

Prikladnost pulsirajućeg nebulizatora za nazalnu primjenu in situ gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata

Mrše, Ante

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:712055>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

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



Ante Mrše

**Prikladnost pulsirajućeg nebulizatora za nazalnu
primjenu *in situ* gelirajućih nanosuspenzija
flutikazonpropionata**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Aniti Hafner, na prenesenom znanju, brojnim savjetima te strpljenu i povjerenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem asistentici Lauri Nižić Nodilo, mag. pharm. na uloženom vremenu, podršci i savjetima oko izrade eksperimentalnog dijela ovog rada te svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.

Hvala i svim mojim kolegama i prijateljima bez kojih ove godine studiranja ne bi bile iste.

I za kraj, posebno zahvaljujem Luciji Potočki i svojoj obitelji koji su mi uvijek bili potpora i poticali me da budem najbolja verzija samoga sebe, bez obzira na okolnosti.

1. Uvod	1
1.1. Građa i funkcija nosa.....	1
1.1.1. Oboljenja nosne sluznice.....	2
1.2. Nazalna primjena lijekova u liječenju oboljenja nosne sluznice	3
1.2.1. Farmaceutski oblici u nazalnoj primjeni lijekova.....	4
1.2.1.1. Tekući farmaceutski oblici	4
1.2.1.2. Praškasti farmaceutski oblici	5
1.2.1.3. Nazalni gelovi	5
1.3. Nebulizatori	6
1.3.1. Opće značajke nebulizatora.....	6
1.3.2. Vrste nebulizatora.....	8
1.3.2.1. Mlazni nebulizatori	8
1.3.2.2. Ultrazvučni i mrežni nebulizatori	9
1.3.2.3. Nebulizatori sa sudarajućim mlazovima	11
1.3.2.4. Nebulizatori prilagođeni nazalnoj primjeni	11
1.4. Suspenzije	13
1.4.1. Nanosuspenzije	14
1.5. Flutikazonpropionat	15
2. Obrazloženje teme	16
3. Eksperimentalni dio	18
3.1. Materijali	18
3.2. Metode.....	18
3.2.1. Priprava <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata.....	18
3.2.2. Određivanje veličine suspendiranih čestica flutikazonpropionata	19
3.2.3. Određivanje krivulje viskoznosti <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata.....	19
3.2.4. Ispitivanje ujednačenosti doziranja <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata pulsirajućim nebulizatorom.....	20
3.2.5. Određivanje profila nazalne depozicije <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata nakon raspršivanja pulsirajućim nebulizatorom.....	21
3.2.6. Statistička analiza	22
4. Rezultati i rasprava	23
4.1. Veličina suspendiranih čestica flutikazonpropionata.....	23
4.2. Krivulje viskoznosti <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata	23
4.3. Ujednačenost doziranja <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata pulsirajućim nebulizatorom	25
4.4. Profil nazalne depozicije <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata ..	30
5. Zaključci	34
6. Literatura	35
7. Sažetak.....	39
8. Summary.....	40

Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

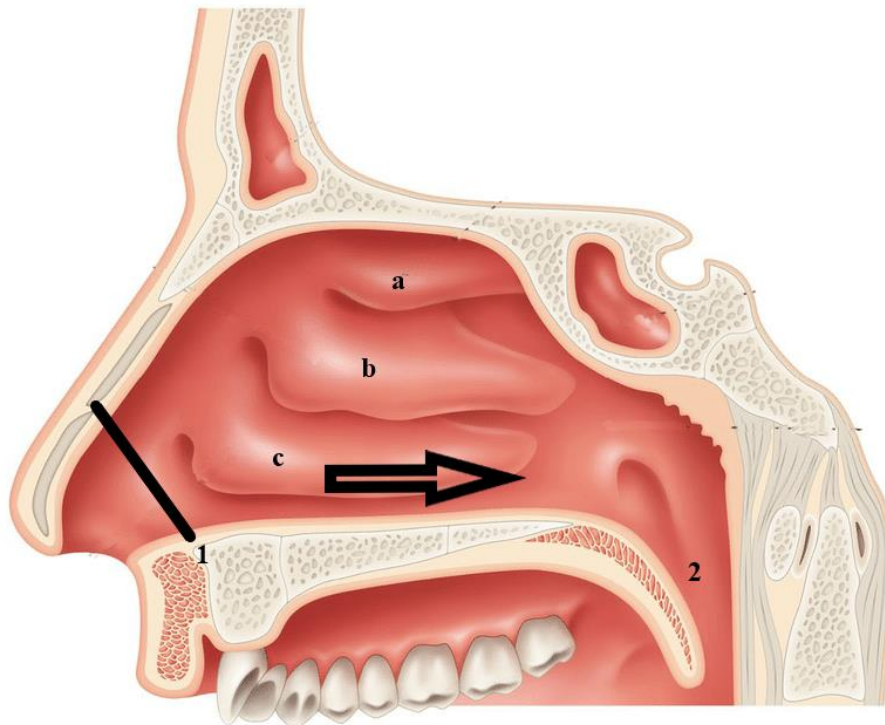
1.Uvod

1.1. Građa i funkcija nosa

Nos je strukturno i funkcionalno kompleksni organ gornjeg dišnog sustava. Uz osjet njuha, funkcije nosa su filtracija, grijanje i vlaženje udahnutog zraka prije nego što dospije do osjetljivijih donjih dijelova dišnog sustava. Nosna šupljina proteže se od nosnica do nazofarinksa (Slika 1.). Podijeljena je nosnom pregradom na dva nejednaka dijela koji su građeni od vanjskog predvorja, nazalnog vestibula, i unutrašnjeg dijela nosne šupljine (nazvanog još turbinatnom regijom), odijeljenog od vestibula nosnom valvulom, mjestom najvećeg suženja u nosnoj šupljini. Početak nosne šupljine obložen je višeslojnim pločastim neuroženim epitelom. Na njega se u unutrašnjem dijelu nosne šupljine nastavlja mukozni pseudovišeslojni cilindrični epitel s mnogobrojnim vrčastim stanicama. Taj se epitel zove još i respiratorni epitel. Bitno obilježje respiratornog epitela su i cilije, odnosno trepetljike. To su mali izdanci iz epitela nosne šupljine koje svojim gibanjem usmjeravaju dinamički sloj sluznice prema nazofarinksu. Procesom prijenosa sluzi prema nazofarinksu i probavnom sustavu odvija se čišćenje nosne sluznice od udahnutih čestica i mikroorganizama. Na zidovima nosne šupljine nalaze se tri nosne školjke (Slika 1.). Donje dvije oblaže respiratorni epitel, a gornja je obložena olfaktornim epitelom. To je posebna vrsta epitela u nosnoj šupljini koja je odgovorna za osjet njuha. Posebnost olfaktornog epitela je u tome da sadrži olfaktorne receptorske stanice preko kojih se može izravno pristupiti središnjem živčanom sustavu. Važno anatomske obilježje nosne šupljine su i teško dostupni paranasalni sinusi. Oni su izdanci nosne šupljine u kosti lubanje. Uloga im je stvaranje sluzi koja se slijeva u nosnu šupljinu te u oblikovanju zvuka pri govoru (Harkema i sur., 2006; Janqueira i Carneiro, 2005; Lane, 2004).

Nazalna sluznica ima bitnu ulogu u imunom odgovoru na alergene i patogene čestice koje izvana u tijelo ulaze kroz nos. Sprječava njihovo prodiranje dublje u nosnu šupljinu te širenje dalje u tijelu, primjerice prema plućima. Izlučena sluz na površini epitela stvara fizičku barijeru koja kao prva crta imunosne obrane u sebi zarobljava patogene koje uđu u nosnu šupljinu. Zarobljene patogene napada imunosni sustav pomoću protutijela imunoglobulina A, koji vezanjem na patogen sprječavaju njihovo vezanje za stanice epitela, te lizozima, enzima koji razgrađuju patogene. Kod razvijanja reakcije hiperosjetljivosti tipa 1, odnosno alergijske reakcije, glavnu ulogu imaju protutijela imunoglobulina E koja tvore komplekse antigen-protutijelo s alergenom. Uslijed nastanka kompleksa antigen-protutijelo

izlučuju se velike količine citokina i histamina što potiče upalu okolnog tkiva (Male i sur., 2012).



Slika 1. Anatomija nosne šupljine. 1 označava valvulu, a 2 lokaciju nazofarinksa. Slovicima a, b i c označene su redom gornja, srednja i donja nosna školjka. Strelica pokazuje smjer mukocilijarnog čišćenja. Prilagođeno iz (Borup i sur., 2020)

1.1.1. Oboljenja nosne sluznice

Sluznica nosa i paranazalnih sinusa podložna je raznim oboljenjima. Većina oboljenja je posljedica mikrobioloških infekcija, alergijskih reakcija ili prirodnog starenja. Izloženost toksinima/ksenobioticima u onečišćenom zraku također potencijalno može uzrokovati oboljenje nosne sluznice ili postojeće oboljenje pogoršati (Harkema i sur., 2006). Najčešća oboljenja nosa su alergijski rinitis te kronični rinosinuitis sa ili bez nazalnih polipa. Osim njih se još znaju javljati epistaksa (krvarenje iz nosa), perforacija nazalnog septuma, nazofaringealni karcinom te mikrobiološke infekcije nosne šupljine (Wang i Luo, 2016; Emerick i Deschler, 2006).

Alergijski rinitis je oboljenje nazalne sluznice inducirano alergenom koji pokreće upalu posredovanu imunoglobulinom E. Karakteriziran je rinorejom, kihanjem, svrbežom

nosa te nazalnom kongestijom. Povezan je s komorbiditetima poput astme, atopijskog dermatitisa i nazalnih polipa, a često samo prethodi razvoju kroničnog rinosinuitisa. Liječenje alergijskog rinitisa je kombinacija izbjegavanja alergena koji pokreće upalu i farmakoterapije. Farmakoterapija uključuje liječenje oralnim H1 antihistaminicima, oralnim i nazalnim kortikosteridima lokalnog djelovanja, kromonima, nazalnim dekonjestivima, inhibitorima leukotriena te imunoterapiju (Varshney i Varshney, 2015).

Kronični rinosinuitis definira se kao kronična upala sluznice nosa i sinusa. Iako se znanje o patofiziologiji bolesti zadnjih par desetljeća jako proširilo, točna etiologija bolesti je i dalje nepoznata. Pretpostavlja se da je uzrok spoj različitih okolišnih i genskih čimbenika. Simptomi vezani za kronični rinosinuitis su nazalna opstrukcija, kongestija nosa, nazalni sekret, gubitak mirisa te nazalni polipi. Prije razvijanja upale, u nazalnoj sluznici su često prisutne bakterije ili gljivice. Stoga je dio farmakoterapije kroničnog rinosinuitisa uklanjanje patogena s nazalne sluznice. To se postiže sistemskom antibiotskom terapijom i topikalnom ili sistemskom primjenom antimikotika (Suh i Kennedy, 2011).

1.2. Nazalna primjena lijekova u liječenju oboljenja nosne sluznice

Nazalna primjena je prvi izbor u liječenju oboljenja sluznice nosne šupljine. Prednost lokalne primjene je dostava lijeka direktno na mjesto djelovanja, što osigurava terapijski učinak pri manjim dozama nego u slučaju sistemske primjene. U odnosu na oralnu primjenu kao najzastupljeniji put sistemske primjene lijekova, dostavom lijeka izravno u nosnu šupljinu izbjegava se prolaz lijeka kroz probavni sustav, metabolizam prvim prolaskom kroz jetru te nuspojave sistemski raspoloživog lijeka. Dodatne značajke nazalne primjene su neinvazivnost i jednostavnost pa su nazalni farmaceutski oblici prikladni u liječenju djece i starijih osoba kao posebnih skupina bolesnika (Brozović i Mrše, 2019; Rohrer i sur., 2018; Kleven i sur., 2005).

Kako bi se ispunio potencijal nazalne primjene, potrebno je savladati ograničenja kao što su kompleksna anatomija nosne šupljine te mukocilijarno čišćenje. Kompleksna anatomija nosne šupljine započinje nosnom valvulom koja predstavlja najuži dio nosne šupljine. Nalazi se na granici unutarnjeg i vanjskog nosa (Slika 1.) te regulira protok zraka kroz nosne hodnike. Kao mjesto najvećeg suženja, otežava dostavu nazalno primijenjenog lijeka u dublje dijelove nosne šupljine (Xi i sur., 2016). Na nosnu valvulu nastavlja se i kompleksna anatomija unutarnjeg nosa s tri nosne školjke koje predstavljaju izbočine/lobuse

u nosnoj šupljini (Slika 1.). Problem anatomije nosa u terapiji sinuitisa opisala je Laube (2007). Definirala je anatomiju nosa kao jedan od glavnih problema ciljane dostave lijeka u dublje dijelove nosne šupljine, što je bitno za učinkovitu terapiju sinuitisa. Osim anatomije nosa, Laube je zaključila kako nazalnu primjenu ograničava i mukocilijarno čišćenje.

Mukocilijarno čišćenje je obrambeni mehanizam nosne sluznice kojim se uklanjaju čestice i patogeni organizmi iz udahnutog zraka prije prolaska u niže dišne putove. Čestice i mikroorganizmi ostaju uhvaćeni u sluzi koja prekriva nosnu sluznicu i prenosi se treperenjem cilija epitelnih stanica prema nazofarinksu i probavnom sustavu (Slika 1.). Iako je uloga mukocilijarnog čišćenja uklanjanje stranih čestica, na isti način djeluje i na nazalno primijenjene lijekove. Značajni dio primijenjene doze lijeka mukocilijarnim mehanizmom čišćenja prenosi se do nazofarinksa preko kojeg odlazi u probavni sustav odakle se lijek može apsorbirati, te ovisno o metabolizmu prvim prolaskom kroz jetru, biti više ili manje sistemski raspoloživ te izazvati nuspojave.

