

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko – biokemijski fakultet

Stefanie Bobičanec i Mia Kobaš

**Mikrosfere s deksametazonom u praškastom inertnom  
nosaču: karakterizacija farmaceutskog oblika i depozicija u  
silikonskom modelu nosne šupljine**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko–biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Anite Hafner i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020. Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-4592.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Anatomija nosne šupljine .....	1
1.2. Fiziologija nosne šupljine .....	4
1.3. Interindividualne razlike u anatomskim i fiziološkim značajkama nosne šupljine .....	7
1.4. Modeli za proučavanje depozicije lijeka u nosnoj šupljini .....	8
1.4.1. Komercijalno dostupni modeli.....	8
1.4.2. 3D-printani modeli .....	11
1.4.3. Računalne simulacije dinamike fluida (CFD simulacije) .....	13
1.5. Formulacijski parametri i parametri primjene koji utječu na depoziciju lijeka u nosnoj šupljini .....	14
1.5.1. Značajke farmaceutskog oblika .....	14
1.5.2. Kut primjene .....	16
1.5.2.1. Kut primjene – pregled dosadašnjih istraživanja.....	17
1.5.3. Protok zraka kroz nosnu šupljinu .....	18
1.5.3.1. Prednosti i nedostaci različitih oblika simulacije disanja u modelu nosne šupljine .....	20
1.5.4. Uređaji za dostavu nazalnih pripravaka .....	21
1.5.4.1. Nazalna dostava prašaka.....	21
1.6. Nazalna primjena kortikosteroida u liječenju rinitisa, rinosinitisa i nazalnih polipa...23	
1.6.1. Nazalni pripravci kortikosteroida odobreni u Republici Hrvatskoj .....	24
1.7. Deksametazon .....	27
2. Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada.....	28
3. Eksperimentalni dio .....	31
3.1. Materijali .....	31
3.2. Metode .....	31
3.2.1. Priprava mikrosfera s deksametazonom.....	31
3.2.2. Određivanje raspodjele veličina mikrosfera s deksametazonom .....	32
3.2.3. Određivanje uspješnosti uklapanja i sadržaja lijeka u mikrosferama .....	33
3.2.4. Priprema praškastih sustava mikrosfera i inertnog nosača .....	33
3.2.5. Ispitivanje homogenosti praškastih sustava .....	35
3.2.6. Ispitivanje bubrenja praškastih sustava .....	35
3.2.7. Određivanje svojstava tečenja praškastih sustava .....	36
3.2.8. Određivanje kuta raspršenja praškastih sustava.....	37
3.2.9. Određivanje profila depozicije praškastih sustava u modelu nosne šupljine.....	37
3.2.10. Određivanje isporučene mase praškastih sustava .....	39

3.2.11. Statistička analiza rezultata .....	39
4. Rezultati .....	40
4.1. Priprava i karakterizacija mikrosfera s deksametazonom .....	40
4.2. Homogenost praškastih sustava mikrosfera i inertnog nosača .....	40
4.3. Svojstva bubrenja praškastih sustava .....	41
4.4. Svojstva tečenja praškastih sustava.....	42
4.5. Kut raspršenja praškastih sustava.....	43
4.6. Profil depozicije praškastih sustava u modelu nosne šupljine.....	45
4.7. Isporučena masa praškastih sustava .....	49
5. Rasprava.....	52
5.1. Svojstva mikrosfera s deksametazonom .....	52
5.2. Sastav i homogenost praškastih sustava mikrosfera i inertnog nosača .....	53
5.3. Bubrenje praškastih sustava .....	55
5.4. Reologija praškastih sustava.....	57
5.5. Kut raspršenja praškastih sustava.....	57
5.6. Depozicija praškastih sustava u modelu nosne šupljine .....	59
5.7. Isporučena masa praškastih sustava .....	62
6. Zaključci .....	65
7. Zahvale .....	67
8. Literatura .....	68
9. Sažetak .....	80
10. Summary.....	81
Prilozi	

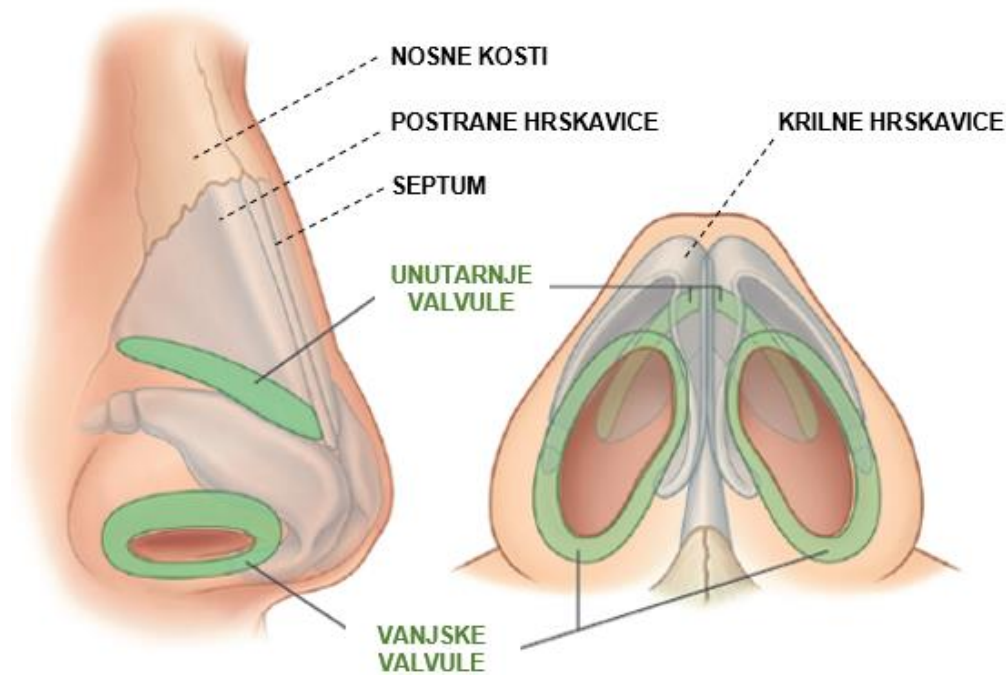
# 1. Uvod

## 1.1. Anatomija nosne šupljine

Nos se anatomski dijeli na vanjski nos, nosnu šupljinu i paranazalne sinuse. Svaki od ova tri dijela ima specifičnu fiziološku ulogu koja proizlazi upravo iz njihove anatomske strukture.

Vanjski nos je piramidalna struktura smještena u samom središtu lica koja se sastoji od kostiju i hrskavice. Gornji dio koji se spaja s čelom naziva se korijen nosa, a slobodni donji dio koji se pruža anteriorno, vrh nosa. Baza nosa sastoji se od dva elipsoidna otvora koji predstavljaju otvore nosnica i lateralno su omeđeni nosnim krilima. Nosnice su međusobno odijeljene prednjim dijelom nosne pregrade, odnosno kolumelom [1], [2]. Koštanu osnovu vanjskog nosa tvore nosne kosti i kosti gornje čeljusti, dok elastični dio tvore nosne hrskavice. U središnjoj ravnini nalazi se gornji dio hrskavice nosne pregrade, a lateralno, s obje strane nosnog hrpta, po jedna postrana nosna hrskavica (Slika 1.) [2]. Kut kojeg zatvaraju postrane nosne hrskavice i septum važan je za protok zraka kroz unutrašnjost nosa, točnije određuje geometriju i površinu unutarnjih nosnih valvula [1]. Valvule se nalaze na mjestu gdje se postrane hrskavice povezuju s krilnim hrskavicama [2], [3] te predstavljaju najuži dio nosa i mjesto generiranja velikog otpora protoku zraka što je iznimno važno za fiziološku funkciju nosa [4].

Nosna šupljina (Slika 2.) prostire se između krova usne šupljine i baze lubanje. Omeđena je koštanom osnovom, a koštano-hrskavični septum dijeli ju po sredini na lijevi i desni dio [2]. Ulazni otvori u nosnu šupljinu su nosnice, a završne otvore prema ždrijelu čine nosni lijevci. Lijeva i desna polovica nosne šupljine dijele se na nosni vestibulum ili predvorje nosa i pravu nosnu šupljinu [1], [2].



**Slika 1.** Anatomija vanjskog nosa (prilagođeno prema [5] uz suglasnost izdavača - u Prilogu)

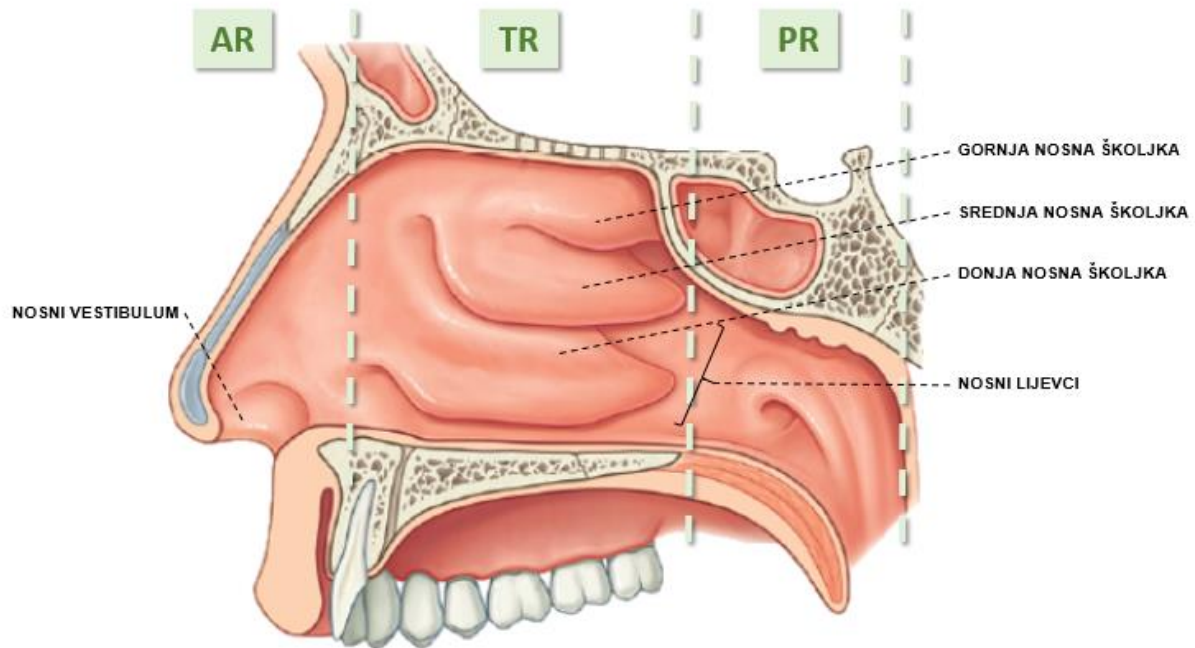
Predvorje nosa (nosni vestibulum) smješteno je na ulazu u nosnu šupljinu. Prekriveno je skvamoznim epitelom i sadrži nosne dlačice koje pri disanju imaju važnu ulogu u zadržavanju većih čestica na samom ulazu u nos. Granicu između vestibuluma i prave nosne šupljine čini *limen nasi* [1], [2]. To je ujedno i mjesto gdje započinje prijelaz prema respiratornom epitelu koji oblaže gotovo cijelu unutrašnjost nosne šupljine [1], [6].

Prava nosna šupljina može se podijeliti na: dno nosne šupljine, nosnu pregradu, lateralnu stijenku, njušno područje i krov nosne šupljine. Nosnu pregradu ili septum tvore okomita ploča rešetnice (lat. *lamina perpendicularis ossis ethmoidales*), raonik (lat. *vomer*) i hrskavica nosne pregrade (lat. *cartilago septi nasi*) [1], [2].

Lateralna stijenka nosne šupljine (Slika 2.) specifične je građe i zaslužna je za glavni otpor protoku zraka kroz unutrašnji nos. Čine ju tri nosne školjke: gornja, srednja i donja te pripadajući nosni hodnici kroz koje struji zrak pri disanju [1], [2].

Sluznica nosa je najdeblja i najviše prokrvljena na području nosnih školjki te prednjem i stražnjem dijelu septuma, dok je jako tanka u području nosnih hodnika što je izrazito važno za obavljanje fiziološke funkcije nosa [1].

U donji nosni hodnik otvara se suzni kanal koji dovodi suze u nosnu šupljinu te zajedno s mukocilijarnim čišćenjem pridonosi bržem uklanjanju udahnutih čestica s površine sluznice. Unutar srednjeg i gornjeg nosnog hodnika nalaze se otvori koji povezuju nosnu šupljinu s paranazalnim sinusima [1], [2].



**Slika 2.** Anatomija nosne šupljine; pogled sa strane (prilagođeno prema [5] uz suglasnost izdavača - u Prilogu)

[AR = anteriorna regija; TR = turbinatna regija; PR = posteriorna regija]

Njušno područje smješteno je u stražnjem dijelu gornje nosne školjke, a ispod krova nosne šupljine. U tom dijelu nalazi se uski njušni žlijeb obložen sluznicom koja sadrži gusto pakirane receptorske stanice (neurone) za njuh. Te iste stanice možemo naći i u drugim dijelovima nosne šupljine, no u tim područjima su mjestimično raspoređene između trepetljivikavih stanica respiratornog epitela [1], [2].

U paranazalne sinuse ubrajamo: sinus gornje čeljusti (lat. *sinus maxillaris*), čeonni sinus (lat. *sinus frontalis*), sinus klinaste kosti (lat. *sinus sphenoidalis*) i tzv. labirint rešetnice (lat. *sinus ethmoidales*). To su zrakom ispunjene šupljine smještene unutar pripadajućih kostiju koje su obložene respiratornim epitelom. S nosnom šupljinom povezane su otvorima u njezinom lateralnom zidu zbog čega je omogućeno mukocilijarno potiskivanje sadržaja sinusa direktno u nosnu šupljinu [1], [2].

Za obavljanje fiziološke funkcije nosa, uz anatomiju dosad spomenutih koštano-hrskavičnih struktura, ključan je i anatomski raspored krvnih žila i živaca u sluznici nosa. Arterije koje opskrbljuju različite dijelove nosne šupljine ogranci su očne i lične te arterije gornje čeljusti. One se dodatno granaju unutar nosne šupljine i međusobno tvore anastomozne spletove unutar mukoze [1], [4]. Sfenopalatina arterija (ogranak arterije gornje čeljusti) opskrbljuje mukozu nosnih školjki, hodnika i posteroinferiorni dio septuma, stoga se može reći da je to krvna žila koja opskrbljuje glavninu mukoze nosne šupljine [1].

U području nosnog vestibuluma, na septumu, nalazi se tzv. Kiesselbachov pleksus. To je anastomozni splet sfenopalatine i prednje etmoidalne arterije s ogrankom arterije gornje usne. U većini slučajeva epistakse (krvarenja iz nosa), izvor krvarenja potječe upravo iz ovog spleta [1], [7]. Submukoza posteriornog dijela septuma te srednje i donje nosne školjke sadrži osobito razvijene venske spletove nalik onima u erektilnom tkivu [1]. Zbog velikog kapaciteta zaprimanja krvi prilikom vazodilatacije, može doći do nabreknuća mukoze čime se značajno mijenja otpor protoku zraka u ovim područjima nosne šupljine [6], [7].

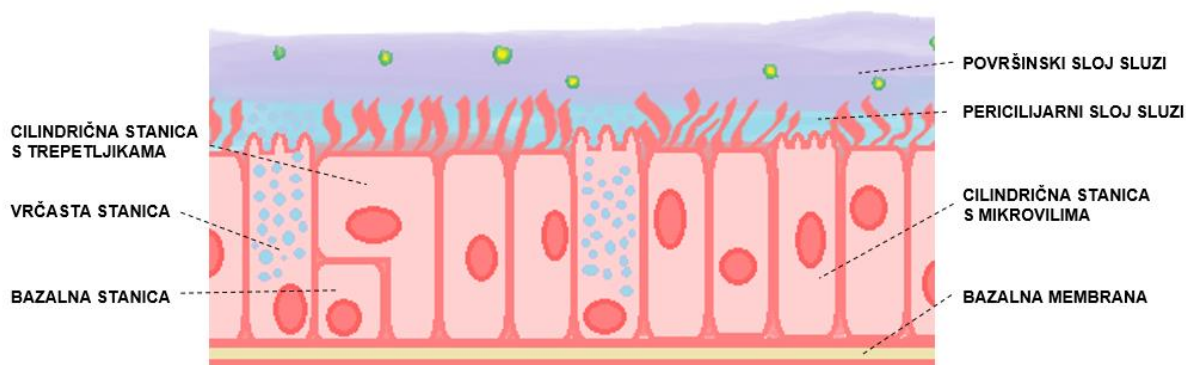
Živci središnjeg živčanog sustava koji inerviraju područje nosne šupljine ogranci su njušnog te trodijelnog (trigeminalnog) živca. Osjet njuha posredovan je uglavnom njušnim, dok osjet temperature, boli i dodira trigeminalnim živčanim ograncima [1]. Autonomna živčana vlakna stjenovitog živca inerviraju mukozne žlijezde i krvne žile nosne šupljine te na taj način kontroliraju sekretomotornu i vazomotornu aktivnost [1], [7].

## 1.2. Fiziologija nosne šupljine

Nos ima nekoliko fizioloških funkcija od kojih su osnovne: osjet njuha, kondicioniranje udahnutog zraka, zadržavanje udahnutih čestica te uklanjanje istih uslijed mukocilijarne aktivnosti epitela nosne šupljine. Usto, u submukozi nazofarinksa nalaze se nakupine limfoidnog tkiva (engl. *nasal-associated lymphoid tissue*; NALT), a na površinu sluznice nosne šupljine luče se i zaštitna protutijela IgA [8]. Zbog toga nos ima važnu ulogu u primarnoj zaštiti organizma od patogena i stranih čestica u udahnutom zraku.

Među glavnim čimbenicima koji diktiraju fiziološku funkciju nosa jest sluznica te njezina izrazito dobra prokrvljenost i inervacija. Velika većina površine nosne šupljine obložena je pseudostratificiranim pokrovnim epitelom koji se sastoji od četiri tipa stanica: cilindričnih stanica s trepetljikama (cilijama), cilindričnih stanica s dugim citoplazmatskim izdancima (mikrovilima), vrčastih stanica te bazalnih stanica. Sve navedene stanice poredane su u jednom sloju i vezane su na bazalnu membranu kao što je prikazano na Slici 3. [6], [9]-[11].





**Slika 3.** Respiratorni epitel sluznice nosa

Na površini stanica respiratornog epitela nalazi se tanki sloj sluzi (mukusa) koju poglavito luče vrčaste epitelne stanice smještene na površini sluznice i unutar submukoznih žlijezda. Sluz se pojačano može lučiti na podražaj parasimpatičkih živčanih vlakana zbog toga što vrčaste stanice na svojoj bazolateralnoj strani imaju eksprimirane muskarinske receptore [6], [9].

Najvažnija komponenta sluzi su mucini. To su glikoproteini četkastog izgleda s visokim udjelom sijalinske kiseline te hidroksilnih i sulfatnih skupina u svojoj građi [12]. Te skupine, osim zbog potencijalnih elektrostatskih interakcija, bitne su i zbog svog kapaciteta vezanja vode uslijed čega sluz sadržava preko 90% vode. Time se sprječava isušivanje i propadanje epitelnih stanica sluznice [7], [9], [13].

Nakon lučenja, sluz stvara tanki sloj niske viskoznosti u tzv. pericilijarnom prostoru, a iznad njega formira se nešto deblji sloj veće viskoznosti čija je površina pogodna za adsorbiranje udahnutih čestica i mikroorganizama [6], [7], [9]. Viskoelastična svojstva sluzi izrazito su bitna za normalno funkcioniranje mukocilijarnog aparata, a proizlaze upravo iz specifične strukture mucina [12].

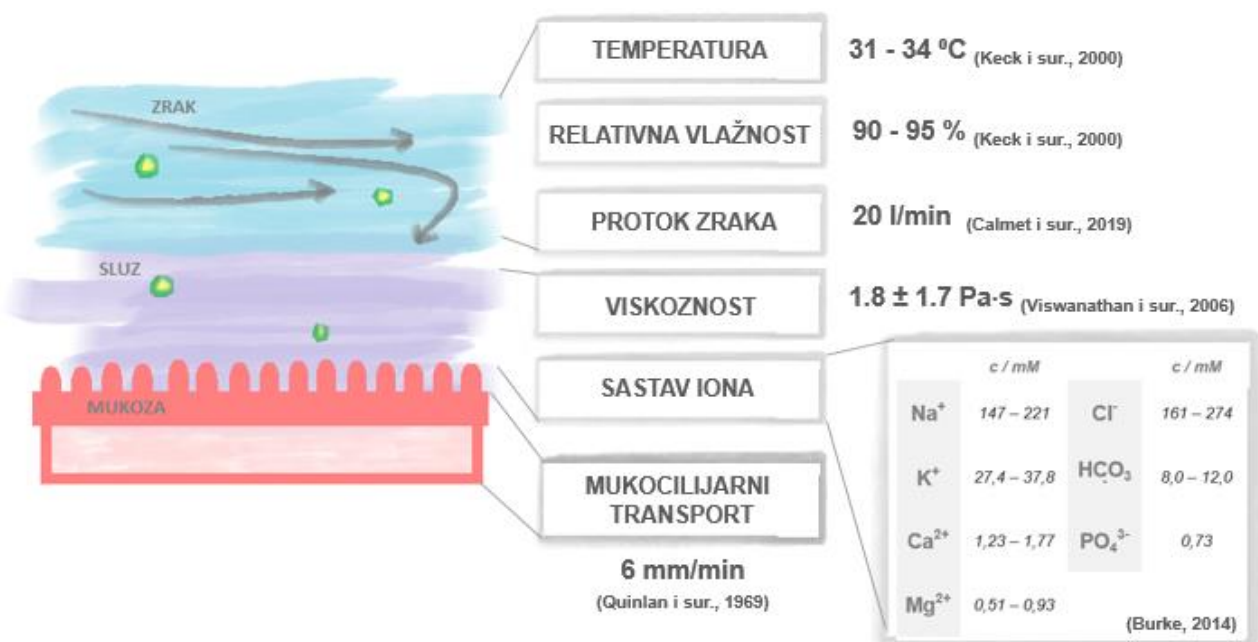
Mucini se međusobno povezuju kovalentnim i nekovalentnim interakcijama čime nastaju oligomerne strukture nalik mreži s izraženim svojstvima bubrenja i adhezije [12]. Budući da je pH sluzi u nosu blago kiseo (između 5,5 i 6,5), negativno nabijene funkcionalne skupine prisutne na mucinima svojim elektrostatskim odbijanjima također pridonose formiranju strukture gela [7], [12].

Površinski sloj sluzi poput tankog prekrivača dodiruje vrhove cilija trepetljikavog epitela koji svojim sinkroniziranim pokretima pokreću taj sloj sluzi u smjeru od anteriornog prema posteriornom dijelu nosne šupljine [7], [9], [10]. Na taj način se čestice i mikroorganizmi adsorbirani na površini sluzi prenose do ždrijela te posljedično završavaju u probavnom traktu

umjesto u donjem dijelu dišnog sustava. Suhoća sluznice, jednako kao i hipersekrecija sluzi mogu narušiti ovu ravnotežu i opstruirati normalno funkcioniranje mukocilijarnog transporta [7], [9].

Kondicioniranje zraka podrazumijeva prilagodbu temperature i ovlaživanje udahnutog zraka, a postiže se primarno zahvaljujući karakterističnoj anatomskoj građi nosa te jako dobroj prokrvljenosti sluznice. Zbog turbulentnog protoka zraka kroz nosnu šupljinu povećan je kontakt između zraka i površine sluznice koja je topla i vlažna [6], [7]. Zahvaljujući tome se zrak sobne temperature može zagrijati za gotovo 10° C te postići relativnu vlažnost do 95% dok dođe do ždrijela [7], [14].

U shematskom prikazu (Slika 4.) sumirane su osnovne fiziološke karakteristike nosne šupljine koje mogu utjecati na profil depozicije nekog lijeka [15]-[19]. Iz tog razloga se pojedini od ovih parametara simuliraju u modelima nosne šupljine prilikom proučavanja depozicije.



**Slika 4.** Prikaz fizioloških parametara u nosnoj šupljini zdrave osobe pri uvjetima umjerenog disanja

### **1.3. Interindividualne razlike u anatomskim i fiziološkim značajkama nosne šupljine**

Prethodno spomenute anatomske i fiziološke značajke nosne šupljine mogu varirati među osobama različite dobi i rase ili uslijed pojedinih patofizioloških stanja te anatomske deformacije. Budući da geometrija nosne šupljine utječe na profil depozicije, ove razlike mogu za posljedicu imati i različitu učinkovitost nazalnih pripravaka [20]. Primjerice, upalne bolesti sluznice nosa popraćene su hipersekrecijom sluzi, promjenom njena sastava u odnosu na zdravu sluz te nabreknućem mukoze [9], [13]. Ove promjene negativno utječu na mukocilijarni klirens te mogu dovesti i do opstrukcije dišnih putova u nosu čime je otežana i dostava lijeka [9], [21]. Slično stanje može se vidjeti i u osoba s nazalnim polipima gdje izrasline, ovisno o njihovoj veličini i broju, također mogu dovesti do opstrukcije [22]. Kod atrofijskog rinitisa pak dolazi do propadanja sluznice nosa, što za posljedicu ima smanjeni otpor protoku zraka te smanjeno zadržavanje čestica u nosnoj šupljini [23]. Unutar vanjskog nosa te u području nosnih valvula pripravak se susreće s preprekama u protoku puno prije nego uopće dosegne ciljnu turbinatnu regiju. Zbog toga interindividualne razlike u geometriji i površini nosnih valvula mogu utjecati na količinu lijeka koja će biti dostavljena do sluznice nosne šupljine [24]. U tom smislu i različite deformacije nosa mogu utjecati na profil depozicije lijeka, kao na primjer kod osoba s devijacijom septuma gdje je dostava lijeka u nosnici koja je opstruirana značajno smanjena, ali se može povećati prilagodbom parametara primjene kao što su udah i/ili položaj glave [25].

Važnost prilagodbe uvjeta primjene zbog razlike u anatomiji nosne šupljine dokazana je i na primjerima iz pedijatrijske populacije [26], [27]. Naime, kod djece su dišni putovi u nosu puno uži i kraći u odnosu na one odraslih, a ove razlike osobito su izražene u području nosnih valvula [28], [29]. Zbog tih razlika dolazi i do razlika u profilu depozicije u odnosu na odrasle [26], [30] te upitne učinkovitosti pojedinih nazalnih pripravaka za tu populaciju [31], [32].

Glavne statistički značajne razlike u anatomiji nosa među pripadnicima različitih etničkih skupina su one u građi vanjskog nosa [33]. Zbog jednostavnosti promatranja ovih razlika koriste se mjere poput eliptičnosti nosnica [34] te nazalnog indeksa [35]. Nazalni indeks predstavlja omjer širine i visine vanjskog nosa, a eliptičnost nosnica omjer visine i širine nosnice. Bennet i Zeman (2005) uočili su da veću eliptičnost nosnica prati i veći otpor protoku zraka [35], a do sličnih zaključaka došli su i Keeler i sur. (2016) u svom radu [34], no zbog prevelike interindividualne varijabilnosti u rezultatima depozicije nisu mogli ta svojstva pripisati razlikama u rasi. Neki autori [26], [32] pak smatraju da su upravo eliptičnost nosnica te nazalni indeks mjere koje bi bolje opisivale razlike u profilu depozicije opažene i među pripadnicima različitih dobnih skupina.

## 1.4. Modeli za proučavanje depozicije lijeka u nosnoj šupljini

Simuliranje uvjeta u nosnoj šupljini veliki je izazov s obzirom na anatomske i fiziološke kompleksnosti iste. Zbog toga ne postoji univerzalni model koji obuhvaća sve uvjete prisutne *in vivo* niti pomoću kojeg se mogu generirati podaci koji se mogu ekstrapolirati na cijelu populaciju. Ipak, modeli nosne šupljine mogu biti korisni pri uspoređivanju izvedbenih značajki različitih uređaja za nazalnu primjenu lijeka [31], [36], [37], različitih formulacija [30], [38], [39] ili načina primjene nazalnih pripravaka [26], [27], [40]. Ispitivanje depozicije primjenom modela nosne šupljine jedini je oblik *in vitro* ispitivanja nazalnih pripravaka koji može objediniti podatke o kvantitativnom i kvalitativnom aspektu dostave lijeka te kojim se može dobiti potvrda o depoziciji u ciljnoj regiji nosne šupljine, što je izrazito važno kod razvoja pripravaka za dostavu lijeka u središnji živčani sustav [41]. Zbog toga postoji tendencija da se ovaj tip ispitivanja na određeni način validira kako bi u budućnosti poslužio u studijama bioekvivalencije ili za utvrđivanje kritičnih parametara kvalitete nazalnog pripravka (engl. *Critical Quality Attributes; CQA*) [40], [42]. Forbes i sur. (2020) smatraju da prvi korak ka tome predstavlja odabir materijala koji bolje odgovaraju značajkama sluznice s naglaskom na mekoći i fleksibilnosti istog te uvođenje stanica i umjetne sluzi u modele kako bi se simulirala površinska svojstva sluznice [43]. U znanstvenim radovima koji se bave depozicijom lijeka u nosnoj šupljini koriste se različiti modeli i različiti načini simulacije uvjeta u nosnoj šupljini stoga su u ovom radu, radi preglednosti, podijeljeni na: komercijalno dostupne modele, 3D-printane modele i računalne simulacije dinamike fluida (engl. *Computational Fluid Dynamics Simulations; CFD*).

### 1.4.1. Komercijalno dostupni modeli

Komercijalno dostupni modeli zastupljeni su u velikom broju radova na temu depozicije te su njihova glavna svojstva i zastupljenost prikazani u Tablici 1. Iz priloženog je razvidno da su za izradu tih modela uglavnom korištene CT (kompjutorizirana tomografija, engl. *computerized tomography*) snimke nosne šupljine odraslog muškarca uz iznimku Bepakovog modela za koji je korištena i snimka nosne šupljine odrasle žene. Zbog komercijalne dostupnosti, ovi modeli prepoznati su od strane znanstvenika koji rade na razvoju nazalnih pripravaka kao vrlo koristan alat jer se uvjeti primjene lako mogu varirati i reproducirati te rezultati dobiveni na istom modelu međusobno uspoređivati budući da je barem anatomske aspekt u svim ispitivanjima konstantan.

