiranih lijekova ne može prijeći iz sistemske cirkulacije u mozak zbog krvno-moždane barijere. Ipak, kliničke studije i studije na životinjama pokazale su da je moguća izravna dostava lijekova iz nosa u mozak, zaobilazeњem krvno-moždane barijere i metabolizma prvog prolaska kroz jetru (Bhavna i sur., 2014; Chen i sur., 2014).

Nazalni put primjene predstavlja alternativnu, bezbolnu i neinvazivnu metodu zaobilazanja krvno-moždane barijere s nekoliko prednosti. Nazalnom primjenom moguća je izravna dostava

lijeka u mozak olfaktornim i trigeminalnim živcem. Zbog brze apsorpcije, poboljšana je bioraspoloživost i ubrzano je djelovanje lijeka. Smanjena je sistemska raspoloživost u odnosu na druge oblike sistemske primjene čime su minimizirane nuspojave. Usto, nazalna primjena pogodna je i za gerijatrijske pacijente s problemima gutanja oralnih oblika. Neki nedostaci povezani s nazalnom primjenom su slaba permeabilnost (posebice hidrofилnih i/ili molekula velike molekulske mase), enzimatska razgradnja i mukocilijarni klirens. Zbog toga je važan razvoj inovativnih formulacija koje osiguravaju poboljšanu topljivost i permeabilnost lijeka, produljeno vrijeme zadržavanja te zaštitu lijeka od enzimatske razgradnje (Espinoza i sur., 2019).

1.3.1. Građa nosne šupljine

Nos je odgovoran za više fizioloških funkcija kao što su osjet njuha i disanje. Sastoji se od dvije simetrične šupljine odvojene septumom. Nosna šupljina je od usne šupljine odvojena nepčanom kosti (Erdő i sur., 2018).

Nosne se šupljine dalje mogu podijeliti na tri regije. Prva od njih je vestibularna regija. Sadrži dlake koje filtriraju čestice iz udahnutog zraka. Zbog njene male površine i građe epitela (višeslojni pločasti epitel), apsorpcija lijekova u ovoj regiji vrlo je ograničena. Druga je respiratorna regija koja uključuje nosne školjke (donju, srednju i gornju). Prekrivena je respiratornim epitelom koji se sastoji od četiri osnovna tipa stanica: vrčastih stanica, cilijarnih i necilijarnih cilindričnih stanica te bazalnih stanica. Vrčaste stanice izlučuju mucin tvoreći mukozni sloj kojeg lijek mora proći kako bi se apsorbirao. Bazalne stanice po potrebi mogu diferencirati u ostale tipove stanica nosne šupljine. Cilijarne i necilijarne stanice imaju razvijene mikrovile koji im dodatno povećavaju površinu. Velika površina u kombinaciji s visokim stupnjem prokrvljenosti čini respiratornu sluznicu odličnim mjestom za apsorpciju lijekova u sistemska cirkulaciju, ali ne i u CNS. No, kako ovu regiju inerviraju ogranci trigeminalnog živca, ona predstavlja moguću metu za prijenos lijekova u CNS zajedno s olfaktornom regijom (Erdő i sur., 2018). Olfaktorna regija prekrivena je olfaktornim epitelom odgovornim za osjet njuha građenim od olfaktornih stanica smještenih između potpornih stanica te bazalnih stanica. Zbog izravnog kontakta s toksinima iz vanjskog okoliša, olfaktorni neuroni moraju se regenerirati svakih 3 do 4 tjedna iz bazalnih stanica. Tijekom sazrijevanja neurona neke karakteristike poput čvrstih spojeva među stanicama nisu u potpunosti funkcionalne, pa je moguće da zbog toga nazalna barijera postaje propusnija (Battaglia i sur., 2018).

1.3.2. Izravna dostava lijeka iz nosne šupljine u mozak

Nazalno primijenjeni lijekovi odlažu se u prednjim dijelovima i segmentu respiratorne regije nosa ako se primjenjuju konvencionalnim uređajima za raspršivanje, dok neki specijalizirani uređaji mogu učinkovitije dostaviti lijek u olfaktornu regiju. Lijek se s mjesta depozicije, ovisno o svojoj molekulskoj masi, naboju i lipofilnosti, može apsorbirati u sistemsku cirkulaciju ili se mukocilijarnim klirensom iščistiti u probavni sustav preko nazofarinksa (Casettari i Illum, 2014). Nazalno primijenjeni lijek može biti dostavljen u mozak preko tri glavna puta: izravnim paracelularnim ili transcelularnim transportom preko olfaktornih ili epitelnih stanica, transportom preko trigeminalnog živca te sistemskim putem ako je dovoljno lipofilan da prijeđe krvno-moždanu barijeru. Olfaktorni neuroni započinju u olfaktornom bulbusu u mozgu, a završavaju na apikalnoj strani olfaktornog epitela u nosnoj šupljini zbog čega su u izravnom kontaktu s okolinom. Za razliku od njih, završeci ogranaka trigeminalnog živca nisu u izravnom kontaktu s lumenom nosne šupljine, već se nalaze unutar epitela, blizu apikalne površine, u razini čvrstih spojeva. Iz tog razloga, lijek mora proći epitelnu barijeru paracelularnim ili transcelularnim putem da bi ušao u trigeminalni živac (Casettari i Illum, 2014).

1.3.3. Praškasti sustavi za nazalnu primjenu

Lijekovi za nazalnu primjenu najčešće su oblikovani kao tekući farmaceutski oblici, a rjeđe kao prašci i gelovi. Praškasti oblici sve se više ističu zbog povećane stabilnosti, mogućeg korištenja većih doza i duljeg vremena zadržavanja u nosnoj šupljini, što rezultira boljom apsorpcijom (Tanaka i sur., 2017). Vrijeme zadržavanja i/ili apsorpciju lijeka moguće je dodatno povećati korištenjem specifičnih pomoćnih tvari pri oblikovanju nazalnih prašaka, kao što su topljiva i netopljiva punila, mukoadhezivni agensi, pospješivači apsorpcije i inhibitori enzima. Mukoadhezivni polimeri pokazali su se kao potencijalno najučinkovitiji u produljenju vremena zadržavanja lijeka u nosnoj šupljini. Polimerni lanci imaju sposobnost hidracije pri kontaktu s nosnom sluzi, pri čemu dehidriraju sluz, a istovremeno se isprepliću s mucinima i tako mijenjaju reološka svojstva mukoznog sloja (Trenkel i Scherließ, 2021).

Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) donijela je smjernice za proizvodnju farmaceutskih oblika za inhalaciju i nazalnu primjenu (www.ema.europa.eu).

Preporuke su usredotočene na fizikalnu karakterizaciju, ispitivanje raspodjele veličina čestica i stabilnost (Trenkel i Scherließ, 2021).

1.4. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem je proces prevođenja otopine, suspenzije, emulzije ili disperzije u praškasti sustav u jednom koraku (Ziaee i sur., 2019). Uređaji za sušenje raspršivanjem sastoje se od četiri glavna dijela: komore za sušenje, atomizatora, aspiratora te ciklona za separaciju i sakupljanje produkta (Ameri i Maa, 2006). Kada atomizirane kapljice tekućine uđu u komoru za sušenje s plinovitim medijem visoke temperature, otapalo isparava, a osušene krute čestice odvajaju se od plina za sušenje u ciklonu (Ziaee i sur., 2019).

Procesni parametri sušenja raspršivanjem uvelike utječu na izgled i fizičko-kemijska svojstva suhog produkta. Ulazna temperatura treba biti što viša, a razlika između ulazne i izlazne temperature što manja kako bi se dobio uzorak sa što manjim sadržajem ostatne vlage/otapala. Velika brzina aspiratora rezultira kraćim vremenom zadržavanja uzorka u komori za sušenje i većim sadržajem ostatne vlage/otapala, ali i boljim odvajanjem čestica u ciklonu. Manja brzina dotoka uzorka (regulirana radom peristaltičke pumpe), uz konstantnu ulaznu temperaturu i postavku aspiratora, osigurava manji sadržaj ostatne vlage/otapala u produktu zbog manje količine otparenog otapala u promatranom vremenu, manje zasićenosti plina za sušenje otparenim otapalom i posljedično veće izlazne temperature plina za sušenje. Povećanjem snage sapsnice dobivaju se manje čestice, a povećanjem koncentracije otopljenih tvari u uzorku za sušenje raspršivanjem dobivaju se veće čestice (www.buchi.com).

Glavne prednosti sušenja raspršivanjem su velika specifična površina raspršenih kapljica u kontaktu s plinom za sušenje zbog koje je sušenje brzo te prikladnost metode za termolabilne tvari jer se čestice hlade isparavanjem otapala. Također, prilagođavanjem procesnih i formulacijskih parametara moguće je utjecati na veličinu i morfologiju čestica suhog produkta. Nedostatak je visoka cijena opreme i termalna neučinkovitost zbog zagrijavanja velikih količina zraka (Aulton i Taylor, 2018).

1.5. Kitozan

Kitozan je biorazgradljivi i biokompatibilni polisaharid uvršten u GRAS (engl. *generally recognized as safe*) materijale. Dobiven je deacetilacijom hitina iz ljusaka školjkaša i rakova. Građen je od nasumično povezanih jedinica glukozamina i N-acetilglukozamina. Kemijske modifikacije poput stupnja deacetilacije (opisuje se kao prosječan broj N-acetilglukozamina na 100 monomernih jedinica kitozana) i molekulske mase određuju fizikalno-kemijska te biološka svojstva kitozana, pa se kitozani različitih molekulskih masa razlikuju po topljivosti i

konformaciji, što je važno za učinkovitost u farmaceutskim oblicima (Casettari i Illum, 2014; Espinoza i sur., 2022; Sun i sur., 2009).

Kitozan je poznati bioadhezivni polimer i pospješivač apsorpcije (Charlton i sur., 2007). Pozitivno je nabijen pri kiselom pH te ulazi u interakcije s negativno nabijenim mucinom, odnosno njegovom komponentom sijalinskom kiselinom, pa produljuje vrijeme zadržavanja farmaceutskog oblika u nosnoj šupljini (Casettari i Illum, 2014). Zbog svog pozitivnog naboja, kitozan ulazi i u interakcije sa staničnom membranom tako da reverzibilno otvara međustanične čvrste veze i tako omogućuje transport hidrofilnih tvari paracelularnim putem, što dodatno pridonosi poboljšanju permeabilnosti (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012; Yeh i sur., 2011). Istraživanja na štakorima pokazala su da je učinak kitozana na povećanje propusnosti stanične membrane prolazan te je normalna permeabilnost uspostavljena već nakon 60 minuta (Illum i sur., 1994).