1.2.1. Farmaceutski oblici u nazalnoj primjeni lijekova

Lijekovi za nazalnu primjenu dostupni na tržištu postoje u više farmaceutskih oblika. Najčešći su tekući oblici, a osim njih koriste se i praškasti oblici te gelovi. Otopine su najzastupljeniji tekući oblik, a u primjeni su i suspenzije i emulzije. Odgovarajući farmaceutski oblik i pomoćne tvari odabiru se prema fizičko-kemijskim svojstvima djelatne tvari. U ta svojstva spadaju topljivost, gustoća te kemijska, mikrobiološka i fizička stabilnost (Xi i sur., 2016; Kublik i Vidgren, 1998).

1.2.1.1. Tekući farmaceutski oblici

U izradi tekućih farmaceutskih oblika kao otapalo ili dispezno sredstvo najčešće se koristi voda zbog sigurnosti primjene i svojstva vlaženja sluznice. Vlaženje sluznice pozitivno utječe na ishod liječenja alergija i kroničnih oboljenja nosne šupljine. U takvim stanjima nosna sluznica je najčešće oštećena što rezultira nedovoljnom vlažnošću i isušivanjem sluznice. Osim vode, kao otapala u izradi tekućih oblika za nazalnu primjenu koriste se još i alkohol, masna ulja te druga organska otapala, najčešće kada je djelatna tvar slabo topljiva u vodi.

Glavni nedostatak tekućih oblika s vodom kao otapalom/disperznim sredstvom je slaba mikrobiološka stabilnost. U višedozirnim oblicima mikrobiološka stabilnost postiže se dodatkom konzervansa, primjerice benzalkonijevog klorida. Dodatak konzervansa potencijalno iritira sluznicu nosa te može negativno utjecati na mukocilijarno čišćenje. Dugotrajna primjena konzervansa može rezultirati i alergijskim rinitisom što su dokazali Zia i suradnici (1993). Osim mikrobiološke stabilnosti, problem predstavljaju i kemijska stabilnost tekućih farmaceutskih oblika te fizička stabilnost suspenzija koje su podložne taloženju. Optimiranje formulacije uz pomni odabir prikladnih pomoćnih tvari uključujući pufere, solubilizatore, sredstva za prilagođavanje viskoznosti, konzervanse i antioksidanse ključni su za postizanje odgovarajućeg profila stabilnosti tekućih oblika za nazalnu primjenu (Kublik i Vidgren, 1998).

1.2.1.2. Praškasti farmaceutski oblici

Praškasti farmaceutski oblici su alternativa tekućim oblicima u nazalnoj primjeni. U odnosu na tekuće oblike, farmaceutski prašci su kemijski stabilniji. Mikrobiološka stabilnost se postiže bez dodatka konzervansa što smanjuje mogućnost iritacija. Dodatkom mukoadhezivnih pomoćnih tvari moguće je osigurati bolje i dulje prijanjanje praška na sluznicu i povećani/produljeni učinak lijeka. Sve navedeno može rezultirati rjeđim doziranjem lijeka što povećava adherenciju pacijenata (Sheth i Mistry, 2011; Kublik i Vidgren, 1998). Usprkos navedenim prednostima, praškasti sustavi za nazalnu primjenu rijetko su zastupljeni na tržištu. Primjeri takvih farmaceutskih oblika su Rhinocort Turbohaler[®] (AstraZeneca, Kanada) i Puvlizer Rhinocort[®] (Tejin Pharma Limited, Japan) (Pozzoli i sur., 2016).

1.2.1.3. Nazalni gelovi

Nazalni gel je farmaceutski oblik povećane viskoznosti koji ima potencijal duljeg zadržavanja i produljenog oslobađanja djelatne tvari na nosnoj sluznici. Zbog reoloških svojstava gelove je teže dostaviti u nosnu šupljinu u odnosu na tekuće farmaceutske oblike. Stoga se, kao alternativa nazalnim gelovima, istražuju *in situ* gelirajući sustavi. To su sustavi koji se primjenjuju raspršivanjem u tekućem obliku kao otopine ili suspenzije, a na mjestu primjene, odnosno u kontaktu s nosnom sluznicom, prelaze u gel koji osigurava dulje

zadržavanje i kontrolira oslobađanje uklopljenog lijeka. Geliranje je potaknuto uvjetima na nosnoj sluznici poput pH, temperature ili prisustva kationa. *In situ* gelirajući sustavi, dakle, zadržavaju prednosti gelova, ali zaobilaze njihove probleme u dostavi (Brozović i Mrše, 2019; Sheth i Mistry, 2011).

1.3. Nebulizatori

Nebulizatori su uređaji koji raspršivanjem prevode tekuće farmaceutske oblike u aerosol i omogućuju njihovu primjenu u dišni sustav. Najčešće se koriste u bolničkom liječenju pacijenata koji boluju od kronične opstruktivne bolesti pluća. Prikladni su za pacijente koji imaju smanjeni respiracijski volumen, što je često u oboljenjima dišnog sustava. Zbog smanjene potrebe za koordinacijom udaha i neovisnosti o respiracijskom volumenu, nebulizatori predstavljaju dobro rješenje za dostavu lijeka u dišni sustav djece, starijih te mentalno zaostalih pacijenata. Sve se više istražuju mogućnosti nebulizatora kako bi im se povećala učinkovitost te proširila primjena. Većom dostupnošću nebulizatora za liječenje u samom domu pacijenta, smanjio bi se broj dana koje pacijent mora provesti u bolnici. Uređaji su sve manji kako bi bili lakše prenosivi i jeftiniji. Minimizira se buka koja se proizvodi tijekom rada i smanjuje vrijeme potrebno za primjenu terapijske doze da bi se povećala adherencija pacijenata. Osim prilagodbe kućnoj upotrebi istražuju se i mogućnosti primjene nebulizatora u liječenju drugih dijelova dišnog sustava osim pluća (Tashkin, 2016; Le Brun i sur., 2000; O'Callaghan i Barry, 1997).

1.3.1. Opće značajke nebulizatora

Cilj primjene nebulizatora je dostaviti terapijsku dozu lijeka u obliku aerosola na mjesto djelovanja (u dišnom sustavu) u što kraćem vremenu. Na uspješnost primjene lijeka nebulizatorom utječu različiti faktori kao što su:

- 1) protok plina

Radi se o protoku plina iz izvora, karakterističnog za mlazne nebulizatore. Povećanjem protoka plina ubrzava se raspršivanje lijeka što smanjuje vrijeme primjene te veličinu raspršenih kapljica. Idealni protok plina ovisi o korištenom mlaznom nebulizatoru i

farmaceutskom obliku koji se raspršuje, a većinom odgovara protoku od 6 do 10 l/min (Stenton i sur., 1990)

2) dizajn komore nebulizatora

Svaki model nebulizatora ima sebi svojstveni dizajn komore za farmaceutski oblik. Kod mlaznih nebulizatora postoje razlike u smještaju i obliku pregrada, a mrežni se nebulizatori razlikuju po vrsti mreže kroz koju se raspršuje uzorak. Dizajn ultrazvučnih nebulizatora razlikuje se po vrsti i položaju piezoelektričnog kristala koji stvara ultrazvučne valove (Standard, 1997).

3) rezidualni volumen

Rezidualni volumen je naziv za volumen uzorka koji zaostaje u nebulizatoru nakon završetka raspršivanja. Definira količinu djelatne tvari koja zaostaje u nebulizatoru nakon primjene. Rezidualni volumen se može smanjiti smanjenjem površinske napetosti tekućeg farmaceutskog oblika. Manja površinska napetost rezultira manjim prianjanjem tekućine za stijenke komore nebulizatora što smanjuje gubitke (O'Callaghan i Barry, 1997).

4) volumen punjenja

Volumen punjenja je volumen kojim se puni nebulizator prije početka rada. Ovisi o rezidualnom volumenu. Ako je rezidualni volumen manji od 1 ml, volumen punjenja je oko 2 ml. Nadalje, ako je rezidualni volumen veći od 1 ml volumen punjenja bi trebao biti barem 4 ml. Povećanjem volumena punjenja produljuje se vrijeme primjene što smanjuje adherenciju pacijenata (Standard, 1997).

5) ritam disanja pacijenta

Ritam disanja pacijenta je bitan za depoziciju lijeka, neovisno primjenjuje li se lijek u pluća ili u nosnu šupljinu. Idealnim ritmom se smatra jednoliko disanje na usta s povremenim dubokim udisajima. Ritam i način disanja se može modificirati/optimirati upotrebom posebnih maski za inhalaciju (Standard, 1997).

6) svojstva uzorka

Svojstva poput viskoznosti, temperature i površinske napetosti od velike su važnosti u procesu formuliranja farmaceutskog oblika. Shodno tome utječu na odabir nebulizatora i uspješnost raspršivanja. Fizičko-kemijska svojstva poput topljivosti djelatne tvari i pH

također se trebaju regulirati dodatkom ekscipijensa (primjerice pufera) kako bi se povećala stabilnost uzorka. U tekućim uzorcima koji su suspenzije posebna se pažnja mora obratiti na pojavu flokulacije suspenzije s obzirom da se takve suspenzije teško raspršuju (Standard, 1997).

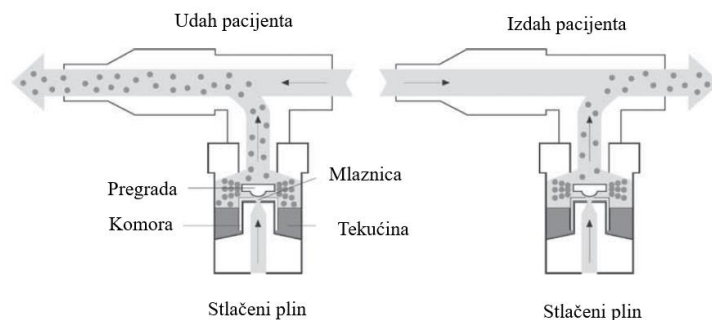
1.3.2. Vrste nebulizatora

Vrste nebulizatora se razlikuju po načinu raspršivanja tekućeg farmaceutskog oblika u aerosol. Nebulizatori se najčešće dijele na:

- a) mlazne (kompresorske) nebulizatore (engl. *jet nebulizers*)
- b) ultrazvučne nebulizatore (engl. *ultrasonic nebulizers*)
- c) mrežne nebulizatore (engl. *mesh nebulizers*)
- d) nebulizatore sa sudarajućim mlazovima (engl. *colliding jets nebulizers*)

1.3.2.1. Mlazni nebulizatori

Mlazni nebulizatori su najstarija vrsta nebulizatora na tržištu. Raspršivanje postižu zračnim praskom koji nastaje prolaskom plina (zrak, kisik...) kroz mlaznicu (Slika 2.) u kojoj plin dobiva na brzini. Kada ubrzani plin uđe u komoru, stupa u kontakt s tekućinom (O'Callaghan i Barry, 1997). Kontakt ubrzanog plina i stacionarne tekućine rezultira raspršenjem tekućine u kapljice, a uslijed razlike u brzini i viskoznosti između plina i tekućine (Lavorini i sur., 2011). Veličina (promjer) kapljica koje nastaju ovom metodom varira od 15 do 500 μm . Na promjer kapljica utječe i dizajn komore nebulizatora. Kapljice koje nastaju u prvom ciklusu raspršivanja nazivaju se primarne kapljice. Veći dio primarnih kapljica, u starijim nebulizatorima i do 95 %, je preveliko da prođu pregradu te zaostaju na njoj. Kapljice koje zaostaju na pregradi vraćaju se u komoru te podliježu novom ciklusu raspršivanja. Svaki novi ciklus raspršivanja nepovoljan je za farmaceutski oblik jer uzrokuje dodatna naprezanja što može rezultirati raspadanjem makromolekula ili nosača djelatne tvari poput liposoma. Stoga opisana metoda nije prikladna za raspršivanje farmaceutskih oblika koji sadrže makromolekule kao što su proteini i DNA, iako su Qaseem i sur. (2011) pokazali kako se dodatkom protektivnog agensa može utjecati na očuvanje makromolekula u ljekovitom obliku (Tashkin, 2016; Sharafkhaneh i sur., 2013; Barta i sur., 2002).