Silikonski model proizvođača Koken dobar je primjer toga budući da je korišten u velikom broju istraživanja provedenih od strane različitih znanstvenih timova. Zbog transparentnosti modela i nemogućnosti rastavljanja na regije, pri primjeni ovog modela (kao i kod modela

proizvođača Pfeifer) uglavnom su zastupljene tehnike vizualne detekcije profila depozicije [37], [38], [40], [44], [45]. Iznimku predstavljaju rad Gua i sur. (2005) gdje je korištena scintigrafija [39], rad Nižić i sur. (2019) gdje je vagan Sar-gel u pojedinoj regiji modela nosa [46] te rad Nižić i sur. (2020) gdje je model segmentirano ispiran i analiza sadržaja lijeka u eluatima provedena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti [47]. Za razliku od spomenutog silikonskog modela, modeli proizvođača Bepak i Aftar Pharma nisu pogodni za vizualnu detekciju, ali se mogu rastavljati na pojedine regije nosne šupljine, što olakšava ispiranje i kvantitativnu analizu.

Uz spomenute tipove modela koriste se i raznovrsne tehnike kojima se nastoji simulirati sluz na način da se modeli iznutra premazuju tankim slojem gela ili smjesama tekućina. U pojedinim radovima [38], [40], [45] gelovi kojima se premazuje model primarno imaju funkciju detekcije jer mijenjaju boju u kontaktu s formulacijom, dok je u drugima pak svrha smjesa tekućina isključivo imitiranje adsorptivne funkcije sluznice nosne šupljine [39], [48]-[50]. Castile i sur. (2013) koristili su medicinski lubrikant koji sadrži ione kalcija čime su htjeli simulirati prirodno prisutne ione u sluznici nosa kao i interakciju istih s gelirajućim sustavom na bazi pektina [51]. Osim što predstavlja veliku prednost zbog oponašanja uvjeta *in vivo*, korištenje takvih tehnika pomaže i fiksiranju čestica/kapljica na mjestu kontakta s hidrofobnom površinom modela [30], [39].

**Tablica 1. Svojstva komercijalno dostupnih modela nosne šupljine i njihova zastupljenost u ispitivanjima profila nazalne depozicije**

Proizvođač	Model	Materijal	Anatomska podjela	Rastavljanje na regije	Sredstvo	Ispitivana formulacija	Literatura
<b>Koken Co. Ltd.</b>	odrasli muškarac (Japanac)	silikon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• anteriorna regija</li> <li>• turbinatna regija</li> <li>• posteriorna regija</li> </ul>	-	/	prašak	[44]
					K-Y Jelly lubrikant	otopina	[51]
					/	prašak	[37]
					smjesa deterdženta za suđe i acetona	otopina	[39]
					<i>Sar-Gel</i>	otopina	[40]
					<i>Kolor Kut</i>	otopina	[45]
					/	prašak	[47]
					<i>Sar-Gel</i>	otopina	[46]
<i>Sar-Gel</i>	otopina	[38]					
<b>Aptar Pharma</b>	odrasli muškarac (bijelac)	ND	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vestibulum</li> <li>• nosne valvule</li> <li>• turbinatna regija</li> <li>• njušna regija</li> <li>• nazofarinks</li> </ul>	+	/	prašak	[52]
<b>Boehringer Ingelheim</b>	odrasli muškarac	ND	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nosnice</li> <li>• vestibulum</li> <li>• turbinatna regija (3)*</li> <li>• nazofarinks</li> </ul>	ND	smjesa propilen glikola i izopropanola	prašak	[49]
<b>Bespak</b>	odrasle osobe (M i Ž)	Duraform PA (najlon)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vestibulum</li> <li>• turbinatna regija (2)**</li> <li>• olfaktorna regija</li> <li>• nazofarinks</li> </ul>	+	smjesa etanola i glicerola	prašak	[50]
					smjesa glicerola i Brij 35	otopina	[48]
					/	suspencija	[53]
<b>Pfeifer</b>	ND	silikon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nosna šupljina</li> <li>• nazofarinks</li> </ul>	-	parafinsko ulje	prašak	[54]

ND - informacija nije dostupna

\*podijeljena na donji, srednji i gornji dio

\*\*podijeljena na prednji i stražnji dio

Vezano uz simuliranje drugih fizioloških svojstava nosne šupljine, vrijedi istaknuti i rad Saladea i sur. (2018) koji su na modelu Aptar Pharme simulirali relativnu vlažnost nebuliziranjem istog MiliQ vodom kroz deset minuta nakon čega je provedeno raspršivanje

praška. Ovo je ujedno i jedini primjer pokušaja simulacije relativne vlažnosti u ispitivanjima depozicije [52].

### 1.4.2. 3D-printani modeli

Činjenica da se pojedini nazalni pripravci koriste u odraslih bolesnika, a indicirani su i za pedijatrijsku populaciju, potakla je razvoj raznih 3D-printanih modela koji bi dali uvid u to koliko anatomske razlike između pedijatrijske i odrasle populacije utječu na profil depozicije i učinkovitost takvih pripravaka [32]. Kao što je vidljivo iz Tablice 2. nekoliko znanstvenih timova proučavalo je tu problematiku na 3D-printanim modelima vlastite izrade. Modeli za pedijatrijsku populaciju u svim spomenutim radovima izrađeni su na temelju individualnih CT snimaka glave zdrave djece. Zbog toga se pojedini modeli čak i unutar iste dobne skupine međusobno razlikuju u anatomske značajkama te se rezultati ne mogu direktno ekstrapolirati na cijelu pedijatrijsku populaciju [31]. Kada se tome pridoda i činjenica da su u različitim istraživanjima (Tablica 2.) korišteni različiti uvjeti primjene, uređaji i protoci zraka, može se zaključiti da je međusobno uspoređivanje rezultata puno kompleksnije u odnosu na ono pri primjeni komercijalno dostupnih modela. Unatoč tome, svako od tih istraživanja zasebno daje nove i zanimljive spoznaje na temu važnosti prilagodbe nazalnih pripravaka za pacijente pedijatrijske populacije. Vrijedi naglasiti i da etička pitanja koja bi za sobom povlačila ispitivanja parametara primjene na toj populaciji također govore u prilog važnosti razvoja *in vitro* metoda.

U ovoj skupini modela samo su dva primjera simulacije mukoze od kojih onaj iz rada Sawanta i Donovana (2018) donosi inovacije budući da su korišteni mucini iz gastrične mukoze svinje. Uz to, liofilizat mucina rekonstituiran je u izotoničnom fosfatnom puferu pH 6,5 te je koncentracija mucina podešena tako da je viskoznost otopine bila približna onoj sluzi čovjeka čime je najvjernije od svih do sad predstavljenih metoda simulirana sluznica nosa [30].

**Tablica 2. Svojstva 3D-printanih modela nosne šupljine i njihova zastupljenost u ispitivanjima profila nazalne depozicije**

Starosna dob	Model	Materijal	Anatomska podjela	Rasklapanje na regije	Sredstvo	Ispitivana formulacija	Literatura
Pedijatrijska populacija	2-, 5- i 12-godišnje dijete	Objet Fullcure 720 <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vestibulum</li> <li>• nosne valvule</li> <li>• gornja nosna (n.) školjka i njušna regija</li> <li>• srednja n. školjka</li> <li>• donja n. školjka i nazofarinks</li> </ul>	+	/	otopina	[32]
	12-godišnje dijete	Durus White	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vestibulum</li> <li>• nosne valvule</li> <li>• prednji dio n. školjki</li> <li>• stražnji dio n. školjki</li> <li>• nazofarinks</li> </ul>	+	otopina mucina svinjske gastrične mukoze	otopina	[30]
Pedijatrijska i odrasla populacija	2-, 5- i 50-godišnjak	Accura ClearVue <sup>2</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• anteriorna regija</li> <li>• gornja n. školjka</li> <li>• srednja n. školjka</li> <li>• donja n. školjka</li> <li>• nazofarinks</li> <li>• sinusi<sup>4</sup></li> </ul>	+	/	suspencija	[31]
	7-, 12- i 48-godišnjak	Somos Watershed XC11122	<ul style="list-style-type: none"> <li>• anteriorna regija</li> <li>• gornja n. školjka</li> <li>• srednja n. školjka</li> <li>• donja n. školjka</li> <li>• nazofarinks</li> </ul>	+	/	otopina	[27]
	7-14 godina i 31-48 godina <sup>3</sup>	Somos Watershed XC11122	<ul style="list-style-type: none"> <li>• anteriorna regija</li> <li>• gornja n. školjka</li> <li>• srednja n. školjka</li> <li>• donja n. školjka</li> <li>• nazofarinks</li> </ul>	+	/	otopina	[26]
Odrasla populacija	53-godišnji muškarac	pločice akril plastike	<ul style="list-style-type: none"> <li>• anteriorna regija</li> <li>• gornja n. školjka</li> <li>• srednja n. školjka</li> <li>• donja n. školjka</li> <li>• nazofarinks</li> </ul>	+	/	otopina	[55]
					/	otopina	[56]
	53-godišnji muškarac	Veroclear polipropilen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• anteriorna regija</li> <li>• turbinatna regija</li> <li>• njušna regija</li> <li>• nazofarinks</li> </ul>	+	Sar-Gel	otopina	[36]
	33-godišnja žena	epoksi smola <sup>1</sup>	ND	ND	/	otopina	[57]

ND - informacija nije dostupna

<sup>1</sup> - unutrašnji dio izrađen od navedenog materijala, a vanjski dio od silikona

<sup>2</sup> - unutrašnji dio izrađen od navedenog materijala, a vanjski dio od materijala Tango Plus 27A

<sup>3</sup> - CT snimke 5 osoba pedijatrijske populacije (prosjeak godina 9,8) i 5 odraslih osoba (prosjeak godina 40,8) korištene za izradu 10 modela

<sup>4</sup> - na modelu vidljivi maksilarni, frontalni i etmoidalni sinusi



Velika prednost tehnologije 3D-printanja jest to što znanstvenicima otvara širok spektar mogućnosti pri dizajniranju, odnosno prilagođavanju svojstava modela tipu eksperimenta. Tako se primjerice svi modeli u ovoj kategoriji rastavljaju na regije od interesa i materijali korišteni za izradu (Tablica 2.) u većini su slučajeva lakši u odnosu na komercijalne silikonske modele, što olakšava rukovanje te u nekim radovima [36] omogućuje čak i kvantitativnu analizu vaganjem.

Koliko su mogućnosti široke jako je dobro vidljivo na primjeru rada Pozzoli i sur. (2016) gdje 3D-printani model nema anatomske karakteristike nosne šupljine, nego predstavlja nastavak za kaskadni impaktor oblika kupole [58]. Kupola je modificirana na način da su dizajnirani utori u koje se mogu nasaditi epitelne stanice zbog čega ovaj model može dati informacije o permeaciji djelatne tvari preko simuliranog nazalnog epitela iz pripravka raspršenog u simuliranu nosnu šupljinu [41].

### **1.4.3. Računalne simulacije dinamike fluida (CFD simulacije)**

Tehnika računalne simulacije dinamike fluida u svojoj srži kombinira znanja iz područja mehanike fluida i računalnih simulacija te se koristi s ciljem dobivanja novih informacija o procesima koji uključuju gibanja fluida [59].

Razvoj ove metode u svrhu proučavanja depozicije nazalnih pripravaka započinje uzimanjem CT ili MRI (magnetska rezonancija, engl. *magnetic resonance imaging*) snimke nosne šupljine ispitanika nakon čega se ista obrađuje u specijaliziranim programima kojima se simulira njezin trodimenzionalni oblik [59], [60]. Potom se primjenom matematičkih modela simuliraju protok zraka, parametri primjene i isporuka nazalnog pripravka [16], [60] te se na kraju mogu dobiti rezultati koji su u korelaciji s eksperimentalnim vrijednostima dobivenim u ljudi [61].

Prednost CFD simulacije je to što se uz dovoljan broj snimaka nosne šupljine na jeftiniji i jednostavniji način može obuhvatiti veća populacija pacijenata u odnosu na onu jednog komercijalnog ili 3D-printanog modela. Primjerice, Keeler i sur. (2016) su koristeći ovu tehniku obuhvatili snimke 16 osoba kako bi promatrali razlike u profilu depozicije između pripadnika četiriju etničkih skupina [34].

Byun i sur. (2019) su u svom radu CFD simulacijom obuhvatili čak 32 pacijenta od kojih je dvoje patilo od kroničnog rinosinuitisa te pokazivalo značajne razlike u anatomiji s obzirom na normalno fiziološki prisutan nazalni ciklus, što ukazuje na još jedan kriterij kojeg prethodno spomenuti modeli teže mogu obuhvatiti [62].

Iako idealan matematički model svih parametara primjene nije uvijek lako postići, rad na ovakvim metodama može biti od velikog interesa farmaceutskim tvrtkama koje razvijaju

nazalne pripravke [59], jer može uštediti vrijeme i novac izvođenjem *in vitro* ispitivanja na fizičkim modelima.

## **1.5. Formulacijski parametri i parametri primjene koji utječu na depoziciju lijeka u nosnoj šupljini**

Medicinski proizvod za nazalnu primjenu objedinjuje farmaceutski oblik i uređaj za nazalnu primjenu. Uspješnost terapije ovisi o njegovoj pravilnoj primjeni od strane pacijenta. Parametri koji opisuju rukovanje pacijenta medicinskim proizvodom su: dubina umetanja uređaja u nosnicu, kut primjene, položaj glave, udah te zatvaranje nosnice [43]. Ti parametri trebaju biti usklađeni sa svojstvima farmaceutskog oblika i uređaja za nazalnu primjenu kako bi se postigla maksimalna učinkovitost, sigurnost i ujednačenost doziranja nazalno primijenjenog lijeka.

Ovisno o željenom djelovanju (lokalni učinak, sistemska raspoloživost primijenjenog lijeka ili izravna dostava lijeka iz nosne šupljine u mozak), potrebna je ciljana dostava terapijskog sustava u određena područja nosne šupljine [41]. Ciljanom dostavom lijeka postiže se efikasnije liječenje uz manje nuspojave [48], optimiranjem formulacijskih parametara i parametara primjene. Za većinu indikacija, za sistemska raspoloživost i lokalno djelovanje, odgovarajuća je depozicija na što većoj površini nazalne sluznice [24], [41]. Međutim, kod bolesti nosne sluznice poput kroničnog sinusitisa i nazalnih polipa poželjnija je povećana depozicija u dijelovima koje ove bolesti zahvaćaju. Kod kroničnog sinusitisa to su gornji i srednji nosni hodnik gdje su smješteni i otvori sinusa [24], [32], dok je kod polipa to najčešće srednji nosni hodnik [63]. Za izravnu dostavu lijeka iz nosne šupljine u mozak, ciljana regija je u gornjem nosnom hodniku, gdje se nalazi njušna regija i završeci njušnog živca [52].

### **1.5.1. Značajke farmaceutskog oblika**

Pri primjeni lijeka raspršivanjem tekućih ili praškastih sustava u nosnu šupljinu, veličina čestica generiranog aerosola važan je parametar o kojem ovise sigurnost i uspješnost primjene nazalnog pripravka. Naime, prevelike čestice će se brže ukloniti djelovanjem mukocilijarnog klirensa, dok će one premale prolaziti u donje dišne putove [64]. Navedeno može dovesti do izostanka terapijskog učinka ili neželjenih nuspojave tako primijenjenog lijeka. Kako bi se takvi ishodi sveli na najmanju moguću mjeru, Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*; EMA) zahtijeva od proizvođača nazalnih pripravaka utvrđivanje granice za udio čestica aerosola manjih od 10  $\mu\text{m}$  te promjera čestica koji odgovara vrijednosti kumulativnog udjela od 50% ( $d_{50\%}$ ) [65]. Stoga se kao optimalna veličina čestica za nazalnu primjenu smatra ona od 10 do 50  $\mu\text{m}$  [64], [66], [67], a navedeno potkrepljuju i brojni literaturni

primjeri koji pokazuju da se unutar sličnih raspodjela veličina čestica postiže adekvatna depozicija [47], [49], [50], [54].

Učinkovitost primjene nazalnog pripravka ovisi o dva tehnološka aspekta primjene: količini pripravka koja se prilikom raspršivanja dostavi iz uređaja u nosnu šupljinu te geometriji oblaka generiranog aerosola koja određuje distribuciju lijeka unutar nosne šupljine [68]. Budući da oba aspekta ovise o reološkim svojstvima pripravka i značajkama uređaja važno je prilikom razvoja nazalnog pripravka ciljano ispitati varijabilnosti istih za utemeljenu procjenu učinkovitosti terapijskog sustava [69], [70]. Kombinacija uređaja i farmaceutskog oblika prema tome može se vrednovati promatranjem ujednačenosti doziranja, čime se utvrđuje kvantitativni aspekt dostave lijeka, te kuta raspršenja, brzine, oblika, gustoće, površine i veličine čestica/kapljica te visine generiranog oblaka čime se procjenjuje kvalitativni aspekt dostave, povezan s depozicijom [68]. Tim ispitivanjima najčešće prethodi detaljno proučavanje reoloških značajki formulacije. Od reoloških svojstava tekućih nazalnih pripravaka važno je poznavanje viskoznosti, površinske napetosti te tiksotropnih svojstava tekućine [38], [41]. Reološka svojstva prašaka posljedica su adhezijskih i kohezijskih sila među česticama praška [71]. Budući da je riječ o interakcijama koje se događaju na površini čestica, njihova veličina, oblik, poroznost, gustoća, hrapavost te druga svojstva površine predstavljaju parametre koji utječu na reološka svojstva [71]. Navedeni parametri mogu utjecati i na svojstva aerosolizacije pripravka [37], [50], [72], na način da, uslijed povećanja kohezijskih sila među česticama praška, sila generirana od strane uređaja može biti nedovoljna za deaglomeraciju i dispergiranje praška u aerosol [73]. Kao posljedica tih pojava dio praška zaostat će u uređaju [73]. Pringels i sur. (2006) su kod praška lošijih reoloških svojstava uočili i sporiju isporuku iz uređaja te veću površinu oblaka [54]. Da je ovaj učinak povezan i s drugim svojstvima generiranog oblaka pokazuje rad Colomba i sur. (2016) koji su uslijed lošijih reoloških svojstava primijetili manju gustoću i veći kut raspršenja te pomicanje veličine čestica aerosola prema većim vrijednostima [37]. Kod tekućih pripravaka koji pokazuju svojstva Newtonovskih tekućina povećanje viskoznosti pripravaka rezultira većim otporom sili koju generira uređaj što se odražava i na svojstva generiranog aerosola [38], [74]. Zbog toga takvi pripravci imaju manji kut raspršenja te formiraju veće kapljice u odnosu na one manje viskoznosti [27], [30], [56]. Pu i sur. (2014) nisu zamijetili takav učinak povećanjem viskoznosti kod pseudoplastičnog tiksotropnog pripravka [38], što je bilo i očekivano budući da se viskoznost takvih pripravaka smanjuje primjenom sile koja potiskuje tekućinu iz uređaja. Sosnowski i sur. (2020) su pak uspoređujući pet različitih komercijalno dostupnih pripravaka međusobno sličnih tiksotropnih svojstava uočili razlike u raspodjeli veličine čestica i geometriji oblaka, no iste su pripisali razlikama u površinskoj napetosti među pripravcima te različitim izvedbenim značajkama uređaja [75].

Spomenuta svojstva aerosola valja prilagoditi i namjeni nazalnog pripravka. To podrazumijeva prilagodbu s obzirom na željeni profil depozicije [20] i terapijski učinak [41], [68]. Efikasnost dostave pripravka u turbinatnu ili njušnu regiju ponajprije će ovisiti o tome koliko pripravka može proći kroz anatomske najuži dio nosa, a to su nosne valvule [24], [40]. Stoga će manji kut raspršenja pripravka u kombinaciji s prilagođenim uvjetima primjene polučiti bolji rezultat [27], [40], [56]. Svojstva oblaka poput kuta raspršenja, veličine čestica te površine oblaka važni su parametri aerosola koji određuju profil depozicije i površinu sluznice koju će pripravak prekriti [40].

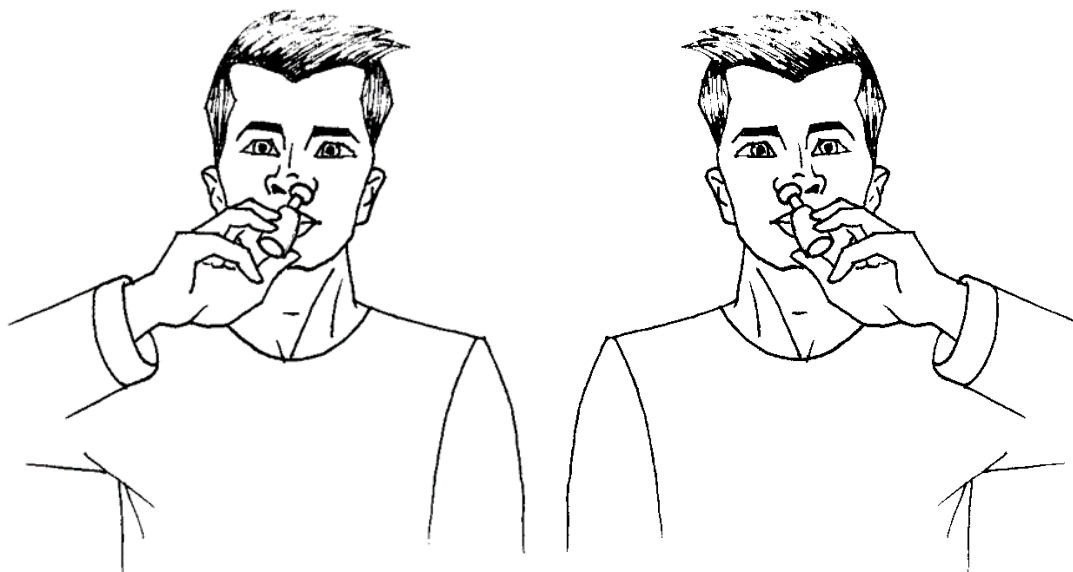
Kvalitativni aspekt dostave nazalnog pripravka obuhvaća i utjecaj reoloških svojstava na profil depozicije nakon što pripravak dođe u kontakt sa sluznicom. U tom smislu razlikujemo inicijalnu depoziciju koja je postignuta impakcijom ili sedimentacijom čestica te sekundarnu depoziciju do koje dolazi translokacijom pripravka od strane mukocilijarnog aparata [20] ili uslijed sile generirane protokom zraka [75]. Tako tekući pripravci veće viskoznosti imaju manju sposobnost rasprostiranja pri inicijalnom kontaktu sa sluznicom u odnosu na one manje viskoznosti, ali se zato i sporije uklanjaju s površine sluznice djelovanjem mukocilijarnog klirensa [38], [40], [75]. Pringels i sur. (2006) su pak zaključili da bi manja gustoća praška mogla rezultirati većim rasprostiranjem po površini sluznice budući da takav prašak ima veći volumen u odnosu na onaj veće gustoće [54].

### **1.5.2. Kut primjene**

Osim opisanih reoloških svojstava, na samu depoziciju utječe i način primjene. Kut primjene je kritičan parametar koji određuje profil depozicije [40], [56] te se stoga mora jasno istaknuti pacijentu u uputama o primjeni lijeka. Kut primjene određen je položajem glave prilikom primjene te položajem bočice.

Položaj glave pacijenta može biti: uspravan, nagnut prema naprijed i nagnut prema natrag, a položaj bočice ovisi o tome radi li se o ipsilateralnoj ili kontralateralnoj primjeni [76]. Prema procjeni Aggarwal i suradnika (2004.) (Odjel za otorinolaringologiju, kirurgiju glave i vrata, Manchester, UK) pregledom literature, nije definiran optimalni način primjene nazalnih lijekova te je zaključeno da su potrebna daljnja ispitivanja u optimizaciji depozicije [77]. Mnoga ispitivanja su od tada provedena u tom smjeru [26], [77]-[80]. Merkus i sur. (2006.) u svoja dva rada uspoređuju nazalnu primjenu sprejeva u različitim položajima uzimajući u obzir anatomiju nosne šupljine te zaključuju da nema generalno najbolje pozicije za nazalnu primjenu lijeka te je potreban individualni pristup s obzirom na anatomiju i patologiju nosne šupljine svakog pacijenta [79], [80]. Isto zaključuju i Warnken i sur. (2018) prema kojima bi za svakog pojedinca trebalo odrediti optimalan kut primjene za maksimalnu učinkovitost depozicije u željenoj turbinatnoj regiji [26]. Individualizacija kuta primjene može biti važna za lijekove uske terapijske

širine ili lijekove za životno-ugrožavajuće bolesti [26]. Benninger i sur. (2004) proučavajući nazalne kortikosteroide na tržištu i relevantnu literaturu ne nalaze dokaze za definiranje načina primjene maksimalne učinkovitosti, ali preporučuju kontralateralnu primjenu, usmjerenu od septuma, uz istovremeni udah (Slika 5.) [78]. Ovaj način primjene preporučuje se i u Europskim smjernicama za liječenje rinosinuitisa i nazalnih polipa (EPOS) iz 2020 za primjenu nazalnih sprejeva [81].



**Slika 5.** Kontralateralna tehnika primjene nazalnih kortikosteroida (a) desnom rukom u lijevu nosnicu i (b) lijevom rukom u desnu nosnicu

#### 1.5.2.1. Kut primjene – pregled dosadašnjih istraživanja

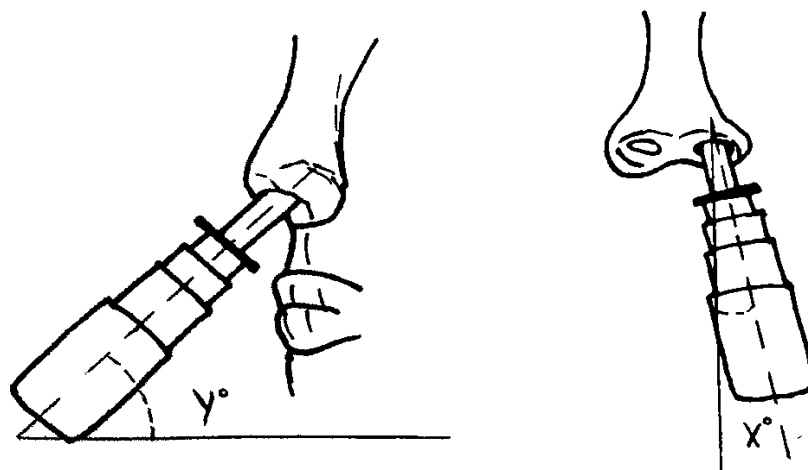
Kut primjene u istraživanjima definira se kao horizontalni kut i vertikalni kut (Slika 6.) uz najčešće uspravni položaj glave, ali i s položajem glave prema naprijed ili natrag. Važnost u određivanju optimalnog kuta primjene proizlazi iz njegovog značajnog utjecaja na depoziciju [40], [56].

Prema pregledu uputa o primjeni lijeka, dijagrami koji prate uputu ukazuju na primjenu pri horizontalnom kutu od 30° i 45° [78], pri kojima je dokazana bolja depozicija zbog lakšeg prolaska nosne valvule [40]. Navedene upute temelje se na mnogim istraživanjima u kojima je ispitivana depozicija pri horizontalnom kutu primjene od 30° [16], [27], [30], [56] ili 45° [26], [40], [51], [57], [82], uspoređujući ih i s drugim većim kutovima primjene [26], [40], [56]. Pri kutovima primjene većim od 60° povećana je depozicija u anteriornom dijelu nosne šupljine [40]. Navedeni kutovi primjene sumirani su iz radova u kojima je ispitivana depozicija otopina

i suspenzija djelatne tvari u nosnoj šupljini nakon raspršivanja. S obzirom na različita reološka svojstva tekućih i praškastih sustava očekivano je da se kut primjene razlikuje među navedenim oblicima.

Usljed nedostatka objavljenih radova o praškastim sustavima i manje zastupljenosti na tržištu, nema definiranog optimalnog kuta primjene praškastih sustava. U većini objavljenih radova s ispitivanjem depozicije praškastog sustava nije definiran kut primjene. U radu Salade i suradnika (2018) ispitivan je horizontalni kut od  $45^\circ$  [52], a u radu Nižić i suradnika (2020) horizontalni kut od  $60^\circ$  [47]. U nedostatku generalnih podataka, potrebno je optimirati kut primjene za svaki pojedini praškasti sustav.

Vertikalni kut primjene u istraživanjima uglavnom iznosi  $0^\circ$  [26], [47] ili je definiran kao vertikalni položaj bočice [24], jednako kao i u uputama o primjeni lijeka [78]. Primjena kortikosteroida od septuma u istraživanjima se definira kao vertikalni kut od  $20^\circ$  [46].



**Slika 6.** Horizontalni kut (lijevo) i vertikalni kut (desno)

### 1.5.3. Protok zraka kroz nosnu šupljinu

Protok zraka kroz nosnu šupljinu je sljedeći važan parametar s utjecajem na depoziciju lijeka [83]. Specifične interindividualne razlike u anatomiji nosne šupljine dovode do razlika u protoku zraka u pojedinom dijelu nosne šupljine, što rezultira razlikama u depoziciji [84]. Na protok zraka utječu i različite bolesti gornjeg dišnog sustava poput upale, polipa i alergije, koji mijenjaju površinu nosne sluznice i/ili volumen i konzistenciju sluzi na njoj [21].

Razvojem CFD simulacije omogućeno je detaljnije ispitivanje protoka zraka u nosnoj šupljini. Većina radova koja istražuje protok zraka i utjecaj protoka na depoziciju lijeka u nosnoj

šupljini temelji se na toj tehnologiji simulacije [21], [61], [84]-[86], jer omogućuje matematičke izračune koji vjerno prikazuju što se događa tijekom kretanja zraka kroz nosnu šupljinu.

Uviđajući važnost samog protoka zraka, potrebno je u eksperimentalnom radu simulirati disanje uzimajući u obzir svojstva samog modela. Disanje se može simulirati pomoću vakuum pumpe [26], [27], [30], [39], [50], [55], [56], [82] ili respiratorne pumpe [38], [47], [82] priključene na model.

