

Hijaluronsko-manitolske mikrosfere za nazalnu primjenu prednizolona

Križanić, Erika

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:925196>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



Erika Križanić

**Hijaluronsko-manitolske mikrosfere za
nazalnu primjenu prednizolona**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

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 dr.sc. Laure Nižić Nodilo.

Zahvaljujem svojoj mentorici, dr.sc. Lauri Nižić Nodilo na neizmjernom trudu, korisnim savjetima i pruženoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svojim najbližima na pruženoj podršci, razumijevanju i strpljenju tijekom mojeg studiranja. Posebno hvala mami i tati bez kojih ovo ne bi bilo moguće.

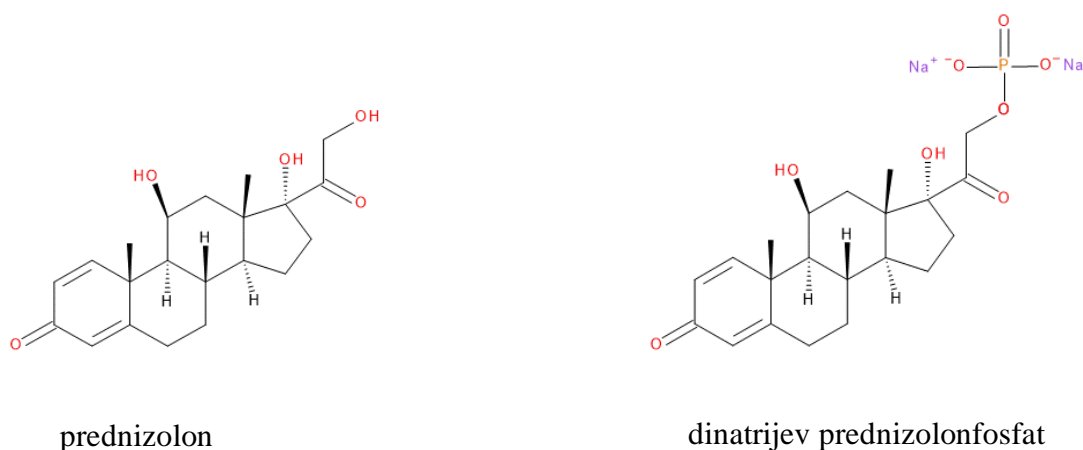
SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	DJELOVANJE I PRIMJENA PREDNIZOLONA	1
1.2.	NAZALNI KORTIKOSTEROIDI.....	5
1.2.1.	OBLIKOVANJE PRAŠKASTIH SUSTAVA KORTIKOSTEROIDA	6
1.3.	SUŠENJE RASPRŠIVANJEM.....	9
1.3.1.	UTJECAJ DISPERGIRANIH TVARI U UZORKU ZA SUŠENJE NA MOGUĆNOST ATOMIZACIJE RASPRŠIVANJEM.....	11
1.3.2.	REOLOŠKA SVOJSTVA UZORAKA ZA SUŠENJE RASPRŠIVANJEM	12
2.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	13
3.	MATERIJALI I METODE.....	15
3.1.	MATERIJALI.....	15
3.2.	METODE.....	15
3.2.1.	PRIPREMA OTOPINA ZA POSTUPAK SUŠENJA RASPRŠIVANJEM	15
3.2.2.	IZRADA MIKROSFERA.....	16
3.2.3.	ODREĐIVANJE REOLOŠKIH SVOJSTAVA OTOPINA ZA SUŠENJE RASPRŠIVANJEM	16
3.2.4.	ODREĐIVANJE SADRŽAJA I USPJEŠNOSTI UKLAPANJA PREDNIZOLONA U MIKROSFERAMA	16
3.2.5.	ODREĐIVANJE SADRŽAJA VLAGE.....	17
3.2.6.	ODREĐIVANJE RASPODJELE VELIČINE ČESTICA	17
3.2.7.	ODREĐIVANJE ZETA POTENCIJALA	18
3.2.8.	ISPITIVANJE SVOJSTAVA TEČENJA	18
3.2.9.	ODREĐIVANJE STUPNJA BUBRENJA MIKROSFERA U SNF-u.....	18
4.	REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1.	IZRADA MIKROSFERA	19
4.2.	ISKORIŠTENJE PROCESA	19
4.3.	REOLOŠKA SVOJSTVA OTOPINA ZA PRIPREMU MIKROSFERA	21
4.4.	SADRŽAJ PREDNIZOLONA I USPJEŠNOST UKLAPANJA U MIKROSFERAMA	23
4.5.	RASPODJELA VELIČINE ČESTICA	25
4.6.	SADRŽAJ VLAGE	26
4.7.	ZETA POTENCIJAL.....	27
4.8.	SVOJSTVA TEČENJA PRAŠAKA.....	28
4.9.	SVOJSTVA BUBRENJA MIKROSFERA	29
5.	ZAKLJUČCI.....	31
6.	LITERATURA.....	32
7.	SAŽETAK/SUMMARY	39

1. UVOD

1.1. DJELOVANJE I PRIMJENA PREDNIZOLONA

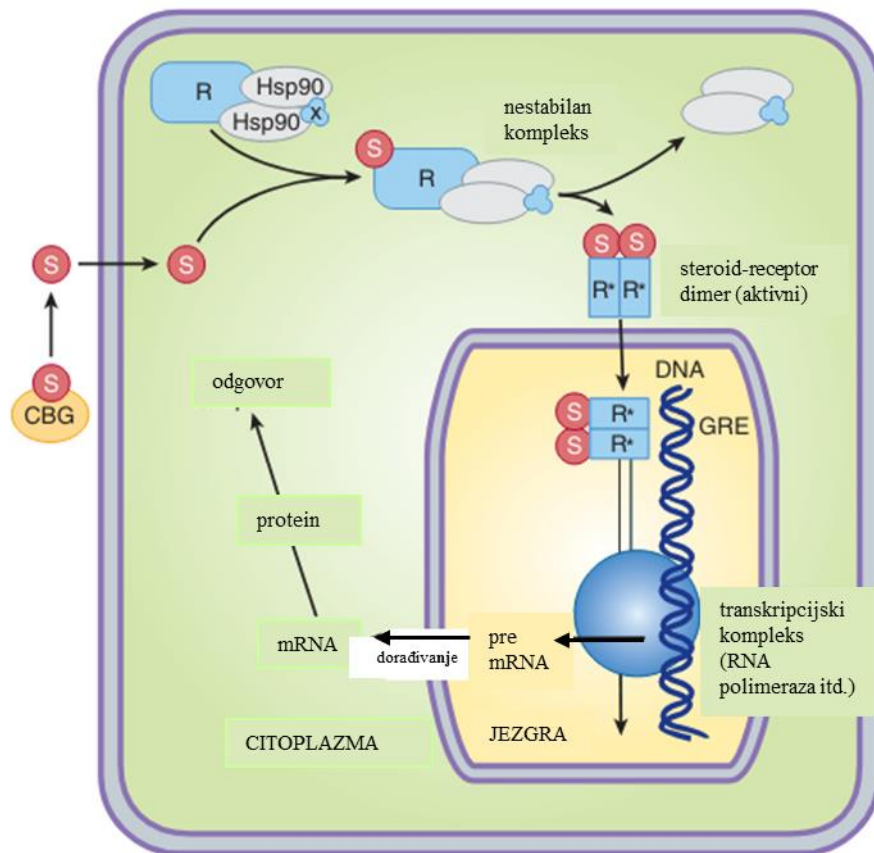
Prednizolon je kortikosteroidni lijek s protuupalnim i imunosupresivnim djelovanjem (Slika 1.). Općenito, glukokortikoidi imaju važnu ulogu u liječenju upalnih, imunoloških, hematoloških i drugih poremećaja (Katzung, 2011). Prednizolon, kao sintetski glukokortikoid kratkog do srednje dugog djelovanja, najčešće se koristi kao lijek za sistemsku primjenu pri gastrointestinalnim upalnim bolestima, reumatskim, hematološkim oboljenjima, liječenju simptoma astme te lokalno u oftalmologiji i dermatologiji (Seeberger i Frey, 1985). Prednizolon ima 4 puta veću protuupalnu aktivnost u odnosu na kortizol pri oralnoj i intravenskoj primjeni (Liang i Strong, 2012).



Slika 1. *Struktura prednizolona i dinatrijevog prednizolonfosfata*

Glukokortikoidi djelovanje postižu vezanjem na steroidne unutarstanične receptore u citoplazmi (Slika 2.). Prije vezanja glukokortikoida, unutarstanični receptor vezan je za stabilizirajuće proteine kao što su tzv. *heat-shock* proteini, odnosno proteini toplinskog šoka (hsp 90). Vezanjem glukokortikoida za receptor stvara se nestabilan kompleks te dolazi do odvajanja stabilizirajućih proteina. Nakon dimerizacije kompleksa glukokortikoid-receptor, dimer ulazi u jezgru stanice, veže se na regulatornu regiju gena te regulira njegovu transkripciju (Katzung, 2011). Glavni mehanizmi smanjenja upale uključuju smanjenje ekspresije gena za proupalne medijatore kao što su AP-1 i NF- κ B te poticanje stvaranja

protuupalnih proteina kao što je aneksin. S obzirom na mehanizam djelovanja koji uključuje modulaciju ekspresije gena, učinak prednizolona nije trenutčan (Fernandes i McKay, 2013).



Slika 2. Prikaz interakcije steroida, S (npr. prednizolon) i receptora, R te naknadnih događaja unutar ciljane stanice (preuzeto i prilagođeno prema Katzung, 2011).

Zbog slabe topljivosti prednizolona, u formulacijama se najčešće nalazi u obliku prolijeka koji se aktivira u organizmu. Odobreni prolijekovi prednizolona od strane EMA-e i FDA su: prednizon, prednizonfosfat, prednizonpivalat, prednizolonsukcinat i prednizonacetat. Natrijev prednizonfosfat je prolijek prednizolona koji ima više od 30 puta veću topljivost u vodi od prednizolona (Choudhary i sur., 2020). Odobren je od strane EMA-e i FDA u obliku kapi za oko, oralnih otopina i tableta (www.fda.gov; www.ema.europa.eu). Za sistemsku primjenu najčešće se koristi prednizon, oralni prolijek prednizolona, koji se hidrogenacijom u jetri aktivira u prednizon (Seeberger i Frey, 1985). Koristi se u dozama od 30 do 40 mg dnevno, ali se doza može povećati do 80 mg/dan (www.halmed.hr). Prema podacima EMA-e,

u Europskoj uniji su dostupni oblici vodotopljivog prednizolonsukcinata za intravensku i intramuskularnu primjenu kada je potreban brz učinak. Prednizolonacetat lokalno se koristi u oftalmologiji pri liječenju upalnih stanja zbog svoje sposobnosti penetracije kroz rožnicu oka. Aktivira se pomoću esteraza u oku u aktivni prednizolon (Sebbag i sur., 2020).

U Republici Hrvatskoj odobrena su četiri lijeka s prednizolonom kao djelatnom tvari (Tablica 1.). Koriste se lokalno kod upalnih oboljenja vlasišta i oka, a za sistemsku primjenu odobrene su tablete prednizona koji se koristi pri oboljenjima koja zahtijevaju sistemsku primjenu kortikosteroida (www.halmed.hr).

Tablica 1. Farmaceutski oblici prednizolona i prolijejkova prednizolona odobrenih u Republici Hrvatskoj (www.halmed.hr)

NAZIV LIJEKA	DJELATNA TVAR I DOZA	FARMACEUTSKI OBLIK	TERAPIJSKA INDIKACIJA
Alpicort	prednizolon 0,2 g/100 ml salicilatna kiselina 0,4 g/100 ml	otopina za kožu	blaga upalna oboljenja vlasišta
Alpicort F	estradiol 0,005 g/100 ml prednizolon 0,2 g/100 ml salicilatna kiselina 0,4 g/100 ml	otopina za kožu	blaga upalna oboljenja vlasišta
Ultracortenol	prednizolonpivalat 5 mg /g	mast za oko	alergijska i neinfektivna upalna stanja oka
Decortin	prednizon 5 mg, 20 mg	tableta	sistemska liječenje glukokortikoidima

U Tablici 2. prikazani su neki od prolijejkova prednizolona koji su odobreni od strane FDA i nalaze se na tržištu. Natrijev prednizolonfosfat dostupan je u obliku tableta, oralne otopine i kapi za oko.