1.5.1. Utjecaj kemijskih modifikacija kitozana na svojstva terapijskih sustava

Molekulska masa kitozana može utjecati na viskoznost pripremljenih otopina za sušenje raspršivanjem. Niskomolekulski kitozan ima bolju topljivost u vodi i kraće polimerne lance, pa otopine koje ga sadrže imaju manju viskoznost, što u konačnici rezultira proizvodnjom manjih čestica (Gholizadeh i sur., 2019; Omar Zaki i sur., 2015). Povećanje molekulske mase kitozana rezultira povećanjem viskoznosti otopina za sušenje raspršivanjem i većim srednjim promjerom proizvedenih čestica (Bruinsmann i sur., 2019; Gholizadeh i sur., 2019).

Pokazano je da molekulska masa i stupanj deacetilacije kitozana kao pomoćne tvari u oblikovanju lijeka utječu na citotoksična svojstva kitozana i potencijal povećanja permeabilnosti lijeka. Upotreba kitozana s visokim stupnjem deacetilacije i velikom molekulskom masom rezultira najvećim povećanjem permeabilnosti lijeka (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012). Srednjemolekulski i visokomolekulski kitozan imaju bolju sposobnost interakcije s većim brojem molekula sijalinske kiseline, što dovodi do učinkovitije mukoadhezivnosti (Bruinsmann i sur., 2019). Smanjenje stupnja deacetilacije kitozana rezultira slabljenjem njegovog citotoksičnog djelovanja (Huang i sur., 2004). Sva su navedena znanja dovela do zaključka da se odabirom kitozana optimalne molekulske mase i stupnja deacetilacije mogu osigurati željena svojstva farmaceutskog oblika (Schipper i sur., 1997).

Trimetilirani, pegilirani, karboksilirani i tiolirani derivati kitozana proizvode se i koriste u svrhu poboljšanja ili modificiranja značajki kitozana kao što su naboj, gustoća naboja, topljivost pri višim pH vrijednostima i promjene pK vrijednosti (Casettari i Illum, 2014).

Zbog njegovih svojstava i mogućnosti primjene, kitozan je polimer od velikog interesa i mnogi znanstveni radovi proučavaju terapijske sustave s kitozonom i/ili utjecaj kitozana na njihova svojstva. Neki od radova koji ispituju utjecaj molekulske mase kitozana na svojstva terapijskih sustava pripravljenih sušenjem raspršivanjem i/ili su namijenjeni za nazalnu primjenu navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1: Odabrana istraživanja utjecaja molekulske mase kitozana na svojstva terapijskih sustava pripravljenih sušenjem raspršivanjem i/ili namijenjenih za nazalnu primjenu

Terapijski sustav	Molekulska masa kitozana	Utjecaj molekulske mase kitozana na svojstva terapijskog sustava	Literatura
Kitozanske mikrosfere s uklopljenim metotreksatom pripravljene sušenjem raspršivanjem	40 kDa	EE = $93,55 \pm 0,47$ % $D_{,50} = 3,6 \pm 0,43$ μm Nasipni kut = $41,6 \pm 2,3^\circ$ Nasipna gustoća = $0,153 \pm 0,006$ g/mL Brzo oslobađanje lijeka (lijek u potpunosti oslobođen nakon 10 min) Najmanja bioadhezivnost	(Sun i sur., 2009)
	480 kDa	EE= $93,84 \pm 0,29$ % $D_{,50} = 4,2 \pm 0,98$ μm Nasipni kut = $47,3 \pm 2,4^\circ$ Nasipna gustoća = $0,114 \pm 0,015$ g/mL Sporije oslobađanje lijeka (lijek u potpunosti oslobođen nakon 3 h) Najveća bioadhezivnost	
	850 kDa	EE= $98,56 \pm 0,53$ % $D_{,50} = 4,9 \pm 0,73$ μm Nasipni kut = $57,0 \pm 1,6^\circ$ Nasipna gustoća = $0,097 \pm 0,001$ g/mL Sporije oslobađanje lijeka (lijek u potpunosti oslobođen nakon 3-4 h) Velika bioadhezivnost	
	Koncentracija kitozana u otopini sušenoj raspršivanjem iznosila je 0,2 % (m/V), 0,4 % (m/V) i 0,5 % (m/V). S porastom koncentracije kitozana, rasla je i uspješnost uklapanja (EE). EE, $D_{,50}$, nasipni kut i nasipna gustoća istaknuti su samo za mikrosfere pripravljene iz otopine s najvećom koncentracijom kitozana. Bioadhezivnost se povećavala s koncentracijom kitozana u otopini sušenoj raspršivanjem. Zabilježena je minimalna toksičnost.		
Otopine soli kitozana za nazalnu primjenu	<50 kDa	Kitozan veće molekulske mase više usporava mukocilijarno čišćenje.	(Aspden i sur., 1997)
	205 kDa		

	340 kDa	Utjecaj kitozana na permeabilnost nije se mijenjao s promjenom molekulske mase.	
Nanokapsule simvastatina obložene kitozonom za nazalnu primjenu	21 kDa	D = 166 ± 7 nm Zeta potencijal = $28,95 \pm 2,1$ mV Lošija mukoadhezivnost Bolja permeabilnost	(Bruinsmann i sur., 2019)
	152 kDa	D = 210 ± 10 nm Zeta potencijal = $33,8 \pm 5,5$ mV Bolja mukoadhezivnost Sporije oslobađanje lijeka	
	Nanokapsule nisu uzrokovale iritaciju ni toksičnost, pa se smatraju biokompatibilnima za nazalnu primjenu.		

EE = uspješnost uklapanja lijeka u mikrosfere (engl. *entrapment efficiency*); D_{v50} = volumni promjer, promjer čestica od kojeg manje čestice zauzimaju 50 % ukupnog volumena uzorka; D= prosječni promjer nanokapsula.

1.6. Svojstva tečenja prašaka

Svojstva tečenja prašaka često mogu biti nepredvidljiva zbog adhezivnosti i kohezivnosti prašaka. Adhezija i kohezija odvijaju se na površini čestica, stoga ovise o veličini i obliku čestica. Kohezija se pojavljuje između istovrsnih, a adhezija između raznovrsnih čestica, na primjer čestica uzorka i stijenke spremnika. U podlozi su uglavnom van der Waalsove sile koje se povećavaju sa smanjenjem veličine čestica, a ovise i o vlažnosti uzorka. Svojstva tečenja bitno je odrediti i poznavati već u ranim fazama razvoja farmaceutskih prašaka, pa su se u tu svrhu osobito korisni pokazali Hausnerov omjer i Carrov indeks (Aulton i Taylor, 2018).

1.7. Zeta potencijal

Zeta potencijal označava električni potencijal difuznog sloja iona koji okružuje česticu u suspenziji. Čestice sa zeta potencijalom između -10 i +10 mV smatraju se relativno neutralnima, dok su čestice sa zeta potencijalom manjim od -30 mV i većim od +30 mV izrazito anionske, odnosno kationske. Većina staničnih membrana je negativno nabijena, pa zeta potencijal čestica utječe na interakciju sa staničnom membranom (Clogston i Patri, 2011). Mucini u nosnoj sluzi također imaju negativni naboj. Pokazano je da pozitivno nabijeni sustavi poboljšavaju mukoadheziju i tako produljuju zadržavanje farmaceutskog oblika na nosnoj sluznici (Mura i sur., 2022).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Alzheimerova bolest je progresivna neurodegenerativna bolest i predstavlja glavni uzrok demencije u svijetu (Khan i sur., 2020). Procjenjuje se da više od 55 milijuna ljudi živi s demencijom, a do 2050. ta bi brojka mogla dosegnuti 139 milijuna (www.who.int). Zbog brojnih kliničkih simptoma kao što su gubitak pamćenja, poremećaji govora i teško snalaženje u prostoru, bolesnici ne mogu samostalno obavljati svakodnevne aktivnosti i često im je potrebna stalna skrb (Hall, 2016). Liječenje Alzheimerove bolesti obuhvaća simptomatsku terapiju, a uključuje antagoniste NMDA receptora (memantin) i inhibitore enzima acetilkolinesteraze (donepezil, rivastigmin i galantamin). Inhibitori acetilkolinesteraze sprječavaju razgradnju acetilkolina koji ima važnu ulogu u kognitivnim funkcijama poput pamćenja, pažnje i učenja (Breijyeh i Karaman, 2020; Wang i Reddy, 2017).

Donepezil je visokoselektivni reverzibilni inhibitor acetilkolinesteraze koji se često koristi zbog poboljšavanja kognitivnih funkcija pacijenata i smanjenja neuropsihijatrijskih simptoma bolesti (Espinoza i sur., 2019). Glavni nedostaci oralne primjene donepezila su metabolizam prvog prolaska kroz jetru, gastrointestinalne nuspojave i mala bioraspoloživost u mozgu jer slabo prelazi krvno-moždanu barijeru (Espinoza i sur., 2019; Shigeta i Homma, 2001).

Pojam krvno-moždane barijere podrazumijeva jedinstvena svojstva kapilara u središnjem živčanom sustavu (CNS-u) koje su građene tako da reguliraju prolazak molekula iz krvi u CNS, što omogućuje njegovo ispravno funkcioniranje te ga istovremeno štiti od toksina, patogena, upale i bolesti (Daneman i Prat, 2015).

Nazalna primjena lijekova predstavlja neinvazivnu metodu zaobilaznja krvno-moždane barijere. Omogućuje izravnu dostavu lijeka u mozak olfaktornim i trigeminalnim živcem, brzu apsorpciju i poboljšanu bioraspoloživost lijeka u mozgu, brzo djelovanje te manju sistemsku raspoloživost u odnosu na druge oblike sistemske primjene čime su nuspojave bitno smanjene. Kako bi se prevladali nedostaci nazalne primjene poput slabe permeabilnosti hidrofилnih lijekova, enzimatske razgradnje i mukocilijarnog klirensa, važan je razvoj inovativnih formulacija za nazalnu primjenu (Espinoza i sur., 2019).

