Razvoj in situ gelirajućeg pektinskog sustava kao platforme za nazalnu primjenu lijekova

Zečević, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:796469

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Lucija Zečević

Razvoj *in situ* gelirajućeg pektinskog sustava kao platforme za nazalnu primjenu lijekova

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na stručnom vodstvu, savjetima i susretljivosti prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Hvala Lauri Nižić, mag. pharm, na strpljenju i pomoći koju mi je pružila tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Hvala Ivi Krtalić, mag. pharm, iz Plive d.o.o. na pomoći oko mjerenja osmolalnosti sustava.

Hvala kolegici Luciji Čotić i svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na ugodnom društvu tijekom boravka u prostorijama zavoda.

I na kraju, posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi pružili nesebičnu podršku i bili oslonac tijekom cijelog studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
   1.1. Nazalna primjena lijekova 1
      1.1.1. Gelovi za nazalnu primjenu 3
      1.1.2. *In situ* gelirajući sustavi za nazalnu primjenu 4
   1.2. Pektin 8
      1.2.1 Geliranje pektina 10
      1.2.2. Upotreba pektina u farmaceutskoj industriji 12
   1.3. H_1-antihistaminici 13
      1.3.1. Prometazin 15
2. OBRAZLOŽENJE TEME 17
3. MATERIJALI I METODE 19
   3.1. MATERIJALI 19
   3.2. METODE 20
      3.2.1. Priprema pektinskih *in situ* gelirajućih sustava 20
      3.2.2. Ispitivanje reoloških svojstava 21
      3.2.3. Određivanje osmolalnosti 23
      3.2.4. *In vitro* oslobođanje lijeka 23
      3.2.5. Određivanje količne *in vitro* oslobođenog lijeka 24
4. REZULTATI I RASPRAVA 25
   4.1. Reološka svojstva 25
      4.1.1. Viskoznost pektinskih *in situ* gelirajućih sustava 25
      4.1.2. Oscilacijska mjerenja 26
   4.2. Osmolalnost 31
   4.3. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja 33
5. ZAKLJUČCI 35
6. LITERATURA 36
7. SAŽETAK/SUMMARY 42

1. UVOD

1.1. Nazalna primjena lijekova

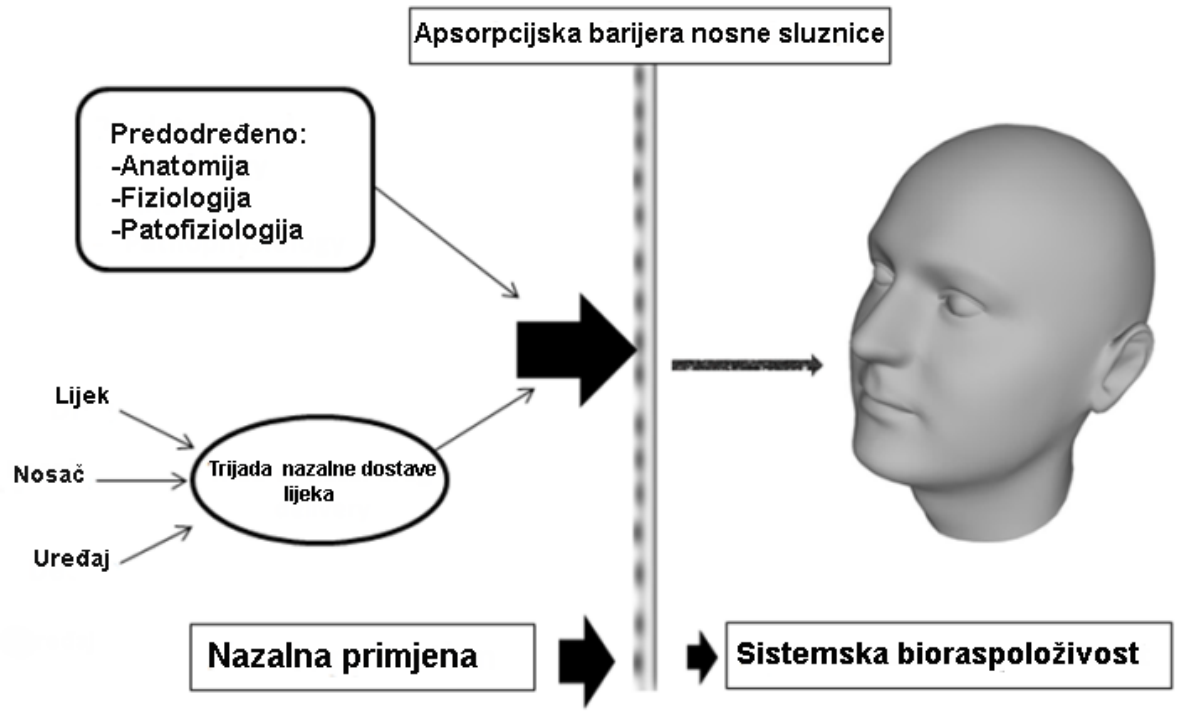
Iako se nazalna primjena lijekova tradicionalno koristi u liječenju lokalnih bolesti nosne sluznice, ona predstavlja i put primjene kojim je moguće postići sistemski učinak. Zbog mnogih prednosti takav način primjene lijeka sve se više koristi u praksi. Međutim, postoje i određena ograničenja koja treba uzeti u obzir pri razvoju terapijskih sustava za nazalnu primjenu (Jadhav i sur., 2007).