Parametri disanja uključuju volumen udahnutoga zraka u jednom udahu, frekvenciju disanja te izmijenjen volumen zraka u jednoj minuti. Iako se ti parametri razlikuju kod svakog pojedinca, određene su vrijednosti koje vrijede za većinski dio populacije. Volumen zraka izmijenjen tijekom jednog ciklusa inspiracije i ekspiracije (respiracijski volumen) iznosi oko 500 ml [14], [87], a u jednoj minuti se prosječno izmijeni oko 6 L zraka u stanju mirovanja [87]. Frekvencija normalnog disanja zdrave odrasle osobe je 12 do 18 udaha po minuti [88]. Kod napora se frekvencija može povećati na 30 do 40 udaha po minuti [87] uz istovremeno povećanje respiracijskog volumena [14].

Kod normalnog umjerenog disanja, tijekom hodanja ili laganijeg vježbanja, protok zraka je sporiji, jednoličniji te pretežito laminaran [24], s vrijednostima od oko 20 l/min [16], [89]. U vanjskom dijelu nosne šupljine zrak se kreće laminarno [6] do suženja u području vestibula, odnosno nosne valvule, koja pruža najveći otpor protoku [24], [90] uz pojavu vršne vrijednosti protoka zraka i ubrzanje do 18 m/s [6], [24], [90], [91]. U tom dijelu dolazi do promjene u brzini i protoku zraka tijekom inspiracije [24], koji prelazi iz brzog i laminarnog protoka, u sporiji i turbulentniji protok [6]. Prolaskom najužeg dijela, zrak dolazi do unutarnjeg dijela nosne šupljine gdje su smještene nosne školjke. Njihova struktura ovisna je o nazalnom ciklusu kojem podliježe sluznica [14], [92] i patološkim stanjima koja utječu na samu površinu sluznice i time pružaju određeni otpor protoku zraka [21], [93]. Nosne školjke svojom strukturom stvaraju uske prolaze te zakreću protok zraka uzrokujući turbulentno kretanje uz smanjenje brzine na 2-3 m/s koje dovodi do depozicije čestica [6], [24], [90], [91]. Glavni dio toka zraka kreće se u području srednje i donje nosne školjke, dok se manji dio zakreće prema gornjim dijelovima nosne šupljine, gdje dolazi do njušne regije [91]. Zakretanje toka omogućuje dulje zadržavanje zraka i čestica u nosnoj šupljini. Najveća brzina dostiže se uz donji dio nosne šupljine gdje je prisutan najmanji otpor [91], dok je najmanja brzina uz samu njušnu regiju [86]. Pri samom izlasku iz nosne šupljine strujanje postaje laminarno i kao takvo prolazi u dublje dijelove dišnog sustava [92].

U mnogim uputama o lijeku navodi se kako je potrebno udahnuti tijekom primjene lijeka. Kod naglog udaha brzina protoka zraka može doseći 32 m/s [24], odnosno oko dva puta veću brzinu nego u uvjetima normalnog udaha [16]. Naglim udahom postiže se veće raspršenje

čestica u nosnoj šupljini u odnosu na normalno disanje, povećava se depozicija u turbinatnoj, a smanjuje u anteriornoj regiji [16]. Naime, kod jednosmjernog protoka zraka većeg od 25 l/min povećava se udio turbulentnog kretanja zraka [24], [90], što rezultira većim udjelom čestica u njušnoj regiji [85]. Pri protoku zraka iznad 35 l/min, disanje prelazi na usta zbog prejakog otpora u nosnoj šupljini [24], [90].

Zatvaranje jedne nosnice navodi se u mnogim uputama primjene nazalnih pripravaka (Tablica 3., [78]). Naime, zatvaranjem nosnice smanjuje se površina poprečnog presjeka za prolaz struje zraka. Smanjenjem prolaza dolazi do povećanja brzine protoka zraka, kako jednaka količina zraka mora proći kroz uži prostor u istom vremenskom razdoblju. Povećanjem brzine, jača i utjecaj protoka na primijenjene čestice i njihovu depoziciju [27].

**Tablica 3.** Nazalni prašci odobreni od strane FDA, PMDA te nacionalnih agencija država Europe

Trgovačko ime	Lijek	Uređaj	Odobrenje	Način primjene
<i>Onzetra</i> [94]	Sumatriptan-sukcinat	OptiNose Bi-Directional™	FDA	upuhivanjem u uređaj glava u uspravnom položaju
<i>BAQSIMI</i> [95]	Glukagon	Aptar Pharma UniDose	FDA	vrh sprej pumpice nježno se stavi u nos do razine dok prsti ne dotaknu nosnicu
<i>Rhinocort Turbuhaler</i> [96]	Budezonid	Rhinocort® Turbuhaler®	Nacionalne agencije država Europe	jak i snažan udah kroz nosnicu druga nosnica zatvorena
<i>Teijin Rhinocort</i> [97]	Beklometazon-dipropionat	Puvlizer Rhinocort®	PMDA	mehanički stisak gumenog balona uz istovremeni udah
<i>Erizas</i> [98]	Deksametazon-cipeclat	Twin-lizer®	PMDA	snažan udah kroz nosnicu

FDA – Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. Food and Drug Administration)

PMDA - Agencija za lijekove i medicinske proizvode Japana (engl. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)

#### 1.5.3.1. Prednosti i nedostaci različitih oblika simulacije disanja u modelu nosne šupljine

Disanje je simulirano u mnogim istraživanjima nazalne depozicije lijekova zbog velikog utjecaja protoka zraka na depoziciju u nosnoj šupljini. Simuliranje protoka zraka od 10 l/min



predstavlja plitko disanje [26], [27], [30]. Umjereno disanje ispituje se pri vrijednostima od 15-20 l/min [16], [40], [47], [49], [55], [56], [58], [60], dok se forsirani udah simulira vrijednostima od 45 l/min [27] do 60 l/min [26], [56].

Dvije su vrste simulacije disanja u nazalnim modelima: simulacija vakuum pumpom i respiratornom pumpom.

Respiratornom pumpom simulira se cikličko disanje. Prednost te vrste simulacije je mogućnost podešavanja parametara poput respiracijskog volumena, omjera trajanja inspiracije i ekspiracije te volumena zraka izmijenjenog u jednoj minuti. Nedostatak takve simulacije je što se kod izvođenja eksperimenta mora koordinirati potisak sa simuliranim udahom, što otvara prostor za moguće greške prilikom primjene te, naposljetku, pogrešnu procjenu depozicije.

Vakuum pumpa pruža simulaciju stalnog jednosmjernog protoka zraka, odnosno konstantnog udaha od strane pacijenta, što ne odgovara situaciji *in vivo*. Prednost stalnog protoka zraka je lakše izvođenje eksperimenta. Nedostatak je što je nazalna depozicija u takvim uvjetima generalno veća nego pri simulaciji cikličkog disanja pri jednakom protoku zraka [83]. Razlog tomu je što se cikličkim disanjem, stvaraju vrtlozi izmjenom smjera protoka zraka u nosnoj šupljini koji se kod jednosmjernog protoka ne pojavljuju [83].

#### **1.5.4. Uređaji za dostavu nazalnih pripravaka**

Sljedeći važan parametar koji utječe na profil depozicije lijeka u nosnoj šupljini, a time i na učinkovitost terapije, je sami uređaj za nazalnu primjenu lijeka. Uređaj kao suportivni dio nazalne primjene lijeka mora biti funkcionalan, robustan i jednostavan za upotrebu [43]. Jednako tako mora osiguravati reproducibilnost doze te željeni profil depozicije. Važna je i kompatibilnost uređaja s pojedinim sastavnicama formulacije [99]. Dizajn uređaja mora biti optimiran za minimalno izazivanje nelagodnih osjeta u anteriornom dijelu nosne šupljine koji su povezani s uređajem (direktni kontakt vrha uređaja sa sluznicom nosa, niske temperature ili raspršenje velikom brzinom), a s ciljem postizanja bolje adherencije pacijenata prema propisanoj terapiji [24].

##### **1.5.4.1. Nazalna dostava prašaka**

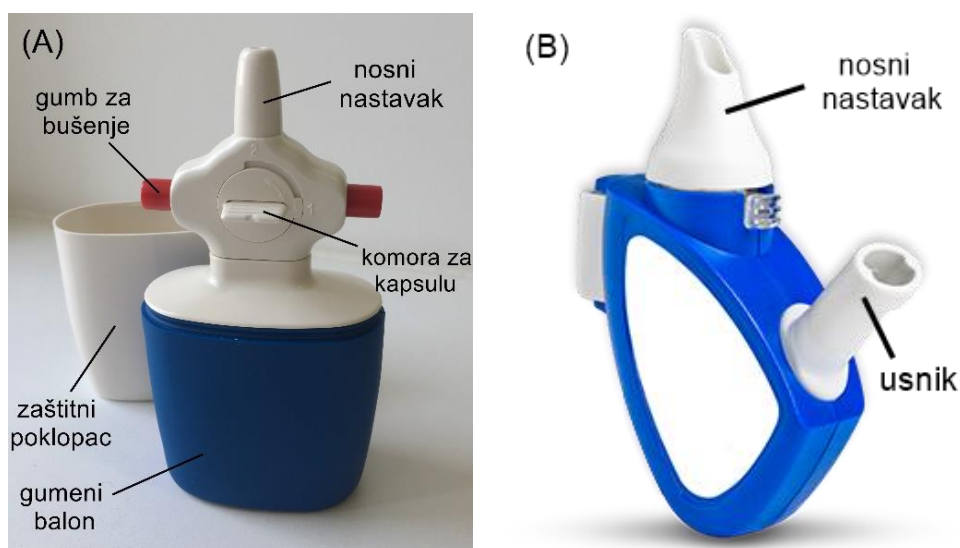
Uređaji za nazalnu dostavu prašaka mogu se podijeliti prema mehanizmu primjene na sljedeće kategorije: nazalni inhaleri (engl. *nasal powder inhalers*), nazalni mehanički raspršivači (engl. *nasal powder sprayers*) i nazalni upuhivači (engl. *nasal powder insufflators*) [24], [100]. Uređaji za nazalnu dostavu lijeka navedeni su u Tablici 4. [24], [66], [97], [98], [100].

**Tablica 4. Uređaji za nazalnu dostavu praška navedeni prema mehanizmu primjene**

Inhaleri	Mehanički raspršivači	Upuhivači
Rhinocort® Turbuhaler® (AstraZeneca) Twin-lizer® (Nippon Shinyaku) Puvlizer Rhinocort® (Teijin Pharma) Prohaler®/BiDose (Pfeiffer/Aptar)	UniDose (Aptar) Fit-lizer™ (SNBL Pharma) Unidose DP™ (Bespak) SoluVent™ (BD Pharma) Monopowder (Pfeiffer/Valois) MIAT® (MIAT S.p.A.) PowderJet (RPC Formatec)	Trivair™ (IP Med Inc.) Direct Haler (Trimel Pharmaceuticals) Optinose Bi-Directional™ (Optinose)

Princip primjene nazalnih inhalera temelji se na dostavi lijeka pod utjecajem vlastitog udaha. Lijek je u obliku praška sadržan u kapsuli ili blisteru [24], [100]. Navedeni uređaji dostupni su na tržištu za nazalnu dostavu praška u indikaciji liječenja rinitisa [97], [98]. Kod uređaja Rhinocort® Turbuhaler® i Twin-lizer® doza je primijenjena pacijentovim udahom, dok je kod Puvlizer Rhinocort® potreban dodatan mehanički potisak gumenog balona uz istovremeni udah do 8 puta [98].

Mehanički raspršivači pokreću se mehaničkim generiranjem protoka zraka, pri čemu dolazi do stvaranja tlaka koji uzrokuje raspršivanje praška, slično primjeni tekućih nazalnih sprejeva [24], [100]. Na Slici 7. (A) prikazan je MIAT® jednodozni insuflator kao primjer.



**Slika 7.** MIAT® jednodozni nazalni insuflator (A) i OptiNose dvosmjerni nazalni upuhivač (B) (preuzeto i prilagođeno prema [101])

Princip mehanizma dostave lijeka pomoću nazalnog upuhivača temelji se na raspršivanju nazalnog praška izdahnutim zrakom pacijenta [97]. Nazalni upuhivač sastoji se od usnika i nosnog nastavka, međusobno povezanih u protočnu cjelinu (Slika 7. (B)) [24], [66], [102]. Izdahom u usnik, pokreće se raspršivanje praška kroz nosni nastavak u nosnu šupljinu. Prednost takvih uređaja je što se izdahom u uređaj podiže meko nepce, izolira nosna šupljina i smanjuje mogućnost dostave lijeka u niže dijelove dišnog sustava [66], [97], [100].

U Tablici 3. sumirani su prašci za nazalnu primjenu odobreni od strane Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) za područje SAD-a, Agencije za lijekove i medicinske proizvode (engl. *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*, PMDA) za područje Japana te prašak s odobrenjem u nekoliko država na području Europe - Nizozemska, Danska, Belgija, Finska, Irska, Luksemburg, Italija, Švedska, Mađarska, Norveška i Island. Uz davatelja odobrenja za pojedini nazalni prašak, u Tablici 3., navedeni su uređaji te način njihove primjene. Zanimljivo je istaknuti da je kod nazalnog pripravka Onzetra kut primjene definiran oblikom samog spremnika s nosnim nastavkom uz uspravan položaj glave. Kod ostalih nazalnih prašaka kut primjene nije definiran.

## **1.6. Nazalna primjena kortikosteroida u liječenju rinitisa, rinosinuitisa i nazalnih polipa**

Rinitis je simptomatska upalna bolest nosne sluznice koju karakterizira nazalna kongestija, kihanje, svrbež i rinoreja. Ova bolest je globalni zdravstveni problem. Prema etiologiji može se podijeliti na alergijski i nealergijski rinitis. Upala nazalne sluznice kod alergijskog rinitisa posredovana je IgE protutijelima kao odgovor na specifične alergene iz okoliša, dok kod nealergijskog nema IgE posredovane reakcije, a patogeneza nije u potpunosti jasna [103].

Rinosinitis se klinički definira kao upala sluznice nosa i paranazalnih sinusa, a karakteriziran je simptomima začepljenog nosa ili curenja nosa, pritiska/boli u području lica uz smanjenje ili gubitak osjeta njuha. Ovisno o trajanju simptoma može biti akutni (<12 tjedana) te kronični (>12 tjedana), uz prisustvo ili bez prisustva nazalnih polipa [81].

Nazalni polipi su upalne nazalne izrasline najčešće u području paranazalnih sinusa, uzrokovane kroničnim upalnim procesima nazalne sluznice. Simptomi koji se povezuju s nazalnim polipima su kronična nazalna kongestija te smanjenje ili gubitak osjeta njuha [63], [104].

Kod svih navedenih bolesti temelj je upala nosne sluznice. Iz tog razloga je nazalna primjena kortikosteroida prva linija u njihovoj kroničnoj terapiji [63], [77], [81], [103].

Klinička učinkovitost kortikosteroidnih lijekova temelji se na kombiniranom protuupalnom djelovanju, koje uključuje smanjenu transkripciju gena za proupalne medijatore, povećanu transkripciju gena za protuupalne medijatore te smanjenje migracije proupalnih stanica [105]. Visoka prevalencija pacijenata koji pate od jedne od ovih kroničnih bolesti, rezultirala je brojnim pripravcima kortikosteroida za nazalnu primjenu odobrenih na području EU (Tablica 5.) [106]-[111].

Pripravci kortikosteroida odobreni na području EU oblikovani su kao suspenzija za primjenu u obliku spreja i kapi za nos. Iznimke su pripravci natrijevog deksametazon fosfata oblikovani kao otopina, te Rhinocort Turbohaler oblikovan kao prašak za nazalnu primjenu.

**Tablica 5. Nazalni pripravci kortikosteroida odobreni na području EU**

<b>Kortikosteroid</b>	<b>Odobreni pripravci na području EU</b>
Flutikazonpropionat	Flonase, Nasofan, Fluticasone-Teva, Fanipos, Flutica-Teva, Flutirin, Flutide Nasal, Flixonase, Flixonase Allergy, Flixonase Nasule, Fluticasone propionate, Otri-Allergie, Rinoco
Budezonid	Rhinocort Turbohaler*, Rhinocort Aqua, Pulmicort nasal aqua, Budesonid Sandoz, Budesonid 1A Pharma, Tafen nasal, Desonix
Mometazon	Mometasone Zentiva, Mometaso Apofri, Mometasonfuroat Ratiopharm, Mometasone Furoate, Mometasone Actavis, Sebanex, Nasometin, Zhekort, Mommox Rino, Mometason Hexal, MometaHEXAL, Rinometasone, Brusonex, Mometason ABECE, Momekort, Mometazonfuroat Cipla, Mometason Cipla, Mometasone Teva, Kalmente, Netonox, Bloctimo, Momanose, Nasonex
Triamcinolon	Allegra nasal, Nasacort, Nasacort allergy, Nasacort Sanofi-Aventis, Triamcinolone acetone
Beklometazon	Beclomtason-CT, Beclometasone-ratiopharm, Rinoclenil, Beclorhinol, Otri-Allergie Heuschnupfenspray, Beconase Allergy, Beconase Hayfever Relief, Beclomet Nasal, Beclomethasone dipropionate, Tespo Hayfever Relief, Rhinomaxil
Natrijev deksametazon fosfat	Solupen Sine, Dexametazon N Sine

\*jedini pripravak u obliku praška na području EU

### 1.6.1. Nazalni pripravci kortikosteroida odobreni u Republici Hrvatskoj

Kratki pregled nazalnih pripravaka kortikosteroida odobrenih u Hrvatskoj, za indikaciju liječenja alergijskog i nealergijskog rinitisa ili/i nosnih polipa, ukazuje na slične preporuke za

položaj glave, položaj nosnog nastavka bočice i koordiniranosti udaha s potiskom (Tablica 6.). Svi nazalni pripravci kortikosteroida odobreni u Republici Hrvatskoj su u obliku suspenzije.

Prema uputama o lijeku, potrebno je prije upotrebe nježno ispuhati nos te protresti bočicu. Većina proizvođača u opisu primjene navodi položaj glave. Također je za devet pripravaka navedeno da je potrebno zatvoriti drugu nosnicu u koju se trenutno ne primjenjuje lijek. Kod svih pripravaka daje se uputa da je potrebno udahnuti uz istovremeni potisak sprej pumpice za dostavu doze lijeka, osim u slučaju lijeka Tafen gdje je udah naveden nakon same primjene doze. Nakon primjene lijeka potrebno je izdahnuti kroz usta, da se izbjegne utjecaj na samu depoziciju u nosnoj šupljini. Kod dvaju lijekova (Avamys i Tafen) u uputama se naglašava primjena s usmjeravanjem nosnog nastavka bočice od septuma, a u slučaju lijeka Tafen dodatno se preporučuje kontralateralna primjena.

### *Epistaksa*

Kod primjene navedenih nazalnih pripravaka iz Tablice 6., kao česte i manje česte nuspojave javljaju se faringitis, iritacija grla, glavobolja te iritacija i peckanje nosa [112]-[122]. Vrlo često zabilježena nuspojava kod primjene nazalnih kortikosteroida je epistaksa, odnosno krvarenje iz nosa, koje može biti iz anteriornog ili posteriornog dijela nosne šupljine. Anteriorno krvarenje često je posljedica mehaničkog oštećenja sluznice nosnim nastavkom, dok je posteriorno često povezano s devijacijom septuma [123]. Chong i sur. (2016) u sustavnom su pregledu analizirali dokaze o potencijalnoj koristi i rizicima korištenja nazalnih kortikosteroida u osoba s kroničnom upalom sluznice nosa i sinusa [124]. Analiza pokazuje da nema razlike u prijavljenim nuspojavama korištenjem nazalnih kortikosteroida u odnosu na placebo, osim povećanog rizika od pojave epistakse.

Nekoliko studija ispitalo je povezanost pojave epistakse s ipsilateralnom odnosno kontralateralnom primjenom nazalnih kortikosteroida [76], [123], [125], [126]. Studija Joice i sur. (2008) ukazala je na trend češćeg krvarenja pri ipsilateralnoj primjeni kortikosteroida, ali ti rezultati nisu bili statistički toliko značajni da bi se moglo tvrditi da kontralateralna primjena smanjuje pojavnost epistakse [126]. Studija Benningera (2008) ukazuje na značajnu povezanost strane krvarenja s ipsilateralnom primjenom [125]. Ganesh i sur. (2017) zaključili su da ipsilateralna primjena rezultira četiri puta većim rizikom od pojave epistakse i tri puta većom vjerojatnošću odustajanja od terapije u odnosu na kontralateralnu primjenu [76]. Zbog navedenih rezultata, u EPOS 2020 smjernicama preporučuje se kontralateralna primjena nazalnih kortikosteroida s ciljem smanjenja epistakse, te u iznimnim slučajevima perforacije sluznice [81].

**Tablica 6.** Parametri primjene iz uputa o lijeku za nazalne pripravke kortikosteroida odobrene u Republici Hrvatskoj

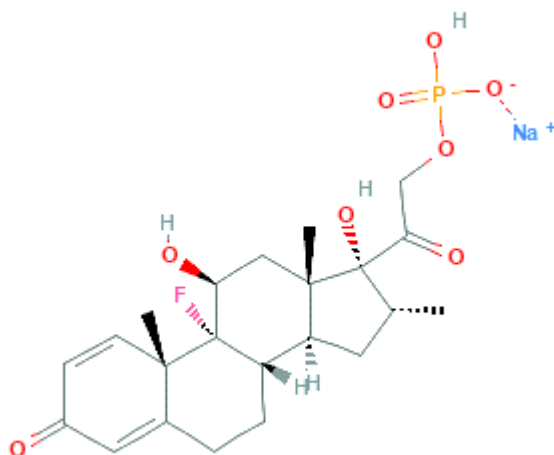
Trgovački naziv lijeka	Udah	Zatvorena druga nosnica	Položaj glave
<i>Tafen</i> <sup>[112]</sup>	Da*	Ne	„Glavu nagnite prema naprijed.“
<i>Flixonase</i> <sup>[113]</sup>	Da	Da	„Glavu nagnite lagano unaprijed.“
<i>Rinoco</i> <sup>[114]</sup>	Da	Da	„Glavu nagnite lagano unaprijed.“
<i>Synaze</i> <sup>[115]</sup>	Da	Da	„Držite glavu prema dolje u smjeru Vaših nožnih prstiju.“
<i>Dymista</i> <sup>[116]</sup>	Da	Da	„Držite glavu prema dolje u smjeru Vaših nožnih prstiju.“
<i>Avamys</i> <sup>[117]</sup>	Da	Ne	-
<i>Bloctimo</i> <sup>[118]</sup>	Da	Da	„Malo nagnite glavu naprijed.“
<i>Momanose</i> <sup>[119]</sup>	Da	Da	„Malo nagnite glavu naprijed.“
<i>Mometazonfuroat Cipla</i> <sup>[120]</sup>	Da	Da	„Nagnite glavu prema naprijed.“
<i>Nasonex</i> <sup>[121]</sup>	Da	Da	„Malo nagnite glavu naprijed.“
<i>Nasacort</i> <sup>[122]</sup>	Da	Da	-

\*udah je naveden nakon primjenjene doze

## 1.7. Deksametazon

Deksametazon je djelatna tvar molekulske formule  $C_{22}H_{29}FO_5$  ( $M_r = 392,5$  g/mol). Prema kemijskoj strukturi pripada skupini glukokortikoida. Deksametazon se u gotovim lijekovima nalazi kao baza u slobodnom obliku, natrijeva ili dinatrijeva sol deksametazon fosfata (Slika 8.) te deksametazoncipeclata (Erizas). Djelovanje deksametazona je snažno protuupalno te imunosupresivno, stoga ima brojne terapijske indikacije kao što su: endokrini poremećaji, bolesti povezane s alergijama, dermatološke, gastrointestinalne, hematološke, oftalmičke bolesti i mnoge druge [127].

Pripravci deksametazona odobreni u Hrvatskoj u obliku su tablete te otopine za injekciju i infuziju za sistemska primjenu, te kapi, gela i masti za oko za lokalnu primjenu. U Republici Hrvatskoj nema odobrenih nazalnih pripravaka deksametazona [128], dok su na području EU u obliku otopine odobreni Solupen Sine (natrijev deksametazon fosfat) i Dexa-Rhinospray N Sine (natrijev deksametazon fosfat) te u obliku praška u Japanu – Erizas (deksametazoncipeclat).



**Slika 8.** Struktura natrijeve soli deksametazon fosfata (preuzeto s [129])

## 2. Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada

### *Hipoteza*

Praškasti sustav polimernih mikrosfera s deksametazonom i inertnog nosača prikladan je terapijski sustav deksametazona za nazalnu primjenu. Svojstva inertnog nosača utječu na bubrenje mikrosfera, homogenost i kut raspršenja praškastog sustava te dostavu lijeka u ciljano turbinatnu regiju nosne šupljine.

Profil nazalne depozicije mikrosfera, osim o svojstvima inertnog nosača, ovisi i o parametrima primjene uključujući protok zraka kroz nosnu šupljinu i kut primjene prema horizontalnoj ravnini.

### *Opći i specifični ciljevi rada*

Nazalna primjena lijeka primarni je terapijski izbor za liječenje bolesti nosa i sinusa, poput rinitisa, rinosinusitisa i nazalnih polipa, jer se, u odnosu na sistemsku primjenu, terapijski učinak lijeka postiže pri manjoj dozi i uz manju mogućnost razvoja sistemskih nuspojava [102]. Povećani interes u istraživanju nazalne dostave lijeka rezultat je raznih mogućnosti koje taj put primjene pruža. Osim navedenog lokalnog djelovanja, nazalnom primjenom može se postići sistemska raspoloživost/djelovanje lijeka te cijepljenje, kao i izravna dostava lijeka u mozak preko njušne regije nosne šupljine [102], [130], [131]. Nazalna primjena lijeka za pacijenta predstavlja jednostavan, bezbolan i neinvazivni način primjene, što ga čini pogodnim i za primjenu u djece [132]. Glavni ograničavajući čimbenici nazalne primjene su (i) problem prolaska nosne valvule, najužeg dijela nosne šupljine, ispred turbinatne regije koja predstavlja ciljno mjesto dostave nazalno primijenjenog lijeka [24], [77] te (ii) mukocilijarno čišćenje koje skraćuje vrijeme zadržavanja lijeka na nosnoj sluznici [46].

Lijekovi za nazalnu primjenu uglavnom su oblikovani kao otopine i suspenzije, te se na tržištu nalaze kao sprejevi ili kapi za nos. Nedostatci tekućih farmaceutskih oblika vezani su uz poteškoće s osiguravanjem odgovarajuće kemijske i/ili fizičke te mikrobiološke stabilnosti. Važno je i pitanje topljivosti i potentnosti djelatne tvari sadržane u obliku, s obzirom na ograničeni volumen koji se može primijeniti po nosnici. Konvencionalni tekući oblici podložni su curenju iz nosa te mukocilijarnom klirensu, što smanjuje vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu primjene [66].

Priprema praškastih sustava jedno je od rješenja problema vezanih uz konvencionalne tekuće oblike lijeka za nazalnu primjenu [68]. Prednost praškastih sustava temelji se na većoj kemijskoj, fizičkoj i mikrobiološkoj stabilnosti suhog oblika te duljem zadržavanju na nosnoj sluznici. Praškasti sustavi omogućuju uklapanje veće doze lijeka te su pogodni i za dostavu



teško topljivih lijekova [52], [133]. Za uspješno formuliranje praškastog pripravka nije potreban dodatak konzervansa, čime je smanjena mogućnost potencijalne iritacije sluznice nosa [68], [133]. Dulje zadržavanje praškastog sustava u nazalnoj sluznici znači dulje djelovanje i manje učestalu primjenu te naposljetku veću adherenciju pacijenta.

Mikrosfere su terapijski sustavi veličine od 1 do 1000  $\mu\text{m}$ , a čini ih polimerni matriks u koji je uklopljen lijek. Hipromeloza i pektin su mukoadhezivni i biokompatibilni polimeri koji ne iritiraju sluznicu nosa [47] te omogućuju kontrolirano bubrenje mikrosfera u dodiru s nosnim fluidom. Gel formiran bubrenjem polimernog matriksa manje je podložan utjecaju mukocilijarnog klirensa, te produljuje vrijeme zadržavanja lijeka na sluznici nosa u odnosu na konvencionalne nazalne oblike [134]. Što su mikrosfere manje veličine, to je njihova ukupna površina kojom mogu stupiti u kontakt s nosnom sluznicom veća. No, čestice manje od 10  $\mu\text{m}$  nisu prikladne za dostavu u nosnu šupljinu, već se odlažu u nižim dijelovima dišnog sustava. Također, velika ukupna površina malih čestica pridonosi izraženijim kohezivnim silama među česticama, što nepovoljno utječe na svojstva tečenja takvih prašaka.

Reološka svojstva i profil depozicije polimernih mikrosfera u nosnoj šupljini mogu se optimirati miješanjem mikrosfera s praškastim inertnim nosačem odgovarajuće veličine čestica, a da se pritom zadrže sve prednosti mikrosfera kao nosača lijeka. Mikrosfere se adsorbiraju na čestice nosača djelovanjem adhezijsko-kohezijskih sila, a rezultirajući praškasti sustav prikladne je veličine čestica za nazalnu depoziciju te boljih izvedbenih značajki od samih mikrosfera [49], [50].

Cilj ovog rada bio je pripremiti mikrosfere s deksametazonom polimernog sastava koji osigurava kontrolirano bubrenje te odabrati prikladni nosač mikrosfera i parametre primjene koji će osigurati ujednačenost doziranja i učinkovitu dostavu deksametazona u željenu (turbinatnu) regiju nosa.