Slika 2. Princip rada mlaznog nebulizatora pri udahu i izdahu pacijenta uz naznačene dijelove nebulizatora. Prilagođeno iz (Martin i Finlay, 2015)

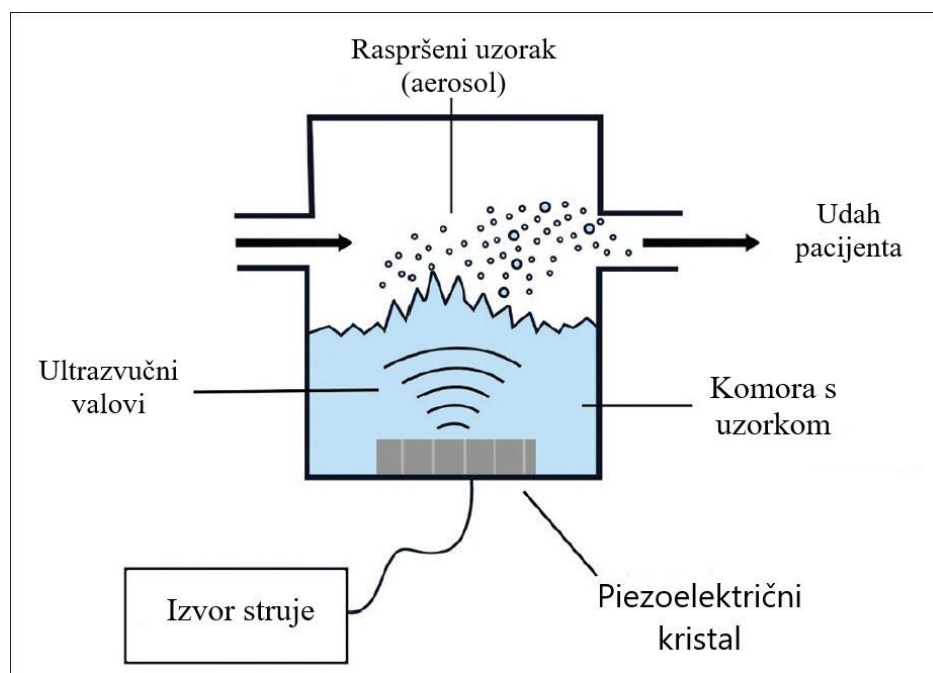
Problem mlaznih nebulizatora je njihova teška standardizacija, što je posljedica isparavanja otapala tijekom raspršivanja aerosola. Isparavanjem se povećava koncentracija tekućeg farmaceutskog oblika koji je u komori, što rezultira većim gubitcima lijeka u rezidualnom volumenu. Loša standardizacija je razlog ograničene kontrole doziranja lijeka uslijed koje se primjenjuje veća doza kako bi se osiguralo djelovanje. Međutim, povećanjem doze povećava se i rizik od javljanja nuspojava. Isparavanje otapala također rezultira smanjenjem temperature tekućeg farmaceutskog oblika što rezultira nelagodnim osjećajem i nadraživanjem dišnog sustava (Pritchard i sur., 2018; Gowda i sur., 2017; Martin i Finlay, 2015; Pedersen, 1996).

Unatoč problemima, mlazni nebulizatori su i dalje prvi izbor u raspršivanju vodenih suspenzija. Jedina su vrsta nebulizatora koja pri raspršivanju suspenzija ne stvara kapljice aerosola bez čestica djelatne tvari. Promjer kapljica raspršenog aerosola suspenzija se pokušava maksimalno smanjiti kako bi se izbjeglo prekomjerno nakupljanje djelatne tvari u većim kapljicama (Tashkin, 2016).

1.3.2.2. Ultrazvučni i mrežni nebulizatori

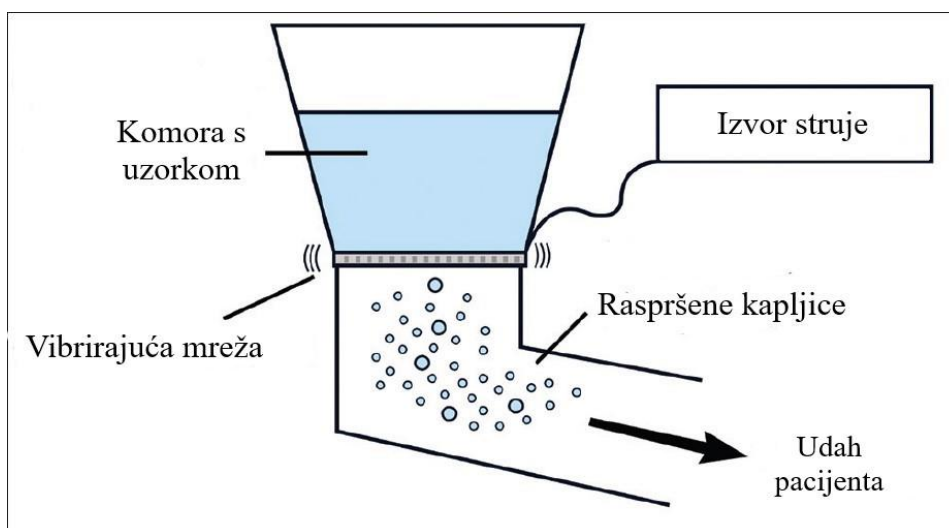
Ultrazvučni i mrežni nebulizatori su druga skupina nebulizatora po načinu nastajanja aerosola. Nemaju potrebu za stlačenim plinom, već atomizaciju postižu vibracijama visokih frekvencija. Vibracije se postižu različitim metodama. Najstarija metoda je uranjanje piezoelektričnog kristala u tekućinu pri čemu se piezoelektričnim efektom stvaraju valovi sile na granici faza tekućina/zrak što rezultira stvaranjem kapljica (Slika 3.). Nebulizatori koji koriste ovu metodu raspršivanja zovu se ultrazvučni nebulizatori. Opisana metoda nije

prikladna za raspršivanje tekućih oblika velike gustoće ni za suspenzije. Također, tijekom raspršivanja ultrazvučnim nebulizatorom stvara se toplina te se raspršivani uzorak zagrijava, što nije prikladno za termolabilne lijekove. Nova varijanta ultrazvučnih nebulizatora raspršuje tekući farmaceutski oblik primjenom površinskih akustičnih valova (engl. *surface acoustic wave*, SAW). Inducirani su piezoelektričnim kristalom, međutim viših su frekvencija i niže energije za razliku od valova klasičnih ultrazvučnih nebulizatora. Takvi valovi manje utječu na stabilnost molekula te omogućuju nebulizaciju većeg dijela uzorka u odnosu na obične ultrazvučne nebulizatore (Pritchard i sur., 2018; Gowda i sur., 2017; Martin i Finlay, 2015; Beule, 2010; Pedersen, 1996).



Slika 3. Prikaz rada i dijelovi ultrazvučnog nebulizatora. Prilagođeno iz (Alharbi i sur., 2021)

U mrežnim nebulizatorima je piezoelektrični kristal zamijenjen mrežom koja generira kapljice aerosola (Slika 4.). Raspršenje tekućeg oblika može se postići na dva načina. U prvoj varijanti se mreža giba lijevo desno dok je tekućina stacionarna, a u drugoj tekućina oscilira u odnosu na stacionarnu mrežu. Za raspršenje tekućeg farmaceutskog oblika mrežnim nebulizatorom karakterističan je mali rezidualni volumen, odnosno mali gubitak djelatne tvari. Mrežni nebulizatori su vrlo osjetljivi zbog svojih elektroničkih komponenti. Neadekvatnom brigom se lako mogu onečistiti što dovodi do kvarova (Pritchard i sur., 2018).



Slika 4. Prikaz rada i dijelovi mrežnog nebulizatora. Prilagođeno iz (Alharbi i sur., 2021)

1.3.2.3. Nebulizatori sa sudarajućim mlazovima

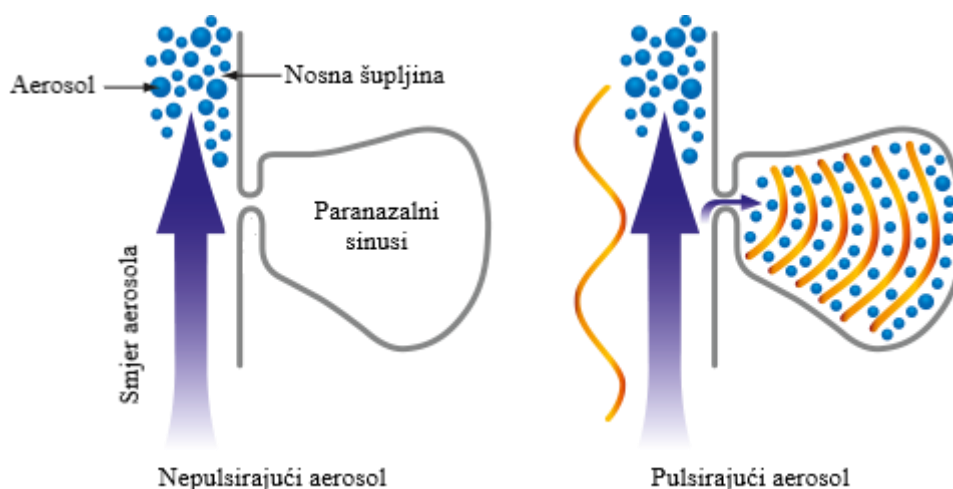
Nebulizatori sa sudarajućim mlazovima slični su mrežnim nebulizatorima. Protiskuju tekuću formulaciju pri velikom tlaku kroz mlaznicu (sito), pri čemu nastaju dva mlaza koji se međusobno sudaraju pri velikoj brzini i stvaraju aerosol (Martin i Finlay, 2015).

1.3.2.4. Nebulizatori prilagođeni nazalnoj primjeni

Veličina kapljica nastalog aerosola je od velikog značaja za nazalnu primjenu. Manje i sporije kapljice se češće odlažu u srednjem i gornjem meatusu te paranazalnim sinusima koji su od velike važnosti u lokalnoj terapiji nosne sluznice (Djupesland, 2013). Do sada navedeni nebulizatori raspršuju tekuće farmaceutske oblike pomoću stlačenog plina, ultrazvučnih valova ili prolaskom tekućeg oblika kroz mrežu. Međutim, spomenute vrste nebulizatora slabo su prikladne za nazalnu primjenu. Naime, 33 do 56% doze lijeka gubi se u plućima što rezultira kašljanjem i potrebom za povećanjem doze lijeka (Xi i sur., 2016). Zbog toga se radi na razvoju nebulizatora koji je u potpunosti prilagođen nazalnoj primjeni. Primjer nebulizatora prilagođenog nazalnoj primjeni je pulsirajući nebulizator.

Pulsirajući nebulizator

Pulsirajući nebulizator je namijenjen ciljanoj primjeni lijeka u nosnu šupljinu. Ciljana depozicija postiže se generiranjem mlaza aerosola koji pulsira određenom frekvencijom i amplitudom. Naime, male čestice, srednjeg promjera od 3 μm , generiraju se zračnim praskom (BISCO, 2017). Pulsiranjem postižu bolje i dublje prodiranje u paranazalne sinuse (Slika 5.). Učinkovitost pulsirajućeg aerosola opisali su Wiesemann i suradnici (1998) na primjeru infekcija bakterijom *Pseudomonas aeruginosa* koje su zahvatile paranazalne sinuse. Farmaceutski oblik tobramicina je pulsirajućim nebulizatorom uspješno dostavljen u paranazalne sinuse što je značajno pridonijelo liječenju infekcije. Dostava lijeka se dodatno optimira tehnikama disanja te zatvaranjem druge nosnice kako bi se izbjegli gubici lijeka (Djupesland, 2013). Veliku djelotvornost pulsirajućeg nebulizatora su također dokazali Möller i suradnici (2010). Pomoću nuklearne magnetne rezonancije i radioaktivnog kriptona pokazali su kako pulsirajući efekt uvelike pridonosi depoziciji u paranazalne sinuse u odnosu na primjenu lijeka bez pulsiranja. Pulsirajući nebulizator pokazuje obećavajuće rezultate u nazalnoj primjeni i treba se dodatno istražiti kako bi se usavršila njegova upotreba (Espenschied i sur., 2010; Keller i sur., 2010; Schuschnig i sur., 2008; Valentine i sur., 2008).



Slika 5. Prikaz prodiranja pulsirajućeg aerosola u paranazalne sinuse. Prilagođeno sa (<https://www.pari.com/us-en/products/sinus/sinustm-pulsating-aerosol-system/>)

1.4. Suspenzije

Suspenzija kao tekući farmaceutski oblik je disperzni sustav u kojemu je djelatna tvar (disperzna faza) u čvrstom stanju raspršena u tekućem disperznom sredstvu, najčešće vodi. Općenito, prema veličini dispergiranih čestica, disperzni sustavi dijele se na grube disperzije, koloidne disperzije i molekulske disperzije (otopine). U grubim disperzijama promjer dispergiranih čestica veći je od 1 μm , u koloidnim disperzijama je u rasponu od 1 do 1000 nm, a u otopinama je promjer čestica manji od 1 nm. Po odnosu veličina čestica u disperznom sustavu, idealni sustav bio bi monodisperzni, odnosno onaj u kojemu su sve čestice jednake veličine. To često nije moguće postići te prevladavaju heterodisperzni sustavi, odnosno sustavi u kojem postoji razlika u veličini čestica (Aulton i Taylor, 2018).

Suspenzijama je svojstvena slaba topljivost disperzne faze u disperznom sredstvu. U pravilu je, kod suspenzija kao tekućeg farmaceutskog oblika, disperzna faza/djelatna tvar hidrofobna. Hidrofobnost djelatne tvari dolazi od komplementarnosti s receptorima u ljudskom tijelu koji su većinski hidrofobni, a za koje je dizajnirana. Razlika u polarnosti disperzne faze i disperznog sredstva čini suspenzije nestabilnim sustavima. Bez dodatka pomoćnih (površinski aktivnih) tvari, suspendirane čestice aglomeriraju te se talože ili izlučuju na površinu (zbog većeg afiniteta prema zraku nego prema vodi).

Prema načinu sedimentiranja suspenzije se mogu podijeliti na flokulirane i deflokulirane suspenzije. U flokuliranim su suspenzijama čestice povezane u slabe nakupine (flokule) koje se brzo sedimentiraju dajući rahli talog koji se lagano redispergira potresivanjem. Nasuprot tome, deflokulirane suspenzije karakterizirane su dobro suspendiranim česticama koje se sporo talože dajući gusti sediment, još zvan i „kolač“, koji se teško redispergira i čini suspenziju neupotrebljivom. Iz tog razloga se u formulaciji suspenzija češće koriste flokulirane nego deflokulirane suspenzije (Aulton i Taylor, 2018; Edman, 1994).