Tablica 2. Farmaceutski oblici prednizolona i prolijekova prednizolona odobrenih od strane FDA (www.fda.gov)

NAZIV LIJEKA	DJELATNA TVAR	FARMACEUTSKI OBLIK	TERAPIJSKA INDIKACIJA
Omnipred	prednizonacetat	kapi za oko, suspenzija	upalne bolesti oka: alergijski konjuktivitis, iritis, ciklitis itd.
Orapred ODT	natrijev prednizonfosfat	tableta	alergijske reakcije, edemi, adrenokortikalna insuficijencija, ulcerozni kolitis, akutna leukemija, multipla skleroza itd.
Prednisolone sodium phosphate (Bausch and Lomb)	natrijev prednizonfosfat	kapi za oko, otopina	upalne bolesti oka: alergijski konjuktivitis, iritis, ciklitis itd.
Prednisolone sodium phosphate (Chartwell RX)	natrijev prednizonfosfat	oralna otopina	alergijske reakcije, edemi, adrenokortikalna insuficijencija, ulcerozni kolitis, akutna leukemija, multipla skleroza itd.
Prednisone (Mylan)	prednizon	tableta	alergijske reakcije, edemi, adrenokortikalna insuficijencija, ulcerozni kolitis, akutna leukemija itd.

1.2. NAZALNI KORTIKOSTEROIDI

Lokalnom primjenom kortikosteroida lijek se dostavlja direktno u ciljni organ što dokazano povećava sigurnost primjene u odnosu na sistemsku primjenu oralnih kortikosteroida (Demoly, 2008). Nazalni kortikosteroidi koriste se u liječenju alergijskog i nealergijskog rinitisa te nosnih polipa (www.halmed.hr).

Nosni polipi su benigne, upalne, hiperplastične izrasline sinonazalne mukoze koje se manifestiraju kao kronični rinosinuitis. Prva linija liječenja su nazalni kortikosteroidi u razdoblju od 2 do 3 mjeseca (del Toro i Portela, 2024). Ciljevi liječenja nosnih polipa uključuju smanjenje veličine polipa, otvaranje nosnih dišnih puteva, disanje kroz nos, vraćanje osjeta mirisa (Badia i Lund, 2001). Rinitis je upalna bolest karakterizirana simptomima nazalne kongestije, rinoreje, kihanja te svrbeži nosa. Korištenje nazalnih kortikosteroida opravdano je kod pacijenata kojima simptomi rinitisa utječu na kvalitetu života (Seidman i sur., 2015).

Doze kortikosteroida u liječenju rinitisa manje su nego u liječenju nosnih polipa. Primjerice, mometazonfuroat hidrat u obliku spreja za nos je nazalni kortikosteroid koji je u Republici Hrvatskoj odobren za liječenje nosnih polipa. Ukupna početna doza za obje nosnice je 200 µg/dan te se može povećati do ukupne doze od 400 µg/dan. Kada se mometazonfuroat hidrat koristi za liječenje rinitisa početna doza iznosi 200 µg/dan za obje nosnice, a doza održavanja 100 µg/dan kada se simptomi bolesti stave pod kontrolu (www.halmed.hr).

Druga generacija kortikosteroida najčešće se koristi u lokalnom liječenju akutnog rinosinuitisa jer njihovom primjenom ne dolazi do sistemskih nuspojava kao što su negativan utjecaj na metabolizam kosti, supresija osi hipotalamus-hipofiza-adrenalna žlijezda i zastoj u rastu kod djece. Rizik od sistemskih nuspojava ovisi o količini lijeka koja dospije u sistemsku cirkulaciju nakon nazalne primjene (Gupta i Fonacier, 2016). Količina lijeka koja dospije u sistemsku cirkulaciju posljedica je apsorpcije lijeka kroz nazalnu mukozu i gastrointestinalni trakt. Većina lijeka koja je primijenjena nazalnim putem odlaže se u ustima i bude progutana, a njegova sistemska biorasploživost ovisi o apsorpciji kroz gastrointestinalni trakt i metabolizmu prvog prolaska kroz jetru (Cave i sur., 1999). Odlaganje lijeka u stražnjem i nazofaringealnom dijelu nosa rezultira odstranjivanjem lijeka mukocilijarnim transportom u probavni sustav te dolazi do gutanja lijeka (Gizurason, 1993). Druga generacija kortikosteroida uključuje mometazonfuroat, flutikazonpropionat, ciklezonid i flutikazonfuroat. Smanjena biorasploživost lijeka nakon gutanja intranazalnog kortikosteroida druge generacije posljedica je podložnosti tih lijekova metabolizmu prvog

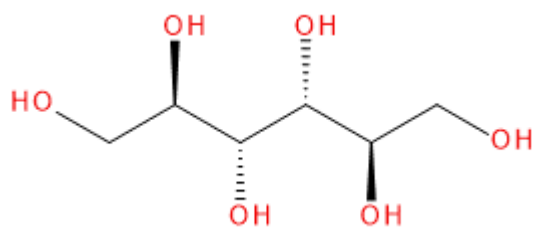
prolaska kroz jetru (Gupta i Fonacier, 2016). Moguće nuspojave su rijetke i primarno lokalne te uključuju suhoću, peckanje, žarenje i epistaksu, tj. krvarenje iz nosa (Seidman i sur., 2015). U Republici Hrvatskoj dostupni kortikosteroidi za nazalnu primjenu su: flutikazonfuroat, flutikazonpropionat, mometazonfuroat, triamcinolonacetonid i budezonid. Oni se u formulacijama nalaze u obliku otopina ili suspenzija (www.halmed.hr).

1.2.1. OBLIKOVANJE PRAŠKASTIH SUSTAVA KORTIKOSTEROIDA

Prednosti čvrstih, točnije praškastih formulacija lijekova pri nazalnoj primjeni u odnosu na tekuće formulacije su veća stabilnost djelatnih i pomoćnih tvari te poboljšana bioraspoloživost lijekova zbog povećane difuzije i apsorpcije lijeka kroz mukozne membrane. Nadalje, praškasti sustavi zahtijevaju manji udio pomoćnih tvari i dulje se zadržavaju u nosnoj šupljini zahvaljujući otpornosti mukocilijarnom čišćenju (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Mukocilijarno čišćenje je mehanizam kojim organizam sprječava ulaz štetnih tvari u donje dijelove respiratornog sustava. Cilindrične stanice s trepetljikama pokreću sluz koja se izlučuje iz vrčastih stanica i potencijalno štetne tvari prema probavnom sustavu (Lee i Minko, 2021). Uklapanjem određenih pomoćnih tvari kao što su mukoadhezivni ili *in situ* gelirajući polimeri u praškaste sustave za nazalnu primjenu omogućava se dulje zadržavanje lijeka u nosnoj šupljini. Usprkos nizu prednosti, malen je broj praškastih sustava za nazalnu primjenu (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018).

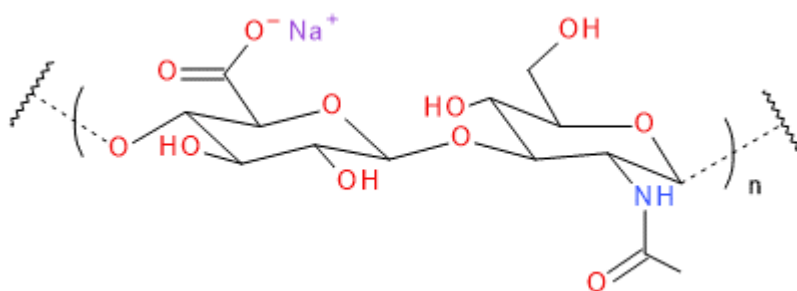
S ciljem postizanja sigurnosti primjene nazalnih prašaka potrebno je maksimalno smanjiti broj i količinu pomoćnih tvari. Pomoćne tvari pri formuliranju nazalnih mikrosfera mogu se podijeliti na tvari za povećanje volumena, mukoadhezivne ekscipijense te tvari koje poboljšavaju apsorpciju lijeka (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018).

Tvari za povećanje volumena omogućavaju lakše rukovanje i primjenu djelatne tvari. Takvi ekscipijensi utječu na veličinu čestica, bioraspoloživost lijeka i apsorpciju (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Manitol (Slika 3.) se često, zbog svoje topljivosti, inertnosti i niske higroskopsnosti, koristi kao ekscipijens. FDA navodi manitol kao „*generally recognized as safe*“ (GRAS) te je odobren za inhalacijsku primjenu kao ekscipijens ili djelatna tvar ovisno o dozi (Scherließ, 2012). Promjenom parametara sušenja raspršivanjem moguće je modificirati hrapavost površine i veličinu manitolskih mikrosfera. Hrapavost površine mikrosfera utječe na dostavu lijeka u pluća (Littringer i sur., 2012).



Slika 3. *Struktura D(-) manitola*

Natrijev hijaluronat je endogeni glikozaminoglikan koji čini sastavni dio ekstracelularnog matriksa i sinovijalne tekućine. Građen je od ponavljajućih disaharidnih jedinica N-acetil-D-glukoamina i D-glukuronske kiseline povezane β -1,4 glikozidnom vezom (Slika 4.). Koristi se kao pomoćna tvar jer je biokompatibilan, biorazgradiv te neimunogen. Pri formuliranju čestica, natrijev hijaluronat se kombinira s drugim ekscipijensima zbog svoje kohezivnosti i loših svojstava tečenja (Martinelli i sur., 2017). Pogodan je za nazalnu dostavu lijekova zbog svoje mukoadhezivnosti i viskoznosti. Stvaranje vodikovih veza s glikoproteinima nazalne mukoze omogućava produljeno zadržavanje čestica na površini nosne sluznice (Horvát i sur., 2009).



Slika 4. *Struktura disaharidne jedinice natrijevog hijaluronata građene od N-acetil-D-glukoamina i natrijevog D-glukuronata*

Promotori apsorpcije različitim mehanizmima pomažu nazalnom transportu aktivne tvari. Primjeri takvih ekscipijenasa su surfaktanti, masne kiseline i derivati, fosfolipidi, ciklodekstrini itd. Njihovi mehanizmi djelovanja uključuju modificiranje fosfolipidne barijere stanica, narušavanje stabilnosti čvrstih spojeva (engl. *tight junctions*) i povećanje topljivosti djelatnih tvari (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018).

U svijetu su trenutno dostupne samo tri vrste nazalnih prašaka kortikosteroida za lokalnu primjenu (Tablica 3.). Praškasti oblik budezonida dostupan je u Europi, dok su u Japanu odobreni Teijin Puvlizer Rhinocort[®] i Erizas[®]. Sva tri odobrena lijeka koriste se u liječenju alergijskog rinitisa (Pozzoli i sur., 2016).

Tablica 3. Nazalni prašci kortikosteroida za lokalnu primjenu odobreni u svijetu

NAZIV LIJEKA	DJELATNA TVAR I DOZA (μg)	POMOĆNE TVARI
Rhinocort Turbuhaler [®]	budezonid, 100 μg	nema
Teijin Puvlizer Rhinocort [®]	beklometazon dipropionat, 50 μg	hidroksipropilceluloza, stearinska kiselina, magnezijev stearat
Erizas [®]	deksametazon cipeccilat, 400 ili 200 μg	laktoza

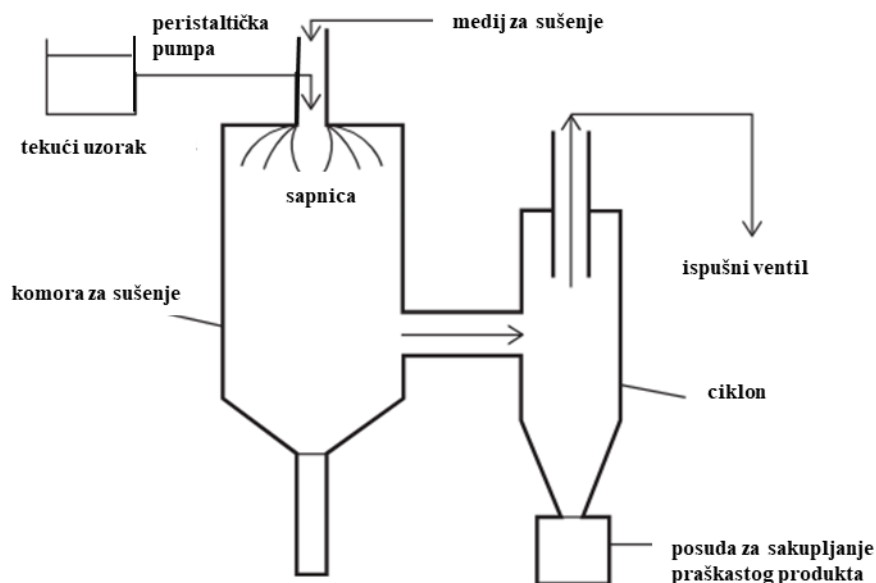
1.3. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM

Sušenje raspršivanjem je široko rasprostranjena tehnika u kojoj se djelatna tvar, otopljena ili dispergirana u tekućem vehikulumu, raspršuje i suši do nastanka suhog praškastog produkta (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Često je korištena tehnika u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. U farmaceutskoj industriji koristi se u pripremi formulacija s malim molekulama niske topljivosti te u obradi velikih biomolekula i biofarmaceutika (Ziaee i sur., 2019).

