

Ivana Plantić

Lipidno-alginatne nanočestice za nazalnu primjenu deksametazona

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biofarmacija s farmakokinetikom Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Anite Hafner.

Srdačno zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na prenesenom znanju, potpori, strpljenju, susretljivosti te stručnim savjetima prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem Marini Juretić, mag. pharm. i Biseri Jurišić, mag. pharm. te kolegi Ivanu Čunčiću na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada. Hvala svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na ugodnom vremenu provedenom na Zavodu.

Veliko hvala mojoj obitelji, kolegama i prijateljima na podršci tijekom cijelog studiranja.

SADRŽAJ

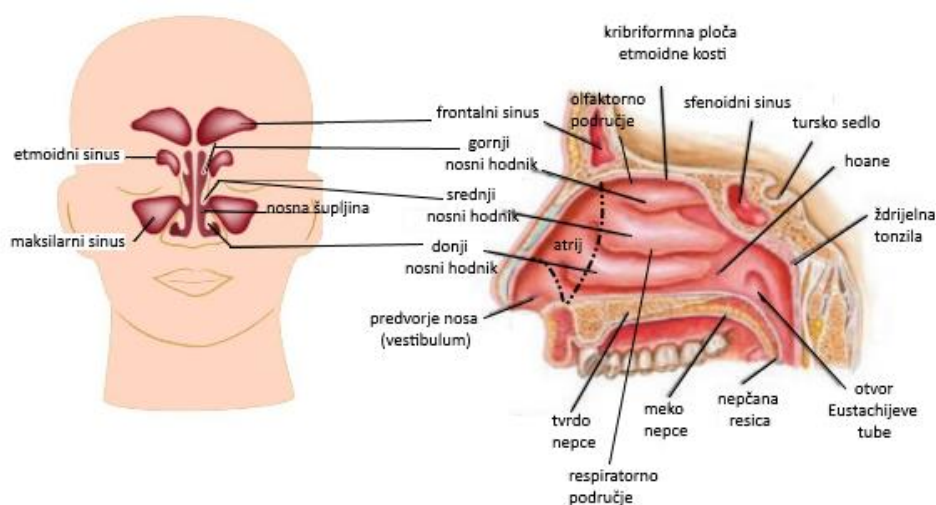
1. UVOD	1
1.1. Građa i funkcija nosne šupljine	1
1.2. Poremećaji sluznice nosa i mogućnosti liječenja	4
1.2.1. Rinitis	4
1.2.2. Rinosinusitis	5
1.3. Nazalna primjena kortikosteroida	7
1.3.1. Indikacije	7
1.3.2. Farmaceutski oblici	8
1.3.3. Sigurnost primjene	11
1.3.4. Deksametazon	12
1.4. Natrijev alginat - polimer izbora u pripravi terapijskih (nano)sustava	13
1.4.1. Biofarmaceutska svojstva alginata	16
1.4.2. Primjeri alginatnih terapijskih sustava	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	19
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Materijali	21
3.2. Metode	22
3.2.1. Priprava nanočestica	22
3.2.2. Određivanje topljivosti deksametazona u 6,24 % etanolu (<i>m/m</i>)	23
3.2.3. Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka u nanočestice	23
3.2.4. Određivanje veličine nanočestica	24
3.2.5. Određivanje zeta-potencijala nanočestica	25
3.2.6. <i>In vitro</i> oslobađanje lijeka iz nanočestica	25
3.2.7. Stanična linija i uvjeti uzgoja	25
3.2.8. Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica <i>in vitro</i>	26

4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Priprava lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom.....	27
4.2. Određivanje topljivosti deksametazona u 6,24 % etanolu (<i>m/m</i>).....	29
4.3. Uspješnost uklapanja deksametazona u nanočestice.....	30
4.4. Veličina i zeta potencijal nanočestica	31
4.5. <i>In vitro</i> oslobađanje deksametazona iz nanočestica	33
4.6. Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica <i>in vitro</i>	35
5. ZAKLJUČCI.....	37
6. LITERATURA.....	38
7. SAŽETAK/ SUMMARY.....	44
Temeljna dokumentacijska kartica/ Basic documentation card	

1. UVOD

1.1. Građa i funkcija nosne šupljine

Nos i nosna šupljina početni su dio dišnog sustava. Nos je krajnji prednji dio nosne šupljine koja se proteže od nosnica pa do hoana gdje je prijelaz nosne šupljine u gornji dio ždrijela. Nos započinje nosnim krilima i nastavlja se prema gore nosnim hrbtom te završava korijenom nosa. Korijen nosa tvore kosti, dok hrbat nosa i nosna krila imaju hrskavičnu osnovu (Jalšovec, 2013).



Slika 1: Prikaz sinusa i građe nosne šupljine (preuzeto i prilagođeno prema www.dfwsinus.com i www.vasezdravlje.com)

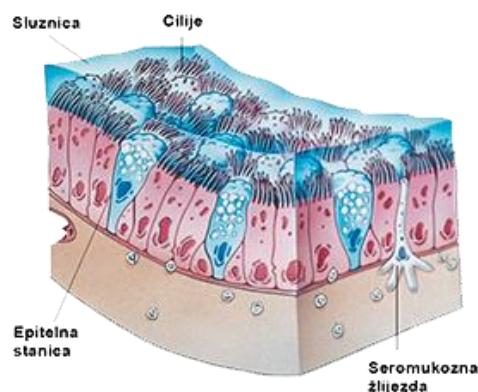
Nosna šupljina podijeljena je nosnom pregradom (septumom) na dva dijela koja se sastoje od četiri područja: vestibula, atrija, respiratornog područja i olfaktornog područja (Slika 1). Duljina nosne šupljine je 12-14 cm, ukupni volumen iznosi 15-20 ml, a ukupna površina joj je oko 150-200 cm². Nosna šupljina odgovorna je za vlaženje i filtriranje udahnutog zraka te sudjeluje u nastanku osjeta mirisa (Kapoor i sur., 2016).

Vestibul je prednji dio nosne šupljine površine oko 0,6 cm². Prekriven je višeslojnim pločastim keratiniziranim epitelom u kojem su prisutne žlijezde lojnice. U vestibulu se nalaze nosne dlačice koje pročišćavaju udahnuti zrak jer zaustavljaju čestice veće od 10 μm. Zbog slabe prokrvljenosti i prisustva keratiniziranih stanica područje vestibula je izrazito male permeabilnosti (Hafner i sur., 2014).

Atrij je dio nosne šupljine smješten između vestibula i respiratornog područja. Prednji dio atrija prekriven je višeslojnim pločastim epitelom, a stražnji dio pseudovišeslojnim cilindričnim epitelom prekrivenim mikrovilima. Višeslojni pločasti epitel i slaba prokrvljenost ograničavaju permeabilnost tvari u području atrija (Hafner i sur., 2014).

Respiratorno područje obuhvaća najveći dio nosne šupljine i sastoji se od gornje, srednje i donje nosne školjke koje su odgovorne za vlaženje i zagrijavanje udahnutog zraka (Anand i sur., 2012). Ispod svake nosne školjke nalazi se nosni hodnik. U donji nosni hodnik otvara se suzni kanal, dok se u gornji i srednji nosni hodnik otvaraju paranazalni sinusi. Paranazalni sinusi su šupljine u kostima glave koje su povezane s nosnom šupljinom. Postoje četiri skupine sinusa-maksilarni, etmoidni, frontalni i sfenoidni (Jalšovec, 2013).

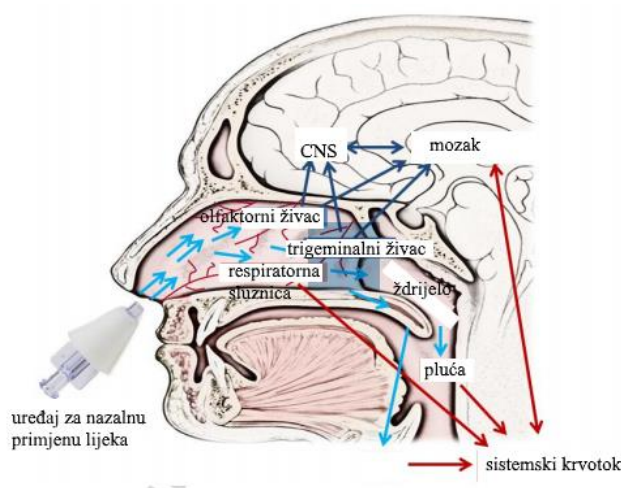
Nosna šupljina i paranazalni sinusi prekriveni su sluznicom koja sadrži pseudovišeslojni cilindrični cilijarni epitel ispod kojeg se nalazi rahlo vezivno tkivo tj. *lamina propria* koja je dobro prokrvljena i sadrži limfne žile, živce, žlijezde i stanice imunološkog sustava. Unutar epitela i *lamine propriae* nalazi se velik broj stanica imunološkog sustava s obzirom da kroz nos u organizam ulazi veliki broj stranih čestica. U epitelu se nalaze i mukozne stanice koje proizvode sluz i oslobađaju je na površinu epitela (Slika 2). Sluz se sastoji najvećim dijelom od vode (95 %), te od glikoproteina mucina, drugih proteina, anorganskih soli i lipida. U sluzi se otapaju veće čestice i bakterije, a tu mogu biti razgrađene enzimima te prenesene pomoću cilija i sluzi do ždrijela (Fokkens i sur., 2007; Sosnik i sur., 2014). Naime, sluz na površini epitela stvara dvostruki sloj sastavljen od vodene pericilijarne sol-faze niske viskoznosti u kojoj se cilije pokreću, te od površinskog gela koji se preko vrhova cilija stalno pomiče prema nazofarinksu čime se čestice otopljene u sluzi prenose u gastrointestinalni trakt (Hafner i sur., 2014).



Slika 2: Prikaz građe respiratorne sluznice (preuzeto iz www.gelo-line.eu)

U gornjem dijelu nosne šupljine tj. u području gornje nosne školjke smješteno je olfaktorno područje koje zauzima oko 10 % nosne šupljine. To područje prekriveno je pseudovišeslojnim epitelom i sadrži mirisne receptore. Otapanjem tvari u sluzi nastaju impulsi koji se šalju u mozak što rezultira osjetom mirisa (Jalšovec, 2013; Kapoor i sur., 2016). Prokrvljenost olfaktornog područja je velika te primjenom lijeka na to područje postoji mogućnost njegovog ulaska u središnji živčani sustav kroz olfaktorni neuroepitel. Dakle, lijekovi koji ne prolaze krvno-moždanu barijeru mogli bi se dostaviti u središnji živčani sustav primjenom ljekovitog pripravka u nosnu šupljinu (Kapoor i sur., 2016).

Specifične anatomske i histološke značajke nosne šupljine omogućuju postizanje terapijskog učinka nazalnom primjenom lijekova. Osim lokalnog učinka na sluznicu nosa, moguće je postići sistemski učinak apsorpcijom lijeka kroz krvne žile respiratornog područja ili postići dostavu lijeka u mozak preko olfaktornog područja (Slika 3) (Hafner i sur., 2014; Kumar i sur., 2016). Nosna šupljina je mogući put dostave lijekova male molekulske mase, ali i peptida, proteina te cjepiva (Karavasili i Fatouros, 2016). Nazalna primjena lijekova se intenzivno istražuje jer ima brojne prednosti: brzi početak djelovanja zbog brze apsorpcije, izbjegava se iritacija želuca, zaobilazi se problem male bioraspodivnosti zbog metaboliziranja tijekom prvog prolaska kroz jetru, niske permeabilnosti kroz sluznicu probavnog sustava ili zbog kemijske/ proteolitičke razgradnje (Mali i sur., 2015; Karavasili i Fatouros, 2016).



Slika 3: Mogućnosti dostave lijekova primjenom u nosnu šupljinu (preuzeto i prilagođeno prema Kapoor i sur., 2016)

1.2. Poremećaji sluznice nosa i mogućnosti liječenja

Poremećaji koji zahvaćaju nos mogu se podijeliti na:

- poremećaje sluznice (rinitis- alergijski i nealergijski, rinosinusitis- akutni i kronični)
- poremećaje uzrokovane strukturnim promjenama (npr. devijacija nosnog septuma, perforacija nosnog septuma, strana tijela, tumori, adenoidna hipertrofija) čije je liječenje najčešće kirurško
- poremećaje uzrokovane primjenom lijekova (npr. acetilsalicilna kiselina, nesteroidni protuupalni lijekovi, oralni kontraceptivi, vazodilatatori, lijekovi za erektilnu disfunkciju, beta blokatori za lokalnu primjenu na oko, nazalni dekonjestivi) (Ocampo i Grammer, 2013).

1.2.1. Rinitis

Rinitis se definira kao stanje kod kojeg su zbog upale nosne sluznice prisutni sljedeći simptomi: nosna kongestija (začepljen nos), rinoreja (pretjerano stvaranje sekreta), kihanje i svrbež. Može biti alergijski tj. uzrokovan preosjetljivošću na tvari iz okoliša s kojima u dodir dolazimo putem dišnog sustava ili nealergijski koji se najčešće javlja zbog virusnih i bakterijskih infekcija (Ocampo i Grammer, 2013). Simptomi koji mogu upućivati na alergijsku etiologiju su kihanje, suzenje očiju, vodenasti sekret iz nosa i svrbež (Fokkens i sur., 2007). Kako bi se odredilo je li rinitis nealergijski ili alergijski provode se kožni testovi na specifična IgE antitijela (Ocampo i Grammer, 2013). Naime, ta antitijela vežu alergen te se zatim vežu na mastocite prisutne u sluznici nosne šupljine. To dovodi do pojačanog lučenja histamina koji izaziva alergijsku reakciju i upalu (Cao i sur., 2009).

Simptomi rinitisa mogu se ublažiti lokalnom primjenom dekonjestiva. Topikalni dekonjestivi su simpatomimetici koji izazivaju konstrikciju krvnih žila nosne sluznice čime smanjuju oteklinu sluznice. Primjena im je ograničena zbog tzv. *rebound* fenomena- simptomi koji su bili prigušeni djelovanjem lijeka javljaju se u pojačanom obliku nakon prekida terapije jer dolazi do sekundarne vazodilatacije. To često uzrokuje njihovu dugotrajnu i nepotrebnu primjenu te oštećenje cilijarnog epitela nosne sluznice pa se dekonjestivi ne bi trebali koristiti dulje od 5 do 7 dana. Liječenje blažih oblika alergijskog rinitisa temelji se na peroralnim antihistaminicima koji antialergijski učinak postižu vezanjem na H1 receptore čime blokiraju nepoželjne učinke histamina. U težim oblicima rinitisa primjenjuju se topikalni kortikosteroidi sami ili u kombinaciji s antihistaminicima (Francetić i sur., 2015). Smatra se da su

kortikosteroidi učinkovitija skupina lijekova za ublažavanje nazalnih i okularnih simptoma od oralnih antihistaminika i antagonista leukotriena (Meltzer, 2011). Dakle, kortikosteroidi su postali prvi izbor u liječenju rinitisa kod pacijenata sa srednje do jako izraženim simptomima jer se kronična primjena dekongestiva ne preporuča zbog neželjenih učinaka na srce i povratne kongestije (Cave i sur., 1999; Meltzer, 2011).