Epitel nosne sluznice prekriven je mikrovilima pa ona ima veliku površinu što je čini pogodnom za brzu apsorpciju lipofilnih lijekova. Subepitel je vrlo dobro prokrvljen te osigurava sistemsku biorasopoloživost lijeka uz izbjegavanje prvog prolaska kroz jetru i kemijske i enzimske razgradnje u probavnom sustavu. Ovaj način primjene je jednostavan i neinvazivan pa je i adherencija prema terapiji olakšana (Ghori i sur., 2015). Moguće je postići i direktan prijenos nazalno primijenjenog lijeka u središnji živčani sustav putem olfaktornog neuroepitela (Talegaonkar i Mishra, 2004). Budući da nosna sluznica predstavlja prvu liniju obrane respiratornog sustava od infekcija, nazalna primjena cjepiva protiv, primjerice, gripe danas predstavlja dobru alternativu parenteralnoj primjeni te osigurava indukciju i sistemskog i lokalnog imunosnog odgovora. Osim toga, nazalni put primjene cjepiva ne zahtijeva sterilnu tehniku doziranja što predstavlja značajnu prednost u nerazvijenim dijelovima svijeta (Constantino i sur., 2007).

Među ograničenjima nazalne primjene lijekova potrebno je istaknuti mukocilijarni klirens. Taj nespecifični mehanizam čišćenja ograničava vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu primjene. Naime, 50% primijenjenog lijeka ukloni se navedenim mehanizmom iz nosne šupljine za samo 15-20 minuta (Marttin i sur., 1998). Također, maksimalni volumen otopine/suspenzije koji se može primijeniti u nosnicu je 200 μL. U slučaju primjene većeg volumena može doći do curenja lijeka iz nosa ili niz grlo, što dodatno smanjuje bioraspoloživost. Mogućnost enzimske razgradnje još je jedan od ograničavajućih faktora koje treba uzeti u obzir. Peptidi i proteini su podložni razgradnji djelovanjem egzo- i endopeptiaza prisutnih u nosnom epitelu (Grassin-Delyle, 2012).

