

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko – biokemijski fakultet

Maja Brozović i Ante Mrše

**Nazalna depozicija *in situ* gelirajućih suspenzija
flutikazonpropionata pri dvosmjernoj dostavi *in vitro***

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko–biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Anite Hafner i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019. Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-4592.

Sadržaj

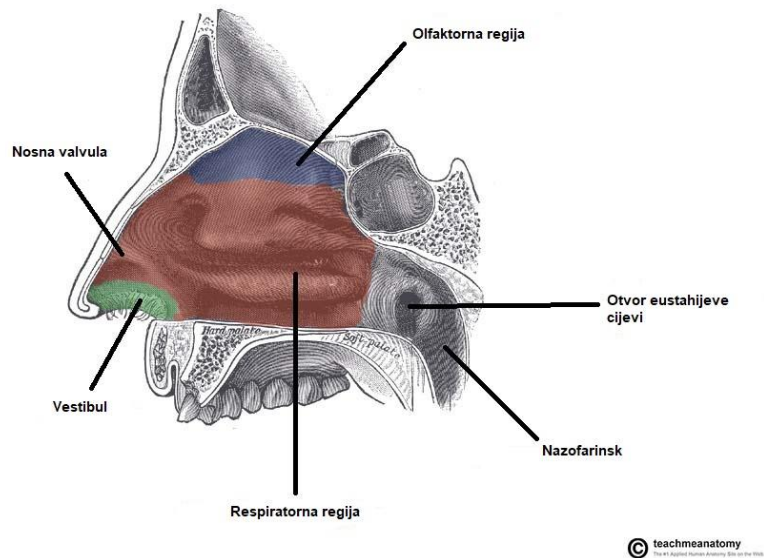
1.	Uvod	1
1.1	Nazalna primjena lijekova	1
1.1.1	Prednosti, problemi i specifičnosti nazalne primjene	2
1.1.2	Mogućnosti nazalne primjene lijekova i depozicija u nosnoj šupljini	3
1.2	<i>In situ</i> gelirajući sustavi	6
1.2.1	Mehanizmi geliranja <i>in situ</i> gelirajućih sustava	6
1.2.2	Polimeri u <i>in situ</i> gelirajućim sustavima.....	8
1.2.3	Reološka svojstva.....	14
1.3	Flutikazon	16
2.	Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada	18
3.	Eksperimentalni dio	21
3.1	Materijali	21
3.2	Metode	21
3.2.1	Priprava <i>in situ</i> gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom.....	21
3.2.2	Određivanje veličine suspendiranih čestica flutikazonpropionata	22
3.2.3	Određivanje raspodjele veličina raspršenih kapljica	22
3.2.4	Određivanje kuta raspršenja <i>in situ</i> gelirajućih sustava	22
3.2.5	Reološka karakterizacija	23
	3.2.5.1 Određivanje vremena geliranja.....	23
	3.2.5.2 Određivanje viskoznosti u mirovanju.....	24
	3.2.5.3 Određivanje krivulje viskoznosti i graničnog smičnog naprezanja.....	24
	3.2.5.4 Test promjene frekvencije.....	24
3.2.6	Određivanje profila nazalne depozicije <i>in situ</i> gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom.....	25
4.	Rezultati	27
4.1	Osnovna svojstva <i>in situ</i> gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom	27
4.2.	Raspodjela veličina kapljica i kut raspršenja <i>in situ</i> gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom.....	27
4.3	Reološka svojstva <i>in situ</i> gelirajućih sustava prije i nakon geliranja	29
4.3.1	Određivanje viskoznosti u mirovanju	29
4.3.2	Vrijeme geliranja i čvrstoća gelova.....	30
4.3.3	Krivulje viskoznosti prije i nakon geliranja	32
4.4	Nazalna depozicija <i>in situ</i> gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom.....	34

5. Rasprava.....	41
5.1 Priprava <i>in situ</i> gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom	41
5.2 Reološka svojstva <i>in situ</i> gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom	42
5.3 Raspodjela veličina kapljica i kut raspršenja <i>in situ</i> gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom.....	42
5.4 Vrijeme geliranja <i>in situ</i> gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom	43
5.5 Reološka svojstva formiranog gela.....	44
5.6 Profil depozicije u nosnoj šupljini	45
6. Zaključci.....	49
7. Zahvale.....	50
8. Literatura.....	51
9. Sažetak	57
10. Summary	58

1. Uvod

1.1 Nazalna primjena lijekova

Nos predstavlja početni dio našeg respiratornog sustava. Osim što ima vrlo bitnu ulogu u disanju, obavlja i druge važne funkcije poput olfaktorne, zaštitne i rezonantne funkcije. S ciljem zaštite donjih dišnih putova nos filtrira, vlaži i grije udahnuti zrak. Anatomske ga možemo podijeliti na unutarnji i vanjski nos koje odvaja suženje koje se naziva nosna valvula. I unutarnji i vanjski nos podijeljeni su središnjom pregradom ili septumom [1], [2]. Vanjski nos građen je od nosne hrskavice i nosnica koje su s unutarnje strane omeđene vestibulom [3]. Unutarnji nos, bitan za nazalnu primjenu lijekova, naziva se još i nosna šupljina. Nosna šupljina obložena je nosnom sluznicom i omeđena je, osim septumom, trima nosnim školjkama koje se definiraju kao lobusi/izbočine u nosnu šupljinu. Razlikujemo olfaktornu sluznicu koja prekriva olfaktorno područje nosne šupljine male površine (5-6 cm²), i respiratornu sluznicu koja prekriva respiratorno područje nosne šupljine, površine od oko 130 cm². Nosna je sluznica dobro prokrvljena što je čini prikladnim mjestom primjene lijekova s ciljem postizanja sistemske raspoloživosti. U različitim područjima nosne šupljine sluznica je različito prokrvljena i inervirana. Najveća je prokrvljenost olfaktornog područja (Slika 1.). Smatra se da je u toj regiji prokrvljenost veća nego u mišićima, mozgu i jetri [4]. Usto, depozicijom lijeka u olfaktornom području moguće je osigurati direktnu dostavu nazalno primijenjenog lijeka u središnji živčani sustav zaobilazeći krvno-moždanu barijeru. Sakane i suradnici su u *in vivo* ispitivanju na animalnom modelu uspoređivali raspoloživost 5-fluorouracila u mozgu nakon nazalne primjene (olfaktorna sluznica) i nakon intravenske primjene [5]. Utvrđeno je da je koncentracija lijeka u mozgu nakon nazalne primjene bila veća od koncentracije lijeka u mozgu nakon intravenske primjene. Takvi rezultati svjedoče o velikom terapijskom potencijalu liječenja neuroloških oboljenja dostavom lijekova u olfaktorno područje nosne šupljine. No, uz veliki terapijski potencijal, potrebno je navesti i tešku dostupnost olfaktornog područja.



Slika 1. Anatomija nosa (preuzeto s [6])

1.1.1 Prednosti, problemi i specifičnosti nazalne primjene

Nazalna primjena predstavlja atraktivan put i prvi izbor u liječenju oboljenja sluznice nosa, ali isto tako i vrlo interesantan alternativni put sistemske dostave lijeka, i to zahvaljujući relativno velikoj površini, dobroj prokrvljenosti i permeabilnosti te niskoj enzimskoj aktivnosti nosne sluznice. Usto, valja istaknuti i mogućnost direktne dostave nazalno primijenjenog lijeka u središnji živčani sustav putem olfaktorne regije i olfaktornog živca koji je jedini izravno izložen vanjskoj okolini. Prednosti nazalne primjene pri sistemske dostavi lijekova u odnosu na oralnu primjenu su brza apsorpcija te velika bioraspoloživost, dijelom zbog zaobilaska metabolizma lijeka prvim prolaskom kroz jetru. Nadalje, zaobilaskom probavnog sustava izbjegnute su i nuspojave koje bi ljekoviti oblik mogao izazvati u toj okolini. Također, nazalnom primjenom lijeka može se olakšati farmakoterapija u gerijatrijskoj i pedijatrijskoj populaciji izbjegavanjem gutanja koje u tim dobnim skupinama može predstavljati problem. Nazalna primjena lijeka pogodna je i za osobe koje pate od mučnine, povraćanja, te poremećaja probavnog sustava koji bi mogli utjecati na apsorpciju lijeka. Prednost nazalne primjene nad parenteralnom je ta što je nazalna primjena lijeka neinvazivna i bezbolna te omogućava samoliječenje/izvanbolničko liječenje – bez pomoći zdravstvenog osoblja [2], [7]–[9].

Uz sve prednosti nazalne primjene, valja naglasiti i zahtjevnost izrade efikasnog medicinskog proizvoda koji će ih dobro iskoristiti. Glavna prepreka pri nazalnoj primjeni lijeka je nosna valvula koja je najuži dio nosne šupljine i predstavlja granicu koja fizički odvaja

unutarnji od vanjskog nosa. Nalazi se oko 2 cm od ulaza u nosnicu i funkcija joj je da pri udisaju filtrira udahnuti zrak, čime štiti donje dišne putove od vanjskih štetnih utjecaja, a pri izdisaju zadržava vlažnost u nosnoj šupljini. Takvom geometrijom nosne valvule, koja služi kao zaštita respiratornog sustava, otežano je dospijevanje ljekovitog oblika dublje u unutrašnjost nosne šupljine, s obzirom da većina lijeka zaostaje na stjenkama nosnog vestibula ili septuma vanjskog nosa. Svakako je cilj dostaviti što veći dio primijenjene doze iza nosne valvule u respiratorno područje. Zanimljivo je i već spomenuto ciljanje olfaktorne regije, s obzirom na potencijal ovog područja za izravnu dostavu lijeka u središnji živčani sustav, odnosno mozak (engl. *nose-to-brain delivery*) [9]–[12].

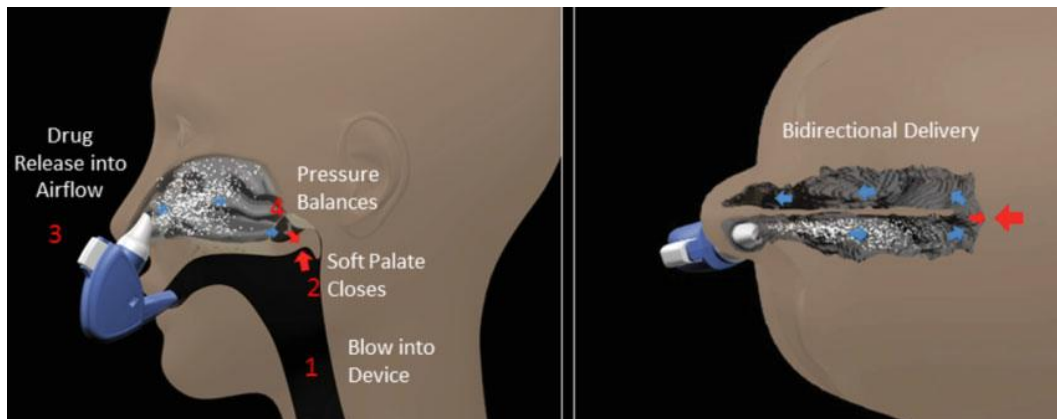
Problem također predstavlja curenje ljekovitog oblika iz nosa i refleksno „šmrcanje“ koje dodatno sužava nosnu valvulu i unutarnje nosne putove. Nadalje, refleksno „šmrcanje“ i nakupljanje ljekovitog oblika na dnu nosne šupljine dovode do curenja lijeka u nazofarinks što uzrokuje neugodan okus uslijed doticaja lijeka s okusnim pupoljcima na stražnjem dijelu jezika. Usto, lijek pristiže u probavni sustav gdje se i apsorbira. Takva distribucija lijeka opisana je kod sumatriptana koji bimodalnim apsorpcijskim profilom pokazuje prvo niži pik koji se javlja kroz 20 minuta i predstavlja brzu nazalnu apsorpciju, te drugi, viši pik apsorpcije koji se javlja nakon 90 minuta i predstavlja apsorpciju (progutanog lijeka) putem probavnog sustava [7].

Svi navedeni problemi povezani su s jednosmjernom primjenom lijeka (engl. *unilamellar delivery*). Takva primjena lijeka podrazumijeva jednostavno raspršivanje/ukapavanje ljekovitog oblika u nosnicu. S ciljem nadilaženja navedenih nedostataka i poboljšanja nazalne dostave lijekova, ispituju se alternativni načini dostave lijeka u nosnu šupljinu te razni inovativni sustavi koji bi produljili vrijeme zadržavanja na nosnoj sluznici [9], [12], [13].

1.1.2 Mogućnosti nazalne primjene lijekova i depozicija u nosnoj šupljini

U potrazi za boljim načinom nazalne primjene sve se više ispituje metoda dvosmjerne dostave lijeka (engl. *Bidirectional delivery*). To je jednostavna, neinvazivna metoda primjene lijeka pomoću posebnog uređaja za dvosmjernu dostavu. Nakon dubokog udaha, odgovarajući nastavci uređaja stave se u usta i nos te je potrebno kroz usta izdahnuti u uređaj. Izdahom se podiže meko nepce i zatvara nazofarinks, čime se potpuno odvaja nosna šupljina od usne šupljine i ždrijela (Slika 2.). Prolaskom izdahnutog zraka kroz uređaj u nos, pozitivnim tlakom potiče se širenje nosne valvule i povećava se tlak u nosnoj šupljini, što uzrokuje širenje nosnih kanala. Takvo povećanje tlaka unutar same nosne šupljine sprječava da se meko nepce previše uzdigne. Odvajanjem nosne šupljine sprječava se depozicija lijeka u grlo, pluća i probavni sustav, čime se štite navedeni dijelovi od potencijalno štetnih učinaka

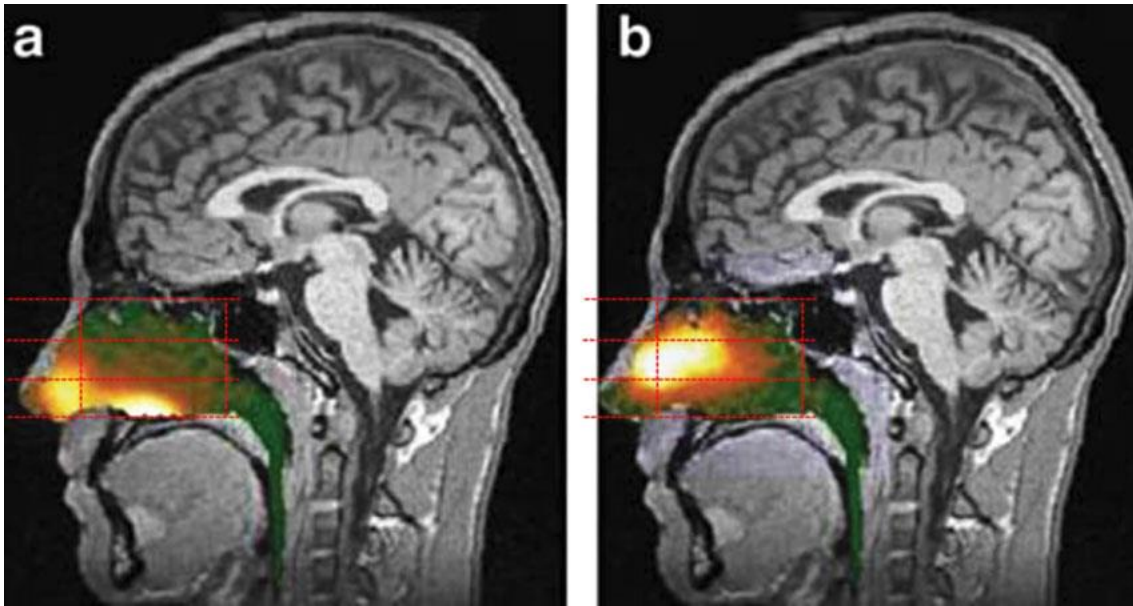
lijeka, a sprječava se i pojava neugodnog okusa lijeka. Istodobno se povećava iskorištenost lijeka u nosnoj šupljini jer nema gubitaka u nazofarinksu. Sam se uređaj može višekratno koristiti, a nastavci za nos i usta su jednokratni. Moguće je primijeniti i tekuće i praškaste sustave. Dvosmjernom se primjenom lijek većinom odlaže iza nosne valvule, posebno u gornjoj i srednjoj turbinatnoj regiji koje su izrazito prokrvljene, za razliku od jednosmjerne metode gdje većina lijeka ostaje u prednjoj regiji [7], [13].



Slika 2. Princip funkcioniranja dvosmjernog načina nazalne primjene (preuzeto iz [7])

S obzirom na nedostatke klasičnih kapi i sprejeva za nos, uvelike se istražuje potencijal praškastih i *in situ* gelirajućih sustava koji bi spriječili curenje pripravka te produljili vrijeme zadržavanja na nosnoj sluznici. Tako su Djupesland i suradnici istražili mogućnost primjene praškastog sumatriptana u dvosmjernoj primjeni u usporedbi s nazalnim sprejom sumatriptana pri klasičnoj nazalnoj primjeni. Potvrđene su prednosti dvosmjernog načina primjene u odnosu na klasičnu jednosmjernu primjenu [7]. Do sličnog zaključka je došao i R. Cady koji je proučavao dvosmjernu primjenu aerosola sumatriptana [9].

Istraživanja su pokazala da se dvosmjernom primjenom većina lijeka zadržava u nosnoj šupljini, za razliku od jednosmjerne primjene tokom koje se ljekoviti oblik poglavito odlaže po vestibulima i u manje prokrvljenim dijelovima nosa (Slika 3.) [7].



Slika 3. Depozicija Tc^{99} označene laktoze pri jednosmjernom načinu primjene tekućine (a) i dvosmjernog načina primjene praška (b) (preuzeto iz [7])

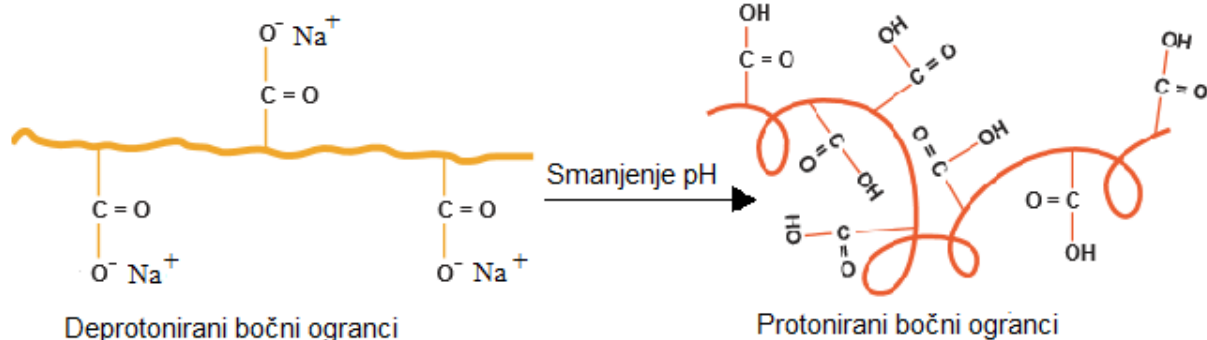
Nadalje, u novije vrijeme dosta se pažnje posvećuje *in situ* gelirajućim sustavima, o čemu se raspravlja u poglavlju 2.2.