1.2.2. Rinosinusitis

Akutni rinosinusitis

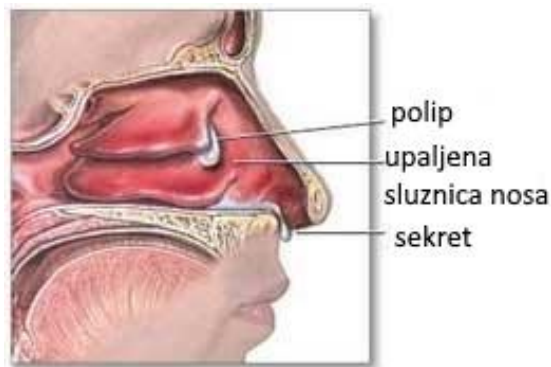
Akutni rinosinusitis je upala sluznice nosa i paranazalnih sinusa uzrokovana virusnim ili bakterijskim infekcijama, a karakterizira ga iznenadna pojava nosne kongestije, curenje iz nosa, bol i osjećaj pritiska na lice te poremećaj osjeta mirisa u trajanju kraćem od 12 tjedana. Dijagnoza se postavlja na temelju anamneze i pregleda. Najčešće je uzrokovano virusima (virus influence i rinovirus) pa je liječenje simptomatsko. Koriste se nazalni dekongestivi i antihistaminici, a ako oni nisu učinkoviti može se uvesti terapija nazalnim kortikosteroidima. Ako simptomi traju 10-14 dana može se posumnjati na bakterijsku infekciju i razmotriti terapija antibioticima. Bakterije koje najčešće uzrokuju ovaj poremećaj su: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus* (Ocampo i Grammer, 2013).

Kronični rinosinusitis

Kronični rinosinusitis definira se kao upala nosa i paranazalnih sinusa koja traje dulje od 12 tjedana, a simptomi su isti kao kod akutnog rinosinusitisa (nosna kongestija i curenje iz nosa, bol i osjećaj pritiska na lice, poremećaj osjeta mirisa). Kronični rinosinusitis se dijagnosticira ako su barem dva simptoma prisutna dulje od 12 tjedana, a dijagnoza se može potvrditi endoskopskim pregledom ili snimanjem CT uređajem gdje su vidljive promjene na sluznici nosa (Fokkens i sur., 2007). Promjene prisutne na sluznici nosa pacijenata su: stanjenje bazalne membrane, hiperplazija stanica, ograničeni subepitelni edem, fibroza, infiltrat mononuklearnih stanica, smanjenje broja cilija. Iako su i eozinofili i neutrofilni dio upalnog procesa, neutrofilni su brojniji u sluznici pacijenata (Ocampo i Grammer, 2013). Kronični rinosinusitis je čest poremećaj složena podrijetla, a mogući čimbenici za koje se vjeruje da su povezani s nastankom tog poremećaja su infekcije, gljivice, alergije, poremećaj mukocilijarnog čišćenja, astma, imunokompromitirana stanja, genetski faktori, trudnoća i status hormona te oticanje sluznice iz

nekeg drugog razloga. Upala sinusa može nastati ako je otvor kroz koji sluz izlazi iz sinusa premali, ako se sluz pojačano stvara npr. zbog infekcije ili ako je funkcija cilija smanjena. Zbog zastoja sekreta prestaje uklanjanje bakterija iz sinusa što uzrokuje ili pogoršava upalu, a to dovodi do daljnje disfunkcije cilija. Ovaj začarani krug je teško prekinuti pa dolazi do razvoja kroničnog rinosinusitisa (Fokkens i sur., 2007).

Razvoj kroničnog rinosinusitisa može biti potaknut prisustvom polipa, ali pacijenti najčešće imaju rinosinusitis bez nosnih polipa (Ocampo i Grammer, 2013).



Slika 4: Prikaz upaljene sluznice nosa i stvaranja sekreta kod rinosinusitisa sa polipima (preuzeto i prilagođeno prema www.entslc.com)

Polipi

Polipi su mesnate izrasline sluznice nosa bez osjeta i obično rastu na područjima na kojima je sluznica natečena zbog nakupljanja tekućine, kao što je područje oko otvora sinusa u nosnu šupljinu (Slika 4) (Ocampo i Grammer, 2013). Sastoje se od vezivnog tkiva, edema, upalnih stanica, žlijezda i kapilara, te su pokriveni različitim vrstama epitela, uglavnom respiratornim pseudovišeslojnim epitelom s cilijarnim i vrčastim stanicama. Eozinofili su najčešće upalne stanice u nosnim polipima, a također su prisutni i neutrofilni, mastociti, plazma stanice, limfociti, monociti i fibroblasti (Fokkens i sur., 2007). Prisustvo nosnih polipa može se ustanoviti rinoskopskim pregledom i snimanjem CT uređajem. S obzirom da se polipi obično stvaraju u području na kojem se sinusi otvaraju u nosnu šupljinu, mogu zapriječiti uklanjanje sluzi iz sinusa što dovodi do razvoja rinosinusitisa (Ocampo i Grammer, 2013).

Kronični rinosinusitis nije životno ugrožavajuća bolest, ali značajno narušava kvalitetu života pa je cilj liječenja postizanje i održavanje stanja bez simptoma kod kojeg se na nazalnoj endoskopiji vidi zdrava ili gotovo zdrava sluznica (Kosugi i sur., 2016). S obzirom da je kronični rinosinusitis kronična upalna bolest, cilj liječenja je kontrolirati upalu pa se u tu svrhu kao prva linija liječenja koriste kortikosteroidi, pogotovo kod pacijenata s polipima te srednje do jako izraženim simptomima (Mullol i sur., 2009; Ocampo i Grammer, 2013). Kortikosteroidi smanjuju broj upalnih stanica (eozinofile, T limfocite, dendritične stanice, mastocite) inhibicijom njihove migracije iz cirkulacije i preživljavanja u tkivima. Ako se lijekovima bolest ne kontrolira uspješno te zbog polipa često dolazi do infekcija, potrebno je razmišljati o kirurškom zahvatu s ciljem poboljšanja čišćenja sinusa i uklanjanja inficiranog materijala (Ocampo i Grammer, 2013). Pokazalo se da nazalna primjena kortikosteroida u postoperativnom razdoblju ima pozitivne učinke- poboljšanje nazalnih simptoma, smanjenje potrebe za oralnim kortikosteroidima, smanjenje stope ponovne pojave polipa (Mullol i sur., 2009).

Ako pacijent nije dostigao prihvatljivu razinu kontrole kroničnog rinosinusitisa unatoč operaciji, nazalnoj primjeni kortikosteroida i 2 kratka perioda sistemske primjene antibiotika ili kortikosteroida, može se razmotriti ispiranje (irigacija) nosa velikim volumenom izotoničnih ili hipertoničnih otopina kortikosteroida (minimalno 200 ml) jer je uočeno subjektivno poboljšanje simptoma (Kosugi i sur., 2016; Rudmik i Soler, 2015).

1.3. Nazalna primjena kortikosteroida

1.3.1. Indikacije

Kortikosteroidi su sintetski derivati steroidnih hormona koje proizvodi kora nadbubrežne žlijezde. Izmjenom strukture prirodnih kortikosteroida dobivaju se spojevi kojima su neke farmakološke osobine pojačane, a druge potisnute. Zbog svog protuupalnog djelovanja, kortikosteroidi su vrlo učinkoviti u liječenju poremećaja nosne sluznice jer su ti poremećaji potaknuti različitim čimbenicima koji dovode do upalnih procesa. Indikacije za primjenu kortikosteroida su: akutni rinosinusitis, preventivno liječenje akutnog rekurentnog rinosinusitisa, kronični rinosinusitis sa ili bez polipa, postoperativno liječenje kroničnog rinosinusitisa sa ili bez polipa. Akutni i kronični poremećaji nosne sluznice imaju iste simptome, a njihov intenzitet može se razlikovati (Fokkens i sur, 2007; Mullol i sur., 2009). Brojna ispitivanja pokazala su da kortikosteroidi ublažavaju te simptome- smanjuju kongestiju, kihanje, rinoreju, poremećaj osjeta mirisa, smanjuju veličinu polipa (Mullol i sur., 2009). Do

oslobađanja od simptoma u nekih bolesnika dolazi nekoliko sati nakon početka primjene lijeka, ali puni učinak postiže se tek nakon nekoliko dana primjene (www.halmed.hr).

S obzirom da je upalni proces kod akutnih i kroničnih poremećaja sluznice nosa prisutan u nosnoj šupljini, logično je primijeniti kortikosteroide direktno na mjesto gdje trebaju djelovati tj. pomoću uređaja kojima se lijek dostavlja u nosnu šupljinu. Građa sluznice nosa te farmakodinamička i farmakokinetička svojstva nazalnih pripravaka omogućuju postizanje terapijskog učinka lokalnom primjenom lijeka. Nakon nazalne primjene, kortikosteroidi prolaze kroz stanične membrane jer su liposolubilni. U citoplazmi stanica vežu se na glukokortikoidne receptore. Nastali kompleks hormon-receptor prelazi u staničnu jezgru i veže se na regulacijski dio molekule DNA čime regulira tvorbu različitih molekula koje sudjeluju u upalnoj reakciji. Smanjuje se aktivacija i preživljavanje eozinofila te sekrecija kemotaksijskih citokina iz sluznice nosa i epitelnih stanica polipa čime se postiže protuupalni učinak (Fokkens i sur., 2007). Osim zbog učinkovitosti, nazalna primjena kortikosteroida se preferira i zbog manje stope sistemskih nuspojava u odnosu na sustavno liječenje (Meltzer, 2011; Francetić i sur., 2015).

Topikalni nazalni kortikosteroidi mogu se podijeliti na kortikosteroide prve generacije (beklometazon dipropionat, triamcinolon acetonid, flunizolid i budezonid) i novije kortikosteroide (flutikazon propionat, mometazon furoat, ciklezonid i flutikazon furoat) koji su razvijeni s ciljem smanjenja sistemske apsorpcije (Chong i sur., 2016).

1.3.2. Farmaceutski oblici

U Republici Hrvatskoj registrirani pripravci za nazalnu primjenu kortikosteroida su suspenzije u obliku kapi i sprejeva za nos, a kortikosteroidi koje sadrže su: triamcinolon, budezonid, flutikazon, mometazon (Bencarić, 2016). Registrirani pripravci i njihove indikacije prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1: Registrirani pripravci za nazalnu primjenu kortikosteroida u Republici Hrvatskoj i indikacije za njihovu primjenu

Farmaceutski oblik	Djelatna tvar	Indikacije
sprej za nos (suspencija)	triamcinolon	sezonski i cjelogodišnji alergijski rinitis
sprej za nos (suspencija)	budezonid	sezonski i cjelogodišnji (tzv. perenijalni) alergijski rinitis, vazomotorni rinitis, prevencija nastanka nosnih polipa nakon polipektomije, simptomatsko liječenje nosnih polipa
sprej za nos (suspencija), kapi za nos (suspencija)	flutikazon	alergijski i dugotrajni rinitis, nosni polipi
sprej za nos (suspencija)	mometazon	sezonski alergijski rinitis ili cjelogodišnji rinitis, nosni polipi

Svojstva ljekovitog pripravka i uređaja za primjenu utječu na terapijski učinak nazalno primjenjenih lijekova. Također, učinak ovisi i o svojstvima molekule lijeka.

Farmaceutski oblik i uređaj za nazalnu primjenu određuju mjesto prvog kontakta ljekovitog pripravka sa sluznicom nosa te vrijeme zadržavanja na mjestu primjene. O ovim čimbenicima ovisi apsorpcija lijeka koja utječe na podnošljivost, učinkovitost i sigurnost njegove primjene (Meltzer, 2011; Hafner i sur., 2014). Nazalni pripravci su najčešće tekućine koje se primjenjuju u obliku spreja (Szeffler, 2001; Meltzer, 2011). Sprejevi se raspršuju u prednji dio nosne šupljine, odakle se prenose mukocilijarnim mehanizmom čišćenja pa je vrijeme zadržavanja dulje nego kod primjene kapi za nos kojima se lijek dostavlja više u stražnji dio nosne šupljine (Hafner i sur., 2014). Raspodjela/depozicija ljekovitog pripravka nakon primjene u obliku spreja ovisi o oslobođenom volumenu. Moguće je primijeniti manje od 200 µl pripravka po nosnici, a veći volumen odlazi u ždrijelo. Idealni uređaj za nazalnu primjenu lijeka trebao bi oslobađati volumen kojim se postiže optimalna depozicija u nosu te minimalni odlazak u probavni sustav (Meltzer, 2011). Pokazalo se da su za poboljšanje simptoma rinosinuitisa učinkovitije kapi od sprejeva pa se kod jako izraženih simptoma preporučuje upotreba kapi

(Mullol i sur., 2009). Kapi imaju puno bolji učinak na poboljšanje osjeta mirisa (Fokkens i sur., 2007).

Svojstva ljekovitog pripravka koja utječu na terapijsku učinkovitost su: viskoznost, pH, osmolarnost, koncentracija lijeka, veličina čestica, pomoćne tvari. Također, okus, miris i moguća nelagoda kod primjene pripravka utječu na adherenciju pacijenata.

Viskoznost pripravka utječe na brzinu mukocilijarnog čišćenja o kojem ovisi vrijeme raspoloživo za apsorpciju lijeka. Viskoznijim pripravcima se produljuje vrijeme zadržavanja.

Neodgovarajući pH ljekovitog pripravka može izazvati iritaciju sluznice i utjecati na funkciju cilija pa je poželjno da bude sličan pH vrijednosti nosne sluznice (5- 6,5). Također, pH vrijednost utječe na stabilnost i topljivost lijeka te udio neioniziranog oblika lijeka (Kumar i sur., 2016).

Osmolarnost pripravka može utjecati na zadržavanje i raspoređivanje lijeka na sluznici nosa te na pokretanje cilija. Izotonične otopine su kompatibilne s nosnom sluznicom, dok hipertonične i hipotonične otopine utječu na brzinu mukocilijarnog čišćenja (Hafner i sur., 2014; Kapoor i sur., 2016).

Kod razvoja ljekovitog pripravka potrebno je odabrati odgovarajuće pomoćne tvari. Naime, mnoge pomoćne tvari su inertne, ali neke iritiraju i isušuju tkivo nosa (npr. polisorbati) te uzrokuju hiperosjetljivost. Također, mogu uzrokovati neugodan miris i okus ljekovitog pripravka (npr. benzalkonij klorid) (Meltzer, 2007).