### *Specifični ciljevi*

- Pripraviti mikrosfere s deksametazonom metodom sušenja raspršivanjem otopine lijeka (deksametazona u obliku natrijevog deksametazon fosfata) i polimera (hipromeloze i pektina)
- Odrediti raspodjelu veličine pripremljenih mikrosfera
- Odrediti uspješnost uklapanja i sadržaj lijeka u mikrosferama
- Pripremiti praškaste sustave mikrosfera s deksametazonom i inertnih nosača te odrediti homogenost pripremljenih praškastih sustava
- Ispitati utjecaj praškastih inertnih nosača (laktose, manitola, sorbitola, kalcijevog karbonata i magnezijevog stearata) na:
  - svojstva tečenja,
  - kut raspršenja,
  - bubrenje mikrosfera s deksametazonom
- Odrediti profil nazalne depozicije mikrosfera (korištenjem modela nosne šupljine spojenog s respiratornom pumpom radi simuliranja disanja) u ovisnosti o:
  - vrsti inertnog nosača
  - kutu primjene u odnosu na horizontalnu ravninu
  - protoku zraka kroz nosnu šupljinu
- Odrediti isporučenu masu praška

## 3. Eksperimentalni dio

### 3.1. Materijali

U izradi mikrosfera s uklopljenom djelatnom tvari korišteni su natrijev deksametazon fosfat (dalje u tekstu označen kao deksametazon; Carbosynth Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo), niskoamidirani visokometoksilirani pektin (ljubaznošću donirano od Herbstreith&Fox, Njemačka) i hipromeloza (hidroksipropilmetilceluloza; Shin-Etsu Chemical Co. LTD, Japan). Kao inertni nosači korišteni su laktoza GranuLac® 200 (Meggler, Njemačka), Lactochem® Powder (DFE Pharma, Njemačka), Lactochem® Extra Fine Powder (DFE Pharma, Njemačka), manitol (BDH Prolabo®, VWR International Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo), sorbitol (Kemig, Hrvatska), kalcijev karbonat (Kemig, Hrvatska) te magnezijev stearat (Sigma-Aldrich, SAD).

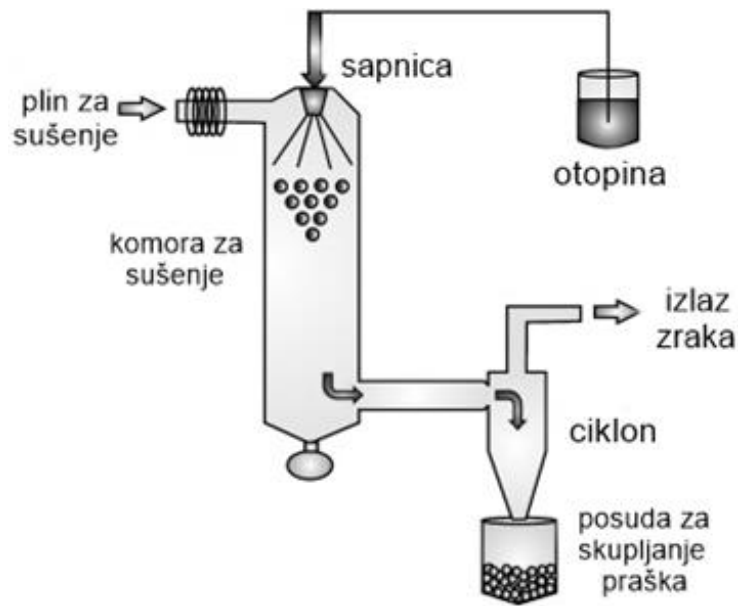
Za pripravu umjetnog nazalnog fluida (engl. *simulated nasal fluid*, SNF) u pročišćenoj vodi otopljeni su NaCl (Kemig, Hrvatska), KCl (Kemig, Hrvatska) te  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Njemačka) redom u koncentracijama od 150 mM, 40mM i 5,3 mM.

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Priprava mikrosfera s deksametazonom

Za izradu mikrosfera najprije su pripremljene koncentrirane otopine polimera. Otopina pektina pripremljena je pri masenom udjelu pektina od 1,4% otapanjem pektina u pročišćenoj vodi pri sobnoj temperaturi tijekom 24 sata uz stalno miješanje na magnetskoj miješalici. Nakon pripreme, otopina je profiltrirana. Otopina hipromeloze pripremljena je pri masenom udjelu hipromeloze od 1,2% dispergiranjem u pročišćenoj vodi zagrijanoj pri 80-85°C te, nakon hlađenja, miješanjem na magnetskoj miješalici 24 sata na sobnoj temperaturi. Otopina hipromeloze ohlađena je te čuvana u hladnjaku 24 sata prije upotrebe. Otopina deksametazona pripravljena je pri masenom udjelu deksametazona od 0,135% otapanjem krute soli deksametazona u 20 g pročišćene vode (korištena natrijeva sol fosfatnog estera deksametazona topljiva je u vodi). Iz otopina polimera i lijeka pripravljena je smjesa otopina konačnog masenog udjela deksametazona od 0,135%, pektina od 0,1% i hipromeloze od 0,3% te masenog omjera deksametazona u odnosu na polimere od 1:3.

Smjesa otopina lijeka i polimera podvrgnuta je procesu sušenja raspršivanjem (Slika 9.) pomoću uređaja Büchi Mini Spray Dryer B-191 (Büchi, Flawil, Švicarska) sapnice promjera 0,7 mm, čime su pripravljene mikrosfere s deksametazonom (MD).



**Slika 9.** Shema procesa sušenja raspršivanjem (prilagođeno prema [135] uz suglasnost izdavača - u Prilogu)

Parametri sušenja raspršivanjem iznosili su kako slijedi: ulazna temperatura 140°C, izlazna temperatura 79°C, protok komprimiranog zraka 650 NI/h, kapacitet aspiratora 50% te brzina protoka otopine 3,5 g/min. Iskorištenje procesa izračunato je prema sljedećoj formuli:

$$I (\%) = \frac{\text{masa dobivenih mikrosfera (mg)}}{\text{masa suhe tvari u otopini za sušenje (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

Masa suhe tvari u otopini za sušenje izračunata je iz masenih udjela (*m/m*) deksametazona, pektina i hipromeloze, te mase pripremljene vodene otopine koja je podvrgnuta procesu sušenja raspršivanjem.

### 3.2.2. Određivanje raspodjele veličina mikrosfera s deksametazonom

Raspodjela veličina mikrosfera određena je metodom laserske difrakcije pomoću uređaja Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd, Velika Britanija), s lećom žarišne duljine 300 mm, dostupnog u tvrtki Jadran-galenski laboratorij d.d. Uređaj je opremljen ćelijom za uzorak Hydro MV s magnetskim mješačem. Za pripremu uzorka 5 mg mikrosfera dispergirano je soniciranjem u približno 10 ml 96%-tnog etanola do nastanka homogene suspenzije.

Prije početka mjerenja napravljeno je pozadinsko očitavanje, a uzorci su ekvilibrirani 10 s. Zatim su uzorci suspenzije mikrosfera dodavani u Hydro MV ćeliju sve do zatamnjenja (opskuracije) od 10-30%. Suspenzija mikrosfera analizirana je u triplikatu. Rezultati su izraženi volumnim promjerima  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$ .

### 3.2.3. Određivanje uspješnosti uklapanja i sadržaja lijeka u mikrosferama

Mikrosfere (20 mg) dispergirane su u 50 ml pročišćene vode. Disperzija je miješana na magnetnoj miješalici tijekom 24 h, te je nakon filtriranja (0,22 µm, Chromafil, Macherey-Nagel GmbH&Co, Njemačka) razrijeđena pročišćenom vodom u omjeru 1:4 (V/V). Analiza sadržaja deksametazona provedena je pomoću UV-Vis spektrofotometra (UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Probe, Varian, SAD) pri valnoj duljini od 241 nm. Postupak je za svaki uzorak proveden u triplikatu.

Koncentracije su izračunate prema prethodno izrađenom baždarnom pravcu s jednadžbom  $A = 0,029 \times C$  [136]. Preliminarnim ispitivanjima utvrđeno je da prisutnost otopljenih polimera u mjerenom uzorku ne utječe na apsorbanciju deksametazona pri navedenoj valnoj duljini.

Iz dobivenih rezultata izračunati su uspješnost uklapanja lijeka (engl. *entrapment efficiency*, EE) te sadržaj lijeka u mikrosferama (engl. *drug loading*, DL) prema sljedećim formulama:

$$EE (\%) = \frac{\text{stvarni sadržaj lijeka (mg)}}{\text{teorijski sadržaj lijeka (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

$$DL (\%) = \frac{\text{masa lijeka u mikrosferama (mg)}}{\text{ispitivana masa mikrosfera (mg)}} \times 100 \quad (3)$$

### 3.2.4. Priprema praškastih sustava mikrosfera i inertnog nosača

Prašci korišteni u ovom radu pripremljeni su miješanjem MD mikrosfera i različitih nosača u masenom omjeru 1:9. Kao nosači korišteni su: sorbitol (S), manitol (M), laktoza monohidrat Lactochem® Powder (LP), laktoza monohidrat Lactochem® Extra Fine Powder (LEFP), laktoza monohidrat GranuLac® 200 (GL), magnezijev stearat (MS) i kalcijev karbonat (C). Budući da su korištene tri vrste laktoze monohidrata dobivene postupkom mljevenja, svojstva deklarirana od strane proizvođača tih prašaka prikazani su u Tablici 7.

**Tablica 7. Svojstva prašaka laktoze monohidrata koji su korišteni kao nosači mikrosfera**

Naziv praška	Carrov indeks (%)	Hausnerov omjer	$d_{10\%}$ / $\mu\text{m}$	$d_{50\%}$ / $\mu\text{m}$	$d_{90\%}$ / $\mu\text{m}$
Granulac <sup>®</sup> 200 [137]	35,37	1,55	≈3	20-30	≈100
Lactochem <sup>®</sup> Powder [138]	34,71	1,53	6	50	140
Lactochem <sup>®</sup> Extra Fine Powder [139]	37,97	1,61	3	20	50

Nosači su prije miješanja prosijani pomoću laboratorijskog vibracijskog sita (Vibratory Sieve Shaker AS 200, Retsch<sup>®</sup>, Njemačka). Prosijavanje je provedeno pri amplitudi od 50% u trajanju od 10 minuta [47], a prosijana frakcija zaostala između sita promjera otvora 45  $\mu\text{m}$  i 63  $\mu\text{m}$  korištena je u daljnjim eksperimentima. MD mikrosfere i pojedini prosijani nosač miješani su u masenom omjeru 1:9 pomoću miješalice MX-S vortex mixer (DLAB Scientific Co. Ltd., Kina) pri 1250 okretaja/min tijekom 10 minuta u kiveti volumena 50 ml (Falcon<sup>®</sup>, Corning Inc, SAD). Nakon toga, prašci su prebačeni u kivete od 1,5 ml (Eppendorf, Njemačka) te promiješani pomoću miješalice MX-S vortex mixer (DLAB Scientific Co.,Ltd., Kina) još dvije minute. Literaturni podatci o gustoći tvari koje su u ovom radu korištene kao nosači MD mikrosfera prikazani su u Tablici 8.

**Tablica 8. Literaturni podatci o gustoći tvari koje su u ovom radu korištene kao nosači MD mikrosfera (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 8th ed., 2017, [140]).**

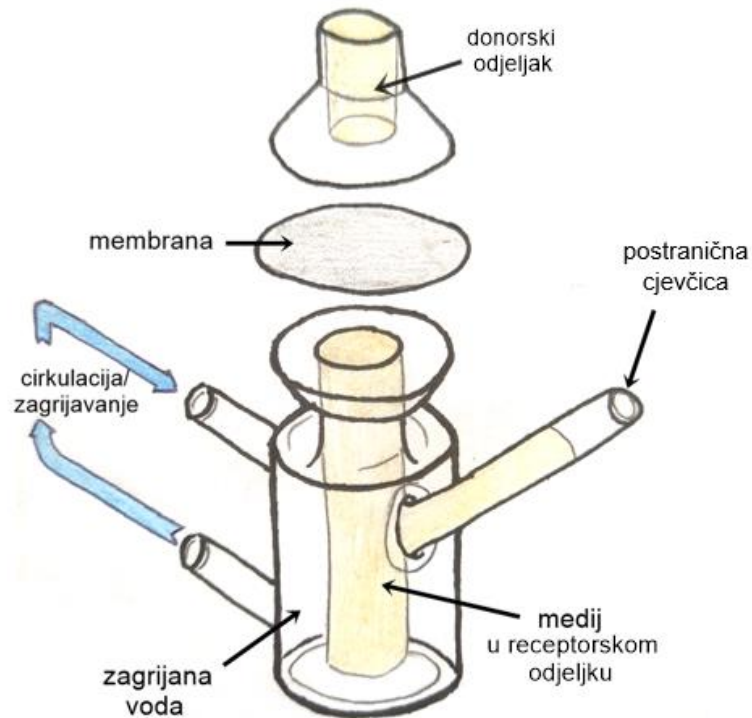
Vrsta praška nosača	Laktoza monohidrat	Sorbitol	Manitol	Magnezijev stearat	Kalcijev karbonat
Gustoća praška ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	1,545	1,507	1,514	1,092	2,7 – 2,95 [141]

### **3.2.5. Ispitivanje homogenosti praškastih sustava**

Homogenost praškastih sustava pripremljenih miješanjem MD mikrosfera s inertnim nosačima određena je netom nakon pripreme istih, prilagodbom metode Lee i sur., 2018 [72]. Uzorak praška uzet je s vrha, sredine i dna kivete. Uzorci su preneseni u vijalu te dispergirani u 10 ml pročišćene vode. Pripravljene disperzije miješane su na magnetskoj miješalici tijekom 24 sata. Analiza sadržaja deksametazona u uzorcima provedena je nakon filtriranja kroz filter pora 0,22  $\mu\text{m}$  (Chromafil, Macherey-Nagel GmbH&Co, Njemačka) spektrofotometrijskom metodom opisanom u poglavlju 3.2.3. Za svaki praškasti sustav izračunate su: (i) srednja vrijednost postotnog omjera eksperimentalno određene i teorijske mase deksametazona u uzetim uzorcima, te (ii) relativna standardna devijacija (RSD). Za svaki prašak postupak je proveden u duplikatu.

### **3.2.6. Ispitivanje bubrenja praškastih sustava**

Svojstvo bubrenja praškastih sustava ispitano je volumetrijskom metodom pomoću Franzove difuzijske ćelije (PermeGear, SAD; Slika 10.) prema postupku Nižić i sur. (2020) [47]. Na membranu od regenerirane celuloze promjera pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka) ravnomjerno je nanoseno 10 mg praška. Receptorski odjeljak napunjen je pročišćenom vodom ili SNF-om termostatiranim pri 34°C. Membrana s praškastim uzorkom postavljena je između donorskog i receptorskog odjeljka te dovedena u doticaj s medijem za bubrenje. U vremenskim intervalima od 3 minute provjeravana je razina medija u postraničnoj cjevčici. Zbog bubrenja mikrosfera razina medija u postraničnoj cjevčici se snižavala te se po potrebi isti dodavao do početne razine pomoću graduirane štrcaljke (Hamilton, Švicarska). Ispitivanje bubrenja u trajanju od 15 minuta provedeno je za svaki prašak u duplikatu, a svojstvo bubrenja iskazano je kao volumen medija apsorbiran po miligramu mikrosfera u praškastom sustavu.



**Slika 10.** *Franzova difuzijska ćelija*

### 3.2.7. Određivanje svojstava tečenja praškastih sustava

Svojstva tečenja prašaka određena su indirektnom metodom, mjerenjem nasipne gustoće ( $\rho_{\text{bulk}}$ ) i gustoće nakon potresivanja ( $\rho_{\text{tapped}}$ ), iz kojih je potom izračunat Carrov indeks (indeks kompresibilnosti) i Hausnerov omjer. Mjerenje je provedeno modifikacijom postupka Duvnjak Romić i sur. (2016) [142]. Količina od 50 mg pripremljenog praška prenesena je u začepljenu plastičnu štrcaljku od 1 ml (Medispo®, HBM Group, SAD) te je zabilježen volumen. Parafilmom zatvorena štrcaljka zatim je protresivana dok volumen između dva protresivanja nije bio konstantan.



Nasipna gustoća i gustoća nakon potresivanja određene su omjerom mase praška u štrcaljki i volumena praška, redom prije i nakon potresivanja. Za svaki prašak postupak je rađen u triplikatu. Iz dobivenih vrijednosti izračunat je Carrov indeks i Hausnerov omjer prema sljedećim jednadžbama iz Europske farmakopeje 8.0 [143]:

$$\text{Carrov indeks (\%)} = \frac{\rho_{\text{tapped}} - \rho_{\text{bulk}}}{\rho_{\text{tapped}}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Hausnerov omjer} = \frac{\rho_{\text{tapped}}}{\rho_{\text{bulk}}} \quad (5)$$

$\rho_{\text{bulk}}$  -gustoća prije potresivanja,  $\rho_{\text{tapped}}$  -gustoća nakon potresivanja

### 3.2.8. Određivanje kuta raspršenja praškastih sustava

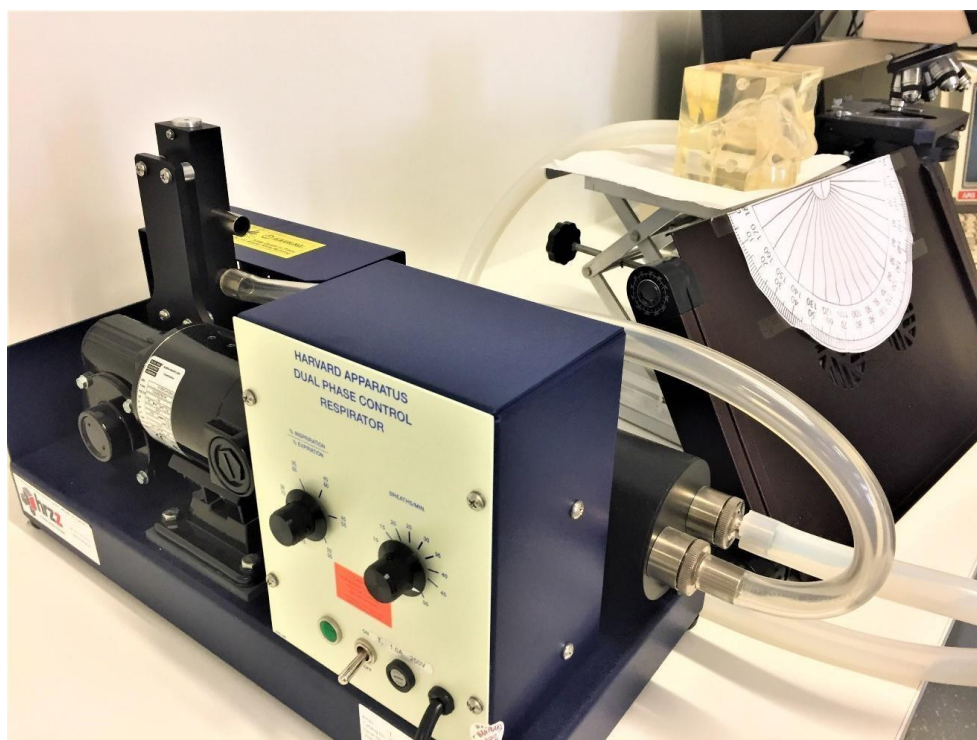
Raspršivanje praškastih uzoraka provedeno je pomoću jednodoznog nazalnog insuflatora (MIAT® S. p. A, Italija). U kapsulu od hipromeloze (Vcaps® Plus, veličina 3; ljubaznošću donirano od Capsugel, Lonza, Švicarska) odvagano je 15 mg praškastog sustava te je tako napunjena kapsula stavljena u jednodozni nazalni insuflator MIAT® (Slika 7A). Nakon bušenja kapsule s praškom, mehaničkim stiskom gumenog dijela generira se protok zraka potreban za raspršivanje praška. Za svaki praškasti uzorak određen je kut raspršenja pomoću virtualnog kutomjera (Protractor, Chrome Plugin) iz fotografija raspršivanja praška ispred tamne podloge. Svako mjerenje provedeno je u triplikatu.

### 3.2.9. Određivanje profila depozicije praškastih sustava u modelu nosne šupljine

Praškesti uzorci primijenjeni su u model nosne šupljine pomoću jednodoznog nazalnog insuflatora (MIAT® S. p. A, Italija). Količina od 15 mg praškastog sustava odvagana je u kapsulu od hipromeloze. Kapsula je umetnuta u jednodozni nazalni insuflator MIAT®. Nakon bušenja kapsule s praškom, mehaničkim stiskom gumenog dijela generiran je protok zraka potreban za raspršivanje praška.

Određivanje profila nazalne depozicije praškastih uzoraka provedeno je pomoću transparentnog silikonskog modela nosne šupljine (Koken Co. Ltd., Japan), postavljenog na stalak i spojenog s respiratornom pumpom (Respiratory Pump Model 613, Harvard Apparatus, SAD; Slika 11.).

Prašasti uzorci primijenjeni su pri kutu od  $0^\circ$  u odnosu na vertikalnu te pri kutovima od  $45^\circ$  ili  $60^\circ$  u odnosu na horizontalnu ravninu. Simulacija udaha postignuta je sljedećim parametrima definiranim respiratornom pumpom: volumen udahnutog zraka 700 ml, omjer trajanja udaha i izdaha 40:60 te protok zraka od 20 l/min (predstavlja umjereni udah). Ispitivanje je provedeno i pri protoku zraka od 0 l/min (predstavlja zadržavanje daha). Pri simulaciji zadržavanja daha, parafilmom je obložen otvor u nazofaringealnom području kako bi se sakupile tu odložene čestice. Sva mjerenja provedena su u duplikatu.

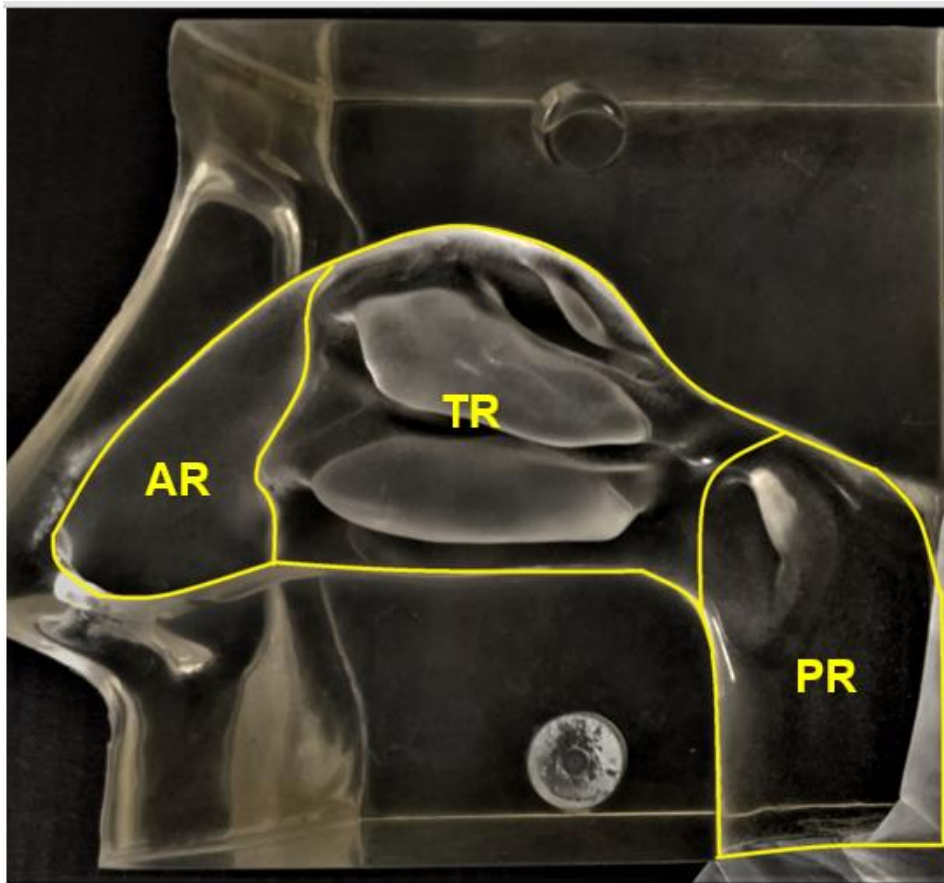


**Slika 11.** Jedinica za određivanje profila nazalne depozicije praškastih sustava

Za potrebe kvalitativnog procjenjivanja nazalne depozicije praška, model nosne šupljine fotografiran je ispred tamne podloge.

S ciljem određivanja količine deksametazona u pojedinoj regiji nosne šupljine, nakon primjene praška, svaka od regija (anteriorna (AR), posteriorna (PR), turbinatna (TR) te septum i parafilm (O)) kvantitativno je isprana pročišćenom vodom. Regije unutar modela nosne šupljine prikazane su na Slici 12. Sakupljeni eluati miješani su na magnetskoj miješalici dva sata kako bi se omogućilo potpuno oslobađanje deksametazona iz mikrosfera.

Uzorci su potom filtrirani kroz filter promjera pora  $0,22 \mu\text{m}$  (Chromafil, Macherey-Nagel GmbH&Co, Njemačka) i analizirani spektrofotometrijski pomoću UV-Vis spektrofotometra metodom opisanom u poglavlju 3.2.3.



**Slika 12.** Anteriorna (AR), turbinatna (TR) i posteriorna (PR) regija nosne šupljine

### **3.2.10. Određivanje isporučene mase praškastih sustava**

Nakon raspršivanja praškastog sustava u model nosne šupljine pri ispitivanju depozicije, određena je masa praška zaostala u kapsuli. Zaostala masa određena je kao razlika mase napunjene kapsule i mase kapsule nakon raspršivanja. Rezultati su bilježeni pri kutu primjene od 45° i 60° u odnosu na horizontalnu ravninu, te brzini protoka zraka od 0 l/min i 20 l/min, u kvadriplikatu.

### **3.2.11. Statistička analiza rezultata**

Ispitivanje povezanosti promatranih parametara provedeno je određivanjem Pearsonovog (parametarskog) koeficijenta korelacije korištenjem statističkog softvera JMP 14.0 (JMP®, Version 14.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2007). Vrijednost  $\alpha = 0,05$  uzeta je kao razina statističke značajnosti.

## 4. Rezultati

### 4.1. Priprava i karakterizacija mikrosfera s deksametazonom

Mikrosfere MD uspješno su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem otopine deksametazona, pektina i hipromeloze. Proces sušenja proveden je pri sljedećim parametrima: ulazna temperatura 140°C, izlazna temperatura 79°C, protok komprimiranog zraka 650 NI/h, kapacitet aspiratora 50% te protok otopine 3,5 g/min. Iskorištenje procesa iznosilo je  $50,3 \pm 2,0\%$ .

Mikrosfere su karakterizirane s obzirom na raspodjelu veličina čestica, uspješnost uklapanja i sadržaj deksametazona.

Raspodjela veličina čestica izražena je volumnim promjerima  $D_v10$ ,  $D_v50$  i  $D_v90$  koji redom iznose  $1,58 \pm 0,00 \mu\text{m}$ ,  $2,69 \pm 0,01 \mu\text{m}$  te  $6,79 \pm 0,37 \mu\text{m}$ . Postupkom sušenja raspršivanjem pri opisanim uvjetima postignuta je uspješnost uklapanja lijeka od  $95,4 \pm 0,8\%$ . Sadržaj lijeka u mikrosferama iznosio je  $23,7 \pm 0,3\%$ .

### 4.2. Homogenost praškastih sustava mikrosfera i inertnog nosača

Procjena učinkovitosti miješanja MD mikrosfera s inertnim nosačem provedena je ispitivanjem homogenosti pripremljenih praškastih sustava. Za svaki praškasti sustav uzet je uzorak s vrha, sredine i dna kivete te je u uzetim uzorcima određen sadržaj lijeka. Homogenost svakog od praškastih sustava MD mikrosfera i inertnog nosača izražena je kao srednja vrijednost postotnog omjera eksperimentalno određene i teorijske mase deksametazona u uzetim uzorcima (% D) uz prikaz relativne standardne devijacije (RSD) (Tablica 9.). Praškasti sustav zadovoljavajućeg stupnja homogenosti karakteriziran je srednjom vrijednošću postotnog omjera eksperimentalno određene i teorijske mase deksametazona u uzetim uzorcima (s vrha sredine i dna kivete) unutar raspona  $100 \pm 5,5\%$ , uz RSD vrijednost  $\leq 5,5\%$  [72], [144]. Zaključno, praškasti sustavi MD mikrosfera i inertnog nosača uspješno su pripremljeni, uz iznimku praška MD-LEFP kod kojeg je zabilježena %D vrijednost od 94,6% uz RSD vrijednost od 7,5%.

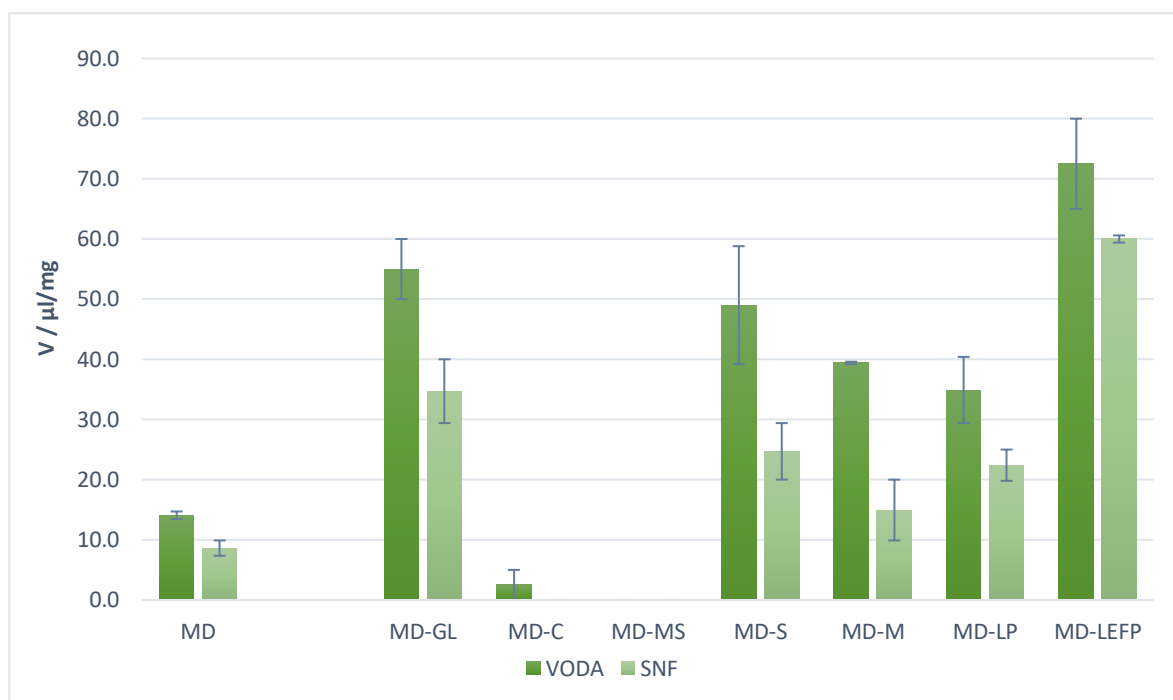
**Tablica 9.** Homogenost praškastih sustava MD mikrosfera i inertnog nosača izražena kao srednja vrijednost postotnog omjera eksperimentalno određene i teorijske mase deksametazona u uzetim uzorcima (% D) uz prikaz relativne standardne devijacije RSD (n=6).