1.2 *In situ* gelirajući sustavi

U potrazi za što učinkovitijim nazalnim terapijskim sustavima sve više se istražuju *in situ* gelirajući sustavi. To su sustavi koji geliraju na mjestu primjene (lat. *in situ* - na mjestu/na licu mjesta). Radi se o polimernim disperzijama koje pod utjecajem nekog od fizioloških čimbenika (prisustva iona, promjene temperature, promjene pH) prelaze iz tekućeg oblika u polučvrsti oblik gela (sol-gel prijelaz). Takvi se sustavi mogu lako primijeniti raspršivanjem kao tekući oblici osiguravajući točnost primijenjene doze. Nadalje, u kontaktu s nosnom sluznicom formiraju gel čime produljuju vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu primjene i poboljšavaju učinkovitost i bioraspoloživost nazalno primijenjenog lijeka. Također, uz produljeno vrijeme kontakta, takvi sustavi mogu osigurati i produljeno oslobađanje te smanjiti učestalost primjene lijeka, što povećava suradljivost pacijenta. *In situ* gelirajući sustavi svoju primjenu nalaze kao napredne platforme za parenteralnu, oftalmičku, bukalnu, rektalnu, vaginalnu, intraperitonealnu i nazalnu primjenu lijekova. Za sada se takvi sustavi istražuju ili primjenjuju uglavnom za dostavu antimikrobnih lijekova, lijekova protiv glaukoma i astme, dijabetika i lijekova koji djeluju na središnji živčani sustav [14]–[18].

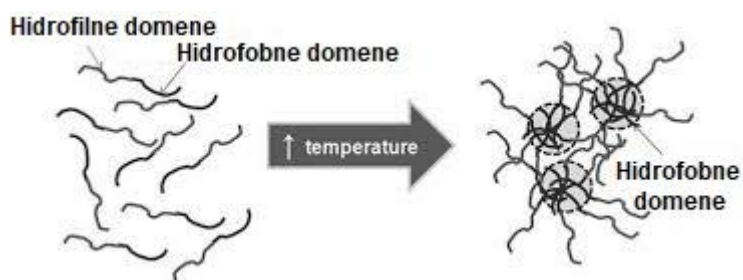
1.2.1 Mehanizmi geliranja *in situ* gelirajućih sustava

In situ gelirajući sustavi su polimerne disperzije koje pri promjeni određenih parametara u svojoj okolini prelaze iz sol u gel stanje. Po vrsti parametra iz okoline koji se mijenja razlikuju se tri mehanizma geliranja odnosno tri tipa *in situ* gelirajućih sustava: pH ovisni sustavi, temperaturno ovisni sustavi i ionima aktivirani sustavi [14]. Primjer pH ovisnog *in situ* gelirajućeg sustava su disperzije poliakrilne kiseline (Carbopol®). Zahvaljujući strukturi poliakrilatnih polimera s puno bazičnih i kiselih ogranaka ti sustavi geliraju promjenom pH (Slika 4.).Ovisno o ioniziranosti ili neioniziranosti navedenih ogranaka nastaju intra i intermolekulske veze uslijed čega se stvara gel [14].



Slika 4. Prikaz Carbopol-a pri umjerenom i niskom pH (prilagođeno prema [19])

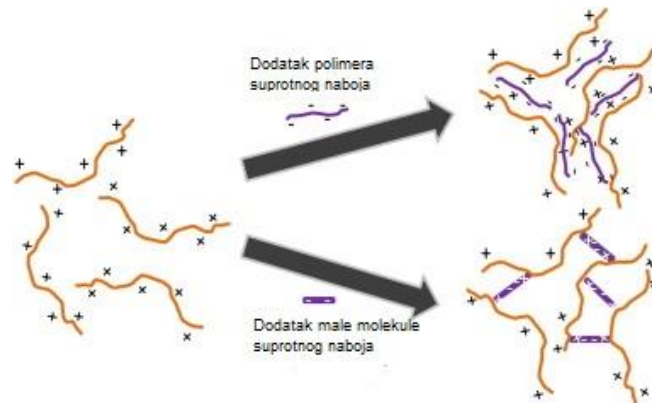
Temperaturno ovisno geliranje karakteristično je za poloksamerske sustave. Takvi sustavi su pri sobnoj temperaturi u tekućem stanju, dok pri fiziološkoj temperaturi geliraju. Za razliku od većine drugih polimera koji stvaraju temperaturno ovisne gelove, poloksameri čine sustave koji geliraju povišenjem temperature (Slika 5.). Rajoira i suradnici pretpostavljaju da kod ovakvih polimera dolazi do geliranja iz tri razloga: 1.) postupne desolvatacije polimernih lanaca, 2.) povećanja micelarne agregacije i 3.) zapetljavanja polimernih lanaca [14].



Slika 5. Mehanizam geliranja temperaturno ovisnog sustava (Prilagođeno prema [14])

Ionima aktivirani sustavi geliraju u prisustvu iona, većinom kationa koji umrežavaju karboksilne skupine polimera i time stvaraju stabilnu trodimenzionalnu strukturu (Slika 6.). Takvim povezivanjem neutraliziraju se istoimeni naboji čime se sprječavaju elektrostatska odbijanja unutar lanca polimera. Primjer takvog polimera je pektin koji gelira u prisustvu

kalcijevih iona. Postoje i polimeri kod kojih je prisutan dvojni ili trojni utjecaj na geliranje. Primjer takvog polimera je gelan guma. Njeno geliranje ovisi o temperaturi, ali najveći utjecaj na geliranje imaju kationi koji anuliraju elektrostatsko odbijanje [14], [18], [20]. Više riječi o pektinu i gelan gumi bit će u poglavlju 2.2.2.



Slika 6. Mehanizam geliranja ionima aktiviranih sustava (prilagođeno prema [21])

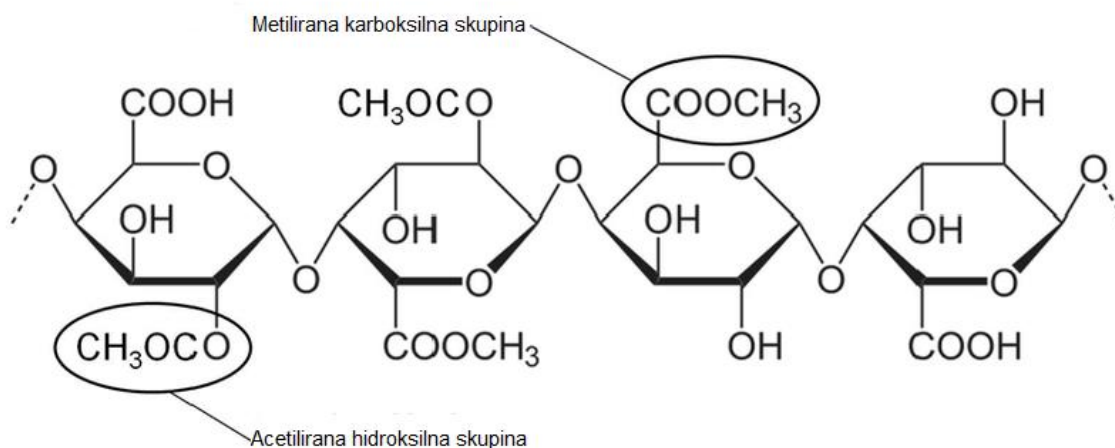
1.2.2 Polimeri u *in situ* gelirajućim sustavima

Polimeri prirodnog ili sintetskog porijekla ubrajaju se među najzastupljenije pomoćne tvari u oblikovanju lijekova odnosno izradi terapijskih sustava. Građeni su od manjih podjedinica (monomera) koje su međusobno povezane. Načinom povezivanja mogu stvarati tri tipa osnovne strukture: linearnu, razgranatu ili umreženu. Po sastavu podjedinica razlikujemo homopolimere, kopolimere i heteropolimere. Zbog svojih specifičnih svojstava poput elastičnosti, (ne)topljivosti, viskoznosti otopina, svojstava keliranja, biorazgradljivosti i bioadhezije, koriste se s ciljem optimiranja stabilnosti formulacije, ponašanja u biološkom okruženju i (posljedičnog) profila oslobađanja djelatne tvari [22], [23].

Pektin

Pektin je prirodni polimer koji se koristi kao pomoćna tvar pri oblikovanju lijekova u funkciji emulgatora, gelirajuće tvari, stabilizatora i/ili ugušćivača. Sve navedene funkcije pektina mogu se sažeti u ulozi modifikatora reoloških svojstava formulacije. Po kemijskoj strukturi pektin je anionski polisaharid čije su monomerne podjedinice uglavnom povezane s α -1,4 vezama (Slika 7.). Na mjestu monomerne podjedinice može se naći barem 17 različitih monosaharida, pri čemu se većinom radi o galakturonskoj kiselini, iako se pojavljuju i L-arabinoza, D-galaktoza, L-ramnoza i druge [24]. Pojedini monomeri mogu biti modificirani metilacijom ili acetilacijom. Po stupnju metoksilacije galakturonske kiseline komercijalni pektin klasificira se na visokometoksilirani pektin (engl. *high methoxy pectin*, HMP) i na niskometoksilirani pektin (engl. *low methoxy pectin*, LMP). Pektin je topljiv u vodi i netopljiv u

organskim otapalima. Zbog mnoštva karboksilnih skupina u svojoj strukturi smatra se slabom organskom kiselinom.



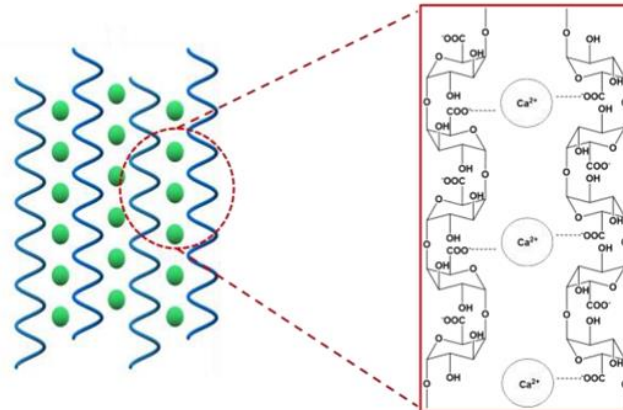
Slika 7. Prikaz pektina čije su podjedinice povezane α -1,4 vezama (preuzeto s [25])

Pektin u prirodi nalazimo u biljkama, i to u staničnoj stjenci. Najzastupljeniji je u staničnim stjenkama dvosupnica, a u nešto manjim količinama nalazi se i u stjenkama jednosupnica [26]. Za komercijalne svrhe pektin se većinom dobiva iz pulpe/komine jabuke. Za ekstrakciju se najčešće koriste mineralne kiseline jer omogućavaju jeftinu metodu s velikim iskorištenjem.

Pektin je s nutritivnog stajališta kategoriziran kao siguran dodatak prehrani koji nema ograničenu dnevnu dozu. Naime, ljudski probavni sustav ne može razgraditi pektin jer nema potrebne enzime, jedino ga određene bakterije crijevne flore mogu iskoristiti kao hranu, ali izuzevši njih, pektin prolazi nepromijenjen kroz ljudski probavni sustav.

Pektin se koristi kao pomoćna tvar u izradi različitih farmaceutskih oblika. Razlog široke primjene je njegovo izraženo svojstvo geliranja te izuzetna sigurnost primjene zbog koje ga Agencija za hranu i lijekove SAD-a (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) svrstava u kategoriju GRAS (engl. *Generally regarded as safe*). Najčešće se koristi u formulacijama namijenjenim primjeni na sluznice (primjerice, oralna ili vaginalna primjena). Međutim u novije vrijeme sve više se razvijaju *in situ* gelirajući sustavi za nazalnu primjenu, a pektin predstavlja polimer izbora i za takve oblike. PecSysTM je primjer tehnologije koja se služi niskometoksiliranim pektinom kao gelirajućim agensom koji u prisutnosti kalcijevih iona u sluznici nosa tvori gel, osiguravajući dulje zadržavanje uklopljenog lijeka na mjestu primjene te modificirajući profil oslobađanja. Watts i Smith su ga opisali kao terapijski oblik namijenjen nazalnoj primjeni lipofilnih lijekova [27]. PecFent[®] je pripravak fentanila temeljen na PecSysTM tehnologiji, a koji se koristi u terapiji probijajuće boli kod tumorskih bolesnika [28].

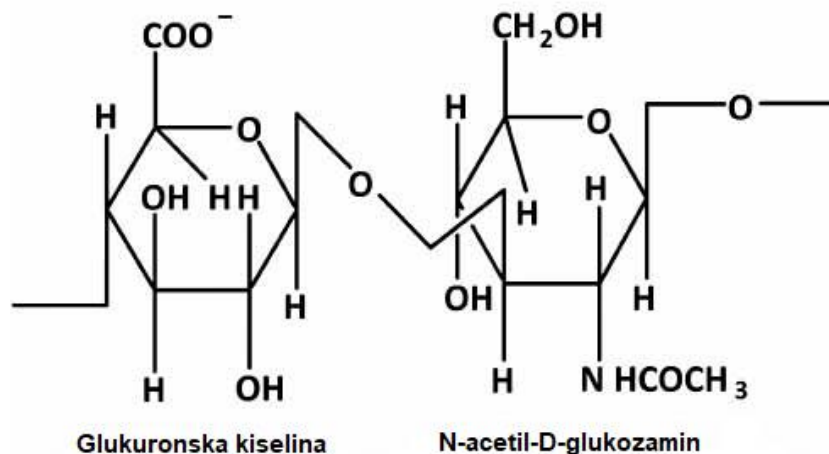
Prijelaz iz sol (tekućeg) u gel stanje može se potaknuti zakiseljavanjem otopine pektina i posljedičnom neutralizacijom negativno nabijenih karboksilnih skupina. Time se smanjuje odbijanje istoimeno nabijenih skupina te se u trodimenzionalnoj strukturi pektina javljaju zone u kojima su lanci polimera usko spojeni čime se povećava konzistencija/gustoća gela. U tim zonama vezanje polimernih lanaca moguće je pojačati dodatkom kalcijevih iona (Slika 8.). Isto se tako geliranje može potaknuti hlađenjem cjelokupnog sustava.



Slika 8. Geliranje pektina dodatkom kalcija (preuzeto iz [26])

Natrijev hijaluronat

Hijaluronska kiselina je anionski glikozaminoglikan. Glikozaminoglikani (GAG) su dugački nerazgranati polisaharidi kod kojih se javljaju disaharidne jedinice koje se ponavljaju. Te disaharidne jedinice sastoje se od jedne heksoze, koja je u većini slučajeva uronska kiselina, i jednog N-acetilheksozamina. U slučaju hijaluronske kiseline, disaharidne podjedinice građene su od glukuronske kiseline i N-acetil-D-glukozamina (Slika 9.) [29]–[31].



Slika 9. Prikaz hijaluronske disaharidne podjedinice (preuzeto s [32])

GAG su molekule koje grade komponente vezivnog tkiva. Hijaluronsku kiselinu u ljudskom tijelu, osim u vezivnom tkivu, nalazimo i u staklastom tijelu oka i u sinovijalnoj tekućini zglobova. GAG su po strukturi većinom proteoglikani kod kojih se proteinska podjedinica sintetizira u endoplazmatskom retikulumu, a disaharidne podjedinice dodaju glikoziltransferazama u Golgijevom tijelu. Ovisno o tome koliko su disaharidne jedinice gusto složene razlikuju se domene koje su više ili manje negativno nabijene. S porastom negativnog naboja hijaluronska kiselina privlači više kationa, poglavito natrija (a posljedično i vodu). Hijaluronska kiselina se ističe među GAG-ima, jer jedina nema proteinsku osnovu, odnosno nije proteoglikan [30], [31].

U biomedicinskom području hijaluronska se kiselina uvelike koristi zbog svojih gelirajućih svojstava i biokompatibilnosti. Primjenjuje se u oftalmološkim operacijama, kao punilo u dermatološkim pripravcima te u tkivnom inženjeringu [29], [31].

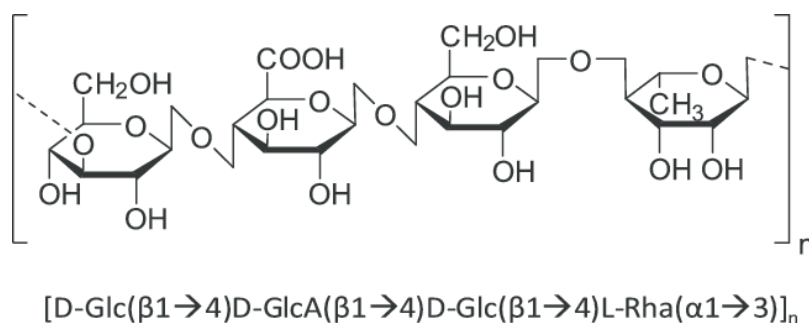
U razvoju i izradi farmaceutskih oblika, hijaluronska kiselina koristi se kao gelirajuća tvar koja se odlikuje visokom biokompatibilnošću. Tvori gelove koji imaju svojstva polielektrolitnih gelova, što znači da slabije bubre i geliraju u otopinama soli. Dodatkom elektrolita povećava se koncentracija kationa u sustavu te se smanjuju sile odbijanja negativno nabijenih skupina hijaluronske kiseline što omogućuje geliranje [31].

Natrijev hijaluronat razmatra se kao konstitutivni polimer *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu [33]. Naime, hijaluronska kiselina ima pozitivni učinak na nosnu sluznicu (cijeljenje i obnavljanje sluznice). Prema istraživanju kojeg su proveli Cassandro i suradnici [34], hijaluronska kiselina je sama po sebi povoljno djelovala u terapiji kroničnog rinitisa sa

polipima smanjujući disfunkciju nazalnog epitela i sluznice, a u kombinaciji s odgovarajućim kortikosteroidom uočeno je izraženo sinergističko djelovanje.

Gelan guma

Gelan guma je linearni anionski polisaharid koji se dobiva od bakterije *Sphingomonas paucimobilis*. Podjedinice polisaharidne strukture su β -D-glukoza, β -D-glukuronska kiselina i L-ramnoza koje su poredane u obliku tetrasaharida β -D-glukoza, β -D-glukuronska kiselina, β -D-glukoza i L-ramnoza. U biosintezi *S. paucimobilis* dijeli prekursore s lipopolisaharidima (LPS), koji su sastavni dio bakterijske membrane, i peptidoglikanima. Zbog tih istih prekursora u biosintezi, za industrijsku proizvodnju gelan gume potrebno je dodati metabolički inhibitor koji će smanjiti kompetitivni utjecaj biosinteze LPS-a i peptidoglikana [35].

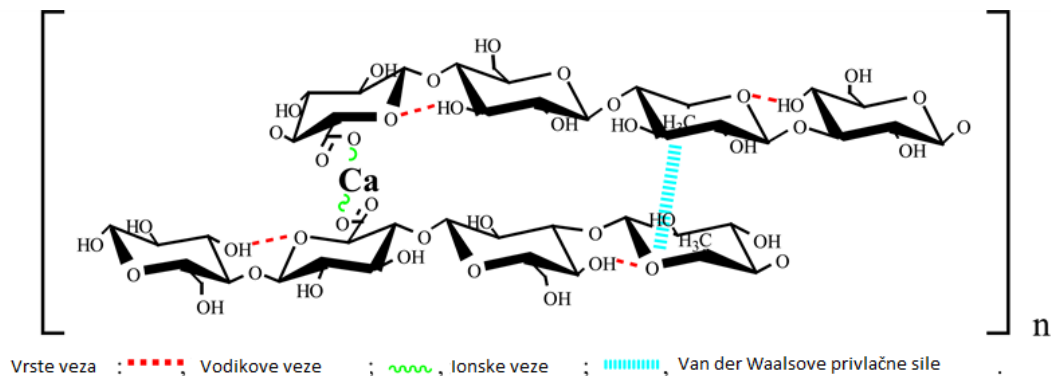


Slika 10. Prikaz deacetilirane gelan gume (preuzeto s [36])

Gelan guma koristi se u prehrambenoj industriji u širokom spektru proizvoda poput glazura, pudinga, pića, umaka, pekarskih proizvoda itd. Po širokom spektru primjene može se vidjeti da je gelan guma relativno otporna na različite uvjete kojima može biti izložena. U farmaceutskoj tehnologiji gelan guma se koristi kao pomoćna tvar u oblicima produljenog učinka te kao sastavnica krema za sunčanje, losiona za tijelo i pasta za zube. U farmaceutskoj tehnologiji koristi se isključivo deacetilirana gelan guma (Slika 10.) [35], [37]–[39].