Brzina i obim apsorpcije lijeka uvelike ovise o njegovim fizičko-kemijskim svojstvima, kao što su koeficijent raspodjele, pKa vrijednost, molekulska masa, veličina čestica i topljivost. Prvi korak u apsorpciji je prolazak kroz sluz koja prekiva sluznicu, što

može biti problematično za veće čestice. Nakon toga slijedi prijenos lijeka kroz sluznicu transcelularnim i paracelularnim transportom, ovisno o svojstvima same molekule. Transcelularnim prijenosom, odnosno prolaskom kroz epitelne stanice, apsorbiraju se lipofilne molekule i molekule koje imaju odgovarajuće transportere. Nasuprot tome, prolazak molekula čvrstim međustaničnim vezama epitelnih stanica (tj. paracelularnim transportom) spor je i pasivan (Ghori i sur., 2015). Posljedično, pri nazalnoj primjeni hidrofilnih lijekova velike molekulske mase s ciljem postizanja sistemske raspoloživosti, potrebno je koristiti promotore apsorpcije (Touitou i Illum, 2013). S druge strane, kod lijekova molekulske mase manje od 300 Da apsorpcija ne ovisi značajno o fizičko-kemijskim svojstvima. Stupanj ionizacije ima stanovit utjecaj na apsorpciju, s obzirom da je samo neionizirana frakcija difuzibilna (Kaur i sur., 2015). Treba uzeti u obzir i osjetljivost nosne sluznice te potencijalni iritirajući učinak nekih lijekova i ekscipijensa (Ugwoke i sur., 2005). Svojstva same formulacije poput osmolalnosti, pH i viskoznosti također su od velike važnosti (Jadhav i sur., 2007). Dakle, pri razvoju terapijskih sustava za nazalnu primjenu postoje mnogi faktori koje je potrebno razmotriti (Slika 1.).



Slika 1. Razmatranja pri razvoju nazalnih terapijskih sustava (preuzeto i prilagođeno prema Ghori i sur., 2015)

Budući da se nazalni put primjene uglavnom koristi za terapiju lokalnih oboljenja, tim putem se najčešće primjenjuju dekongestivi, antihistaminici i kortikosteroidi. Za lokalni učinak antihistaminika i kortikosteroida potrebne su relativno niske doze. Posljedično, u odnosu na oralnu primjenu ovih lijekova, nazalna primjena smanjuje rizik od sistemskih nuspojava (Constantino, 2007). U slučaju sistemske primjene lijeka putem nazalne sluznice, glavna prednost je brz početak djelovanja što je korisno kod liječenja boli, migrene, erektilne disfunkcije, insomnije, frigidnosti, valunga, mučnine, rigidnosti kod Parkinsonove bolesti, kardiovaskularnih događaja te napadaja Alzheimera i multiple skleroze (Touitou i Ilum, 2013). U Hrvatskoj je, primjerice, odobren Imigran 20 mg sprej za nos koji sadrži sumatriptan i koristi se protiv napadaja migrene (Halmed, 2018). Osim toga, nazalna primjena predstavlja alternativu oralnoj primjeni za lijekove koju imaju nisku oralnu bioraspoloživost i stabilnost, poput proteina i peptida. Međutim, oni su velike polarne molekule, zbog čega se slabo apsorbiraju preko bioloških membrana, pri čemu im se bioraspoloživost kreće od 1 do 2% (Alagusundaram i sur., 2010). Posljedično, raste potreba za novim i poboljšanim promotorima apsorpcije (Ilum, 2012).