Prašak	MD-GL	MD-C	MD-MS	MD-S	MD-M	MD-LP	MD-LEFP
% D	97,4	101,1	102,8	102,7	101,6	95,7	94,6
RSD (%)	4,3	2,2	3,8	1,5	5,5	5,5	7,5

MD - mikrosfere s deksametazonom; GL - laktoza monohidrat GranuLac® 200; C – kalcijev karbonat; MS – magnezijev stearat; S – sorbitol; M – manitol; LP - laktoza monohidrat Lactochem® Powder; LEFP - laktoza monohidrat Lactochem® Extra Fine Powder

### 4.3. Svojstva bubrenja praškastih sustava

Bubrenje MD mikrosfera i praškastih sustava MD mikrosfera i inertnog nosača ispitano je indirektnom volumetrijskom metodom korištenjem Franzove difuzijske ćelije. Ispitivanje za svaki prašak provedeno je u dva medija, pročišćenoj vodi i SNF-u. Svojstvo bubrenja izraženo je volumenom apsorbiranog medija po miligramu mikrosfera prisutnih u ispitivanom prašku. Rezultati bubrenja praškastih sustava prikazani su na Slici 13. Same MD mikrosfere su u procesu bubrenja apsorbirale  $14,1 \pm 0,6$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  pročišćene vode te  $8,6 \pm 1,3$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  SNF-a. Svi praškasti sustavi MD mikrosfera i nosača topljivih u vodi (M, S, GL, LP i LEFP) bubrili su u kontaktu s vodenim medijem. Za takve sustave zabilježeni su značajno veći volumeni apsorbiranog medija u odnosu na same MD mikrosfere ( $34,9\text{-}72,9$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  u pročišćenoj vodi te  $14,95\text{-}60,0$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  u SNF-u). Nadalje, jednako kao i kod samih MD mikrosfera, volumen apsorbirane pročišćene vode bio je veći od volumena apsorbiranog SNF-a. Praškasti sustavi s nosačima netopljivim u vodi (MS i C) nisu ili su vrlo oskudno bubrili u kontaktu s vodenim medijem. Zaključno, netopljivi nosači (C i MS) negativno su utjecali na svojstva bubrenja mikrosfera, dok je prisutnost topljivih i osmotski aktivnih nosača u praškastim sustavima pozitivno utjecala na volumen apsorbiranog vodenog medija u donorskom odjeljku.



**Slika 13.** Bubrenje mikrosfera s deksametazonom (MD) i praškastih sustava MD mikrosfera i nosača (GL - laktoza monohidrat GranuLac® 200; C – kalcijev karbonat; MS – magnezijev stearat; S – sorbitol; M – manitol; LP - laktoza monohidrat Lactochem® Powder; LEFP - laktoza monohidrat Lactochem® Extra Fine Powder) u pročišćenju vodi i simuliranom nazalnom fluidu (SNF-u). Bubrenje je izraženo volumenom medija (V) apsorbiranog po miligramu mikrosfera u praškastom sustavu tijekom 15-minutnog ispitivanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n=2).

#### 4.4. Svojstva tečenja praškastih sustava

Svojstva tečenja praška izražena su Carrovim indeksom i Hausnerovim omjerom koji su izračunati iz eksperimentalno utvrđenih vrijednosti nasipne gustoće praška i gustoće nakon potresivanja (Tablica 10.).

**Tablica 10.** Nasipna gustoća ( $\rho_{\text{bulk}}$ ) i gustoća nakon potresivanja ( $\rho_{\text{tapped}}$ ) te Carrov indeks i Hausnerov omjer za MD mikrosfere te praškaste sustave MD mikrosfera i inertnog nosača.

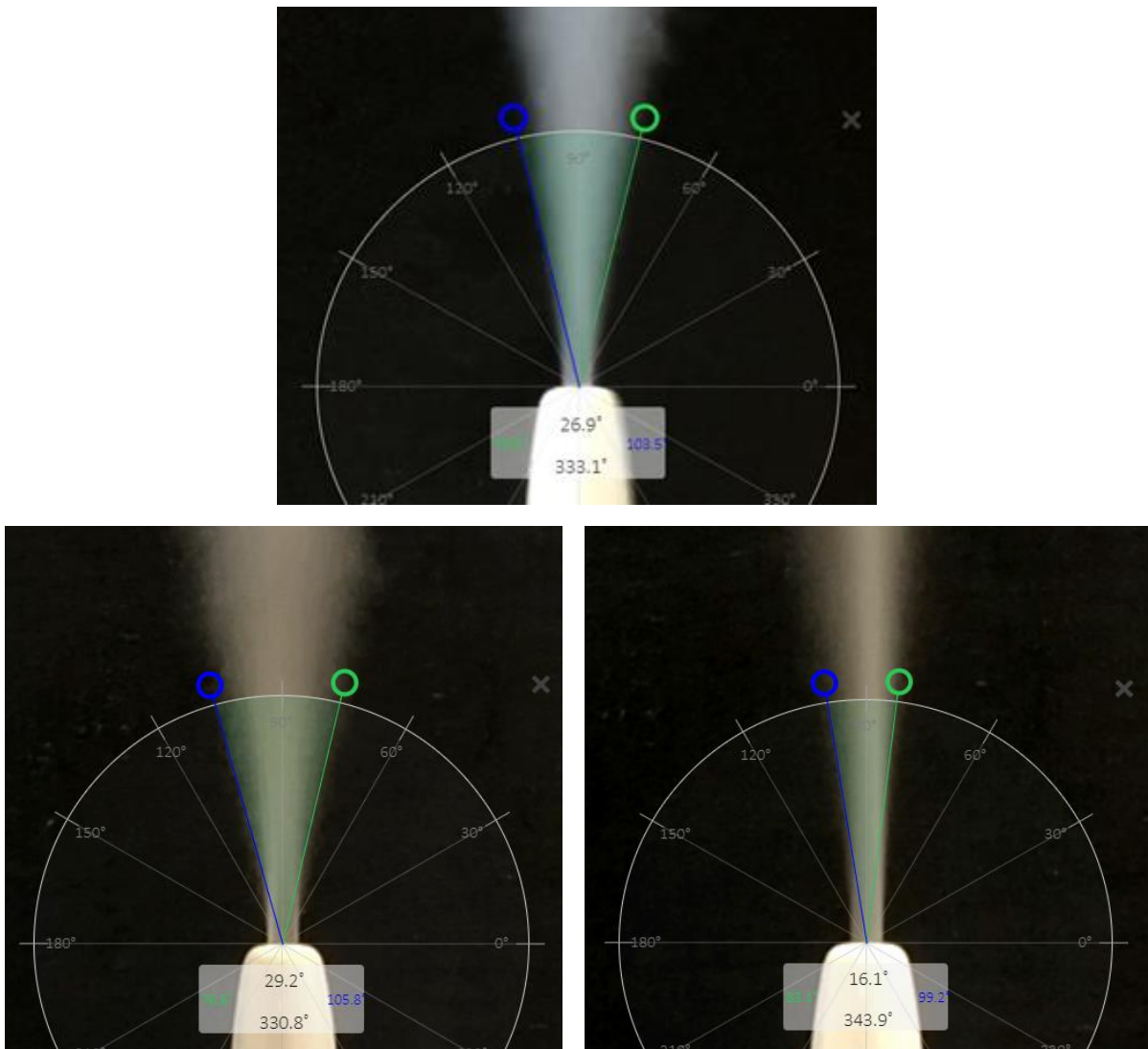
Prašak	$\rho_{\text{bulk}}$ (mg/ml)	$\rho_{\text{tapped}}$ (mg/ml)	Carrov indeks (%)	Hausnerov omjer
<b>MD</b>	113,8 ± 4,2	300,9 ± 16,4	62,14 ± 1,14	2,64 ± 0,08
<b>MD-GL</b>	526,5 ± 72,1	724,2 ± 85,3	27,42 ± 2,04	1,38 ± 0,04
<b>MD-C</b>	206,0 ± 10,4	484,8 ± 21,4	57,52 ± 0,75	2,35 ± 0,04
<b>MD-MS</b>	165,1 ± 6,7	416,7 ± 0,0	60,37 ± 1,61	2,53 ± 0,10
<b>MD-S</b>	306,4 ± 8,7	500,0 ± 0,0	38,73 ± 1,73	1,63 ± 0,05
<b>MD-M</b>	375,5 ± 13,0	714,3 ± 0,0	47,44 ± 1,81	1,90 ± 0,07
<b>MD-LP</b>	334,3 ± 18,2	684,5 ± 42,1	51,11 ± 1,57	2,05 ± 0,07
<b>MD-LEFP</b>	266,4 ± 28,5	568,2 ± 80,4	52,83 ± 2,27	2,13 ± 0,10

MD - mikrosfere s deksametazonom; GL - laktoza monohidrat GranuLac® 200; C – kalcijev karbonat; MS – magnezijev stearat; S – sorbitol; M – manitol; LP - laktoza monohidrat Lactochem® Powder; LEFP - laktoza monohidrat Lactochem® Extra Fine Powder  
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n=3).

Za MD mikrosfere Carrov indeks iznosio je 62,14 ± 1,14 %, a Hausnerov omjer 2,64 ± 0,08. Dodatkom nosača, poboljšana su svojstva tečenja praškastih sustava, s iznimkom MD-MS koji je pokazao slična svojstva tečenja kao i same MD mikrosfere. Vrijednost Carrovog indeksa za pripravljene praškaste sustave MD mikrosfera i nosača kretala se od 27,42 ± 2,04 % do 60,37 ± 1,61 %, a vrijednost Hausnerovog omjera od 1,38 ± 0,04 do 2,53 ± 0,10. Utjecaj nosača na svojstva tečenja rastao je u nizu MS < C < LEFP < LP < M < S < GL.

#### 4.5. Kut raspršenja praškastih sustava

Praškasti sustavi raspršivani su korištenjem jednodoznog nazalnog insufлятора MIAT®. Proces raspršivanja sniman je kamerom. Snimka je analizirana, a iz nje izdvojena slika koja prikazuje maksimalno raspršenje praška u položaju kad je potisak na gumeni balon najjači. Na slici je određen kut raspršenja pomoću virtualnog kutomjera (Slika 14.). Za svaki praškasti sustav postupak je proveden u triplicatu, a rezultati su prikazani u Tablici 11. Kut raspršenja za MD mikrosfere iznosio je 26,7 ± 1,0°. Za pripravljene praškaste sustave MD mikrosfera i različitih nosača kut raspršenja kretao se između 17,3 ± 0,9° i 28,4 ± 0,6°. Miješanje MD mikrosfera s nosačem u masenom omjeru 1:9 u svim je slučajevima, osim u slučaju nosača C, rezultiralo smanjenjem kuta raspršenja u odnosu na same MD mikrosfere.



**Slika 14.** Kut raspršenja MD mikrosfera (gore), praškastog sustava MD mikrosfera i kalcijevog karbonata (nosač C; lijevo dolje) te praškastog sustava MD mikrosfera i laktoze monohidrata Granulac® 200 (nosač GL; desno dolje).



**Tablica 11.** Kut raspršenja MD mikrosfera te praškastih sustava MD mikrosfera i različitih nosača.

Prašak	Kut raspršenja (°)
<i>MD</i>	26,7 ± 1,0
<i>MD-GL</i>	17,3 ± 0,9
<i>MD-C</i>	28,4 ± 0,6
<i>MD-MS</i>	23,9 ± 0,3
<i>MD-S</i>	20,0 ± 0,3
<i>MD-M</i>	19,6 ± 0,4
<i>MD-LP</i>	22,8 ± 1,3
<i>MD-LEFP</i>	24,2 ± 1,6

MD - mikrosfere s deksametazonom; GL - laktoza monohidrat GranuLac® 200; C – kalcijev karbonat; MS – magnezijev stearat; S – sorbitol; M – manitol; LP - laktoza monohidrat Lactochem® Powder; LEFP - laktoza monohidrat Lactochem® Extra Fine Powder  
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n=3).

Temeljem provedene karakterizacije praškastih sustava MD mikrosfera i inertnih nosača koja je uključivala određivanje homogenosti prašaka, bubrenja, reoloških svojstava i kuta raspršenja, za daljnja ispitivanja profila depozicije i mase isporučenog praška odabrani su praškasti sustavi MD mikrosfera s laktozom monohidrat GranuLac® 200 (MD-GL), kalcijevim karbonatom (MD-C), magnezijevim stearatom (MD-MS), sorbitolom (MD-S) i manitolom (MD-M).

#### 4.6. Profil depozicije praškastih sustava u modelu nosne šupljine

Profili depozicije MD mikrosfera i praškastih sustava MD mikrosfera i nosača u modelu nosne šupljine određeni su nakon primjene insuflatorom MIAT® pri horizontalnom kutu od 45° i 60° te protoku zraka kroz nosnu šuplinu od 0 l/min (simulacija zadržavanja daha) i 20 l/min (simulacija umjerenog daha).

Kvalitativna (vizualna) procjena profila depozicije provedena je temeljem fotografija silikonskog modela iznad tamne podloge, a kvantitativna procjena određivanjem količine deksametazona u pojedinoj regiji nosne šupljine. Za ocjenu uspješnosti nazalne isporuke praškastog sustava kao glavni kriterij uzet je postotni udio doze deksametazona dostavljen u turbinatnu regiju (Tablica 12.).

**Tablica 12.** Postotni udio doze deksametazona dostavljen u turbinatnu regiju (TR) modela nosne šupljine nakon primjene MD mikrosfera te praškastih sustava MD mikrosfera i inertnog nosača jednodoznim nazalnim insuflatorom MIAT®, pri horizontalnom kutu od 45° ili 60° i protoku zraka kroz nosnu šupljinu od 0 l/min ili 20 l/min.

Prašak	Udio doze deksametazona u TR (%)			
	60° / 0 l/min	60° / 20 l/min	45° / 0 l/min	45° / 20 l/min
<b>MD</b>	27,1 ± 1,3	26,4 ± 3,5	30,9 ± 1,5	25,8 ± 3,6
<b>MD-GL</b>	42,0 ± 3,1	23,9 ± 0,9	39,6 ± 4,6	23,5 ± 5,0
<b>MD-C</b>	42,9 ± 5,5	33,7 ± 1,5	39,2 ± 5,8	38,0 ± 2,9
<b>MD-MS</b>	47,9 ± 4,6	31,7 ± 0,2	35,6 ± 0,9	31,9 ± 2,7
<b>MD-S</b>	40,9 ± 0,9	40,3 ± 5,6	33,9 ± 2,4	30,9 ± 2,9
<b>MD-M</b>	40,5 ± 3,5	34,7 ± 5,3	44,3 ± 1,3	31,3 ± 1,2

MD - mikrosfere s deksametazonom; GL - laktoza monohidrat GranuLac® 200; C – kalcijev karbonat; MS – magnezijev stearat; S – sorbitol; M – manitol.

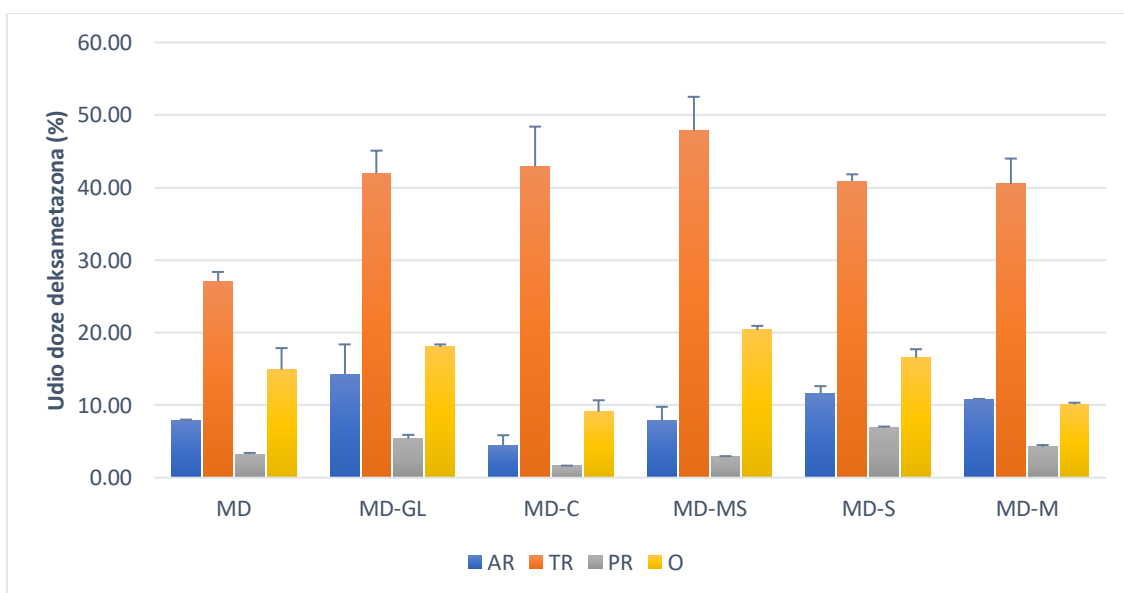
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n=2).

Udio doze deksametazona dostavljen u turbinatnu regiju kretao se između  $23,9 \pm 0,9$  % i  $47,9 \pm 4,6$ %. Za sve ispitivane praške i oba kuta primjene, simulacija umjerenog udaha (protok zraka od 20 l/min) rezultirala je smanjenjem depozicije lijeka u turbinatnoj regiji u odnosu na simulaciju zadržavanja daha (protok zraka od 0 l/min), a posebno je taj utjecaj vidljiv za praškasti sustav MD-GL. Smanjenje turbinatne depozicije lijeka sa smanjenjem kuta primjene uočeno je za praškasti sustav MD-S pri oba protoka zraka, te za MD-MS, pri protoku zraka od 0 l/min.

Svi ispitivani praškasti sustavi MD mikrosfera i nosača osigurali su učinkovitiju dostavu lijeka u turbinatnu regiju u odnosu na same MD mikrosfere (Tablica 12.). Iznimka je primjena MD-GL praškastog sustava uz simulaciju udaha (protok zraka od 20 l/min) pri kojoj se postotni udio lijeka dostavljen u turbinatnu regiju nije značajno razlikovao od onog pri primjeni samih MD mikrosfera pod istim uvjetima.

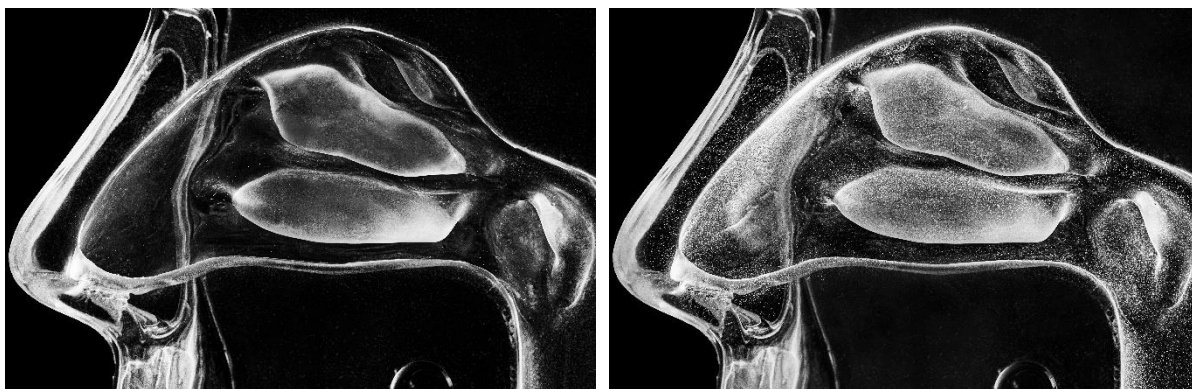
Najučinkovitija dostava lijeka u turbinatnu regiju ( $40,9 \pm 0,9$ % do  $47,9 \pm 4,6$ %) za četiri od pet tipova nosača MD mikrosfera (iznimka je manitol) postignuta je pri horizontalnom kutu primjene od 60° i protoku zraka kroz nosnu šupljinu od 0 l/min, te su navedeni parametri primjene prepoznati kao parametri izbora za razvijene praškaste sustave.

Uz udio doze deksametazona u turbinatnoj regiji, na Slici 15. prikazani su i udjeli doze deksametazona u anteriornoj i posteriornoj regiji nosne šupljine te na septumu i parafilmu (kojim je bio obložen otvor u nazofaringealnom području), dajući uvid u ukupni profil depozicije lijeka u nosnoj šupljini pri navedenim parametrima primjene. Razvidno je da je kod svih ispitivanih prašaka najveći udio doze deksametazona dostavljen u turbinatnu regiju. Slijedi područje koje obuhvaća septum i parafilmu, zatim anteriorna regija, a najmanji je udio doze deksametazona dostavljen u posteriornu regiju nosne šupljine. Generalno, nije uočena značajnija razlika u profilima depozicije deksametazona ovisno o tipu nosača MD mikrosfera pri navedenim uvjetima primjene. Na Slici 16. prikazani su korišteni model nosne šupljine i profil depozicije praškastog sustava MD-GL u modelu nosne šupljine, kao reprezentativni kvalitativni prikaz raspodjele praškastih sustava MD mikrosfera i inertnog nosača primijenjenih pri horizontalnom kutu od 60° i simulaciji zadržavanja daha.



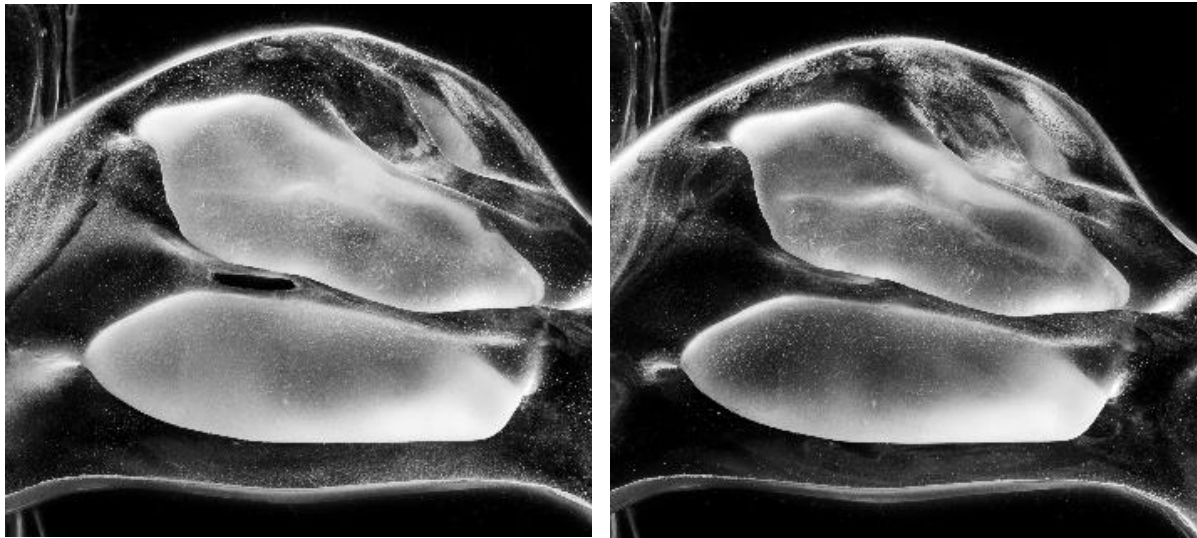
**Slika 15.** Postotni udio doze deksametazona dostavljen u pojedine regije modela nosne šupljine nakon primjene MD mikrosfera te praškastih sustava MD mikrosfera i inertnog nosača jednodoznim nazalnim insuflatorom MIAT, pri horizontalnom kutu od 60° i protoku zraka kroz nosnu šupljinu od 0 l/min. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2).

(MD – mikrosfere s deksametazonom; GL - laktoza monohidrat GranuLac® 200; C – kalcijev karbonat; MS – magnezijev stearat; S – sorbitol; M – manitol; AR – anteriorna regija; TR – turbinatna regija; PR – posteriorna regija; O – ostalo)



**Slika 16.** Silikonski model nosne šupljine (lijevo) i profil depozicije praškastog sustava MD mikrosfera i inertnog nosača laktoza monohidrat GranuLac® 200 (MD-GL) u masenom omjeru 1:9 (*m/m*) nakon primjene jednodoznim nazalnim insuflatorom MIAT®, pri horizontalnom kutu od 60° i protoku zraka kroz nosnu šupljinu od 0 l/min (desno)

Kvalitativnom (vizualnom) procjenom depozicije praškastih sustava MD mikrosfera i inertnih nosača u modelu nosne šupljine provedena je usporedba profila depozicije unutar same turbinatne regije pri različitim parametrima primjene. Smanjenje kuta primjene je uzrokovalo povećanu depoziciju u područjima donje nosne školjke i donjeg nosnog hodnika u odnosu na profil depozicije pri primjeni praškastog sustava pod kutom od 60°. Također, pri kutu primjene od 45° i brzini protoka zraka od 20 l/min uočena je veća depozicija u području gornje nosne školjke i gornjeg nosnog hodnika, a smanjena u području donjeg nosnog hodnika, u odnosu na primjenu praškastog sustava uz simulaciju zadržavanja daha (brzina protoka zraka od 0 l/min; Slika 17.). Na istoj slici razvidno je smanjenje depozicije lijeka u turbinatnoj regiji pri simulaciji umjerenog udaha (20 l/min) u odnosu na simulaciju zadržavanja daha (protok zraka od 0 l/min).



**Slika 17.** Profil depozicije praškastog sustava MD mikrosfera i inertnog nosača laktoza monohidrat GranuLac® 200 (MD-GL) u masenom omjeru 1:9 (*m/m*) u turbinatnoj regiji silikonskog modela nosne šupljine nakon primjene jednodoznim nazalnim insuflatorom MIAT®, pri horizontalnom kutu od 45° i protoku zraka kroz nosnu šupljinu od 0 l/min (lijevo) i pri horizontalnom kutu od 45° i protoku zraka kroz nosnu šupljinu od 20 l/min (desno).

#### 4.7. Isporučena masa praškastih sustava

Isporučena masa praškastog sustava određena je iz razlike mase napunjene kapsule i mase kapsule nakon raspršivanja praškastog sustava u model nosne šupljine insuflatorom MIAT®, pri horizontalnom kutu od 45° i 60° te protoku zraka kroz nosnu šupljinu od 0 l/min (simulacija zadržavanja daha) i 20 l/min (simulacija umjerenog udaha). Isporučena masa izražena je kao postotni udio mase praška odvagnute u kapsulu, prije raspršivanja (15 mg). Vrijednosti isporučene mase praškastog sustava pri svim ispitivanim parametrima primjene prikazane su u Tablici 13. Miješanje MD mikrosfera s inertnim nosačem (osim u slučaju kalcijevog karbonata) rezultiralo je učinkovitijom isporukom raspršivanjem insuflatorom MIAT® u odnosu na same MD mikrosfere, pri čemu je isporučeno više od 90% mase praškastog sustava napunjenog u kapsulu (iznimno, raspršivanjem MD-MS pri 60° / 20 l/min isporučeno je  $89,3 \pm 0,7\%$  mase praška). Praškasti sustav MD mikrosfera i kalcijevog karbonata (MD-C) karakteriziran je manje učinkovitom isporukom raspršivanjem ( $71,7 \pm 7,0\%$  do  $81,3 \pm 8,7\%$ ) u odnosu na same MD mikrosfere ( $83,3 \pm 1,3\%$  do  $91,2 \pm 1,3\%$ ). Vrlo visoka učinkovitost isporuke praškastog sustava ( $97,2 \pm 2,0\%$  do  $99,2 \pm 0,7\%$ ) zabilježena je za nosače GL (pri 60°/0 l/min), M i S. Najmanja varijabilnost isporučene doze istog praškastog sustava pri različitim parametrima primjene uočena je za MD-M i MD-S.

**Tablica 13.** Isporučena masa MD mikrosfera te praškastih sustava MD mikrosfera i inertnog nosača raspršivanjem u model nosne šupljine pomoću jednodoznog nazalnog insuflatora MIAT<sup>®</sup>, pri horizontalnom kutu od 45° ili 60° i protoku zraka kroz nosnu šupljinu od 0 l/min ili 20 l/min. Isporučena masa izražena je kao postotni udio mase praška odvagnute u kapsulu, prije raspršivanja.

Prašak	Isporučena masa praška (%)			
	60° / 0 l/min	60° / 20 l/min	45° / 0 l/min	45° / 20 l/min
<b>MD</b>	91,2 ± 1,3	83,7 ± 0,3	87,3 ± 1,3	83,3 ± 1,3
<b>MD-GL</b>	97,2 ± 2,0	93,5 ± 2,6	95,8 ± 1,6	90,8 ± 1,0
<b>MD-C</b>	81,3 ± 8,7	75,7 ± 4,3	71,7 ± 7,0	80,7 ± 0,0
<b>MD-MS</b>	91,8 ± 6,1	89,3 ± 0,7	94,0 ± 0,7	91,3 ± 2,0
<b>MD-S</b>	99,2 ± 0,7	98,8 ± 1,7	99,2 ± 0,7	98,8 ± 1,4
<b>MD-M</b>	99,0 ± 0,8	96,7 ± 4,0	99,2 ± 0,7	98,5 ± 1,0

MD - mikrosfere s deksametazonom; GL - laktoza monohidrat GranuLac<sup>®</sup> 200; C – kalcijev karbonat; MS – magnezijev stearat; S – sorbitol; M – manitol.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n=4).

Ukupni prinos pri raspršivanju praškastog sustava u model nosne šupljine podrazumijeva zbroj količine deksametazona koja je dostavljena/detektirana u nosnoj šupljini i količine deksametazona zaostalog u kapsuli nakon raspršivanja, izražen kao postotni udio cjelovite doze deksametazona. Vrijednosti ukupnog prinosa pri raspršivanju ispitivanih praškastih sustava prikazane su u Tablici 14.