Gel koji gelan guma stvara u vodi prilično je nestabilan. Za to su često zaslužni acetilni supstituenti esterski vezani za glukozne podjedinice u nativnoj gelan gumi. Međutim i nakon njihovog uklanjanja i dalje nastaje slabi i termoreverzibilni gel. Miyoshi i suradnici proveli su istraživanje utjecaja koncentracije gelan gume i temperature pripreve na svojstva formiranog

gela te su pokazali da je pri svim ispitivanim uvjetima čista gelan guma davala pretežito slabi gel [38]. Da bi gelan guma mogla dati termioreverzibilni i čvrsti gel potrebno je u gelirajuću smjesu dodati soli koje disociraju (npr. NaCl, CaCl₂ ili MgCl₂). Kationi iz tih soli potiču umrežavanje lanaca gelan gume (Slika 11.) dok istovremeno smanjuju širenje heliksa pri povišenju temperature. To se može tumačiti sprječavanjem međusobnog elektrostatskog odbijanja karboksilnih skupina na heliksu koje onemogućava dobro geliranje [37]–[39].

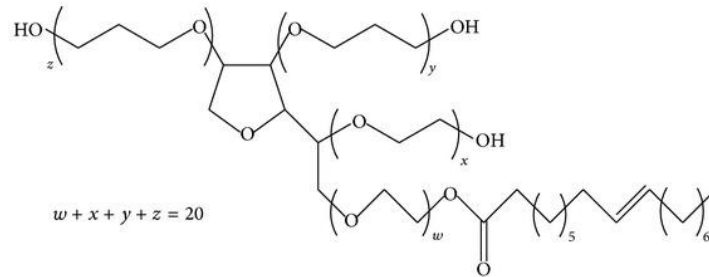


Slika 11. Moguće veze koje se javljaju među molekulama gelan gume (preuzeto s [40])

Polisorbat 80

Polisorbat 80 ili Tween 80 spada u skupinu tvari pod nazivom neionogeni tenzidi. Tenzidi su površinski aktivne tvari koje zbog svoje amfipatske molekulske strukture na granici faza smanjuju površinsku napetost. HLB (hidrofilno lipofilni balans) vrijednost Tweena 80 iznosi oko 15, čime spada u skupinu solubilizatora. Solubilizatori olakšavaju otapanje inače teško topljivih tvari. Kako bi to postigli, smanjuju površinsku napetost na granici faza tako da se orijentiraju hidrofobnim krajem prema nevodenoj fazi, a hidrofilnim krajem prema vodenoj fazi. Time zauzimaju mjesto na granici faza čime smanjuju količinu slobodne energije i stabiliziraju takav sustav.

Polisorbati su po kemijskoj strukturi parcijalni esteri masnih kiselina i polioksietilensorbitana, a Polisorbat 80 je polioksietilen (20) sorbitanmonooleat (Slika 12.). Drugi polisorbati se razlikuju po tome kojom su masnom kiselinom parcijalno esterificirani [41], [42].



Slika 12. Prikaz strukture Polisorbata 80 (preuzeto s [43])

U farmaceutskim oblicima se polisorbati, osim kao solubilizatori, koriste još i kao neionogeni emulgatori koji tvore emulzije tipa ulje u vodi. Neki polisorbati mogu se koristiti kao tvari za močenje koje stabiliziraju čestice lijeka suspendirane u tekućem mediju.

1.2.3 Reološka svojstva

Reologija je znanstvena disciplina koja proučava tečenje materijala te deformaciju istih pri djelovanju neke vanjske sile. Pri laminarnom strujanju jednostavne tekućine i razrijeđene otopine ponašaju se kao Newtonove tekućine koje prate Newtonov zakon tečenja:

$$F = \eta \times A \times \frac{dv}{dx}$$

gdje F predstavlja silu koja djeluje na površinu imaginarnog sloja fluida dok teče. Taj imaginarni sloj nalazi se na udaljenosti x od nepomičnog sloja te se giba brzinom v . Vrijednost η predstavlja dinamičku viskoznost koja je konstantna za određeni sustav pri određenoj temperaturi. Nažalost, samo manji broj sustava pokazuje takav način tečenja, većina pokazuje odstupanje od Newtonovog zakona te se nazivaju realnim ili ne-Newtonovim sustavima [44], [45].

Realni reološki sustavi

Primjeri realnih sustava su koloidne otopine, guste suspenzije, otopine polimera i razni drugi. Da bi se ponašanje realnih reoloških sustava moglo lakše grafički pratiti, Newtonova jednadžba raspisana je u oblik:

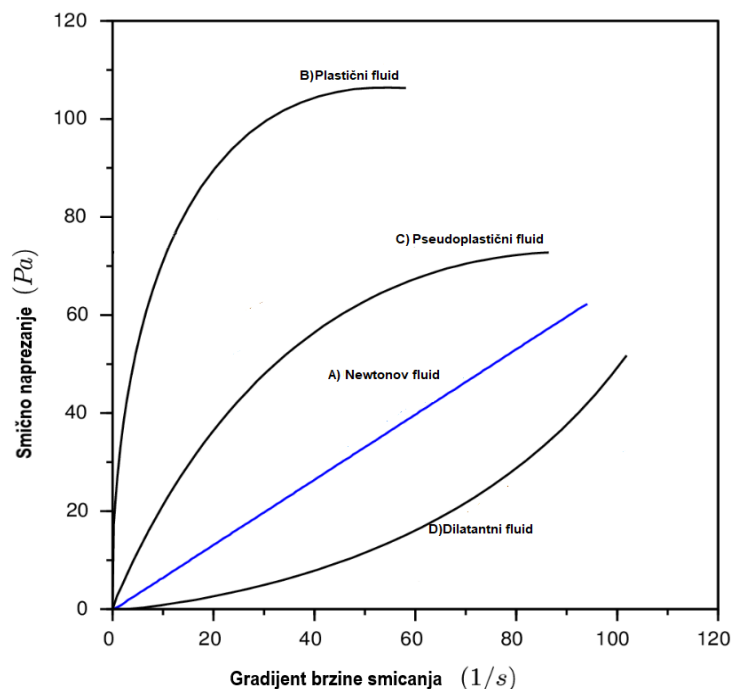
$$\tau = \eta \times D$$

pri čemu se τ definira kao smično naprezanje i jednako je omjeru sile koja djeluje na sustav (F) i površine sustava (A ; $\tau = F/A$). D predstavlja gradijent brzine smicanja i može se izraziti

kao $\frac{dv}{dx}$. Ovakvim oblikom Newtonove jednadžbe možemo jednostavno grafički prikazati tečenje fluida pomoću reograma. Reogram realnog sustava je graf koji prikazuje ovisnost smičnog napreznja (τ) o gradijentu brzine smicanja (D) [44].

Kod realnih sustava dolazi do međuodnosa dvaju djelovanja na fluid. Djelovanje sile utječe na elongaciju fluida i smicanje fluida. Elongacijski tok fluida je pojava elastičnog rastezanja fluida pri djelovanju sile, a smicanje se može opisati kao pomicanje imaginarnih slojeva fluida djelovanjem sile. Temeljem reakcije realnih ne-Newtonovih sustava na djelovanje sile (mijenja li se više elongacijski tok ili smicanje), možemo ih dalje razvrstati u plastične, pseudoplastične i dilatantne sustave [46].

Tipični reogrami različitih sustava prikazani su na Slici 13. Uz (A) reogram idealnog sustava, prikazani su i (B) reogram plastičnog sustava kod kojeg je potrebno izvesti minimalno smično napreznje da bi došlo do tečenja, a do pojave dovoljnog smičnog napreznja u potpunosti se ponaša kao elastičan materijal, (C) reogram pseudoplastičnog sustava kod kojeg dolazi do strukturnih promjena usred djelovanja sile (destruktuiranje) i (D) reogram dilatantnog sustava kod kojeg dolazi do promjene strukturiranja čestica uslijed djelovanja sile.



Slika 13. Reogram idealnog, pseudoplastičnog, dilatantnog i plastičnog sustava (prilagođeno iz [47])

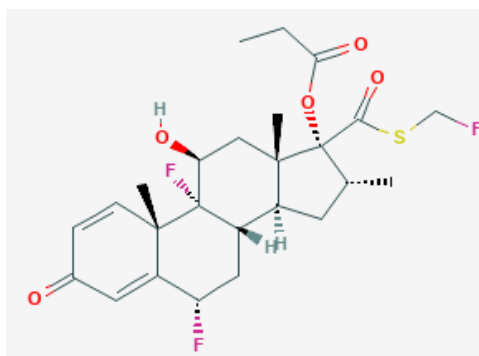
Reološka karakterizacija

Reološka mjerenja izvode se viskozimetrima i reometrima. Za dinamička reološka mjerenja koristi se reometar. Najčešće se koristi rotacijski reometar. On mjeri viskoznost na principu otpora kretanju tijela u fluidu. To je moguće postići na dva načina. Prvi je da se kontrolira smično naprezanje tako da se podesi sila koja djeluje i mjeri brzina. Drugi podrazumijeva kontroliranje brzine smicanja, koje se postiže kontrolom brzine rotirajuće ploče, te se mjeri sila.

Gelovi su složeni materijali koji istovremeno mogu imati svojstva tekućina i krutina, to jest kažemo da posjeduju viskoelastična svojstva. Viskoelastičnost se sastoji od otpora tečenju (viskoznost) i otporu deformaciji (elastičnost). Svojstva viskoelastičnih materijala mjere se dinamički pri oscilacijskom opterećenju [45].

1.3 Flutikazon

Flutikazon je lijek kemijske formule $C_{22}H_{27}F_3O_4S$ ($M_r = 444,509$ g/mol). Na tržištu se nalazi u obliku propionata (Slika 14.) ili fuorata. Po ATC klasifikaciji označava se pod R03BA05 i kao takav spada u antiastmatike. Smještaju u tu klasu pridonosi kemijska struktura po kojoj je flutikazon trifluorirani glukokortikosteroid. Flutikazon djeluje kao agonist na receptore glukokortikoida. Vezanjem na te receptore aktivira lipokortin koji inhibira citosolnu fosfolipazu A2. Ta aktivacija pokreće kaskadnu reakciju sinteze medijatora upale poput prostaglandina i leukotriena. Tom kaskadom djeluje kao antialergik, antiupalni lijek i antipruritik, a koristi se u liječenju astme, alergijskog rinitisa sa ili bez polipa i atopijskog dermatitisa. U tijelu se metabolizira preko citokroma P450 3A4. Prisutan je na tržištu u obliku praška inhalata, stlačenih inhalacijskih suspenzija (pulmonalna primjena) te kapi i sprejeva za nos (Tablica 1.). Siguran je za korištenje i u pedijatrijskoj i gerijatrijskoj populaciji [48], [49].



Slika 14. Struktura flutikazonpropionata (preuzeto s [50])

Tablica 1. Farmaceutski oblici flutikazonpropionata prisutni na hrvatskom tržištu [51]

Odobreni lijek	Farmaceutski oblik
Airflusal	Stlačeni inhalat, suspenzija
AirFluSal Forspiro	Dozirani prašak inhalata
Arquist	Stlačeni inhalat, suspenzija
Dimenium	Dozirani prašak inhalata
Duohal	Stlačeni inhalat, suspenzija
Dymista	Sprej za nos, suspenzija
Flixonase	Kapi za nos, suspenzija
Flixonase	Sprej za nos, suspenzija
Flixotide Diskus	Dozirani prašak inhalata
Flixotide Inhaler	Stlačeni inhalat, suspenzija
Fusamix Easyhaler	Dozirani prašak inhalata
Rinoco	Sprej za nos, suspenzija
Saldisk	Dozirani prašak inhalata
Salmeterol/flutikazon Cipla	Stlačeni inhalat, suspenzija
Seretide Diskus	Dozirani prašak inhalata
Seretide Inhaler	Stlačeni inhalat, suspenzija
Serzyl	Stlačeni inhalat, suspenzija
Synaze	Sprej za nos, suspenzija

2. Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada

Hipoteza

Nazalni *in situ* gelirajući sustavi s flutikazonpropionatom pripremljeni iz pektina (0,8%, *m/m*), gelan gume (0 ili 0,1%, *m/m*) i natrijevog hijaluronata (0, 0,03 ili 0,05%, *m/m*) prikladnih su reoloških svojstava s obzirom na put primjene.

Dvosmjerna dostava *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazona osigurava depoziciju u ciljnom području modela nosne šupljine. Profil depozicije pri dvosmjernoj dostavi ovisi o koncentraciji gelan gume i natrijevog hijaluronata te kutu primjene prema horizontalnoj i vertikalnoj ravnini.

Opći i specifični ciljevi rada

Nazalna primjena predstavlja prvi izbor u liječenju oboljenja sluznice nosa te alternativni put sistemske dostave lijeka, a pruža i mogućnost direktne dostave lijeka u središnji živčani sustav putem olfaktorne regije i olfaktornog živca izravno izloženog vanjskoj okolini [52]. Prednosti nazalne primjene pri sistemske dostavi lijekova u odnosu na oralnu primjenu su brza apsorpcija te velika bioraspoloživost, izbjegnute nuspojave u probavnom sustavu, te olakšana primjena lijeka u posebnih skupina bolesnika (djeca, stariji bolesnici, bolesnici s poremećajem probavnog sustava) [53]. U odnosu na parenteralnu primjenu, nazalna je primjena lijeka neinvazivna i bezbolna te omogućava samoliječenje odnosno smanjenje troškova bolničkog liječenja [54].

Potencijal nazalne primjene lijekova još uvijek nije u potpunosti iskorišten. Primjerice, tome u prilog govori činjenica da je učinak sistemski primijenjenih kortikosteroida veći od učinka nakon lokalne primjene [55]. Otežavajući čimbenici svakako su specifične značajke nosne šupljine poput geometrije nosne valvule kao najužeg dijela nosne šupljine koji otežava dostavu lijeka u ciljno turbinatno područje te mukocilijarnog mehanizma čišćenja koje skraćuje vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu djelovanja/apsorpcije [10], [56].

Istraživanja i razvoj u jednom smjeru idu prema inovativnim platformama za nazalnu dostavu lijekova poput *in situ* gelirajućih i praškastih sustava koji mogu produljiti vrijeme zadržavanja lijeka u nosnoj šupljini te prilagoditi profil oslobađanja lijeka [33], [57], [58]. S druge strane, ulažu se napor u razvoj inovativnih načina nazalne dostave lijekova i razvoj medicinskih proizvoda koji mogu povećati dostavu nazalno primijenjenog lijeka dublje u unutrašnjost nosne šupljine. Tako se danas velika pozornost usmjerava na inovativni pristup nazalne dostave lijeka uređajima koji se aktiviraju izdahom osiguravajući dvosmjernu dostavu nazalno primijenjenog lijeka, posebice kortikosteroida [59]. Uređaj sadrži jednokratni spremnik za lijek i dio za višekratnu upotrebu s dva nastavka, od kojih se jedan stavlja u

nosnicu, a drugi u usta, pri čemu se izdahom lijek iz spremnika unosi u nosnu šupljinu. Prilikom izdaha podiže se meko nepce odvajajući nosnu od usne šupljine, što omogućava dvosmjerno strujanje zraka: pri upuhivanju izdahnutog zraka u nosnu šupljinu zrak najprije struji u smjeru nazofarinksa kroz prvu nosnicu, a kroz drugu nosnicu izlazi van. Dvosmjerno strujanje zraka predstavlja jednu od glavnih razlika u odnosu na konvencionalnu nazalnu primjenu lijekova, te pridonosi depoziciji primijenjenog lijeka dublje u nosnoj šupljini [60].

Iz svega navedenog proizlazi potreba za istraživanjima koja će objediniti razvoj naprednih platformi za nazalnu primjenu kortikosteroida s inovativnim načinima/uređajima za njihovu učinkovitiju dostavu u ciljno područje nosne šupljine. Nižić i suradnici predložili su razvoj *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata pripravljene s pektinom i gelan gumom (kao gelirajućim polimerima) te natrijevim hijaluronatom (kao bioaktivnim konstituansom s pozitivnim učinkom na nosnu sluznicu) razmatrajući formulacijske parametre i mogućnosti njihove konvencionalne primjene raspršivanjem. Primjenom statističkog dizajna eksperimenta uspostavili su regresijske modele odnosa uključenih parametara i varijabli odaziva [33].

Cilj ovog istraživanja je, temeljem prethodno uspostavljenih regresijskih modela, pripremiti *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata te, nakon detaljne karakterizacije, ispitati mogućnosti njihove dvosmjerne dostave, kao i ovisnost profila depozicije o odabranim formulacijskim parametrima i parametrima primjene. Ispitat će se primjenjivost modela nosne šupljine i respiratorne pumpe pri simuliranju uvjeta dvosmjerne dostave lijeka.

Specifični ciljevi

- Pripremiti *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata različitog polimernog sastava
- Odrediti veličinu suspendiranih čestica flutikazonpropionata
- Odrediti reološka svojstva *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata
 - viskoznost u mirovanju
 - krivulja viskoznosti
- Odrediti kut raspršenja i veličinu raspršenih kapljica *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata
- Odrediti vrijeme geliranja *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata
- Odrediti reološka svojstva *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata nakon geliranja
 - krivulja viskoznosti
 - granično smično naprezanje

- čvrstoća gela
- Odrediti profil nazalne depozicije pri simulaciji dvosmjerne dostave te
 - ispitati utjecaj koncentracije gelan gume i natrijevog hijaluronata
 - kuta primjene u odnosu na horizontalnu i vertikalnu ravninu

3. Eksperimentalni dio

3.1 Materijali

Tijekom eksperimentalnog rada i priprave suspenzijskih sustava za kasnija ispitivanja korišteni su flutikazonpropionat (Carbosynth Ltd, UK), Tween 80 (Sigma-Aldrich, SAD), niskometoksilirani amidirani pektin CF 025 (stupanj esterifikacije 23-28%; stupanj amidacije 22-25%; Herbstreith & Fox, Njemačka), gelan guma (Phytigel, Sigma-Aldrich, SAD) i hijaluronska kiselina (molekulska masa 0,8 Da; Contipro, Češka). Umjetni nazalni fluid (engl. *Simulated Nasal Fluid*, SNF) pripremljen je otapanjem NaCl (Kemig, Hrvatska) u koncentraciji od 150 mM, KCl (Kemig, Hrvatska) u koncentraciji od 40 mM i $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Njemačka) u koncentraciji od 5,3 mM, u pročišćenoj vodi. Za vizualizaciju depozicije u nosnoj šupljini korištena je indikatorska pasta Sar-Gel[®] (Arkema Inc., Sartomer Americas, SAD).

3.2 Metode

3.2.1 Priprava *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom

Inicijalne vodene otopine polimera pripravljene su na način da su se krutine otapale u pročišćenoj vodi uz miješanje na magnetnoj miješalici. Otopine su pripravljene u koncentraciji od 1,4% (*m/m*) za pektin, 0,6% (*m/m*) za gelan gumu i 0,5% (*m/m*) za natrijev hijaluronat. Nakon otapanja pektina, otopina je filtrirana. Pri pripremi vodene otopine gelan gume, sustav je zagrijan na temperaturu od 85°C te miješan do potpunog otapanja polimera.

In situ gelirajući sustavi pripremljeni su u dva koraka. Prvi korak bila je priprema smjese polimernih otopina u koncentracijama polimera prikazanim u Tablici 2, uz homogeniziranje na magnetskoj miješalici. Drugi korak obuhvaćao je rastrljavanje flutikazonpropionata s Tween-om 80 u masenom omjeru 2:1 te pripremu suspenzije dodavanjem otopine polimera u smjesu flutikazonpropionata i Tween-a 80. Koncentracija djelatne tvari u suspenziji iznosila je 0,06 % (*m/m*), a Tween-a 80 0,03 % (*m/m*). Naknadno je dodan manitol u koncentraciji od 4% (*m/m*) radi izotonizacije. Tako pripremljenom uzorku je dodatkom malog volumena 0,1 M otopine NaOH podešen pH (Shema 1.).