Praškasti farmaceutski oblici za nazalnu primjenu sve se više istražuju zbog povećane stabilnosti, duljeg vremena zadržavanja u nosnoj šupljini i bolje apsorpcije djelatne tvari u odnosu na druge oblike (Tanaka i sur., 2017), a moguće je dodatno produljenje vremena zadržavanja lijeka u nosnoj šupljini korištenjem mukoadhezivnih polimera (Trenkel i Scherließ, 2021).

Kitozan je poznati mukoadhezivni polimer i pospješivač apsorpcije uvršten u GRAS materijale (Casettari i Illum, 2014; Charlton i sur., 2007). Pozitivno je nabijen pri kiselom pH, stoga ulazi u interakciju s negativno nabijenom sijalinskom kiselinom (komponentom mukoznog sloja) i staničnom membranom (reverzibilno otvara međustanične čvrste veze). Zbog toga produljuje vrijeme zadržavanja i pridonosi poboljšanju permeacije, odnosno transporta hidrofilnih tvari, kao što je donepezilklorid, paracelularnim putem (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012; Casettari i Illum, 2014; Yeh i sur., 2011). Stupanj deacetilacije i molekulska masa određuju fizikalno-kemijska te biološka svojstva kitozana (Casettari i Illum, 2014; Sun i sur., 2009). Odabirom kitozana optimalne molekulske mase i/ili stupnja deacetilacije mogu se postići željena svojstva farmaceutskog oblika (Schipper i sur., 1997).

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj molekulske mase kitozana na svojstva mikrosfera pripremljenih od kitozana i manitola s uklopljenim donepezilkloridom, za nazalnu primjenu. Osim molekulske mase kitozana, varirana je i koncentracija manitola u otopinama za sušenje raspršivanjem. Ispitivana su reološka svojstva pripremljenih otopina u svrhu određivanja utjecaja molekulske mase kitozana na njihovu viskoznost. Određivana je veličina mikrosfera metodom laserske difrakcije kako bi se utvrdilo koji kitozan daje suhi produkt s najprikladnijom raspodjelom veličine čestica za nazalnu primjenu. Ispitana su svojstva tečenja i ostatak u kapsuli. Određen je kut raspršenja, bitan za dostavu lijeka na ciljno mjesto u nosnoj šupljini. Zeta potencijal izmjeren je kako bi se procijenila jačina interakcije kitozana različitih molekulskih masa sa staničnom membranom i negativno nabijenim mukoznim slojem.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za izradu mikrosfera u ovom radu korišteni su donepezilklorid (dalje u tekstu donepezil; Carbosynth Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo), niskomolekulski kitozan (engl. *low molecular weight chitosan*, LMW, stupanj deacetilacije 75–85 %), srednjemolekulski kitozan (engl. *medium molecular weight chitosan*, MMW, stupanj deacetilacije 75–85 %), visokomolekulski kitozan (engl. *high molecular weight chitosan*, HMW, stupanj deacetilacije >75 %) (Sigma-Adrich Chemie, Njemačka) i D-manitol (dalje u tekstu manitol; Lach-Ner, Češka). Etanol (96 %, V/V) nabavljen je od tvrtke Gram-mol, Hrvatska. NaCl za pripremu 10mM otopine NaCl-a nabavljen je od tvrtke Kemig, Hrvatska.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema otopina za sušenje raspršivanjem

Pripremljene su otopine donepezila, kitozana različitih molekulskih masa i manitola za pripremu mikrosfera sušenjem raspršivanjem (Tablica 2.). Koncentrirane otopine HMW, MMW i LMW kitozana (1,5 %, *m/V*) pripravljene su u 0,5 % (V/V) octenoj kiselini, uz miješanje tijekom 24 sata na magnetskoj miješalici. Pripravljene otopine profiltrirane su pomoću vakuumske pumpe. Vodena otopina manitola u koncentraciji od 20,0 i 33,3 %, *m/V*, redom za otopine H-L1 i H-L2, te vodena otopina donepezila (3 %, *m/V*) pripravljene su otapanjem navedenih tvari u pročišćenoj vodi uz miješanje na magnetskoj miješalici. Vodene otopine donepezila i manitola pomiješane su s koncentriranom otopinom kitozana u odgovarajućim omjerima. Sastav složenih otopina prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Sastav vodenih otopina za pripremu mikrosfera s uklopljenim donepezilom

Uzorak	Koncentracija donepezila (% , <i>m/V</i>)	Koncentracija i tip kitozana (% , <i>m/V</i>)	Koncentracija manitola (% , <i>m/V</i>)
H1	0,3	1,0 (HMW)	4,0
M1	0,3	1,0 (MMW)	4,0
L1	0,3	1,0 (LMW)	4,0
H2	0,3	1,0 (HMW)	6,0
M2	0,3	1,0 (MMW)	6,0
L2	0,3	1,0 (LMW)	6,0

3.2.2. Određivanje reoloških svojstava otopina

Reološka svojstva otopina određivana su na reometru MCR 102 (Anton Paar GmbH, Austrija) prikazanom na Slici 2. Kao mjerno tijelo korišten je mjerni stožac CP50-1 (engl. *cone-plate*, promjera 50 mm, nagibnog kuta 1°) pri fiksnoj udaljenosti (0,102 mm) od donje ploče mjernog sustava reometra. Odgovarajuća količina otopine prenesena je iz staklene čaše na donju ploču mjernog sustava reometra te je potom uzorak ekvilibriran 3 minute. Viskoznost pri mirovanju (engl. *zero shear viscosity*) određena je rotacijskim testom puzanja (engl. *creep test*), mjerenjem ovisnosti smične deformacije o vremenu pri temperaturi od $25\text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 5 minuta. Pri ovom testu je korišteno konstantno smično naprezanje od 0,1 Pa. Za izračun viskoznosti pri mirovanju korišten je program RheoCompass.

Krivulje viskoznosti određene su rotacijskim testom, pri temperaturi od $25\text{ }^\circ\text{C}$. Korišteno je mjerno tijelo mjerni stožac CP50-1, nagiba 1° i promjera 50 mm. Udaljenost od donje mjerne ploče je iznosila 0,102 mm. Promatran je utjecaj brzine smicanja u području od 0,1 do 100 s^{-1} na tečenje sustava. Po završetku mjerenja prikazana je funkcija ovisnosti prividne viskoznosti (η , mPas) o brzini smicanja ($\dot{\gamma}$, s^{-1}). Mjerenja su provedena u duplikatu.



Slika 2. Reometar MCR102

3.2.3. Izrada mikrosfera sušenjem raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem pripremljenih vodenih otopina donepezila, manitola i kitozana provedeno je na uređaju Büchi Mini Spray Drier B-290 (Büchi Labortechnik AG, Švicarska) s ultrazvučnom sapnicom (Büchi Labortechnik AG, Švicarska) koji je prikazan na Slici 3. Tijekom sušenja, ulazna temperatura iznosila je 120 °C, a izlazna temperatura bila je između 60 °C i 75 °C. Snaga sapnice postavljena je na 65 %, rad pumpe na 10 %, dok je aspirator bio na 100 % kapaciteta.



Slika 3. Büchi Mini Spray Drier B-290 s odvlaživačem

Za izračun iskorištenja postupka sušenja raspršivanjem korištena je sljedeća formula:

$$I (\%) = \frac{\text{masa mikrosfera pripremljenih sušenjem raspršivanjem (mg)}}{\text{masa suhe tvari u otopini za sušenje (mg)}} \times 100$$

Masa mikrosfera pripremljenih sušenjem raspršivanjem dobivena je vaganjem sakupljenog praškastog produkta, a masa suhe tvari izračunata je iz masenog udjela pojedinih sastavnica vodenih otopina podvrgnutih sušenju raspršivanjem.

3.2.4. Određivanje uspješnosti uklapanja i sadržaja donepezila u mikrosferama

Na analitičkoj vagi (Mettler Toledo, Švicarska) izvagano je 10 mg mikrosfera i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 25 ml koja je nadopunjena pročišćenom vodom do oznake. Disperzija je ostavljena 1 sat na ultrazvučnoj kupelji (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Njemačka). Ispitivani uzorci i slijepa proba (pročišćena voda) su prije analize filtrirani kroz membranski filter Chromafil® Xtra PES-20/25 veličine pora 0,2 µm (Machqerey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka). Uspješnost uklapanja donepezila određena je spektroskopski korištenjem uređaja UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Probe (Varian, SAD). ApSORBANCija svakog uzorka mjerena je pri 271 nm u triplikatu. Za svaki uzorak mjerenje je provedeno u duplikatu. Koncentracija donepezila u uzorku izračunata je iz jednadžbe baždarnog pravca ($y = 0,0288x - 0,0068$, $R^2 = 0,9997$) (Dvorski, 2022). Uspješnost uklapanja donepezila (engl. *entrapment efficiency*, EE (%)) izračunata je iz stvarne i teorijske koncentracije lijeka u analiziranom uzorku prema jednadžbi:

$$EE (\%) = \frac{\text{stvarna koncentracija lijeka } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right)}{\text{teorijska koncentracija lijeka } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right)} \times 100$$

Sadržaj donepezila u mikrosferama (engl. *drug loading*, DL (%)) izračunat je iz mase uklopljenog lijeka i ispitivane mase mikrosfera prema jednadžbi:

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

3.2.5. Određivanje raspodjele veličina mikrosfera

Raspodjela veličina mikrosfera određena je korištenjem uređaja Mastersizer 3000 opremljenog s Hydro SV ćelijom (Malvern Panalytical Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo), metodom laserske difrakcije. Ispitivani uzorak pripremljen je dispergiranjem 5 mg mikrosfera u 20 ml 96 %-tnog etanola. U svrhu poništavanja pozadinskih interferencija napravljeno je pozadinsko očitavanje, a zatim je suspenzija dodavana u ćeliju do zatamnjenja od 10 % do 20 %. Ispitivanja su provedena u pentaplikatu, a rezultati izraženi volumnim promjerima D_v10 , D_v50 i D_v90 .