Ukupni prinos kretao se u rasponu od 42,8 ± 3,84 do 87,3 ± 1,0% i rezultat je kombiniranog učinka vrste nosača i parametara primjene. Ipak, za sve praškaste sustave uočeno je smanjenje ukupnog prinosa pri raspršivanju praškastih sustava u model nosne šupljine uz protok zraka od 20 l/min u odnosu na ukupni prinos pri raspršivanju istih sustava uz protok zraka od 0 l/min (simulacija zadržavanja daha).

**Tablica 14.** Ukupni prinos pri raspršivanju MD mikrosfera te praškastih sustava MD mikrosfera i inertnog nosača u model nosne šupljine pomoću jednodoznog nazalnog insuflatora MIAT®, pri horizontalnom kutu od 45° ili 60° i protoku zraka kroz nosnu šupljinu od 0 l/min ili 20 l/min.

Prašak	Ukupni prinos (%)			
	60° / 0 l/min	60° / 20 l/min	45° / 0 l/min	45° / 20 l/min
<b>MD</b>	62,8±0,4	42,8±3,8	87,3±1,0	69,9±2,3
<b>MD-GL</b>	84,4±1,9	57,7±4,8	65,7±7,6	52,5±4,6
<b>MD-C</b>	83,8±8,0	76,5±5,8	84,2±2,0	75,5±2,1
<b>MD-MS</b>	83,7±7,7	67,5±1,2	85,1±3,0	69,6±0,0
<b>MD-S</b>	76,5 ± 1,0	62,0±3,9	60,9±11,4	54,5±9,5
<b>MD-M</b>	67,0±3,3	55,9±0,2	70,9±2,1	53,4±6,7

MD - mikrosfere s deksametazonom; GL - laktoza monohidrat GranuLac® 200; C – kalcijev karbonat;  
MS – magnezijev stearat; S – sorbitol; M – manitol.

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

## 5. Rasprava

### 5.1. Svojstva mikrosfera s deksametazonom

U ovom eksperimentalnom radu uspješno su pripravljene mikrosfere s uklopljenim deksametazonom (MD mikrosfere) procesom sušenja raspršivanjem. Proces sušenja raspršivanjem u širokoj je primjeni, ne samo u farmaceutskoj industriji već i u kemijskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Sam proces uključuje: atomizaciju tekuće formulacije – otopine, emulzije, ili suspenzije, sušenje zagrijanim zrakom te odvajanje čestica od struje zraka [66], [145]. Raspršena otopina, emulzija ili suspenzija suši se u struji zagrijanog zraka pri čemu otapalo isparava, a zaostaje fini prah osušenih čestica [66], [145]. Čestice praška odvajaju se od struje zraka u ciklonu te se skupljaju u posudi za sakupljanje produkta. Dobiveni praškasti sustavi kemijski i fizikalno su stabilniji od tekućih farmaceutskih oblika [135]. Na svojstva dobivenih mikrosfera, uz formulacijske parametre, utječu i procesni parametri poput veličine sapnice, tlaka na sapnici, ulazne temperature, protoka otopine te relativne vlažnosti i protoka zagrijanog zraka [68], [145].

U ovom radu vodena otopina djelatne tvari i polimera (hipromeloze i pektina) sušena je raspršivanjem. Iskorištenje procesa iznosilo je  $50,3 \pm 2,0\%$ , što predstavlja relativno visok stupanj iskorištenja u usporedbi s literaturnim podacima [66], [68], [146], [147]. Nepotpuno iskorištenje procesa posljedica je gubitka dijela čestica uslijed prijanjanja na dijelove raspršivača te gubitaka kod sakupljanja produkta, ali i gubitaka najmanjih čestica kroz ispuh uređaja za sušenje raspršivanjem [135], [148].

Pektin i hipromeloza mukoadhezivni su polimeri i pomoćne tvari u već odobrenim nazalnim pripravcima. Primjerice, pektin je gelirajuća tvar u PecFent<sup>®</sup> nazalnom terapijskom sustavu fentanila [149]. Naime, pektin stvara hidrogel iz otopine u prisutnosti kalcijevih iona koji su prirodno sadržani u nosnoj sluzi. Ionske interakcije između kalcijevih iona i funkcionalnih skupina pektinskih lanaca rezultiraju preslagivanjem u trodimenzionalnu mrežu [51], [149]. Primjer korištenja hipromeloze kao pomoćne tvari u nazalnim pripravcima je nazalni sprej azelastin hidroklorida Astelin [150]. Usto, hipromeloza se često koristi kao matriksni polimer mikrosfera zbog izraženih svojstava bubrenja u vodenom mediju [151], [152]. Matriksni sustav građen iz hipromeloze i pektina kontrolirano bubri u doticaju s nosnim fluidom uslijed umrežavanja lanaca pektina kalcijevim ionima te stvara gel koji produljuje zadržavanje lijeka na mjestu primjene [47], [146].

Raspodjela veličina MD mikrosfera određena je metodom laserske difrakcije i izražena volumnim promjerima  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$  koji redom iznose  $1,58 \pm 0,00 \mu\text{m}$ ,  $2,69 \pm 0,01 \mu\text{m}$  te  $6,79 \pm 0,37 \mu\text{m}$ . Iako su pripravljene mikrosfere manje od veličine čestica



koja odgovara nazalnoj primjeni, one zbog svoje velike ukupne površine i kohezivnih sila mogu biti podložne spontanoj aglomeraciji što može rezultirati odgovarajućom nazalnom depozicijom [66]. Međutim, kohezivne sile i stvaranje aglomerata mogu predstavljati problem u fazama mjerenja količine praška i punjenja kapsula unutar proizvodnog procesa [153], [154], što može rezultirati problemima neujednačenosti doze i nereproducibilnosti profila depozicije. Iz navedenog razloga mikrosferama se dodaju inertni praškasti nosači, čija je uloga olakšati deaglomeraciju mikrosfera, optimirati veličinu čestica te poboljšati reološka svojstva praškastog sustava [153].

Postupkom sušenja raspršivanjem pri opisanim uvjetima postignuta je uspješnost uklapanja lijeka u mikrosfere od  $95,4 \pm 0,8\%$ . S obzirom na literaturne podatke [47], [147], dobiveni rezultat predstavlja visoki stupanj uspješnosti uklapanja. Sadržaj lijeka u mikrosferama relativno je velik ( $23,7 \pm 0,3\%$ ) kada se usporedi s drugim praškastim sustavima za nazalnu primjenu deksametazona [146]. Veliki sadržaj lijeka u mikrosferama dozvoljava njihovo miješanje s inertnim praškastim nosačima s ciljem poboljšanja reoloških svojstava i nazalne depozicije praška uz istodobnu mogućnost primjene terapijske doze [47].

## 5.2. Sastav i homogenost praškastih sustava mikrosfera i inertnog nosača

Inertni nosač u svojstvu punila bitno utječe na kvalitativni i kvantitativni aspekt nazalne primjene praškastog sustava [47], [49], [50]. Usto, postoje dokazi o povoljnom učinku inertnih nosača na bioraspoloživost pojedinih lijekova [155]-[157]. Stoga je u ovom radu posebna pozornost posvećena odabiru nosača pripremljenih MD mikrosfera. Svi ispitivani nosači zadovoljavaju sljedeća dva kriterija: svrstani su na *GRAS* (engl. *Generally Recognized As Safe*) listu i postoje literaturni dokazi o sigurnosti primjene putem dišnog sustava [50], [155]-[159]. Frakcija čestica nosača koja je korištena u svim praškastim sustavima odabrana je temeljem literaturnih podataka o optimalnoj veličini čestica prašaka u pripravcima za nazalnu primjenu [49], [66] te je obuhvatila čestice u rasponu veličina od 45 do 63  $\mu\text{m}$ .

Praškesti sustavi MD mikrosfera i nosača pripremljeni su na način da su MD mikrosfere miješane s prosijanom frakcijom nosača u omjeru 1:9 (*m/m*) po uzoru na rad Nižić i sur. (2020) u kojem je pri tom masenom omjeru postignut bolji profil nazalne depozicije i učinkovitija isporuka praška u nosnu šupljinu u odnosu na omjer 1:1 (*m/m*) [47]. Odabir odgovarajućeg omjera u korist nosača važan je i kako se površina nosača ne bi prezasitila mikrosferama, a mikrosfere slabije vezale, što za posljedicu može imati njihovo odvajanje od površine nosača uslijed protoka zraka generiranog pri raspršivanju ili udahu, čime se povećava udio mikrosfera koje bi samo prošle kroz nosnu šupljinu u donje dišne putove [49].

U ovom radu provedena je metoda miješanja prašaka po uzoru na onu Nižić i sur. (2020) koji su uz identične uvjete uspješno pripravili slične praškaste sustave [47]. Mehanizam pripreme praškastih sustava fizičkim miješanjem mikrosfera i nosača zasniva se na adhezijsko-kohezijskim silama među česticama [160]. Adhezijske sile između većih i manjih čestica u smjesi prašaka jače su od gravitacijske sile zbog čega se površina čestica nosača prekriva mikrosferama koje sadrže lijek. Time se osigurava priprema homogene smjese prašaka veličine čestica prikladne za nazalnu primjenu te ujednačenost doziranja [49], [161].

Pri izradi praškastih sustava bilo je potrebno voditi računa o tome da isti osiguraju uklapanje terapijske doze lijeka (dnevna doza deksametazona iznosi 400-800  $\mu\text{g}$ ) [146] te da je masa praškastog sustava koja sadrži terapijsku dozu odgovarajuća s obzirom na količinu praška koju nosnica može zaprimiti (10-25 mg) [66], [146]. U ovom radu, količina praškastog sustava koja sadrži terapijsku dozu iznosila je 15 mg, jednako kao i u radu Nižić i sur. (2020) prema kojem je i prilagođena metoda pripreme mješavina prašaka [47]. Naime, s obzirom na uspješnost uklapanja deksametazona u MD mikrosfere ( $95,4 \pm 0,8\%$ ) i omjer MD mikrosfera i nosača (1:9, *m/m*), 15 mg mješavine prašaka sadrži  $357,7 \pm 2,9 \mu\text{g}$  lijeka stoga je tako pripremljen sustav uz prilagođen režim doziranja prikladan za osiguravanje terapijske doze lijeka.

Osnovni preduvjet za ujednačenu isporuku terapijske doze lijeka jest homogenost praškastog sustava MD mikrosfera i inertnog nosača. Kriterij homogenosti u ovom radu od posebne je važnosti s obzirom da se radi o terapijskim sustavima za dostavu izrazito male doze lijeka. Svi praškasti sustavi, osim MD-LEFP, karakterizirani su visokim stupnjem homogenosti (Tablica 9.) sa srednjom vrijednošću postotnog omjera eksperimentalno određene i teorijske mase deksametazona u uzetim uzorcima praškastog sustava (% D) unutar zadanog intervala od  $100 \pm 5,5\%$  i RSD vrijednošću manjom ili jednakom 5,5 [72], [144]. Najveći stupanj homogenosti zabilježen je za praškasti sustav MD-S (% D 102,65% i RSD 1,52%), a najveće odstupanje za MD-LEFP (RSD 7,52%).

Za daljnju procjenu terapijskog potencijala praškastih sustava MD mikrosfera i nosača, potrebno je odrediti kritične parametre koji utječu na aerosolizaciju, profil depozicije u nosnoj šupljini te ponašanje sustava pri kontaktu sa sluznicom. Zbog toga su pripremljeni praškasti sustavi podvrgnuti ispitivanjima svojstava tečenja, kuta raspršenja, bubrenja, isporučene mase praška te profila depozicije pri različitim uvjetima primjene.

### 5.3. Bubrenje praškastih sustava

Svojstvo bubrenja kritični je parametar kvalitete praškastog sustava namijenjenog za nazalnu primjenu, s obzirom da izravno utječe na vrijeme zadržavanja pripravka na mjestu primjene, kao i na profil oslobađanja lijeka uklopljenog u polimerni matriks mikrosfera. Bubrenje polimernih mikrosfera rezultira stvaranjem gela na površini sluznice koji se sporije uklanja mukocilijarnim mehanizmom čišćenja [47], [68], [146]. Bubrenje uzrokuje i reverzibilnu dehidraciju sluznice što rezultira privremenim širenjem čvrstih međustaničnih veza (engl. *tight junctions*) među epitelnim stanicama što može poboljšati permeabilnost hidrofilnih lijekova mehanizmom paracelularne apsorpcije [68], [162]. Prisustvo nosača u praškastom sustavu također može utjecati na bioraspodivnost pojedinih lijekova uslijed učinka na epitel sluznice [66], [133], [155]-[157]. Stoga je u ovom radu provedeno ispitivanje bubrenja samih MD mikrosfera, kao i praškastih sustava MD mikrosfera i nosača pripremljenih u masenom omjeru 1:9. Sposobnost bubrenja izražena je volumenom medija apsorbiranog po miligramu mikrosfera u 15-minutnom procesu bubrenja.

Same MD mikrosfere su u procesu bubrenja apsorbirale  $14,1 \pm 0,6$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  pročišćene vode te  $8,6 \pm 1,3$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  SNF-a. Bubrenje MD mikrosfera odraz je hidratacije polimernih lanaca pektina i hipromeloze. Stupanj bubrenja mikrosfera ovisi o mediju kojem su izložene, pa se tako bubrenje mikrosfera u pročišćenoj vodi razlikuje od onog u SNF-u. Razlog tome je umrežavanje lanaca pektina kalcijevim ionima prisutnim u SNF-u [47], [163]. Jurišić Dukovski i sur. (2019) pripravili su mikrosfere s deksametazonom za nazalnu primjenu korištenjem pektina u funkciji mukoadhezivnog polimera [146]. Navedene mikrosfere imale su izraženije svojstvo bubrenja u odnosu na MD mikrosfere pripravljene u ovom radu. Razlika u vrijednostima bubrenja posljedica je razlike u masenom omjeru lijeka i polimera u matriksu uspoređenih mikrosfera. MD mikrosfere značajno su većeg sadržaja lijeka (23,7%) od mikrosfera pripravljenih u radu Jurišić Dukovski i sur. (2019) [146], iz čega je razvidan i manji sadržaj polimera u matriksu mikrosfera. Također, kao što je već opisano u literaturi [47] mikrosfere građene od pektina i hipromeloze slabije bubre od pektinskih mikrosfera u pročišćenoj vodi, a bolje u SNF-u.

Dodatak topljivih osmotski aktivnih nosača u praškasti sustav za nazalnu primjenu predstavlja prednost jer se time poboljšava močenje mikrosfera u koje je uklopljen lijek te, ovisno o fizičko-kemijskim svojstvima lijeka, može pospješiti njegovo otapanje i raspoloživost na mjestu učinka [66]. Takvi nosači mogu utjecati na kinetiku bubrenja mikročestica, njihova mukoadhezivna svojstva te profil oslobađanja lijeka [47]. Očekuje se da bi učinak topljivih nosača na mukoadhezivna svojstva mikrosfera baziranih na pektinu trebao biti umjeren s obzirom na umrežavanje lanaca pektina kalcijevim ionima prisutnim u SNF-u i posljedično kontrolirano bubrenje [47], [146]. U ovom radu je u izradi praškastih sustava korišteno pet

različitih nosača topljivih u vodi (GL, LP, LEFP, S i M). Svi praškasti sustavi MD mikrosfera i nosača topljivih u vodi bubrili su u kontaktu s vodenim medijem te su zabilježeni značajno veći volumeni apsorbiranog medija (34,9-72,9  $\mu\text{l}/\text{mg}$  u pročišćenoj vodi te 14,95-60,0  $\mu\text{l}/\text{mg}$  u SNF-u) u odnosu na same MD mikrosfere. Iz navedenog se može zaključiti da je razlika u volumenu apsorbiranog vodenog medija u donorskom odjeljku između samih MD mikrosfera i praškastih sustava MD mikrosfera i topljivih nosača posljedica osmotskog učinka nosača. Tanaka i suradnici (2017) primijetili su povećanje volumena sluzi pri primjeni formulacija za nazalnu primjenu koje sadrže laktozu [155]. Taj učinak pripisali su osmotskom tlaku koji nastaje otapanjem laktoze u nosnom fluidu te posljedičnom povlačenju vode iz epitelnih stanica i/ili tkiva sluznice. Može se pretpostaviti da je sličan mehanizam u pozadini rezultata dobivenih u ovom radu za praškaste sustave s nosačem topljivim u vodi, odnosno da je osmotski tlak, nastao brzim otapanjem nosača, uzrokovao prelazak vode iz receptorskog u donorski odjeljak preko polupropusne membrane.

Bubrenje praškastih sustava MD mikrosfera i laktoze monohidrata u pročišćenoj vodi i SNF-u raslo je u nizu: LP <GL <LEFP. S obzirom na to da je za sve nosače korištena prosijana frakcija raspona veličina čestica od 45 do 63  $\mu\text{m}$  te da je riječ o identičnim klasama laktoze, pretpostavka je da su opažene razlike u svojstvima bubrenja odraz razlika u morfologiji čestica. Praškasti sustavi MD-S i MD-M su, pri ispitivanju svojstava bubrenja, apsorbirali redom  $49,0 \pm 9,8$  i  $39,4 \pm 0,2$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  pročišćene vode te  $24,7 \pm 4,7$  i  $15,0 \pm 5,1$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  SNF-a. Usporediva svojstva bubrenja praškastih sustava s manitolom i sorbitolom očekivana su budući da su manitol i sorbitol izomeri te posjeduju jednak broj hidroksilnih skupina koje su zaslužne za osmotski učinak tih spojeva. Za procjenu značaja dobivenih vrijednosti u smislu stvarnog učinka praškastih sustava s osmotski aktivnim nosačima u *in vivo* uvjetima, bilo bi potrebno provesti dodatna istraživanja na animalnim modelima.

Praškasti sustavi s netopljivim nosačima (magnezijevog stearata i kalcijevog karbonata) nisu pokazali značajnija svojstva bubrenja (Slika 13.). To je bilo potvrđeno i činjenicom da su nakon provedenog ispitivanja prašci na membrani ostali suhi i u obliku kako su prvotno nanoseni. Takvi rezultati upućuju na zaključak da su čestice netopljivih nosača zahvaljujući lošim svojstvima močenja onemogućile bubrenje mikrosfera. No, neovisno o nepovoljnim rezultatima bubrenja, dokazano je da netopljivi nosači mogu produljiti vrijeme zadržavanja pripravka na površini sluznice i time povoljno utjecati na bioraspodjivu/činak lijeka [156], [157].

## 5.4. Reologija praškastih sustava

Poznavanje svojstava tečenja jedan je od ključnih parametara u razvoju i procjeni terapijskog potencijala praškastih nazalnih pripravaka [66], [133]. Naime, reološka svojstva praška u kombinaciji s karakteristikama uređaja za nazalnu primjenu utječu na aerosolizaciju pripravka [37], [73], a samim time i na ujednačenost doziranja te geometriju oblaka aerosola [37], [49]. Na aerosolizaciju praška mogu utjecati i vrsta te udio nosača u formulaciji što za posljedicu može imati i razliku u profilu depozicije pripravka [47], [50]. U ovom radu uspoređena su svojstva tečenja MD mikrosfera i sedam praškastih sustava MD mikrosfera i nosača. Reološka svojstva praška procijenjena su temeljem izračunatog Hausnerovog omjera i Carrovog indeksa, veličina koje su povezane s trenjem među česticama te kompresibilnošću praška i kao takve pogodne su za procjenu svojstava tečenja praška [71], [143].

Prašak MD mikrosfera karakteriziran je lošijim svojstvima tečenja u odnosu na ispitivane praškaste sustave MD mikrosfera i nosača, uz iznimku MS (Tablica 10.). Navedeno opažanje u skladu je s očekivanjima budući da su mikronizirani prašci dobiveni metodom sušenja raspršivanjem karakterizirani manjom gustoćom praška [154] te skloni aglomeraciji zbog velikog omjera površine prema volumenu [66], [154]. Adsorpcija MD mikrosfera na čestice nosača rezultirala je poboljšanjem svojstava tečenja. Utjecaj nosača na svojstva tečenja rastao je u nizu  $MS < C < LEFP < LP < M < S < GL$  (Tablica 10.). S obzirom da prašci teku pod utjecajem gravitacije, u pravilu su čestice veće gustoće manje kohezivne i imaju bolja svojstva tečenja od čestica manje gustoće, a iste veličine i oblika [71]. Tako je, među tvarima odabranim za nosače MD mikrosfera, MS tvar karakterizirana najmanjom gustoćom, a praškasti sustav MD-MS najlošijih je svojstava tečenja među ispitivanim praškastim sustavima mikrosfera i nosača. Međutim, iz odnosa gustoća ostalih tvari korištenih kao nosača (Tablica 8.) razvidno je da još neki čimbenici imaju ulogu u određivanju reoloških svojstava ispitivanih praška, kao primjerice oblik i/ili površina čestica nosača [164].

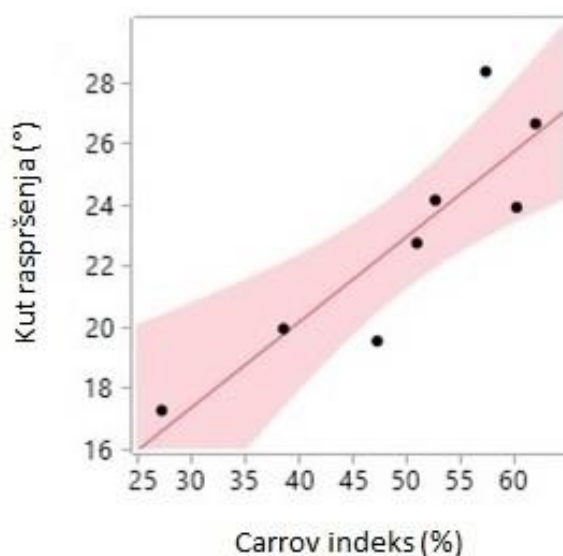
## 5.5. Kut raspršenja praškastih sustava

Kut raspršenja važan je parametar za ciljanu dostavu lijeka u nosnu šupljinu, s obzirom da značajno utječe na sami profil depozicije nazalno primijenjenog lijeka [40]. Naime, povećanjem kuta raspršenja povećava se nazalna depozicija u anteriornoj regiji [55], [56]. Jednako tako se smanjenje kuta raspršenja povezuje s povećanom depozicijom u ciljnoj turbinatnoj regiji [27], [38], [46], [56]. Iz navedenog je razvidna potreba za prilagođavanjem kuta raspršenja ciljanoj regiji, odnosno željenom terapijskom učinku nazalno primijenjenog lijeka [20]. Prema simulaciji Foo i sur. (2018) izvedenoj za tekuće pripravke, značajnije

odlaganje lijeka u turbinatnoj regiji u odraslih postiže se pri kutu raspršenja manjem od 30°, a u djece pri kutu raspršenja manjem od 20° [164].

Kut raspršenja za MD mikrosfere iznosio je  $26,7 \pm 1,0^\circ$ , a za praškaste sustave MD mikrosfera i različitih nosača kretao se između  $17,3 \pm 0,9^\circ$  i  $28,4 \pm 0,6^\circ$  (Tablica 11.). Miješanje MD mikrosfera s nosačem u masenom omjeru 1:9 u svim je slučajevima, osim u slučaju nosača C, rezultiralo smanjenjem kuta raspršenja u odnosu na same MD mikrosfere.

Dodatkom nosača u omjeru 9:1 u odnosu na MD mikrosfere, kut raspršenja mijenjao se ovisno o reološkim svojstvima praškastog sustava, pri čemu su prašci boljih svojstava tečenja (odnosno manjeg Carrovog indeksa) imali manji kut raspršenja. Analizom povezanosti kuta raspršenja ispitivanih praškastih sustava i Carrovog indeksa određen je Pearsonov (parametarski) koeficijent korelacije od 0,8759 (Slika 18.). Navedena zapažanja u skladu su s literaturnim podacima. Naime, Colombo i sur. (2016) su u ispitivanjima praškastih sustava s talidomidom također koristili MIAT<sup>®</sup> uređaj za nazalnu primjenu te je uočeno da je raspršivanjem praška s boljim svojstvima tečenja generiran oblak veće gustoće i manjeg kuta raspršenja dok je kombinacija istog uređaja s praškom lošijih svojstava tečenja rezultirala oblakom manje gustoće i većeg kuta raspršenja [37].



**Slika 18.** Korelacija između kuta raspršenja ispitivanih praškastih sustava i Carrovog indeksa (Pearsonov koeficijent korelacije 0,8759)

Kut raspršenja manji od 30° zabilježen je za sve ispitivane praškaste sustave MD mikrosfera i nosača što ih čini prikladnim za ciljanu depoziciju u turbinatnoj regiji. Kako je prolaz u području nosne valvule kod djece uži nego kod odraslih [28], [29], teže je postići učinkovitu dostavu lijeka, stoga je potreban uži kut raspršenja za značajniju depoziciju iza nosne valvule.

Praškasti sustavi MD mikrosfera s nosačima GL, S i M (MD-GL, MD-S i MD-M) karakterizirani su kutom raspršenja jednakim ili manjim od  $20^\circ$ , što ih čini potencijalno prikladnim i za primjenu u pedijatrijskoj populaciji.

Valja imati na umu da kut raspršenja pri primjeni lijeka u nosnu šupljinu ovisi i o parametrima primjene kao što su kut primjene i protok zraka [27]. Tako se, simuliranjem udaha u ispitivanju depozicije, kut raspršenja smanjuje u odnosu na kut pri zadržanom dahu [27], što predstavlja jedan od čimbenika s utjecajem na profil nazalne depozicije primijenjenog praškastog sustava.

## 5.6. Depozicija praškastih sustava u modelu nosne šupljine

Za osiguravanje terapijske učinkovitosti nazalno primijenjenog lijeka važna je njegova dostava u ciljanu regiju nosne šupljine. Stoga je u razvoju lijeka za nazalnu primjenu potrebno ispitati profil depozicije u ovisnosti o reološkim svojstvima formulacije, parametrima primjene te značajkama uređaja za njegovu dostavu u nosnu šupljinu [79].

Mehanizmi kojima se čestice odlažu u dišnom sustavu uključuju presretanje, sudaranje uslijed inercije, sedimentaciju utjecajem gravitacije, Brownovo gibanje i elektrostatske interakcije [166]. Međutim, odlaganje čestica u nosnoj šupljini posljedica je isključivo inercije i gravitacije. Aktiviranjem uređaja za nazalnu primjenu praškastog sustava generira se protok zraka koji raspršuje čestice praška u nosnu šupljinu. Opiranje raspršenih čestica promjeni inicijalne putanje zbog zakretanja protoka zraka rezultira njihovim tangencijalnim kretanjem u odnosu na protok zraka te sudaranjem s nosnom sluznicom [20], [166], [167]. Za čestice u gibanju, kada otpor zraka (kao medija u kojem se raspršene čestice kreću) i gravitacijska sila nadvladaju silu kojom su čestice praška raspršene, nastupa sedimentacija čestica pod utjecajem gravitacije. Sedimentacija je značajnija u nižim dijelovima dišnog sustava [166].

Na inicijalnu putanju čestica praška utječu kut raspršenja i kut primjene. U slučaju užeg kuta raspršenja iznimno je važno prilagoditi kut primjene da bi se prašak dostavio u područje iza nosne valvule, dok je kod šireg kuta raspršenja učinkovitost prolaska nosne valvule manje ovisna o kutu primjene [56]. Praškasti sustavi MD mikrosfera i nosača pripremljeni u ovom radu karakterizirani su relativno uskim kutom raspršenja. Stoga je, za osiguranje dostave lijeka u turbinatnu regiju, potrebno prilagoditi kut primjene.

Prema literaturnim podacima kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu koji je još ugodan za pacijenta kreće se u rasponu od  $55^\circ$  do  $75^\circ$  [89], pri čemu se kut od  $60^\circ$  opisuje kao ugodan [27]. Prema ranijim istraživanjima, kut od  $60^\circ$  prikladan je za nazalnu primjenu praškastih sustava [47]. Xi i suradnici (2017.) su u svom radu zaključili da čestice primijenjene pod kutom od  $60^\circ$  u odnosu na horizontalnu ravninu mogu izbjeći tok udahnutog zraka i

zadržati svoje usmjereno kretanje prema olfaktornoj regiji [168]. Kut primjene od 45° uključen je u ovo ispitivanje prema radu Salade i sur. (2018) [52]. Warnken i sur. (2018) su taj kut predložili kao najprikladniji za nazalnu primjenu, prema udjelu depozicije u turbinatnoj regiji, a temeljem istraživanja profila depozicije nazalnih pripravaka korištenjem nekoliko modela nosne šupljine osoba različite starosne dobi [26].

Za ispitivanje profila depozicije u modelu nosne šupljine, odabrani su praškasti sustavi MD-GL, MD-C, MD-MS, MD-S i MD-M te je izvršena usporedba sa samim MD mikrosferama. Od tri nosača laktoze monohidrata odabran je nosač GL, s obzirom na bolja svojstva u odnosu na LP i LEFP, na što upućuju ranije prikazani rezultati ispitivanja (Tablica 9., 10. i 11. te Slika 13.).

Deksametazon je indiciran u liječenju alergijskog rinitisa i rinosinuitisa kao upalne bolesti nosne sluznice [169], [170] te ga je potrebno dostaviti u turbinatnu regiju nosne šupljine [24], [171]. Stoga je upravo udio doze deksametazona dostavljen u tu regiju uzet kao pokazatelj uspješnosti njegove nazalne dostave, odnosno prikladnosti ostvarenog profila depozicije u nosnoj šupljini.