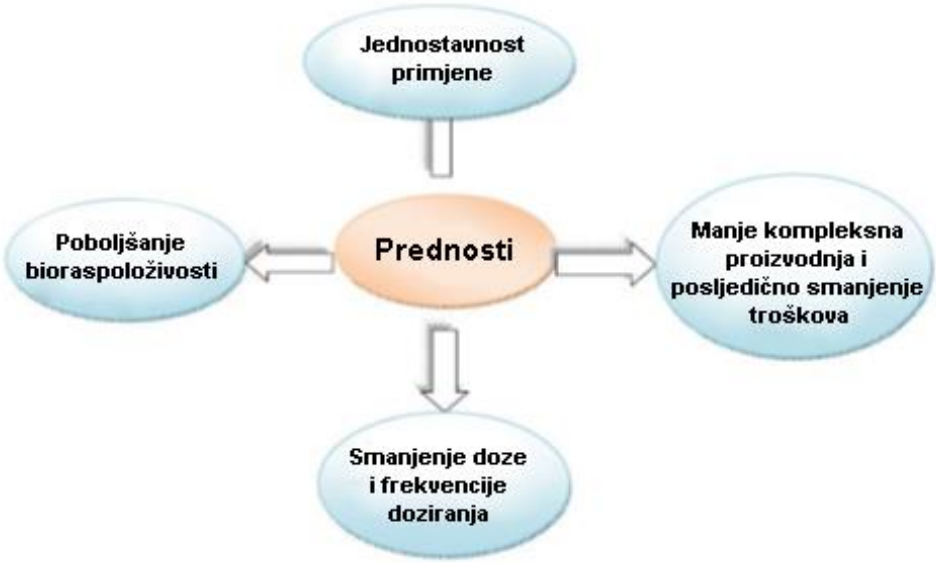
1.1.1. Gelovi za nazalnu primjenu

Gel je polučvrsti oblik koji se sastoji od najmanje dvije sastavnice, u kojem jedna od njih stvara trodimenzionalnu strukturnu mrežu putem kovalentnih ili nekovalentnih interakcija u mediju druge, koja je tekućina prisutna u značajnoj količini (Rogovina i sur., 2008; Almdal i sur., 1993). Gelovi za nazalnu primjenu razvijaju se s ciljem osiguravanja produljenog zadržavanja pripravka na sluznici. Pokazuju raznolika reološka svojstva te mogu varirati od viskoznih tekućina, kao što su gelovi hipromeloze, metilceluloze, ksantan gume i kitozana, do jako čvrstih gelova gelan gume, pektina i alginata. Zbog povećane viskoznosti smanjuje se curenje pripravka iz nosa i niz grlo. Međutim, zbog istog razloga njihova je primjena otežana. Naime, zbog svoje viskoznosti gelovi imaju loša svojsta rasprostiranja, pa će oni bez posebnih tehnika primjene zauzimati samo usko područje na koje su direktno primijenjeni (Ghori i sur., 2015; Kublik i Vidgren, 1998).

1.1.2. *In situ* gelirajući sustavi za nazalnu primjenu

In situ gelirajući sustavi su razvijeni da bi se izbjegli problemi prisutni kod primjene klasičnih gelova. Riječ je o sustavima koji su nisko-viskozne otopine koje se lako primjenjuju, a u kontaktu s nosnom sluznicom geliraju različtim mehanizmima (Madan i sur., 2009). Bioadhezivna svojstva pomažu u očuvanju kontakta između sustava i mukoze. Nakon geliranja dolazi do razgradnje i uklanjanja mukocilijarnim čišćenjem. Ovo predstavlja prednost jer to znači da nije potrebno uklanjanje dozirnog oblika nakon primjene (Sreeja i sur., 2014). Mehanizme geliranja možemo podijeliti u tri glavne skupine. Zbog jednostavne kontrole i praktičnosti termoreverzibilni gelovi su vjerojatno najviše proučavani polimerni sustavi reaktivni na okolinu. Prvi mehanizam je geliranje kao posljedica fiziološkog stimulansa, poput temperature, pH i prisustva iona. Nadalje, formiranje gela može biti posljedica kemijskih reakcija poput ionskog umrežavanja i fotopolimerizacije. Zadnju skupinu čine fizički mehanizmi koji se uglavnom temelje na bubrenju i difuziji (Kaur i sur., 2015; Swammy i Abbas, 2012).

In situ gelirajući sustavi imaju brojne prednosti, a neke od njih prikazane su na Slici 2 (Sreeja i sur., 2014). Tablica 1. donosi primjer istraživanih *in situ* gelirajućih sustava za nazalnu primjenu.