Nije dokazano da je neki kortikosteroid značajno učinkovitiji u ublažavanju simptoma rinitisa i rinosinusitisa kod nazalne primjene u odnosu na ostale (Waddell i sur., 2003), ali strukturne razlike među kortikosteroidima utječu na lipofilnost i razlike u farmakokinetici (Szeffler, 2001). Općenito, lijek namijenjen nazalnoj primjeni trebao bi biti male molekulske mase, lipofilan, neutralan pri fiziološkom pH te dovoljno topljiv u vodi da je učinkovitu dozu moguće primijeniti u ograničenom volumenu pripravka koji se može primijeniti nazalno (Hafner i sur., 2014). Kod liječenja poremećaja sluznice nosa poželjno je da se lijek što dulje zadrži na mjestu primjene i da što manje prelazi u sistemski krvotok kako bi se izbjegle sistemske nuspojave. Lipofilniji lijekovi se brže i bolje apsorbiraju kroz sluznicu nosa i dulje se zadržavaju u nazalnom tkivu što produljuje izloženost glukokortikoidnim receptorima. Također, lipofilniji lijekovi se više vežu za proteine plazme čime je smanjeno njihovo djelovanje nakon sistemske apsorpcije. Dakle, idealni lijek je onaj koji ima veliku lipofilnost i nisku sistemsku apsorpciju te brzu eliminaciju. Redoslijed lipofilnosti kortikosteroida je:

mometazon furoat > flutikazon propionat > beklometazon dipropionat > budezonid > triamcinolon acetamid > flunizolid (Meltzer, 2011).

1.3.3. Sigurnost primjene

Nazalni kortikosteroidi propisuju se velikom broju bolesnika s kroničnim bolestima nosne šupljine, te je prisutna zabrinutost za sigurnost njihove primjene. Liječenje nazalnim kortikosteroidima je dugoročno pa postoji rizik od sistemskih i lokalnih nuspojava (Mullol i sur., 2009).

U 5-10 % pacijenata javljaju se lokalne nuspojave kao što su suhoća, žarenje, peckanje, krvarenje iz nosa, perforacija septuma (Szeffler, 2001; Meltzer, 2011).

Nakon nazalne primjene ljekovitog pripravka, kortikosteroidi mogu ući u krvotok i uzrokovati sistemske nuspojave. Ulazak u sistemski krvotok moguć je apsorpcijom kroz nosnu sluznicu ili apsorpcijom u probavnom sustavu nakon što je mukocilijarnim čišćenjem lijek prenesen do ždrijela i progutan. Prolaz lijeka kroz epitel nosne sluznice može biti transcelularni i paracelularni, a čimbenici koji utječu na apsorpciju su fiziologija nosne sluznice (protok krvi, mukocilijarno čišćenje, aktivnost enzima i transportnih sustava), te fizičko-kemijska svojstva kortikosteroida (molekulska masa, hidrofilnost/lipofilnost, stupanj ionizacije) i ljekovitog pripravka (način dostave lijeka, doza). Sistemska apsorpcija nazalnih kortikosteroida kreće se od 1 % za novije molekule (mometazon, flutikazon) do 40- 50 % za starije molekule (budesonid, triamcinolon) (Salib i Howarth, 2003; Mullol i sur., 2009). Rizik od sistemskih nuspojava kortikosteroida je smanjen jer se oni u velikoj mjeri vežu za proteine plazme (71-99%) pa nisu farmakološki aktivni (Mullol i sur., 2009). Rizik od nuspojava je manji i ako se kortikosteroidi inaktiviraju metaboliziranjem tijekom prvog prolaska kroz jetru. Međutim, dio koji se apsorbira preko sluznice nosa zaobilazi taj zaštitni mehanizam (Meltzer, 2011).

Nuspojave koje se mogu javiti nakon apsorpcije nazalno primijenjenih kortikosteroida u krvotok su: supresija hipotalamus-hipofizno-adrenalne osi (HPA-os), zaostajanje u rastu kod djece, smanjenje gustoće kostiju i osteoporoza, glaukom, katarakta.

Kortikosteroidi suprimiraju HPA-os smanjivanjem proizvodnje adrenokortikotropina (ACTH) negativnom povratnom spregom što vodi do smanjenog oslobađanja kortizola iz nadbubrežne žlijezde. Utjecaj na HPA-os ovisi o dozi i učestalosti primjene (Blais, 2007). Supresiju nadbubrežne žlijezde mogu uzrokovati neki nazalni kortikosteroidi ako se primjenjuju u preporučenim dozama, ali upitan je klinički značaj ovog utjecaja. Liječenje

dozom višom od preporučene može dovesti do klinički značajne supresije (Fokkens i sur., 2007).

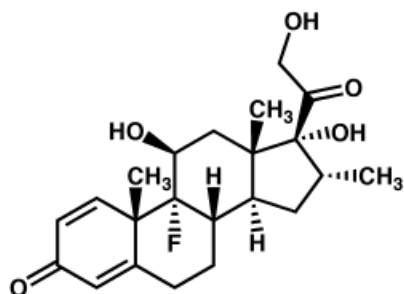
Prijavljeni su slučajevi zaostajanja u rastu u djece koja su primala nazalne kortikosteroide pri dozvoljenim dozama. Preporuča se redovito praćenje visine djece koja primjenjuju nazalne kortikosteroide kroz dulje vremensko razdoblje. U slučaju da je rast usporen, potrebno je razmotriti smanjenje doze na najmanju dozu pri kojoj je djelotvorna kontrola simptoma održiva (Salib i Howarth, 2003).

Kortikosteroidi mogu utjecati na izgradnju i razgradnju kostiju jer smanjuju apsorpciju kalcija u crijevima, utjecajem na bubrege povećavaju izlučivanje fosfata i kalcija urinom, inhibiraju osteoblaste i diferencijaciju njihovih prekursora te direktno inhibiraju formiranje kosti. Zbog navedenih učinaka kortikosteroida, postoji rizik od razvoja osteoporoze (Cave i sur., 1999).

Nema dovoljno podataka i dokaza za donošenje zaključka da nazalna primjena kortikosteroida može utjecati na razvoj katarakte i glaukoma, iako oralna primjena uzrokuje te nuspojave. S obzirom da postoji rizik od takvih sistemskih učinaka kortikosteroida, nužno je pažljivo praćenje bolesnika kod kojih su uočene promjene vida ili u anamnezi imaju povišen intraokularni tlak, glaukom i/ili kataraktu (Cave i sur., 1999; Salib i Howarth, 2003).

S obzirom da nazalno primijenjeni kortikosteroidi nisu potpuno bez sistemskih učinaka, potreban je oprez pri njihovoj primjeni. Rizik ovisi o dozi i trajanju liječenja, a manji je pri primjeni novije generacije kortikosteroida. Opres je naročito potreban u djece i pacijenata koji osim nazalnim putem, kortikosteroide uzimaju inhalacijski ili oralno (Fokkens i sur., 2007).

1.3.4. Deksametazon



Slika 5: Struktura deksametazona

Deksametazon (Slika 5) iskazuje znatno protuupalno djelovanje te osim rinitisa i rinosinusitisa, postoje brojne terapijske indikacije za njegovu primjenu (endokrine bolesti

nadbubrežne žlijezde, reumatske, kožne bolesti kao npr. dermatitisi i psorijaze, astma, bolesti oka, upalne bolesti probavnog sustava - ulcerozni kolitis, Chronova bolest, hematološke bolesti...). U Republici Hrvatskoj registrirani pripravci s deksametazonom su tablete, otopine za injekciju i infuziju te kapi, gel i mast za oko (www.halmed.hr).

Deksametazon je liposolubiln i može prelaziti u međustanični i unutarstanični prostor. Nakon apsorpcije veže se (do približno 77 %) na proteine u plazmi, uglavnom albumine. Razgrađuje se na mjestu djelovanja, u stanicama. Metabolizira se prije svega u jetri, ali i u bubrezima i drugim tkivima putem citokroma P450 (najviše CYP3A4). Veći dio je hidrogeniziran ili hidroksiliran, pri čemu su glavni metaboliti hidroksi-6-deksametazon i dihidro-20-deksametazon. 30 do 40 % su konjugirani u glukuronsku kiselinu ili podvrgnuti sulfataciji u ljudskoj jetri te se u ovom obliku izlučuju u urinu. Manji dio primijenjenog deksametazona izlučuje se nepromijenjen putem bubrega (www.halmed.hr).

1.4. Natrijev alginat - polimer izbora u pripravi terapijskih (nano)sustava

Iako nazalna primjena lijekova ima brojne prednosti, postoje ograničavajući čimbenici za postizanje terapijskog učinka kao npr. ograničen kapacitet nosne šupljine i brzo odvijanje mukocilijarnog čišćenja. Osim navedenog, kod nazalne primjene kortikosteroida postoji problem učinkovite dostave i depozicije ljekovitog pripravka u pacijenata koji imaju rinosinuitis i polipe. Iz tog razloga primjenjuju se visoke doze kortikosteroida jer se smatra da prodiru do sinusa. Kako bi se smanjio rizik od sistemskih nuspojava nakon primjene velikih doza kortikosteroida, razvijaju se novi terapijski sustavi koji omogućuju produljeno zadržavanje i oslobađanje lijeka čime se lokalni učinak može postići primjenom manje doze kortikosteroida. Farmakokinetički profil i bioraspodjelivost nazalno primijenjenog lijeka može se poboljšati uklapanjem lijekova u nanosustave (Cao i sur., 2009; Karavasili i Fatouros, 2016).

Nanosustavi mogu služiti kao nosači lijekova male molekulske mase, ali i različitih biofarmaceutika (npr. proteini i peptidi) (Hadinoto i sur., 2013). Tipovi nanosustava koji se razvijaju za nazalnu primjenu lijekova su nanoemulzije, liposomi, nanočestice, nanogelovi i nanosfere. Nanočestice su promjera od 1 do 1000 nm. One imaju velik omjer površine i mase, jedinstvena fizička svojstva i mogućnost apsorpcije i transporta tvari zbog čega su idealne za dostavu lijekova. Lijek može u njima biti otopljen, fizički uklopljen, adsorbiran ili kemijski vezan, a oslobađanje može biti kontrolirano svojstvima matriksa ili potaknuto čimbenicima na mjestu primjene (npr. pH, temperatura) (Hudson i Margaritis, 2012; Kumar i sur., 2016).

U posljednje vrijeme intenzivno se razvijaju polimerno-lipidne nanočestice (PLN) koje objedinjuju svojstva liposoma i polimernih nanočestica (Slika 6). Postoje dva tipa polimerno-lipidnih nanočestica. Prvi tip je tzv. monolitni matriks (engl. *monolithic matrix PLN*) u kojem je kompleks lijek-polimer, nastao ionskim ili drugim interakcijama, distribuiran u lipidnoj fazi. Drugi tip su PLN građene od jezgre obložene ovojnicom (engl. *core-shell PLN*) i dolaze u dva oblika. Prvi podtip (engl. *lipid-core/polymer-shell*) sadrži lipidnu jezgru okruženu polimerom, a drugi podtip ima polimernu jezgru okruženu lipidima (engl. *polymer-core/lipid-shell*). Razvijene su polimerno-lipidne nanočestice za različite puteve primjene: oralnu, transdermalnu, nazalnu i subkutanu primjenu (Zhang i sur., 2016).



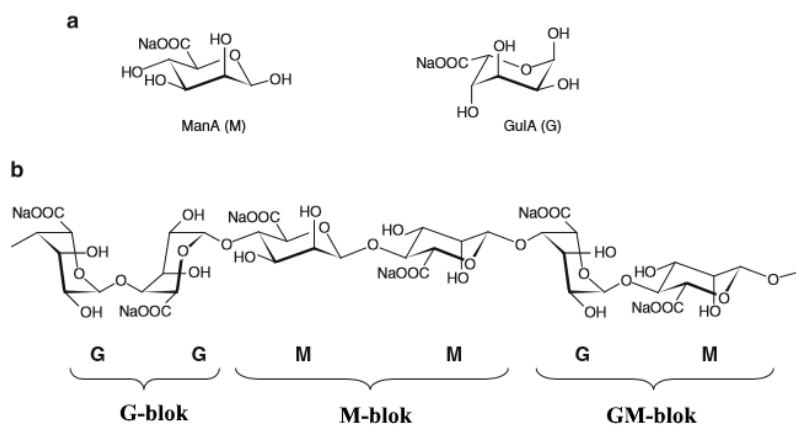
Slika 6: Prikaz sastava konvencionalnih i polimerno-lipidnih nanočestica (preuzeto i prilagođeno prema Zhang i sur., 2016)

Izbor lipida i polimera za pripremu nanočestica ovisi o stabilnosti lijeka, oslobađanju i količini lijeka koja se želi ugraditi u nanočestice. Mogu se koristiti različite skupine lipida-masne kiseline, gliceridi, fosfolipidi, čvrste masti i drugi lipidi. Polimeri moraju biti biorazgradljivi i biokompatibilni. Polimerno-lipidne nanočestice mogu sadržavati i surfaktante za stabilizaciju, a oni mogu biti različitih naboja i strukture (Zhang i sur., 2016).

Izborom odgovarajućeg polimera mogu se pripremiti nanočestice mukoadhezivnih i mukopenetrirajućih svojstava. Sluz na površini nosne sluznice je hidrofilna barijera, a produljeno oslobađanje lijeka može se postići česticama koje sadrže mukoadhezivne polimere, dok se mukopenetrirajuće čestice razvijaju kada je poželjno njihovo prodiranje kroz sluz do epitela (Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016). Mukoadhezija je složen fenomen koji

uključuje vlaženje, adsorpciju i prožimanje polimernih lanaca te omogućuje prijanjanje nanočestica uz sluz. Mukoadhezivni polimeri mogu se podijeliti na prirodne (alginat, kitozan i njegovi derivati, guar guma, ksantan guma, pektin, galaktomanan, glukomanan, karagenan tip II, hijaluronska kiselina i drugi glikozaminoglikani, želatina), sintetske (polietilenglikol, polietilenoksid, derivati poliakrilne i polimetakrilne kiseline, polivinilpirolidon, polivinilamin) i polusintetske (derivati celuloze) (Sosnik i sur., 2014). Mukoadhezivna svojstva polimera ovise o duljini polimernih lanaca, stupnju hidratacije, stupnju umrežavanja, koncentraciji polimera i naboju (Kumar i sur., 2014).

Jedan od najvažnijih prirodnih mukoadhezivnih polimera u farmaciji je alginat. Alginat je anionski polimer. Komercijalno dostupni alginati obično se dobivaju iz smeđih morskih algi (*Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Acicophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*), a proizvode ih i bakterije *Azobacter* i *Pseudomonas*. Strukturno, alginati su kopolimeri sastavljeni od blokova beta-D-manuronata (M) i alfa-L-glukuronata (G) povezanih 1,4-vezama (Slika 7), a njihov udio i duljina bloka razlikuje se ovisno o izvoru (Lee i Mooney, 2012) i starosti biljke (Sosnik i sur., 2014). Blokovi se sastoje od uzastopnih G podjedinica (GGGG), uzastopnih M podjedinica (MMMM) ili naizmjeničnih G i M podjedinica (GMGMGM) (Lee i Mooney, 2012). Alge prolaze kroz proces obrade kojim se uklanjaju onečišćenja, a zatim se prevode u prašak u obliku soli ili kiseline (Goh i sur., 2012).