Prednosti tehnike sušenja raspršivanjem su mogućnost sušenja otopina i disperznih sustava u različitim koncentracijama uz korištenje organskih ili neorganskih otapala. Procesne parametre moguće je prilagoditi djelatnoj tvari koja može biti termolabilna (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Proces sušenja raspršivanjem izvodi se u jednom koraku, brz je, kontinuiran i reproducibilan. Dobiveni prašci veće su kemijske i fizičke stabilnosti u odnosu na početne formulacije te imaju dobra svojstva tečenja (Sosnik i Seremeta, 2015).

Glavna mana ove tehnike jesu niske vrijednosti iskorištenja pri laboratorijskim uvjetima koje najviše iznose od 50 do 60 %. Količina izgubljenog produkta relativno je konstantna, a posljedica je zaostajanja praška na stijenkama uređaja za sušenje raspršivanjem (Sosnik i Seremeta, 2015).

Proces sušenja raspršivanjem sastoji se od četiri koraka: 1.) atomizacija početne formulacije, 2.) sušenje raspršenih kapljica, 3.) stvaranje suhih čestica, 4.) razdvajanje i sakupljanje suhog produkta. Ulaskom uzorka u komoru za sušenje pomoću peristaltičke pumpe, uzorak prolazi kroz sapnicu te dolazi do atomizacije. Sapnica može biti pneumatska, rotacijska, hidraulična ili ultrazvučna. Iz dobivenih kapljica, pod utjecajem visoke temperature, dolazi do brzog isparavanja otapala te stvaranja suhih čestica. Suhe čestice se, pod utjecajem centrifugalne sile, razdvajaju od plina za sušenje te sakupljaju u kolektoru na dnu uređaja (Slika 5.; Sosnik i Seremeta, 2015). Smjer strujanja plina za sušenje i raspršene tekućine može biti istosmjern ili protusmjern. Istosmjern smjer strujanja pogodan je za termolabilne tvari pri kojem termolabilna tvar nikad nije u kontaktu s visokom temperaturom, dok je protusmjern smjer strujanja pogodan zbog većeg termalnog iskorištenja (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018).



Slika 5. Shematski prikaz uređaja za sušenje raspršivanjem (preuzeto i prilagođeno prema Nguyen i sur., 2021)

Ultrazvučna sapnica raspršuje uzorak pomoću vibracijske energije koja se prenosi na uzorak. Moguće je pripremiti čestice uniformne veličine od 5 do 1000 μm (O'Sullivan i sur., 2019). Korištenje ultrazvučne sapnice prikladno je za formulacije sa osjetljivim tvarima, otopine niske viskoznosti i Newtonove tekućine. Krajnji produkt ima mali udio vlage (Khaire i Gogate, 2021).

Prilagodbom procesnih parametara sušenja raspršivanjem i odabirom komponenata početne otopine utječe se na karakteristike praškastog produkta kao što su udio vlage, veličina i morfologija čestica (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Tablica 4. prikazuje utjecaj procesnih parametara na svojstva praškastog produkta i iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem. Povećanjem protoka uzorka, sapnica jednakom energijom raspršuje više tekućine, nastaju veće kapljice te posljedično veće čestice s većim sadržajem vlage (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Povećanjem ulazne temperature smanjuje se udio vlage u krajnjem produktu te se povećava iskorištenje procesa (www.buchi.com).

Tablica 4. Utjecaj procesnih parametara na svojstva produkta pripravljenog sušenjem raspršivanjem

	Brzina dotoka uzorka ↑	Ulazna temperatura ↑	Aspirator ↑
Udio vlage	povećanje	smanjenje	povećanje
Veličina čestica	povećanje	-	-
Iskorištenje procesa	smanjenje/ povećanje	povećanje	povećanje
Izlazna temperatura	smanjenje	povećanje	povećanje

1.3.1. UTJECAJ DISPERGIRANIH TVARI U UZORKU ZA SUŠENJE NA MOGUĆNOST ATOMIZACIJE RASPRŠIVANJEM

Sastavnice i svojstva uzorka za sušenje raspršivanjem kao što su viskoznost, površinska napetost, gustoća, kemijska i fizička stabilnost utječu na stvaranje krajnjeg produkta. Ključna značajka prilikom formuliranja početne otopine za sušenje raspršivanjem je postizanje kemijske stabilnosti djelatnih i pomoćnih tvari u otapalu (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018).

Polimerni nosači stabiliziraju djelatnu tvar te mogu poboljšati otapanje lijeka i apsorpciju. Intermolekulske interakcije djelatne i pomoćnih tvari potiču stvaranje homogene formulacije. Interakcije mogu biti ionske, elektrostatske, hidrofobne ili vodikove veze. Higroskopnost polimera u formulaciji utječe na fizičku stabilnost amorfno produkta tijekom skladištenja. Prisutnost punila u uzorku za sušenje raspršivanjem poboljšava svojstva tečenja, regulira sadržaj vlage i utječe na profil nazalne depozicije (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018).

Prilikom odabira otapala za pripremu uzorka za sušenje raspršivanjem potrebno je osigurati: 1.) topljivost i kemijsku stabilnost djelatne i pomoćnih tvari, 2.) odgovarajuću viskoznost otopine, 3.) nisku toksičnost, 4.) hlapljivost i brzo isparavanje disperznog sredstva tijekom sušenja (Ziaee i sur., 2019).

Koncentracija otopljenih tvari u uzorku utječe na viskoznost i gustoću uzorka koji utječu na svojstva dobivenih mikrosfera (Santos i sur., 2017). Veća koncentracija otopljenih tvari u uzroku za sušenje raspršivanjem odgovara manjoj količini otapala u raspršenim kapljicama. Manji udio otapala skraćuje vrijeme isparavanja otapala, stvaraju se porozne čestice manje

gustoće sa smanjenim udjelom vlage. Veća koncentracija otopljenih tvari može potaknuti aglomeraciju i stvaranje multimera između polimernih lanaca što dovodi do stvaranja poroznih čestica grublje površine (Ziaee i sur., 2019).

Za proces atomizacije tekućine tijekom sušenja raspršivanjem važna je površinska napetost uzorka. Smanjenjem površinske napetosti tijekom atomizacije omogućava se stvaranje malenih kapljica tekućine. Tekućine s velikom površinskom napetosti mogu ometati i spriječiti proces atomizacije (Santos i sur., 2017).

1.3.2. REOLOŠKA SVOJSTVA UZORAKA ZA SUŠENJE RASPRŠIVANJEM

Reološka svojstva otopina za sušenje raspršivanjem uvelike ovise o karakteristikama korištenog polimera, otapalu te njihovoj međusobnoj interakciji u otopini. Viskoznost otopine ovisna je o koncentraciji polimera i njegovoj molekulskoj masi. Pogodno otapalo smanjuje privlačne sile u lancima polimera, dolazi do razmatanja strukture polimera i povećanja viskoznosti otopine. Suprotno tome, nepogodno otapalo potiče privlačenje polimernih lanaca te dolazi do sakupljanja polimera u prirodnu nasumičnu konfiguraciju. Tekućine s uklopljenim polimerima najčešće su ne-Newtonovi fluidi (Porfirio i sur., 2021).

Viskoznost otopina za sušenje raspršivanjem direktno utječe na veličinu čestica. Povećanjem viskoznosti otopine potrebna je veća atomizacijska energija kako bi se nadvladale sile viskoznosti i omogućilo stvaranje manjih kapljica. Stoga, povećanje viskoznosti otopine rezultira stvaranjem većih kapljica te posljedično većim česticama (Anandharamakrishnan i sur., 2015).

Općenito, pri konstantnoj atomizacijskoj energiji, tekućine manje viskoznosti mogu se raspršiti u manje kapljice u odnosu na tekućine veće viskoznosti. Najpogodnija sapnica (atomizator) za raspršivanje viskoznih tekućina je rotacijski atomizator koji omogućuje stvaranje relativno ujednačenih kapljica (Ziaee i sur., 2019).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nazalna primjena kortikosteroida koristi se u lokalnom liječenju upalnih oboljenja nosne sluznice kao što su rinitis, rinosinuitis i nosna polipoza. Kortikosteroidi smanjuju upalu i simptome bolesti. Lokalna primjena je neinvazivan način primjene lijekova koji omogućuje dostavu lijeka u ciljni organ čime se smanjuje rizik od sistemskih nuspojava, ubrzava djelovanje kortikosteroida, a terapijski učinak postiže se pri manjim dozama (Demoly, 2008). Na tržištu su trenutno dostupne formulacije kortikosteroida za lokalnu primjenu u nosnu šupljinu u obliku otopina i suspenzija koje se kratko zadržavaju na mjestu primjene pa je time njihova učinkovitost ograničena (Hafner i sur., 2014).

Mukocilijarno čišćenje jedan je od problema primjene konvencionalnih tekućih formulacija za nazalnu primjenu jer uvelike skraćuje vrijeme zadržavanja lijeka na nosnoj sluznici. Nadalje, volumen tekućine koji nosna šupljina može primiti je ograničen, a tvari u otopini mogu biti nestabilne (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Formuliranjem nazalnih prašaka stabilnost djelatnih i pomoćnih tvari je povećana, a difuzija lijeka i mukozna apsorpcija su poboljšane. Nazalni prašci osiguravaju dulje zadržavanje lijeka i veću koncentraciju na mjestu primjene (Filipović-Grčić i Hafner, 2008).

Pravilnim odabirom pomoćnih tvari pri formuliranju nazalnih prašaka moguće je modificirati nepovoljne karakteristike djelatne tvari (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Isto tako, pomoćne tvari osiguravaju dulje zadržavanje lijeka u nosnoj šupljini te povećanje otpora mukocilijarnom čišćenju (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Pomoćne tvari utječu na svojstva dobivenih mikrosfera kao što su veličina čestica, bioraspoloživost, apsorpcija i svojstva tečenja prašaka. Nazalni prašci ne zahtijevaju uporabu konzervansa (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Manitol je inertna, vodotopljiva tvar niske higroskopnosti koja se često koristi kao tvar za povećanje volumena. Također, koristi se i zbog dobrih svojstava tečenja te ima sposobnost mijenjanja propusnosti mukoznog sloja osmotskim putem (Nižić Nodilo i sur., 2021). Polimeri korišteni za izradu mikrosfera su biokompatibilni, biorazgradivi i neimunogeni, a stvaranje viskoznih otopina i mukoadhezivnost pomažu zadržavanju lijeka na mjestu primjene (Horvat i sur., 2009). Razmatanjem polimernih lanaca natrijevog hijaluronata omogućava se stvaranje vodikovih veza između karboksilnih skupina hijaluronata i mucina čime se osigurava mukoadhezija (Joergensen i sur., 2011).

Sušenje raspršivanjem je brza, reproducibilna i jednostavna tehnika koja omogućava stvaranje mikrosfera željenih karakteristika. Proces se odvija u jednom koraku, a variranjem procesnih

parametara utječe se na svojstva dobivenih čestica kao što su veličina i morfologija koje su povezane s potencijalnom iritacijom nosne šupljine (Filipović-Grčić i Hafner, 2008).

U ovome su radu pripremljene hijaluronsko-manitolske mikrosfere s uklopljenim natrijevim prednizolonfosfatom metodom sušenja raspršivanjem. Natrijev prednizolonfosfat je vodotopljivi prolijek prednizolona. Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti karakteristike pripremljenih mikrosfera, uspješnost uklapanja, iskorištenje procesa te ispitati utjecaj masenog udjela prednizolona na fizičko-kemijska svojstva mikrosfera. Ispitana su i reološka svojstva vodenih otopina natrijevog hijaluronata, manitola i natrijevog prednizolonfosfata pri različitim koncentracijama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U svrhu izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada korišteni su dinatrijev prednizolonfosfat (dalje u tekstu: prednizolon; Biosynth Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo), natrijev hijaluronat (Conti pro, Češka), D(-) manitol (Lach-Ner, Češka) i umjetni nazalni fluid.

Umjetni nazalni fluid (engl. *simulated nasal fluid*, SNF) pripremljen je otapanjem natrijevog klorida (Alkaloid AD, Makedonija), kalijevog klorida (GRAM-MOL, Zagreb) i kalcijevog klorida dihidrata (Sigma-Aldrich, Njemačka) pri koncentracijama redom od 7,45 g/L, 1,29 g/L i 0,32 g/L u pročišćenoj vodi.

3.2. METODE

3.2.1. PRIPREMA OTOPINA ZA POSTUPAK SUŠENJA RASPRŠIVANJEM

Za pripravu mikrosfera korištene su otopine natrijevog hijaluronata, manitola i prednizolona pri različitim koncentracijama (Tablica 5.). Koncentrirana vodena otopina natrijevog hijaluronata (0,5 %, *m/m*) pripremljena je otapanjem natrijevog hijaluronata u pročišćenoj vodi uz miješanje na magnetnoj miješalici. Odvagani manitol i prednizolon otopljeni su u pročišćenoj vodi uz dodatak potrebne količine otopine natrijevog hijaluronata te je smjesa homogenizirana na magnetnoj miješalici.