Tablica 2. Sastav *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata

Uzorak	Pektin (%, <i>m/m</i>)	Na-hijaluronat (%, <i>m/m</i>)	Gelan guma (%, <i>m/m</i>)	Flutikazonpropionat (%, <i>m/m</i>)	Tween 80 (%, <i>m/m</i>)
P	0,8	-	-	0,06	0,03
PH1	0,8	0,03	-	0,06	0,03
PH2	0,8	0,05	-	0,06	0,03
PG	0,8	-	0,1	0,06	0,03
PGH1	0,8	0,03	0,1	0,06	0,03
PGH2	0,8	0,05	0,1	0,06	0,03

3.2.2 Određivanje veličine suspendiranih čestica flutikazonpropionata

Srednji promjer suspendiranih čestica u *in situ* gelirajućim sustavima određen je mikroskopskom analizom slike pomoću mikroskopa Olympus BH2 spregnutog s kamerom (CCD kamera ICD-42-E, Ikegami Tsushinki Co., Japan). Veličina i broj čestica izmjereni su računalnom obradom slike programom Optomax V (Cambridge, UK). Mjerenja su rađena u triplikatu, a za svako mjerenje izmjereno je najmanje 3000 čestica.

3.2.3 Određivanje raspodjele veličina raspršenih kapljica

Raspodjela veličina kapljica određena je na uređaju SprayTec (Malvern Instruments, UK), pri ručnom raspršivanju korištenjem nazalnog raspršivača Spray Pump 3K, (Aeropump, Njemačka, volumena doziranja 140 μ L). Kako bi se postigla jednoličnost doze raspršenog uzorka, prije mjerenja napravljeno je nekoliko potisaka nazalnim raspršivačem. Bočica s nazalnim raspršivačem bila je postavljena pod kutom od 90° u odnosu na podlogu. Žarišna udaljenost od leće iznosila je 300 mm, a vrh raspršivača nalazio se 3 cm ispod zone mjerenja laserske difrakcije. Svaki od tri potiska za pojedini uzorak bio je proveden ručno radi što vjernije simulacije stvarne kliničke situacije.

3.2.4 Određivanje kuta raspršenja *in situ* gelirajućih sustava

Kut raspršenja *in situ* gelirajućih sustava određen je korištenjem nazalnog raspršivača Spray Pump 3K (Aeropump, Njemačka). Raspršivač je prije mjerenja pripremljen raspršivanjem uzorka kao i kod određivanja raspodjele veličina raspršenih kapljica (odjeljak

3.2.3.). Mjerenje je provedeno raspršivanjem uzorka naspram tamne pozadine. Proces je sniman kamerom te su kasnije, iz tih snimaka, određeni kutovi korištenjem virtualnog kutomjera. Mjerenja su rađena u triplikatu.

3.2.5 Reološka karakterizacija

Sva mjerenja provedena su na reometru Anton Paar MCR 102 (Anton Paar GmbH, Austrija; Slika 15.), a podaci su analizirani pomoću RheoCompass™ softvera. Sva mjerenja napravljena su u triplikatu.



Slika 15. Reometar MCR 102 (Anton Paar GmbH, Austrija)

3.2.5.1. Određivanje vremena geliranja

Za određivanje vremena geliranja korišten je oscilacijski test vremena geliranja (engl. *Gelation time test*). Korišteno je mjerno tijelo PP50 (engl. *parallel plate*, promjera 50 mm). Kutna frekvencija (ω) postavljena je na $6,28 \text{ rad s}^{-1}$, temperatura na 34°C , a udaljenost između ploča iznosila je 0,500 mm. *In situ* gelirajući sustav pomiješan je sa SNF-om u volumnom omjeru 1:1. Mjerenja su provedena pri deformaciji od 0,5 % (iz linearnog viskoelastičnog područja). Promatrane su vrijednosti modula pohrane i modula gubitka u ovisnosti o vremenu.

3.2.5.2. Određivanje viskoznosti u mirovanju

Viskoznost u mirovanju *in situ* gelirajućih sustava određena je testom puzanja (engl. *Creep test*). Za određivanje viskoznosti u mirovanju (engl. *Zero shear viscosity*) korišteno je mjerno tijelo stožac CP50 – 1 (engl. *cone plate*, promjera 50 mm i nagiba 1°). Udaljenost od donje ploče iznosila je 0,102 mm, što je fiksni razmak za ovaj sustav mjernih tijela. Uzorci su ekvilibrirani 3 minute na 25°C. Mjerenje viskoznosti u mirovanju pokazuje kakva je mikrostruktura sustava u slučajevima kada se brzina smicanja ($\dot{\gamma}$; s⁻¹) približava nuli [46].

3.2.5.3. Određivanje krivulje viskoznosti i graničnog smičnog napreznja

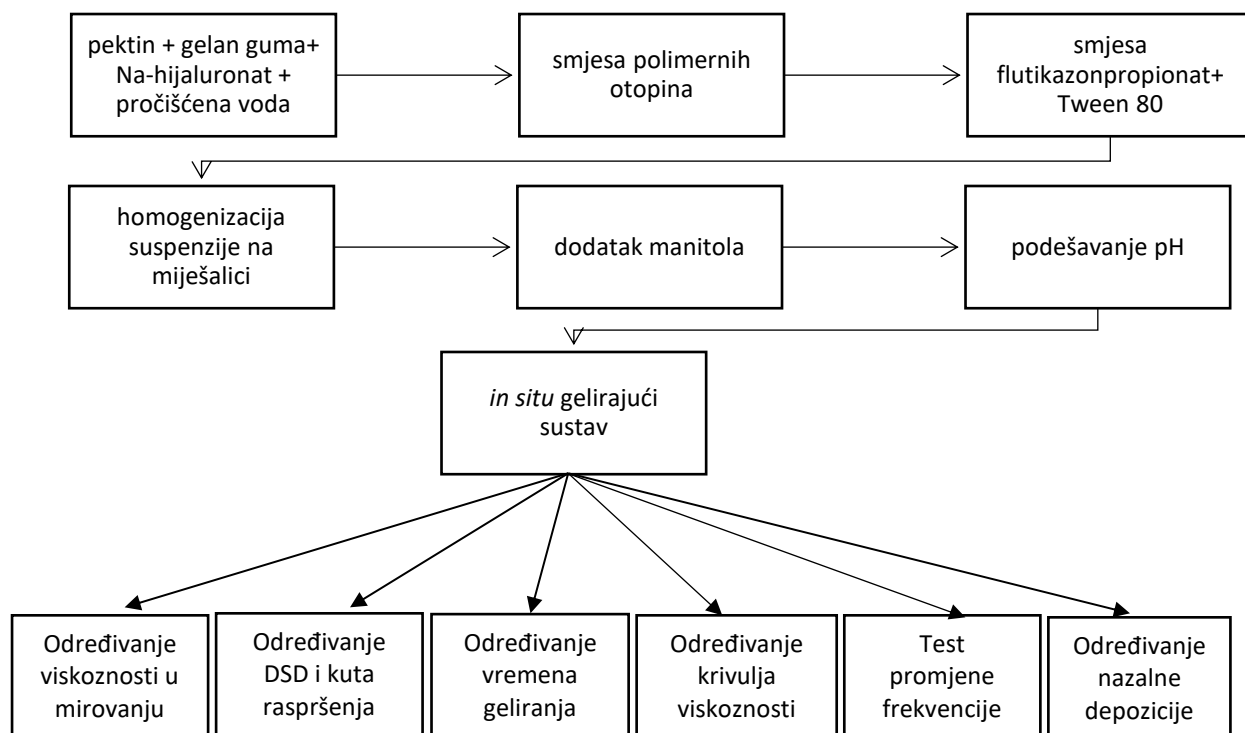
Krivulje viskoznosti *in situ* gelirajućih sustava prije i nakon miješanja s SNF-om (1:1; v/v) određene su rotacijskim testom koji pokazuje kako se uzorak ponaša pri različitim brzinama smicanja ($\dot{\gamma}$). Mjerenje je rađeno pri 34°C pomoću mjernog tijela CP50 – 1, čija je udaljenost od donje ploče iznosila 0,102 mm. Tijekom mjerenja promatrano je kako različite brzine smicanja u području od 1 do 100 s⁻¹ djeluju na tečenje sustava i to se prikazuje kao funkcija ovisnosti viskoznosti (η , mPa s) o brzini smicanja ($\dot{\gamma}$, s⁻¹) prema jednadžbi:

$$\eta = \tau/\dot{\gamma}$$

Granično smično napreznje (engl. *yield point*) izračunato je iz navedenog mjerenja prema Binghamovoj jednadžbi.

3.2.5.4. Test promjene frekvencije

Test promjene frekvencije (engl. *Frequency sweep test*) rađen je pri temperaturi od 34°C, kutnoj frekvenciji (ω) od 6,28 rad s⁻¹ i deformaciji od 0,5% (iz linearnog viskoelastičnog područja). Korišteno je mjerno tijelo PP50, a udaljenost od donje ploče bila je 0,500 mm. *In situ* gelirajući sustavi pomiješani su sa SNF-om u volumnom omjeru 1:1. Vrijeme ekvibracije uzorka bilo je 15 minuta. U ispitivanju se prati promjena deformacije u vremenu, pri stalnoj kutnoj frekvenciji. Rezultati se prikazuju u obliku modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') u ovisnosti o kutnoj frekvenciji (ω).



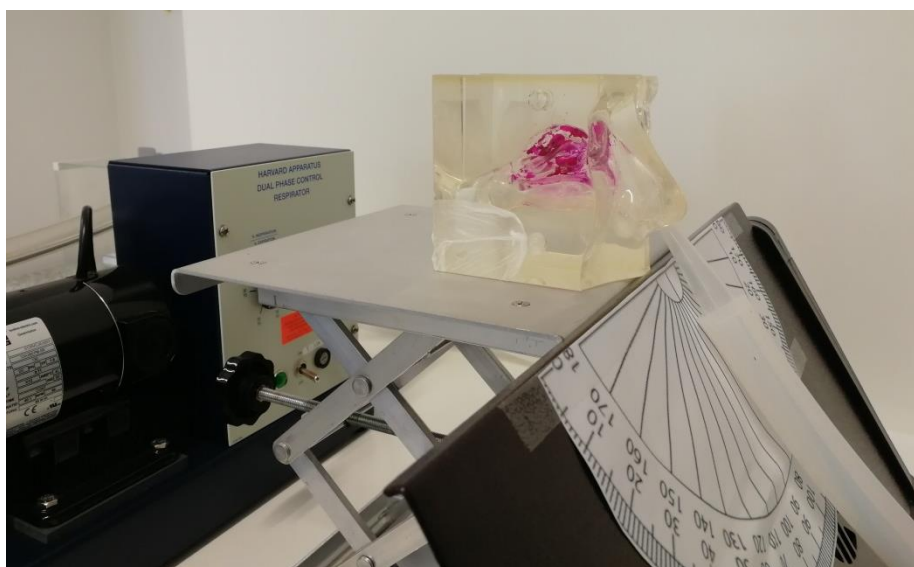
Shema 1. Hodogram pripreve uzoraka i kasnijih mjerenja (DSD-raspodjela veličina raspršenih kapljica)

3.2.6. Određivanje profila nazalne depozicije *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom

Za određivanje profila depozicije korišten je komercijalno dostupni transparentni model nosne šupljine (Koken Co Ltd., Japan) povezan s respiratornom pumpom (Large Animal Ventilator, Harvard Apparatus, SAD). Obje strane modela premazane su Sar-gelom za vizualizaciju depozicije spreja. Respiratorna pumpa povezana je s modelom putem nosnice (Slika 16.) radi simulacije dvosmjerne (engl. *bidirectional*) primjene lijeka. Simuliranje protoka zraka kroz nosnu šupljinu osigurano je sljedećim postavkama respiratorne pumpe: volumen udahnutog zraka 700 ml, omjer trajanja udaha i izdaha 25:75, pri 30 udaha u minuti. Uzorak je raspršen u slobodnu nosnicu. Raspršivač je prethodno pripremljen s nekoliko potisaka u zrak, kako bi se osigurala preciznost raspršene doze. Prolaz prema usnoj šupljini zatvoren je parafilmom (Parafilm M, Laboratory Film SAD, Brand GMBG + CO KG, Njemačka) kako bi se simuliralo podizanje mekog nepca pri izdahu te stvorio zatvoreni sustav. Kut pod kojim je raspršivač unesen u nosnicu, odnosno kut primjene, variran je u odnosu na horizontalnu i vertikalnu ravninu. Kutovi u odnosu na horizontalnu ravninu iznosili su 45° i 60°, dok su kutovi prema vertikalnoj ravnini bili 0° i 20°, gledano od septuma. Uzorak je raspršen u nosnu

šupljinu tijekom faze udaha na respiratornoj pumpi, kako bi se ispitao put raspršenog *in situ* gelirajućeg sustava u nosnoj šupljini pod utjecajem dvosmjernog protoka zraka. Sar-Gel[®] je zbog svojih svojstava promjene boje u kontaktu s vodom služio za vizualizaciju depozicije.

Usporedbe radi, odabrani uzorak primijenjen je raspršivanjem u nosnu šupljinu metodom jednosmjerne dostave (klasičnom primjenom spreja), pri čemu je respiratorna pumpa spojena na model sa strane nazofarinksa, simulirajući jednosmjerno strujanje zraka kroz nosnicu u koju je lijek primijenjen, odnosno udah. Druga nosnica zatvorena je Parafilmom. Postavke respiratorne pumpe odgovarale su postavkama pri simulaciji dvosmjerne dostave lijeka.



Slika 16. Jedinica za određivanje nazalne depozicije *in vitro* pri dvosmjernoj primjeni

4. Rezultati

4.1. Osnovna svojstva *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom

In situ gelirajući sustavi uspješno su pripremljeni kao suspenzije flutikazonpropionata u vodenoj otopini polimera (pektina, natrijevog hijaluronata i/ili gelan gume) uz Tween 80 kao površinski aktivnu tvar, postupkom prikazanim u poglavlju 3.2.1. Sastav pripremljenih *in situ* gelirajućih suspenzija prikazan je u Tablici 2. pH vrijednost uzoraka podešena je na $6,0 \pm 0,2$. Veličina čestica suspendiranog lijeka bila je u rasponu od $1,52 \pm 0,02$ do $1,85 \pm 0,04$ μm , dok je osmolalnost podešena dodatkom manitola. Pripremljeni *in situ* gelirajući sustavi prikladnih su osnovnih svojstava za nazalnu primjenu. Daljnja karakterizacija u vidu određivanja kuta raspršenja, reoloških svojstava i profila depozicije neophodna je za procjenu svojstava spreja i terapijskog potencijala pripremljenih sustava, uzimajući u obzir planirani način/mjesto primjene.

4.2. Raspodjela veličina kapljica i kut raspršenja *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom

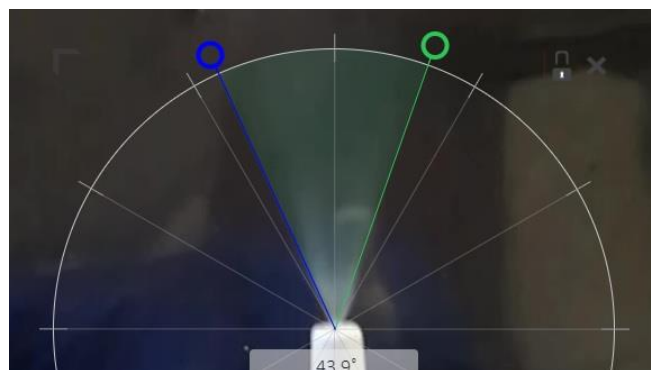
Raspodjela veličina kapljica određena je na uređaju SprayTec pri ručnom raspršivanju korištenjem nazalnog raspršivača Spray pump 3K. Vrijednosti volumnih primjera Dv10, Dv50 i Dv90 bile su u rasponu redom od $24,01 \pm 0,89$ μm do $36,82 \pm 0,93$, od $74,47 \pm 3,88$ do $123,70 \pm 3,32$ μm te od $162,73 \pm 7,26$ do $249,27 \pm 4,26$ μm (Tablica 3.). Veličina raspršenih kapljica rasla je s porastom sadržaja polimera u sustavu.

Određivanje kuta raspršenja provedeno je korištenjem raspršivača Spray Pump 3K (volumen doziranja 140 μL). Uzorci su raspršeni ispred tamne pozadine. Proces raspršivanja sniman je kamerom te je, uz pomoć usporene snimke, određen trenutak u kojem je raspršenje bilo maksimalno, odnosno kada je potisnik raspršivača bio u krajnjem položaju. Kut raspršenja određen je pomoću virtualnog kutomjera (Slika 17.). Sva mjerenja provedena su u triplikatu, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 18.

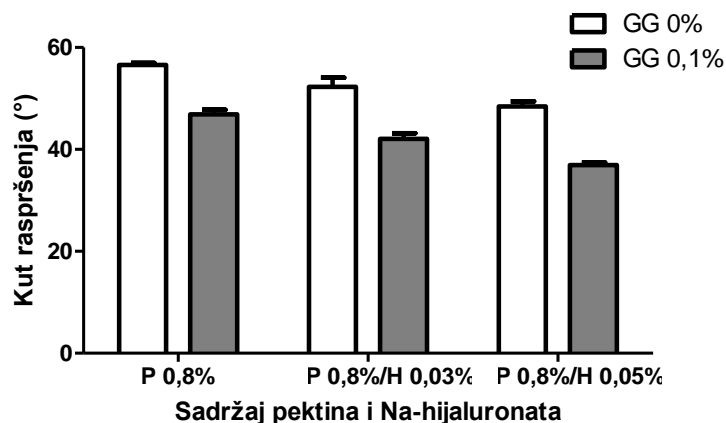
Tablica 3. Raspodjela veličina raspršenih kapljica *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata

Uzorak	Pektin (%, <i>m/m</i>)	Na- hijaluronat (%, <i>m/m</i>)	Gelan guma (%, <i>m/m</i>)	Dv10 (μm)	Dv50 (μm)	Dv90 (μm)
P	0,8	-	-	24,01±0,89	74,47±3,88	162,73±7,26
PH1	0,8	0,03	-	33,58±1,42	112,40±3,98	230,03±8,15
PH2	0,8	0,05	-	34,69±0,95	118,83±3,44	249,27±4,26
PG	0,8	-	0,1	24,55±0,78	85,75±3,78	188,87±4,95
PGH1	0,8	0,03	0,1	33,11±0,27	113,90±2,55	234,10±4,69
PGH2	0,8	0,05	0,1	36,82±0,93	123,70±3,32	247,53±5,82

Dv10, Dv50, Dv90 – volumni promjeri raspršenih kapljica. Prikazane su srednje vrijednosti±SD (n=3).



Slika 17. Određivanje kuta raspršenja *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata pripravljene pri koncentracijama pektina, gelan gume i natijevog hijaluronata od 0,8, 0,1 i 0,03% *m/m* (uzorak PGH1).



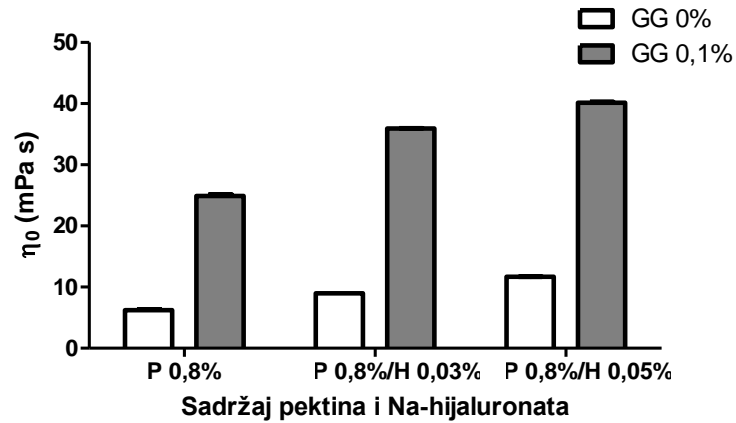
Slika 18. Ovisnost kuta raspršenja *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata o sadržaju pektina (P), natrijevog hijaluronata (H) i gelan gume (GG). Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD (n=3).