Stabilnost suspenzija osigurava se dodatkom sredstva za močenje ili peptizatora. Sredstvo za močenje smanjuje površinsku napetost između dviju faza (disperzne faze i disperznog sredstva) i tako stabilizira suspenziju. Peptizatori stabiliziraju suspenzije adsorbiranjem iona na površinu raspršenih čestica čime stvaraju istovrsni naboj na površini čestica što rezultira međusobnim odbijanjem čestica i sprječava njihovu aglomeraciju. Alternativu tim metodama predstavlja primjena sredstava za prilagođavanje viskoznosti kojima se povećava viskoznost disperznog sredstva, čime se usporava proces aglomeracije čestica.

Zbog problema u održavanju kemijske stabilnosti suspenzija, ali i zbog problema s doziranjem heterodisperznih sustava, istražuju se novi oblici disperznih sustava. Liposomi, mikroemulzije i inkluzijski kompleksi s ciklodekstrinima predstavljaju nove oblike disperznih sustava prikladne za uklapanje teško topljivih lijekova. Ti oblici pokazuju prednosti nad klasičnim suspenzijama, međutim nedostaje im univerzalna primjenjivost na sve vrste djelatne tvari. Zato se u zadnje vrijeme sve više istražuju nanosuspenzije kao novi oblik disperznih sustava (Aulton i Taylor, 2018; Djupesland, 2013; Kublik i Vidgren, 1998; Marttin i sur., 1998).

1.4.1. Nanosuspenzije

Nanosuspenzije su koloidne disperzije u kojima su suspendirane čestice djelatne tvari nanometarskog raspona veličina. Koriste se za oblikovanje djelatnih tvari teško topljivih u vodi s ciljem povećanja njihove brzine otapanja/topljivosti i raspoloživosti na mjestu djelovanja. Trenutno se posebna pažnja posvećuje proširenju mogućnosti topikalne primjene nanosuspenzija (Agrawal i Patel, 2011; Patravale i sur., 2010).

Prilikom razvoja nanosuspenzija je, kao i kod običnih suspenzija, potrebno osigurati dostatnu stabilnost. Dodatkom tvari za močenje smanjuje se velika površinska energija u nanosuspenzijama, odnosno sprječava se aglomeracija čestica (Kumar i Krishna, 2011). Ostwaldovo zrenje je vid fizičke nestabilnosti specifičan za koloidne disperzne sustave poput nanosuspenzija. Posljedica je različite brzine otapanja i topljivosti manjih i većih čestica disperzne faze uslijed čega veće čestice rastu dok se manje čestice otapaju. Pojava Ostwaldovog zrenja može se spriječiti izradom nanosuspenzija uske raspodjele veličina čestica te dodatkom površinski aktivnih tvari koje se smiještaju na površini nanokristala djelatne tvari sprječavajući rast kristala (Agrawal i Patel, 2011; Patravale i sur., 2010).

Glavne prednosti nanosuspenzija posljedica su male veličine suspendiranih čestica djelatne tvari. Sama priprema nanosuspenzija jednostavan je proces koji se lako prilagođava proizvodnji u industrijskim pogonima (Aulton i Taylor, 2018; Agrawal i Patel, 2011). Monodisperznost srednjeg dometa, koja je posljedica načina pripreme nanosuspenzija, omogućuje dugotrajnu fizičku stabilnost suspenzija i tako produljuje rok upotrebe istih. Nanosuspenzije se primjenjuju različitim putovima primjene: parenteralno, oralno, pulmonalno i okularno, a istražuju se i mogućnosti njihove bukalne, topikalne i nazalne primjene (Patravale i sur., 2010).

U nazalnoj primjeni nanosuspenzije predstavljaju alternativu klasičnim suspenzijama i suhim prašcima. Nanosuspenzije umanjuju probleme ograničenog otapanja i difuzije djelatne tvari na mjestu primjene. Povećana adhezija nanokristala na nosnu sluznicu usporava mukocilijarno čišćenje i osigurava produljeni učinak lijeka (Duchêne i Ponchel, 1997). Zbog opisanog potencijala nanosuspenzija, u ovom radu je istraživana mogućnost nazalne primjene nanosuspenzije flutikazonpropionata putem nebulizatora.

1.5. Flutikazonpropionat

Flutikazonpropionat topikalni je kortikosteroid iz skupine glukokortikosteroida. Koristi se nazalno oblikovan kao suspenzija u obliku kapi i spreja za nos te pulmonalno u obliku praška inhalata ili stlačenog inhalata, suspenzije.

Farmakodinamički djeluje na upalu na više razina. Preko receptora u citoplazmi stanica utječe na sintezu proupalnih citokina i smanjuje aktivaciju bazofila te broj mastocita u tkivu. Slijedom toga je prikladan u liječenju kroničnih upalnih stanja (Bryson i Faulds, 1992).

Slabo je topljiv i izrazito lipofilan te vrlo male sistemske raspoloživosti nakon lokalne primjene. Frakcija flutikazonpropionata koji se ipak apsorbira putem crijevne sluznice podliježe gotovo potpunoj razgradnji metabolizmom u jetri. Zbog toga su sistemske nuspojave pri primjeni flutikazonpropionata minimalne. Afinitet vezanja flutikazonpropionata za receptore je vrlo visok, čime postiže jače djelovanje u odnosu na druge kortikosteroide (Staresinic i Sorkness, 2000). Flutikazonpropionat se među kortikosteroidima ističe po svojoj sigurnosti i učinkovitosti u lokalnoj primjeni. Stoga se nameće kao najčešći izbor kod lokalne terapije kroničnih upala u dišnom sustavu. Primjeri su liječenje kroničnog alergijskog rinitisa i rinosinitisa s nosnim polipima te liječenje astme (Staresinic i Sorkness, 2000).

2. Obrazloženje teme

Nebulizatori su uređaji koji omogućuju dostavu lijeka u obliku aerosola u pluća. Uobičajeno se koriste pri bolničkom liječenju astme, cistične fibroze, kronične obstruktivne bolesti pluća i drugih oboljenja dišnog sustava. Raspršuju lijek u aerosol kojeg pacijent primjenjuje inhalacijom. Koriste se kod pacijenata smanjenog respiracijskog volumena te smanjene mogućnosti koordinacije udaha. Zbog tih značajki, nebulizatori su prikladni za primjenu u djece, starijih te mentalno zaostalih pacijenata. Prilagodбом i razvojem novijih vrsta nebulizatora omogućena je i njihova primjena u domu bolesnika, što pridonosi smanjenju boravka pacijenta u bolnici i bolničkih troškova (Tashkin, 2016).

Osim u terapiji plućnih oboljenja, nebulizatori imaju potencijal primjene i u liječenju oboljenja drugih dijelova dišnog sustava. Istraživanje mogućnosti primjene nebulizatora za dostavu lijeka u nosnu šupljinu rezultiralo je razvojem pulsirajućih nebulizatora. Navedeni tip nebulizatora osigurava depoziciju lijeka u nosnoj šupljini i paranazalnim sinusima. Kapljice prikladne veličine generiraju se pulsiranjem mlaza aerosola određenom frekvencijom i amplitudom (Espenschied i sur., 2010; Keller i sur., 2010).

Nedostatak pri nazalnoj primjeni lijeka nebulizatorom je depozicija dijela doze u plućima. Navedeni problem može se umanjiti tehnikama disanja koje se koriste tijekom primjene (Djupesland, 2013). Prikladnost pulsirajućeg nebulizatora u nazalnoj primjeni inovativnih terapijskih sustava još se treba istražiti.

Cilj ovog rada je pripremiti pseudoplastične *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata s natrijevim hijaluronatom kao konstitutivnim polimerom te pektinom i gelan gumom ili ksantan gumom kao *in situ* gelirajućim polimerima te ispitati prikladnost pulsirajućeg nebulizatora za njihovu nazalnu primjenu.

Specifični ciljevi

- Pripraviti *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata s polisorbatom 80 kao sredstvom za močenje, natrijevim hijaluronatom kao konstitutivnim polimerom te pektinom i gelan gumom ili ksantan gumom kao *in situ* gelirajućim polimerima
- Odrediti veličinu suspendiranih čestica flutikazonpropionata i indeks polidisperznosti u pripremljenim *in situ* gelirajućim nanosuspenzijama
- Odrediti krivulju viskoznosti *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata
- Ispitati utjecaj vremena predgrijavanja i vremena rada pulsirajućeg nebulizatora na brzinu i ujednačenost doziranja odnosno ponovljivost raspršene mase pripremljenih *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata
- Odrediti profil nazalne depozicije *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata nakon raspršivanja pulsirajućim nebulizatorom pri različitim vremenima predgrijavanja, uz upotrebu komercijalno dostupnog transparentnog modela nosne šupljine
- Usporediti profile nazalne depozicije *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata pri primjeni pulsirajućim nebulizatorom i klasičnim nazalnim sprejem

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

U eksperimentalnom dijelu rada za izradu *in situ* gelirajućih nanosuspenzija korišteni su flutikazonpropionat (Carbosynth Ltd, UK), polisorbata 80 (Sigma-Aldrich, SAD), gelan guma (Phytigel, Sigma-Aldrich, SAD), ksantan guma (Kemig, Hrvatska), natrijev hijaluronat (molekulska masa 0,8 MDa; Contipro, Češka), niskometoksilirani amidirani pektin CF 025 (stupanj esterifikacije 23-28 %; stupanj amidacije 22-25 %, Herbstreith & Fox, Njemačka), manitol (VWR Chemicals BDH, SAD) i NaOH 1 M (Kemika, Hrvatska). Kao indikatorsko bojilo pri određivanju depozicije *in situ* gelirajućih nanosuspenzija u modelu nosne šupljine korištena je indikatorska pasta Sar-Gel[®] (Arkema Inc., Sartomer Americas, SAD).

3.2. Metode

3.2.1. Priprava *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata

Osnovne otopine polimera pripravljene su otapanjem krutine u pročišćenoj vodi uz miješanje na magnetnoj miješalici. Otopine pektina, gelan gume, natrijevog hijaluronata i ksantan gume redom su pripravljene u koncentraciji od 1,4, 0,6, 0,5 i 0,25 % (*m/m*). Vodena otopina pektina je filtrirana prije upotrebe. Pri otapanju gelan gume, vodena disperzija polimera zagrijavana je pri temperaturi od 85 °C i miješana do potpunog otapanja polimera.

Osnovna suspenzija flutikazonpropionata pripravljena je rastrljavanjem mikroniziranog flutikazonpropionata s polisorbatom 80 kao sredstvom za močenje u masenom omjeru 2:1 te dodatkom pročišćene vode do nastanka suspenzije flutikazonpropionata u koncentraciji od 0,48 % (*m/m*). Koncentracija polisorbata 80 u pripremljenoj suspenziji iznosila je 0,24 % (*m/m*).

Pripremljena suspenzija podvrgnuta je vlažnom mljevenju u vijalama promjera 2 cm i visine 6 cm u koje su izvagane kuglice za mljevenje promjera 0,1 mm, 0,2 mm i 0,4-0,6 mm, po 0,5 g svake veličine (ukupno 1,5 g). U svaku vijalu su dodani osnovna suspenzija u količini od 2,5 g i 5 cilindričnih magnetnih mješača duljine 10 mm i promjera 6 mm. Uzorci su miješani pri sobnoj temperaturi na magnetnoj miješalici tijekom 24 sata, nakon čega su nadopunjeni otopinom polimera te, po potrebi, pročišćenom vodom, do željenih koncentracija djelatne tvari i polimera prikazanih u Tablici 1. Naknadno je dodan manitol pri koncentraciji

od 4 % (*m/m*) radi izotonizacije. Tako pripremljenom uzorku je dodatkom malog volumena otopine NaOH (1 M) prilagođen pH na $6,0 \pm 0,1$.

Tablica 1. Sastav pripremljenih *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata

Uzorak	Pektin (%, <i>m/m</i>)	Gelan guma (%, <i>m/m</i>)	Na-hijaluronat (%, <i>m/m</i>)	Ksantan guma (%, <i>m/m</i>)	Flutikazonpropionat (%, <i>m/m</i>)	Polisorbat 80 (%, <i>m/m</i>)
UGG	0,66	0,1	0,05	-	0,06	0,03
UXG	0,66	-	0,05	0,05	0,06	0,03

3.2.2. Određivanje veličine suspendiranih čestica flutikazonpropionata

Srednji promjer suspendiranih nanočestica *in situ* gelirajućih suspenzija određen je metodom fotonske korelacijske spektroskopije na uređaju Zetasizer Ultra (Malvern Pananalytical d.o.o., UK). Uzorci su prije mjerenja razrijeđeni 10 puta otopinom polisorbata 80 koncentracije 0,03 % (*m/m*). U polistirensku kivetu dimenzija 10×10×45 mm prenesen je 1 ml razrijeđenog uzorka. Mjerenje je provedeno pri temperaturi od 23 °C, a svako mjerenje je ponovljeno pet puta.