Slika 7: Struktura alginata (preuzeto i prilagođeno prema Rehm, 2009)

Fizičko-kemijska i reološka svojstva alginata i njegovih vodenih otopina ovise o sastavu slijedova (omjer M/G), duljini G blokova te molekulskoj masi. Molekulske mase komercijalno dostupnih alginata iznose između 32,000 i 400,000 g/mol. Mehanička svojstva alginata

povećavaju se s povećanjem duljine G blokova i molekulske mase (Lee i Mooney, 2012). Natrijev alginat koji sadrži veći udio guluronata topljiviji je u vodi od alginata koji ima više manuronske kiseline (Goh i sur., 2012). Vodena otopina alginata može prijeći iz sol u gel stanje umrežavanjem u prisustvu dvovalentnih kationa kao što je Ca^{2+} (Lee i Mooney, 2012). Naime, G podjedinice mogu formirati šupljine koje mogu zauzeti ioni kao npr. natrijevi ioni kod natrijevog alginata. Drugi ioni (npr. Ba^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+}) također mogu ući u šupljine i potaknuti geliranje (Hudson i Margaritis, 2012). Hidrogelovi se koriste za dostavu lijekova, zarastanje rana te tkivno inženjerstvo (Lee i Mooney, 2012).

1.4.1. Biofarmaceutska svojstva alginata

Alginat se istražuje i upotrebljava u farmaciji zbog povoljnih biofarmaceutskih svojstava. Alginat je mukoadhezivan, biokompatibilan, biorazgradljiv, ne iritira, niske toksičnosti, relativno male cijene (Sosnik i sur., 2014).

Mukoadhezivnost alginata u sol stanju posljedica je stvaranja vodikovih veza, hidratacije i geliranja polimera (Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016).

Biokompatibilnost alginata postiže se pročišćavanjem u nekoliko koraka ekstrakcijom jer alginati visoke čistoće ne pokazuju sposobnost induciranja neželjenih reakcija kod primjene (Hudson i Margaritis, 2012). Onečišćenja (teški metali, endotoksini, proteini, polifenolni spojevi) mogu izazvati imunološke reakcije pa se alginat povezuje s nekim neželjenim djelovanjima (Sosnik i sur., 2014).

Za dostavu lijekova koriste se biorazgradljivi polimeri jer oni koji nisu biorazgradljivi mogu uzrokovati nuspojave kao npr. kroničnu toksičnost i nakupljanje u tkivima. Molekule alginata pokazuju degradaciju *in vivo* te se ne akumuliraju u organima (Hudson i Margaritis, 2012). Enzim alginaza koji razgrađuje alginat nije prisutan kod sisavaca. Većina komercijalno dostupnih alginata ima prosječnu molekulsku masu veću od najviše dopuštene za izlučivanje bubrezima te se alginat ne uklanja potpuno iz tijela. Oksidacijom lanaca alginata on postaje razgradljiv u fiziološkim uvjetima (Lee i Mooney, 2012).

1.4.2. Primjeri alginatnih terapijskih sustava

Brojna istraživanja usmjerena su na razvoj alginatnih nanočestica za različite putove primjene lijeka, među kojima je i nazalna primjena. Primjerice, Mali i suradnici pripravili su nanočestice s antiemetikom granisetron hidrokloridom, sastavljene od natrijevog alginata, Pluronica, moringa gume, karboksimetil gume tamarinde (Mali i sur., 2015). Povećanjem

koncentracije polimera povećana je mukoadhezivnost, omogućeno *in situ* stvaranje gela i produljen kontakt sa sluznicom nosa, a smanjena je temperatura pri kojoj dolazi do geliranja. S ciljem poboljšane dostave nazalno primijenjenog lijeka u mozak, Haque i sur. pripravili su alginatne nanočestice s antidepresivom venlafaksinom i rezultati pokazuju da bi se taj pristup mogao koristiti u liječenju depresije (Haque i sur., 2013).

Sintetizirane su nanočestice alginata supstituirane hidrofobnim fitosterolima i konjugirane folatom koji je specifičan ligand stanica karcinoma. U njih je uspješno uklopljen hidrofoban antitumorski lijek doksorubicin. Fitosterol-alginatne nanočestice s folatom imaju potencijal za ciljanu dostavu hidrofobnih lijekova do stanica karcinoma s povećanom ekspresijom folatnog receptora čime bi se izbjegla toksičnost antitumorskih lijekova na zdrava tkiva (Wang i sur., 2015).

Severino i suradnici uspješno su uklopili polipeptidni antibiotik polimiksin B sulfat u lipidne nanočestice umrežene alginatom. Naime, polimiksin B je u obliku slobodne baze praktički netopljiv u vodi i preferira se njegova primjena u obliku soli, ali kationski naboj takvih soli predstavlja zapreku za uspješno uklapanje u čvrste lipidne nanočestice (engl. *solid lipid nanoparticles*, SLN). Polimiksin (PLX) je najprije umrežen natrijevim alginatom (SA) u različitim omjerima (1:1, 1:2, 1:3 SA/PLX) kako bi se smanjila njegova hidrofilnost i uklopljen u SLN pripravljene visokotlačnom homogenizacijom (Severino i sur., 2015).

U nanočestice natrijevog alginata i glikol kitozan stearata uklopljen je amfotericin B za učinkovitije liječenje lišmanioze. Provedena su ispitivanja toksičnosti i raspodjele te je pokazano da se ove nanočestice raspodjeljuju u većoj mjeri u tkiva inficirana bičasiima roda *Leishmania* npr. slezenu i jetru, a manje u bubrege (Gupta i sur., 2015).

Najafabadi i suradnici pripremili su alginatne nanočestice sa slabo topljivim anestetikom propofolom za intravensku primjenu. Naime, komercijalno dostupna lipidna emulzija propofola je nestabilna i tijekom injektiranja uzrokuje bol. Alginat je modificiran vezanjem njegovih karboksilnih skupina na oktanol. Rezultati ukazuju na dobru kemijsku i fizičku stabilnost prilikom skladištenja pri sobnoj temperaturi najmanje 6 mjeseci (Najafabadi i sur., 2015).

Istražuju se i mogućnosti okularne primjene alginatnih nanočestica. Primjerice, pripremljene su mukoadhezivne kitozansko-alginatne nanočestice s antibiotikom daptomicinom za njegovu dostavu kroz epitel oka za liječenje endoftalmitisa. Zahvaljujući dobroj uspješnosti uklapanja lijeka (79 – 92 %), razvijene nanočestice pokazale su se kao potencijalan terapijski sustav za okularnu primjenu daptomicina (Costa i sur., 2015). Motwani

i suradnici pripremili su alginatno-kitozanske nanočestice s produljenim oslobađanjem gatifloksacina, za okularnu primjenu (Motwani i sur., 2008).

Pripremljene su alginatne nanočestice poticanjem geliranja kalcijevim ionima nakon čega je slijedilo polielektrolitno kompleksiranje slojem kitozana te uklapanje inzulina. Blagi uvjeti pripreme, odgovarajuća veličina čestica, dobra uspješnost uklapanja i stabilnost u probavnom sustavu, obećavajući su čimbenici za razvoj oblika za oralnu primjenu inzulina (Sarmiento i sur., 2007).

Ahmad i suradnici uklopili su ekonazol u alginatne nanočestice i pokazali da uklapanje produljuje zadržavanje lijeka u tijelu do 15 dana, dok se lijek primijenjen bez uklapanja u nanočestice zadržava manje od 24 sata. Razvijene nanočestice omogućuju smanjenje učestalosti doziranja azola (Ahmad i sur. 2007).

Razvijaju se i nanočestice sastavljene od derivata alginata pripremljenih kemijskim ili fizičkim postupcima kako bi se dobila željena svojstva. Primjerice, pripravljene su nanočestice sastavljene od oleilalginatnog estera u koji je uklopljen vitamin D₃ (Ju i sur., 2012). Općenito, uklapaju se funkcionalni lipidi (karotenoidi, fitosteroli, ω -3 masne kiseline) i antioksidansi u biopolimerne nanočestice za poboljšanje oralne bioraspoloživosti.

Osim za pripravu nanočestica, alginat se koristi za pripravu drugih terapijskih sustava kao što su peleti i mikrosfere. Primjenjuje se za zgušnjavanje i geliranje, posebno za oralne pripravke (Goh i sur., 2012; Jain i Bar-Shalom, 2014). Koristi se za izradu obloga za rane s ciljem apsorpcije eksudata, očuvanja homeostaze i vlažnosti, poticanja epitelizacije i cijeljenja (Sosnik i sur., 2014). Alginatni matriksi upotrebljavaju se za rad sa staničnim kulturama, istražuje se primjena alginata za dostavu proteina i stanica za regeneraciju različitih tkiva i organa (Goh i sur., 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Anatomske i fiziološke značajke nosne šupljine osiguravaju brojne prednosti nazalne primjene lijekova poput terapijskog učinka nedugo nakon primjene, mogućnosti sistemskog učinka i direktne dostave lijeka u mozak. Istodobno, građa nosne sluznice i mukocilijarni transport predstavljaju prepreku nazalnoj primjeni lijekova (Hafner i sur., 2014; Karavasili i Fatouros, 2016).

Ublažavanje simptoma upalnih poremećaja sluznice nosa kao što su rinitis i rinosinuitis sa ili bez polipa provodi se nazalnom primjenom kortikosteroida kojom se želi postići lokalni učinak. Kortikosteroidi ublažavaju nosnu kongestiju i curenje iz nosa, bol i osjećaj pritiska na lice te poremećaj osjeta mirisa. Iako se mogu primijeniti različitim putovima, nazalna primjena je najsigurnija i najpraktičnija (Mullol i sur., 2009; Meltzer, 2011). Registrirani pripravci za nazalnu primjenu kortikosteroida su suspenzije u obliku kapi i sprejeva za nos. Kako bi se poboljšala učinkovitost i sigurnost njihove primjene, razvijaju se novi terapijski sustavi.

Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj nanosustava. Uklapanjem lijekova u nanosustave može se poboljšati farmakokinetički profil nazalno primijenjenog lijeka. U posljednje vrijeme intenzivno se razvijaju polimerno-lipidne nanočestice koje su veličine od 1 do 1000 nm.

U ovom radu pripravljene su lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom. Alginat je polimer izbora za izradu terapijskih nanosustava zbog povoljnih bioloških svojstava kao što su biokompatibilnost, mukoadezivnost te niska toksičnost. Ta svojstva omogućuju interakcije sa sluznicom nosa i dulje zadržavanje ljekovitog pripravka na mjestu primjene, što omogućuje produljeno oslobađanje lijeka i primjenu manje doze kortikosteroida (Sosnik i sur., 2014).

Lipidi korišteni za pripremu nanočestica su lecitin i dimetil-dioktadecil-amonij bromid. Lecitin je smjesa lipida i koristi se za pripremu nanočestica jer omogućuje dobro uklapanje lipofilnih lijekova, kao što su kortikosteroidi, omogućuje produljeno oslobađanje, siguran je i biokompatibilan (Hafner i sur., 2009; Bhatta i sur., 2012). Dimetil-dioktadecil-amonij bromid (DDAB) je tetraalkil amonijev spoj i sadrži dugi alkilni lanac koji mu daje lipofilna svojstva. Alkilni lanac omogućuje pripremu kationskih liposoma kao nosača lijekova koji mogu stupiti u elektrostatsku interakciju s negativno nabijenim strukturama/površinama (www.sigmaaldrich.com).

Cilj ovog rada bio je odrediti svojstva lipidno-alginatnih nanočestica kao nosača deksametazona te ispitati njihovu biokompatibilnost *in vitro*, koristeći epitelne stanice karcinoma debelog crijeva (Caco-2 stanice), kako bi se procijenila sigurnost njihove nazalne primjene u svrhu liječenja rinitisa i rinosinuitisa bez ili sa polipima.

Specifični ciljevi:

- Pripraviti lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom korištenjem lecitina S100 i dimetil-dioktadecil-amonij bromida.
- Odrediti fizičko-kemijska svojstva pripremljenih nanočestica
 - veličinu i raspodjelu veličina čestica
 - površinski naboj
 - sadržaj uklopljenog lijeka
- Ispitati *in vitro* oslobađanje uklopljenog deksametazona iz lipidno-alginatnih nanočestica.
- Ispitati biokompatibilnost lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom praćenjem metaboličke aktivnosti epitelnih stanica karcinoma debelog crijeva tj. Caco-2 stanica *in vitro* nakon izlaganja suspenzijama nanočestica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Tvari korištene za izradu nanočestica su:

- lecitin S100 (Lipoid GmbH, Njemačka)
- dimetil-dioktadecil-amonij bromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- natrijev alginat (NovaMatrix, Norveška)
- deksametazon (Sanofi Aventis, Francuska)
- etanol 96 % (Kemig d.o.o., Hrvatska)

Za razrjeđivanje suspenzija nanočestica prije mjerenja zeta potencijala korištena je 10 mM otopina NaCl (Kemig d.o.o., Hrvatska).

Receptorski medij korišten pri ispitivanju oslobađanja deksametazona *in vitro* bila je 0,03% otopina natrij lauril- sulfata ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$, engl. *sodium dodecyl sulfate*- SDS; Merck, Njemačka).

Caco-2 stanice (American Type Culture Collection, SAD) uzgajane su u hranidbenom mediju DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Švicarska) uz dodatak 10 % fetalnog telećeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS; Biosere, Francuska), smjese antibiotika (penicilin, streptomycin, amfotericin B; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Švicarska) i neesencijalnih aminokiselina (Lonza, Belgija). U radu sa Caco-2 stanicama korišteni su fosfatni pufer bez Ca i Mg (engl. *phosphate buffered saline without Ca and Mg*, PBS, Lonza, Belgija), otopina EDTA (Versene) (Lonza, Belgija), tripsin (Lonza, Belgija).

Razrjeđivanje suspenzije nanočestica prije tretiranja Caco-2 stanica provedeno je puferom balansiranim Hankovim solima (engl. *Hank's balanced salt solution*, HBSS pufer) pH 7,4 koji je pripremljen otapanjem sljedećih tvari u pročišćenoj vodi:

- kalcijev klorid ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,185 mg/ml)
- magnezijev klorid ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg/ml)
- magnezijev sulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg/ml)
- kalijev klorid (KCl; 0,4 mg/ml)
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4 ; 0,06 mg/ml)

- natrijev bikarbonat (NaHCO_3 ; 0,350 mg/ml)
- natrijev klorid (NaCl ; 8 mg/ml)
- natrijev hidrogenfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,06 mg/ml)
- D-glukoza (D-glukoza \times H_2O ; 1,1 mg/ml)
- 4-(2-hidroksietil)-1piperazinetansulfonska kiselina (HEPES; 30 mM, 7,15 mg/ml)

Za podešavanje pH vrijednosti HBSS-a na 7,4 korišten je NaOH (T.T.T., Hrvatska).