Kut raspršenja *in situ* gelirajućih suspenzija kretao se u rasponu od $36,9 \pm 0,5^\circ$ do $56,6 \pm 0,4^\circ$. Smanjenje promatranog parametra uočeno je s porastom koncentracije natrijevog hijaluronata u sustavu kao i uslijed dodatka gelan gume.

4.3. Reološka svojstva *in situ* gelirajućih sustava prije i nakon geliranja

4.3.1. Određivanje viskoznosti u mirovanju

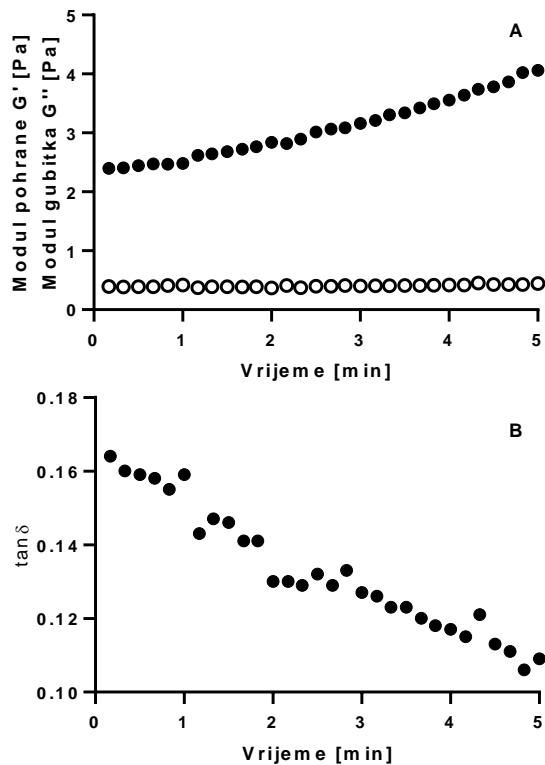
Viskoznost u mirovanju (engl. *zero shear viscosity*) *in situ* gelirajućih sustava određena je testom „puzanja“ korištenjem CP50–1 mjernog tijela pri 25°C . Pri smičnom naprezanju od 0,1 Pa kroz predodređeno vrijeme promatrana je rezultirajuća smična deformacija (do postizanja njene stalne vrijednosti). Viskoznost u mirovanju izračunata je pomoću regresijskog modela korištenjem RheoCompass softvera. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 19. Viskoznost u mirovanju *in situ* gelirajućih suspenzija bila je u rasponu od $6,23 \pm 0,12$ do $40,14 \pm 0,14$ mPa s i rasla je s porastom sadržaja polimera u sustavu, odnosno s porastom koncentracije natrijevog hijaluronata i uslijed dodatka gelan gume.



Slika 19. Ovisnost viskoznosti u mirovanju *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata o sadržaju pektina (P), natrijevog hijaluronata (H) i gelan gume (GG). Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD (n=3).

4.3.2. Vrijeme geliranja i čvrstoća gelova

Vrijeme geliranja određeno je oscilacijskim testom vremena geliranja (engl. *Gelation time test*) uz mjerno tijelo PP50 pri 34°C, nakon miješanja *in situ* gelirajućeg sustava s umjetnim nosnim fluidom (SNF-om) u volumnom omjeru 1:1. Za sve *in situ* gelirajuće suspenzije uočeno je trenutno geliranje, s obzirom da je već u trenutku $t = 0$ modul pohrane bio veći od modula gubitka ($G' > G''$; Slika 20a.), odnosno vrijednost faktora gubitka ($\tan \delta$) manji od 1 (Slika 20b.) To znači da pripravljene suspenzije trenutno geliraju u kontaktu s kalcijevim ionima sadržanim u SNF-u pri fiziološkoj koncentraciji, čime je omogućeno predviđanje ponašanja tih sustava u kontaktu s nosnom sluznicom.

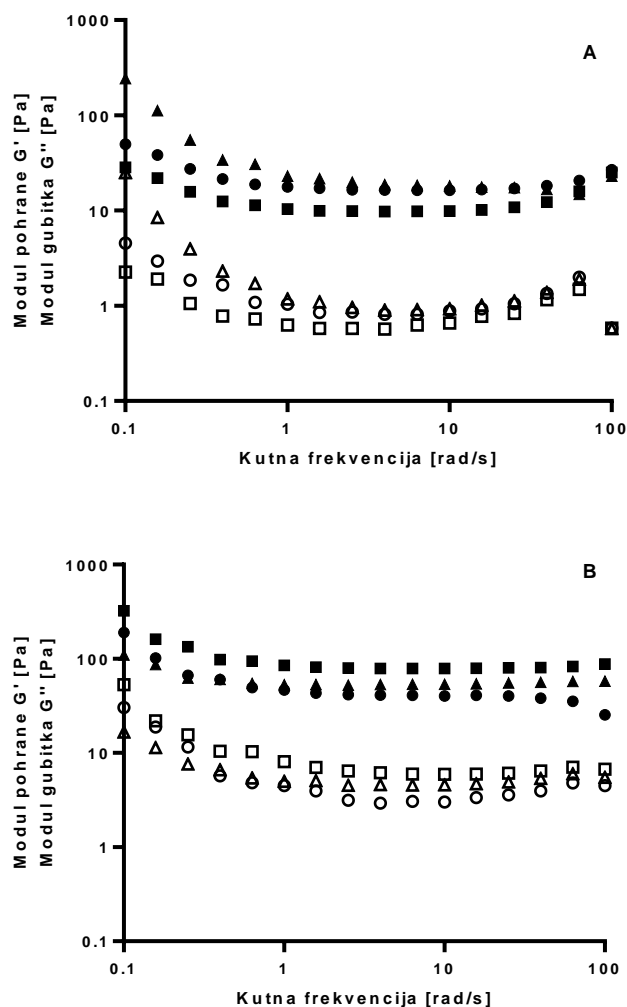


Slika 20. Reprezentativni prikaz ovisnosti modula pohrane (puni znak) i modula gubitka (prazni znak) (a) te faktora gubitka (b) za *in situ* gelirajući sustav s flutikazonpropionatom nakon miješanja s SNF-om (1:1, v/v), o vremenu. Prikazani rezultati odnose se na *in situ* gelirajuću suspenziju pripravljenu pri koncentraciji pektina od 0,8%, m/m (uzorak P).

Gelovi su dalje karakterizirani s obzirom na stabilnost/čvrstoću oscilacijskim testom promjene frekvencije (engl. *Frequency sweep test*), uz PP50, pri temperaturi od 34°C i kutnoj frekvenciji (ω) od 6,28 rad s⁻¹. Sva mjerenja provedena su u triplikatu. Profili ovisnosti modula pohrane i modula gubitka o kutnoj frekvenciji za sve pripravljene gelove prikazani su na Slici 21.

Mjerenjima je pokazano da *in situ* gelirajući sustavi nakon miješanja s SNF-om tvore slabe gelove, s obzirom da je G' kod svih gelova za jedan red veličine veći od G'' . U testu promjene frekvencije, za uzorke P, PH1 i PH2 (pripravljene bez gelan gume), razlike između modula pohrane (G') i gubitka (G'') na kraju mjerenja redom su iznosile su 26,2, 24,5 i 13,0 Pa. Za uzorke PG, PGH1 i PGH2 (pripravljene s gelan gumom) razlike između modula pohrane (G') i gubitka (G'') na kraju mjerenja redom su iznosile 31,0, 74,7 i 51,4 Pa. Iz navedenih podataka vidljivo je da je razlika G' i G'' veća u sustavima s gelan gumom nego u sustavima pripravljenim samo sa pektinom i natrijevim hijaluronatom. Usporedbom odgovarajućih *in situ* gelirajućih suspenzija pripravljenih sa i bez gelan gume (P vs PG; PH1

vs PGH1; PH2 vs PGH2) može se zaključiti da su moduli pohrane i gubitka sustava s gelan gumom značajno viših vrijednosti. Grupni prikazi uzoraka pripremljenih bez (Slika 21a.) i sa gelan gumom (Slika 21b.) pokazuju slične vrijednosti unutar oba skupa uzoraka što znači da sama koncentracija natrijevog hijaluronata nije značajnije utjecala na G' i G'' .



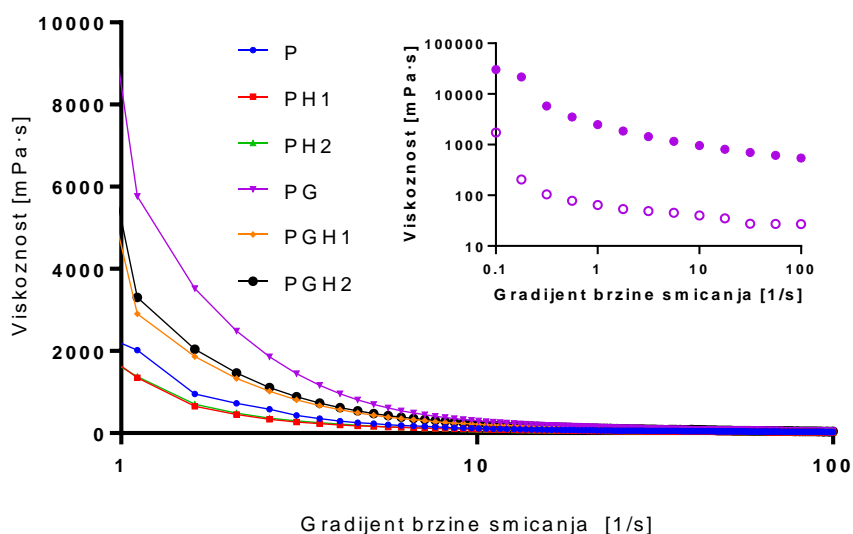
Slika 21. Ovisnost modula pohrane (G' ; puni znak) i modula gubitka (G'' ; prazni znak) *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom nakon miješanja s SNF-om, o kutnoj frekvenciji.

In situ gelirajuće suspenzije pripravljene su bez gelan gume (a) i sa gelan gumom (0,1% *m/m*; b) pri koncentraciji natrijevog hijaluronata od 0% (●), 0,03%, *m/m*(■), i 0,05%, *m/m* (▲).

4.3.3. Krivulje viskoznosti prije i nakon geliranja

Određene su i krivulje viskoznosti (engl. *viscosity curve*) rotacijskim testom koji pokazuje kako se uzorak ponaša pri različitim brzinama smicanja ($\dot{\gamma}$). Krivulje viskoznosti *in situ*

gelirajućih sustava određene su prije i nakon miješanja s SNF-om (Slika 22.). Mjerenja su rađena pri fiziološkoj temperaturi nosne sluznice (34°C) u triplikatu, a prikazana je srednja vrijednost. Utvrđeno je pseudoplastično ponašanje sustava prije i nakon geliranja, pri gradijentu brzine smicanja od 1 do 100 s⁻¹. Usporedbom profila ovisnosti viskoznosti o brzini smicanja za odgovarajuće *in situ* gelirajuće suspenzije prije i nakon miješanja s SNF-om (Slika 22 - umetak.), može se uočiti značajni porast viskoznosti formulacija uslijed geliranja. Veći porast viskoznosti zabilježen je kod *in situ* gelirajućih suspenzija koje su sadržavale gelan gumu.



Slika 22. Ovisnost viskoznosti *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom nakon miješanja s SNF-om, o brzini smicanja. *In situ* gelirajuće suspenzije pripravljene su pri koncentraciji pektina od 0,8%, *m/m* (P), gelan gume od 0 ili 0,1%, *m/m* (G) te natrijevog hijaluronata od 0, 0,03 (H1) ili 0,05%, *m/m* (H2). Oznake P, G, H1 i H2 sadržane su u nazivima uzoraka opisujući njihov sastav.

Umetak: usporedba krivulje viskoznosti *in situ* gelirajućeg sustava s pektinom (0,8%, *m/m*) i gelan gumom (0,1%, *m/m*; uzorak PG) prije (prazni znak) i nakon miješanja (puni znak) s SNF-om.

Istim rotacijskim testom kojim je određivana krivulja viskoznosti, dobivena je i vrijednost graničnog smičnog naprezanja (engl. *yield point*) *in situ* gelirajućih suspenzija nakon miješanja s SNF-om, odnosno smičnog naprezanja pri kojem sustav počinje teći. Ta vrijednost dobivena je regresijskom metodom po Binghamovoj jednadžbi. Rezultati su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Granično smično naprezanje *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata u ovisnosti o polimernom sastavu.

Uzorak	Pektin (%, <i>m/m</i>)	Na-hijaluronat (%, <i>m/m</i>)	Gelan guma (%, <i>m/m</i>)	Granično smično naprezanje τ_0 (Pa)
P	0,8	-	-	1,06 ± 0,01
PH1	0,8	0,03	-	0,89 ± 0,07
PH2	0,8	0,05	-	0,84 ± 0,02
PG	0,8	-	0,1	1,92 ± 0,63
PGH1	0,8	0,03	0,1	2,16 ± 0,12
PGH2	0,8	0,05	0,1	2,50 ± 0,22

Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n=3).

Vrijednosti graničnog smičnog naprezanja kretale su se u rasponu od 0,84 ± 0,02 Pa do 2,50 ± 0,22 Pa. Gelovi koji u svom sastavu imaju gelan gumu karakterizirani su značajno većom vrijednošću graničnog smičnog naprezanja u odnosu na gelove koji ne sadrže gelan gumu. Istodobno, promjena koncentracije natrijevog hijaluronata nije rezultirala značajnijom promjenom graničnog smičnog naprezanja.

4.4. Nazalna depozicija *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom

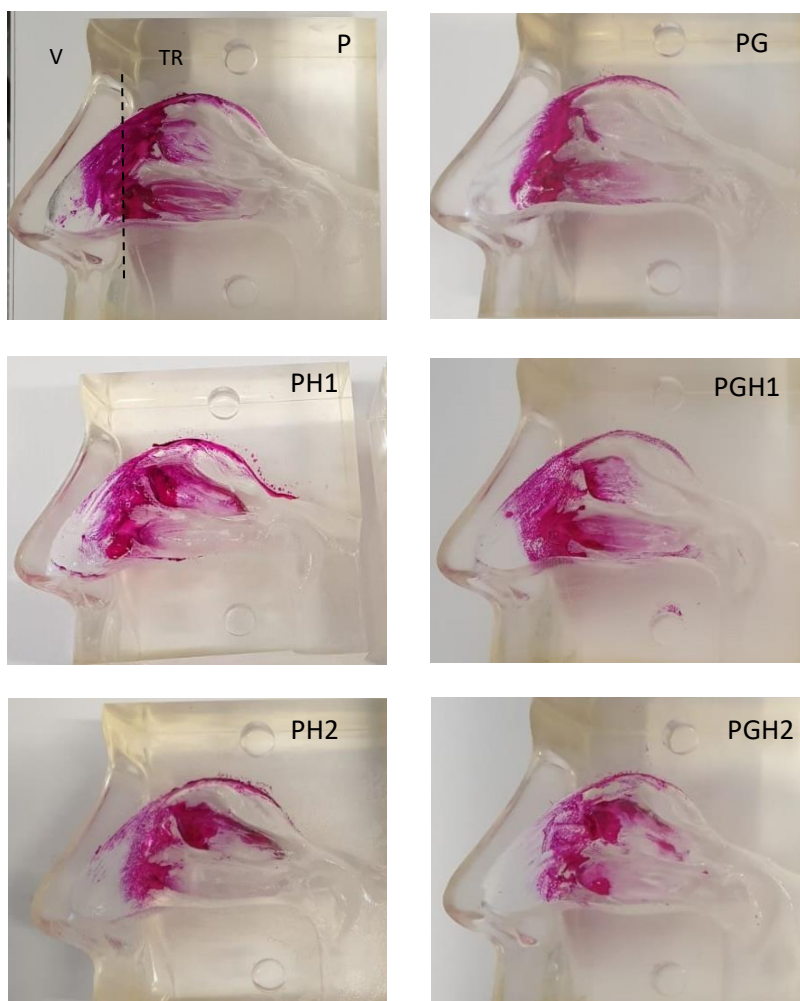
Za određivanje profila depozicije raspršenih *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata korišten je komercijalno dostupni transparentni model nosne šupljine sa zatvorenim prolazom prema usnoj šupljini, te povezan s respiratornom pumpom putem jedne od nosnica. Za vizualizaciju depozicije spreja korišten je Sar-gel[®] koji u kontaktu s vodom mijenja boju u ružičastu. Ispitivanje je provedeno metodom dvosmjerne primjene, simulirajući uvjete u nosnoj šupljini koji se javljaju pri aktiviranju uređaja za nazalnu primjenu lijeka izdahom. Kutovi primjene varirani su s obzirom na horizontalnu i vertikalnu ravninu. Kutovi u odnosu na horizontalnu ravninu iznosili su 45° i 60°, a kutovi u odnosu na vertikalnu ravninu 0° i 20° gledano od septuma. Raspršivač je bio primijenjen u slobodnu nosnicu pri strujanju zraka u trenutku faze udaha respiratorne pumpe (čime je simulirano strujanje zraka pri upuhivanju izdahnutog zraka u nosnu šupljinu: zrak najprije struji u smjeru nazofarinksa kroz

prvu nosnicu, a kroz drugu nosnicu izlazi van) kako bi ga podtlak koji se stvorio od zatvaranja epiglotisa i dvosmjernog prolaska zraka odnio što dalje u nosnu šupljinu.

Sva mjerenja su napravljena u triplikatu, a promatrana je dostava u područje srednje i gornje nosne školjke u turbinatnoj regiji.