3.2.3. Određivanje krivulje viskoznosti *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata

Reološka karakterizacija *in situ* gelirajućih nanosuspenzija je provedena na reometru MCR 102 (Anton Paar, Austrija). Krivulje viskoznosti *in situ* gelirajućih nanosuspenzija određene su rotacijskim testom koji pokazuje ponašanje uzorka pri različitim brzinama smicanja. Mjerenje je rađeno pri 25 °C korištenjem mjernog tijela mjerni stožac (CP50-1), nagiba 1° i promjera 50 mm. Udaljenost od donje mjerne ploče je iznosila 0,102 mm. Tijekom mjerenja promatran je utjecaj različitih brzina smicanja u području od 1 do 100 s⁻¹ na tečenje sustava te je prikazana funkcija ovisnosti viskoznosti (η , mPa s) o brzini smicanja ($\dot{\gamma}$, s⁻¹).

3.2.4. Ispitivanje ujednačenosti doziranja *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata pulsirajućim nebulizatorom

Raspršivanje *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata provedeno je Pari SinusTM nebulizatorom (PARI, Njemačka; Slika 7.). Ispitan je utjecaj predgrijavanja nebulizatora na ujednačenost doziranja odnosno ponovljivost raspršene mase uzorka. Komora nebulizatora napunjena je volumenom uzorka od 4 do 5 ml. Nebulizator je predgrijavan u vremenu od 0, 15 i 30 sekundi, dok je vrijeme rada nebulizatora/raspršivanja uzorka iznosilo 10, 20, 30, 45 i 60 sekundi. Sva mjerenja su napravljena u 10 ponavljanja. Količina raspršenog uzorka određena je gravimetrijski, odnosno iz razlike mase spremnika nebulizatora prije i poslije raspršivanja.



Slika 7. Nebulizator Pari SinusTM pripremljen za ispitivanje ujednačenosti doziranja *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata

3.2.5. Određivanje profila nazalne depozicije *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata nakon raspršivanja pulsirajućim nebulizatorom

Pri određivanju profila nazalne depozicije *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata nakon raspršivanja pulsirajućim nebulizatorom korišten je komercijalno dostupni transparentni model nosne šupljine (Koken Co Ltd., Japan; Slika 8.). Unutrašnjost nosne šupljine i septum premazani su Sar-gel[®] pastom radi vizualizacije profila depozicije nanosuspenzije u modelu nosne šupljine. Prije svakog mjerenja, nebulizator je predgrijavan u trajanju od 0, 15 i 30 sekundi. Zatim je spojen na nosnicu kroz koju je uzorak raspršivan u trajanju od 45 sekundi. Masa uzroka raspršenog u nosnu šupljinu određena je gravimetrijski, odnosno iz razlike u masi spremnika nebulizatora prije i poslije raspršivanja. Sar-gel[®] pasta u kontaktu s vodenim medijem poprima ružičastu boju, omogućujući vizualizaciju profila depozicije raspršenog uzroka u modelu nosne šupljine.

Usporedbe radi, odabrani uzorci raspršivani su u nosnu šupljinu i klasičnom primjenom nazalnog raspršivača Spray Pump 3K (Aeropump, Njemačka, volumen doziranja 140 µl). Kako bi se postigla jednoličnost doze raspršenog uzorka, prije mjerenja napravljeno je nekoliko potisaka nazalnim raspršivačem.



Slika 8. Pulsirajući nebulizator spojen na transparentni model nosne šupljine tijekom ispitivanja profila depozicije *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata

3.2.6. Statistička analiza

Regresijska analiza ovisnosti isporučene mase raspršenog uzorka *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata o vremenu provedena je korištenjem GraphPad Prism programa (GraphPad Software, Inc., San Diego, SAD; www.graphpad.com; probna verzija 8.0).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Veličina suspendiranih čestica flutikazonpropionata

Srednji promjer i indeks polidisperznosti čestica flutikazonpropionata u *in situ* gelirajućim nanosuspencijama određeni su metodom fotonske korelacijske spektroskopije. Navedeni parametri ovisni su o uspješnosti mljevenja suspenzija te prisustvu površinski aktivne tvari i polimera u sustavu (Agrawal i Patel, 2011; Cerdeira i sur., 2010).

Srednji promjer čestica *in situ* gelirajuće nanosuspencije pripravljene uz dodatak gelan gume (uzorak UGG) je $218,5 \pm 7,0$ nm, a indeks polidisperznosti je $0,508 \pm 0,092$. Nadalje, čestice flutikazonpropionata u *in situ* gelirajućoj nanosuspenciji pripravljenoj uz dodatak ksantan gume (uzorak UXG) imaju srednji promjer od $171,1 \pm 2,7$ nm, a indeks polidisperznosti od $0,420 \pm 0,019$.

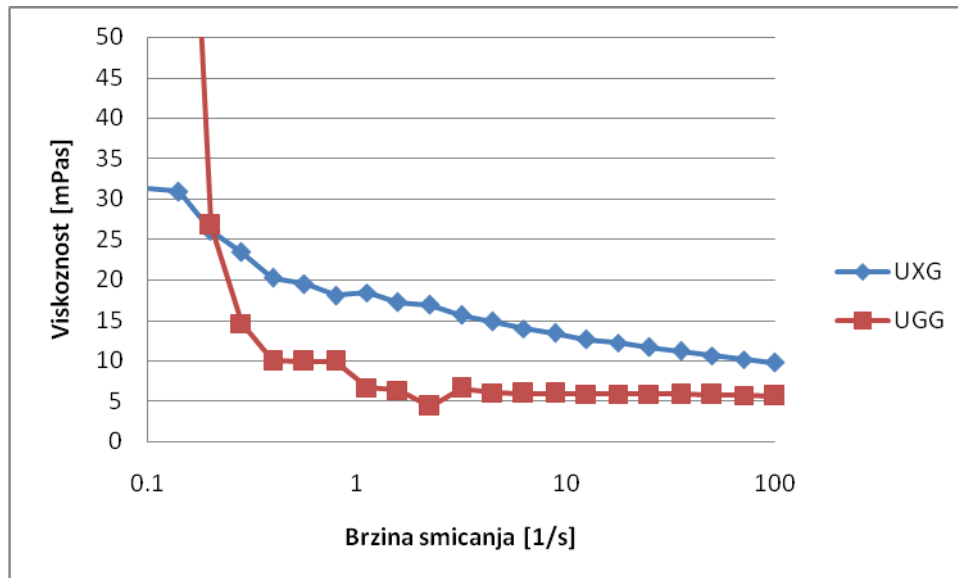
Veličina nanočestica flutikazonpropionata potvrđuje uspješno usitnjavanje kristala lijeka do nanometarske veličine metodom vlažnog mljevenja u laboratorijskom mjerilu. Vrijednosti indeksa polidisperznosti manje su od 0,7 što ukazuje na uspješnu pripremu nanosuspencija (Mahbubul, 2019; Mudalige i sur., 2018). Općenito se sustavi s indeksom polidisperznosti manjim od 0,05 smatraju monodisperznima, a oni s indeksom polidisperznosti većim od 0,7 polidisperznima. Vrijednosti indeksa polidisperznosti koje se nalaze između 0,05 i 0,7 opisuju sustave koji se u širem smislu mogu smatrati monodisperznima (engl. *nearly to mid-range monodisperse*) (Shakrani i sur., 2020).

Značaj ujednačene veličine čestica djelatne tvari u (nano)suspencijama je njihova jednolika raspodjela u kapljicama raspršenog aerosola. Heterogena raspodjela može rezultirati neujednačenom koncentracijom djelatne tvari u kapljicama u nosnoj šupljini, što onemogućuje zadovoljavajuću kontrolu nad doziranjem i depozicijom djelatne tvari. Jednolika raspodjela veličine čestica je, osim zbog kontrole doziranja i depozicije, potrebna i kako bi se izbjeglo Ostwaldovo zrenje koje predstavlja rast kristala u nanosuspencijama neujednačene veličine suspendiranih čestica (Aulton i Taylor, 2018; Finlay i sur., 1997).

4.2. Krivulje viskoznosti *in situ* gelirajućih nanosuspencija flutikazonpropionata

Izrađene *in situ* gelirajuće nanosuspencije flutikazonpropionata, UGG i UXG, predstavljaju sustave povećane viskoznosti, s obzirom na dodatak hidrofилnih polimera -

natrijevog hijaluronata, pektina te gelan ili ksantan gume. Prilagođena viskoznost pridonosi stabilnosti izrađениh nanosuspenzija u mirovanju. No, za takve sustave važno je ispitati kako se viskoznost mijenja ovisno o brzini smicanja, a s ciljem predviđanja njihovog ponašanja pri raspršivanju. Promjena viskoznosti razvijenih *in situ* gelirajućih nanosuspenzija u ovisnosti o brzini smicanja prikazana je na Slici 9. Utvrđeno je pseudoplastično ponašanje za oba uzorka pri ispitivanom gradijentu brzine smicanja.



Slika 9. Ovisnost viskoznosti *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata o brzini smicanja. UXG je *in situ* gelirajuća nanosuspenzija koja sadrži ksantan gumu, a UGG ona koja sadrži gelan gumu.

Pseudoplastično ponašanje *in situ* gelirajućih nanosuspenzija je važno svojstvo za njihovo uspješno raspršivanje. Ono podrazumijeva smanjenje viskoznosti tijekom raspršivanja uslijed smičnog naprezanja. Smanjena viskoznost tekućih sustava poboljšava raspršivanje nebulizatorom. Naime, viskozni uzorci raspršuju se u veće kapljice aerosola što negativno utječe na dostavu aerosola u nosnu šupljinu (Xi i sur., 2016; McCallion i Patel, 1996). Nadalje, pseudoplastičnost sustava olakšava resuspendiranje istaloženih čestica lijeka prije primjene. Mućkanjem istaloženih suspenzija smanjuje im se viskoznost, što olakšava potpuno resuspendiranje istaloženih čestica. S druge strane, pseudoplastični sustavi u mirovanju imaju veću viskoznost što smanjuje aglomeraciju čestica i povećava stabilnost nanosuspenzija (Aulton i Taylor, 2018).

4.3. Ujednačenost doziranja *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata pulsirajućim nebulizatorom

In situ gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata pseudoplastični su sustavi čija viskoznost ovisi o smičnom naprezanju te može utjecati na ujednačenost doziranja raspršivanjem. U ovom diplomskom radu ispitan je utjecaj vremena predgrijavanja i vremena rada pulsirajućeg nebulizatora na brzinu i ujednačenost doziranja odnosno ponovljivost raspršene mase pripremljenih *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata.

Prosječne isporučene mase UGG i UXG uzoraka (uz prikaz standardne devijacije i relativne standardne devijacije) tijekom rada nebulizatora u vremenu od 10 do 60 s, uz predgrijavanje od 0 do 30 s, prikazane su redom u Tablicama 2. i 3. Za oba uzorka i pri sva tri vremena predgrijavanja (0, 15 i 30 s), ustanovljena je linearna ovisnost isporučene mase uzorka o vremenu rada nebulizatora (Slika 10.), odnosno konstantna brzina isporuke uzorka. Koeficijent regresije za uzorak UGG bio je u rasponu od 2,261 do 2,477, a za uzorak UXG u rasponu od 2,502 do 2,763, prema kojima je isporuka *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata pripravljene uz dodatak ksantan gume (UXG) bila usporediva ili malo brža u odnosu na onu pripravljenu uz dodatak gelan gume (UGG). Izostanak veće razlike u brzini raspršivanja u skladu je sa sličnim profilima viskoznosti uspoređenih uzoraka pri većim brzinama smicanja ($> 10 \text{ s}^{-1}$; Slika 9.).

Tablica 2. Prosječne isporučene mase *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata pripravljene uz dodatak gelan gume (UGG) (uz prikaz standardne devijacije i relativne standardne devijacije (RSD); n=10) tijekom rada nebulizatora u vremenu od 10 do 60 s, uz predgrijavanje od 0 do 30 s