Tijekom ispitivanja citotoksičnosti nanočestica korišteni su: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-25-difeniltetrazol bromid] (MTT; Biochemica, Aplichem GmbH, Njemačka), izopropanol (VWR Chemicals, Francuska).

3.2. Metode

3.2.1. Priprava nanočestica

Otopina dimetil-dioktadecil-amonij bromida (DDAB) koncentracije 10 mg/ml pripravljena je u 96 % etanolu. Različiti volumeni te otopine pomiješani su s otopinom lecitina dobivenom otapanjem 50 mg lecitina u 96 % etanolu tako da ukupan volumen etanolne otopine iznosi 2 ml. Deksametazon je otopljen u etanolnoj otopini lecitina i DDAB u koncentraciji od 5 mg/ml, odnosno u masenom omjeru prema lecitinu od 1:5. Sastav pripremljenih etanolnih otopina DDAB, lecitina i deksametazona prikazan je u Tablici 2.

Otopina natrijevog alginata koncentracije 10 mg/ml pripravljena je u pročišćenoj vodi. Alikvot od 500 μl te otopine alginata razrijeđen je pročišćenom vodom do volumena od 23 ml.

Lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom pripravljene su injektiranjem 2 ml etanolne otopine lecitina, DDAB i deksametazona kroz iglu unutarnjeg promjera 0,75 mm, u 23 ml razrijeđene otopine alginata uz miješanje na magnetskoj miješalici (900 okr/min). Koncentracija alginata u suspenziji nanočestica iznosila je 200 $\mu\text{g/ml}$, a maseni omjer lecitina i alginata je 10:1.

Tablica 2: Sastav otopina korištenih za pripravu nanočestica sastavljenih od lecitina, DDAB i alginata u koje je uklopljen deksametazon

	Lecitin (mg)	DDAB (mg)	Deksametazon (mg)	Alginat (mg)
DLAN1	50	0,7	10	5
DLAN2	50	1	10	5
DLAN3	50	3	10	5
DLAN4	50	5	10	5
	Etanolna otopina (2 ml)			Vodena otopina (23 mL)

Opisanim postupcima pripravljene su i prazne lipidno-alginatne nanočestice uz izostavljanje deksametazona. Pripravljene su i nanočestice bez alginata i deksametazona injektiranjem 2 ml etanolne otopine lecitina i DDAB u 23 ml pročišćene vode.

3.2.2. Određivanje topljivosti deksametazona u 6,24 % etanolu (*m/m*)

Određena je topljivost deksametazona u 6,24 % etanolu (*m/m*). Pripremljene su prezasićene otopine deksametazona koncentracije 400 i 600 µg/ml u 6,24 % etanolu (*m/m*) u triplikatu. Otopine su miješane 24 sata na sobnoj temperaturi pri brzini od 130 okr/min. Nakon 24 sata otopine su filtrirane kroz filter veličine pora 0,45µm (Millipore, Švicarska) kako bi se odvojio neotopljeni deksametazon. Koncentracija deksametazona u filtratu, koji predstavlja njegovu zasićenu otopinu, određena je UV-Vis spektrofotometrijom (UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Probe, Varian, CA, SAD) pri 241 nm. Uzorci su prije mjerenja apsorbancije razrijeđeni 10 puta korištenjem 6,24 % etanola (*m/m*).

Za određivanje koncentracije deksametazona u zasićenim otopinama tj. za određivanje topljivosti na temelju izmjerenih apsorbancija, napravljen je baždarni dijagram. Za izradu baždarnog dijagrama pripremljen je koncentracijski niz otopina deksametazona u 6,24% etanolu (*m/m*) (5, 10, 15, 20, 25 µg/ml). Slijepa proba je bio 6,24 % etanol (*m/m*) i mjerenja su provedena u duplikatu UV-Vis spektrofotometrijom pri 241 nm.

3.2.3. Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka u nanočestice

Sadržaj deksametazona u nanočesticama određen je nakon filtriranja pripremljenih suspenzija nanočestica kroz filter veličine pora 0,45 µm (Millipore, Švicarska). Filtriranjem je odvojen neuklopljeni deksametazon koji se istaložio, od nanočestica s uklopljenim lijekom.

Metoda kojom je određen sadržaj deksametazona je tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC) (Agilent Infinity 1290 Agilent, Santa Clara, CA, USA). Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci razdjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna dok se druga kreće u određenom smjeru. Kod tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti pokretna faza je tekuća i pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama nepokretne faze noseći sastavnice uzorka. Mjerenje je provedeno korištenjem kolone The Acquity UPLC BEH Shield RP18 Column (1,7 μm , 2,1 mm x 50 mm) (Waters, MA, SAD) pri temperaturi od 50 °C. Mobilna faza sastojala se od acetatnog pufera i acetonitrila (Merck-Millipore, MA, SAD) u volumnom omjeru 67:33. Acetatni pufer pripremljen je otapanjem $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska) u Milli-QTM vodi (0,3 mg ml⁻¹) (Merck-Millipore, MA, SAD), a pH vrijednost je podešena na 4,5 pomoću octene kiseline (Merck-Millipore, MA, SAD). Prije upotrebe pufer je filtriran kroz membranski filter (regenerirana celuloza, 0,2 μm , Whatman, Njemačka). Mobilna faza je protjecala brzinom 0,4 ml/min i elucija je bila izokratična. Detekcija se odvijala na valnoj duljini od 241 nm, a vrijeme zadržavanja je bilo 1,18 min. Uzorci nanočestica su prije analize razrijeđeni 50 puta u metanolu i filtrirani (Whatman® Spartan® syringe filters, membrana od regenerirane celuloze, veličina pora 0,22 μm).

Uspješnost uklapanja lijeka određena je prema jednadžbi:

$$\text{UU} = [\text{masa uklopljenog lijeka}] / [\text{teorijska masa lijeka}] \times 100 .$$

Sadržaj lijeka u nanočesticama (engl. *drug loading*, DL (%)) određen je prema jednadžbi:

$$\text{DL} (\%) = [\text{masa uklopljenog lijeka}] / [\text{masa nanočestica}] \times 100.$$

Sadržaj lijeka (C) u suspenziji nanočestica određen je prema jednadžbi:

$$\text{C} (\mu\text{g/ml}) = [\text{masa uklopljenog lijeka}] / [\text{volumen suspenzije nanočestica}].$$

Filtrirani uzorci suspenzija nanočestica korišteni su u daljnjim ispitivanjima.

3.2.4. Određivanje veličine nanočestica

Veličina nanočestica određena je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*; PCS) pri 25°C (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, UK). Prije mjerenja veličine, pripravljene suspenzije nanočestica razrijeđene su 5 puta pročišćenom

vodom. Tijekom mjerenja uzorak se obasjava monokromatskom koherentnom 10 mW He-Ne laserskom zrakom ($\lambda = 633 \text{ nm}$) te se bilježi intenzitet svjetlosti raspršene na česticama pod kutom od 90° . Ovom metodom može se mjeriti veličina dispergiranih čestica u rasponu od 2 nm do 3 μm .

3.2.5. Određivanje zeta-potencijala nanočestica

Zeta-potencijal nanočestica određen je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (PCS) (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, UK) pri 25°C . Ovaj parameter omogućuje predviđanje stabilnosti suspenzija. Mali zeta-potencijal ukazuje na veću vjerojatnost agregacije nanočestica u kratkom vremenu. Suspenzije nanočestica razrijeđene su otopinom NaCl (10 mM) prije mjerenja. Vrijednost zeta-potencijala određuje se indirektnim mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica korištenjem 10 mW He-Ne lasera.

3.2.6. *In vitro* oslobađanje lijeka iz nanočestica

Profil oslobađanja deksametazona iz nanočestica određen je metodom dijalize. Suspenzije nanočestica s uklopljenim deksametazonom (2 ml) nakon filtriranja stavljene su u dijalizacijsku vrećicu (Spectra/Por 4 Dialysis Tubing, MWCO 12 000 - 14 000 Da, Medicell International Ltd., UK). Zatim je dijalizacijska vrećica uronjena u 30 ml 0,03 % otopine natrij lauril sulfata (receptorski medij), čime su osigurani uvjeti topljivosti za deksametazon. Uz neprekidno miješanje na magnetskoj miješalici (180 okr/min), iz receptorskog medija uzimani su uzorci (2 ml) u određenim vremenskim intervalima (svakih 30 minuta kroz prva 3 sata te nakon 4, 5, 7 i 24 sata). Nakon uzimanja uzoraka volumen receptorskog medija nadoknađen je dodavanjem 2 ml 0,03 % otopine natrij lauril sulfata. Uzorci su razrijeđeni s 1 ml 0,03 % otopine natrij lauril sulfata te je u njima određena koncentracija oslobođenog deksametazona UPLC metodom. Mjerenja su provedena u triplicatu.

3.2.7. Stanična linija i uvjeti uzgoja

Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica *in vitro* provedeno je na epitelnim stanicama karcinoma debelog crijeva tj. Caco-2 stanicama (American Type Culture Collection, SAD). Stanice su uzgajane u sterilnim uvjetima pri temperaturi od 37°C , 5 % CO_2 i 95 % relativne vlažnosti u tikvicama od 150 cm^2 u 24 ml hranidbenog medija. Hranidbeni medij korišten za uzgoj je DMEM koji sadrži i fetalni goveđi serum, smjesu antibiotika (penicilin, streptomycin, amfotericin B) i neesencijalne aminokiseline.

Nakon postizanja 80-90 % konfluentnosti, stanice su presađivane u nove tikvice ili na ploče s jažicama za ispitivanje vijabilnosti. Uklonjen je medij te su ostaci isprani 2 puta sa po 10 ml PBS-a. Odvajanje stanica od podloge provedeno je dodatkom 8 ml tripsina koji je 10 puta razrijeđen otopinom EDTA (Versene), uz inkubaciju oko 5 minuta. Tripsinizacija je zaustavljena dodatkom 12 ml medija. Suspenzija stanica je centrifugirana, supernatant iznad taloga je uklonjen, a stanicama je dodan hranidbeni medij.

3.2.8. Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica *in vitro*

Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica na Caco-2 stanicama provedeno je nasadivanjem na ploče s 96 jažica, pri gustoći od 4000 stanica/jažici. Nakon nekoliko dana, kada su stanice postigle odgovarajuću konfluentnost (80-90 %), tretirane su nanočesticama. Pripravljene suspenzije nanočestica razrijeđene su HBSS-om do koncentracija 50, 100, 200 i 400 µg/ml (izražene koncentracijom lecitina u sustavu). Otopina pufera HBSS imala je pH vrijednost 7,4 koja je podešena dodatkom 10 M NaOH. Prije nanošenja nanočestica, iz jažica je uklonjen medij. Na stanice su naneseni uzorci razrijeđenih suspenzija nanočestica volumena 100 µl, nakon čega je uslijedila inkubacija od 2 sata. Stanice tretirane samo HBSS-om služile su kao kontrola. Po završetku inkubacije, uzorci nanočestica su uklonjeni, stanice su isprane PBS-om i dodano im je 100 µl medija. Nakon 24 sata određivana je vijabilnost tretiranih stanica.

Vijabilnost stanica određena je MTT testom. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid] (Sigma, Njemačka) test je kolorimetrijski test kojim se ispituje metabolička aktivnost stanica. Otopina MTT je žute boje, a stanice pomoću NAD(P)H – ovisne oksidoreduktaze prevode MTT u formazan koji je netopljiv u vodi i ljubičaste je boje. Nastali ljubičasti kristali formazana topljivi su u organskim otapalima. Intenzitet boje mjeri se spektrofotometrijski, a izmjerena apsorbancija izravno je proporcionalna koncentraciji formazana tj. metaboličkoj aktivnosti stanica.

Pripremljena je otopina MTT-a koncentracije 5 mg/ml (žute boje) i u svaku jažicu je dodano po 10 µl otopine. Uslijedila je inkubacija pri 37 °C u trajanju od 2 sata. Nastali su ljubičasti kristalići formazana. Iz jažica je uklonjen medij i u svaku je dodano po 100 µl izopropanola kako bi došlo do otapanja kristala. Dobivenim izopropanolnim otopinama formazana izmjerena je apsorbancija na UV-Vis spektrofotometru (Victor³, PerkinElmer, SAD) pri valnoj duljini od 570 nm.

4. REZULTATI I RASPRAVA

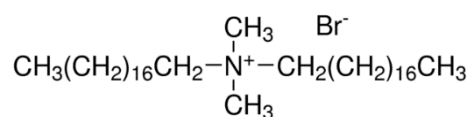
4.1. Priprava lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom

Nanočestice i brojni drugi nanosustavi kao npr. liposomi, nanoemulzije, polimerne micelle, dendrimeri, nanokristali istražuju se kao terapijski sustavi namijenjeni različitim putovima primjene lijeka s ciljem modifikacije farmakokinetičkih parametara. Pod pojmom nanočestica podrazumijevaju se nanosfere i nanokapsule veličine od 1 do 1000 nm. Nanosfere se sastoje od čvrste polimerne mreže matriksnog tipa, u kojoj lijek može biti homogeno raspodijeljen (čvrste otopine ili disperzije) ili može biti adsorbiran na površinu čestica. Nanokapsule su vezikularni sustavi kod kojih je lijek smješten u središtu čestice koja je okružena polimernom ovojnicom (Herrero-Vanrell i sur., 2013).

Uspješno su pripravljene nanočestice s kortikosteroidom deksametazonom sastavljene od lecitina, dimetil-dioktadecil-amonij bromida i alginata.

Lecitin je prirodna smjesa fosfolipida, triglicerida, masnih kiselina, sterola, glikolipida. Sastavni je dio stanica ljudi, biljaka i životinja. Najvažniji izvori za industrijsku proizvodnju lecitina su jaja te ulja soje, uljane repice, suncokreta. Različiti tipovi lecitina razlikuju se prema udjelu polarnih lipida i sastavu fosfolipida (www.lipoid.com). Lecitin koji je korišten za pripravu nanočestica dobiven je iz soje i sadrži > 94 % fosfatidilkolina. Za pripravu nanočestica odabran je lecitin jer omogućuje dobro uklapanje lipofilnih lijekova kao što je deksametazon, omogućuje produljeno oslobađanje, siguran je i biokompatibilan (Hafner i sur., 2009; Bhatta i sur., 2012).