Tablica 5. Sastav vodenih otopina za pripravu mikrosfera sušenjem raspršivanjem

Broj uzorka	Natrijev hijaluronat (%, <i>m/m</i>)	Manitol (%, <i>m/m</i>)	Prednizolon (%, <i>m/m</i>)
1	0,05	6,0	0,050
2	0,05	6,0	0,075
3	0,05	6,0	0,100
4	0,05	6,0	0,150

3.2.2. IZRADA MIKROSFERA

Uređaj Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Švicarska) s ultrazvučnom sapnicom korišten je za pripravu mikrosfera. Postavljeni parametri sušenja bili su konstantni, kako slijedi: snaga ultrazvučne sapnice 60 %, postavka peristaltičke pumpe 5 %, kapacitet aspiratora 100 %. Ulazna temperatura iznosila je 120 °C, a izlazna 67-70 °C.

Iskorištenje procesa izrade mikrosfera određeno je omjerom mase dobivenih mikrosfera i mase suhe tvari u otopini prema formuli:

$$I = \frac{\text{masa dobivenih mikrosfera (g)}}{\text{masa suhe tvari u otopini (g)}} \times 100 \%$$

3.2.3. ODREĐIVANJE REOLOŠKIH SVOJSTAVA OTOPINA ZA SUŠENJE RASPRŠIVANJEM

Krivulje viskoznosti otopina određene su korištenjem reometra MCR 102 (Anton Paar, Austrija). Krivulje pokazuju ovisnost viskoznosti sustava (η , mPas) o brzini smicanja ($\dot{\gamma}$) u rasponu od 0,1 do 100 s⁻¹. Mjerni sustav je mjerni stožac promjera 50 mm, a nagibni kut stošca iznosi 1° (CP50-1). Udaljenost između donje ploče i mjernog stošca bila je 0,102 mm. Mjerenje je provedeno pri 25 °C.

3.2.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA I USPJEŠNOSTI UKLAPANJA PREDNIZOLONA U MIKROSFERAMA

Za izradu baždarnog dijagrama pripremljen je koncentracijski niz otopina prednizolona od 5 do 30 µg/ml koje su pripremljene u duplikatu. Radne otopine pripremljene su razrjeđivanjem potrebne količine standardne vodene otopine prednizolona (engl. *stock solution*; 100 µg/ml) pročišćenom vodom u odmjernoj tikvici od 10,0 ml. Otopine su filtrirane kroz membranski filter Chromafil® Xtra PES-20/25, promjera pora 0,2 µm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka). Spektrofotometrijskom metodom dobivena je ovisnost apsorbancije o poznatim koncentracijama standardnih otopina prednizolona pri valnoj duljini od 246 nm.

Sadržaj lijeka u mikrosferama određen je spektrofotometrijski pomoću UV/VIS spektrofotometra Varian Cary 60 (Varian Inc., Nizozemska). Slijepa proba sadržavala je 0,05 % (m/m) natrijevog hijaluronata i 6 % (m/m) manitola.

Odvagano je 10 mg mikrosfera korištenjem analitičke vage (Mettler Toledo, Švicarska) u odmjernu tikvicu od 10,0 ml koja je dopunjena do oznake pročišćenom vodom. Uzorci su pripremljeni u duplikatu. Otopine su filtrirane kroz membranski filtar Chromafil® Xtra PES-20/25, promjera pora 0,2 µm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka). Apsorbancija je određivana pri valnoj duljini od 246 nm, u triplikatu.

Sadržaj prednizolona (engl. *drug loading*, DL) u mikrosferama izračunat je iz stvarne mase prednizolona (Q_a) i ukupne mase mikrosfera (Q_m) prema formuli:

$$DL(\%) = \frac{Q_a}{Q_m} \times 100 \%$$

Uspješnost uklapanja (engl. *encapsulation efficiency*, EE) prednizolona određena je omjerom stvarne mase lijeka (Q_a) i teorijske mase (Q_t) prednizolona u uzorku prema formuli:

$$EE(\%) = \frac{Q_a}{Q_t} \times 100 \%$$

3.2.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VLAGE

Sadržaj vlage u mikrosferama određen je termogravimetrijski pomoću halogenog vlagomjera (Mettler Toledo, Švicarska). Oko 0,2 g mikrosfera jednolično je raspoređeno po jedinici za vaganje i zagrijavano do 110 °C. Sadržaj vlage određen je metodom gubitka vlage pri sušenju.

3.2.6. ODREĐIVANJE VELIČINE ČESTICA

Raspodjela veličine mikrosfera određena je metodom laserske difrakcije pomoću uređaja Mastersizer 3000 s Hydro SV ćelijom (Malvern Panalytical Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo). Mikrosfere su dispergirane u 96 %-tnom etanolu. Rezultati su prikazani kao udio čestica manjih od 10 µm. Veličina čestica određena je u pentaplikatu.

3.2.7. ODREĐIVANJE ZETA POTENCIJALA

Zeta potencijal čestica određen je uređajem Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo) prema principu elektroforetskog raspršenja svjetlosti. Čestice su dispergirane u 10 mM NaCl-u. Mjerenja su provedena u triplikatu u kiveti DTS 1070.

3.2.8. ISPITIVANJE SVOJSTAVA TEČENJA

Određivanjem Hausnerovog omjera istražena su svojstva tečenja prašaka. U zatvorenu inzulinsku štrcaljku od 1 ml odvagano je 200 mg uzorka te je očitani nasipni volumen uzorka prije protresivanja. Štrcaljka je protresivana do konstantnog volumena uzorka (približno sto puta) nakon čega je određen volumen praška nakon protresivanja. Iz omjera mase mikrosfera i očitanih volumena izračunate su gustoće prije i nakon protresivanja. Metoda je indirektna i provedena je u triplikatu za svaki uzorak. Hausnerov omjer izračunat je prema sljedećoj formuli:

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

3.2.9. ODREĐIVANJE STUPNJA BUBRENJA MIKROSFERA U SNF-u

Stupanj bubrenja određen je indirektnom metodom koristeći Franzovu difuzijsku ćeliju. Izvagano je 10 mg mikrosfera na polupropusnu poliamidnu membranu promjera pora 45 μm (Sartorius Stedim Biotech, Njemačka). Receptorski odjeljak ispunjen je SNF-om i termostatiran pri 34 °C. Tijekom 15 minuta, svake 3 minute se kroz postraničnu cijev nadomješta volumen apsorbiranog SNF-a. Za nadoknadu SNF-a korištena je šprica volumena 500 μl (Hamilton, Švicarska).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. IZRADA MIKROSFERA

Vodene otopine korištene za izradu mikrosfera sadržavale su 0,05 % (*m/m*) natrijevog hijaluronata, 6 % (*m/m*) manitola te koncentracije prednizolona u rasponu od 0,05 % do 0,15 % (*m/m*; Tablica 5.).

Manitol je pomoćna tvar topljiva u vodi koja se često koristi kao tvar za povećanje volumena (engl. *bulking agent*) i nosač za djelatne tvari. Poboljšava mukoadhezivna svojstva i svojstva tečenja prašaka. Osmotskim putem ima sposobnost mijenjanja propusnosti mukozog sloja (Nižić Nodilo i sur., 2021).

Natrijev hijaluronat kao ekscipijens u pripravcima za nazalnu primjenu poboljšava bioraspoloživost i penetraciju djelatne tvari zahvaljujući svojim mukoadhezivnim svojstvima. Dodatno ima sposobnost hidratacije sluznice nosa (Liao i sur., 2005).

Mikrosfere su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem uz pomoć uređaja Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Švicarska). Prvotna početna otopina za izradu mikrosfera sadržavala je 0,5 % (*m/m*) natrijevog hijaluronata te se izrada mikrosfera iz takve otopine pokazala neuspješnom. Uspjeh je postignut smanjenjem koncentracije natrijevog hijaluronata do 0,05 % (*m/m*). Mogući razlozi neuspješne atomizacije mogu biti neprikladna viskoznost otopine te svojstva linearnih polimera velike molekulske mase, prvenstveno njihova elastična otpornost koja sprječava nužnu deformaciju za stvaranje mikrosfera (Lin i sur., 2020). Smanjenje koncentracije natrijevog hijaluronata u otopini za sušenje omogućilo je uspješnu pripremu mikrosfera sušenjem raspršivanjem.

4.2. ISKORIŠTENJE PROCESA

Iskorištenje procesa iznosilo je od 42,65 % do 54,96 %, a smanjivalo se s povećanjem koncentracije prednizolona u otopini (Tablica 6.).

Sarisozen i suradnici (2010) razvili su mikrosfere prednizolonacetata i kitozana za prevenciju restenoze koristeći Büchi 190 Mini Spray Dryer (Büchi, Flawil, Švicarska). Iskorištenje procesa bilo je od $30,5 \pm 2,7$ % do $70,6 \pm 1,9$ %, a povećavalo se s povećanjem udjela kitozana u otopini.

Shahin i suradnici (2019) razvili su mikrosfere sa sildenafilom, natrijevim alginatom, natrijevom karboksimetilcelulozom i natrijevim hijaluronatom za inhalacijsku primjenu u svrhu liječenja plućne hipertenzije koristeći Büchi B-290 Mini Spray Dryer (Büchi, Flawil, Švicarska) s bifluidnom sapnicom. Iskorištenje sušenja raspršivanjem variralo je od 30,3 % do 65,6 %. Uočeno je da natrijev hijaluronat ima zanemarivo mali utjecaj na povećanje iskorištenja procesa u usporedbi s natrijevim alginatom i natrijevom karboksimetilcelulozom. Općenito, relativno male vrijednosti iskorištenja procesa sušenja raspršivanjem posljedica su male ukupne mase čvrstih tvari u otopini te vezanja čestica za stijenke uređaja pod utjecajem centrifugalne sile, što smanjuje ukupnu masu dobivenog produkta (Sosnik i Seremeta, 2015). Dobiveni rezultati u skladu su s očekivanjima za proces sušenja raspršivanjem s obzirom na male volumene početnih otopina. M i Gogate (2024) u svome su istraživanju uspoređivali mikrosfere natrijevog alginata i metforminklorida dobivene koristeći uređaj za sušenje raspršivanjem (JISL Instruments, Mumbai) s ultrazvučnom i bifluidnom sapnicom. Iskorištenje pri korištenju ultrazvučne sapnice iznosilo je najviše 48,2 %. Iako su iskorištenja pri korištenju bifluidne sapnice bila veća (do 56,6 %), prilikom korištenja ultrazvučne sapnice postignuta je uska raspodjela veličine čestica i veća učinkovitost uklapanja lijeka.

Tablica 6. Rezultati iskorištenja sušenja raspršivanjem

Udio prednizolona u otopini za sušenje raspršivanjem (%, <i>m/m</i>)*	Iskorištenje (%)
0,05	54,96
0,075	52,33
0,1	43,99
0,15	42,65

*Sve sušene otopine sadržavale su i manitol (6 %, *m/m*) te natrijev hijaluronat (0,05 %, *m/m*).

4.3. REOLOŠKA SVOJSTVA OTOPINA ZA PRIPREMU MIKROSFERA

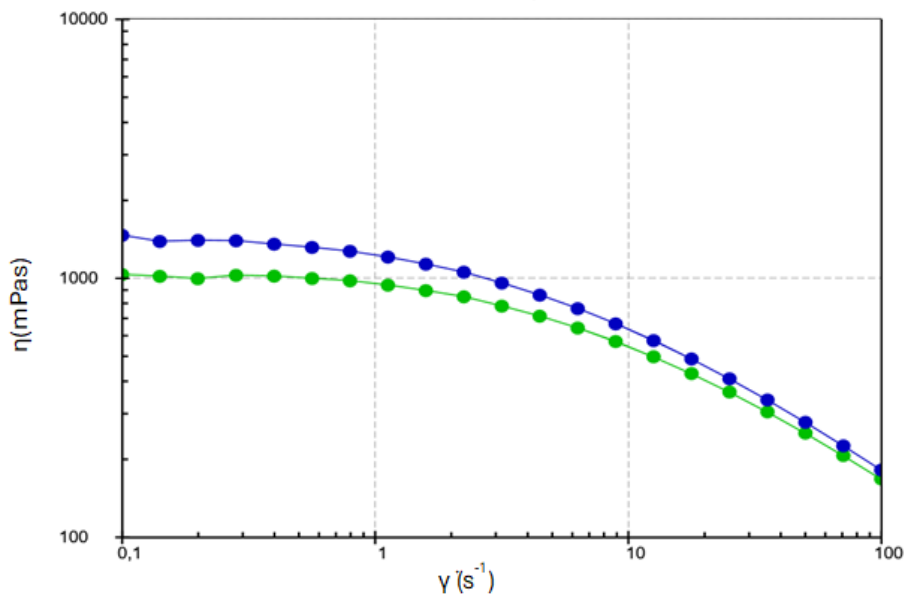
Površinska napetost, viskoelastičnost i viskoznost uvelike utječu na učinak metode sušenja raspršivanjem, posebice pri korištenju ne-Newtonovih fluida. Koncentracija i molekulska masa otopljenih tvari utječe na viskoznost otopine, a viskoznost tekućina utječe na proces atomizacije čestica pri procesu sušenja raspršivanjem (Porfirio i sur., 2021).