Slika 4. Mastersizer 3000 opremljen Hydro SV ćelijom

3.2.6. Određivanje svojstava tečenja prašaka

Svojstva tečenja pripravljenog praškastog sustava ispitana su indirektnom metodom, tj. određivanjem Hausnerovog omjera prema jednadžbi:

$$\text{Hausnerov omjer} = \frac{\text{nasipna gustoća nakon protresivanja}}{\text{nasipna gustoća prije protresivanja}}$$

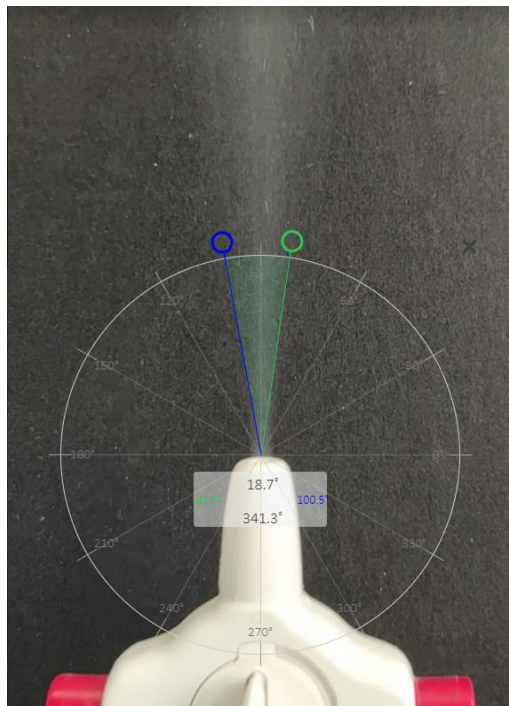
Količina od 300 mg mikrosfera stavljena je u plastičnu brizgalicu volumena 5 ml, na dnu zatvorenu parafilmom. Očitana je volumen prije protresivanja, a zatim je zatvorena brizgalice protresivana otprilike 100 puta, odnosno sve dok volumen između protresivanja nije bio konstantan. Nakon toga očitana je volumen nakon protresivanja, a iz mase mikrosfera i očitanih volumena izračunata je nasipna gustoća prije i nakon protresivanja. Za svaki uzorak mjerenje je provedeno u triplikatu.

3.2.7. Određivanje ostatka u kapsuli

S obzirom na predviđeni način primjene praškastog uzorka u nosnu šupljinu, ispitan je i ostatak praškastog sadržaja u kapsuli nakon raspršivanja, a s ciljem određivanja uspješnosti dostave nominalne doze korištenim raspršivačem. Izvagana je prazna kapsula Vcaps[®] Plus (Lonza, Švicarska), veličine 3, u koju je zatim preneseno 15 mg mikrosfera. Napunjena kapsula je umetnuta u jednodozni nazalni insuflator. Pritiskom na gumb za bušenje, kapsula se probuši, a stiskom gumenog dijela insuflatora sadržaj se raspršuje kroz nastavak za nos. Masa praška zaostalog u kapsuli određena je iz razlike mase kapsule nakon raspršivanja jednodoznim nazalnim insuflatorom MIAT[®] (engl. *Monodose inhaler attenuator*, Miat S. p. A., Italija) i mase prazne kapsule. Kapsula je vagana neposredno nakon aktivacije, a sva su mjerenja provedena u triplikatu.

3.2.8. Određivanje kuta raspršenja

Kut raspršenja određen je korištenjem virtualnog kutomjera. Nakon raspršivanja jednodoznim nazalnim insuflatorom MIAT[®] napunjenim kapsulom s mikrosferama ispred tamne podloge, kamerom mobitela Mi 9 Lite (Xiaomi Communications Co., Ltd., Kina) sniman je videozapis sa 120 slika u sekundi kako bi bilo moguće izdvojiti sliku u trenutku raspršenja praška. Slika je učitana u virtualni kutomjer pomoću kojeg je u triplikatu određen kut raspršenja, što je prikazano na Slici 5.



Slika 5. Određivanje kuta raspršenja korištenjem virtualnog kutomjera

3.2.9. Mjerenje zeta potencijala

Zeta potencijal mikrosfera mjeren je korištenjem uređaja Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo), prikazanog na Slici 6., i ćelije DTS1070. Uzorak za mjerenje pripremljen je dispergiranjem 10 mg mikrosfera u 4 ml 10 mM otopine NaCl uz miješanje na magnetskoj miješalici. U postavkama programa unesena je vrijednost refraktivnog indeksa od 1,58 te apsorpcije od 0,01. Vrijeme ekvibracije iznosilo je 120 sekundi, a mjerenja su provedena pri 25 °C, u triplikatu.



Slika 6. Zetasizer Ultra

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprema otopina za sušenje raspršivanjem

Mikrosfere s uklopljenim donepezilom pripravljene su metodom sušenja raspršivanjem. Prije sušenja raspršivanjem bilo je potrebno izraditi vodene otopine donepezila, kitozana i manitola.

Kitozan je korišten kao pomoćna tvar zbog svoje biokompatibilnosti, bioadhezivnosti i potencijala za poboljšanje permeabilnosti hidrofilne djelatne tvari uklopljene u farmaceutski oblik (Casettari i Illum, 2014; Charlton i sur., 2007).

Molekulska masa kitozana u velikoj mjeri određuje njegova fizičko-kemijska svojstva (Casettari i Illum, 2014), stoga su u sastavu otopina za raspršivanje korišteni kitozani različite molekulske mase te je ispitan utjecaj navedenog parametra na svojstva pripremljenih otopina i prašaka. Korišteni kitozani nisu se značajnije razlikovali u stupnju deacetilacije.

Manitol se u farmaceutskoj industriji često koristi kao punilo, a ističe se zbog svojih povoljnih fizičko-kemijskih svojstava kao što su dobra topljivost, mala higroskopnost, inertnost prema djelatnoj tvari i ljudskom organizmu te osmotski učinak (Ohrem i sur., 2014; Perkušić i sur., 2022). U sastavu otopina za sušenje raspršivanjem varirana je koncentracija manitola.

4.2. Reološka svojstva otopina za sušenje raspršivanjem

4.2.1. Viskoznost pri mirovanju

Ispitivana su reološka svojstva pripremljenih otopina u svrhu određivanja utjecaja molekulske mase kitozana na njihovu viskoznost.

Viskoznost pri mirovanju određena je pomoću reometra MCR102. Dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 3. Viskoznost pri mirovanju vrlo je važan parametar sustava koji sadrže polimere. Ovisi o koncentraciji, molekulskoj masi, modifikacijama i građi polimernog lanca te odražava utjecaj tih parametara na svojstva sustava (Dreval i sur., 1973; Standau i sur., 2020). Dakle, uobičajeno je očekivati da otopine polimera manje molekulske mase imaju manju viskoznost pri mirovanju, odnosno da su te dvije veličine proporcionalne (Dalsin i sur., 2014). Niskomolekulski kitozan ima bolju topljivost u vodi i kraće polimerne lance, pa tekuće formulacije koje ga sadrže imaju manju viskoznost, dok veća molekulska masa kitozana rezultira većom viskoznošću otopina za sušenje raspršivanjem (Gholizadeh i sur., 2019; Omar Zaki i sur., 2015). Otopine H1 i H2 koje sadrže visokomolekulski kitozan imaju najveću

viskoznost. Otopine L1 i L2 sadrže niskomolekulski kitozan i imaju najmanju viskoznost, te su dobiveni rezultati u skladu s očekivanjima i prethodnim istraživanjima.

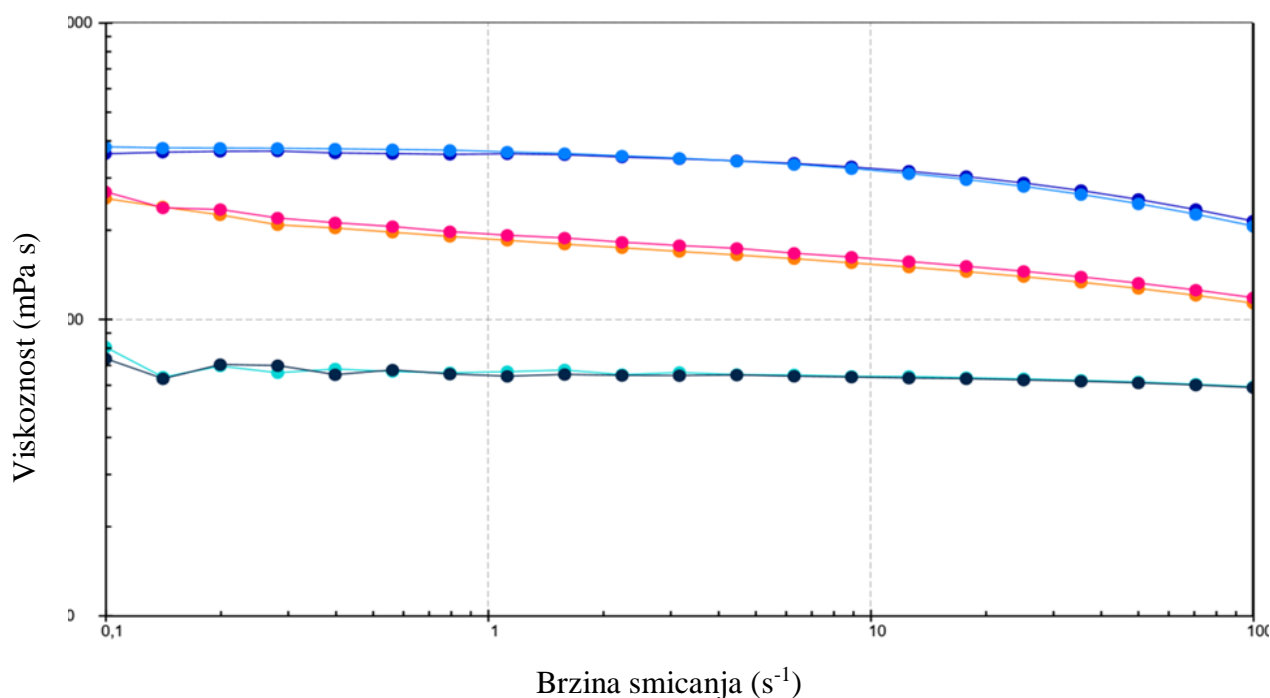
Tablica 3. Viskoznost pri mirovanju otopina za pripravu mikrosfera s uklopljenim donepezilom

Ispitivana otopina	H1	M1	L1	H2	M2	L2
Viskoznost (mPas)	375,3±2,9	179,3±1,9	63,5±0,5	391,2±2,6	102,2±2,8	53,6±0,3

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n=2).