Dimetil-dioktadecil-amonij bromid (DDAB) je tetraalkil amonijev spoj molekularne formule $C_{38}H_{80}NBr$ i molekularne mase 630.95 g/mol (Slika 8). Sadrži dugi alkilni lanac koji mu daje lipofilna svojstva. Alkilni lanac omogućuje pripremu kationskih liposoma kao nosača lijekova koji mogu stupiti u elektrostatsku interakciju s negativno nabijenim strukturama/površinama. Topljiv je u etanolu (100 mg/ml) (www.sigmaaldrich.com).



Slika 8: Struktura dimetil-dioktadecil-amonij bromida (DDAB)

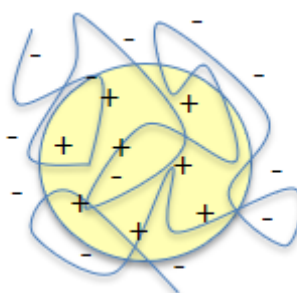
Alginat je anionski polimer dobrih biofarmaceutskih svojstava - mukoadhezivan, biokompatibilan, biorazgradljiv, ne iritira.

Deksametazon je djelatna tvar s protuupalnim djelovanjem.

Injektiranjem etanolne otopine lipidnih komponenti (lecitin i DDAB) u pročišćenu vodu dolazi do formiranja vezikula/nanočestica pozitivnog zeta potencijala. Lecitin je negativno nabijen, a DDAB je kationski lipid pa ukupan naboj ovisi o tipu lecitina i masenom omjeru lecitina i kationskog lipida. Pri izradi nanočestica s deksametazonom korišteni su oni omjeri lecitina i kationskog lipida koji osiguravaju ukupni pozitivni naboj lipidnih nanočestica. Dodavanjem deksametazona dolazi do njegove ugradnje u nanočestice što je moguće s obzirom na njegovu lipofilnost. Injektiranjem etanolne otopine lipidnih sastavnica u vodenu otopinu alginata nastaju negativno nabijene lipidno-alginatne nanočestice. Mehanizam njihova nastanka uključuje ionsku interakciju između pozitivno nabijene lipidne smjese i negativno nabijenog alginata (Slika 9). Takva metoda pripreme nanočestica temeljena na elektrostatskim interakcijama naziva se ionotropno geliranje.

Maseni omjer lecitina i deksametazona bio je 5:1, lecitina i alginata 10:1, deksametazona i alginata 2:1. Uzorci nanočestica pripremljeni su s različitim količinama kationskog lipida DDAB i označeni kao DLAN1, DLAN2, DLAN3 i DLAN4.

Pripremljene lipidno-alginatne nanočestice bez deksametazona označene su kao LAN, a nanočestice bez deksametazona i alginata označene su kao LN.



Slika 9: Shematski prikaz pripremljenih lipidno-alginatnih nanočestica

4.2. Određivanje topljivosti deksametazona u 6,24 % etanolu (*m/m*)

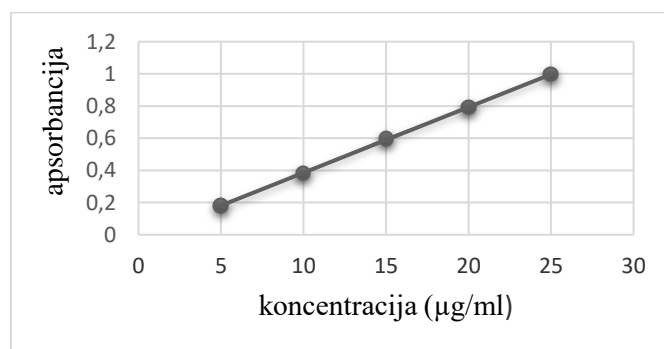
Određena je topljivost deksametazona u 6,24 % etanolu (*m/m*). Odabrana koncentracija odgovara koncentraciji etanola u suspenziji nanočestica. Izmjerene su apsorbancije zasićenih otopina deksametazona dobivene filtriranjem prezasićenih otopina deksametazona koncentracije 400 i 600 µg/ml koje su pripremljene u triplikatu. Filtrati su prije mjerenja razrijeđeni 10 puta u 6,24 % etanolu (*m/m*). Koncentracija tj. topljivost određena je na temelju izmjerenih apsorbancija nakon izrade baždarnog dijagrama. Izmjerene apsorbancije i određena topljivost prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3: Izmjerene apsorbancije i koncentracija deksametazona u zasićenim otopinama nakon filtriranja i razrjeđivanja ($10 \times$) otopina deksametazona u 6,24 % etanolu (*m/m*) koncentracije 400 µg/ml (otopina 1) i 600 µg/ml (otopina 2)

	A	C (µg/ml)
otopina 1	0,543	133,09
otopina 2	0,537	131,62

Srednja vrijednost topljivosti deksametazona iznosi 132,36 µg/ml tj. u 25 ml 6,24 % etanola (*m/m*) otapa se 3,3 mg deksametazona.

Baždarni pravac je dobiven mjerenjem apsorbancija pripremljenog koncentracijskog niza otopina deksametazona u 6,24 % etanolu (5, 10, 15, 20, 25 µg/ml). Značajke baždarnog pravca su sljedeće: $y = 0,0408 x - 0,0225$; $r^2 = 0,9999$ (Slika 10).



Slika 10: Linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji deksametazona u 6,24 % etanolnoj otopini (*m/m*)

4.3. Uspješnost uklapanja deksametazona u nanočestice

Sadržaj deksametazona u nanočesticama određen je UPLC metodom nakon filtriranja pripremljenih suspenzija nanočestica čime je odvojen neuklopljeni deksametazon. Izračunata je uspješnost uklapanja i sadržaj uklopljenog lijeka u odnosu na količinu nanočestica i volumen suspenzije.

Uspješnost uklapanja lijeka (UU) je sadržaj lijeka uklopljen u nanočestice izražen u postotku prema ukupnoj količini lijeka u pripravku. Izračunat je sadržaj uklopljenog lijeka tj. postotni udio uklopljenog lijeka u odnosu na ispitivanu količinu nanočestica (DL; Tablica 4), te količina uklopljenog lijeka sadržana u jediničnom volumenu suspenzije nanočestica (koncentracija deksametazona u suspenziji nanočestica, C; Tablica 4).

Tablica 4: Uspješnost uklapanja i sadržaj deksametazona u lipidno-alginatnim nanočesticama koje imaju različit udio DDAB.

	UU (%)	DL (%)	C (µg/ml)
DLAN1	54,6 ± 0,8	8,3 ± 0,1	218 ± 3
DLAN2	51,8 ± 0,1	7,8 ± 0,01	207 ± 1
DLAN3	50,9 ± 1,7	7,5 ± 0,2	204 ± 7
DLAN4	63,8 ± 1,6	8,9 ± 0,2	255 ± 7

UU (%) - uspješnost uklapanja: masa uklopljenog lijeka / teorijska masa lijeka × 100

DL (%) - masa uklopljenog lijeka / masa nanočestica × 100

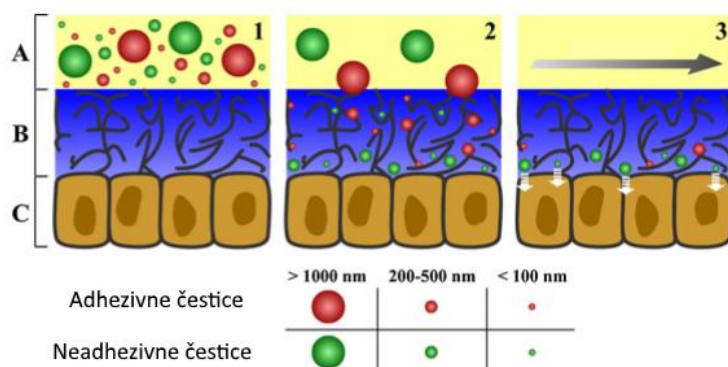
CM (µg/ml) - masa uklopljenog lijeka / volumen suspenzije nanočestica

Uklapanje deksametazona je uspješno. U svim pripremljenim nanočesticama sastavljenim od lipida i alginata uklopljeno je više od 50 % deksametazona. Najveća uspješnost uklapanja od 63,8 % postignuta je kod nanočestica DLAN4 koje imaju najveću koncentraciju DDAB, dok sadržaj deksametazona u toj suspenziji nanočestica iznosi 255 ± 7 µg/ml.

4.4. Veličina i zeta potencijal nanočestica

Veličina i zeta-potencijal lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom izmjereni su nakon filtriranja pripremljenih suspenzija. Filtrati su razrijeđeni 5 puta pročišćenom vodom prije mjerenja veličine čestica, a prije mjerenja zeta-potencijala razrjeđivanje je provedeno 10 mM otopinom natrijeva klorida. Veličina i zeta-potencijal izmjereni su i za nanočestice bez deksametazona (LAN) te nanočestice bez deksametazona i alginata (LN).

Veličina i zeta potencijal utječu na interakcije nanočestica sa sluzi i epitelnim stanicama sluznice. Čestice mikrometarskih veličina ostaju na površini sluzi jer su prevelike za ulazak u slobodne prostore između lanaca mucina prisutnih u sluzi. Nanočestice veličine 200-500 nm mogu penetrirati kroz sluz, ali to ne vrijedi za sve tipove sluzi ljudskog tijela jer sastav nekih sluzi onemogućava prolaz čestica veličine 500 nm. Adhezivne čestice tog raspona veličina zbog interakcija sa sluzi difundiraju sporije. Neadhezivne čestice brzo difundiraju i dolaze do epitelnih stanica. Čestice manje od 100 nm u manjoj mjeri difundiraju do epitelnih stanica, vjerojatno zbog zaostajanja u mreži mucina. Interakcije mukoadhezivnih i neadhezivnih nanočestica sa sluzi prikazane su na Slici 11 (Sosnik i sur., 2014).



Slika 11: Prikaz interakcija mukoadhezivnih i neadhezivnih nanočestica različitih veličina sa sluzi (preuzeto i prilagođeno prema Sosnik i sur., 2014)

S obzirom da se mukocilijarnim čišćenjem sa sluznice nosa brzo uklanja primijenjeni lijek, cilj je uklopiti lijek u nanočestice koje će se dulje zadržavati. To je moguće postići ako su čestice veličine 200-500 nm jer difundiraju u sluz. Alginat na površini nanočestica može pridonijeti duljem zadržavanju jer ima mukoadhezivna svojstva.

Tablica 5: Srednji promjer, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom (DLAN) te odgovarajućih praznih lipidno-alginatnih (LAN) i lipidnih (LN) nanočestica. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija ($n = 3$).

	Srednji promjer (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)
LN1	46,1 \pm 0,3	0,46 \pm 0,01	11,4 \pm 2,4
LAN1	129,7 \pm 1,2	0,531 \pm 0,01	-16,0 \pm 0,4
DLAN1	109,1 \pm 3,1	0,54 \pm 0,17	-14,2 \pm 0,3
LN2	37,4 \pm 0,4	0,517 \pm 0,01	8,1 \pm 1,6
LAN2	134,9 \pm 4,4	0,610 \pm 0,02	-19,5 \pm 0,3
DLAN2	129,1 \pm 2,5	0,514 \pm 0,01	-21,9 \pm 0,5
LN3	47,1 \pm 9,8	0,477 \pm 0,08	31,9 \pm 1,9
LAN3	278,9 \pm 1,4	0,519 \pm 0,02	-24,9 \pm 0,6
DLAN3	258,6 \pm 4,2	0,343 \pm 0,07	-26,5 \pm 0,3
LN4	237,5 \pm 169,1	0,990 \pm 0,02	55,0 \pm 4,4
LAN4	276,6 \pm 2,4	0,374 \pm 0,03	-30,6 \pm 1,0
DLAN4	252,3 \pm 2,4	0,241 \pm 0,01	-31,7 \pm 1,0

U Tablici 5 prikazana su svojstva nanočestica LN, LAN i DLAN. Srednji promjer pripremljenih lipidno-alginatnih nanočestica LAN (bez deksametazona) veći je od srednjeg promjera lipidnih nanočestica LN sastavljenih od lecitina i kationskog lipida DDAB. Dakle, u prisustvu alginata nastale su veće nanočestice što ukazuje na ionsku interakciju alginata s lipidima. Nanočestice s deksametazonom imaju manji srednji promjer od nanočestica bez deksametazona, iz čega proizlazi mogući utjecaj deksametazona na strukturiranje nanočestica.

Raspodjela veličina pripremljenih nanočestica prikazana je indeksom polidisperznosti (PDI) koji se može kretati od 0 za monodisperzni sustav do 1 za potpuno heterodisperzni sustav. Sve pripremljene nanočestice bile su karakterizirane relativno širokom raspodjelom veličina čestica.

Površinski naboj je važno svojstvo nanočestica o kojem ovisi stabilnost suspenzije nanočestica, biokompatibilnost i interakcije sa sluzi/sluznicom na mjestu primjene. Zbog niske izoelektrične točke, mucin je negativno nabijen pri fiziološkoj pH vrijednosti nazalne sluznice, a njegov naboj utječe na jačinu interakcije sa pozitivnim i negativnim nanočesticama (Sosnik i

sur., 2014). Negativno nabijene i nenabijene čestice mogu putovati kroz sluz, dok pozitivno nabijene čestice stvaraju ionske interakcije s tvarima u sluzi što onemogućuje prodiranje kroz sloj sluzi (Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016).

Lipidne nanočestice (LN) imaju pozitivan zeta potencijal koji potječe od pozitivno nabijenog kationskog lipida DDAB. Dodatkom alginata dolazi do ionskih interakcija karboksilnih skupina alginata s kationskim lipidom koje rezultiraju nastajanjem lipidno-alginatnih nanočestica (LAN) s ukupnim negativnim zeta-potencijalom. Uklapanje deksametazona nije značajnije utjecalo na zeta-potencijal nanočestica.