Ovisnost viskoznosti (η , mPas) otopina o brzini smicanja ($\dot{\gamma}$) određena je korištenjem reometra MCR 102 (Anton Paar, Austrija) uz mjerni sustav stožac-ploča. Viskoznost je određivana otopinama s 6 % (*m/m*) manitola, 0,1 % (*m/m*) prednizolona i različitim koncentracijama natrijevog hijaluronata te otopini koja sadrži 0,5 % (*m/m*) natrijevog hijaluronata i 6 % (*m/m*) manitola bez djelatne tvari kako bi se utvrdio utjecaj prednizolona na viskoznost otopine. Viskoznost (η , mPas) je određivana u rasponu brzine smicanja od 0,1 do 100 s⁻¹.

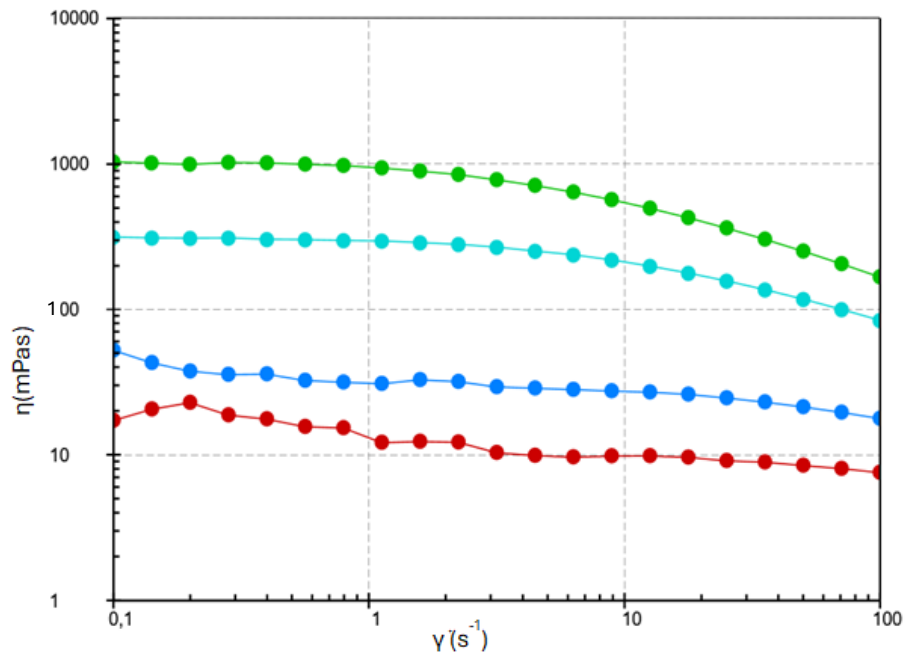
Ispitivanjem je potvrđeno da se viskoznost svih otopina smanjuje s porastom brzine smicanja (Slike 6. i 7.) što ukazuje da se radi o pseudoplastičnim sustavima. Smanjenje viskoznosti posljedica je deformacije makromolekula u otopini koja dovodi do smanjenja otpora smicanju (Malkin i Isayev, 2012).

Utvrđeno je da dodatak 0,1 % (*m/m*) prednizolona u otopinu s natrijevim hijaluronatom i manitolom smanjuje viskoznost same otopine (Slika 6.).

Korištenje ultrazvučne sapnice pri sušenju raspršivanjem nije prikladno za viskozne otopine i ne-Newtonove tekućine (Khaire i Gogate, 2021). Smanjenjem koncentracije natrijevog hijaluronata smanjuje se viskoznost otopina (Slika 7.). Uspješna atomizacija uzorka i sušenje te dobivanje mikrosfera tijekom eksperimenta postignuto je pri koncentraciji natrijevog hijaluronata od 0,05 % (*m/m*).



Slika 6. Ovisnost viskoznosti (η , mPa s) otopine 0,5 % natrijevog hijaluronata, 6 % manitola te 0,1 % prednizolona (●) i otopine 0,5 % natrijevog hijaluronata te 6 % manitola (●) o brzini smicanja ($\dot{\gamma}$, s^{-1}). Navedeni su maseni udjeli sastavnica otopina. Mjerenja su provedena u duplikatu, a prikazane su reprezentativne krivulje.



Slika 7. Ovisnost viskoznosti (η , mPas) otopine 0,1 % prednizolona, 6 % manitola te natrijevog hijaluronata pri koncentraciji od 0,5 % (●), 0,3 % (●), 0,1 % (●) i 0,05 % (●) o brzini smicanja ($\dot{\gamma}$, s^{-1}). Navedeni su maseni udjeli sastavnica otopina. Mjerenja su provedena u duplikatu, a prikazane su reprezentativne krivulje.

4.4. SADRŽAJ PREDNIZOLONA I USPJEŠNOST UKLAPANJA U MIKROSFERAMA

Baždarni dijagram za određivanje sadržaja prednizolona izrađen je mjerenjem apsorbancije koncentracijskog niza vodene otopine prednizolona (Slika 8.). Dobivena je sljedeća jednadžba pravca: $y = 0,0284x - 0,0061$ ($R^2 = 0,9994$), gdje y označava apsorbanciju, a x koncentraciju prednizolona u otopini.

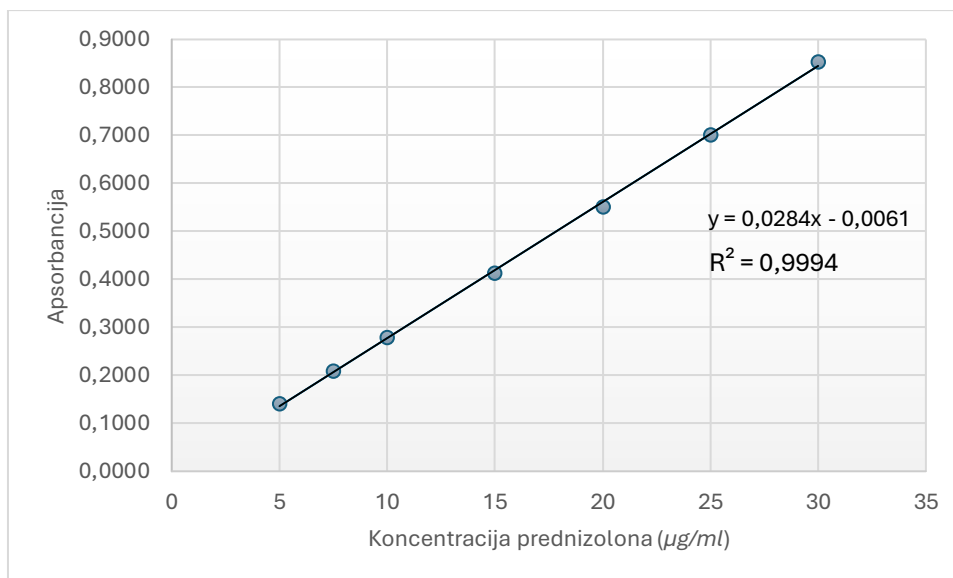
Metoda sušenja raspršivanjem pokazala se uspješnom za uklapanje prednizolona u mikrosfere s natrijevim hijaluronatom i manitolom. Uspješnost uklapanja lijeka (engl. *entrapment efficiency*, EE) iznosila je od 84,68 % do 98,79 % te se povećavala s povećanjem udjela lijeka. Sadržaj prednizolona (engl. *drug loading*, DL), određen kao omjer stvarne mase prednizolona i ukupne mase mikrosfera, iznosio je od 0,69 % do 2,37 %. Rezultati su prikazani u Tablici 7. Postignuta je visoka uspješnost uklapanja prednizolona u mikrosfere.

Sarisozen i suradnici (2010) metodom sušenja raspršivanjem pripravili su mikrosfere prednizolonacetata i kitozana. Uspješnost uklapanja varirala je između $4,6 \pm 0,5$ % i $45,7 \pm 0,3$ %, ovisno o koncentraciji polimera. Liu i suradnici (2018) razvili su mikrosfere hijaluronske kiseline i nanokristala hidrofobnog budezonida za inhalacijsku primjenu metodom sušenja raspršivanjem. Uspješnost uklapanja lijeka u mikrosfere iznosila je $21,0 \pm 0,3$ % i $91,5 \pm 1,5$ %.

Liang i Strong (2012) ispitivali su sigurnost nazalne primjene prednizolonacetata u liječenju polipoze nosa. Pojedinačna doza prednizolona u studiji iznosila je 2 mg prednizolona po nosnici dva puta dnevno, što je odgovaralo ukupnoj dnevnoj dozi od 8 mg. Studijom je potvrđena mogućnost sigurne primjene prednizolonacetata u liječenju polipoze.

Liječenje polipoza nosa zahtjeva veće dnevne doze kortikosteroida u usporedbi s liječenjem alergijskog rinitisa. Na primjer, ukupna dnevna doza mometazonfuroata u liječenju polipoze iznosi 200 µg, dok u liječenju alergijskog rinitisa, nakon postizanja kontrole simptoma, iznosi 100 µg (www.halmed.hr).

Prosječna doza praška za nazalnu primjenu koju ljudski nos može primiti iznosi 10-25 mg po potisku po nosnici (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Doza prednizolona uklopljenog u 25 mg mikrosfera dobivenih u istraživanju za nazalnu primjenu iznosila bi od 173 µg do 593 µg po potisku. Sadržaj prednizolona u hijaluronsko-manitolskim mikrosferama razvijenima u ovom radu odgovara potencijalnoj terapijskoj dozi u lokalnom liječenju alergijskog rinitisa te rinosinuitisa s nosnim polipima ili bez polipa.



Slika 8. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 246 nm o koncentraciji prednizolona u otopini (µg/ml)

Tablica 7. Rezultati uspješnosti uklapanja (EE) i sadržaja lijeka (DL) u mikrosferama. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n=2)

Udio prednizolona u otopini za sušenje raspršivanjem* (% , m/m)	EE (%)	DL (%)
0,05	84,68 ± 5,73	0,69 ± 0,04
0,075	94,04 ± 3,75	1,15 ± 0,05
0,1	97,93 ± 3,59	1,59 ± 0,06
0,15	98,00 ± 1,68	2,37 ± 0,04

*Sve sušene otopine sadržavale su i manitol (6 % , m/m) te natrijev hijaluronat (0,05 % , m/m).

4.5. VELIČINA ČESTICA

Čestice veličine od 10 do 50 μm najprikladnije su za nazalnu dostavu lijekova. Čestice promjera manjeg od 10 μm prolaze prema donjim dišnim putevima, a što su čestice veće to je njihova depozicija anteriornija (Rathanan i sur., 2007). Raspodjela veličine čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem određena je korištenjem uređaja Mastersizer 3000 s Hydro SV ćelijom, a rezultati su prikazani kao udio volumena čestica promjera manjeg od 10 μm (Tablica 8.).

Kontrolom parametara procesa sušenja raspršivanjem moguće je utjecati na veličinu čestica i njihovu morfologiju. Kritični parametri u procesu atomizacije su viskoznost otopine, protok otopine do sapnice i protok komprimiranog zraka. Vrsta i učinkovitost sapnice imaju velik utjecaj na veličinu čestica (Vicente i sur., 2013). Sušenje otopine veće viskoznosti ili koncentracije rezultira većim česticama zbog većeg udjela čvrste tvari. Prilikom raspršivanja otopine na sapnici veličina kapljica proporcionalna je konačnoj veličini čestica. Smanjenjem protoka otopine do sapnice smanjuje se veličina raspršenih kapljica te se tako smanjuje veličina dobivenih mikrosfera. U slučaju bifluidne sapnice, veći protok komprimiranog zraka bolje raspršuje tekući uzorak, iz čega proizlaze manje raspršene kapljice, a time i manje čestice (Patel i sur., 2015).

Zahtjevi za nazalnu primjenu suhih prašaka zahtijevaju da je većina čestica promjera većeg od 10 μm . Uočen je znatno manji udio čestica promjera manjeg od 10 μm kod uzoraka s 0,10 i 0,15 % (*m/m*) prednizolona u početnoj otopini u usporedbi s uzorcima s manjom koncentracijom prednizolona (0,05 % i 0,075 %; *m/m*) (Tablica 8.).