Slika 2. Prednosti *in situ* gelirajućih sustava (preuzeto i prilagođeno prema Sreeja i sur., 2014)

Tablica 1. Primjeri istraživanih *in situ* gelirajućih sustava za nazalnu primjenu

Djelatna tvar	Polimer	Cilj istraživanja	Komentar	Literatura
Razagilin mesilat	Poloksamer 407 i Poloksamer 188 (1:1) Carbopol 934 P Kitozan	Poboljašanje terapije Parkinsonove bolesti povećanjem bioraspoloživosti i dostave lijeka do mozga	Povećana bioraspoloživost i dostava lijeka do mozga bez iritiracije nosne sluznice	Ravi i sur., 2015
Mometazon furoat	Gelan guma	Razvoj novog terapijskog sustava za nazalnu primjenu mometazon furoata s ciljem poboljšanja ishoda liječenja alergijskog rinitisa	*In vivo* ispitivanjima u životinja utvrđen veći potencijal razvijenog sustava u odnosu na klasične nazalne suspenzije	Cao i sur., 2008
Metoklopramid HCl	Poloksamer 407 Carbopol 934P Polietilen glikol	Razvoj mukoadhezivnog *in situ* gelirajućeg sustava s ciljem smanjenja mukocilijarnog klirensa i poboljšane bioraspoloživosti lijeka	Produljeno zadržavanje, neiritabilnost i povećana bioraspoloživost u odnosu na oralno primijenjenu otopinu lijeka	Zaki i sur., 2007

Venlafaksin	Lutrol F127	Povećanje bioraspoloživosti lijeka	Dokazana netoksičnost za nosnu sluznicu uz povećanu bioraspoloživost u odnosu na oralne formulacije	Bhandwalkar i Avachat , 2013
Inzulin	Kitozan Polivinilalkohol	Razvoj *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu inzulina	Utvrđen obećavajući učinak na sniženje razine glukoze u krvi *in vitro* i *in vivo*	Agrawal i sur., 2010
Ketorolak trometamin	Pektin Kitozan	Razvoj sigurnog i bioadhezivnog *in situ* gelirajućeg sustava za sistemsku primjenu lijeka	Blagi iritirajući učinak na nosnu sluznicu	Chelladurai i sur., 2008
Metoprolol tartarat	Pluronic F127	Smanjenje mukocilijarnog klirensa i posljedično dulje zadržavanje na sluznici	Metoprolol tartarat ima intenzivan metabolizam prvog prolaska (40-60%) koji se ovim putem primjene izbjegava	Gaikwad, 2010
Sumatriptan	Pluronic F127 Carbopol 934P	Razvoj terapijskog sustava s odgvorajućim svojstvima za nazalnu primjenu	Povećano vrijeme zadržavanja i poboljšana apsorpcija; Značajno povećanje permeabilnosti	Majithiya i sur., 2006

			lijeka pri upotrebi Carbopola u koncetraciji ≥0,3%	
Ondansetron	Pluronic F127 Hidroksipropilmetil celuloza	Razvoj nazalnog terapijskog sustava zbog intenzivnog metabolizma lijeka prvim prolaskom kroz jetru i posljednično niske bioraspoloživosti	Utvrđena izraženija mukoadhezivnost i smanjeno rasprostiranje pri većoj koncentraciji mukoadhezivnog polimera	Bhalerao i sur., 2009
Salbutamol sulfat	Hidroksipropilmetil celuloza Natrijeva karboksimetil celuloza Kitozan Natrijev alginat	Razvoj *in situ* gelirajućeg umetka s ciljem zaobilaska prvog prolaska kroz jetru	Najopsežnije oslobađanje lijeka iz kitozanskih umetaka; Zadvoljavajuća mukoadhezivna svojstva uz mogućnost dostave lijeka kroz 12h	Farid i sur., 2013
Dimenhidrinat	Gelan guma Carbopol 934P	Razvoj nove formulacije zbog intenzivnog metabolizma lijeka prvim prolaskom kroz jetru i mogućeg gubitka lijeka povraćanjem	Stabilan, neiritabilan i efikasan sustav, praktičan za primjenu tijekom vožnje	Belgamwar i sur., 2009

Loratadin	Poloxamer 407 Carpobopol 934P	Povećanje bioraspoloživosti izbjegavanjem prvog prolaska kroz jetru	Stabilan i neiritabilan oblik s prikladnim mukoadhezivnim svojstvima i profilom oslobađanja lijeka	Singh i sur., 2013