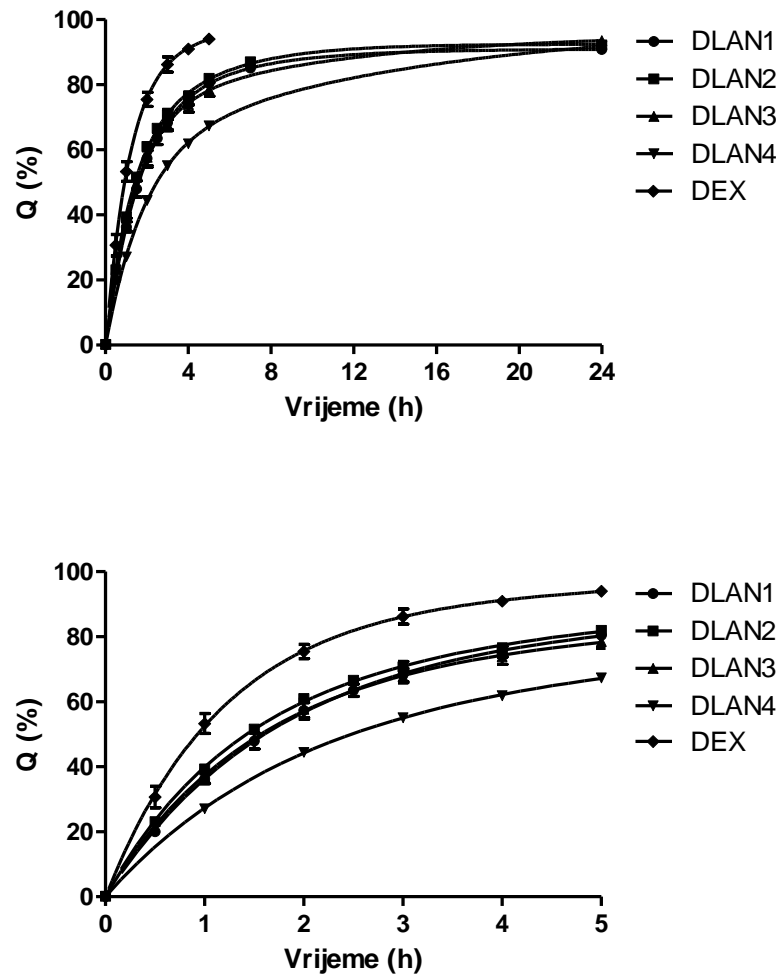
U Tablici 5 prikazana su svojstva nanočestica koje su pripravljene s različitom količinom kationskog lipida DDAB. Količina kationskog lipida utječe na veličinu i zeta-potencijal nanočestica. S povećanjem količine DDAB raste i pozitivni zeta-potencijal pripremljenih LN nanočestica. U sustavima pripremljenim s alginatom, s povećanjem količine DDAB, povećava se veličina i negativni zeta-potencijal pripremljenih lipidno-alginatnih nanočestica što je posljedica intenzivnije interakcije između alginata i lipida. Vrijednost zeta-potencijala od -31,7 mV u slučaju nanočestica DLAN4 osigurava fizičku stabilnost suspenzije nanočestica. Usto, među ispitivanim nanočesticama, DLAN4 nanočestice su najboljih svojstava jer, osim dovoljno velikog zeta potencijala, imaju odgovarajući srednji promjer (252,3 nm), najmanji indeks polidisperznosti (0,241) i najuspješnije uklapanje deksametazona (63,8 %).

4.5. *In vitro* oslobađanje deksametazona iz nanočestica

Profil oslobađanja deksametazona iz lipidno-alginatnih nanočestica određen je provođenjem dijalize tijekom koje je kao receptorski medij korištena 0,03 % vodena otopina natrij lauril sulfata pri čemu su osigurani uvjeti topljivosti za deksametazon. Metoda dijalize smatra se najprikladnijom metodom za određivanje profila oslobađanja lijeka iz koloidnih terapijskih sustava (Modi i Anderson, 2013). Međutim, treba imati na umu da dobiveni rezultati ne mogu poslužiti u predviđanju profila oslobađanja lijeka *in vivo* jer uvjeti pri određivanju profila oslobađanja metodom dijalize ne odgovaraju uvjetima pri stvarnoj primjeni sustava. Ipak, metoda je prikladna za uspoređivanje oslobađanja lijeka iz različitih formulacija. U ovom radu metoda dijalize korištena je kako bi se utvrdio utjecaj koncentracije kationskog lipida DDAB na kinetiku oslobađanja deksametazona iz nanočestica.

Sve nanočestice osiguravale su produljeno oslobađanje deksametazona i značajno manju brzinu oslobađanja u odnosu na otopinu deksametazona (Slika 12). Brzina oslobađanja

deksametazona najsporija je iz nanočestica koje imaju najveći sadržaj kationskog lipida DDAB (5 mg), a $t_{1/2}$ za ovu suspenziju bio je oko 3 sata.



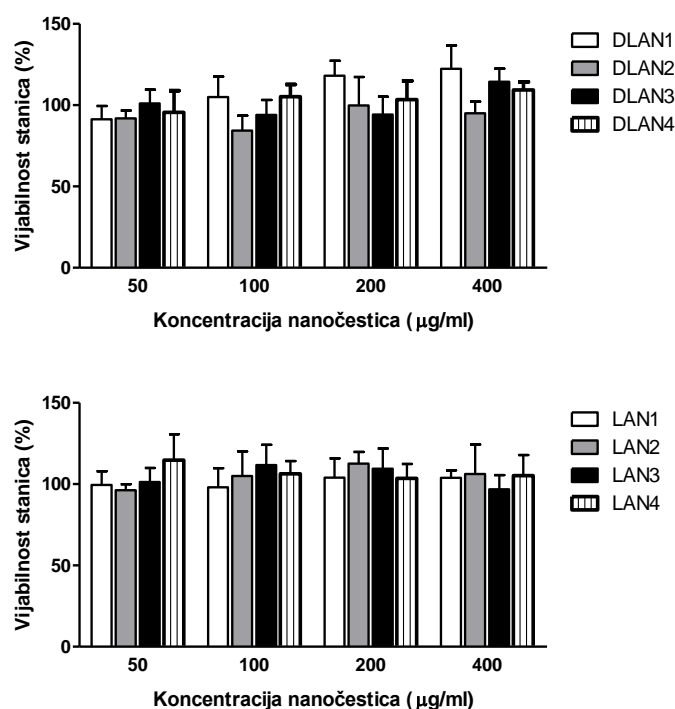
Slika 12: Profil oslobađanja deksametazona iz lipidno-alginatnih nanočestica s različitim sadržajem DDAB. Kao receptorski medij korištena je vodena otopina natrij-lauril sulfata 0,03 % (w/). Prikazan je i profil difuzije deksametazona kroz dijalizacijsku membranu iz otopine deksametazona pripravljene u 0,03 % otopini natrij-lauril sulfata. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija ($n = 3$).

4.6. Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica *in vitro*

Razmatranje biokompatibilnosti i toksičnosti terapijskog sustava već u ranoj razvojnoj fazi od posebne je važnosti, osobito ako je terapijski sustav namijenjen kroničnoj primjeni.

Ispitivanje citotoksičnosti lipidno-alginatnih nanočestica provedeno je *in vitro* praćenjem metaboličke aktivnosti Caco-2 stanica nakon izlaganja suspenziji nanočestica u trajanju od 2 sata. Metabolička aktivnost stanica mjerena je MTT testom.

Pri ispitivanju citotoksičnosti nanočestica, Caco-2 stanice izložene su suspenzijama nanočestica u različitim koncentracijama (50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) pripremljenim razrjeđivanjem HBSS-om. Tretiranje stanica suspenzijama nanočestica tijekom 2 sata nije utjecalo na vijabilnost stanica što ukazuje na netoksičnost pripremljenih nanočestica (Slika 13). Rezultati ne ukazuju na različitu promjenu vijabilnosti kod različitih koncentracija nanočestica.



Slika 13: Utjecaj lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom (DLAN) i praznih lipidno-alginatnih nanočestica (LAN) na vijabilnost Caco-2 stanica provođenjem MTT testa.

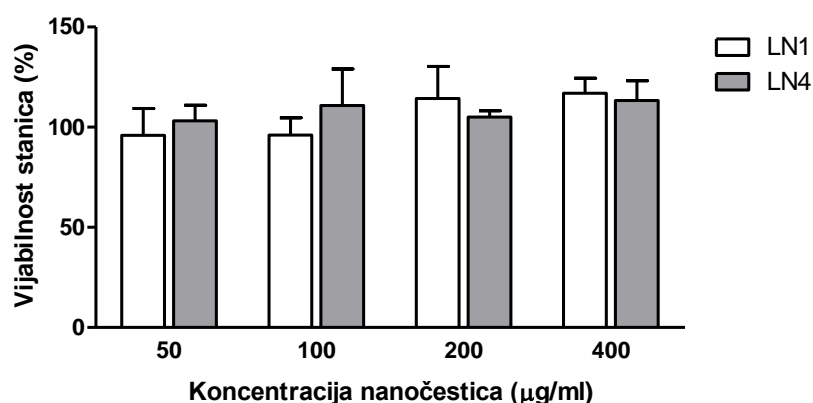
Suspenzije nanočestica razrijeđene su HBSS-om

(pH 7,4) do koncentracija nanočestica od 50, 100, 200 i 400 $\mu\text{g/ml}$.

Stanice tretirane samo HBSS-om služile su kao kontrola. Stanice su tretirane 2 sata.

Vijabilnost stanica izražena je u odnosu na netretirane stanice inkubirane u HBSS-u (pH 7,4).

Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (n=3).



Slika 14: Utjecaj lipidnih nanočestica (LN) na vijabilnost Caco-2 stanica provođenjem MTT testa. Suspenzije nanočestica razrijeđene su HBSS-om

(pH 7,4) do koncentracija nanočestica od 50, 100, 200 i 400 µg/ml.

Stanice tretirane samo HBSS-om služile su kao kontrola. Stanice su tretirane 2 sata.

Vijabilnost stanica izražena je u odnosu na netretirane stanice inkubirane u HBSS-u (pH 7,4).

Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3).

Tretiranje Caco-2 stanica suspenzijama lipidnih nanočestica tijekom 2 sata nije utjecalo na vijabilnost stanica (Slika 14).

5. ZAKLJUČCI

- Lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom uspješno su pripravljene ionskom interakcijom alginata i smjese lecitina i kationskog lipida DDAB.
- Veličina lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom kretala se od 109,1 do 258,6 nm, a površinski naboj od -14,2 do -31,7 mV.
- Povećanje količine dimetil-dioktadecil-amonij bromida u nanočesticama rezultiralo je povećanjem veličine i zeta-potencijala nanočestica.
- Uspješnost uklapanja deksametazona u lipidno-alginatne nanočestice bila je u rasponu od 50,93 - 63,8 %.
- Nanočestice s najvećim udjelom DDAB (lecitin:DDAB 10:1) karakterizirane su najvećim uklapanjem deksametazona (uspješnost uklapanja iznosila je 63,8 %, a sadržaj deksametazona u suspenziji nanočestica 255 ± 7 $\mu\text{g/ml}$), najnegativnijim zeta potencijalom (-31,7 mV), odgovarajućim srednjim promjerom (252,3 nm) te najmanjim indeksom polidisperznosti (0,241).
- Lipidno-alginatne nanočestice omogućuju produljeno oslobađanje deksametazona, a brzina oslobađanja je najmanja kod nanočestica s najvećim sadržajem dimetil-dioktadecil-amonij bromida.
- Vijabilnost Caco-2 stanica nije se značajnije promijenila nakon izlaganja suspenzijama nanočestica u ispitivanom rasponu koncentracija i trajanju.

6. LITERATURA

Ahmad Z, Sharma S, Khuller GK. Chemotherapeutic evaluation of alginate nanoparticle-encapsulated azole antifungal and antitubercular drugs against murine tuberculosis. *Nanomed. Nanotechnol Biol Med*, 2007, 3, 239-243.

Anand U, Feridooni T, Agu RU. Novel mucoadhesive polymers for nasal drug delivery. U: *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. Sezer AD, urednik, InTech, 2012, str. 315-330.

Bencarić L. Registar lijekova u Hrvatskoj. Zagreb, Hrvatska udruga poslodavaca u zdravstvu, 2016, str. 441.

Bhatta RS, Chandasana H, Chhonker YS, Rathi C, Kumar D, Mitra K, Shukla PK. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: In vitro and pharmacokinetics studies. *Int J Pharm*, 2012, 432, 105-112.

Blaiss MS. Safety considerations of intranasal corticosteroids for the treatment of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc*, 2007, 28, 145–152.

Cao S, Ren X, Zhang Q, Chen E, Xu F, Chen J, Liu LC, Jiang X. In situ gel based on gellan gum as new carrier for nasal administration of mometasone furoate. *Int J Pharm*, 2009, 365, 109-115.

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

Chong LY, Head K, Hopkins C, Philpott C, Burton MJ, Schilder AGM. Different types of intranasal steroids for chronic rhinosinusitis (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016, 1-82.

Costa JR, Silva NC, Sarmiento B, Pintado M. Potential chitosan coated alginate nanoparticles for ocular delivery of daptomycin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015, 34, 1255-1262.

Fokkens W, Lund V, Mullol J. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. *Rhinology* 45. 2007, 1–136.

Francetić I i suradnici. Farmakoterapijski priručnik. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 716, 777.

Goh CH, Heng PWS, Chan LW. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr Polym*, 2012, 88, 1-12.

Gupta PK, Jaiswal AK, Asthana S, Verma A, Kumar V, Shukla P, Dwivedi P, Dube A, Mishra PR. Self assembled ionically sodium alginate cross-linked amphotericin B encapsulated glycol chitosan stearate nanoparticles: applicability in better chemotherapy and non-toxic delivery in visceral leishmaniasis. *Pharm Res*, 2015, 32, 1727-1740.

Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85, 427–443.

Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grčić J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm*, 2009, 381, 205-213.

Hafner A, Škrinjar D, Filipović-Grčić J. Mogućnosti nazalne primjene lijekova. *Farm. glas.*, 2014, 5, 303-318.

Haque S, Md S, Sahni JK, Ali J, Baboota S. Development and evaluation of brain targeted intranasal alginate nanoparticles for treatment of depression. *J Psychiat Res*, 2013, 48, 1-12.

Herrero-Vanrell R, Vicario de la Torre M, Andrés-Guerrero V, Barbosa-Alfaro D, Molina Martínez IT, Bravo-Osuna I. Nano and microtechnologies for ophthalmic administration, an overview. *J Drug Del Sci Tech*, 2013, 75-102.

Hudson D, Margaritis A. Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals. *Crit Rev Biotechnol*, 2012, 34, 161-179.

Jain D, Bar-Shalom D. Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40, 1576-1584.

Jalšovec D. Anatomija- osnove građe tijela čovjeka za studente. Zagreb, ZT Zagraf, 2013, str. 113-114.

Ju C, Sung F, Chen J, Liu S, Liu N, Wang K, Liu C. Nanoparticles based on hydrophobic alginate derivative as nutraceutical delivery vehicle: Vitamin D 3 loading. *Artif Cell Blood Sub*, 2012, 40, 113–119.

Kapoor M, Cloyd JC, Siegel RA. A Review of intranasal formulations for the treatment of seizure emergencies. *J Control Release*. 2016, 237, 147–159.

Karavasili C, Fatouros DG. Smart materials : in situ gel-forming systems for nasal delivery. *Drug Discov Today*, 2016, 21, 157-166.

Kosugi EM, Moussalem GF, Simoes JC, de Souza RPSF, Chen VG, Saraceni-Neto P. Topical therapy with high-volume budesonide nasal irrigations in difficult-to-treat chronic rhinosinusitis. *Braz J of Otorhinolaryngol*, 2016, 82, 191–197.

Kumar A, Pandey AN, Jain SK. Nasal-nanotechnology: revolution for efficient therapeutics delivery. *Drug Deliv*, 2016, 23, 681-693.