Tablica 8. Rezultati raspodjele veličine čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD ($n=5$)

Udio prednizolona u otopini za sušenje raspršivanjem (%)	Udio čestica manjih od 10 μm (%)
0,05	19,7 \pm 0,2
0,075	18,7 \pm 0,7
0,1	4,2 \pm 0,3
0,15	8,1 \pm 0,8

*Sve sušene otopine sadržavale su i manitol (6 %, *m/m*) te natrijev hijaluronat (0,05 %, *m/m*).

4.6. SADRŽAJ VLAGE

Veliki sadržaj vlage utječe na svojstva samog praška. Vлага utječe na veličinu i stabilnost čestica te može potaknuti kristalizaciju pomoćnih tvari pri dugotrajnom skladištenju. Nadalje, mali sadržaj vlage smanjuje gustoću čestica i omogućava bolja svojstva raspršivanja. Čimbenici koji utječu na sadržaj vlage u praškastom uzorku su uvjeti procesa sušenja raspršivanjem i sastav praška (Shahin i sur., 2019). Povećanje izlazne temperature smanjuje sadržaj vlage u krajnjem produktu. S druge strane, prevelika razlika između ulazne i izlazne temperature rezultira većom vlažnosti produkta (Maa i sur., 1997).

Najvažnije svojstvo praškastog sustava koje utječe na sadržaj vlage je higroskopnost pojedine tvari. Prašci dobiveni sušenjem raspršivanjem najčešće imaju nizak sadržaj vlage (<10 %, *m/m*) (Ameri i Maa, 2006).

Udio vlage u praškastim uzorcima iznosio je od 1,64 % do 2,55 % (*m/m*) kako je prikazano u Tablici 9. Natrijev hijaluronat je higroskopan, ali se u prašcima nalazi u malom udjelu pa nije u velikoj mjeri utjecao na sadržaj vlage (Athamneh i sur., 2019). Manitol nije higroskopna tvar, a povećanjem udjela prednizolona u prašcima uočava se blago povećanje sadržaja vlage zbog njegove blage higroskopnosti (Ohrem i sur., 2014).

Perkušić i suradnici (2022) pripravili su mikrosfere manitola i kitozana s uklopljenim donepezilom za nazalnu primjenu u svrhu liječenja simptoma Alzheimerove bolesti. Mikrosfere su sadržavale od $3,8 \pm 0,3$ % do $9,3 \pm 0,3$ % vlage ovisno o udjelu manitola i lijeka, što se smatra prikladnim udjelom za mikrosfere koje sadrže polimer.

Tablica 9. Rezultati ispitivanja sadržaja vlage. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD ($n=3$)

Udio prednizolona u otopini za sušenje raspršivanjem (%)	Sadržaj vlage (%)
0,05	$1,64 \pm 0,27$
0,075	$1,93 \pm 0,10$
0,1	$1,90 \pm 0,02$
0,15	$2,55 \pm 0,12$

*Sve sušene otopine sadržavale su i manitol (6 %, *m/m*) te natrijev hijaluronat (0,05 %, *m/m*).

4.7. ZETA POTENCIJAL

Mjerenjem zeta potencijala čestica koristeći Zetasizer Ultra određuje se naboj čestica na njihovoj površini. Čestice su suspendirane u 10 mmol otopini NaCl-a pri pH 7. Promjene zeta potencijala mogu ukazivati na interakcije između komponenti mikrosfera (Jug i Bećirević-Laćan, 2008). Izmjerene vrijednosti zeta potencijala iznose od $-9,3 \pm 0,6$ do $-15,1 \pm 1,4$ mV kako je prikazano u Tablici 10. Karboksilne skupine hijaluronske kiseline su, između ostalog, odgovorne za negativan naboj mikrosfera na površini, što onemogućava stvaranje ionskih interakcija s negativno nabijenim glikoproteinima mucina. Međutim, elektrostatsko odbijanje istoimenih naboja može dovesti do otvaranja polimernih lanaca i olakšanog stvaranja vodikovih veza pomoću karboksilnih skupina hijaluronata, što omogućuje ispreplitanje lanaca polimera i mucina te osigurava mukoadheziju (Joergensen i sur., 2011).

Povećanjem udjela prednizolona u mikrosferama iznad 0,05 % (*m/m*) povećala se apsolutna vrijednost negativnog zeta potencijala, koja je bila gotovo jednaka za preostala tri uzorka. Prednizolon se u mikrosferama nalazi u obliku prednizolonfosfata, prolijeka koji sadrži dodatnu fosfatu skupinu. Fosfatna skupina je negativno nabijena pri uvjetima određivanja zeta potencijala (pH=7) te, zajedno s utjecajem natrijevog hijaluronata, dovodi do pojave negativnog naboja na površini mikrosfera.

Tablica 10. Zeta-potencijal pripremljenih mikrosfera. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD ($n=3$)

Udio prednizolona u otopini za sušenje raspršivanjem (%)*	Zeta potencijal (mV)
0,05	$-9,3 \pm 0,6$
0,075	$-13,7 \pm 2,2$
0,1	$-15,1 \pm 1,4$
0,15	$-12,1 \pm 2,1$

*Sve sušene otopine sadržavale su i manitol (6 %, *m/m*) te natrijev hijaluronat (0,05 %, *m/m*).

4.8. SVOJSTVA TEČENJA PRAŠAKA

Svojstva tečenja prašaka mogu se opisati na temelju izračunatih vrijednosti Hausnerovog omjera. Hausnerov omjer za dobivene praške iznosio je od 1,553 do 1,889 kako je prikazano u Tablici 11. Prema Europskoj farmakopeji dobivene mikrosfere pripadaju kategoriji vrlo loših (1,46-1,59) i vrlo vrlo loših ($>1,60$) svojstava tečenja. Hausnerov omjer ne može precizno odrediti svojstva tečenja prašcima dobivenih sušenjem raspršivanjem te nije prikladan za predviđanje svojstava raspršivanja prašaka za nazalnu primjenu (Juptner i Scherliess, 2019). Međutim, prikladan je za usporedbu svojstava tečenja dobivenih mikrosfera (Nižić Nodilo i sur., 2021).

Povećane vrijednosti Hausnerovog omjera očekuju se pri korištenju hidrofilnih i ionskih polimera koji imaju veću kohezivnost i tendenciju aglomeracije (Perkušić i sur., 2022). Prema istraživanju Perkušić i suradnika (2022), povećanje udjela inertne pomoćne tvari dobrih svojstava tečenja, u ovom slučaju manitola, poboljšalo bi svojstva tečenja prašaka zbog smanjenja vlage u mikrosferama, ali bi rezultiralo i povećanjem veličine čestica. Promjena procesnih parametara, točnije povećanje ulazne temperature prilikom izrade mikrosfera rezultira smanjenjem ostatne vlage u dobivenim mikrosferama što dovodi do boljih svojstava tečenja (Sandler i sur., 2010).

Povećanje udjela prednizolona u mikrosferama rezultiralo je smanjenjem Hausnerovog omjera i poboljšanim svojstvima tečenja (Tablica 11.). U česticama s udjelom vlage manjim od 50 %, vlaga pridonosi smanjenju intermolekulskih interakcija zbog rasipanja triboelektričnog naboja što dovodi do boljih svojstava tečenja (Hadjittofis i sur., 2017). Mikrosfere s većim udjelom prednizolona sadrže veći udio vlage koji pridonosi tome efektu (Tablica 9.). Dodatno, veće čestice imaju bolja svojstva tečenja zbog smanjene kohezivnosti (Schlick-Hasper i sur., 2022). Udio čestica većih od 10 μm veći je u uzorcima s većim udjelom prednizolona (Tablica 8.).

Costabile i suradnici (2016) razvili su mikrosfere manitola i hijaluronske kiseline. Veličina čestica u različitim formulacijama iznosila je približno 20 μm , a vrijednosti nasipne gustoće bile su vrlo male, iznosile su od 0,045 do 0,1 g/ml. Najmanja nasipna gustoća izmjerena je za prašak samog natrijevog hijaluronata, koji je pokazao i loša svojstva aerosolizacije (samo 22,2 % doze praška dostavljeno iz uređaja nakon simulacije udaha). Dodatkom manitola u sustav, nasipna gustoća je rasla te su postignuta izvrsna svojstva aerosolizacije (do 100 % dostavljene doze), čime je potvrđen odabir manitola kao tvari za poboljšanje svojstava tečenja čestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem.

Tablica 11. Vrijednosti Hausnerovog omjera za pripravljene mikrosfere. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD. ($n=3$)

Udio prednizolona u početnoj otopini* (%)	Hausnerov omjer
0,05	1,889 \pm 0,192
0,075	1,848 \pm 0,156
0,1	1,748 \pm 0,091
0,15	1,553 \pm 0,129

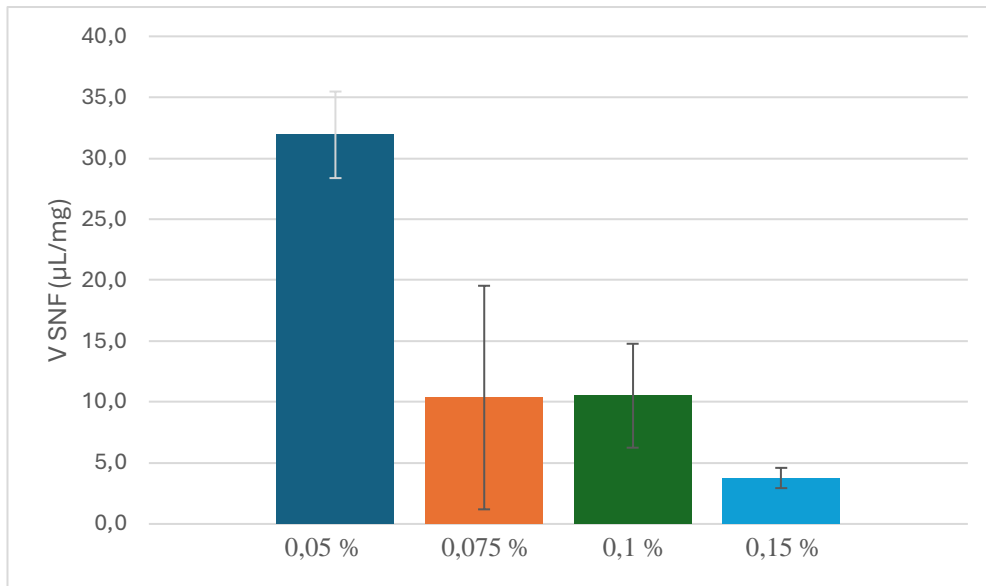
*Sve sušene otopine sadržavale su i manitol (6 %, *m/m*) te natrijev hijaluronat (0,05 %, *m/m*).

4.9. SVOJSTVA BUBRENJA MIKROSFERA

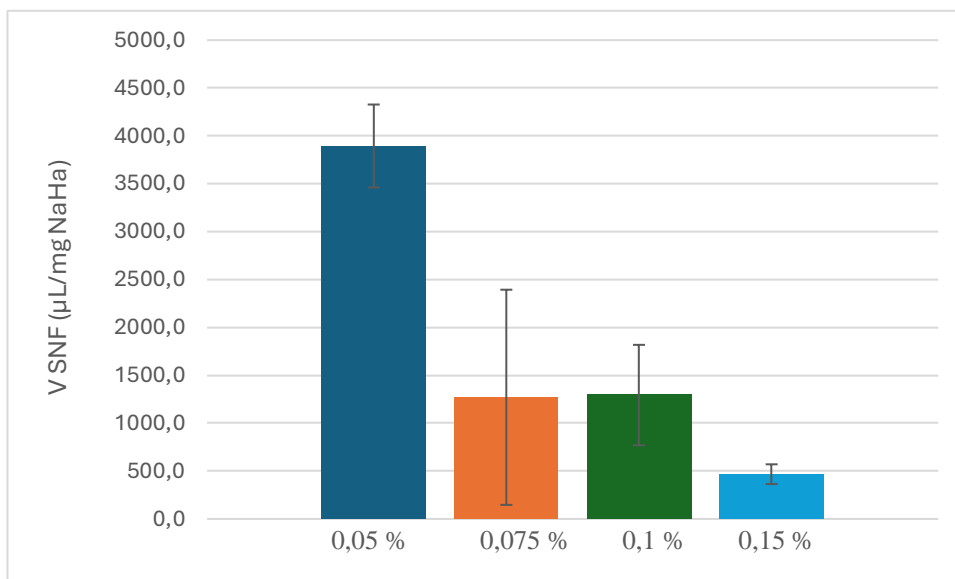
Stupanj bubrenja definira se kao volumen tekućine koju apsorbira jedinična masa čvrste tvari (Nižić Nodilo i sur., 2021). Bubrenje hijaluronsko-manitolskih mikrosfera određeno je koristeći Franzovu difuzijsku ćeliju u 15-minutnom intervalu, a rezultati su izraženi kao volumen apsorbiranog SNF-a po miligramu mikrosfera (Slika 9.) te kao volumen apsorbiranog SNF-a po miligramu natrijevog hijaluronata u mikrosferama (Slika 10.). Optimalno bubrenje mikrosfera u kontaktu s nazalnom sluznicom potrebno je za mukoadheziju mikrosfera, produljeno vrijeme zadržavanja i kontrolirano oslobađanje lijeka iz formulacije. Posljedična dehidracija epitelnih stanica nosne sluznice zbog navlačenja vode u procesu bubrenja mikrosfera dovodi do povećane bioraspoloživosti nekih lijekova. Prekomjerno bubrenje mikrosfera može smanjiti adheziju molekula zbog povećane skliskosti sluzi, dok u pacijenta može izazvati oštećenje sluznice i osjećaj nelagode (Nižić Nodilo i sur., 2021).