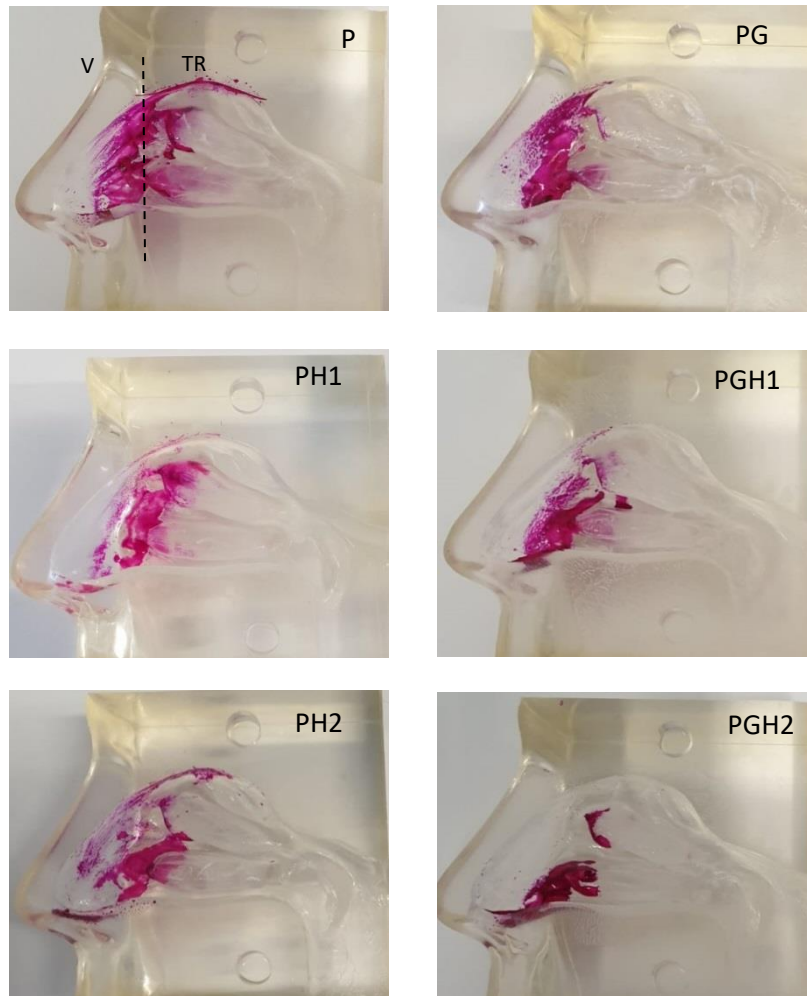
Pri kutovima od 0 i 45° redom u odnosu na vertikalnu i horizontalnu ravninu uočeno je da je znatan dio raspršene doze dostavljen u područje iza nosne valvule (Slika 23.). S druge strane, kada se kut u odnosu na vertikalnu ravninu poveća na 20° (gledano od septuma) lako se može primijetiti da se većina raspršene doze zadržala na srednjoj ili donjoj nosnoj školjci i nije putovala preduboko u nosnu šupljinu (Slika 24.). Kut od 60° u odnosu na horizontalnu ravninu povoljniji je za ciljanje gornje nosne školjke, a u kombinaciji s kutom od 0° u odnosu na vertikalnu ravninu pokazuje bolja svojstva putovanja čestica i depozicije u dubljim dijelovima turbinatne regije (Slika 25.), u odnosu na odgovarajući kut od 20° (Slika 26.), kada značajni dio raspršene doze uopće ne prijeđe granicu nosne valvule. Pregledom profila depozicije, vidljivo je i smanjenje pokrivenosti turbinatnog područja u nizu raspršenih uzoraka koji sadrže gelan gumu, za razliku od onih koji sadrže samo natrijev hijaluronat.

0°/45°



Slika 23. Depozicija raspršenih *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata u turbinatnom području, pri primjeni pod kutom od 0° i 45° redom prema vertikalnoj i horizontalnoj ravnini, metodom dvosmjerne dostave. *In situ* gelirajuće suspenzije pripravljene su pri koncentraciji pektina od 0,8%, *m/m* (P), gelan gume od 0 ili 0,1%, *m/m* (G) te natrijevog hijaluronata od 0, 0,03 (H1) ili 0,05%, *m/m* (H2). Oznake P, G, H1 i H2 sadržane su u nazivima uzoraka opisujući njihov sastav.
V - vestibul; TR - turbinatno područje nosne šupljine.

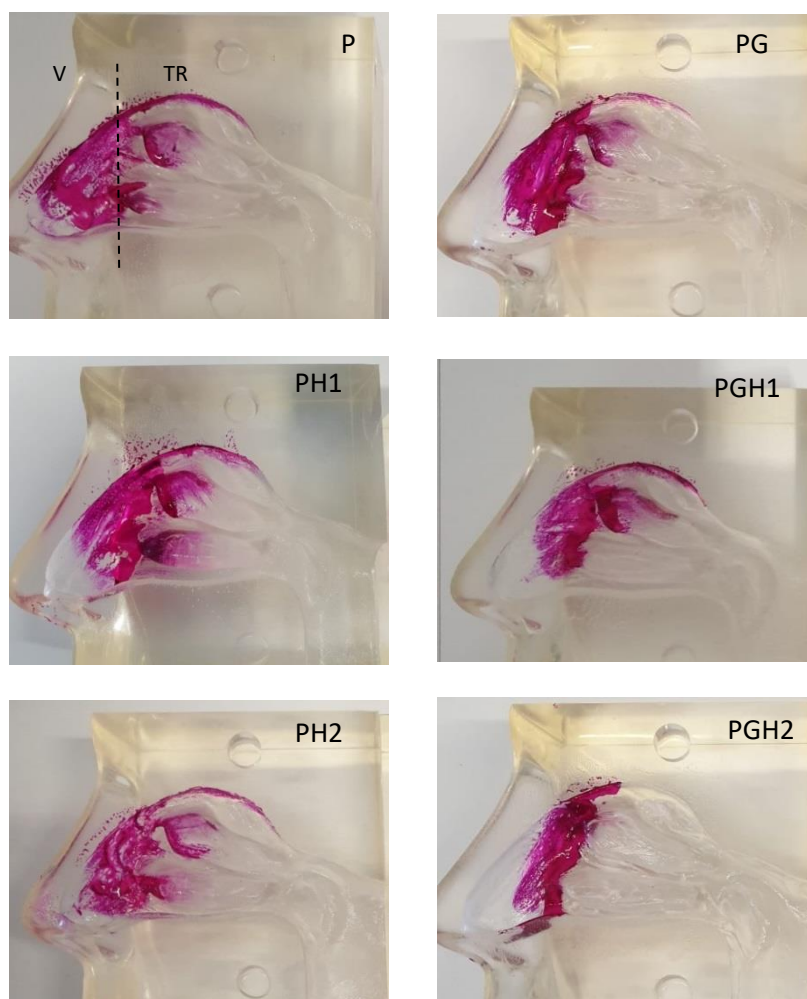
20°/45°



Slika 24. Depozicija raspršenih *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata u turbinatnom području, pri primjeni pod kutom od 20° i 45° redom prema vertikalnoj i horizontalnoj ravnini, metodom dvosmjerne dostave. *In situ* gelirajuće suspenzije pripravljene su pri koncentraciji pektina od 0,8%, *m/m* (P), gelan gume od 0 ili 0,1%, *m/m* (G) te natrijevog hijaluronata od 0, 0,03 (H1) ili 0,05%, *m/m* (H2). Oznake P, G, H1 i H2 sadržane su u nazivima uzoraka opisujući njihov sastav.

V - vestibul; TR - turbinatno područje nosne šupljine.

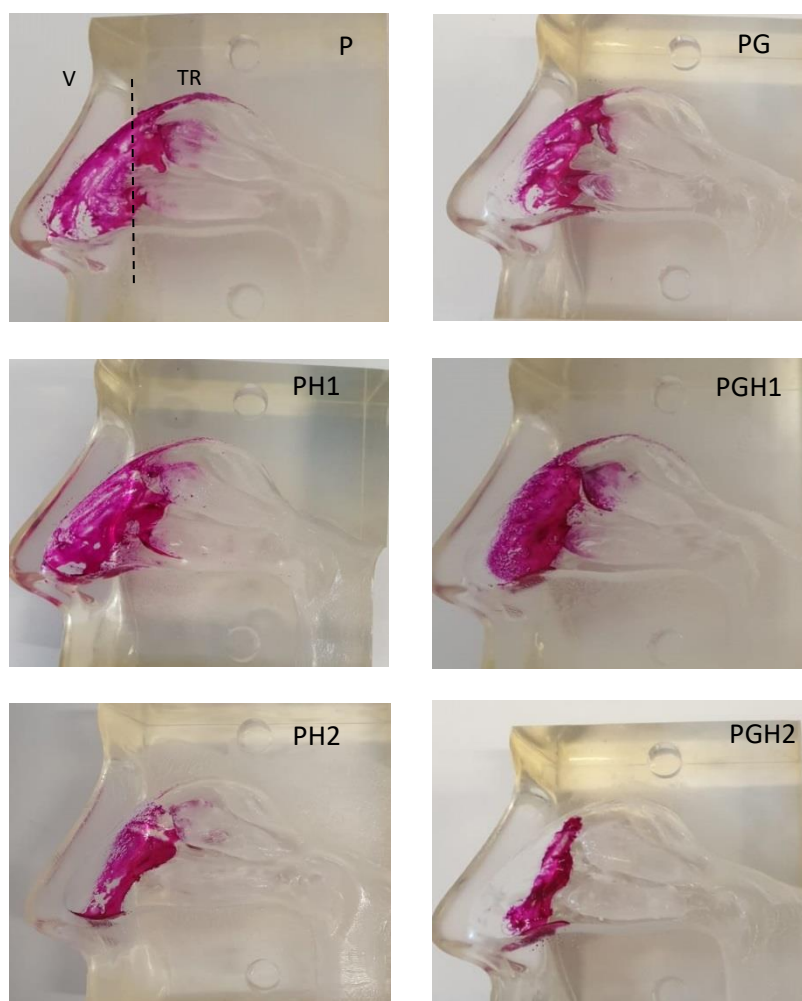
0°/60°



Slika 25. Depozicija raspršenih *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata u turbinatnom području, pri primjeni pod kutom od 0° i 60° redom prema vertikalnoj i horizontalnoj ravnini, metodom dvosmjerne dostave. *In situ* gelirajuće suspenzije pripravljene su pri koncentraciji pektina od 0,8%, *m/m* (P), gelan gume od 0 ili 0,1%, *m/m* (G) te natrijevog hijaluronata od 0, 0,03 (H1) ili 0,05%, *m/m* (H2). Oznake P, G, H1 i H2 sadržane su u nazivima uzoraka opisujući njihov sastav.

V - vestibul; TR - turbinatno područje nosne šupljine.

20°/60°

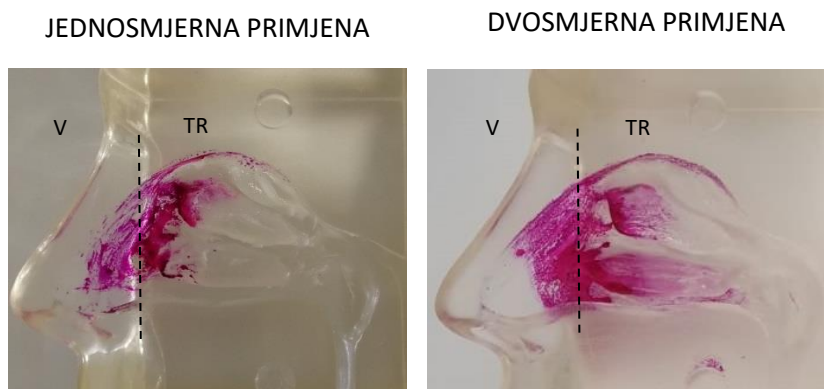


Slika 26. Depozicija raspršenih *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata u turbinatnom području, pri primjeni pod kutom od 20° i 60° redom prema vertikalnoj i horizontalnoj ravnini, metodom dvosmjerne dostave. *In situ* gelirajuće suspenzije pripravljene su pri koncentraciji pektina od 0,8%, *m/m* (P), gelan gume od 0 ili 0,1%, *m/m* (G) te natrijevog hijaluronata od 0, 0,03 (H1) ili 0,05%, *m/m* (H2). Oznake P, G, H1 i H2 sadržane su u nazivima uzoraka opisujući njihov sastav.

V - vestibul; TR - turbinatno područje nosne šupljine.

Na Slici 27. prikazana je usporedba profila depozicije *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata pripravljene iz pektina (0,8%, *m/m*), natrijevog hijaluronata (0,03%, *m/m*) i gelan gume (0,1%, *m/m*), pri jednosmjernoj i dvosmjernoj dostavi *in vitro*, pri istim kutovima primjene u odnosu na horizontalnu i vertikalnu ravninu (redom 0° i 45°). Pri

dvosmjernoj dostavi postignuta je depozicija u znatno dubljim dijelovima turbinatnog područja nego u slučaju jednosmjerne dostave.



Slika 27. Depozicija raspršene *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata u turbinatnom području, pri primjeni pod kutom od 0° i 45° redom prema vertikalnoj i horizontalnoj ravnini, metodom jednosmjerne (lijevo) i dvosmjerne dostave (desno). *In situ* gelirajuća suspenzija pripravljena je iz pektina (0,8%, *m/m*), natrijevog hijaluronata (0,03%, *m/m*) i gelan gume (0,1%, *m/m*) (uzorak PGH1).

V - vestibul; TR - turbinatno područje nosne šupljine.

5. Rasprava

5.1. Priprava *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom

Suspencije su uspješno pripravljene korištenjem mikroniziranog flutikazonpropionata, Tween-a 80 kao površinski aktivne tvari/sredstva za suspendiranje, te pektina, natrijevog hijaluronata i/ili gelan gume kao konstitutivnih polimera. Flutikazonpropionat je teško topljiv u vodi (0,51 mg/L, karakterizirano kao netopljivo [61]) i sukladno tome tvori suspencije [62]. Takve suspencije izrađuju se uz površinski aktivne tvari koje omogućuju suspendiranje/močenje čestica lijeka, a mogu se i dodatno stabilizirati polimerima koji povećavaju viskoznost sustava i time usporavaju taloženje suspendiranih čestica [63]. Tween 80 korišten je kao površinski aktivna tvar u izradi odobrenih konvencionalnih suspencija flutikazonpropionata [64], a svi korišteni polimeri poznati su po svojoj biokompatibilnosti i širokim mogućnostima primjene u biomedicinskom području [27], [65], [66].

Nižić i suradnici sustavno su ispitivali utjecaj koncentracije flutikazonpropionata i Tween-a 80 te konstitutivnih polimera (pektina, natrijevog hijaluronata i gelan gume) na svojstva *in situ* gelirajuće suspencije flutikazonpropionata primjenom statističkog dizajna eksperimenata [33] te uspostavili regresijske modele odnosa uključenih parametara i varijabli odaziva. Razine formulacijskih parametara u ovom ispitivanju odabrane su temeljem uspostavljenih regresijskih modela. Iznimka je koncentracija pektina (0,8%, *m/m*) koja je postavljena iznad ispitivanog raspona koncentracija unutar DoE (0,5-0,7%, *m/m*; [33]).

Suspencije imaju početni pH $4,3 \pm 0,2$, koji im je otopinom NaOH povećan na vrijednost $6,0 \pm 0,2$. Osmolalnost uzoraka podešena je dodatkom manitola [33]. S obzirom na fiziološke vrijednosti pH nosne sluznice i ciljanu osmolalnost nazalnih pripravaka, razvijene suspencije prikladne su za nazalnu primjenu [67]. Daljnja karakterizacija u vidu određivanja viskoznosti u mirovanju, veličine raspršenih kapljica, kuta raspršenja, vremena geliranja, krivulje viskoznosti, čvrstoće gela, i profila depozicije u nosnoj šupljini neophodna je za utemeljenu procjenu terapijskog potencijala pripremljenih sustava, uzimajući u obzir planirani način/mjesto primjene [68]. Poznavanje reoloških svojstava ključno je za *in situ* gelirajuće sustave koji se primjenjuju raspršivanjem. Takvi sustavi moraju pokazivati svojstva tekućina dok se nalaze u raspršivaču, a u kontaktu s nosnom sluznicom moraju stvarati gel. Gel nastaje na mjestu primjene (*in situ*) i mora pokazivati određena reološka svojstva kako bi omogućio dulje zadržavanje na mjestu primjene i oslobađanje djelatne tvari prikladnom brzinom, a bez narušavanja homeostaze u nosnoj šupljini i bez stvaranja osjećaja nelagode koji bi mogao smanjiti adherenciju/suradljivost bolesnika. Preslabi gel mogao bi imati svojstva slična otopinama, te curiti kroz nosnice ili odlaziti u ždrijelo, čime se gubi velika količina djelatne

tvori s mjesta primjene, povećava frakcija koja se apsorbira kroz probavni sustav, te razvija mogućnost javljanja neugodnog okusa [68].

Zbog svega navedenog, sukladno pristupu u radu Nižić i suradnika [33], pripravljene *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata dalje su karakterizirane s obzirom na reološka svojstva prije (viskoznost u mirovanju i pri gradijentu brzine smicanja), u vrijeme (točka/vrijeme geliranja) i nakon geliranja (krivulja viskoznosti, granično smično naprezanje, čvrstoća gela). Ponašanje uzoraka pri raspršivanju karakterizirano je i određivanjem veličine raspršenih kapljica i kuta raspršenja.

5.2. Reološka svojstva *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom

Poznavanje viskoznosti u mirovanju i pri gradijentu brzine smicanja *in situ* gelirajućih sustava, omogućava predviđanje njihove fizičke stabilnosti, resuspendibilnosti i mogućnosti raspršivanja.

Viskoznost u mirovanju *in situ* gelirajućih suspenzija bila je u rasponu od $6,23 \pm 0,12$ do $40,14 \pm 0,14$ mPa s i rasla je s porastom sadržaja polimera u sustavu, odnosno s porastom koncentracije natrijevog hijaluronata i uslijed dodatka gelan gume. U prethodnom istraživanju uočeno je da viskoznosti sustava pripremljenog iz više polimera može pridonijeti i interakcija raznovrsnih polimera, što se opisuje mogućim zaplitanjem polimernih lanaca i njihovim interakcijama koje mogu biti hidrofobne, vodikove, inter- i intramolekularne [26], [33]. Zamijećeno je i sporije taloženje suspendiranih čestica lijeka u sustavima veće viskoznosti. Istovremeno, neovisno o viskoznosti u mirovanju, svi uzorci su se mogli u potpunosti resuspendirati, čemu zasigurno doprinosi i pseudoplastično ponašanje pripremljenih suspenzija (Slika 22.-umetak). Naime, pri mućkanju istaloženih suspenzija, smanjuje se njihova viskoznost, čime se omogućava potpuno resuspendiranje istaloženih čestica lijeka.

5.3. Raspodjela veličina kapljica i kut raspršenja *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom

Raspodjela veličina kapljica i kut raspršenja karakteristike su koje pomažu u predviđanju mogućeg depozicijskog profila u nosnoj šupljini. Ovisni su o formulacijskim parametrima ali i značajkama raspršivača. Vrijednosti volumnih primjera Dv_{10} , Dv_{50} i Dv_{90} bile su u rasponu redom od $24,01 \pm 0,89$ μm do $36,82 \pm 0,93$, od $74,47 \pm 3,88$ do $123,70 \pm 3,32$ μm te od $162,73 \pm 7,26$ do $249,27 \pm 4,26$ μm (Tablica 3.). Raspodjela veličina kapljica definirana navedenim volumnim promjerima odgovara zahtjevima vezanim uz nazalnu primjenu

raspršenih sustava, pri čemu glavnina čestica mora biti veća od 10 μm kako bi se osigurala lokalizirana depozicija u nosnoj šupljini [69]. Uočen je porast veličine raspršenih kapljica s porastom sadržaja polimera u sustavu, što se može objasniti većom viskoznošću raspršivanih uzoraka [33].

Kut raspršenja *in situ* gelirajućih suspenzija kretao se u rasponu od $36,9 \pm 0,5^\circ$ do $56,6 \pm 0,4^\circ$, što je u skladu literaturnim podacima za sustave čija viskoznost ovisi o koncentraciji polimera [70]. Prema očekivanjima, kut raspršenja smanjivao se s porastom sadržaja polimera u sustavu. Sukladno tome, najmanja vrijednost kuta raspršenja zabilježena je za uzorak s većom koncentracijom natrijevog hijaluronata koji usto sadrži i gelan gumu (Slika 18.).

Smanjenjem kuta raspršenja povećava se udio raspršene doze koji dosegne turbinatnu regiju [10], [33], [71], odnosno smanjuje se zaostajanje uzorka u vestibulu i općenito u prednjem djelu nosa. Literaturni podaci potvrđuju da pri klasičnoj primjeni sprejeva za nos kut raspršenja, osim o formulacijskim parametrima i svojstvima raspršivača, ovisi i o protoku zraka kroz nosnu šupljinu prilikom raspršivanja/doziranja lijeka [70]. U tom smislu može se pretpostaviti da protok zraka kroz nosnicu i pri dvosmjernoj dostavi, osim na brzinu raspršenih kapljica, utječe i na kut raspršenja te tako modulira profil depozicije.