Kumar K, Dhawan N, Sharma H, Vaidya S, Vaidya B. Bioadhesive polymers: Novel tool for drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2014, 42, 274-283.

Lecithin, <http://www.lipoid.com>, pristupljeno 15.12.2016.

Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*, 2012, 37, 106–126.

Mali KK, Dhawale SC, Dias RJ, Havaldar VD, Ghorpade VS, Salunkhe NH. Nasal mucoadhesive in-situ gel of granisetron hydrochloride using natural polymers. *J App Pharm Sci*, 2015, 5, 84-93.

Meltzer EO. Formulation considerations of intranasal corticosteroids for the treatment of allergic rhinitis. *Ann Allerg Asthma Immunol*, 2007, 98, 12–21.

Meltzer EO. The role of nasal corticosteroids in the treatment of rhinitis. *Immunol Allergy Clin*, 2011, 31, 545–560.

Modi S, Anderson BD. Determination of drug release kinetics from nanoparticles: overcoming pitfalls of the dynamic dialysis method. *Mol Pharm*, 2013, 10, 3076–3089.

Motwani SK , Chopra S , Talegaonkar S , Kohli K , Ahmad FJ , Khar RK. Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation, optimisation and in vitro characterisation. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68, 513 – 525 .

Mullol J, Obando A, Pujols L, Alobid I. Corticosteroid treatment in chronic rhinosinusitis: The possibilities and the limits. *Immunol Allergy Clin*, 2009, 657-668.

Najafabadi AH, Azodi-Deilami S, Abdouss M, Payravand H, Farzaneh S. Synthesis and evaluation of hydroponically alginate nanoparticles as novel carrier for intravenous delivery of propofol. *J Mater Sci Mater Med*, 2015, 26, 145.

Nasal airway anatomy, <http://dfwsinus.com>, pristupljeno 19.12.2016.

Netsomboon K, Bernkop-Schnürch A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 98, 76–89.

Nos- više od funkcije disanja, <http://www.vasezdravlje.com>, pristupljeno 19.12.2016.

Ocampo CJ, Grammer LC. Grand rounds review: Chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immun*, 2013, 1, 205–211.

Product information, Dimethyldioctadecylammonium bromide, <http://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno 15.12.2016.

Rehm BHA. Alginates: Biology and Applications. Berlin, Springer-Verlag, 2009, str. 5.

Rudmik L, Soler ZM. Medical therapies for adult chronic sinusitis A Systematic Review. *JAMA*, 2015; 314, 926-939.

Salib RJ, Howarth PH. Safety and tolerability profiles of intranasal antihistamines and intranasal corticosteroids in the treatment of allergic rhinitis. *Drug Saf*, 2003, 26, 863-893.

Sarmiento B, Ribeiro AJ, Veiga F, Ferreira DC, Neufeld RJ. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *J Nanosci Nanotechnol*, 2007, 7, 2833–2841.

Sažetak opisa svojstava lijeka- Deksametazon Sandoz 4 mg/ml otopina za injekciju, www.halmed.hr, pristupljeno 20.12.2016.

Sažetak opisa svojstava lijeka- Nasonex 50 mikrograma sprej za nos, suspenzija, www.halmed.hr, pristupljeno 20.12.2016.

Severino P, Haud MV, Shimojo A, Antonini D, Lancelloti M, Santanaa MHA, Souto E. Sodium alginate-cross-linked polymyxin B sulphate-loaded solid lipid nanoparticles: Antibiotic resistance tests and HaCat and NIH/3T3 cell viability studies. *Colloid Surface B*, 2015, 129, 191-197.

Sinus problems, <http://www.entslc.com>, pristupljeno 19.12.2016.

Sosnik A, Neves J, Sarmiento B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. *Prog Polym Sci*, 2014, 39, 2030-2075.

Szeffler SJ. Pharmacokinetics of intranasal corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108, 26-31.

Waddell AN, Patel SK, Toma AG, Maw AR. Intranasal steroid sprays in the treatment of rhinitis: is one better than another? *J Laryngol Otol*, 2003, 117, 843–845.

Wang J, Wang M, Zheng M, Guo Q, Wang Y, Wang H, Xie X, Huang F, Gong R. Folate mediated self-assembled phytosterol-alginate nanoparticles for targeted intracellular anticancer drug delivery. *Colloid Surfac B*, 2015, 129, 63–70.

Zdrava nosna sluznica i znakovi suhe nosne sluznice, <http://www.gelo-line.eu>, pristupljeno 19.12.2016.

Zhang RX, Ahmed T, Li LY, Li J, Abbasi AZ, Wu XY. Design of nanocarriers for nanoscale drug delivery to enhance cancer treatment using hybrid polymer and lipid building blocks *Nanoscale*, 2016, 1-42.

7. SAŽETAK

Nazalna primjena lijekova prvi je izbor u liječenju akutnih i kroničnih bolesti sluznice nosa poput rinitisa i rinosinusitisa bez ili sa polipima. Učinkovitost nazalno primijenjenog lijeka ovisi o fiziologiji nosne sluznice te fizičko-kemijskim svojstvima lijeka i ljekovitog pripravka. Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj inovativnih nanosustava koji osiguravaju dulje vrijeme zadržavanja lijeka na nosnoj sluznici i poboljšavaju farmakokinetički profil čime se poboljšava učinkovitost i sigurnost njihove nazalne primjene.

Cilj ovog rada bio je pripremiti lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom, odrediti im fizičko-kemijska svojstva te ispitati biokompatibilnost *in vitro*. Pri ispitivanju biokompatibilnosti, kao modelne epitelne stanice korištene su epitelne stanice karcinoma debelog crijeva (Caco-2 stanice).

Lipidno-alginatne nanočestice uspješno su pripravljene ionskom interakcijom anionskog polimera alginata i pozitivno nabijene smjese lipida (lecitina i kationskog lipida dimetil-dioktadecil-amonij bromida (DDAB)). Pripravljene su nanočestice s različitim udjelom DDAB. Veličina lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom kretala se od 109,1 do 258,6 nm, a površinski naboj od -14,2 do -31,7 mV. Za sve pripravljene nanočestice, uspješnost uklapanja deksametazona bila je veća od 50 %. Uklapanje deksametazona nije značajnije utjecalo na veličinu niti na površinski naboj nanočestica. Sve nanočestice karakterizirane su produljenim oslobađanjem deksametazona. Među razvijenim nanočesticama, najbolja fizičko-kemijska svojstva imale su nanočestice s najvećim udjelom DDAB (lecitin:DDAB 10:1) karakterizirane su najvećim uklapanjem deksametazona (uspješnost uklapanja iznosila je 63,8 %, a sadržaj deksametazona u suspenziji nanočestica 255 ± 7 $\mu\text{g/ml}$), najnegativnijim zeta potencijalom (-31,7 mV), odgovarajućim srednjim promjerom (252,3 nm) te najmanjim indeksom polidisperznosti (0,241).

Biokompatibilnost nanočestica s deksametazonom ispitana je praćenjem metaboličke aktivnosti Caco-2 stanica nakon dvosatnog izlaganja suspenzijama nanočestica različitih koncentracija (50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$). Vijabilnost Caco-2 stanica nije se značajnije promijenila nakon izlaganja suspenzijama nanočestica u ispitivanom rasponu koncentracija i trajanju, čime je pokazan potencijal lipidno-alginatnih nanočestica za sigurnu nazalnu primjenu deksametazona.

7. SUMMARY

Nasal administration of drugs is the first choice in the treatment of acute and chronic nasal mucosa disorders such as rhinitis and rhinosinusitis with or without polyps. The efficacy of nasally administered drugs is dependent on the physiology of the nasal mucosa and the physiochemical properties of the drug and formulation. Current research is focused on the development of innovative drug delivery nanosystems which ensure prolonged residence time at the nasal mucosa and improve the pharmacokinetic profile, thereby improving efficiency and safety of nasal drug administration.

The aim of this work was to prepare dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles, determine their physiochemical properties and biocompatibility *in vitro*. In biocompatibility studies, Caco-2 cell line, originally derived from a colon carcinoma, were used as the model epithelial cells.

Lipid/alginate nanoparticles were successfully prepared by ionic interaction between anionic polymer alginate and positively charged lipid mixture (lecithin and cationic lipid dimethyl-dioctadecyl-ammonium bromide (DDAB)). Nanoparticles with different amounts of DDAB were prepared. The size of dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles was in range from 109.1 to 258.6 nm, and the surface charge was from -14.2 to -31.7 mV. For all prepared nanoparticles, dexamethasone entrapment efficiency was higher than 50%. Entrapment of dexamethasone did not significantly affect the size or the surface charge of nanoparticles. All nanoparticles were characterized by prolonged dexamethasone release. Among the developed nanoparticles, nanoparticles with the highest amount of DDAB (lecithin: DDAB 10:1) had the best physiochemical properties: they were characterized by the highest entrapment of dexamethasone (entrapment efficacy was 63.8 %, and the content of dexamethasone in the suspension of nanoparticles $255 \pm 7 \mu\text{g/ml}$), the most negative zeta potential (-31.7 mV), the appropriate size (252.3 nm) and the lowest polydispersity index (0.241).

The biocompatibility of nanoparticles was determined by monitoring the metabolic activity of Caco-2 cells after a two-hour exposure to different concentrations of nanoparticle suspensions (50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$). The viability of Caco-2 cells was not significantly changed after exposure to suspensions of nanoparticles in the tested concentration range and duration, which demonstrates their potential for safe nasal administration of dexamethasone.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

LIPIDNO-ALGINATNE NANOČESTICE ZA NAZALNU PRIMJENU DEKSAMETAZONA

Ivana Plantić

SAŽETAK

Nazalna primjena lijekova prvi je izbor u liječenju akutnih i kroničnih bolesti sluznice nosa poput rinitisa i rinosinusitisa bez ili sa polipima. Učinkovitost nazalno primijenjenog lijeka ovisi o fiziologiji nosne sluznice te fizičko-kemijskim svojstvima lijeka i ljekovitog pripravka. Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj inovativnih nanosustava koji osiguravaju dulje vrijeme zadržavanja lijeka na nosnoj sluznici i poboljšavaju farmakokinetički profil čime se poboljšava učinkovitost i sigurnost njihove nazalne primjene.

Cilj ovog rada bio je pripremiti lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom, odrediti im fizičko-kemijska svojstva te ispitati biokompatibilnost *in vitro*. Pri ispitivanju biokompatibilnosti, kao modelne epitelne stanice korištene su epitelne stanice karcinoma debelog crijeva (Caco-2 stanice).

Lipidno-alginatne nanočestice uspješno su pripravljene ionskom interakcijom anionskog polimera alginata i pozitivno nabijene smjese lipida (lecitina i kationskog lipida dimetil-dioktadecil-amonij bromida (DDAB)). Pripravljene su nanočestice s različitim udjelom DDAB. Veličina lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom kretala se od 109,1 do 258,6 nm, a površinski naboj od -14,2 do -31,7 mV. Za sve pripravljene nanočestice, uspješnost uklapanja deksametazona bila je veća od 50 %. Uklapanje deksametazona nije značajnije utjecalo na veličinu niti na površinski naboj nanočestica. Sve nanočestice karakterizirane su produljenim oslobađanjem deksametazona. Među razvijenim nanočesticama, najbolja fizičko-kemijska svojstva imale su nanočestice s najvećim udjelom DDAB (lecitin:DDAB 10:1) karakterizirane su najvećim uklapanjem deksametazona (uspješnost uklapanja iznosila je 63,8 %, a sadržaj deksametazona u suspenziji nanočestica $255 \pm 7 \mu\text{g/ml}$), najnegativnijim zeta potencijalom (-31,7 mV), odgovarajućim srednjim promjerom (252,3 nm) te najmanjim indeksom polidisperznosti (0,241).

Biokompatibilnost nanočestica s deksametazonom ispitana je praćenjem metaboličke aktivnosti Caco-2 stanica nakon dvosatnog izlaganja suspenzijama nanočestica različitih koncentracija (50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$). Vijabilnost Caco-2 stanica nije se značajnije promijenila nakon izlaganja suspenzijama nanočestica u ispitivanom rasponu koncentracija i trajanju, čime je pokazan potencijal lipidno-alginatnih nanočestica za sigurnu nazalnu primjenu deksametazona.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 14 grafičkih prikaza, 5 tablica i 55 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Alginat; Lecitin; Deksametazon; Nanočestice; Biokompatibilnost *in vitro*

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Jasmina Lovrić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: siječanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10 000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

LIPID-ALGINATE NANOPARTICLES FOR DEXAMETHASONE NASAL DELIVERY

Ivana Plantić

SUMMARY

Nasal administration of drugs is the first choice in the treatment of acute and chronic nasal mucosa disorders such as rhinitis and rhinosinusitis with or without polyps. The efficacy of nasally administered drugs is dependent on the physiology of the nasal mucosa and the physicochemical properties of the drug and formulation. Current research is focused on the development of innovative drug delivery nanosystems which ensure prolonged residence time at the nasal mucosa and improve the pharmacokinetic profile, thereby improving efficiency and safety of nasal drug administration. The aim of this work was to prepare dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles, determine their physicochemical properties and biocompatibility *in vitro*. In biocompatibility studies, Caco-2 cell line, originally derived from a colon carcinoma, were used as the model epithelial cells.

Lipid/alginate nanoparticles were successfully prepared by ionic interaction between anionic polymer alginate and positively charged lipid mixture (lecithin and cationic lipid dimethyl-dioctadecyl-ammonium bromide (DDAB)). Nanoparticles with different amounts of DDAB were prepared. The size of dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles was in range from 109.1 to 258.6 nm, and the surface charge was from -14.2 to -31.7 mV. For all prepared nanoparticles, dexamethasone entrapment efficiency was higher than 50 %. Entrapment of dexamethasone did not significantly affect the size or the surface charge of nanoparticles. All nanoparticles were characterized by prolonged dexamethasone release. Among the developed nanoparticles, nanoparticles with the highest amount of DDAB (lecithin: DDAB 10:1) had the best physicochemical properties: they were characterized by the highest entrapment of dexamethasone (entrapment efficacy was 63.8 %, and the content of dexamethasone in the suspension of nanoparticles $255 \pm 7 \mu\text{g/ml}$), the most negative zeta potential (-31.7 mV), the appropriate size (252.3 nm) and the lowest polydispersity index (0.241).

The biocompatibility of nanoparticles was determined by monitoring the metabolic activity of Caco-2 cells after a two-hour exposure to different concentrations of nanoparticle suspensions (50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$). The viability of Caco-2 cells was not significantly changed after exposure to suspensions of nanoparticles in the tested concentration range and duration, which demonstrates their potential for safe nasal administration of dexamethasone.

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

Thesis includes: 45 pages, 14 figures, 5 tables and 55 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Alginate; Lecithin; Dexamethasone; Nanoparticles; Biocompatibility *in vitro*

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

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

The thesis was accepted: January 2017.