Prema rezultatima vizualne procjene depozicije prašaka i kvantitativne analize udjela deksametazona u pojedinim regijama, uočeno je da je kod svih prašaka veći udio raspršene doze prošao nosnu valvulu. Razlog tome je što je kut raspršenja za sve ispitivane praškaste sustave dovoljno mali (<30°, [164]) (Tablica 11.) da prašci u većoj mjeri prolaze kroz suženje u području valvule te se odlažu u području TR, PR ili O. Vizualnom procjenom profila depozicije pri kutu primjene od 45° i uz brzinu protoka zraka od 20 l/min uočena je preraspodjela čestica odloženih u turbinatnoj regiji u odnosu na primjenu praškastog sustava uz simulaciju zadržavanja daha (brzina protoka zraka od 0 l/min). Pri brzini protoka zraka od 20 l/min uočena je veća depozicija u području gornje nosne školjke i gornjeg nosnog hodnika, a smanjena u području donjeg nosnog hodnika (Slika 17.). Slične rezultate dobili su Trows i Scherliess (2016) promatrajući profil depozicije praškastog sustava temeljenog na nosaču manitolu. Iako u radu nije točno definiran kut primjene, promjena protoka zraka od 0 l/min na 15 l/min rezultirala je povećanjem frakcije odložene u području srednje i gornje nosne školjke [49]. Razlika u profilu depozicije kod navedena dva protoka slaže se s radom Lippmann i suradnika (1980.) prema kojem je kod viših brzina protoka zraka veći utjecaj inercije na čestice, odnosno kod manjih brzina protoka veća je zastupljenost odlaganja čestica mehanizmom sedimentacije uslijed gravitacije [166].

Uspoređujući rezultate kvantitativne analize profila depozicije pri svim uvjetima primjene, najveći udio deksametazona u TR zabilježen je u slučaju primjene praškastih sustava pri horizontalnom kutu od 60° i protoku zraka od 0 l/min (simulacija zadržavanja daha)



(Tablica 12.). Miješanje MD mikrosfera s inertnim nosačima u masenom omjeru 1:9 rezultiralo je poboljšanjem depozicije u TR u odnosu na primjenu samih MD mikrosfera, pri svim ispitivanim parametrima primjene. Odstupanje od navedenog uočeno je samo kod praškastog sustava MD-GL primijenjenog uz simulaciju udaha (protok zraka od 20 l/min) pri čemu se postotni udio lijeka dostavljen u turbinatnu regiju nije značajno razlikovao od onog pri primjeni samih MD mikrosfera pod istim uvjetima. Učinkovitija depozicija praškastih sustava MD mikrosfera i inertnih nosača u turbinatnoj regiji u odnosu na same MD mikrosfere može se objasniti adsorpcijom MD mikrosfera na čestice nosača, zahvaljujući kojoj je veličina čestica rezultirajućeg praškastog sustava prilagođena depoziciji u nosnoj šupljini [49], [161].

Budući da se u mnogim uputama o lijeku navodi potreba za primjenom lijeka u nosnu šupljinu uz istovremeni udah, razmatran je utjecaj protoka zraka od 20 l/min (odgovara udahu pri umjerenom disanju) na profil nazalne depozicije. Kao što je već spomenuto u uvodnom dijelu, povećanje protoka zraka uzrokuje veći udio turbulentnog kretanja što rezultira povećanom depozicijom u turbinatnoj regiji. No, povećanje protoka zraka može uzrokovati i smanjenu ukupnu depoziciju čestica u nosnoj šupljini, uzrokujući deaglomeraciju/razdvajanje čestica i njihovo odlaganje u distalnijim dijelovima dišnog sustava [49]. U ovom radu zabilježeno je smanjenje depozicije čestica u ciljanoj regiji nosne šupljine pri protoku zraka od 20 l/min u odnosu na 0 l/min (Tablica 12.) jednako kao i smanjenje ukupnog prinosa nakon raspršivanja u model nosne šupljine (Tablica 14). Pretpostavka je da je raspršivanje praškastog sustava uz simulaciju umjerenog udaha rezultiralo deaglomeracijom/razdvajanjem MD mikrosfera od čestica nosača te posljedično smanjenom depozicijom unutar modela nosne šupljine.

Temeljem analize profila depozicije i udjela deksametazona dostavljenog u TR, postavke horizontalnog kuta primjene od 60° i protoka zraka od 0 l/min (simulacija zadržavanja daha) odabrane su kao najprikladnije za nazalnu primjenu praškastih sustava MD mikrosfera i inertnih nosača, pri čemu je, za sve ispitivane praškaste sustave, najveći udio deksametazona dostavljen u TR (Slika 15.). Slijedi regija O kod svih praškastih sustava, sa otprilike dvostruko manjim vrijednostima udjela deksametazona u odnosu na TR. Navedenu regiju predstavljaju parafilm te septum. Parafilm je u ovom eksperimentalnom radu korišten za zatvaranje regije modela nosne šupljine koja predstavlja nazofarinks. Čestice praška koje se nalaze na parafilmu su čestice koje bi kod pacijenta putem nazofarinksa prošle u niže dijelove dišnog sustava. Primjena kortikosteroida prema nazalnom septumu, odnosno posljedično povećana depozicija na području septuma, povezuje se prema nekim istraživanjima s povećanom incidencijom epistakse [76], [78], [125]. Iako nazalni prašak u ovom radu nije primjenjivan prema septumu, nego paralelno sa septumom, uočena je depozicija dijela čestica na septumu. Povećana depozicija na septumu bila bi od interesa kod nazalnih polipa na području septuma,

no takva lokalizacija polipa vrlo je rijetka i zabilježena tek u nekoliko izvješća o pojedinačnim slučajevima [104], [172].

Pri odabranim uvjetima primjene (horizontalni kut od  $60^\circ$  i protok zraka od 0 l/min), za praškasti sustav MD-GL zabilježen je ukupni prinos od  $84,4 \pm 1,9$  % i depozicija u turbinatnoj regiji od  $42,0 \pm 3,1$  % što se slaže s rezultatima Nižić i sur. (2020) [47]. U navedenom radu korišten je isti omjer ovog nosača u formulacijama te je zabilježena depozicija u turbinatnoj regiji od oko 40% te ukupni prinos od  $74,7 \pm 6,9$ %. Praškasti sustavi MD-S i MD-M također su pokazali dobra svojstva pri razmatranim uvjetima primjene s ukupnim prinosom od  $76,6 \pm 1,0$  % i  $67,0 \pm 4,0$  % te depozicijom u turbinatnoj regiji od  $40,9 \pm 0,9$  % i  $40,5 \pm 3,5$  %. Trows i Scherliess (2016) koristili su manitol (Pearlitol 200 SD) kao nosač u svojim formulacijama jer je rezultirao niskim udjelom postnazalne frakcije i malom varijabilnošću među mjerenjima. Primjenom formulacije s omjerom mikrosfera i nosača 1:9 u model nosne šupljine pri protoku 0 l/min, u radu Trows i Scherliess (2016), postignuta je nešto manja depozicija lijeka u turbinatnoj regiji u odnosu na vrijednosti u ovom radu [49].

Zabilježen je vrlo povoljan profil depozicije i za praške izrazito loših svojstava tečenja poput MD-MS i MD-C uz izražen učinak rasprostiranja, no valja naglasiti da je za te praške utvrđena velika varijabilnost u rezultatima ukupnog prinosa i depozicije u ciljnoj regiji (Tablica 13. i 14.). Zbog navedenog, te rezultata ranijih ispitivanja, prašci MD-MS i MD-C nisu najbolji izbor, iako je profil depozicije povoljan.

## 5.7. Isporučena masa praškastih sustava

Isporučena masa praškastog sustava važan je čimbenik terapijske učinkovitosti nazalnog praška jer direktno utječe na količinu lijeka koja će prilikom primjene biti dostavljena u nosnu šupljinu. Isporučena masa ovisi o svojstvima uređaja i formulacije [68], [100]. MIAT<sup>®</sup> jednodozni nazalni insuflator učinkovito dostavlja prašak u postotku od oko 90% nakon samo jednog potiska, uz minimalne varijacije u rezultatu, te učinkovitost dostave nije ovisna o količini praška u kapsuli [173]. Razlog tome je što veći gumeni balon MIAT<sup>®</sup> uređaja, u odnosu na druge uređaje istog mehanizma, generira jači protok zraka koji omogućuje raspršivanje gotovo cijelog sadržaja kapsule samo jednim potiskom [174]. Zbog navedenih izvedbenih značajki, MIAT<sup>®</sup> uređaj odabran je za raspršivanje praškastih sustava i u ovom eksperimentalnom radu.

Postotni udjeli isporučene mase praškastog sustava raspršivanjem pri horizontalnom kutu od  $60^\circ$  i simulaciji zadržavanja daha (protok zraka od 0 l/min) kretali su se u rasponu od 81,3 % do 99,2 % (Tablica 13.) i većim dijelom se slažu s opisanom učinkovitošću MIAT<sup>®</sup>

uređaja [173]. Uočena varijacija isporučene mase praškastog sustava pripisuje se razlikama u formulaciji, odnosno različitim svojstvima ispitivanih nosača.

Nižić i sur. (2020) su praškasti sustav mikročestica s uklopljenim lijekom i nosača laktoze monohidrata pripremili u jednakom masenom omjeru (1:9), te primijenili uređajem MIAT® u model nosne šupljine pri jednakim parametrima primjene (horizontalni kut 60° i protok zraka od 0 l/min), pri čemu je postotni udio mase praškastog sustava zaostalog u kapsuli nakon raspršivanja iznosio  $4,7 \pm 1,9\%$  [47] što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu.

Kaye i sur. (2009) su također koristili laktozu monohidrat i magnezijev stearat kao nosače u svojim praškastim sustavima [50]. Laktoza monohidrat bila je različite klase i raspodjele veličina čestica u odnosu na onu korištenu u ovom radu. Omjer mikročestica i nosača laktoze monohidrata bio je 1:1 (*m/m*), dok je udio magnezijevog stearata u mješavini s mikročesticama bio svega 1% (*m/m*). U tom ispitivanju, praškasti sustav s laktozom imao je bolja svojstva aerosolizacije u odnosu na praškasti sustav s magnezijevim stearatom, s manjim udjelom mase praška zaostalog u uređaju [50]. Sličan učinak navedenih nosača primijećen je i u ovom radu gdje je praškasti sustav MD mikrosfera s laktoza monohidratom (MD-GL) bio karakteriziran većom isporučenom masom pri svim uvjetima primjene u odnosu na praškasti sustav MD mikrosfera s magnezijevim stearatom (MD-MS), osim pri uvjetima 45° / 20 l/min pri kojima je udio isporučene mase za ta dva sustava gotovo jednak.

Sorbitol i manitol pokazali su se najboljim nosačima s obzirom na varijabilnost među mjerenjima i količinu praška zaostalog u kapsuli pri svim uvjetima primjene, s prosječnim vrijednostima od  $1,0 \pm 0,4\%$  i  $1,7 \pm 1,4\%$ .

Na osnovu vizualne usporedbe formulacija i izgleda kapsula nakon raspršivanja praška uočeno da su kod praška MD-C bila izražena svojstva grudanja, što je vjerojatno utjecalo na aerosolizaciju pripravka i rezultiralo varijabilnošću među mjerenjima (SD vrijednosti 8,7 %, 4,3 % i 7,0 %). Naime, bolje svojstvo tečenja praška, kao posljedica slabijih kohezivnih sila među česticama praška, ujedno prate bolja svojstva aerosolizacije pripravka [71], [73]. Analogno tome lošije svojstvo tečenja prati lošije svojstvo aerosolizacije pripravka. Navedeno je vidljivo u ovom eksperimentalnom radu. Prašci MD-GL, MD-S i MD-M karakterizirani su većim udjelom isporučene mase praška te boljim svojstvima tečenja u usporedbi s prašcima MD, MD-C i MC-MS.

Prema smjernicama EMA-e vezano uz farmaceutsku kvalitetu pripravaka za inhalaciju i nazalnih pripravaka, dozvoljeno odstupanje u isporučenoj masi od deklarirane mase praška iznosi  $\pm 15\%$  [65]. Navedeni kriterij zadovoljavaju prašci MD-GL, MD-MS, MD-S i MD-M pri

svim uvjetima primjene, dok je kod prašaka MD i MD-C zabilježeno odstupanje veće od 15 %, čime navedeni prašci ne zadovoljavaju zahtjeve za farmaceutsku kvalitetu.

Zaključno, temeljem provedene karakterizacije praškastih sustava MD mikrosfera i inertnog nosača te ispitivanja profila depozicije u nosnoj šupljini pri različitim parametrima primjene, laktoza monohidrat (GL), sorbitol (S) i manitol (M) prepoznati su kao nosači MD mikrosfera najvećeg potencijala. Daljnja istraživanja na *in vivo* modelima neophodna su za procjenu učinka odabranih nosača na ponašanje mikrosfera u kontaktu s nosnom sluznicom.

## 6. Zaključci

- Mikrosfere građene od pektina i hipromeloze, sa sadržajem uklopljenog deksametazona od  $23,7 \pm 0,3\%$ ; (MD mikrosfere), uspješno su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem.
- Praškasti sustavi MD mikrosfera (medijan volumne raspodjele  $2,69 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ) i inertnog nosača (laktoze monohidrata, sorbitola, manitola, kalcijevog karbonata i magnezijevog stearata, veličine čestica  $45\text{-}63 \mu\text{m}$ ) pripremljeni su miješanjem u omjeru 1:9 (*m/m*) uz zadovoljene kriterije homogenosti.
- Bubrenje mikrosfera u umjetnom nosnom fluidu (SNF) umjerenije je u odnosu na bubrenje u pročišćenoj vodi. Suprotno topljivim i osmotski aktivnim nosačima, netopljivi nosači (kalcijev karbonat i magnezijev stearat) onemogućili su bubrenje MD mikrosfera u SNF-u.
- Praškasti sustavi MD mikrosfera i inertnog nosača (uz iznimku magnezijevog stearata) poboljšanih su svojstava tečenja (tj. manjeg Carrovog indeksa i Hausnerovog omjera) u odnosu na same MD mikrosfere i prikladni su za primjenu raspršivanjem.
- Kut raspršenja praškastih sustava bio je u rasponu od  $17,3 \pm 0,9^\circ$  do  $28,4 \pm 0,6^\circ$ , što ih čini prikladnim za dostavu lijeka iza nosne valvule. Uočena je korelacija između Carrovog indeksa i kuta raspršenja: prašci manjeg Carrovog indeksa imali su manji kut raspršenja (Pearsonov koeficijent korelacije 0,8759).
- Praškasti sustavi MD mikrosfera i nosača osigurali su učinkovitiju dostavu lijeka u turbinatnu regiju silikonskog modela nosne šupljine u odnosu na same MD mikrosfere. Najučinkovitija dostava deksametazona u turbinatnu regiju ( $40,5 \pm 3,5\%$  do  $47,9 \pm 4,6\%$  primijenjene doze) postignuta je pri horizontalnom kutu primjene od  $60^\circ$  i protoku zraka kroz nosnu šupljinu od 0 l/min, te su navedeni parametri primjene prepoznati kao parametri izbora za razvijene praškaste sustave.
- Simulacija umjerenog udaha (protok zraka od 20 l/min) pri raspršivanju praškastih sustava u nosnu šupljinu rezultirala je smanjenjem depozicije lijeka u turbinatnoj regiji i smanjenjem ukupnog prinosa u odnosu na one pri simulaciji zadržavanja daha (protok zraka od 0 l/min).

- Praškasti sustavi MD mikrosfera i inertnog nosača (uz iznimku kalcijevog karbonata) učinkovito se isporučuju raspršivanjem insuflatorom MIAT<sup>®</sup> te, za razliku od samih MD mikrosfera, zadovoljavaju zahtjeve za farmaceutsku kakvoću s obzirom na isporučenu masu pri primjeni.
- Provedena sveobuhvatna *in vitro* karakterizacija omogućila je prepoznavanje laktoze monohidrata, sorbitola i manitola kao nosača MD mikrosfera s velikim potencijalom za nazalnu primjenu te probir praškastih sustava za *in vivo* ispitivanja njihovog međudjelovanja sa sluznicom nosa.

## 7. Zahvale

*Zahvaljujemo našoj mentorici prof. dr. sc. Aniti Hafner na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, prenesenom znanju i savjetima prilikom izrade ovog rada. Hvala Vam na dobroj volji, ukazanom povjerenju i podršci, a nadasve na utrošenom vremenu koje ste izdvojili da bi ovaj rad bio uspješan.*

*Veliko hvala i asistentici Lauri Nižić Nodilo, mag. pharm. na pomoći, savjetima i pratnji tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujemo i svim ostalim članovima istraživačke grupe projekta OptiNasalSpray te djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.*

*Također, zahvaljujemo i tvrtki Jadran-galenski laboratorij d.d., Rijeka na ustupljenom uređaju za određivanje raspodjele veličine čestica mikrosfera.*

*Zahvaljujemo i Mariju Poji na profesionalnim fotografijama modela nosne šupljine.*

*Hvala našim obiteljima i bližnjima na neizmjerljivoj podršci tijekom izrade ovog rada.*

## 8. Literatura

- [1] C. Hopkins, "Nose, nasal cavity and paranasal sinuses", in Gray's Anatomy, Forty-first edition, S. Standring, Ed. Philadelphia, Elsevier Limited, pp. 556-570, 2016.
- [2] P. Keros i M. Pećina, Temelji anatomije čovjeka, Medicinska naklada, Zagreb 1992.
- [3] M. B. Bloching, "Disorders of the nasal valve area.," GMS Curr. Top. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg., vol. 6, p. Doc07, 2007.
- [4] R. G. Patel, "Nasal Anatomy and Function," Facial Plast. Surg., vol. 33, no. 1, pp. 3–8, 2017.
- [5] J. E. Possa and R. J. Rohrich, "Nasal analysis and anatomy," Plastic surgery 3rd Edition. Volume 2: Aesthetic surgery., pp. 373-386, 2012.
- [6] A. Sahin-Yilmaz and R. M. Naclerio, "Anatomy and physiology of the upper airway," Proc. Am. Thorac. Soc., vol. 8, no. 1, pp. 31–39, 2011.
- [7] A. P. Lane, "Nasal anatomy and physiology," Facial Plast. Surg. Clin. North Am., vol. 12, no. 4, pp. 387–395, 2004.
- [8] N. Csaba, M. Garcia-Fuentes, and M. J. Alonso, "Nanoparticles for nasal vaccination," Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 61, no. 2, pp. 140–157, 2009.
- [9] T. Shimizu, "Mucus, Goblet Cell, Submucosal Gland", in Nasal Physiology and Pathophysiology of Nasal Disorders, T. M. Önerci, Ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1-14, 2013.
- [10] M. Jorissen and M. Jaspers, "Cilia, Ciliary Movement, and Mucociliary Transport", in Nasal Physiology and Pathophysiology of Nasal Disorders, T. M. Önerci, Ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 15-26, 2013.
- [11] C. B. Wigley, "Integrating cells into tissues", in Gray's Anatomy, Forty-first edition, S. Standring, Ed. Philadelphia, Elsevier Limited, pp. 28-41, 2016.
- [12] J. Leal, H. D. C. Smyth, and D. Ghosh, "Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery," Int. J. Pharm., vol. 532, no. 1, pp. 555–572, 2017.
- [13] A. G. Beule, "Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses." GMS Curr. Top. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg., vol. 9, p. Doc07, 2010.
- [14] D. Elad, M. Wolf, and T. Keck, "Air-conditioning in the human nasal cavity," Respir. Physiol. Neurobiol., vol. 163, no. 1–3, pp. 121–127, 2008.
- [15] T. Keck, R. Leiacker, A. Heinrich, S. Kühnemann, and G. Rettinger, "Humidity and temperature profile in the nasal cavity," Rhinology, vol. 38, no. 4, pp. 167–171, 2000.
- [16] H. Calmet, K. Inthavong, B. Eguzkitza, O. Lehmkuhl, G. Houzeaux, and M. Vázquez, "Nasal sprayed particle deposition in a human nasal cavity under different inhalation conditions," PLoS One, vol. 14, no. 9, pp. 1–27, 2019.



- [17] H. Viswanathan, I. A. Brownlee, J. P. Pearson, and S. Carrie, "MUC5B secretion is up-regulated in sinusitis compared with controls," *Am. J. Rhinol.*, vol. 20, no. 5, pp. 554–557, 2006.
- [18] W. Burke, "The Ionic Composition of Nasal Fluid and Its Function," no. March, pp. 720–728, 2014.
- [19] M. F. Quinlan, S. D. Salman, D. L. Swift, H. N. Wagner, and D. F. Proctor, "Measurement of mucociliary function in man.," *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 99, no. 1, pp. 13–23, 1969.
- [20] H. Kublik and M.T. Vidgren, "Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption," *Adv Drug Deliv Rev.*, vol. 29, no. 1-2, pp.157-177, 1998.
- [21] K. Zhao and J. Jiang, "What is normal nasal airflow? A computational study of 22 healthy adults," *Int. Forum Allergy Rhinol.*, vol. 4, no. 6, pp. 435–446, 2014.
- [22] J. R. Newton and K. W. Ah-See, "A review of nasal polyposis," *Ther. Clin. Risk Manag.*, vol. 4, no. 2, pp. 507–512, 2008.
- [23] G. J. M. Garcia, E. W. Tewksbury, B. A. Wong, and J. S. Kimbell, "Interindividual variability in nasal filtration as a function of nasal cavity geometry," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 22, no. 2, pp. 139–155, 2009.
- [24] P. G. Djupesland, "Nasal drug delivery devices: Characteristics and performance in a clinical perspective-a review," *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 42–62, 2013.
- [25] D. O. Frank, J. S. Kimbell, D. Cannon, S. S. Pawar and J. S. Rhee, "Deviated nasal septum hinders intranasal sprays: A computer simulation study," *Rhinology*, vol. 50, no. 3, pp. 311-318, 2012.
- [26] Z. N. Warnken, H. D. C. Smyth, D. A. Davis, S. Weitman, J. G. Kuhn, and R. O. Williams, "Personalized Medicine in Nasal Delivery: The Use of Patient-Specific Administration Parameters to Improve Nasal Drug Targeting Using 3D-Printed Nasal Replica Casts," *Mol. Pharm.*, vol. 15, no. 4, pp. 1392–1402, 2018.
- [27] D. Moraga-Espinoza, Z. Warnken, A. Moore, R. O. Williams, and H. D. C. Smyth, "A modified USP induction port to characterize nasal spray plume geometry and predict turbinate deposition under flow," *Int. J. Pharm.*, vol. 548, no. 1, pp. 305–313, 2018.
- [28] M. H. Becquemin, D. L. Swift, A. Bouchikhi, M. Roy, and A. Teillac, "Particle deposition and resistance in the noses of adults and children," *Eur. Respir. J.*, vol. 4, no. 6, pp. 694–702, 1991.
- [29] W. D. Bennett, K. L. Zeman, and A. M. Jarabek, "Nasal contribution to breathing and fine particle deposition in children versus adults," *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues*, vol. 71, no. 3, pp. 227–237, 2008.
- [30] N. Sawant and M. D. Donovan, "In Vitro Assessment of Spray Deposition Patterns in a Pediatric (12 Year-Old) Nasal Cavity Model," *Pharm. Res.*, vol. 35, no. 5, 2018.

- [31] S. Hosseini et al., "In Vitro Measurement of Regional Nasal Drug Delivery with Flonase,<sup>®</sup> Flonase<sup>®</sup> Sensimist,<sup>TM</sup> and MAD Nasal<sup>TM</sup> in Anatomically Correct Nasal Airway Replicas of Pediatric and Adult Human Subjects," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 32, no. 6, pp. 374–385, 2019.
- [32] B. L. Laube et al., "Intranasal Deposition of Accuspray<sup>TM</sup> Aerosol in Anatomically Correct Models of 2-, 5-, and 12-Year-Old Children," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 28, no. 5, pp. 320–333, 2015.
- [33] S. C. Leong and R. Eccles, "A systematic review of the nasal index and the significance of the shape and size of the nose in rhinology," *Clin. Otolaryngol.*, vol. 34, no. 3, pp. 191–198, 2009.
- [34] J. A. Keeler, A. Patki, C. R. Woodard, and D. O. Frank-Ito, "A Computational Study of Nasal Spray Deposition Pattern in Four Ethnic Groups," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 29, no. 2, pp. 153–166, 2016.
- [35] W. D. Bennett and K. L. Zeman, "Effect of race on fine particle deposition for oral and nasal breathing," *Inhal. Toxicol.*, vol. 17, no. 12, pp. 641–648, 2005.
- [36] J. Xi, J. E. Yuan, Y. Zhang, D. Nevorski, Z. Wang, and Y. Zhou, "Visualization and Quantification of Nasal and Olfactory Deposition in a Sectional Adult Nasal Airway Cast," *Pharm. Res.*, vol. 33, no. 6, pp. 1527–1541, 2016.
- [37] G. Colombo et al., "Nasal powders of thalidomide for local treatment of nose bleeding in persons affected by hereditary hemorrhagic telangiectasia," *Int. J. Pharm.*, vol. 514, no. 1, pp. 229–237, 2016.
- [38] Y. Pu, A. P. Goodey, X. Fang, and K. Jacob, "A comparison of the deposition patterns of different nasal spray formulations using a nasal cast," *Aerosol Sci. Technol.*, vol. 48, no. 9, pp. 930–938, 2014.
- [39] Y. Guo, B. Laube, and R. Dalby, "The effect of formulation variables and breathing patterns on the site of nasal deposition in an anatomically correct model," *Pharm. Res.*, vol. 22, no. 11, pp. 1871–1878, 2005.
- [40] V. Kundoor and R. N. Dalby, "Effect of formulation- and administration-related variables on deposition pattern of nasal spray pumps evaluated using a nasal cast," *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 8, pp. 1895–1904, 2011.
- [41] L. Salade, N. Wauthoz, J. Goole, and K. Amighi, "How to characterize a nasal product. The state of the art of in vitro and ex vivo specific methods," *Int. J. Pharm.*, vol. 561, no. January, pp. 47–65, 2019.
- [42] A. Rygg, M Hindle and P. W. Longest, "Linking Suspension Nasal Spray Drug Deposition Patterns to Pharmacokinetic Profiles: A Proof of Concept Study using Computational Fluid Dynamics" *J Pharm Sci.*, vol. 105, no. 6, pp. 1995-2004., 2016.

- [43] B. Forbes et al., "A consensus research agenda for optimising nasal drug delivery," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 17, no. 2, pp. 127–132, 2020.
- [44] R. Bettini et al., "Nicotine nasal powder: Design and characterization," *S.T.P. Pharma Sci.*, vol. 9, no. 5, pp. 457–462, 1999.
- [45] S. Lungare, J. Bowen, and R. Badhan, "Development and Evaluation of a Novel Intranasal Spray for the Delivery of Amantadine," *J. Pharm. Sci.*, vol. 105, no. 3, pp. 1209–1220, 2016.
- [46] L. Nižić et al., "Innovative sprayable in situ gelling fluticasone suspension: Development and optimization of nasal deposition," *Int. J. Pharm.*, vol. 563, no. April, pp. 445–456, 2019.
- [47] L. Nižić et al., "Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 141, 2020.
- [48] S. A. Shah, C. J. Dickens, D. J. Ward, A. A. Banaszek, C. George, and W. Horodnik, "Design of experiments to optimize an in vitro cast to predict human nasal drug deposition," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 27, no. 1, pp. 21–29, 2014.
- [49] S. Trows and R. Scherließ, "Carrier-based dry powder formulation for nasal delivery of vaccines utilizing BSA as model drug," *Powder Technol.*, vol. 292, pp. 223–231, 2016.
- [50] R. S. Kaye, T. S. Purewal, and O. H. Alpar, "Development and testing of particulate formulations for the nasal delivery of antibodies," *J. Control. Release*, vol. 135, no. 2, pp. 127–135, 2009.
- [51] J. Castile, Y. H. Cheng, B. Simmons, M. Perelman, A. Smith, and P. Watts, "Development of in vitro models to demonstrate the ability of PecSys®, an in situ nasal gelling technology, to reduce nasal run-off and drip," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 39, no. 5, pp. 816–824, 2013.
- [52] L. Salade, N. Wauthoz, M. Vermeersch, K. Amighi, and J. Goole, "Chitosan-coated liposome dry-powder formulations loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 129, no. June, pp. 257–266, 2018.
- [53] S. A. Shah et al., "Regional deposition of mometasone furoate nasal spray suspension in humans," *Allergy Asthma Proc.*, vol. 36, no. 1, pp. 48–57, 2015.
- [54] E. Pringels et al., "Influence of deposition and spray pattern of nasal powders on insulin bioavailability," *Int. J. Pharm.*, vol. 310, no. 1–2, pp. 1–7, 2006.
- [55] Y. S. Cheng et al., "Characterization of nasal spray pumps and deposition pattern in a replica of the human nasal airway," *J. Aerosol Med. Depos. Clear. Eff. Lung*, vol. 14, no. 2, pp. 267–280, 2001.
- [56] M. Y. Foo, Y. S. Cheng, W. C. Su, and M. D. Donovan, "The influence of spray properties on intranasal deposition," *J. Aerosol Med. Depos. Clear. Eff. Lung*, vol. 20, no. 4, pp. 495–508, 2007.

- [57] T. Sartoretti, M. Mannil, S. Biendl, J. M. Froehlich, H. Alkadhi, and M. Zadory, "In vitro qualitative and quantitative CT assessment of iodinated aerosol nasal deposition using a 3D-printed nasal replica," *Eur. Radiol. Exp.*, vol. 3, no. 1, p. 32, 2019.
- [58] M. Pozzoli et al., "Application of RPMI 2650 nasal cell model to a 3D printed apparatus for the testing of drug deposition and permeation of nasal products," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 107, pp. 223–233, 2016.
- [59] R. Mösges, "Computational Fluid Dynamics of the Nasal Cavity", in *Nasal Physiology and Pathophysiology of Nasal Disorders*, T. M. Önerci, Ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 247-256, 2013.
- [60] X. Tong, J. Dong, Y. Shang, K. Inthavong, and J. Tu, "Effects of nasal drug delivery device and its orientation on sprayed particle deposition in a realistic human nasal cavity," *Comput. Biol. Med.*, vol. 77, pp. 40–48, 2016.
- [61] S. Ishikawa, T. Nakayama, M. Watanabe, and T. Matsuzawa, "Flow Mechanisms in the Human Olfactory Groove," *Arch. Otolaryngol. Neck Surg.*, vol. 135, no. 2, p. 156, 2009.
- [62] S. Byun, S. K. Chung, and Y. Na, "Air-conditioning characteristics in nasal cavity models exhibiting nasal cycle states," *J. Therm. Biol.*, vol. 83, no. May, pp. 60–68, 2019.
- [63] M. S. Georgy and A. T. Peters, "Nasal polyps," *Allergy Asthma Proc.*, vol. 33, no. SUPPL. 1, pp. 22–23, 2012.
- [64] G. P. Martin and A. B. Lansley, "Nasal drug delivery," in *Aulton's Pharmaceuticals: The Design and Manufacture of Medicines*, Fifth edition, M. E. Aulton and K. M. G. Taylor, Ed. Edinburgh, Elsevier, pp. 671-689., 2017.
- [65] European Medicines Agency, "Guideline on the Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products," 2006.
- [66] L. T. Fasiolo et al., "Opportunity and challenges of nasal powders : Drug formulation and delivery," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 113, no. May 2017. pp. 2–17, 2018.
- [67] U. Espefält Westin, *Olfactory Transfer of Analgesic Drugs After Nasal Administration.*, vol. 55. 2007.
- [68] J. Filipović-Grčić and A. Hafner, "Nasal Powder Drug Delivery," *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing*, 2010.
- [69] S. Trows, K. Wuchner, R. Spycher, and H. Steckel, "Analytical challenges and regulatory requirements for nasal drug products in Europe and the U.S," *Pharmaceutics*, vol. 6, no. 2, pp. 195–219, 2014.
- [70] C. Guo, K. J. Stine, J. F. Kauffman, and W. H. Doub, "Assessment of the influence factors on in vitro testing of nasal sprays using Box-Behnken experimental design," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 35, no. 5, pp. 417–426, 2008.