4.2.2. Krivulje viskoznosti

Krivulje viskoznosti određene rotacijskim testom prikazane su na Slici 7. Viskoznost pseudoplastičnih sustava se smanjuje s porastom brzine smicanja. Molekule polimera su pod utjecajem smicanja sklone optetljavanju i poravnavanju sa smjerom tečenja, zbog čega pružaju manji otpor, što zajedno s oslobađanjem molekula vode rezultira manjom viskoznošću (Aulton i Taylor, 2018).



Slika 7. Ovisnost viskoznosti (η , mPas) o brzini smicanja (γ , s⁻¹) za otopine H1 (—●—), H2 (—●—), M1 (—●—), M2 (—●—), L1 (—●—) i L2 (—●—)

Prema prikazanim krivuljama ovisnosti viskoznosti (η , mPas) o brzini smicanja (γ , s⁻¹) sve ispitivane otopine su pseudoplastični sustavi, što je i očekivano jer se radi o otopinama polimera. Najveći utjecaj brzine smicanja na viskoznost sustava vidljiv je kod otopina M1 i M2

koje sadrže srednjemolekulski kitozan. Brzina smicanja imala je najmanji utjecaj na viskoznost otopina L1 i L2 koje sadrže niskomolekulski kitozan. Otopine pripravljene iz istog kitozana ali pri različitoj koncentraciji manitola (H1 vs H2; M1 vs M2 i L1 vs L2) nisu se značajnije razlikovale u krivulji viskoznosti.

4.3. Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem

Sušenjem raspršivanjem L1, M1 i H1 te L2, M2 i H2 otopina pripravljene su redom mikrosfere s donepezilom ML1, MM1 i MH1 te ML2, MM2 i MH2. Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem prikazano je u Tablici 4. za sve pripremljene uzorke.

Tablica 4. Rezultati iskorištenja procesa sušenja raspršivanjem

Otopina sušena raspršivanjem	H1	M1	L1	H2	M2	L2
Iskorištenje (%)	55,9	65,2	61,1	36,8	55,4	59,4

Najmanje iskorištenje (36,8%) zabilježeno je za proces sušenja raspršivanjem otopine H2 koja sadrži kitozan velike molekulske mase i veću koncentraciju manitola, a najbolje (65,2%) za proces sušenja raspršivanjem otopine M1 koja sadrži kitozan srednje molekulske mase i manju koncentraciju manitola. Kod sušenja raspršivanjem uzoraka H1 i H2 otopine su bile vidljivo viskoznije zbog visokomolekulskog kitozana te je stoga kod sušenja raspršivanjem otopine H1 bilo potrebno prilagođavati jačinu pumpe, a otopinu H2 nije bilo moguće prikladno atomizirati i uzorak se ukapljivao, pa je to razlog najnižeg iskorištenja. Ako se zanemari vrijednost iskorištenja za otopinu H2, dobivene vrijednosti su zadovoljavajuće.

Desai i suradnici (2006) ispitivali su utjecaj molekulske mase kitozana na svojstva mikrosfera s uklopljenim vitaminom C dobivenih sušenjem raspršivanjem. Iskorištenja sušenja raspršivanjem otopina koje su sadržavale LMW, MMW i HMW kitozan redom su iznosila $59,3 \pm 1,4$ %, $60,6 \pm 1,8$ % i $58,5 \pm 2,1$ %. Utvrđeno je da molekulska masa ne utječe značajno na iskorištenja procesa sušenja raspršivanjem (Desai i sur., 2006).

4.4. Uspješnost uklapanja i sadržaj donepezila u mikrosferama

Uspješnost uklapanja donepezila u mikrosfere izračunata je prema jednadžbi iz poglavlja 3.2.4. U prethodnim istraživanjima određena je uspješnost uklapanja donepezila u različitim farmaceutskim oblicima za nazalnu primjenu, pa je tako uspješnost uklapanja u liposome iznosila $84,1 \pm 5,0$ % (Al Asmari i sur., 2016), nanoemulzije $94,3 \pm 0,1$ % (Espinoza i sur.,

2019) te nanosuspencije 92 – 96 % (Bhavna i sur., 2014). Prema rezultatima prikazanim u Tablici 5., u ovom radu uspješnost uklapanja donepezila za sve ispitivane uzorke iznosila je od $96,1 \pm 1,7$ % do $101,2 \pm 0,7$ %, što u usporedbi s prethodnim istraživanjima predstavlja najviši rezultat.

Kod mikrosfera MH2, MM2 i ML2 vidljivo je povećanje uspješnosti uklapanja donepezila sa smanjenjem molekulske mase kitozana, što je u skladu s istraživanjima Desai i suradnika (2006). Kod MH1, MM1 i ML1 nema vidljive povezanosti molekulske mase i povećanja/smanjenja uspješnosti uklapanja.

Tablica 5. Uspješnost uklapanja donepezila u mikrosfere

	MH1	MM1	ML1	MH2	MM2	ML2
EE (%)	$99,1 \pm 1,0$	$97,1 \pm 0,8$	$100,0 \pm 1,5$	$96,1 \pm 1,7$	$99,6 \pm 2,9$	$101,2 \pm 0,7$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD (n=2).

Sadržaj donepezila (DL) izračunat je prema jednadžbi iz poglavlja 3.2.4. te je izražen kao maseni udio lijeka u mikrosferama. Rezultati su prikazani u Tablici 6., a sadržaj lijeka u prosjeku je iznosio $5,0 \pm 0,1$ % za uzorke s nižom koncentracijom manitola te $3,7 \pm 0,1$ % za uzorke s višom koncentracijom manitola.

Tablica 6. Sadržaj donepezila u mikrosferama

	MH1	MM1	ML1	MH2	MM2	ML2
DL (%)	$5,1 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,0$	$5,1 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,0$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD (n=2).

Kod oralne primjene, dnevna doza donepezila iznosi 5 ili 10 mg (www.halmed.hr). Kako za izravnu dostavu lijeka iz nosne šupljine u mozak doza može iznositi čak 0,01 - 1 % oralne doze (Erdő i sur., 2018), navedeni sadržaji donepezila u mikrosferama su prikladni za nazalnu primjenu.

4.5. Raspodjela veličina mikrosfera s donepezilom

Čestice u farmaceutskim oblicima najčešće su nepravilnog oblika. Njihova veličina opisuje se ekvivalentnim sferičnim promjerom. Pojam se odnosi na promjer kugle koja odgovara mjerenoj nepravilnoj čestici po jednom od svojstava. Kod metode laserske difrakcije, rezultati se izražavaju kao volumni promjeri, D_v (Aulton i Taylor, 2018). Raspodjela čestica izražena je preko volumnih promjera D_{v10} , D_{v50} i D_{v90} , koji označavaju promjer čestica od kojeg manje

čestice zauzimaju navedeni postotak ukupnog volumena praškastog uzorka. Na primjer, D_{v10} znači da je 10 % ukupnog volumena čestica u uzorku manje od izražene veličine (Kulkarni i Shaw, 2016).

Tablica 7. Raspodjela veličine mikrosfera u ispitivanim praškastim produktima

	MH1	MM1	ML1	MH2	MM2	ML2
D_{v10} (μm)	$7,0 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,9$	$10,2 \pm 1,1$	$11,0 \pm 0,7$
D_{v50} (μm)	$27,9 \pm 0,3$	$23,2 \pm 0,2$	$23,5 \pm 0,5$	$28,8 \pm 1,0$	$28,0 \pm 1,1$	$27,5 \pm 1,5$
D_{v90} (μm)	$73,9 \pm 3,0$	$55,5 \pm 0,3$	$62,1 \pm 5,4$	$62,7 \pm 1,5$	$62,5 \pm 1,4$	$61,5 \pm 1,9$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD (n=5).

Kako bi se osigurala ispravna depozicija u nosnoj šupljini, glavina aerosoliziranih čestica trebala bi biti veća od 10 μm (Europska agencija za lijekove, 2006). Čestice koje su značajno veće od 10 μm sklone su nakupljanju u prednjem dijelu nosne šupljine, no to se nakupljanje može smanjiti smanjenjem kuta raspršenja. Čestice manje od 10 μm sklone su depoziciji u nazofarinksu i donjim dišnim putovima, no sve dok su čestice veće od 10 μm , nema povećanog rizika od depozicije u plućima (Casettari i Illum, 2014; Guo i sur., 2005; Inthavong i sur., 2006). Iz rezultata prikazanih u Tablici 7. vidljivo je da uporaba visokomolekuskog kitozana rezultira pripremom većih čestica, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Desai i sur., 2006; Ngan i sur., 2014). Dokazano je da prilikom procesa sušenja raspršivanja manitol ima sposobnost udruživanja s kitozonom, što dovodi do stvaranja većih čestica (Patil i sur., 2021). Otopine s većim sadržajem manitola imaju bolju raspodjelu veličine čestica jer imaju D_{v10} veći od 10 μm . Zaključno, najveći D_{v10} zabilježen je za MH2 mikrosfere, pripravljene sušenjem raspršivanjem otopine koja je sadržavala visokomolekulski kitozan i manitol u većoj koncentraciji.

4.6. Svojstva tečenja mikrosfera s donepezilom

Svojstva tečenja mikrosfera s donepezilom izražena su Hausnerovim omjerom, prikazanim u Tablici 8.

Tablica 8. Hausnerov omjer za ispitivane mikrosfere s donepezilom

	MH1	MM1	ML1	MH2	MM2	ML2
Hausnerov omjer	1,20 ± 0,01	1,22 ± 0,06	1,17 ± 0,01	1,20 ± 0,01	1,22 ± 0,05	1,17 ± 0,05

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

Tablica 9. Povezanost svojstva tečenja farmaceutskih prašaka s Hausnerovim omjerom (Ph. Eur. 9.0, 2016)

Hausnerov omjer	Tečenje
1,00-1,11	Izvršno
1,12-1,18	Dobro
1,19-1,25	Zadovoljavajuće
1,26-1,34	Prolazno
1,35-1,45	Loše
1,46-1,59	Vrlo loše
>1,60	Vrlo, vrlo loše

Usporedbom rezultata prikazanih u Tablici 8. s vrijednostima iz Tablice 9., vidljivo je da svi ispitivani uzorci mikrosfera imaju zadovoljavajuća (engl. *fair*) svojstva tečenja, osim ML1 i ML2 koji imaju dobra (engl. *good*) svojstva tečenja, a zajedničko im je da sadrže kitozan niske molekulske mase.