5.4. Vrijeme geliranja *in situ* gelirajućih sustava s flutikazonpropionatom

Vrijeme geliranja *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata određeno je vremenskim testom geliranja pri čemu je sjecište krivulja koje prikazuju vrijednosti modula pohrane i gubitka u ovisnosti o vremenu ($G'=G''$) uzeto kao točka geliranja. Takav pristup uobičajeno se koristi pri reološkoj karakterizaciji terapijskih sustava [46]. Naime, kod sustava u sol fazi modul pohrane manji je od modula gubitka ($G' < G''$), dok kod gelova vrijedi obrnuto ($G' > G''$).

Svi pripremljeni *in situ* gelirajući sustavi osigurali su trenutno geliranje u kontaktu s Ca^{2+} ionima ($G' > G''$ za $t = 0$; Slika 20a.), što je u skladu s očekivanjima. U radu je prikazana i ovisnost faktora gubitka ($\tan \delta$) o vremenu. Vrijednost $\tan \delta$ označava tangens omjera G'' i G' , tako da viskoelastične sustave (gelove) karakterizira vrijednost $\tan \delta < 1$ (Slika 20b.). Naime, tako su se ponašali i svi sustavi pripremljeni u ranijem ispitivanju pri nižoj koncentraciji pektina, neovisno o sadržaju drugih polimera [33]. U ispitivanju je korišten niskometoksilirani amidirani pektin koji, za razliku od nemodificiranog pektina, gelira uslijed umrežavanja polimernih lanaca Ca^{2+} ionima neovisno o pH [26], [27]. Biorelevantni uvjeti pri određivanju vremena geliranja *in vitro* osigurani su termostatiranjem uzoraka pri fiziološkoj temperaturi

nosne sluznice (34°) i miješanjem *in situ* gelirajućih sustava s umjetnim nosnim fluidom koji sadrži ione K⁺, Ca²⁺ i Na⁺ u fiziološkim koncentracijama [72]. *In situ* gelirajući sustavi i SNF miješani su u omjeru 1:1, s obzirom da nosnu sluznicu prekriva oko 100 µL sluzi (fluida), što odgovara prosječnom volumenu doziranja nazalnih pripravaka [72].

Uzorci koji sadrže gelan gumu imaju veće vrijednosti modula gubitka i pohrane od uzoraka koji sadrže samo pektin te pektin i natrijev hijaluronat. Također, razlika između G' i G'' je veća za uzorke koji sadrže gelan gumu što upućuje na zaključak da su takvi uzorci veće čvrstoće [73]. Čvrstoća gelova dodatno je ispitana testom promjene frekvencije, što je raspravljeno u odjeljku 5.5.

5.5. Reološka svojstva formiranog gela

Poznavanje viskoznosti gelova u ovisnosti o brzini smicanja, graničnog smičnog naprezanja i ovisnosti viskoelastičnih modula o kutnoj frekvenciji omogućava predviđanje relativnog vremena zadržavanja oblika na mjestu primjene, stabilnosti gela i profila oslobađanja uklopljene djelatne tvari.

Krivulje viskoznosti *in situ* gelirajućih sustava prije i nakon miješanja s SNF-om ukazuju na pseudoplastično ponašanje sustava prije i nakon geliranja (Slika 22.). Kao što je već rečeno, pseudoplastičnost sustava prije geliranja predstavlja svojstvo važno za njihovo uspješno raspršivanje. S druge strane, pseudoplastičnost formiranih gelova i umjereno smanjenje viskoznosti omogućuje njihovo lakše rasprostiranje unutar ciljne regije pri smičnom naprezanju koje je posljedica treperenja cilija (sastavnog dijela mukocilijarnog aparata te protoka zraka kroz nosnu šupljinu [58]).

Značajni porast viskoznosti formulacija uslijed geliranja osigurava dulje zadržavanje na mjestu primjene. Veći utjecaj gelan gume na viskoznost formiranih gelova u odnosu na natrijev hijaluronat može se objasniti činjenicom da gelan guma, za razliku od natrijevog hijaluronata, stvara gelove u jednakim uvjetima kao i pektin (umrežavanje kationima) [74]. Tako se viskoznost gelova s gelan gumom pri brzini smicanja od 1 s⁻¹ kreće između 4500 i 9000 mPa s, dok je viskoznost gelova bez gelan gume pri istoj brzini smicanja manja od 2200 mPa s (Slika 22.).

Uz krivulju viskoznosti gelova, određena je i vrijednost graničnog smičnog naprezanja formiranih gelova (Tablica 4.), odnosno smičnog naprezanja pri kojem sustav počinje teći. Navedeni parametar pokazatelj je stabilnosti gelova. Slično kao i kod viskoznosti gelova, uočen je značajan utjecaj gelan gume na granično smično naprezanje, dok promjena

koncentracije natrijevog hijaluronata nije rezultirala značajnijom promjenom tog parametra. Učinak gelan gume ponovno se može pripisati njenom svojstvu geliranja u prisustvu kationa.

Vrijednosti graničnog smičnog naprezanja kretale su se u rasponu od $0,84 \pm 0,02$ Pa do $2,50 \pm 0,22$ Pa. Gelovi koji u svom sastavu imaju gelan gumu karakterizirani su značajno većom vrijednošću graničnog smičnog naprezanja u odnosu na gelove koji ne sadrže gelan gumu. Istodobno, promjena koncentracije natrijevog hijaluronata nije rezultirala značajnijom promjenom graničnog smičnog naprezanja. Zaključno, najveću silu bilo je potrebno primijeniti za uzorke koji imaju i najveću početnu viskoznost da bi počeli teći, a to su u ovom slučaju uzorci s gelan gumom [75]. Takvi uzorci pokazuju i puno strmiji pad viskoznosti pod djelovanjem sile, jer se lanci brzo raspetljavaju i postavljaju u smjeru tečenja. Zbog već spomenutih interakcija među polimerima u otopini, nije moguće potpuno objasniti kretanje vrijednosti u nizu uzoraka.

Karakterizacijom gelova s obzirom na čvrstoću oscilacijskim testom promjene frekvencije pokazano je da *in situ* gelirajući sustavi nakon miješanja s SNF-om tvore slabe gelove, s obzirom da je G' kod svih gelova za jedan red veličine veći od G'' (Slika 21.). Naime, modul pohrane G' prikazuje elastičnost sustava odnosno koliko sustav zadržava oblik, a modul gubitka G'' pokazuje mogućnost tečenja gela, odnosno predstavlja viskoznu komponentu sustava. Što je veća razlika u ove dvije komponente, veća je i čvrstoća gela. Značajno veće vrijednosti viskoelastičnih modula gelova koji sadrže gelan gumu u usporedbi s gelovima bez gelan gume potvrđuju njihov potencijal duljeg zadržavanja na mjestu primjene, ali i bolje kontrole oslobađanja uklopljene djelatne tvari [33].

5.6. Profil depozicije u nosnoj šupljini

Glavni cilj ovog rada bio je ispitati profil nazalne depozicije *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata nakon primjene metodom dvosmjerne dostave *in vitro*. Pojam dvosmjerne dostave odnosi se na nazalnu primjenu tekućih i praškastih oblika sadržanih u medicinskom proizvodu koji se aktivira izdahom. Naime, tvrtka OptiNose US Inc. razvila je inovativni medicinski proizvod kojim se lijek može dostaviti dublje u nosnu šupljinu u odnosu na konvencionalne sprejeve za nos. Uređaj sadrži jednokratni spremnik za lijek i dio za višekratnu upotrebu s dva nastavka, od kojih se jedan stavlja u nosnicu, a drugi u usta, pri čemu se izdahom lijek iz spremnika unosi u nosnu šupljinu. Prilikom izdaha podiže se meko nepce odvajajući nosnu od usne šupljine, što omogućava dvosmjerno strujanje zraka: pri upuhivanju izdahnutog zraka u nosnu šupljinu zrak najprije struji u smjeru nazofarinksa kroz prvu nosnicu, a kroz drugu nosnicu izlazi van (Slika 2.) [7]. Dvosmjerno strujanje zraka predstavlja jednu od glavnih razlika u odnosu na konvencionalnu nazalnu primjenu lijekova,

te pospješuje depoziciju primijenjenog lijeka dublje u nosnoj šupljini [7]. Istraživanje Xi i suradnika pokazuje učinkovitiju dostavu lijeka dvosmjernom primjenom u kombinaciji s nebulizatorom u turbinatnu i u olfaktornu regiju pri čemu je također simuliran dvosmjerni protok zraka [76].

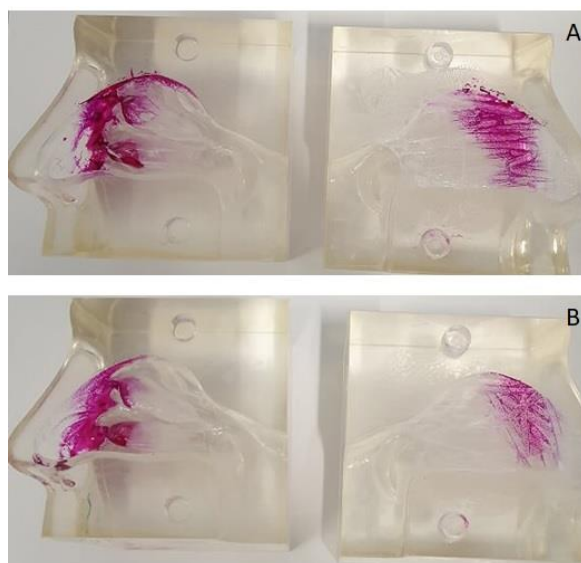
Za ispitivanje profila depozicije korišten je komercijalno dostupni model nosne šupljine. U istraživanjima usmjerenim na profil nazalne depozicije lijeka uglavnom se koriste *in vitro* modeli nosne šupljine. Treba napomenuti da vrijednosti između radova nisu u potpunosti usporedive zbog malih razlika u unutrašnjoj građi modela nosa koji je korišten u istraživanju. Istraživanja rađena na životinjskim modelima nisu potpuno reprezentativna za ljude zbog drugačije građe nosnih prostora [33]. Kao dodatni alat koristi se matematičko modeliranje [77].

U ovom radu dvosmjerno strujanje zraka simulirano je korištenjem modela nosne šupljine sa zatvorenim prolazom prema usnoj šupljini, povezanog s respiratornom pumpom putem jedne od nosnica. Ispitan je i utjecaj kuta primjene spreja u odnosu na horizontalnu ravninu (45 i 60°) i vertikalnu ravninu (0 i 20° ; gledano od septuma). Literaturno se navodi da je maksimalni kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu koji još ne predstavlja pacijentu neugodu između 55 i 75° [78]. Kutovi od 0 i 20° najčešće su ispitivani kutovi u odnosu na vertikalnu ravninu [33], [56]. Simuliranje uvjeta dvosmjernog strujanja zraka provedeno je primjenom spreja u slobodnu nosnicu u trenutku udaha respiratorne pumpe: zrak najprije struji u smjeru nazofarinksa kroz prvu nosnicu, a kroz drugu nosnicu izlazi van.

Profili depozicije *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata određeni su pri svim kombinacijama variranih kutova primjene (Slike 23.-26.). Razmatranjem svih profila depozicije može se izvesti nekoliko generalnih zaključaka. Dodatkom natrijevog hijaluronata postignuta je opsežnija depozicija u turbinatnoj regiji. To se može objasniti užim kutom raspršenja i manjom depozicijom lijeka u području ispred nosne valvule. Iako je većina lijeka dostavljena u turbinatnu regiju, može se primijetiti da je s porastom viskoznosti uzoraka i smanjenjem kuta raspršenja smanjena i površina prekrivena raspršenim uzorkom unutar turbinatne regije. Navedeni utjecaj više je izražen u sustavima koji sadrže gelan gumu, s obzirom da su promjene i viskoznosti i kuta raspršenja rasle s porastom ukupnog sadržaja polimera u formulaciji.

Kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu imao je najizraženiji učinak na raspodjelu raspršene doze između gornjeg i donjeg dijela turbinatne regije. Naime, kut od 60° u odnosu na horizontalnu ravninu povoljniji je za ciljanje gornje nosne školjke. Utjecaj kuta primjene u odnosu na horizontalnu ravninu na raspodjelu raspršene doze između gornjeg i donjeg dijela turbinatne regije zabilježen je i kod jednosmjerne primjene *in situ* gelirajućih sustava [33].

Kada je sprej primijenjen pri kutu od 0° u odnosu na vertikalnu ravninu (septum), postignuta je turbinatna depozicija distalnije od nosne valvule nego pri kutu od 20° . Navedeno zapažanje posljedica je duljeg prijeđenog puta raspršenih kapljica kroz nosnu šupljinu niz struju zraka i kasniju depoziciju kada je sprej orijentiran paralelno sa septumom, a ne prema nosnim školjkama. S druge strane, potrebno je napomenuti da je pri takvom kutu primjene nešto veći udio raspršene doze odložen na septumu nosa, u odnosu na primjenu pod kutom od 20° u odnosu na ravninu septuma (Slika 28.).



Slika 28. Depozicija raspršene *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata u turbinatnom području i na septumu, pri primjeni pod kutom od 0° (a) i 20° (b) prema vertikalnoj ravnini, te pod kutom od 45° prema horizontalnoj ravnini, metodom dvosmjernе dostave. *In situ* gelirajuća suspenzija pripravljena je pri koncentraciji pektina od 0,8%, *m/m* (uzorak P).

Na kraju je provedena usporedba profila depozicije *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata pripravljene iz pektina (0,8%, *m/m*), natrijevog hijaluronata (0,03%, *m/m*) i gelan gume (0,1%, *m/m*), pri jednosmjernoj i dvosmjernoj dostavi *in vitro*, pri istim kutovima primjene u odnosu na vertikalnu i horizontalnu ravninu (redom 0° i 45° ; Slika 27.). Pri dvosmjernoj dostavi postignuta je depozicija u znatno dubljim dijelovima turbinatnog područja nego u slučaju jednosmjernе dostave. S obzirom da je primjena *in situ* gelirajućeg sustava u navedena dva slučaja provedena pri istim parametrima primjene (uvjetima raspršivanja i kutovima primjene) te pri istim postavkama respiratorne pumpe, može se

zaključiti da je razlika u profilu depozicije posljedica isključivo razlike u strujanju zraka kroz nosnu šupljinu. Dobiveni rezultati ukazuju na potencijal dvosmjerne dostave *in situ* gelirajućih sustava.

6. Zaključci

- U ovom radu su uspješno pripravljene *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata (0,06%, *m/m*) korištenjem Tween-a 80 (0,03%, *m/m*) kao tvari za suspendiranje, te pektina (0,8%, *m/m*), gelan gume (0 i 0,1%, *m/m*) i natrijevog hijaluronata (0, 0,03 i 0,05%, *m/m*) kao konstitutivnih polimera.
- Pripravljene *in situ* gelirajući sustavi prikladnih su reoloških svojstava s obzirom na put primjene.
- Viskoznost u mirovanju *in situ* gelirajućih suspenzija kretala se u rasponu od $6,23 \pm 0,12$ mPa s do $40,14 \pm 0,14$ mPa s i rasla je s porastom sadržaja polimera u sustavu.
- Raspodjela veličina kapljica i kut raspršenja odgovarali su zahtjevima vezanim uz nazalnu primjenu raspršenih sustava.
- Svi pripravljene *in situ* gelirajući sustavi trenutno su gelirali u kontaktu s kalcijevim ionima iz simuliranog nosnog fluida. Sustavi prije i nakon miješanja s SNF-om pokazuju pseudoplastično ponašanje.
- Gelovi koji sadrže gelan gumu karakterizirani su značajno većom viskoznošću i čvrstoćom u odnosu na gelove koji ne sadrže gelan gumu.
- Dvosmjerna dostava *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazona osigurala je depoziciju u turbinatnom području modela nosne šupljine.
- Dodatkom natrijevog hijaluronata postignuta je opsežnija depozicija u turbinatnom području. S porastom viskoznosti uzoraka i smanjenjem kuta raspršenja smanjena i površina prekrivena raspršenim uzorkom unutar turbinatnog područja.
- Kada je sprej primijenjen pri kutu od 0° u odnosu na vertikalnu ravninu (septum), postignuta je turbinatna depozicija distalnije od nosne valvule nego pri kutu od 20° .
- Kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu imao je najizraženiji učinak na raspodjelu raspršene doze između gornjeg i donjeg dijela turbinatne regije.
- Pri dvosmjernoj dostavi sustava sa sva tri polimera postignuta je depozicija u znatno dubljim dijelovima turbinatnog područja nego u slučaju jednosmjerne dostave.

7. Zahvale

Zahvaljujemo našoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na pruženoj prilici, prenesenom znanju i brojnim savjetima te strpljenju i povjerenju prilikom izrade i pisanja ovog rada.

Zahvaljujemo i Lauri Nižić, mag. pharm. na velikoj podršci i savjetima te za pomoć u snalaženju u laboratoriju i pri izvođenju pokusa.

Veliko hvala Vesni Saršon, dipl. sanit. ing. (Jadran-galenski laboratorij d.d., Rijeka) na pomoći pri određivanju raspodjele veličina raspršenih kapljica.

Hvala svim članovima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.

Zahvaljujemo Luciji Potočki i Ivanu Škvorcu te obiteljima i svim prijateljima koji su bili uz nas tijekom izrade ovog rada.

8. Literatura

- [1] L. Balatinec, "Atlas strujanja u nosnoj šupljini," studentski rad prijavljen na natječaj za Rektorovu nagradu, 2018.
- [2] M. Kleven, M. C. Melaaen, M. Reimers, J. S. Røtnes, L. Aurdal, and P. G. Djupesland, "Using Computational Fluid Dynamics (CFD) to improve the bi-directional nasal drug delivery concept," *Food Bioprod. Process.*, vol. 83, no. 2 C, pp. 107–117, 2005.
- [3] N. Geurkink, "Nasal anatomy, physiology, and function," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 72, no. 2, pp. 123–128, 1983.
- [4] P. Mura, N. Mennini, C. Nativi, and B. Richichi, "In situ mucoadhesive-thermosensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of opiorphin," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2017.
- [5] T. Sakane, M. Akizuki, S. Yamashita, H. Sezaki, and T. Nadai, "Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: the relation to the dissociation of the drug," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 46, no. 5, pp. 378–379, 1994.
- [6] TeachMeSeries Ltd, "Sagittal section of the nasal cavity." - pristupljeno 15. 4. 2019.
- [7] P. G. Djupesland, J. C. Messina, and R. A. Mahmoud, "Breath powered nasal delivery: A new route to rapid headache relief," *Headache*, vol. 53, no. SUPPL.2, pp. 72–84, 2013.
- [8] J. Rohrer, N. Lupo, and A. Bernkop-Schnürch, "Advanced formulations for intranasal delivery of biologics," *Int. J. Pharm.*, vol. 553, no. 1–2, pp. 8–20, 2018.
- [9] R. Cady, "A novel intranasal breath-powered delivery system for sumatriptan: a review of technology and clinical application of the investigational product AVP-825 in the treatment of migraine," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 12, no. 9, pp. 1565–1577, 2015.
- [10] Y. Pu, A. P. Goodey, X. Fang, and K. Jacob, "A comparison of the deposition patterns of different nasal spray formulations using a nasal cast," *Aerosol Sci. Technol.*, vol. 48, no. 9, pp. 930–938, 2014.
- [11] O. Dale, R. Hjortkjær, and E. D. Kharasch, "Nasal administration of opioids for pain management in adults," *Acta Anaesthesiol. Scand.*, vol. 46, no. 7, pp. 759–770, 2002.
- [12] E. Fuseau, O. Petricoul, K. H. Moore, A. Barrow, and T. Ibbotson, "Clinical pharmacokinetics of intranasal sumatriptan," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 41, no. 11, pp. 801–811, 2002.