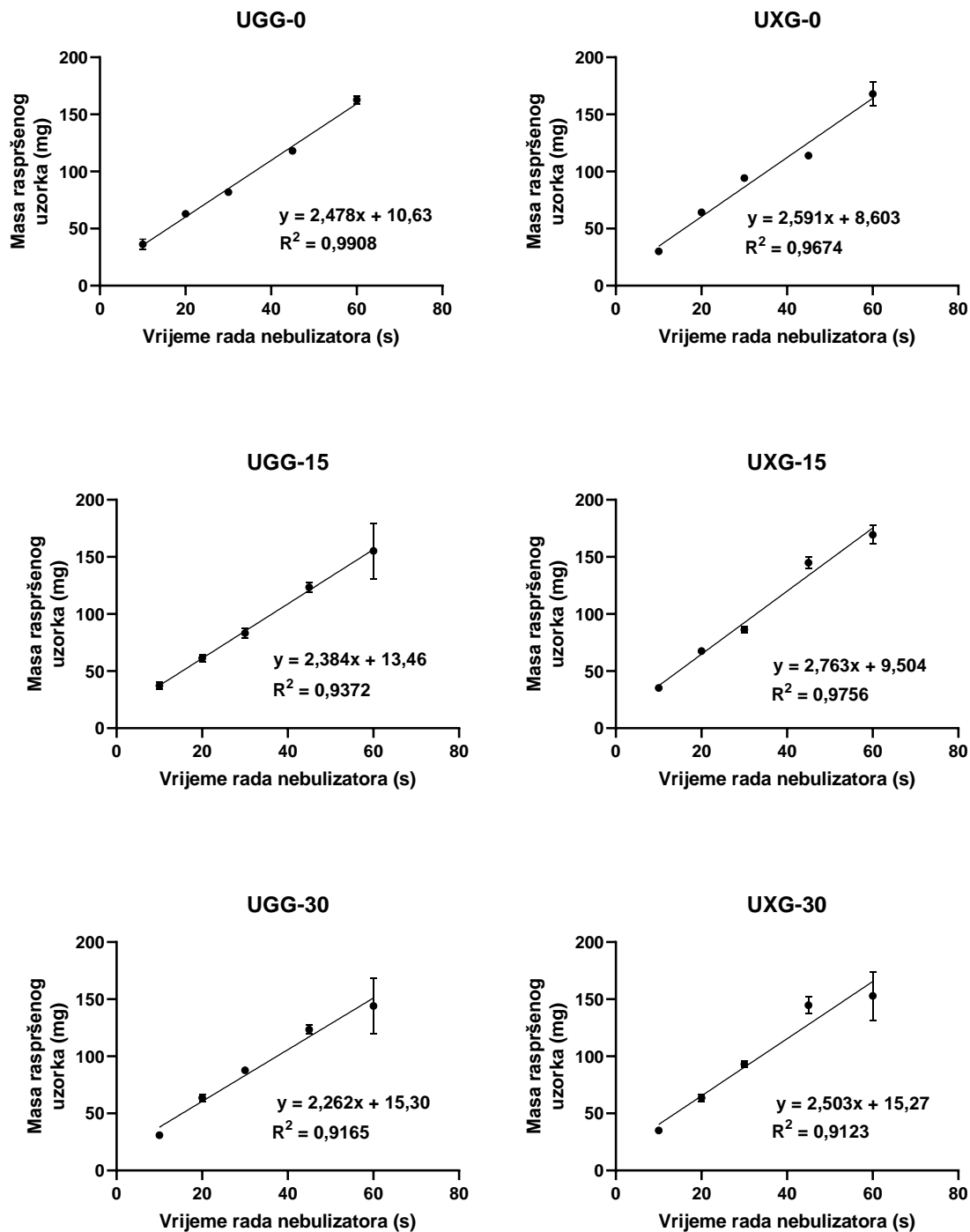
Vrijeme rada nebulizatora (raspršivanja uzorka) [s]	Vrijeme predgrijavanja nebulizatora [s]	Isporučena masa <i>in situ</i> gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata UGG [mg]	RSD (%)
10	0	36,3±4,4	12,3
	15	37,3±3,2	8,5
	30	30,8±2,9	9,4
20	0	62,9±2,1	3,3
	15	61,4±2,9	4,8
	30	63,5±3,0	4,7
30	0	81,9±2,1	2,6
	15	83,3±4,5	5,4
	30	87,8±2,6	3,0
45	0	118,1±2,3	1,9
	15	123,4±4,4	3,5
	30	123,4±3,8	3,1
60	0	162,8±3,8	2,3
	15	155,2±24,4	15,7
	30	144,1±24,3	16,9

Tablica 3. Prosječne isporučene mase *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata pripravljene uz dodatak ksantan gume (UXG) (uz prikaz standardne devijacije i relativne standardne devijacije (RSD); n=10) tijekom rada nebulizatora u vremenu od 10 do 60 s, uz predgrijavanje od 0 do 30 s

Vrijeme rada nebulizatora (raspršivanja uzorka) [s]	Vrijeme predgrijavanja nebulizatora [s]	Isporučena masa <i>in situ</i> gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata UXG [mg]	RSD (%)
10	0	30,1±1,8	6,1
	15	35,3±1,5	4,2
	30	35,1±1,8	5,3
20	0	64,2±1,9	3,0
	15	67,6±2,4	3,5
	30	63,5±3,2	5,0
30	0	94,3±2,4	2,5
	15	86,3±3,0	3,4
	30	93,1±3,0	3,2
45	0	114,0±2,5	2,2
	15	144,9±5,1	3,5
	30	144,7±7,1	4,9
60	0	168,0±10,6	6,3
	15	169,5±8,0	4,7
	30	153,0±21,3	13,9

Ujednačenost doziranja odnosno isporučene mase *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata za svako od ispitivanih vremena rada i predgrijavanja nebulizatora, procijenjena je temeljem RSD vrijednosti prikazanih u Tablici 2. i 3. Za oba uzorka (UGG i UXG), RSD vrijednosti pri radu nebulizatora od 20, 30 i 45 sekundi, neovisno o vremenu predgrijavanja, kretale su se u rasponu od 1,9 do 5,4 %, dok su pri radu nebulizatora od 10 i 60 s one bile značajno više i dosezale vrijednosti do 16,9 %. Usporedbe radi, pri ispitivanju homogenosti prašaka u svrhu osiguranja ujednačenosti doziranja, praškasti sustav smatra se homogenim ako je srednja vrijednost postotnog omjera eksperimentalno određene i teorijske mase djelatne tvari u uzetim uzorcima (s različitih mjesta uzorkovanja praška) unutar raspona $100 \pm 5,5$ %, uz RSD vrijednost $\leq 5,5$ % (Bobičanec i Kobaš, 2020). Polazeći od

pretpostavke da su *in situ* gelirajuće nanosuspenzije homogeni sustavi s obzirom na sadržaj djelatne tvari u jediničnom volumenu, može se zaključiti da bi ujednačenost doziranja bila zadovoljena pri uvjetima primjene pri kojima je RSD vrijednost vezana uz isporučenu masu uzorka $\leq 5,5$ %. Prema rezultatima ostvarenim u ovom diplomskom radu, vidljivo je da vrijeme rada nebulizatora čini presudni faktor za ujednačenost doziranja, dok različita vremena predgrijavanja nebulizatora nisu pokazala utjecaj na ujednačenost doziranja. Zaključno, zadovoljavajuća ujednačenost doziranja *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata postigunata je pri radu nebulizatora od 20, 30 i 45 sekundi, neovisno o vremenu predgrijavanja. Uzevši u obzir dostavljenu dozu flutikazonpropionata, najprikladnije vrijeme rada nebulizatora je 45 sekundi, s obzirom da doza flutikazonpropionata isporučena u tom vremenu odgovara njegovoj terapijskoj dozi.



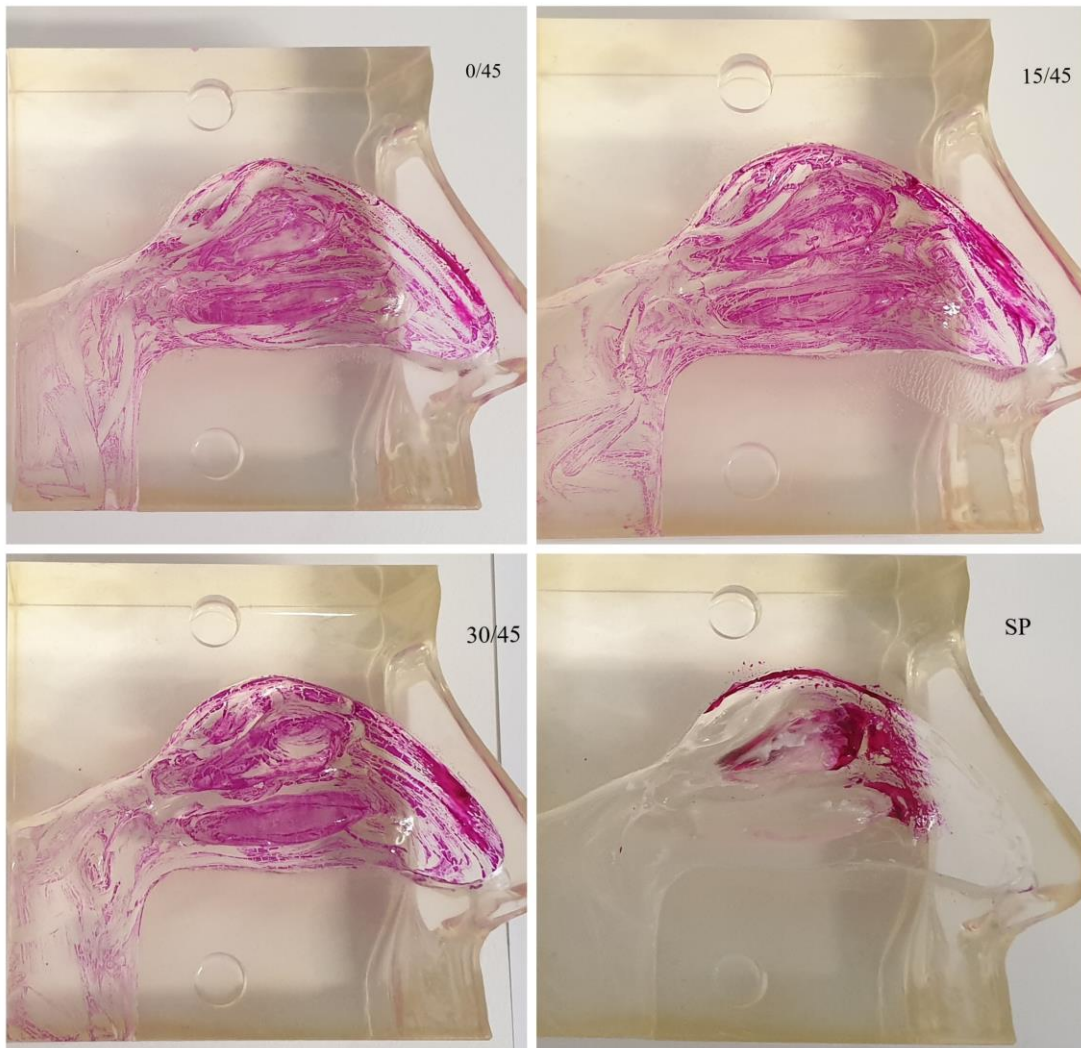
Slika 10. Grafički prikaz ovisnosti isporučene mase raspršenih *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata pripremljenih uz dodatak gelan gume (UGG) ili ksantan gume (UXG) o vremenu rada nebulizatora, pri vremenima predgrijavanja od 0, 15 i 30 s (naznačenim uz oznaku uzorka). Prikazane su srednje vrijednosti mase raspršenog uzorka \pm SD (n=10), jednadžba regresijskog pravca i koeficijent determinacije (R^2).

4.4. Profil nazalne depozicije *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata

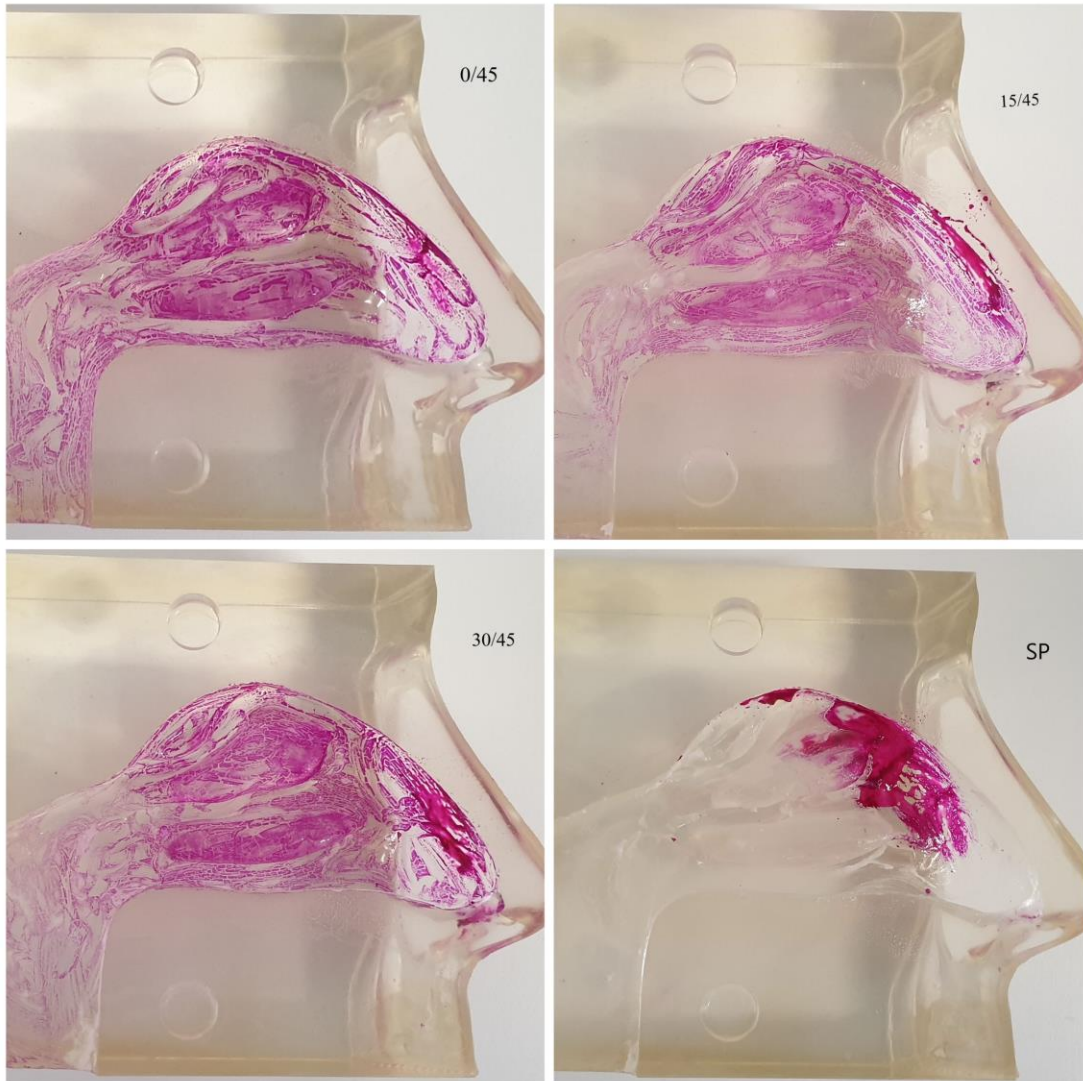
Pri određivanju profila nazalne depozicije *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata nakon raspršivanja pulsirajućim nebulizatorom korišten je komercijalno dostupni transparentni model nosne šupljine.