Pokazano je da se Hausnerov omjer za čestice pripravljene sušenjem raspršivanjem smanjuje s povećanjem koncentracije manitola (Patil i sur., 2021), no u ovom istraživanju koncentracija manitola nije utjecala na Hausnerov omjer.

Khlibsuwan i Pongjanyakul (2016) ispitali su svojstva tečenja mikročestica pripremljenih od magnezijevog aluminij silikata i kitozana različitih molekulskih masa metodom sušenja raspršivanjem. Hausnerov omjer iznosio je $1,39 \pm 0,02$, $1,46 \pm 0,03$ i $1,41 \pm 0,03$ redom za mikročestice pripravljene iz LMW, MMW i HMW kitozana (Khlibsuwan i Pongjanyakul, 2016). Navedene vrijednosti Hausnerovog omjera veće su od onih prikazanih u Tablici 7., no najniži Hausnerov omjer također je zabilježen za niskomolekulski kitozan.

4.7. Kut raspršenja mikrosfera s donepezilom

Kut raspršenja farmaceutskih oblika za nazalnu primjenu ima veliki utjecaj na profil njihove nazalne depozicije. Pokazano je da je veći kut raspršenja (veći od 35°) povezan s depozicijom

u anteriornoj regiji (Cheng i sur., 2001), dok su manji kutovi raspršenja između 10° i 20° povezani s depozicijom u olfaktornoj i gornjoj turbinatnoj regiji (Si i sur., 2021).

Prema Tablici 10. izmjereni kutovi raspršenja svih uzoraka mikrosfera s donepezilom nalaze se u intervalu između 10° i 20° te su stoga teorijski prikladni za izravnu dostavu lijeka u mozak. Najmanji kut raspršenja izmjeren je za mikrosfere MH1, a najveći za ML2. Iz ostvarenih rezultata vidljivo je da je veća molekulska masa kitozana povezana s manjim kutom raspršenja, i obrnuto.

Tablica 10. Kut raspršenja mikrosfera s donepezilom jednodoznim nazalnim insuflatorom Miat®

	MH1	MM1	ML1	MH2	MM2	ML2
Kut (°)	17,1 ± 1,5	18,0 ± 0,2	18,6 ± 0,2	17,5 ± 0,3	18,3 ± 0,4	19,9 ± 0,3

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

Koncentracija manitola u otopini nije imala značajniji utjecaj na kut raspršenja mikrosfera. Prethodna istraživanja pokazala su da povećanje koncentracije manitola rezultira manjim kutom raspršenja što je objašnjeno utjecajem manitola na veličinu čestica (Perkušić i sur., 2022).

4.8. Ostatna masa mikrosfera s donepezilom u kapsuli nakon raspršivanja

Ostatak praškastog sadržaja u kapsuli nakon raspršivanja jednodoznim insuflatorom prikazan je u Tablici 11. i iznosio je od 0,0 ± 0,1 mg do 0,3 ± 0,2 mg, što iznosi od 0,0 ± 0,7 % do 2,0 ± 1,3 % od početne doze u kapsuli.

Tablica 11. Masa mikrosfera s donepezilom zaostala u kapsuli nakon raspršivanja jednodoznim nazalnim insuflatorom Miat®

	MH1	MM1	ML1	MH2	MM2	ML2
m (mg)	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,3 ± 0,2

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

U usporedbi s dostupnom literaturom, masa mikrosfera zaostala u kapsuli nakon raspršivanja jednodoznim insuflatorom je prihvatljiva. Nižić i suradnici (2020) utvrdili su da je ostatak mikrosfera s melatoninom u kapsuli iznosio 12,7 ± 2,6 %. No, veličina tih čestica bila je znatno manja od ovdje ispitivanih čestica (D_{50} iznosio je 10,5 ± 2,6 – 14,6 ± 2,4 μm; Nižić i sur., 2020) te je zbog većeg omjera površine i volumena kohezivnost takvih prašaka veća.

4.9. Zeta potencijal mikrosfera s donepezilom

Vrijednosti zeta potencijala mikrosfera s donepezilom prikazane su u Tablici 12. Svi uzorci imaju pozitivne vrijednosti zeta potencijala što je preduvjet za elektrostatsku interakciju sa staničnom membranom (otvaranje međustaničnih čvrstih veza) i sijalinskom kiselinom u mukoznom sloju (produljeno vrijeme zadržavanja) (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012; Casettari i Illum, 2014). Utjecaj na mukoadhezivnost i permeabilnost lijeka raste s povećanjem stupnja deacetilacije kitozana, odnosno s povećanjem broja slobodnih amino skupina u njegovoj strukturi koje su nositelji pozitivnog naboja pri pH nižem od pKa kitozana (Kumar i sur., 2016; Mura i sur., 2022).

Tablica 12. Zeta potencijal mikrosfera s donepezilom

	MH1	MM1	ML1	MH2	MM2	ML2
ζ (mV)	$38,8 \pm 3,9$	$37,1 \pm 4,1$	$32,3 \pm 3,1$	$23,7 \pm 1,8$	$33,5 \pm 1,2$	$16,1 \pm 0,9$

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

Najveća vrijednost zeta potencijala izmjerena je za mikrosfere MH1, dok je najniža izmjerena za mikrosfere ML2. Za mikrosfere ML1, MM1 i MH1, pripravljene sušenjem raspršivanjem otopina s nižom koncentracijom manitola, primjećuje se da zeta potencijal raste s porastom molekulske mase kitozana. Kod uzoraka s nižom koncentracijom manitola, nema jasne ovisnosti zeta potencijala o molekulskoj masi. Kitozani upotrebljeni u ovom radu ne razlikuju se značajno u stupnju deacetilacije.

U prethodnim istraživanjima zabilježen je manji zeta potencijal za mikrosfere pripravljene od kitozana veće molekulske mase (Alhaji i sur., 2020; Desai i sur., 2006; Ngan i sur., 2014), a Alhaji i suradnici (2020) zaključili su da bi smanjenje zeta potencijala moglo biti povezano s manjim stupnjem deacetilacije visokomolekulskog kitozana u odnosu na niskomolekulski kitozan. Dokazano je i da manitol može utjecati na zeta potencijal i povećanje koloidne stabilnosti nanočestica (Gawali i sur., 2017).

5. ZAKLJUČCI

- Sušenjem raspršivanjem uspješno su pripravljene kitozansko-manitolske mikrosfere s uklopljenim donepezilom, za nazalnu primjenu. U otopinama sušenim raspršivanjem variran je tip kitozana (visikomolekulski, srednjemolekulski i niskomolekulski) i koncentracija manitola (4 % i 6 %, *m/V*).
- Najveću viskoznost pri mirovanju imale su otopine za sušenje raspršivanjem koje su sadržavale visikomolekulski kitozan ($375,3 \pm 2,9$ mPas i $391,2 \pm 2,6$ mPas), a najmanju otopine koje su sadržavale niskomolekulski kitozan ($63,5 \pm 0,5$ mPas i $53,6 \pm 0,3$ mPas). Prema krivuljama viskoznosti, pripravljene otopine za sušenje raspršivanjem su pseudoplastični sustavi.
- Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem bilo je zadovoljavajuće, u rasponu od 55,4 % do 65,2 %, osim u slučaju sušenja raspršivanjem otopine koja je sadržavala visikomolekulski kitozan i manitol u većoj koncentraciji pri kojem je ostvareno iskorištenje 36,8 %.
- Uspješnost uklapanja donepezila u mikrosfere bila je visoka i iznosila je od $96,1 \pm 1,7$ % do $101,2 \pm 0,7$ %.
- Sadržaj donepezila u mikrosferama iznosio je od $3,6 \pm 0,1$ % do $5,1 \pm 0,1$ %, što predstavlja prikladnu dozu za nazalnu primjenu.
- Volumni promjeri pripremljenih mikrosfera s donepezilom, D_v10 , D_v50 i D_v90 , redom su iznosili $7,00 \pm 0,07$ - $12,0 \pm 0,92$ μm , $23,2 \pm 0,16$ - $28,8 \pm 1,02$ μm i $55,5 \pm 0,28$ - $73,9 \pm 3,02$ μm .
- Najveći D_v10 zabilježen je za mikrosfere pripravljene sušenjem raspršivanjem otopine koja je sadržavala visikomolekulski kitozan i manitol u većoj koncentraciji.
- Mikrosfere s donepezilom pripravljene iz niskomolekulskog kitozana imale su dobra svojstva tečenja, a svi ostali uzorci imali su zadovoljavajuća svojstva tečenja.
- Kut raspršenja mikrosfera kretao se od $17,1 \pm 1,5$ do $19,9 \pm 0,3^\circ$, što je prikladno za nazalnu primjenu. Mikrosfere pripravljene iz visikomolekulskog kitozana manjeg su kuta raspršenja od mikrosfera pripremljenih iz niskomolekulskog kitozana i obrnuto.