- [71] M. E. Aulton, "Powder flow," in *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*, Fifth edition, M. E. Aulton and K. M. G. Taylor, Ed. Edinburgh, Elsevier, pp. 189-200., 2017.
- [72] H. J. Lee et al., "The role of lactose carrier on the powder behavior and aerodynamic performance of bosentan microparticles for dry powder inhalation," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 117, pp. 279–289, 2018.
- [73] Q. T. Zhou, B. Armstrong, I. Larson, P. J. Stewart, and D. A. V. Morton, "Understanding the influence of powder flowability, fluidization and de-agglomeration characteristics on the aerosolization of pharmaceutical model powders," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 40, no. 5, pp. 412–421, 2010.
- [74] C. Marriott, "Rheology," in *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*, Fifth edition, M. E. Aulton and K. M. G. Taylor, Ed. Edinburgh, Elsevier, pp. 93-133., 2017.
- [75] T. R. Sosnowski, P. Rapiejko, J. Sova, and K. Dobrowolska, "Impact of physicochemical properties of nasal spray products on drug deposition and transport in the pediatric nasal cavity model," *Int. J. Pharm.*, vol. 574, p. 118911, 2020.
- [76] V. Ganesh, A. Banigo, A. E. L. McMurrin, M. Shakeel, and B. Ram, "Does intranasal steroid spray technique affect side effects and compliance? Results of a patient survey," *J. Laryngol. Otol.*, vol. 131, no. 11, pp. 991–996, 2017.
- [77] R. Aggarwal, A. Cardozo, and J. J. Homer, "The assessment of topical nasal drug distribution," *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.*, vol. 29, no. 3, pp. 201–205, 2004.
- [78] S. Benninger et al., "Techniques of intranasal steroid use," *Otolaryngol. - Head Neck Surg.*, vol. 130, no. 1, pp. 5–24, 2004.
- [79] P. Merkus, F. A. Ebbens, B. Muller, and W. J. Fokkens, "The 'best method' of topical nasal drug delivery: Comparison of seven techniques," *Rhinology*, vol. 44, no. 2, pp. 102–107, 2006.
- [80] P. Merkus, F. A. Ebbens, B. Muller, and W. J. Fokkens, "Influence of anatomy and head position on intranasal drug deposition," *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 263, no. 9, pp. 827–832, 2006.
- [81] W. J. Fokkens et al., "European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2020." *Rhinology*, vol. 58, no. SUPPL. 29, pp.1–464, 2020.
- [82] V. Kundoor and R. N. Dalby, "Assessment of nasal spray deposition pattern in a silicone human nose model using a color-based method," *Pharm. Res.*, vol. 27, no. 1, pp. 30–36, 2010.
- [83] S. Häußermann, A. G. Bailey, M. R. Bailey, G. Etherington, and M. Youngman, "The influence of breathing patterns on particle deposition in a nasal replicate cast," *J. Aerosol Sci.*, vol. 33, no. 6, pp. 923–933, 2002.

- [84] R. A. Segal, G. M. Kepler, and J. S. Kimbell, "Effects of differences in nasal anatomy on airflow distribution: A comparison of four individuals at rest," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 36, no. 11, pp. 1870–1882, 2008.
- [85] K. Zhao, P. Dalton, G. C. Yang, and P. W. Scherer, "Numerical modeling of turbulent and laminar airflow and odorant transport during sniffing in the human and rat nose," *Chem. Senses*, vol. 31, no. 2, pp. 107–118, 2006.
- [86] K. Wang, T. S. Denney, E. E. Morrison, and V. J. Vodyanoy, "Numerical simulation of air flow in the human nasal cavity," *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. - Proc.*, vol. 7 VOLS, pp. 5607–5610, 2005.
- [87] A. C. Guyton i J. E. Hall, *Medicinska fiziologija*, 12. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2012.
- [88] <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/22-3-the-process-of-breathing/> - pristupljeno 20.02.2020.
- [89] J. S. Kimbell et al., "Characterization of deposition from nasal spray devices using a computational fluid dynamics model of the human nasal passages," *J. Aerosol Med. Depos. Clear. Eff. Lung*, vol. 20, no. 1, pp. 59–74, 2007.
- [90] P. Cole, "Nasal and Oral Airflow Resistors," *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 118, 1992.
- [91] D. Elad, R. Liebenthal, B. L. Wenig and S. Einav, "Analysis of air flow patterns in the human nose" *Med. & Biol. Eng. & Comput.*, vol. 31, no. 6, pp. 585-592., 1993.
- [92] G. H. Mlynski, "Physiology and Pathophysiology of Nasal Breathing" in *Nasal Physiology and Pathophysiology of Nasal Disorders*, T. M. Önerci, Ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 257-272, 2013.
- [93] P. Cole, "Biophysics of Nasal Airflow: A Review," *Am. J. Rhinol.*, vol. 14, no. 4, pp. 245–249, 2000.
- [94] <https://www.onzetra.com/> - pristupljeno 13.03.2020.
- [95] <https://www.baqsimi.com/> - pristupljeno 17.03.2020.
- [96] <https://www.astrazeneca.ca/content/dam/azca/downloads/productinformation/rhinocort-turbuhaler-consumer-information-leaflet-en.pdf> - pristupljeno 10.01.2020.
- [97] M. Pozzoli et al. "Dry Powder Nasal Drug Delivery: Challenges, Opportunities and a study of the commercial Teijin Puvlizer Rhinocort® device and formulation, " *Drug Dev. and Ind. Pharmacy*, vol. 42, no.10, pp. 1660-1668, 2016.
- [98] A. R. Khan, M. Liu, M. W. Khan, and G. Zhai, "Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route," *Journal of Controlled Release*, vol. 268. pp. 364–389, 2017.
- [99] M. I. Ugwoke, N. Verbeke, and R. Kinget, "The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 53, no. 1. pp. 3–22, 2001.

- [100] L. Salade, "Development and Characterization of formulations for the nose-to-brain delivery of ghrelin and the management of cachexia," Ph.D. dissertation, Fac. De Pharm., Université libre de Bruxelles, 2019.
- [101] <https://www.optinose.com/exhalation-delivery-systems/technical-overview> - pristupljeno 12.06.2020.
- [102] N. R. Hussein, H. K. Omer, A. M. A. Elhissi, and W. Ahmed, Advances in nasal drug delivery systems. Elsevier Inc., 2020.
- [103] N. T. Agnihotri and K. G. McGrath, "Allergic and nonallergic rhinitis," Allergy Asthma Proc., vol. 40, no. 6, pp. 376–379, 2019.
- [104] A. De Stefano, D. Cerrone, C. Baffa, and G. Kulamarva, "Nasal septal polyps: A report of two cases," B-ENT, vol. 4, no. 1, pp. 49–53, 2008.
- [105] J. Mullol, A. Obando, L. Pujols, and I. Alobid, "Corticosteroid Treatment in Chronic Rhinosinusitis: The Possibilities and the Limits," Immunol. Allergy Clin. North Am., vol. 29, no. 4, pp. 657–668, 2009.
- [106] European Medicines Agency, "List of nationally authorised medicinal products. Active substance: Fluticasone propionate", no. November, 2017.
- [107] European Medicines Agency, "List of nationally authorised medicinal products. Active substance: Budesonide", no. January 2017.
- [108] European Medicines Agency, "List of nationally authorised medicinal products. Active substance: Mometasone", no. January, 2018.
- [109] European Medicines Agency, "List of nationally authorised medicinal products. Active substance: Triamcinolone (topical and nasal formulations) ", no. March, 2018.
- [110] European Medicines Agency, "List of nationally authorised medicinal products. Active substance: Beclometasone", no. September, 2017.
- [111] European Medicines Agency, "List of nationally authorised medicinal products. Active substance: Dexamethasone (apart from centrally authorised products)", no. October, 2016.
- [112] [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr) "Tafen", sažetak opisa svojstava lijeka – pristupljeno 08.01.2020.
- [113] [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr) "Flixonase", sažetak opisa svojstava lijeka – pristupljeno 08.01.2020.
- [114] [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr) "Rinoco", sažetak opisa svojstava lijeka – pristupljeno 08.01.2020.
- [115] [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr) "Synaze", sažetak opisa svojstava lijeka – pristupljeno 08.01.2020.
- [116] [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr) "Dymista", sažetak opisa svojstava lijeka – pristupljeno 08.01.2020.
- [117] [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr) "Avamys", sažetak opisa svojstava lijeka – pristupljeno 08.01.2020.
- [118] [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr) "Bloctimo", sažetak opisa svojstava lijeka – pristupljeno 08.01.2020.
- [119] [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr) "Momanose", sažetak opisa svojstava lijeka – pristupljeno 09.01.2020.
- [120] [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr) "Mometazonfuroat Cipla", sažetak opisa svojstava lijeka – pristupljeno 09.01.2020.
- [121] [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr) "Nasonex", sažetak opisa svojstava lijeka – pristupljeno 08.01.2020.

- [122] [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr) "Nasacort", sažetak opisa svojstava lijeka – pristupljeno 08.01.2020.
- [123] M. Reiß and G. Reiß, "Epistaxis: Some aspects of laterality in 326 patients," *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 269, no. 3, pp. 905–909, 2012.
- [124] L. Y. Chong, K. Head, C. Hopkins, C. Philpott, S. Agm, and B. Mj, "Intranasal steroids versus placebo or no intervention for chronic rhinosinusitis ( Review ) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON," *Cochrane database Syst. Rev.*, vol. 4, no. 4, p. CD011996, 2016.
- [125] M. S. Benninger, "Epistaxis and its relationship to handedness with use of intranasal steroid spray," *Ear, Nose Throat J.*, vol. 87, no. 8, pp. 463–465, 2008.
- [126] P. Joice, P. Ross, G. Robertson, and P. White, "The effect of hand dominance on recurrent idiopathic paediatric epistaxis," *Clin. Otolaryngol.*, vol. 33, no. 6, pp. 570–574, 2008.
- [127] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dexamethasone> - pristupljeno 18.04.2020.
- [128] [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr), "Results for the term: deksametazon" - pristupljeno 18.04.2020.
- [129] [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dexamethasone-21-\\_sodium-hydrogen-phosphate#section=Structures](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dexamethasone-21-_sodium-hydrogen-phosphate#section=Structures) -pristupljeno 15.05.2020.
- [130] L. Illum, "Nasal drug delivery - Possibilities, problems and solutions," *J. Control. Release*, vol. 87, no. 1–3, pp. 187–198, 2003.
- [131] A. Hafner, D. Škrinjar, and J. Filipović-grčić, "Mogućnosti nazalne primjene lijekova," *Farm. Glas.*, vol. 70, no. 5, pp. 303–321, 2014.
- [132] C. Bitter, K. Suter-Zimmermann and C. Surber, "Nasal Drug Delivery in Humans," *Curr. Probl. Dermatol.*, vol. 40, pp. 20–35, 2011.
- [133] F. Buttini, P. Colombo, A. Rossi, F. Sonvico, and G. Colombo, "Particles and powders: Tools of innovation for non-invasive drug administration," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 2, pp. 693–702, 2012.
- [134] M. Rathananand et al., "Preparation of mucoadhesive microspheres for nasal delivery by spray drying," *Ind. J. Pharm. Sci.*, vol. 69, no. 5, pp. 651-657, 2007.
- [135] A. Sosnik and K. P. Seremeta, "Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 223, pp. 40–54, 2015.
- [136] M. Pačarić, "Mikrosfere temeljene na pektinu i hipromelozi za nazalnu primjenu natrijevog deksametazon fosfata," diplomski rad predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, 2020.
- [137] <https://www.meggle-pharma.com/en/lactose/3-granulac-200.html> - pristupljeno 20.04.2020.



- [138] <https://dfepharma.com/en/Excipients/Expertise/Oral-SolidDose/Lactose/Milled/Lactochem-Powder> - pristupljeno 20.04.2020.
- [139] <https://dfepharma.com/en/Excipients/Expertise/Oral-Solid-Dose/Lactose/Milled/Lactochem-Extra-Fine-Powder> – pristupljeno 20.04.2020.
- [140] P. J. Sheskey, W. G. Cook, C. G. Cable, "Handbook of Pharmaceutical Excipients," 8th edition., 2017.
- [141] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calcium-carbonate#section=Solubility> - pristupljeno 05.06.2020.
- [142] M. D. Romić et al., "Melatonin-loaded chitosan/Pluronic® F127 microspheres as in situ forming hydrogel: An innovative antimicrobial wound dressing," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 107, pp. 67–79, 2016.
- [143] Council of Europe, "European pharmacopoeia 8.0." Strasbourg: Council of Europe, 2013.
- [144] W. Kaialy, A. Alhalaweh, S. P. Velaga, and A. Nokhodchi, "Influence of lactose carrier particle size on the aerosol performance of budesonide from a dry powder inhaler," *Powder Technol.*, vol. 227, pp. 74–85, 2012.
- [145] F. Emami, A. Vatanara, E. J. Park, and D. H. Na, "Drying technologies for the stability and bioavailability of biopharmaceuticals," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 3, pp. 1–22, 2018.
- [146] B. Jurišić Dukovski et al., "Spray-dried nanoparticle-loaded pectin microspheres for dexamethasone nasal delivery," *Dry. Technol.*, vol. 37, no. 15, pp. 1915–1925, 2019.
- [147] A. Barišić, "Primjenjivost pektina i hipromeloze u pripravi mikrosfera s flutikazonpropionatom za nazalnu primjenu", diplomski rad predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, 2019.
- [148] M. Maury, K. Murphy, S. Kumar, L. Shi, and G. Lee, "Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 59, no. 3, pp. 565–573, 2005.
- [149] C. Karavasili and D. G. Fatouros, "Smart materials: In situ gel-forming systems for nasal delivery," *Drug Discov. Today*, vol. 21, no. 1, pp. 157–166, 2016.
- [150] [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2012/020114s023lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/020114s023lbl.pdf) - pristupljeno 23.07.2020.
- [151] M. Chaturvedi, M. Kumar, and K. Pathak, "A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system," *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, vol. 2, no. 4, pp. 215–222, 2011.
- [152] C. M. Oh, C. R. S. Siow, P. W. S. Heng, and L. W. Chan, "Impact of HPMC on the physical properties of spray-congealed PEG microparticles and its swelling effect on rifampicin dissolution," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 42, no. 3, pp. 403–411, 2016.

- [153] V. N. P. Le, E. Robins, and M. P. Flament, "Agglomerate behaviour of fluticasone propionate within dry powder inhaler formulations," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 80, no. 3, pp. 596–603, 2012.
- [154] A. Jüptner and R. Scherließ, "Spray dried formulations for inhalation—meaningful characterisation of powder properties," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 1, 2020.
- [155] A. Tanaka et al., "Nasal drug absorption from powder formulations: Effect of fluid volume changes on the mucosal surface," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 40, no. 2, pp. 212–219, 2017.
- [156] F. Ishikawa, M. Katsura, I. Tamai, and A. Tsuji, "Improved nasal bioavailability of elcatonin by insoluble powder formulation," *Int. J. Pharm.*, vol. 224, no. 1–2, pp. 105–114, 2001.
- [157] F. Ishikawa, M. Murano, M. Hiraishi, T. Yamaguchi, I. Tamai, and A. Tsuji, "Insoluble powder formulation as an effective nasal drug delivery system," *Pharm. Res.*, vol. 19, no. 8, pp. 1097–1104, 2002.
- [158] <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=SCOGS> – pristupljeno 22.04.2020
- [159] A. Giuliani et al., "In vivo nose-to-brain delivery of the hydrophilic antiviral ribavirin by microparticle agglomerates," *Drug Deliv.*, vol. 25, no. 1, pp. 376–387, 2018.
- [160] G. Pilcer, N. Wauthoz, and K. Amighi, "Lactose characteristics and the generation of the aerosol," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 3, pp. 233–256, 2012.
- [161] B. M. J. Tan, L. W. Chan and P. W. S. Heng, "Milling and Blending: Producing the Right Particles and Blend Characteristics for Dry Powder Inhalation" in *Pharmaceutical inhalation aerosol technology*, Third Edition, A. J. Hickey and S. R. P. Da Rocha Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 273-290, 2019.
- [162] M. A. Deli, "Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1788, no. 4, pp. 892–910, 2009.
- [163] P. Dolanjski, "Izrada mikrosfera s natrijevim deksametazon fosfatom: utjecaj sastava i brzine dotoka otopine pri sušenju raspršivanjem", diplomski rad predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, 2020.
- [164] N. Sandler, K. Reiche, J. Heinämäki, and J. Yliruusi, "Effect of moisture on powder flow properties of theophylline," *Pharmaceutics*, vol. 2, no. 3, pp. 275–290, 2010.
- [165] M. Y. Foo, N. Sawant, E. Overholtzer, and M. D. Donovan, "A Simplified Geometric Model to Predict Nasal Spray Deposition in Children and Adults," *AAPS PharmSciTech*, vol. 19, no. 7, pp. 2767–2777, 2018.
- [166] M. Lippmann, D. B. Yeates, and R. E. Albert, "Deposition, retention, and clearance of inhaled particles," *British Journal of Industrial Medicine*, 1980; 37:337-362, 1980.

- [167] S. P. Newman, J. E. Agnew, D. Pavia, and S. W. Clarke, "Inhaled aerosols: Lung deposition and clinical applications," *Clin. Phys. Physiol. Meas.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–20, 1982.
- [168] J. Xi, Z. Wang, D. Nevorski, T. White, and Y. Zhou, "Nasal and Olfactory Deposition with Normal and Bidirectional Intranasal Delivery Techniques: In Vitro Tests and Numerical Simulations," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 30, no. 2, pp. 118–131, 2017.
- [169] <https://www.apotheken-umschau.de/Medikamente/Beipackzettel/SOLUPEN-sine-Nasenspray-6082022.html> - pristupljeno 14.07.2020.
- [170] <https://www.apotheken-umschau.de/Medikamente/Beipackzettel/DEXA-RHINOSPRAY-N-sine-Nasenspray-6087485.html> - pristupljeno 14.07.2020.
- [171] B. L. Laube, "Devices for aerosol delivery to treat sinusitis," *J. Aerosol Med. Depos. Clear. Eff. Lung*, vol. 20, no. SUPPL. 1, 2007.
- [172] N. Salaria, N. Sharma, U. Garg, S. K. Saluja, and R. Agarwal, "Inflammatory Septal Nasal Polyp.," *Iran. J. Otorhinolaryngol.*, vol. 27, no. 81, pp. 319–31923, 2015.
- [173] S. B. Patil and K. K. Sawant, "Chitosan microspheres as a delivery system for nasal insufflation," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 84, no. 2, pp. 384–389, 2011.
- [174] P. Russo et al., "Chimeral agglomerates of microparticles for the administration of caffeine nasal powders," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 14, no. 6, pp. 449–454, 2004.

## 9. Sažetak

### **Mikrosfere s deksametazonom u praškastom inertnom nosaču: karakterizacija farmaceutskog oblika i depozicija u silikonskom modelu nosne šupljine**

Stefanie Bobičanec i Mia Kobaš, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ključne riječi: nazalna primjena; deksametazon; mikrosfere; praškasti nosač

Nazalna primjena primarni je izbor puta primjene kortikosteroida u liječenju bolesti nosa i sinusa, jer se terapijski učinak može postići pri manjoj dozi i uz manju mogućnost razvoja nuspojava u odnosu na sistemsku primjenu. Suvremena istraživanja usmjerena su na nadilaženje glavnih ograničavajućih čimbenika nazalne primjene uključujući problem prolaska nosne valvule ispred turbinatne regije koja predstavlja ciljno mjesto dostave kortikosteroida te mukocilijarno čišćenje koje skraćuje vrijeme zadržavanja lijeka na nosnoj sluznici.

Cilj ovog istraživanja je pripremiti mikrosfere s deksametazonom polimernog sastava koji osigurava kontrolirano bubrenje te odabrati prikladni praškasti nosač mikrosfera i parametre primjene koji će osigurati ujednačenost doziranja i učinkovitu dostavu deksametazona u ciljnu (turbinatnu) regiju nosa. Prednost praškastih sustava u odnosu na konvencionalne tekuće oblike lijeka za nazalnu primjenu temelji se na većoj kemijskoj, fizičkoj i mikrobiološkoj stabilnosti suhog oblika te duljem zadržavanju na nosnoj sluznici.

Metodom sušenja raspršivanjem, uspješno su pripravljene mikrosfere građene od pektina i hipromeloze, sa sadržajem uklopljenog deksametazona od  $23,7 \pm 0,3\%$ ; (MD mikrosfere). Praškasti sustavi MD mikrosfera (medijan volumne raspodjele  $2,69 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ) i inertnog nosača (laktoze monohidrata, sorbitola, manitola, kalcijevog karbonata i magnezijevog stearata, veličine čestica 45-63  $\mu\text{m}$ ) pripremljeni su miješanjem u omjeru 1:9 (*m/m*) uz zadovoljene kriterije homogenosti. Uočena je pozitivna korelacija između Carrovog indeksa i kuta raspršenja insuflatorom MIAT® (Pearsonov koeficijent korelacije 0,8759). Praškasti sustavi s laktoza monohidratom, sorbitolom i manitolom osigurali su bubrenje mikrosfera, bolja svojstva tečenja, prikladniji kut raspršenja i učinkovitiju dostavu lijeka u ciljanu turbinatnu regiju silikonskog modela nosne šupljine u odnosu na MD mikrosfere s bez inertnog nosača. Usto, navedeni praškasti sustavi zadovoljavaju zahtjeve za farmaceutsku kakvoću s obzirom na isporučenu masu pri primjeni. Najučinkovitija dostava deksametazona u turbinatnu regiju ( $40,5 \pm 3,5\%$  do  $47,9 \pm 4,6\%$  primijenjene doze) postignuta je pri kutu primjene od  $60^\circ$  prema horizontalnoj ravnini i simulaciji zadržavanja daha (protok zraka kroz nosnu šupljinu od 0 l/min), te su navedeni parametri primjene prepoznati kao parametri izbora za razvijene praškaste sustave.

Rezultati provedene sveobuhvatne *in vitro* karakterizacije upućuju na veliki potencijal razvijenih praškastih sustava MD mikrosfera i inertnog nosača za nazalnu primjenu deksametazona, te su omogućili probir praškastih sustava za *in vivo* ispitivanja njihovog međudjelovanja sa sluznicom nosa.

## 10. Summary

### **Dexamethasone-loaded microspheres blended with inert powder carrier: characterisation of pharmaceutical formulation and deposition within silicone nasal cavity model**

Stefanie Bobičanec and Mia Kobaš, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Keywords: nasal administration; dexamethasone; microspheres; powder carrier

Administration of corticosteroid via the nasal route in the treatment of diseases of the nose and paranasal sinuses is the method of choice, since the therapeutic effect may be visible at a lower dose and has less occurrence of adverse effects compared to systemic delivery. Current investigations are focused on surpassing the main limiting aspects of nasal drug delivery including the hindering effect of nasal valves on the drug's passage to its targeted turbinate region and the mucociliary clearance that reduces its retention time on the nasal mucosa.

The aim of this study is to develop dexamethasone-loaded microspheres of defined polymer content that ensures controlled swelling behavior and to select an inert powder carrier, as well as to establish administration parameters that will ensure uniform and effective dexamethasone delivery to the targeted (turbinate) region of the nasal cavity. Advantages of nasal powder dosage forms over the conventional liquid formulations include improved chemical, physical and microbiological stability distinctive for dry forms, along with prolonged contact with the nasal mucosa.

Spray-dried microspheres consisting of pectin and hypromellose were successfully produced with dexamethasone content of  $23.7 \pm 0.3\%$ ; (MD microspheres). Nasal powders were obtained by mixing MD microspheres (volume median diameter of  $2.69 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ) with an inert carrier (lactose monohydrate, sorbitol, mannitol, calcium carbonate, magnesium stearate, particle size 45-63  $\mu\text{m}$ ) at 1:9 (*w/w*) ratio, assuring the homogeneity of the mixtures. Positive correlation between the Carr's index and plume angle obtained by MIAT<sup>®</sup> insufflator was observed (Pearson's correlation coefficient of 0.8759). Nasal powders containing lactose monohydrate, sorbitol and mannitol ensured swelling of the MD microspheres and, compared to MD microspheres without inert carrier, demonstrated improved rheological properties, spray cone angle and drug delivery to the targeted turbinate region of the silicone nasal cavity model. Also, mentioned powders meet the pharmaceutical quality requirements considering the mass delivered upon administration. The most effective dexamethasone deposition in the turbinate region ( $40.5 \pm 3.5\%$  to  $47.9 \pm 4.6\%$  of the applied dose) was recorded at administration angle of  $60^\circ$  from the horizontal plane and at breath hold (inspiratory flow rate of 0 l/min), hence the featured administration parameters were identified as parameters of choice for the developed nasal powders.

Results of the comprehensive *in vitro* characterization called attention to the considerable potential of the developed dexamethasone nasal powders comprising MD microspheres and inert carrier, and enabled selection of the most promising ones for *in vivo* experiments of their interactions with the nasal mucosa.

## Prilozi



Mia Kobaš &lt;mia.kobas10@gmail.com&gt;

---

**RE: Obtain permission request - Book (1028054)**

---

**Vethakkan, Anita Mercy (ELS-CHN)** <A.Vethakkan@elsevier.com>  
Prima: "mia.kobas10@gmail.com" <mia.kobas10@gmail.com>

4. srpnja 2020. u 08:51



Dear Miss Mia Kobaš

We hereby grant you permission to reprint the aforementioned material at no charge **in your thesis, in print and on the University web site** subject to the following conditions:

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.
2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

“This article was published in Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Page Nos, Copyright Elsevier (or appropriate Society name) (Year).”

3. Your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form.
4. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.
5. This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form other than as specified above. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.
6. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Kind Regards

Anita

**Anita Mercy**

Senior Copyrights Coordinator – Copyrights Team

**Elsevier** | Health Content Operations

(A division of Reed Elsevier India Pvt. Ltd.)

Ascendas International Tech Park, Crest – 12th Floor|Taramani, Chennai 600113 • India|

Tel: +91 4442994696

[a.vethakkan@elsevier.com](mailto:a.vethakkan@elsevier.com)

[Permissions Helpdesk please visit - Permissions Helpdesk Support Center](#)

Join the Elsevier Connect Community

[www.elsevier.com](http://www.elsevier.com)

[Twitter](#) | [Facebook](#) | [LinkedIn](#) | [Google+](#)

---

**From:** [mia.kobas10@gmail.com](mailto:mia.kobas10@gmail.com) <[mia.kobas10@gmail.com](mailto:mia.kobas10@gmail.com)>  
**Sent:** Thursday, July 2, 2020 1:59 PM  
**To:** Rights and Permissions (ELS) <[Permissions@elsevier.com](mailto:Permissions@elsevier.com)>  
**Subject:** Obtain permission request - Book (1028054)

\*\*\* External email: use caution \*\*\*

**Submission ID:** 1028054  
**Date:** 02 Jul 2020 9:28am

**Name:** Miss Mia Kobaš  
**Institute/company:** Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Address:** A. Kovačića 1  
**Post/Zip Code:** 10 000  
**City:** Zagreb  
**State/Territory:** Zagreb  
**Country:** Croatia  
**Telephone:** +385992878180  
**Email:** [mia.kobas10@gmail.com](mailto:mia.kobas10@gmail.com)

**Type of Publication:** Book

**Title:** Plastic Surgery 3rd Edition, Volume 2: Aesthetic Surgery  
**ISBN:** 9781455710539  
**Auhtors:** Richard Warren; Peter Neligan  
**Year:** 2013  
**From page:** 384  
**To page:** 386  
**Chapter number:** 17  
**Chapter title:** Nasal analysis and anatomy

**I would like to use:** Figure(s)

**Quantity of material:** 2  
**I am the author of the Elsevier material:** No  
**Elsevier author is involved in my project:** No



22. 08. 2020.

Gmail - RE: Obtain permission request - Book (1028054)

In what format will you use the material: Print and Electronic

Translation: Yes, not including English language

Language(s): Croatian

**Proposed use:** Reuse in a thesis/dissertation

**Additional Comments / Information:** I kindly request You process this permission request as soon as possible since the deadline for submitting my paper is July 17th. Thank You!

ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Jul 05, 2020

---



---

This Agreement between Faculty of Pharmacy and Biochemistry -- Mia Kobaš ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4862550922417
License date	Jul 05, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Advances in Colloid and Interface Science
Licensed Content Title	Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers
Licensed Content Author	Alejandro Sosnik, Katia P. Seremeta
Licensed Content Date	Sep 1, 2015
Licensed Content Volume	223
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	15
Start Page	40
End Page	54
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation

Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	Dexamethasone-loaded microspheres blended with inert powder carrier: dosage form properties and deposition within silicone nasal cavity model
Institution name	Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Expected presentation date	Aug 2020
Portions	Figure 1
Specific Languages	Croatian
Requestor Location	Faculty of Pharmacy and Biochemistry A. Kovačića 1 Zagreb, Zagreb 10 000 Croatia Attn: Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

## INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

### LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

### **Preprints:**

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

**18. For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

**19. Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

#### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

#### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant

DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

## 20. Other Conditions:

v1.9

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

---

---