- [13] J. Xi, Z. Wang, X. A. Si, and Y. Zhou, "Nasal dilation effects on olfactory deposition in unilateral and bi-directional deliveries: In vitro tests and numerical modeling," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 118, pp. 113–123, 2018.
- [14] G. Rajoria and A. Gupta, "In-Situ Gelling System: A Novel Approach for Ocular Drug Delivery," *J. PharmTech Res*, vol. 2, no. 4, 2012.
- [15] G. Rathnam, N. Narayanan, and R. Ilavarasan, "Carbopol-Based Gels for Nasal Delivery of Progesterone," *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 4, 2008.
- [16] F. Gu, W. Ma, G. Meng, C. Wu, and Y. Wang, "Preparation and in vivo evaluation of a gel-based nasal delivery system for risperidone," *Acta Pharm.*, vol. 66, no. 4, pp. 555–562, 2016.
- [17] M. Kouchak, "In situ gelling systems for drug delivery," *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, vol. 9, no. 3, pp. 3–4, 2014.
- [18] B. Srividya, R. M. Cardoza, and P. D. Amin, "Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered in situ gelling system," *J. Control. Release*, vol. 73, no. 2–3, pp. 205–211, 2001.
- [19] B. Viswanathan, M. I. Salim, A. Subramani, Sruthi, A. Jawahar, and T. K. Shabeer, "Historic review on modern herbal nanogel formulation and delivery methods," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 10, no. 10, pp. 1–10, 2018.
- [20] T. S. Tinu, L. Thomas, and B. Anil Kumar, "Polymers used in ophthalmic in Situ gelling system," *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 176–183, 2013.
- [21] T. R. Hoare and D. S. Kohane, "Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges," *Polymer*. 2008.
- [22] A. Kumar and R. K. Gupta, *Fundamentals of Polymer Engineering: Second Edition Revised and Expanded*. 2003.
- [23] R. M. P. Singh, A. Kumar, and K. Pathak, "Mucoadhesive in situ nasal gelling drug delivery systems for modulated drug delivery.," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 10, no. 1, pp. 115–30, 2013.
- [24] M. Kaya, A. G. Sousa, M. J. Crépeau, S. O. Sørensen, and M. C. Ralet, "Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: Influence of acid type and pH of extraction," *Ann. Bot.*, vol. 114, no. 6, pp. 1319–1326, 2014.
- [25] U. S. Schmidt, L. Koch, C. Rentschler, T. Kurz, H. U. Endreß, and H. P. Schuchmann, "Effect of Molecular Weight Reduction, Acetylation and Esterification on the

- Emulsification Properties of Citrus Pectin,” *Food Biophys.*, vol. 10, no. 2, pp. 217–227, 2015.
- [26] S. Y. Chan, W. S. Choo, D. J. Young, and X. J. Loh, “Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 161, pp. 118–139, 2017.
- [27] P. Watts and A. Smith, “PecSys: in situ gelling system for optimised nasal drug delivery,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 6, no. 5, pp. 543–552, 2009.
- [28] A. Hafner, D. Škrinjar, and J. Filipović-grčić, “Mogućnosti nazalne primjene lijekova,” *Farm. Glas.*, vol. 70, no. 5, pp. 303–321, 2014.
- [29] L. Illum, N. F. Farraj, A. N. Fisher, I. Gill, M. Miglietta, and L. M. Benedetti, “Hyaluronic acid ester microspheres as a nasal delivery system for insulin,” *J. Control. Release*, vol. 29, no. 1–2, pp. 133–141, 1994.
- [30] A. F. Jre, L. Tc, and L. Ubg, “The nature of hyaluronan,” *J. Intern. Med.*, vol. 242, pp. 27–33, 1997.
- [31] A. Ström, A. Larsson, and O. Okay, “Preparation and physical properties of hyaluronic acid-based cryogels,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 29, pp. 1–11, 2015.
- [32] M. N. S. Aly, “Intra-articular drug delivery: a fast growing approach,” *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, 2008.
- [33] L. Nižić *et al.*, “Innovative sprayable in situ gelling fluticasone suspension: Development and optimization of nasal deposition,” *Int. J. Pharm.*, vol. 563, no. March, pp. 445–456, 2019.
- [34] E. Cassandro *et al.*, “Hyaluronan in the Treatment of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis,” *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, vol. 67, no. 3, pp. 299–307, 2015.
- [35] G. Zhu, N. Guo, Y. Yong, Y. Xiong, and Q. Tong, “Effect of 2-deoxy-d-glucose on gellan gum biosynthesis by *Sphingomonas paucimobilis*,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 42, no. 5, pp. 897–900, 2019.
- [36] V. Makani *et al.*, “BBB-permeable, neuroprotective, and neurotrophic polysaccharide, Midi-GAGR,” *PLoS One*, vol. 11, no. 3, 2016.
- [37] T. Osma, A. Froelich, and S. Tasarek, “Application of gellan gum in pharmacy and medicine,” 2014.
- [38] E. Miyoshi, T. Takaya, and K. Nishinari, “Gel-sol transition in gellan gum solutions. I. Rheological studies on the effects of salts,” *Top. Catal.*, vol. 8, no. 6, pp. 505–527, 1994.

- [39] R. Chandrasekaran and A. Radha, "Molecular architectures and functional properties of gellan gum and related polysaccharides," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 6, no. 5, pp. 143–148, 1995.
- [40] M. Tako *et al.*, "Structure-Function Relationship of a Gellan Family of Polysaccharide, S-198 Gum, Produced by *Alcaligenes* ATCC31853," *Adv. Biol. Chem.*, vol. 06, no. 03, pp. 55–69, 2016.
- [41] B. A. Kerwin, "Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways," *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008.
- [42] M. E. Aulton, "Chapter 25 Granulation," *Pharm. Sci. Dos. form Des.*, pp. 364–378, 2001.
- [43] A. U. Kura, S. H. Hussein-Ali, M. Z. Hussein, and S. Fakurazi, "Preparation of Tween 80-Zn/Al-Levodopa-Layered Double Hydroxides Nanocomposite for Drug Delivery System," *Sci. World J.*, vol. 2014, no. March, pp. 1–10, 2014.
- [44] L. J. Struble and X. Ji, "Rheology."
- [45] T. A. Osswald, G. Menges, T. A. Osswald, and G. Menges, "Rheology of Polymer Melts," *Mater. Sci. Polym. Eng.*, pp. 111–159, 2012.
- [46] T. G. Mezger, *The Rheology Handbook For users of rotational and oscillatory rheometers*, 2nd editio. Vincentz Network, Hanover, Germany, 2006.
- [47] Simscale, "Non-Newtonian Models." - pristupljeno 15. 4. 2019.
- [48] A. Płoszczuk, M. Bosheva, K. Spooner, T. McIver, and S. Dissanayake, "Efficacy and safety of fluticasone propionate/formoterol fumarate in pediatric asthma patients: a randomized controlled trial," *Ther. Adv. Respir. Dis.*, 2018.
- [49] National Center for Biotechnology Information, "PubChem Database. Fluticasone, CID=5311101." - pristupljeno 15. 4. 2019.
- [50] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/fluticasone_propionate - pristupljeno 15. 4. 2019.
- [51] www.halmed.hr, "Results for the term: flutikazon." - pristupljeno 15. 4. 2019
- [52] S. Turker, E. Onur, and O. Y., "Nasal route and drug delivery systems," *Pharm. World Sci.*, vol. 26, no. 3, pp. 137–142, 2004.
- [53] H. R. Costantino, L. Illum, G. Brandt, P. H. Johnson, and S. C. Quay, "Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects," *Int. J. Pharm.*, vol. 337, no. 1–2, pp. 1–24, 2007.
- [54] P. Watts, A. Smith, and M. Perelman, "Nasal delivery of fentanyl," pp. 75–83, 2013.

- [55] B. J. Martino, C. A. Church, and K. A. Seiberling, "Effect of intranasal dexamethasone on endogenous cortisol level and intraocular pressure," *Int. Forum Allergy Rhinol.*, vol. 5, no. 7, pp. 605–609, 2015.
- [56] Z. N. Warnken, H. D. C. Smyth, D. A. Davis, S. Weitman, J. G. Kuhn, and R. O. Williams, "Personalized Medicine in Nasal Delivery: The Use of Patient-Specific Administration Parameters to Improve Nasal Drug Targeting Using 3D-Printed Nasal Replica Casts," *Mol. Pharm.*, vol. 15, no. 4, pp. 1392–1402, 2018.
- [57] B. Jurišić Dukovski *et al.*, "Spray-dried nanoparticle-loaded pectin microspheres for dexamethasone nasal delivery," *Dry. Technol.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–11, 2019.
- [58] J. Hao *et al.*, "Fabrication of an ionic-sensitive in situ gel loaded with resveratrol nanosuspensions intended for direct nose-to-brain delivery," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 147, pp. 376–386, 2016.
- [59] W. Fokkens and S. Reitsma, "New delivery forms of nasal corticosteroids," *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018.
- [60] P. G. Djupesland, "Nasal drug delivery devices : characteristics and performance in a clinical perspective — a review," pp. 42–62, 2013.
- [61] TMIC, "Fluticasone propionate," 2005. - pristupljeno 15. 4. 2019.
- [62] A. Umerska, C. R. A. Mouzouvi, A. Bigot, and P. Saulnier, "Formulation and nebulization of fluticasone propionate-loaded lipid nanocarriers," *Int. J. Pharm.*, 2015.
- [63] M. E. Aulton and K. M. G. Taylor, *Aulton's Pharmaceutics - The Design and Manufacture of Medicines, 5th Edition*. 2013.
- [64] www.halmed.hr "Avamys.", sažetak opisa svojstava lijeka - pristupljeno 15. 4. 2019..
- [65] S. lei Cao *et al.*, "In situ gel based on gellan gum as new carrier for nasal administration of mometasone furoate," *Int. J. Pharm.*, vol. 365, no. 1–2, pp. 109–115, 2009.
- [66] M. Gelardi, L. Iannuzzi, and N. Quaranta, "Intranasal sodium hyaluronate on the nasal cytology of patients with allergic and nonallergic rhinitis," *Int. Forum Allergy Rhinol.*, vol. 3, no. 10, pp. 807–813, 2013.
- [67] C. Bitter, K. Suter-Zimmermann, and C. Surbera, "Nasal Drug Delivery in Humans," *Curr. Probl. Dermatol.*, vol. 40, pp. 20–35, 2011.
- [68] L. Salade, N. Wauthoz, J. Goole, and K. Amighi, "How to characterize a nasal product. The state of the art of in vitro and ex vivo specific methods," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 561. Elsevier B.V., pp. 47–65, 20-Apr-2019.

- [69] European Medicines Agency, "Committee for medicinal products for human use (CHMP): Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products," June, p. 27, 2006.
- [70] D. Moraga-Espinoza, Z. Warnken, A. Moore, R. O. Williams, and H. D. C. Smyth, "A modified USP induction port to characterize nasal spray plume geometry and predict turbinate deposition under flow," *Int. J. Pharm.*, vol. 548, no. 1, pp. 305–313, 2018.
- [71] M. Y. Foo, Y.-S. Cheng, W.-C. Su, and M. D. Donovan, "The Influence of Spray Properties on Intranasal Deposition," *J. Aerosol Med.*, vol. 20, no. 4, pp. 495–508, 2007.
- [72] B. Jurišić Dukovski *et al.*, "Lipid/alginate nanoparticle-loaded in situ gelling system tailored for dexamethasone nasal delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 533, no. 2, pp. 480–487, 2017.
- [73] X. Yang, Y. Hou, T. Gong, L. Sun, J. Xue, and Y. Guo, "Concentration-dependent rheological behavior and gelation mechanism of high acyl gellan aqueous solutions," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 131, pp. 959–970, 2019.
- [74] S. R. Salunke and S. B. Patil, "Ion activated in situ gel of gellan gum containing salbutamol sulphate for nasal administration," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 87, pp. 41–47, 2016.
- [75] F. Loosli *et al.*, "Wire-Active Microrheology to Differentiate Viscoelastic Liquids from Soft Solids," *ChemPhysChem*, 2016.
- [76] J. Xi, Z. Wang, D. Nevorski, T. White, and Y. Zhou, "Nasal and Olfactory Deposition with Normal and Bidirectional Intranasal Delivery Techniques: In Vitro Tests and Numerical Simulations," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, 2016.
- [77] M. Y. Foo, N. Sawant, E. Overholtzer, and M. D. Donovan, "A Simplified Geometric Model to Predict Nasal Spray Deposition in Children and Adults," *AAPS PharmSciTech*, 2018.
- [78] J. S. Kimbell *et al.*, "Characterization of Deposition from Nasal Spray Devices Using A Computational Fluid Dynamics Model of The Human Nasal Passages," *J. Aerosol Med.*, vol. 20, no. 1, pp. 59–74, 2007.

9. Sažetak

Nazalna depozicija *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata pri dvosmjernoj dostavi *in vitro*

Maja Brozović i Ante Mrše, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ključne riječi: dvosmjerna nazalna dostava; *in situ* gelirajući sustav; flutikazonpropionat

Unatoč brojnim prednostima nazalne primjene lijekova u odnosu na oralnu i parenteralnu primjenu, taj potencijal još uvijek nije u potpunosti iskorišten. Otežavajući čimbenici obuhvaćaju geometriju nosne valvule koja otežava dostavu lijeka u ciljno područje te mukocilijarni mehanizam čišćenja koji skraćuje vrijeme zadržavanja lijeka na nosnoj sluznici. Iz navedenog proizlazi potreba za istraživanjima koja će objediniti razvoj naprednih terapijskih sustava za nazalnu primjenu lijekova s inovativnim načinima/uređajima za njihovu učinkovitiju dostavu u ciljno područje nosne šupljine.

Cilj ovog istraživanja je pripremiti *in situ* gelirajuće sustave flutikazonpropionata te, nakon detaljne karakterizacije, ispitati mogućnosti njihove dvosmjerne dostave, kao i ovisnost profila depozicije o odabranim formulacijskim parametrima i parametrima primjene. *In situ* gelirajući sustavi mogu produljiti vrijeme zadržavanja lijeka u nosnoj šupljini te prilagoditi profil oslobađanja lijeka. Dvosmjerno strujanje zraka predstavlja jednu od glavnih razlika u odnosu na konvencionalnu nazalnu primjenu lijekova, te pridonosi depoziciji primijenjenog lijeka dublje u nosnoj šupljini.

U ovom radu uspješno su pripravljene *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata (0,06%, *m/m*) korištenjem Tween-a 80 (0,03%, *m/m*) kao tvari za suspendiranje, te pektina (0,8%, *m/m*), gelan gume (0 i 0,1%, *m/m*) i natrijevog hijaluronata (0, 0,03 i 0,05%, *m/m*) kao konstitutivnih polimera. Viskoznost u mirovanju *in situ* gelirajućih suspenzija rasla je s porastom sadržaja polimera u sustavu. Raspodjela veličina kapljica i kut raspršenja odgovarali su zahtjevima vezanim uz nazalnu primjenu raspršenih sustava. Svi pripremljeni *in situ* gelirajući sustavi trenutno su gelirali u kontaktu s kalcijevim ionima iz simuliranog nosnog fluida (SNF). Sustavi prije i nakon miješanja s SNF-om pokazali su pseudoplastično ponašanje. Gelovi koji sadrže gelan gumu karakterizirani su značajno većom viskoznošću i čvrstoćom u odnosu na gelove koji ne sadrže gelan gumu. Dvosmjerna dostava *in situ* gelirajućih suspenzija flutikazonpropionata osigurala je depoziciju u turbinatnom području modela nosne šupljine. Kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu imao je najizraženiji učinak na raspodjelu raspršene doze između gornjeg i donjeg dijela turbinatne regije. Kada je sprej primijenjen pri kutu od 0° u odnosu na septum, postignuta je turbinatna depozicija distalnije od nosne valvule nego pri kutu od 20°. Dodatkom natrijevog hijaluronata postignuta je opsežnija depozicija u turbinatnoj regiji. S porastom viskoznosti uzoraka i smanjenjem kuta raspršenja smanjena i površina prekrivena raspršenim uzorkom unutar turbinatne regije. Pri dvosmjernoj dostavi sustava sa sva tri polimera postignuta je depozicija u znatno dubljim dijelovima turbinatnog područja nego u slučaju jednosmjerne dostave. Ostvareni rezultati mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja u području.

10. Summary

Nasal deposition of *in situ* gelling fluticasone propionate suspensions upon bidirectional delivery *in vitro*

Maja Brozović and Ante Mrše, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Keywords: bidirectional nasal delivery; *in situ* gelling system; fluticasone propionate

Despite numerous advantages of nasal drug delivery in relation to oral and parenteral drug delivery, the potential of nasal drug delivery is still not fully used. The complex geometry of the nasal valve poses a serious challenge for the drug deposition in the targeted area within the nasal cavity. Another challenge is the mucociliary clearance which shortens the residence time of the drug at the nasal mucosa. There is a need for scientific research which will provide a way to explore and develop nasal drug delivery systems in conjunction with innovative delivery devices to achieve a satisfying nasal deposition.

The aim of this study was to prepare *in situ* gelling fluticasone propionate systems and, after thorough characterization, explore the possibility of bidirectional nasal delivery and correlation between the deposition profile and formulation and administration parameters investigated. *In situ* gelling systems can prolong the contact time between the nasal mucosa and the drug, and modify the drug release profile. Bidirectional air flow represents one of the main differences in relation to the conventional nasal drug administration and contributes to the deposition of the administrated drug deeper in the nasal cavity.

In this study, *in situ* gelling fluticasone propionate (0.06%, w/w) systems were successfully prepared by using Tween 80 (0.03%, w/w) as a suspending agent and pectin (0.8%, w/w), gellan gum (0 and 0.1%, w/w) and sodium hyaluronate (0, 0.03 and 0.05%, w/w) as constitutive polymers. Zero shear viscosity of the *in situ* gelling systems increased with the increase of polymer concentration in the formulation. Droplet size distribution and spray cone angle met the needs for nasal drug delivery. All of the *in situ* gelling systems prepared formed gel instantly in contact with calcium ions in simulated nasal fluid (SNF). The systems showed pseudoplastic properties before and after mixing with SNF. The viscosity and strength of the gels containing gellan gum were substantially higher than in gels without gellan gum.

Bidirectional delivery of *in situ* gelling suspensions provided drug deposition in the turbinate region of the nasal cavity model. The angle of administration from the horizontal plain mostly influenced the distribution of the suspension between the upper and lower part of the turbinate region. At the administration angle of 0° from the septum, a more distal turbinate deposition was achieved than at the angle of 20°. With the addition of sodium hyaluronate, more extensive deposition in the turbinate region was achieved. With the increase in viscosity and the decrease of spray cone angle, the surface of the deposition area in the turbinate region decreased. Bidirectional delivery of system containing all three polymers ensured deposition more distally beyond the nasal valve in relation to conventional spray delivery. The obtained results can serve as a starting point for further research in this scientific area.

Životopis

Maja Brozović

Maja Brozović rođena je 24. ožujka 1996. u Zagrebu. Studentica je pete godine farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Završila je srednju školu Tina Ujevića u Kutini, smjer prirodoslovno-matematička gimnazija. U akademskoj godini 2017./2018. (24. studenog 2017.) sudjelovala je na mini-simpoziju „Europski certificirani farmakolog – EuCP Program“ u sklopu godišnje skupštine Hrvatskog društva farmakologa kao koautor posterske prezentacije naslova *Potagrumab (Klio) as a new therapy for glioblastoma – students' approach*, izrađenog pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. L. Bach - Rojcky na Zavodu za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ante Mrše

Ante Mrše rođen je 6. kolovoza 1996. u Siegburgu, Njemačka. Završio je V. gimnaziju u Zagrebu, opći smjer. Godine 2014. upisao je integrirani studij farmacije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na kojemu je trenutno student četvrte godine. Tijekom šestog semestra sudjelovao je na projektu sastavljanja Farmakognoške zbirke na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. S. Vladimir-Knežević, te je na istom zavodu radio na digitalizaciji knjižnice s fokusom na djela Alexandra Tschircha.