- Ostatna masa mikrosfera s donepezilom u kapsuli nakon raspršenja jednodoznim nazalnim insuflatorom iznosila je od $0,0 \pm 0,7$ % do $2,0 \pm 1,3$ % od početne doze u kapsuli, što potvrđuje isporuku odgovarajuće doze lijeka u nosnu šupljinu.
- Izmjerene vrijednosti zeta potencijala svih uzoraka bile su pozitivne, u rasponu od $16,1 \pm 0,9$ mV do $38,8 \pm 3,9$ mV, što ukazuje na mogućnost produljenja vremena zadržavanja i poboljšanja permeabilnosti uklopljenog lijeka. Primijećen je porast zeta potencijala s porastom molekulske mase kitozana za uzorke s manjim sadržajem manitola.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

° - stupanj

°C – celzijev stupanj

ATP – adenzin-trifosfat

CNS – središnji živčani sustav, engl. *central nervous system*

CYP2D6, CYP3A4 – enzimi citokrom P450

D – prosječni promjer

D_{v10} , D_{v50} , D_{v90} – volumni promjeri, promjer čestica od kojeg manje čestice zauzimaju navedeni postotak ukupnog volumena uzorka

EE – uspješnost uklapanja (engl. *entrapment efficiency*)

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

GRAS – općenito prepoznate kao sigurne (pomoćne tvari), engl. *generally recognized as safe*

HMW – visokomolekulski (engl. *high molecular weight*)

I – iskorištenje

LMW – niskomolekulski (engl. *low molecular weight*)

MIAT[®] - jednodozni nazalni insuflator (engl. *Monodose inhaler attenuator*)

MMW – srednjemolekulski (engl. *medium molecular weight*)

NaCl – natrijev klorid

NMDA – N-metil-D-aspartat

pH – vrijednost pH, negativni logaritam množinske koncentracije vodikovih iona u otopini

pKa - negativni logaritam konstante disocijacije elektrolita

SD – standardna devijacija

β – beta

ζ - zeta

7. LITERATURA

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

Alhaji N, Zakaria Z, Naharudin I, Ahsan F, Li W, Wong TW. Critical physicochemical attributes of chitosan nanoparticles admixed lactose-PEG 3000 microparticles in pulmonary inhalation. *Asian J Pharm Sci*, 2020, 15, 374–384.

Ameri M, Maa YF. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. *Dry Technol*, 2006, 24, 763–768.

Aspden TJ, Mason JDT, Jones NS, Lowe J, Skaugrud Ø, Illum L. Chitosan as a Nasal Delivery System: The Effect of Chitosan Solutions on in Vitro and in Vivo Mucociliary Transport Rates in Human Turbinates and Volunteers. *J Pharm Sci*, 1997, 86, 509–513.

Aulton ME, Taylor K. Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines. Edinburgh, Elsevier, 2018, str. 103, 143, 190, 506.

Battaglia L, Panciani PP, Muntoni E, Capucchio MT, Biasibetti E, De Bonis P, Mioletti S, Fontanella M, Swaminathan S. Lipid nanoparticles for intranasal administration: application to nose-to-brain delivery. *Expert Opin Drug Delivery*, 2018, 15, 369–378.

Baza lijekova, 2022., www.halmed.hr, pristupljeno 11.10.2022.

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

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

Bloom GS. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol*, 2014, 71, 505–508.

Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Mol*, 2020, 25, E5789.

Bruinsmann FA, Pigana S, Aguirre T, Dadalt Souto G, Garrastazu Pereira G, Bianchera A, Tiozzo Fasiolo L, Colombo G, Marques M, Raffin Pohlmann A, Stanisquaski Guterres S,

Sonvico F. Chitosan-Coated Nanoparticles: Effect of Chitosan Molecular Weight on Nasal Transmucosal Delivery. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 86.

Buchi Training Papers, 2021. <https://www.buchi.com>, pristupljeno 5.10.2021.

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

Charlton ST, Davis SS, Illum L. Evaluation of bioadhesive polymers as delivery systems for nose to brain delivery: in vitro characterisation studies. *J Control Release*, 2007, 118, 225–234.

Chen H, Chen CC, Acosta C, Wu SY, Sun T, Konofagou EE. A new brain drug delivery strategy: focused ultrasound-enhanced intranasal drug delivery. *PloS One* 9, 2014, e108880

Cheng, YS, Holmes TD, Gao J, Guilmette RA, Li S, Surakitbanharn Y, Rowlings C. Characterization of nasal spray pumps and deposition pattern in a replica of the human nasal airway. *J Aerosol Med*, 2001, 14, 267–280.

Clogston, JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol*, 2011, 697, 63–70.

Dalsin SJ, Hillmyer MA, Bates FS. Molecular Weight Dependence of Zero-Shear Viscosity in Atactic Polypropylene Bottlebrush Polymers. *ACS Macro Lett*, 2014, 3, 423–427.

Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7, a020412.

Desai KG, Liu C, Park HJ. Characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres as affected by chitosan molecular weight. *J Microencapsul*, 2006, 23, 79–90.

Dreval VE, Malkin AY, Botvinnik GO. Approach to generalization of concentration dependence of zero-shear viscosity in polymer solutions. *J Polym Sci*, 1973, 11, 1055–1076.

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

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

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

Espinoza LC, Silva-Abreu M, Clares B, Rodríguez-Lagunas MJ, Halbaut, L, Cañas MA, Calpena AC. Formulation Strategies to Improve Nose-to-Brain Delivery of Donepezil. *Pharmaceutics*, 2019, 11, E64.

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

Gawali SL, Barick BK, Barick KC, Hassan PA. Effect of sugar alcohol on colloidal stabilization of magnetic nanoparticles for hyperthermia and drug delivery applications. *J Alloys Compd*, 2017, 725, 800–806.

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

Guo Y, Laube B, Dalby R. The effect of formulation variables and breathing patterns on the site of nasal deposition in an anatomically correct model. *Pharm Res*, 2005, 22, 1871–1878.

Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. Philadelphia, Elsevier, 2016, str. 771.

Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharm Res*, 2004, 21, 344–353.

Illum L, Farraj NF, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm Res*, 1994, 11, 1186–1189.

Inthavong K, Tian ZF, Li HF, Tu JY, Yang W, Xue CL, Li CG. A Numerical Study of Spray Particle Deposition in a Human Nasal Cavity. *Aerosol Sci Technol*, 2006, 40, 1034–1045.

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

Khlibsuwan R, Pongjanyakul T. Chitosan-clay matrix tablets for sustained-release drug delivery: Effect of chitosan molecular weight and lubricant. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2016, 35, 303–313.

Kulkarni VS, Shaw C. Miscellaneous Physical, Chemical, and Microbiological Test Methods, in: Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages. *Elsevier*, 2016, pp. 193–221.

Kumar Ashwini, Vimal A, Kumar Awanish. Why Chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery. *Int J Biol Macromol*, 2016, 91, 615–622.

Mura P, Maestrelli F, Cirri M, Mennini N. Multiple Roles of Chitosan in Mucosal Drug Delivery: An Updated Review. *Mar Drugs*, 2022, 20, 335.

Ngan LTK, Wang SL, Hiep DM, Luong PM, Vui NT, Dinh TM, Dzung NA. Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity. *Res Chem Intermed*, 2014, 40, 2165–2175.

Nižić L, Potaš J, Winnicka K, Szekalska M, Erak I, Gretić M, Jug M, Hafner A. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 141, 105115.

Ohrem HL, Schornick E, Kalivoda A, Ognibene R. Why is mannitol becoming more and more popular as a pharmaceutical excipient in solid dosage forms? *Pharm Dev Technol*, 2014, 19, 257–262.

Oliveira Lima K, Barreto Pinilla CM, Alemán A, López-Caballero ME, Gómez-Guillén MC, Montero P, Prentice C. Characterization, Bioactivity and Application of Chitosan-Based Nanoparticles in a Food Emulsion Model. *Polymers*, 2021, 13, 3331.

Omar Zaki SS, Ibrahim MN, Katas H. Particle Size Affects Concentration-Dependent Cytotoxicity of Chitosan Nanoparticles towards Mouse Hematopoietic Stem Cells. *J Nanotechnol*, 2015, e919658.

Patil S, Pandit A, Godbole A, Dandekar P, Jain R. Chitosan based co-processed excipient for improved tableting. *Carbohydr. Polym Technol Appl*, 2021, 2, 100071.

Perkušić M, Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Jakobušić Brala C, Pepić I, Lovrić J, Matijašić G, Gretić M, Zadavec D, Kalogjera L, Hafner A. Tailoring functional spray-dried powder platform for efficient donepezil nose-to-brain delivery. *Int J Pharm*, 2022, 624, 122038.

Pharmaceutical quality of inhalation and nasal products, 2017., <https://www.ema.europa.eu> , pristupljeno 28.10.2022.

Sangolkar S, Adhao V, Mundhe D, Sawarkar H. Particle size determination of nasal drug delivery system: A review. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2012, 17, 66-73.

Schipper NGM, Olsson S, Hoogstraate JA, deBoer AG, Vårnum KM, Artursson P. Chitosans as Absorption Enhancers for Poorly Absorbable Drugs 2: Mechanism of Absorption Enhancement. *Pharm Res*, 1997, 14, 923–929.

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

Si XA, Sami M, Xi J. Liquid Film Translocation Significantly Enhances Nasal Spray Delivery to Olfactory Region: A Numerical Simulation Study. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 903.

Standau T, Long H, Murillo Castellón S, Brütting C, Bonten C, Altstädt V. Evaluation of the Zero Shear Viscosity, the D-Content and Processing Conditions as Foam Relevant Parameters for Autoclave Foaming of Standard Polylactide (PLA). *Materials*, 2020, 13, E1371.

Sun Y, Cui F, Shi K, Wang J, Niu M, Ma R. The Effect of Chitosan Molecular Weight on the Characteristics of Spray-Dried Methotrexate-Loaded Chitosan Microspheres for Nasal Administration. *Drug Dev Ind Pharm*, 2009, 35, 379–386.

Tanaka A, Furubayashi T, Enomura Y, Hori T, Shimomura R, Maeda C, Kimura S, Inoue D, Kusamori K, Katsumi H, Sakane T, Yamamoto A. Nasal Drug Absorption from Powder Formulations: Effect of Fluid Volume Changes on the Mucosal Surface. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40, 212–219.

Trenkel M, Scherließ R. Nasal Powder Formulations: In-Vitro Characterisation of the Impact of Powders on Nasal Residence Time and Sensory Effects. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 385.

Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 2017, JAD 57, 1041–1048.

World failing to address dementia challenge, 2021., <https://www.who.int>, pristupljeno 11.10.2022.

Yeh TH, Hsu LW, Tseng MT, Lee PL, Sonjae K, Ho YC, Sung HW. Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening. *Biomaterials*, 2011, 32, 6164–6173.