Profili depozicije nanosuspenzija flutikazonpropionata određeni su pri radu nebulizatora od 45 sekundi, a nakon predgrijavanja samog uređaja u vremenu od 0, 15 i 30 sekundi (volumen doziranja cca. 112,5 μ l). Prethodnim mjerenjima utvrđeno je da vrijeme rada od 45 sekundi osigurava raspršivanje one količine *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata koji odgovara uobičajenoj terapijskoj dozi flutikazonpropionata. Sva mjerenja su provedena u triplicatu, a promatrana je dostava i raspodjela uzorka u nosnoj šupljini, s naglaskom na posteriorni dio nosa. Isporučena masa *in situ* gelirajuće nanosuspenzije pripravljene uz dodatak gelan gume (uzorak UGG) iznosila je $138,0 \pm 7,2$ mg što odgovara dozi flutikazonpropionata od $82,8 \pm 4,3$ μ g. Nadalje, isporučena masa *in situ* gelirajuće nanosuspenzije pripravljene uz dodatak ksantan gume (uzorak UXG) iznosila je $156,2 \pm 5,6$ mg što odgovara dozi flutikazonpropionata od $93,7 \pm 3,4$ μ g. Usporedbe radi, određen je i profil depozicije *in situ* gelirajućih nanosuspenzija nakon klasične primjene nazalnim sprejem. Volumen doziranja nazalnog spreja iznosi 140 μ l što odgovara masi flutikazonpropionata od 84 μ g.

Razmatranjem svih profila depozicije može se izvesti nekoliko zaključaka. Pri dostavi lijeka nebulizatorom za oba je uzorka postignuta depozicija u dubljim dijelovima turbinatnog područja nego u slučaju klasične dostave nazalnim sprejem (Slika 11. i 12.). Između samih nanosuspenzija s gelan gumom i ksantan gumom nije primijećena razlika u depoziciji pri primjeni nebulizatorom te se stoga smatraju jednako prikladnima za takvu primjenu.



Slika 11. Profili nazalne depozicije *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata pripravljene uz dodatak gelan gume (uzorak UGG), pri primjeni pulsirajućim nebulizatorom tijekom 45 sekundi (volumen doziranja cca. 112,5 μ l, doza flutikazonpropionata $82,8 \pm 4,3 \mu$ g) uz predgrijavanje od 0 sekundi (0/45), 15 sekundi(15/45) i 30 sekundi (30/45) te pri primjeni nazalnim sprejem (SP; volumen doziranja 140 μ l, doza flutikazonpropionata 84 μ g).



Slika 12. Profili nazalne depozicije *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata pripravljene uz dodatak ksantan gume (uzorak UXG), pri primjeni pulsirajućim nebulizatorom tijekom 45 sekundi (volumen doziranja cca. 112,5 μ l, doza flutikazonpropionata $93,7 \pm 3,4$ μ g) uz predgrijavanje od 0 sekundi (0/45), 15 sekundi (15/45) i 30 sekundi (30/45) te pri primjeni nazalnim sprejem (SP; volumen doziranja 140 μ l, doza flutikazonpropionata 84 μ g).

Profil depozicije *in situ* gelirajućih nanosuspenzija pri raspršivanju klasičnim nazalnim sprejem pokazuje da većina primijenjene doze zaostaje u anteriornom djelu turbinatne regije. Istraživanja Möller i suradnika (2010) također nisu rezultirala značajnom depozicijom aerosola ^{99m}Tc -DTPA u posteriornom dijelu nosa pri primjeni sprejem. Nadalje,

ista istraživačka grupa pokazala je da 6,5 % doze raspršene pulsirajućim nebulizatorom prodire u paranazalne sinuse. Duboka depozicija postiže se dodatkom pulsiranja na struju zraka pri raspršivanju. Depozicijom u paranazalne sinuse se djelatna tvar dostavlja u teško dostupne dijelove u kojima je usporeno mukocilijarno čišćenje. Takvom depozicijom se dodatno postiže produljeno zadržavanje i raspoloživost lijeka na mjestu djelovanja (Möller i sur., 2010).

Iz profila nazalne depozicije *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata pri primjeni pulsirajućim nebulizatorom razvidno je sveobuhvatno i ujednačeno odlaganje lijeka u cijeloj nosnoj šupljini. Stoga je u liječenju oboljenja koja zahvaćaju velike dijelove nosne sluznice prikladnija primjena nebulizatorom. Na primjeru pacijenata s kroničnim rinosinuitisom su to pokazali Mainz i suradnici (2014). Pacijenti su podvrgnuti nazalnoj primjeni rekombinantne deoksiribonukleaze (dornaze alfa) pulsirajućim nebulizatorom. Takav način primjene lijeka čak i u sinuse nosne šupljine rezultirao je značajnim poboljšanjem simptoma pacijenata. Dobiveni rezultati ukazuju na potencijal lokalne primjene nanosuspenzija u nosnu šupljinu pulsirajućeg nebulizatorom koji treba dalje istražiti.

5. Zaključci

- U ovom radu uspješno su pripravljene *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata (0,06 %, *m/m*) prikladne veličine čestica lijeka i indeksa polidisperznosti, korištenjem polisorbata 80 (0,03 %, *m/m*) kao tvari za močenje, natrijevog hijaluronata (0,05 %, *m/m*) kao konstitutivnog polimera te pektina (0,9 %, *m/m*) i gelan gume (0,1 %, *m/m*) ili ksantan gume (0,05 %, *m/m*) kao *in situ* gelirajućih polimera.
- Pripravljene *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata pokazale su pseudoplastično ponašanje.
- Pulsirajući nebulizator osigurava isporuku *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata konstantnom brzinom.
- Pri radu pulsirajućeg nebulizatora tijekom 20, 30 ili 45 sekundi postignuta je zadovoljavajuća ujednačenost isporučene mase *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata odnosno zadovoljavajuća ujednačenost doziranja.
- Predgrijavanje pulsirajućeg nebulizatora nije utjecalo na ujednačenost isporučene mase *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata.
- Pri dostavi *in situ* gelirajućih nanosuspenzija pulsirajućim nebulizatorom ostvareno je sveobuhvatno i ujednačeno odlaganje lijeka u cijelom modelu nosne šupljine. Ostvarena je depozicija u značajno dubljim dijelovima turbinatnog područja nego u slučaju klasične dostave nazalnim sprejem.
- Između *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata pripremljenih uz dodatak gelan gume ili ksantan gume nije primijećena razlika u depoziciji pri primjeni pulsirajućim nebulizatorom te se stoga smatraju jednako prikladnima za takvu primjenu.

6. Literatura

- Agrawal Y, Patel V. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *J Adv Pharm Technol Res*, 2011, 2, 81–87.
- Alharbi A, Yousef A, Alharbi S, Al-Shamrani A, Alqwaiee M, Almeziny M, Said Y, Alshehri S, Alotaibi F, Mosalli R, Alawam K, Alsaadi M. Application of aerosol therapy in respiratory diseases in children: A Saudi expert consensus. *Ann Thorac Med*, 2021, 16, 188–218.
- Aulton M, Taylor K. *Pharmaceutics The Design and Manufacture of Medicines*, Journal of Chemical Information and Modeling. 2018, str. 427-445.
- Barta SK, Crawford A, Roberts CM. Survey of patients' views of domiciliary nebuliser treatment for chronic lung disease. *Respir Med*, 2002, 96, 375–381.
- Beule AG. Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 2010, 89, S15–S34.
- BISCO. Instructions for Use Content : instructions for Use. *Microbiologics*, 2017, 1–7.
- Bobičanec S, Kobaš M. Mikrosfere s deksametazonom u praškastom inertnom nosaču : karakterizacija farmaceutskog oblika i depozicija u silikonskom modelu nosne šupljine, Rad nagrađen Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu, 2020.
- Borup DD, Engel LE, Elkins CJ, Eaton JK. Transport and dispersion of particle-Laden streaks in a standardized human nasal geometry. *Exp Fluids* 2020 612, 2020, 61, 1–13.
- Brozović M, Mrše A. Nazalna depozicija in situ gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata pri dvosmjernoj dostavi in vitro, 2019, Rad nagrađen Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu, 2019.
- Bryson HM, Faulds D. Intranasal Fluticasone Propionate: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in Allergic Rhinitis. *Drugs*, 1992, 43, 760–775.
- Cerdeira AM, Mazzotti M, Gander B. Miconazole nanosuspensions: Influence of formulation variables on particle size reduction and physical stability. *Int J Pharm*, 2010, 396, 210–218.
- Djupesland PG. Nasal drug delivery devices: Characteristics and performance in a clinical perspective-a review. *Drug Deliv Transl Res*, 2013, 3, 42–62.
- Duchêne D, Ponchel G. Bioadhesion of solid oral dosage forms, why and how? *Eur J Pharm Biopharm*, 1997, 44, 15–23.
- Edman P. Pharmaceutical Formulations— Suspensions and Solutions. *J Aerosol Med Depos Clear Eff Lung*, 1994, 7, 3–6.
- Emerick KS, Deschler DG. Common ENT disorders. *South Med J*, 2006, 99, 1090–1102.

Espenschied S, Dodenhöft J, Lehr S, Böhne-Lampert P, Weber R. Topische nasale therapie nach endonasaler NNH-Op: Pulsierende inhalation versus pumpray. *Laryngorhinootologie*, 2010, 89, 599–605.

Finlay WH, Stapleton KW, Zuberbuhler P. Predicting regional lung dosages of a nebulized suspension: Pulmicort® (Budesonide). *Part Sci Technol*, 1997, 15, 243–251.

Gowda AA, Cuccia AD, Smaldone GC. Reliability of vibrating mesh technology. *Respir Care*, 2017, 62, 65–69.

Harkema JR, Carey SA, Wagner JG. The Nose Revisited: A Brief Review of the Comparative Structure, Function, and Toxicologic Pathology of the Nasal Epithelium. *Toxicol Pathol*, 2006, 34, 252–269.

Janqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije. Zagreb, Školska knjiga, 2005, str. 343.

Keller M, Schuschnig U, Möller W. Pulsating aerosols for sinus drug delivery: New treatment options & perspectives in chronic rhinosinusitis. *ONdrugDelivery*, 2010, 20–24.

Kleven M, Melaaen MC, Reimers M, Røtnes JS, Aurdal L, Djupesland PG. Using Computational Fluid Dynamics (CFD) to improve the bi-directional nasal drug delivery concept. *Food Bioprod Process*, 2005, 83, 107–117.

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

Kumar GP, Krishna KG. Nanosuspensions: The solution to deliver hydrophobic drugs. *Int J Drug Deliv*, 2011, 3, 546–557.

Lane AP. Nasal anatomy and physiology. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 2004, 12, 387–395.

Laube BL. Devices for aerosol delivery to treat sinusitis. *J Aerosol Med Depos Clear Eff Lung*, 2007, 20, S5–S18.

Lavorini F, Corrigan CJ, Barnes PJ, Dekhuijzen PRN, Levy ML, Pedersen S, Roche N, Vincken W, Crompton GK. Retail sales of inhalation devices in European countries: So much for a global policy. *Respir Med*, 2011, 105, 1099–1103.

Le Brun PPH, De Boer AH, Frijlink HW, Heijerman HGM. A review of the technical aspects of drug nebulization. *Pharm World Sci*, 2000, 22, 75–81.

Mahbubul IM. Stability and Dispersion Characterization of Nanofluid, Preparation, Characterization, Properties and Application of Nanofluid. 2019, str. 378, 382.

Mainz JG, Schien C, Schiller I, Schädlich K, Koitschev A, Koitschev C, Riethmüller J, Graepler-Mainka U, Wiedemann B, Beck JF. Sinonasal inhalation of dornase alfa administered by vibrating aerosol to cystic fibrosis patients: A double-blind placebo-controlled cross-over trial. *J Cyst Fibros*, 2014, 13, 461–470.

Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. Immunology (8th ed.). Saunders, 2012, str. 378,382.