Struktura polimerne mreže i naboj pojedinih skupina u molekuli utječu na sposobnost apsorpcije vode. Nabijene skupine u nekim polimerima omogućavaju stvaranje kemijske veze s mukoznim slojem, kao na primjer kitozan koji zbog svog pozitivnog naboja potiče adheziju mikrosfera vezanjem za negativno nabijene lance mucina na sluznici. Natrijev hijaluronat sadrži velik broj hidroksilnih i karboksilnih skupina koje stvaranjem vodikovih veza osiguravaju mukoadhezivnost (Lim i sur., 2000).

Mikrosfere s većim udjelom prednizolona pokazuju smanjeni kapacitet bubrenja u SNF-u. To može biti posljedica smanjene količine natrijevog hijaluronata kao polimera koji bubri u mikrosferama zbog povećanog udjela prednizolona.



Slika 9. Bubrenje mikrosfera izraženo kao volumen apsorbiranog SNF-a po miligramu mikrosfera u 15-minutnom procesu bubrenja. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD ($n=3$).



Slika 10. Bubrenje mikrosfera izraženo kao volumen apsorbiranog SNF-a po miligramu natrijevog hijaluronata u mikrosferama u 15-minutnom procesu bubrenja. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD ($n=3$).

5. ZAKLJUČCI

- Reološkom karakterizacijom utvrđeno je da se vodene otopine natrijevog hijaluronata, manitola i prednizolona ponašaju kao pseudoplastični sustavi. Dodatak prednizolona u vodenu otopinu manitola i natrijevog hijaluronata smanjuje viskoznost sustava.
- Hijaluronsko-manitolske mikrosfere s uklopljenim prednizolonom uspješno su pripravljene sušenjem raspršivanjem vodenih otopina manitola (6 %, *m/m*), natrijevog hijaluronata (0,05 %, *m/m*) i prednizolona (0,05 %-0,15 %, *m/m*).
- Iskorištenje sušenja raspršivanjem iznosilo je od 54,96 % do 42,65 %.
- Sadržaj prednizolona u pripremljenim mikrosferama iznosio je od 0,69 % do 2,37 % te je postignuta visoka uspješnost uklapanja (84,68 % - 98,79 %).
- Udio čestica manjih od 10 μm bio je između $4,2 \pm 0,3$ % i $19,7 \pm 0,2$ %. Izmjeren je znatno manji udio čestica promjera manjeg od 10 μm kod uzoraka s 0,10 i 0,15 % prednizolona u otopini za sušenje u usporedbi s uzorcima s manjom koncentracijom prednizolona (0,05 % i 0,075 %; *m/m*).
- Udio vlage u praškastim uzorcima povećavao se s povećanjem udjela prednizolona te je iznosio od 1,64 % do 2,55 % (*m/m*).
- Vrijednosti zeta potencijala bile su u rasponu od $-9,3 \pm 0,6$ do $-15,1 \pm 1,4$ mV. Veće vrijednosti zeta potencijala uočene su pri koncentracijama prednizolona u otopini za sušenje $\geq 0,075$ % (*m/m*).
- Hausnerov omjer iznosio je između $1,553 \pm 0,129$ i $1,889 \pm 0,192$, a smanjio se povećanjem udjela prednizolona u mikrosferama.
- Pri bubrenju mikrosfera u SNF-u mikrosfere s većim udjelom prednizolona pokazuju smanjeni kapacitet bubrenja.

6. LITERATURA

Ameri M, Maa YF. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. *Drying Technol.*, 2006, 24, 763–8.

Anandharamakrishnan C, Ishwarya, PS. Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation. Chichester, John Willey & Sons, Ltd, 2015, str. 1-32.

Athamneh T, Amin A, Benke E, Ambrus R, Leopold CS, Gurikov P, Smirnova I. Alginate and hybrid alginate-hyaluronic acid aerogel microspheres as potential carrier for pulmonary drug delivery. *J. Supercrit. Fluids*, 2019, 150, 49–55

Badia L, Lund V. Topical Corticosteroids in Nasal Polyposis: *Drugs*, 2001, 61, 573–578.

Brunton LL, Knollmann BC, Hilal-Dandan R (Urednici). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, Thirteenth edition. New York, McGraw Hill Medical, 2018.

Cave A, Arlett P, Lee E. 1999. Inhaled and nasal corticosteroids: Factors affecting the risks of systemic adverse effects. *Pharmacology & Therapeutics*, 1999, 83, 153–179.

Choudhary D, Goykar H, Kalyane D, Sreeharsha N, Tekade RK. Prodrug design for improving the biopharmaceutical properties of therapeutic drugs, in: The Future of Pharmaceutical Product Development and Research. *Elsevier*, 2020, str. 179–226.

Costabile G, d'Angelo I, d'Emmanuele Di Villa Bianca R, Mitidieri E, Pompili B, Del Porto P, Leoni L, Visca P, Miro A, Quaglia F, Imperi F, Sorrentino R, Ungaro F. Development of inhalable hyaluronan/mannitol composite dry powders for flucytosine repositioning in local therapy of lung infections. *J. Controlled Release*, 2016, 238, 80–91.

del Toro E, Portela J, 2024. Nasal Polyps, U: StatPearls. *StatPearls Publishing*, 2024.

Demoly P. Safety of intranasal corticosteroids in acute rhinosinusitis. *Am. J. Otolaryngol.*, 2008, 29, 403–413

Derrien K, Gilormini P. The effect of moisture-induced swelling on the absorption capacity of transversely isotropic elastic polymer–matrix composites. *Int. J. Solids Struct.*, 2009, 46, 1547–1553.

European Medicines Agency: PSUSA/00002506/202308 - periodic safety update report single assessment, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/psusa/psusa-00002506-202308> , svibanj, 2024.

Fernandes S, McKay G. Prednisolone. *Practical Diabetes*, 2013, 30, 251–252a.

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

Frey BM, Seeberger M, Frey FJ. PHARMACOKINETICS OF 3 PREDNISOLONE PRODRUGS: Evidence of Therapeutic Inequivalence in Renal Transplant Patients with Rejection. *Transplantation*, 1985, 39, 270.

Gizurarson S. The relevance of nasal physiology to the design of drug absorption studies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1993, 11, 329–347.

Hadjittofis E, Das SC, Zhang GGZ, Heng JYY. Poglavlje 8 - Interfacial Phenomena, U: *Developing Solid Oral Dosage Forms (Drugo izdanje)*. Qiu Y, Chen Y, Zhang Geoff G Z, Yu L, Mantri RV, urednici, Boston, Academic Press, 2017, str. 225–252.

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

Horvát S, Fehér A, Wolburg H, Sipos P, Veszeka S, Tóth A, Kis L, Kurunczi A, Balogh G, Kürti L, Erős I, Szabó-Révész P, Deli MA. Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009, 72, 252–259.

Joergensen L, Klösigen B, Simonsen AC, Borch J, Hagesaether E. New insights into the mucoadhesion of pectins by AFM roughness parameters in combination with SPR. *Int. J. Pharm.*, 2011, 411, 162–8.

Jug M, Bećirević-Laćan M. Development of a Cyclodextrin-Based Nasal Delivery System for Lorazepam. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2008, 34, 817–26.

Jüptner A, Scherließ R. Spray Dried Formulations for Inhalation—Meaningful Characterisation of Powder Properties. *Pharmaceutics*, 2019, 12, 14.

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

Kassem MA, ElMeshad AN, Fares AR. Lyophilized sustained release mucoadhesive chitosan sponges for buccal bupirone hydrochloride delivery: Formulation and in vitro evaluation. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2014, 6, 1–11

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic and clinical pharmacology. New York, The McGraw-Hill, 2009, str. 683-686.

Khair RA, Gogate PR. Novel approaches based on ultrasound for spray drying of food and bioactive compounds. *Drying Technology*, 2021, 39, 1832–1853.

Lee D, Minko T. Nanotherapeutics for Nose-to-Brain Drug Delivery: An Approach to Bypass the Blood Brain Barrier. *Pharmaceutics* 2021;13(12):2049.

Liang J, Strong EB. Examining the safety of prednisolone acetate 1% nasal spray for treatment of nasal polyposis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2012, 2, 126–9.

Liao Y-H, Jones SA, Forbes B, Martin GP, Brown MB. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. *Drug Delivery*, 2005, 12, 327–342.

Lim ST, Martin GP, Berry DJ, Brown MB. Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. *J Control Release*, 2000, 66, 281–92.

Lin Y-J, Horner J, Illie B, Lynch ML, Furst EM, Wagner NJ. Molecular engineering of thixotropic, sprayable fluids with yield stress using associating polysaccharides. *J. Colloid Interface Sci.*, 2020, 580, 264–274.

Littringer EM, Mescher A, Eckhard S, Schröttner H, Langes C, Fries M, Griesser U, Walzel P, Urbanetz NA. Spray Drying of Mannitol as a Drug Carrier—The Impact of Process Parameters on Product Properties. *Drying Technol.*, 2012, 30, 114–124.

Liu T, Han M, Tian F, Cun D, Rantanen J, Yang M. Budesonide nanocrystal-loaded hyaluronic acid microparticles for inhalation: In vitro and in vivo evaluation. *Carbohydr. Polym.* 2018, 81, 1143–52.

M A, Gogate PR. Improved synthesis of metformin hydrochloride-sodium alginate (MH-NaALG) microspheres using ultrasonic spray drying. *Heliyon*, 2024, 10, e28205.

Malkin AY, Isayev AI. LIQUIDS. U: Rheology Concepts, Methods, and Applications. Editor(s): Alexander Ya.M, Isayev AI, urednici, Elsevier, 2012, str. 127–221.

Martinac A, Filipović-Grčić J, Voinovich D, Perissutti B, Franceschinis E. Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *Int. J. Pharm.*, 2005, 291, 69–77.

Martinelli F, Balducci AG, Kumar A, Sonvico F, Forbes B, Bettini R, Buttini F. Engineered sodium hyaluronate respirable dry powders for pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 2017, 517, 286–295.

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

O’Sullivan JJ, Norwood EA, O’Mahony JA, Kelly AL. Atomisation technologies used in spray drying in the dairy industry: A review. *J. Food Eng.*, 2019,243, 57– 69.

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.

Patel BB, Patel JK, Chakraborty S, Shukla D. Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. *Saudi Pharm. J.*, 2015, 4, 352–65.

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. *International Journal of Pharmaceutics*, 2022, 624, 122038.

Porfirio T, Galindo-Rosales FJ, Campo-Deaño L, Vicente J, Semião V. Rheological characterization of polymeric solutions used in spray drying process. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2021, 158, 105650.

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.

Rathanan M., Kumar DS, Shirwaikar A, Kumar R, Kumar DS, Prasad RS. Preparation of mucoadhesive microspheres for nasal delivery by spray drying. *Indian J. Pharm. Sci.*, 2007, 69, 651.

Sandler N, Reiche K, Heinämäki J, Yliruusi J. Effect of Moisture on Powder Flow Properties of Theophylline. *Pharmaceutics*, 2010, 2, 275–290.

Santos D, Maurício AC, Sencadas V, Santos JD, Fernandes MH, Gomes PS. Spray Drying: An Overview. U: Biomaterials - Physics and Chemistry - New Edition. *IntechOpen*, 2018.

Sarisozen C, Arica B, Orman MN, Hincal AA, Calis S. Optimization of prednisolone acetate-loaded chitosan microspheres using a 2³ factorial design for preventing restenosis. *Drug Deliv.*, 2010, 17, 178–86.

Sažetak opisa svojstava lijekova, <http://www.halmed.hr>: Alpicort, Alpicort F, Ultracortenol, Decortin, Mometazonfuroat Cipla

Scherließ, R. Exploring the potential of mannitol as an alternative to lactose in dry powder inhalation. *Inhalation*, 2016.

Schlick-Hasper E, Bethke J, Vogler N, Goedecke T. Flow properties of powdery or granular filling substances of dangerous goods packagings—Comparison of the measurement of the angle of repose and the determination of the Hausner ratio. *Packag. Technol. Sci.*, 2022, 35, 765–782.