Ziaee A, Albadarin AB, Padrela L, Femmer T, O'Reilly E, Walker G. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 127, 300–318.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Donepezil je reverzibilni inhibitor acetilkolinesteraze koji se koristi u liječenju Alzheimerove bolesti. Nedostatci oralne primjene donepezila su gastrointestinalne nuspojave te mala bioraspoloživost u mozgu zbog slabog prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Nazalnom primjenom zaobilazi se krvno-moždana barijera, što omogućuje izravnu dostavu lijeka u mozak. Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj praškastih farmaceutskih oblika za nazalnu primjenu temeljenih na mukoadhezivnim polimerima kao što je kitozan. Pokazano je da molekulska masa kitozana može utjecati na svojstva farmaceutskih oblika.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj molekulske mase kitozana na svojstva kitozansko-manitoljskih mikrosfera s donepezilom za nazalnu primjenu, pripremljenih sušenjem raspršivanjem. U korištenim otopinama variran je tip kitozana (visokomolekulski, srednjemolekulski i niskomolekulski) i koncentracija manitola (4 % i 6 %, *m/V*). Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem kretalo se od 36,8 % do 65,2 %. Uspješnost uklapanja donepezila bila je visoka ($96,1 \pm 1,7$ - $101,2 \pm 0,7$ %) te je sadržaj lijeka u mikrosferama prikladan za nazalnu primjenu. Volumni promjeri pripremljenih mikrosfera s donepezilom, D_{v10} , D_{v50} i D_{v90} , redom su iznosili $7,00 \pm 0,07$ - $12,0 \pm 0,92$ μm , $23,2 \pm 0,16$ - $28,8 \pm 1,02$ μm i $55,5 \pm 0,28$ - $73,9 \pm 3,02$ μm . Najveći D_{v10} zabilježen je za mikrosfere pripremljene sušenjem raspršivanjem otopine koja je sadržavala visokomolekulski kitozan i manitol u većoj koncentraciji. Uzorci s niskomolekulskim kitozonom imali su bolja svojstva tečenja od ostalih uzoraka. Izmjereni su kutovi raspršenja $17,1 \pm 1,5$ - $19,9 \pm 0,3^\circ$ prikladni za nazalnu primjenu. Ostatak u kapsuli nakon aktivacije raspršivača iznosio je $0,0 \pm 0,7$ - $2,0 \pm 1,3$ % od početne doze u kapsuli. Mikrosfere su karakterizirane pozitivnim zeta potencijalom ($16,1 \pm 0,9$ - $38,8 \pm 3,9$ mV) što upućuje na mukoadhezivnost i potencijal poboljšanja permeacije uklopljenog lijeka. Primijećen je porast zeta potencijala s porastom molekulske mase kitozana za uzorke s manjim sadržajem manitola.

Donepezil is a reversible inhibitor of the acetylcholinesterase enzyme, used in the treatment of Alzheimer's disease. The disadvantages of oral administration of donepezil are adverse effects in the gastrointestinal system and low bioavailability in the brain due to the drug's poor ability to penetrate the blood–brain barrier. The intranasal route enables the delivery of drug directly to the brain by bypassing the blood-brain barrier. Modern research has been focused on the development of dry powder formulations for intranasal administration based on mucoadhesive polymers such as chitosan. It has been shown that the molecular weight of chitosan can influence the properties of drug formulations.

The aim of this study was to examine the influence of chitosan molecular weight on the properties of chitosan/mannitol based donepezil-loaded microspheres for intranasal administration, prepared by spray drying. In the solutions used, the type of chitosan (high molecular weight, medium molecular weight and low molecular weight) and the concentration of mannitol (4% and 6%, w/v) were varied. The yield of the spray drying process ranged from 36.8% to 65.2%. Entrapment efficiency was high (96.1 ± 1.7 - $101.2\pm 0.7\%$) and drug loading was suitable for intranasal administration. The volume diameters of the prepared donepezil-loaded microspheres, D_{v10} , D_{v50} and D_{v90} , were 7.00 ± 0.07 - 12.0 ± 0.92 μm , 23.2 ± 0.16 - 28.8 ± 1.02 μm and 55.5 ± 0.28 - 73.9 ± 3.02 μm , respectively. The highest D_{v10} was recorded for microspheres prepared by spray drying of the solution containing high molecular weight chitosan and mannitol in a higher concentration. Samples with low molecular weight chitosan had better flow properties than other samples. The measured spray cone angles 17.1 ± 1.5 - $19.9\pm 0.3^\circ$ are suitable for nasal administration. Powder retention within the capsule upon activation ranged from $0.0\pm 0.7\%$ to $2.0\pm 1.3\%$ of the initial dose in the capsule. The microspheres had a positive zeta potential (16.1 ± 0.9 - 38.8 ± 3.9 mV), which indicates possible mucoadhesion and the potential to enhance the permeation of the encapsulated drug. Zeta potential increased with an increase in chitosan molecular weight in samples with lower mannitol content.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

UTJECAJ MOLEKULSKE MASE KITOZANA NA SVOJSTVA MIKROSFERA S DONEPEZILOM PRIPRAVLJENIH SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM

Ivana Potočki

SAŽETAK

Donepezil je reverzibilni inhibitor acetilkolinesteraze koji se koristi u liječenju Alzheimerove bolesti. Nedostaci oralne primjene donepezila su gastrointestinalne nuspojave te mala bioraspoloživost u mozgu zbog slabog prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Nazalnom primjenom zaobilazi se krvno-moždana barijera, što omogućuje izravnu dostavu lijeka u mozak. Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj praškastih farmaceutskih oblika za nazalnu primjenu temeljenih na mukoadhezivnim polimerima kao što je kitozan. Pokazano je da molekulska masa kitozana može utjecati na svojstva farmaceutskih oblika. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj molekulske mase kitozana na svojstva kitozansko-manitolskih mikrosfera s donepezilom za nazalnu primjenu, pripremljenih sušenjem raspršivanjem. U korištenim otopinama variran je tip kitozana (visokomolekulski, srednjemolekulski i niskomolekulski) i koncentracija manitola (4 % i 6 %, *m/V*). Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem kretalo se od 36,8 % do 65,2 %. Uspješnost uklapanja donepezila bila je visoka ($96,1 \pm 1,7$ - $101,2 \pm 0,7$ %) te je sadržaj lijeka u mikrosferama prikladan za nazalnu primjenu. Volumni promjeri pripremljenih mikrosfera s donepezilom, D_{v10} , D_{v50} i D_{v90} , redom su iznosili $7,00 \pm 0,07$ - $12,0 \pm 0,92$ μm , $23,2 \pm 0,16$ - $28,8 \pm 1,02$ μm i $55,5 \pm 0,28$ - $73,9 \pm 3,02$ μm . Najveći D_{v10} zabilježen je za mikrosfere pripravljene sušenjem raspršivanjem otopine koja je sadržavala visokomolekulski kitozan i manitol u većoj koncentraciji. Uzorci s niskomolekulskim kitozonom imali su bolja svojstva tečenja od ostalih uzoraka. Izmjereni su kutovi raspršenja $17,1 \pm 1,5$ - $19,9 \pm 0,3^\circ$ prikladni za nazalnu primjenu. Ostatak u kapsuli nakon aktivacije raspršivača iznosio je $0,0 \pm 0,7$ - $2,0 \pm 1,3$ % od početne doze u kapsuli. Mikrosfere su karakterizirane pozitivnim zeta potencijalom ($16,1 \pm 0,9$ - $38,8 \pm 3,9$ mV) što upućuje na mukoadhezivnost i potencijal poboljšanja permeacije uklopljenog lijeka. Primijećen je porast zeta potencijala s porastom molekulske mase kitozana za uzorke s manjim sadržajem manitola.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 7 grafičkih prikaza, 12 tablica i 59 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nazalna primjena, donepezil, mikrosfere, kitozan, molekulska masa, sušenje raspršivanjem

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

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

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

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

Rad prihvaćen: studeni 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

INFLUENCE OF CHITOSAN MOLECULAR WEIGHT ON THE PROPERTIES OF SPRAY-DRIED DONEPEZIL-LOADED MICROSPHERES

Ivana Potočki

SUMMARY

Donepezil is a reversible inhibitor of the acetylcholinesterase enzyme, used in the treatment of Alzheimer's disease. The disadvantages of oral administration of donepezil are adverse effects in the gastrointestinal system and low bioavailability in the brain due to the drug's poor ability to penetrate the blood-brain barrier. The intranasal route enables the delivery of drug directly to the brain by bypassing the blood-brain barrier. Modern research has been focused on the development of dry powder formulations for intranasal administration based on mucoadhesive polymers such as chitosan. It has been shown that the molecular weight of chitosan can influence the properties of drug formulations. The aim of this study was to examine the influence of chitosan molecular weight on the properties of chitosan/mannitol based donepezil-loaded microspheres for intranasal administration, prepared by spray drying. In the solutions used, the type of chitosan (high molecular weight, medium molecular weight and low molecular weight) and the concentration of mannitol (4% and 6%, w/v) were varied. The yield of the spray drying process ranged from 36.8% to 65.2%. Entrapment efficiency was high (96.1 ± 1.7 - $101.2 \pm 0.7\%$) and drug loading was suitable for intranasal administration. The volume diameters of the prepared donepezil-loaded microspheres, D_{v10} , D_{v50} and D_{v90} , were 7.00 ± 0.07 - 12.0 ± 0.92 μm , 23.2 ± 0.16 - 28.8 ± 1.02 μm and 55.5 ± 0.28 - 73.9 ± 3.02 μm , respectively. The highest D_{v10} was recorded for microspheres prepared by spray drying of the solution containing high molecular weight chitosan and mannitol in a higher concentration. Samples with low molecular weight chitosan had better flow properties than other samples. The measured spray cone angles 17.1 ± 1.5 - $19.9 \pm 0.3^\circ$ are suitable for nasal administration. Powder retention within the capsule upon activation ranged from $0.0 \pm 0.7\%$ to $2.0 \pm 1.3\%$ of the initial dose in the capsule. The microspheres had a positive zeta potential (16.1 ± 0.9 - 38.8 ± 3.9 mV), which indicates possible mucoadhesion and the potential to enhance the permeation of the encapsulated drug. Zeta potential increased with an increase in chitosan molecular weight in samples with lower mannitol content.

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

Thesis includes: 37 pages, 7 figures, 12 tables and 59 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nasal drug administration, donepezil, microspheres, chitosan, molecular weight, spray drying

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

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

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

The thesis was accepted: November 2022.