- Martin AR, Finlay WH. Nebulizers for drug delivery to the lungs. *Expert Opin Drug Deliv*, 2015, 12, 889–900.
- Marttin E, Schipper NGM, Coos Verhoef J, Merkus FWHM. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 29, 13–38.
- McCallion ONM, Patel MJ. Viscosity effects on nebulisation of aqueous solutions. *Int J Pharm*, 1996, 130, 245–249.
- Möller W, Schuschnig U, Khadem Saba G, Meyer G, Junge-Hülsing B, Keller M, Häussinger K. Pulsating aerosols for drug delivery to the sinuses in healthy volunteers. *Otolaryngol - Head Neck Surg*, 2010, 142, 382–388.
- Mudalige T, Qu H, Van Haute D, Ansar SM, Paredes A, Ingle T. Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. In: *Nanomaterials for Food Applications*. Elsevier Inc., 2018, str. 313–353.
- O’Callaghan C, Barry P. The science of nebulised drug delivery. *Thorax*, 1997, 52, 31–31.
- Patravale VB, Date AA, Kulkarni RM. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 56, 827–840.
- Pedersen S. Inhalers and nebulizers: Which to choose and why. *Respir Med*, 1996, 90, 69–77.
- Pozzoli M, Rogueda P, Zhu B, Smith T, Young PM, Traini D, Sonvico F. Dry powder nasal drug delivery: challenges, opportunities and a study of the commercial Teijin Puvlizer Rhinocort device and formulation. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 42, 1660–1668.
- Pritchard JN, Hatley RHM, Denyer J, Von Hollen Di. Mesh nebulizers have become the first choice for new nebulized pharmaceutical drug developments. *Ther Deliv*, 2018, 9, 121–136.
- Qaseem A, Wilt TJ, Weinberger SE, Hanania NA, Criner G, van der Molen T, Marciniuk DD, Denberg T, Schünemann H, Wedzicha W, Macdonald R, Shekelle P. Disease: A clinical practice guideline update from the american college of physicians, american college of chest physicians, american thoracic society, and european respiratory society. *Ann Intern Med*, 2011, 155, 179–191.
- Rohrer J, Lupo N, Bernkop-Schnürch A. Advanced formulations for intranasal delivery of biologics. *Int J Pharm*, 2018, 553, 8–20.
- Schuschnig U, Keller M, Klopfer E, Krüner A, Lubner M, Zimmermann J, Knoch M. Drug Delivery to the Nasal and Paranasal Cavities - Critical Cast Dimensions and Aerosol Dynamics. *Rdd2008*, 2008, 227–238.
- Shakrani SA, Ayob A, Ab Rahim MA, Alias S. Stability of kaolin particles subjected to elevated temperatures using various dispersing agents. *J Phys Conf Ser*, 2020, 1529, 1–8.
- Sharafkhaneh A, Wolf RA, Goodnight S, Hanania NA, Make BJ, Tashkin DP. Perceptions and attitudes toward the use of nebulized therapy for COPD: Patient and caregiver perspectives. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*, 2013, 10, 482–492.
- Sheth NS, Mistry RB. A review: Nasal drug delivery system. *Res J Pharm Technol*, 2011, 4,

349–355.

SinusTM Pulsating Aerosol System - PARI, n.d., <https://www.pari.com/us-en/products/sinus/sinustm-pulsating-aerosol-system/>, pristupljeno 15. 8. 2021.

Standard B. Nebulizer therapy. Guidelines. British Thoracic Society Nebulizer Project Group. *Thorax*, 1997, 52 Suppl 2, 4–24.

Staresinic AG, Sorkness CA. Fluticasone propionate: A potent inhaled corticosteroid for the treatment of asthma. *Expert Opin Pharmacother*, 2000, 1, 1227–1244.

Stenton C, Beach R, Walters EH. Ultrasonic Method Aerosol. *Thorax*, 1990, 45, 728–732.

Suh JD, Kennedy DW. Treatment options for chronic rhinosinusitis. *Proc Am Thorac Soc*, 2011, 8, 132–140.

Tashkin DP. A review of nebulized drug delivery in COPD. *Int J COPD*, 2016, 11, 2585–2596.

Valentine RJ, Athanasiadis T, Thwin M, Singhal D, Weitzel EK, Wormald PJ. A prospective controlled trial of pulsed nasal nebulizer in maximally dissected cadavers. *Am J Rhinol*, 2008, 22, 390–394.

Varshney J, Varshney H. Allergic rhinitis: An overview. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015, 67, 143–149.

Wang D, Luo W. Nasal diseases and psychological distress. *Psychol Heal Med*, 2016, 21, 67–73.

Wiesemann HG, Steinkamp G, Ratjen F, Bauernfeind A, Przyklenk B, Döring G, Von Der Hardt H. Placebo-controlled, double-blind, randomized study of aerosolized tobramycin for early treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 1998, 25, 88–92.

Xi J, Yuan JE, Zhang Y, Nevorski D, Wang Z, Zhou Y. Visualization and Quantification of Nasal and Olfactory Deposition in a Sectional Adult Nasal Airway Cast. *Pharm Res*, 2016, 33, 1527–1541.

Zia H, Dondeti P, Needham TE. Intranasal drug delivery. *Clin Res Regul Aff*, 1993, 10, 99–135.

7. Sažetak

Nebulizatori kao uređaji za pulmonalnu primjenu lijekova često su prisutni u bolničkom liječenju bolesti pluća. U zadnje vrijeme razvijaju se novi modeli nebulizatora kako bi im se proširila primjena na druge indikacije te izvanbolničko liječenje. Jedan od novijih tipova nebulizatora je pulsirajući nebulizator. Specifičan je po pulsiranju inače konstantnog mlaza aerosola. Uslijed pulsiranja, aerosol prodire duboko u nosnu šupljinu, te zahvaća i teško dostupne paranazalne sinuse. Primjenjivost pulsirajućeg nebulizatora u nazalnoj primjeni inovativnih terapijskih sustava još se treba istražiti.

Cilj ovog rada bio je pripremiti pseudoplastične *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata te ispitati prikladnost pulsirajućeg nebulizatora za njihovu nazalnu primjenu.

Uspješno su pripravljene *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata (0,06 %, *m/m*) prikladne veličine čestica lijeka i indeksa polidisperznosti, korištenjem polisorbata 80 (0,03 %, *m/m*) kao tvari za močenje, natrijevog hijaluronata (0,05 %, *m/m*) kao konstitutivnog polimera te pektina (0,9 %, *m/m*) i gelan gume (0,1 %, *m/m*) ili ksantan gume (0,05 %, *m/m*) kao *in situ* gelirajućih polimera. Pripravljene *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata pokazale su pseudoplastično ponašanje. Pulsirajući nebulizator osigurao je isporuku *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata konstantnom brzinom. Pri radu pulsirajućeg nebulizatora tijekom 20, 30 ili 45 sekundi postignuta je zadovoljavajuća ujednačenost isporučene mase *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata odnosno zadovoljavajuća ujednačenost doziranja, neovisno o vremenu predgrijavanja uređaja. Pri dostavi *in situ* gelirajućih nanosuspenzija pulsirajućim nebulizatorom ostvareno je sveobuhvatno i ujednačeno odlaganje lijeka u cijelom modelu nosne šupljine. Ostvarena je depozicija u značajno dubljim dijelovima turbinatnog područja nego u slučaju klasične dostave nazalnim sprejem.

Između *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata pripremljenih uz dodatak gelan gume ili ksantan gume nije primijećena razlika u depoziciji pri primjeni pulsirajućim nebulizatorom te se stoga smatraju jednako prikladnima za takvu primjenu.

8. Summary

Nebulizers are drug delivery devices most commonly used in hospital setting for treatment of a variety of pulmonary diseases. Lately, new nebulizer models are being developed in order to expand its use toward new treatment indications and outside the hospitals. One of the most recent types of nebulizers is the pulsating nebulizer. Its unique property is that, instead of applying a constant pressure on the nebulized aerosol, it adds pulsation to the aerosol stream. The addition of pulsation to the aerosol stream results in drug deposition deeper in the nasal cavity, including in the hardly reachable paranasal sinuses. The applicability of pulsating nebulizers in nasal administration of innovative drug delivery systems still needs to be investigated.

The aim of this study was to prepare pseudoplastic *in situ* gelling fluticasone propionate nanosuspensions and explore the applicability of pulsating nebulizer for their nasal delivery.

In this study, *in situ* gelling fluticasone propionate (0.06 %, w/w) nanosuspensions with appropriate particle size and polydispersity index were successfully prepared using polysorbate 80 (0.03 %, w/w) as a wetting agent, sodium hyaluronate (0.05 %, w/w) as a constitutive polymer and gellan gum (0.1 %, w/w) or xanthan gum (0.05 %, w/w) as *in situ* gelling polymer. Both *in situ* gelling nanosuspensions showed pseudoplastic behaviour. Pulsating nebulisation provided drug delivery of the *in situ* gelling fluticasone propionate nanosuspensions at a constant velocity. At the nebulizer operating time of 20, 30 or 45 seconds appropriate dosing uniformity was achieved, regardless of the preheating time of the nebulizer.

Pulsating nebulisation of *in situ* gelling fluticasone propionate nanosuspensions provided widespread and uniform drug deposition over the whole nasal cavity model. Nebulised aerosol reached considerably deeper parts of the turbinate region in relation to the same nanosuspensions delivered by conventional nasal spray pump.

No significant difference was noticed between *in situ* gelling fluticasone propionate nanosuspensions containing gellan gum or xanthan gum while being administrated with pulsating nebulizer and are therefore considered equally suitable for this mode of nasal delivery.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Prikladnost pulsirajućeg nebulizatora za nazalnu primjenu *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata

Ante Mrše

Nebulizatori kao uređaji za pulmonalnu primjenu lijekova vrlo su prisutni u bolničkom liječenju bolesti pluća. Zadnjih godina razvijaju se novi modeli nebulizatora kako bi im se proširila primjena na druge indikacije te izvanbolničko liječenje. Jedan od novijih tipova nebulizatora je pulsirajući nebulizator. Specifičan je po pulsiranju inače konstantnog mlaza aerosola. Uslijed pulsiranja, aerosol prodire duboko u nosnu šupljinu, te zahvaća i teško dostupne paranazalne sinuse. Primjenjivost pulsirajućeg nebulizatora u nazalnoj primjeni inovativnih terapijskih sustava još se treba istražiti.

Cilj ovog rada bio je pripremiti pseudoplastične *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata te ispitati prikladnost pulsirajućeg nebulizatora za njihovu nazalnu primjenu.

Uspješno su pripravljene *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata (0,06 %, *m/m*) prikladne veličine čestica lijeka i indeksa polidisperznosti, korištenjem polisorbata 80 (0,03 %, *m/m*) kao tvari za močenje, natrijevog hijaluronata (0,05 %, *m/m*) kao konstitutivnog polimera te pektina (0,9 %, *m/m*) i gelan gume (0,1%, *m/m*) ili ksantan gume (0,05 %, *m/m*) kao *in situ* gelirajućih polimera. Pripravljene *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata pokazale su pseudoplastično ponašanje. Pulsirajući nebulizator osigurao je isporuku *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata konstantnom brzinom. Pri radu pulsirajućeg nebulizatora tijekom 20, 30 ili 45 sekundi postignuta je zadovoljavajuća ujednačenost isporučene mase *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata odnosno zadovoljavajuća ujednačenost doziranja, neovisno o vremenu predgrijavanja uređaja. Pri dostavi *in situ* gelirajućih nanosuspenzija pulsirajućim nebulizatorom ostvareno je sveobuhvatno i ujednačeno odlaganje lijeka u cijelom modelu nosne šupljine. Ostvarena je depozicija u značajno dubljim dijelovima turbinatnog područja nego u slučaju klasične dostave nazalnim sprejem.

Između *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata pripremljenih uz dodatak gelan gume ili ksantan gume nije primijećena razlika u depoziciji pri primjeni pulsirajućim nebulizatorom te se stoga smatraju jednako prikladnima za takvu primjenu.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 12 grafičkih prikaza, 3 tablice i 60 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nebulizator, nazalna primjena, *in situ* gelirajuće nanosuspenzije, flutikazonpropionat, gelan guma, ksantan guma

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. Ivan Pepić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

Rad prihvaćen: rujan 2021.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Applicability of pulsating nebulisers in nasal drug delivery of *in situ* gelling fluticasone propionate nanosuspensions

Ante Mrše

Nebulizers are drug delivery devices most commonly used in hospital setting for the treatment of a variety of pulmonary diseases. During the last few years new nebulizer models are being developed in order to expand its use toward new treatment indications and outside the hospitals. One of the most recent types of nebulizers is the pulsating nebulizer. Its unique property is that, instead of applying a constant pressure on the nebulized aerosol, it adds pulsation to the aerosol stream. The addition of pulsation to the aerosol stream results in a deeper penetration of the nasal cavity, including penetration into the hard to reach paranasal sinuses. The applicability of pulsating nebulizers in nasal administration of innovative drug delivery systems still needs to be investigated.

The aim of this study was to prepare pseudoplastic *in situ* gelling fluticasone propionate nanosuspensions and explore the applicability of pulsating nebulizer for their nasal delivery.

In this study, *in situ* gelling fluticasone propionate (0,06 %, w/w) nanosuspensions with appropriate particle size and polydispersity index were successfully prepared using polysorbate 80 (0,03 %, w/w) as a wetting agent, sodium hyaluronate (0,05 %, w/w) as a constitutive polymer and pectin (0,9 %, m/m) and gellan gum (0,1%, w/w) or xanthan gum (0,05 %, w/w) as *in situ* gelling polymer. Both *in situ* gelling nanosuspensions showed pseudoplastic behaviour. Pulsating nebulisation provided drug delivery of the *in situ* gelling fluticasone propionate nanosuspensions at a constant velocity. At the nebulizer operating time of 20, 30 or 45 seconds appropriate dosing uniformity was achieved, regardless of the preheating time of the nebulizer.

Pulsating nebulisation of *in situ* gelling fluticasone propionate nanosuspensions provided widespread and uniform drug deposition over the whole nasal cavity model. Nebulised aerosol reached much deeper parts of the turbinate region in relation to the same nanosuspensions delivered by conventional nasal spray.

No significant difference was noticed between *in situ* gelling fluticasone propionate nanosuspensions containing gellan gum or xanthan gum while being administrated with pulsating nebulizer and are therefore considered equally suitable for this mode of nasal delivery.

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

Thesis includes: 40 pages, 12 figures, 3 tables and 60 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nebulizer, nasal drug delivery, *in situ* gelling nanosuspensions, fluticasone propionate, gellan gum, xanthan gum

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

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

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

The thesis was accepted: September 2021.