Sebbag L, Kirner NS, Wulf LW, Mochel JP. Tear Film Pharmacokinetics and Systemic Absorption Following Topical Administration of 1% Prednisolone Acetate Ophthalmic Suspension in Dogs. *Front Vet Sci*, 2020, 7, 571350.

Seidman MD, Gurgel RK, Lin SY, Schwartz SR, Barody FM, Bonner JR, Dawson DE, Dykewicz MS, Hackell JM, Han JK, Ishman SL, Krouse HJ, Malekzadeh S, Mims JW, Omole FS, Reddy WD, Wallace DV, Walsh SA, Warren BE, Wilson MN, Nnacheta LC, Clinical Practice Guideline: Allergic Rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015, 152, 1–43.

Shahin HI, Vinjamuri BP, Mahmoud AA, Shamma RN, Mansour SM, Ammar HO, Ghorab MM, Chougule MB, Chablani L. Design and evaluation of novel inhalable sildenafil citrate spray-dried microparticles for pulmonary arterial hypertension. *J. of Controlled Release*, 302, 126–139.

Sosnik A, Seremeta KP. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2015, 223, 40–54.

Spray-Drying Basic theory & applications, Buchi.com.
<https://www.buchi.com/en/knowledge/applications/spray-drying-basictheory-applications>,
svibanj 2024.

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

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.

Vicente J, Pinto J, Menezes J, Gaspar F. Fundamental analysis of particle formation in spray drying. *Powder Technol.* 2013, 247, 1–7.

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*, 2018, 127, 300-318.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Nazalna primjena kortikosteroida uobičajena je u ublažavanju simptoma upalnih bolesti nosne sluznice poput rinitisa, rinosinitisa i nosnih polipa. Lokalnom primjenom kortikosteroida smanjuje se rizik od nuspojava, osigurava se brži nastup djelovanja i precizno doziranje. Trenutno registrirani oblici nazalnih kortikosteroida su otopine i suspenzije koje se nakon primjene kratko zadržavaju na mjestu djelovanja. Razvojem praškastih farmaceutskih oblika osigurava se dulje zadržavanje i veća koncentracija lijeka na mjestu primjene.

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti hijaluronsko-manitolske mikrosfere s uklopljenim prednizolonfosfatom. Mikrosfere su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem. Određivanjem fizičko-kemijskih svojstava mikrosfera ispitan je utjecaj masenog udjela prednizolonfosfata na svojstva mikrosfera. Ispitana su reološka svojstva otopina koje su sadržavale različiti udio natrijevog hijaluronata (0,05 %-0,5 %, *m/m*) i konstantan udio prednizolona (0,1 %, *m/m*) i manitola (6 %, *m/m*).

Iz početnih otopine koje su sadržavale konstantan udio natrijevog hijaluronata (0,05 %, *m/m*) i manitola (6 %, *m/m*) te udio prednizolona od 0,05 % do 0,15 % (*m/m*) uspješno su pripravljene mikrosfere metodom sušenja raspršivanjem. Iskorištenje procesa smanjivalo se povećanjem udjela prednizolona u mikrosferama od 54,96 % do 42,65 %. Uspješnost uklapanja prednizolona iznosila je od 84,68 % do 98,79 %, dok je sadržaj prednizolona u ukupnoj masi mikrosfera iznosio od 0,69 % do 2,37 %. Udio čestica manjih od 10 μm iznosio je od $4,2 \pm 0,3$ % do $19,7 \pm 0,2$ %. Udio vlage u praškastim uzorcima povećavao se s povećanjem udjela prednizolona od 1,64 % do 2,55 % (*m/m*). Vrijednosti zeta potencijala iznosile su se od $-9,3 \pm 0,6$ do $-15,1 \pm 1,4$ mV. Hausnerov omjer određivan je za usporedbu svojstva tečenja mikrosfera te je uočeno da se povećanjem udjela prednizolona Hausnerov omjer smanjuje. Iznosio je od $1,553 \pm 0,129$ do $1,889 \pm 0,192$. U procesu bubrenja u SNF-u mikrosfere s većim udjelom prednizolona pokazuju smanjeni kapacitet bubrenja. Reološkom karakterizacijom otopina natrijevog hijaluronata, manitola i prednizolona utvrđeno je da se uzorci ponašaju kao pseudoplastični sustavi. Dodatak 0,1 % (*m/m*) prednizolona u otopinu s 0,5 % (*m/m*) natrijevog hijaluronata i 6 % (*m/m*) manitola smanjuje viskoznost otopine.

Nasal administration of corticosteroids is common in reducing symptoms of inflammatory diseases of the nasal mucosa like rhinitis, rhinosinusitis and nasal polyps. Local application of corticosteroids reduces the risk of side effects, ensures faster onset of action and precise dosing. Currently registered forms of nasal corticosteroids are solutions and suspensions that exhibit short retention time at the site of action. The development of powder pharmaceutical forms ensures longer retention and a higher concentration of the drug at the site of application.

The aim of this study was to prepare hyaluronate and mannitol-based microspheres with incorporated prednisolone phosphate. The microspheres were prepared using the spray drying method. The influence of the prednisolone phosphate content on the characteristics of the microspheres was examined by determining their physicochemical properties. The rheological properties were also examined for solutions containing a variable concentration of sodium hyaluronate (0.05 % - 0.05 %, w/w) along with a constant prednisolone (0.1 %, w/w) and mannitol (6 %, w/w) concentration.

Microspheres were successfully prepared by the spray drying method from the feed solutions containing a sodium hyaluronate (0.05 %, w/w), mannitol (6 %, w/w), and prednisolone (0.05 to 0.15 %, w/w). The process yield decreased with increasing prednisolone content from 54.96 % to 42.65 %. Drug entrapment efficiency ranged from 84.68 % to 98.79 %, while the microspheres drug loading varied from 0.69 % to 2.37 %. The fraction of particles smaller than 10 μm was ranging from 4.2 ± 0.3 % to 19.7 ± 0.2 %. The moisture content in the powdered samples slightly increased from 1.64 % to 2.55 % (w/w) with the increase in prednisolone content. Zeta potential values ranged from -9.3 ± 0.6 mV to -15.1 ± 1.4 mV. The Hausner ratio was determined to compare the flow properties of the microspheres and it was observed that the Hausner ratio decreased with increasing prednisolone content. It ranged from 1.553 ± 0.129 to 1.889 ± 0.192 . In the swelling process in SNF, microspheres with higher prednisolone content showed reduced swelling capacity. Rheological characterization of sodium hyaluronate, mannitol, and prednisolone solutions showed that the samples behave as pseudoplastic systems. The addition of 0.1 % (w/w) prednisolone to a solution with 0.5 % (w/w) sodium hyaluronate and 6 % (w/w) mannitol reduces the viscosity of the solution.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Hijaluronsko-manitolske mikrosfere za nazalnu primjenu prednizolona

Erika Križanić

SAŽETAK

Nazalna primjena kortikosteroida uobičajena je u ublažavanju simptoma upalnih bolesti nosne sluznice poput rinitisa, rinosinitisa i nosnih polipa. Lokalnom primjenom kortikosteroida smanjuje se rizik od nuspojava, osigurava se brži nastup djelovanja i precizno doziranje. Trenutno registrirani oblici nazalnih kortikosteroida su otopine i suspenzije koje se nakon primjene kratko zadržavaju na mjestu djelovanja. Razvojem praškastih farmaceutskih oblika osigurava se dulje zadržavanje i veća koncentracija lijeka na mjestu primjene.

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti manitolsko-hijaluronske mikrosfere s uklopljenim prednizolonfosfatom. Mikrosfere su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem. Određivanjem fizičko-kemijskih svojstava mikrosfera ispitan je utjecaj masenog udjela prednizolonfosfata na svojstva mikrosfera. Ispitana su reološka svojstva otopina koje su sadržavale različiti udio natrijevog hijaluronata (0,05 %-0,5 %, *m/m*) i konstantan udio prednizolona (0,1 %, *m/m*) i manitola (6 %, *m/m*).

Iz početnih otopine koje su sadržavale konstantan udio natrijevog hijaluronata (0,05 %, *m/m*) i manitola (6 %, *m/m*) te udio prednizolona od 0,05 % do 0,15 % (*m/m*) uspješno su pripravljene mikrosfere metodom sušenja raspršivanjem. Iskorištenje procesa smanjivalo se povećanjem udjela prednizolona u mikrosferama od 54,96 % do 42,65 %. Uspješnost uklapanja prednizolona iznosila je od 84,68 % do 98,79 %, dok je sadržaj prednizolona u ukupnoj masi mikrosfera iznosio od 0,69 % do 2,37 %. Udio čestica manjih od 10 μm , iznosio je od $4,2 \pm 0,3$ % do $19,7 \pm 0,2$ %. Udio vlage u praškastim uzorcima povećavao se s povećanjem udjela prednizolona od 1,64 % do 2,55 % (*m/m*). Vrijednosti zeta potencijala iznosile su se od $-9,3 \pm 0,6$ do $-15,1 \pm 1,4$ mV. Hausnerov omjer određivan je za usporedbu svojstva tečenja mikrosfera te je uočeno da se povećanjem udjela prednizolona Hausnerov omjer smanjuje. Iznosio je od $1,553 \pm 0,129$ do $1,889 \pm 0,192$. U procesu bubrenja u SNF-u mikrosfere s većim udjelom prednizolona pokazuju smanjeni kapacitet bubrenja. Reološkom karakterizacijom otopina natrijevog hijaluronata, manitola i prednizolona utvrđeno je da se uzorci ponašaju kao pseudoplastični sustavi. Dodatak 0,1 % (*m/m*) prednizolona u otopinu s 0,5 % (*m/m*) natrijevog hijaluronata i 6 % (*m/m*) manitola smanjuje viskoznost otopine.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 10 grafičkih prikaza, 11 tablica i 52 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Prednizolonfosfat; Natrijev hijaluronat; Manitol; Mikrosfere; Sušenje raspršivanjem; Nazalna primjena

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

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

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

Dr. sc. Andrea Čeri, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of pharmaceutical technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Hyaluronate/mannitol microspheres for nasal prednisolone delivery

Erika Križanić

SUMMARY

Nasal administration of corticosteroids is common in reducing symptoms of inflammatory diseases of the nasal mucosa like rhinitis, rhinosinusitis and nasal polyps. Local application of corticosteroids reduces the risk of side effects, ensures faster onset of action and precise dosing. Currently registered forms of nasal corticosteroids are solutions and suspensions that exhibit short retention time at the site of action. The development of powder pharmaceutical forms ensures longer retention and a higher concentration of the drug at the site of application.

The aim of this study was to prepare hyaluronate and mannitol-based microspheres with incorporated prednisolone phosphate. The microspheres were prepared using the spray drying method. The influence of the prednisolone phosphate content on the characteristics of the microspheres was examined by determining their physicochemical properties. The rheological properties were also examined for solutions containing a variable concentration of sodium hyaluronate (0.05 % - 0.05 %, w/w) along with a constant prednisolone (0.1 %, w/w) and mannitol (6 %, w/w) concentration.

Microspheres were successfully prepared by the spray drying method from the feed solutions containing a sodium hyaluronate (0.05 %, w/w), mannitol (6 %, w/w), and prednisolone (0.05 to 0.15 %, w/w). The process yield decreased with increasing prednisolone content from 54.96 % to 42.65 %. Drug entrapment efficiency ranged from 84.68 % to 98.79 %, while the microspheres drug loading varied from 0.69 % to 2.37 %. The fraction of particles smaller than 10 μm was ranging from 4.2 ± 0.3 % to 19.7 ± 0.2 %. The moisture content in the powdered samples slightly increased from 1.64 % to 2.55 % (w/w) with the increase in prednisolone content. Zeta potential values ranged from -9.3 ± 0.6 mV to -15.1 ± 1.4 mV. The Hausner ratio was determined to compare the flow properties of the microspheres and it was observed that the Hausner ratio decreased with increasing prednisolone content. It ranged from 1.553 ± 0.129 to 1.889 ± 0.192 . In the swelling process in SNF, microspheres with higher prednisolone content showed reduced swelling capacity. Rheological characterization of sodium hyaluronate, mannitol, and prednisolone solutions showed that the samples behave as pseudoplastic systems. The addition of 0.1 % (w/w) prednisolone to a solution with 0.5 % (w/w) sodium hyaluronate and 6 % (w/w) mannitol reduces the viscosity of the solution.

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

Thesis includes: 40 pages, 10 figures, 11 tables and 52 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Prednisolone phosphate; Sodium hyaluronate; Mannitol; Microspheres; Spray drying; Nasal delivery

Mentor: **Laura Nižić Nodilo, Ph.D.** Senior assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Laura Nižić Nodilo, Ph.D.** Senior assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

Andrea Čeri, Ph.D. Senior assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2024.