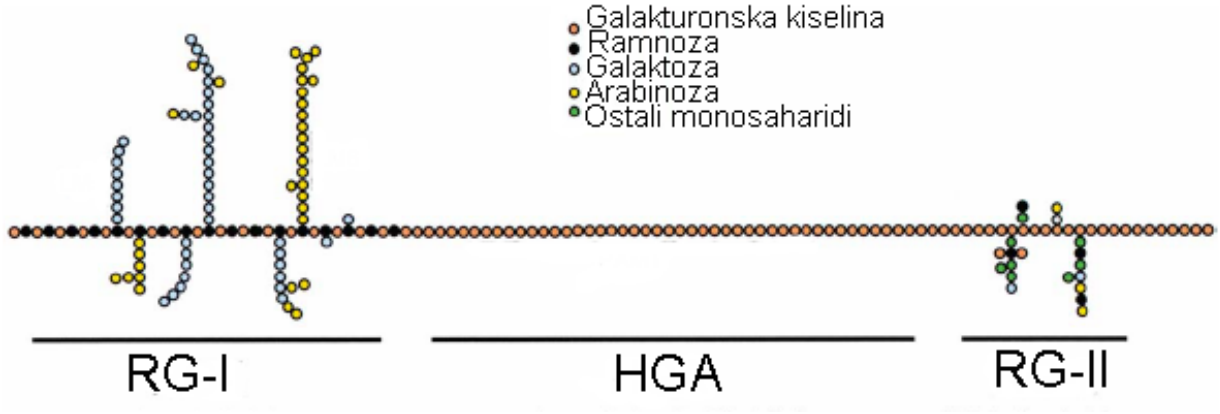
1.2. Pektin

Pektini su klasa kompleksnih polisaharida koje nalazimo u staničnim stijenkama viših biljaka gdje čine trećinu suhe tvari. Uz raširenu upotrebu u prehrambenoj industriji gdje je prisutan kao stabilizator, sredstvo za geliranje i ugušćivač, pektin ima i sve značajniju primjenu u farmaceutskoj industriji (Thakur i sur., 1997) .

Struktura

Pektin je linearni polisaharid čiji sastav varira ovisno o izvoru i uvjetima izolacije (Srivastava i Malviya, 2011). Homogalaktouronan (HG), ramnogalaktouronan I (RG-I) i ramnogalaktouronan II (RG-II) tri su glavna tipa polisaharida koji čine pektin. HG čini 65% pektina, a riječ je o homopolimeru koji se sastoji od 100-200 ostataka D-galakturonske kiseline (D-GalA) povezanih α-(1→4) glikozidnom vezom. Ova regija je poznata i pod nazivom "glatka regija". HG ostaci su parcijalno metoksilirani na O-6, te mogu biti i O-acetilirani na O-3 i O-2 (Mohnen, 2008). Udio metoksiliranih karboksilnih skupina naziva se stupanj esterifikacije (engl. *degree of esterification*, DE) i predstavlja jedno od ključnih svojstava za formiranje gela. Razlikujemo visoko metoksilirane pektine (engl. *high methoxyl*, HM), čiji je DE>50%, i nisko metoksilirane pektine (engl. *low methox*yl, LM), kojima je DE<50% (Munarin i sur., 2012). Iduća domena, RG-I, sastoji se od ponavljajuće disaharidne jedinice koju čine L-ramnoza (L-Rha) i D-galakturonska kiselina [→2)-L-Rha-α-(1→4)-D-GalA-α-(1→]$_n$, pri čemu n može biti veći od 100. Od ramnoze se pružaju postranični lanci različitih neutralnih šećera pa se ova regija naziva i "dlakavom regijom". U pravilu 20-80% ostataka ramnoze je supstituirano pri čemu na C-4 može biti vezan samo jedan ili čak 50 i više glikozidnih ostataka što rezultira velikom raznolikošću (Chan i sur., 2017). Najčešće je riječ o polimerima β-(1→4)-vezane D-galaktoze i α-(1→5)-vezanih L-arabinozil ostataka (Willats i

sur., 2001). RG-II čini 10 % pektina i ima kompleksnu i konzerviranu strukturu koja se sastoji od male srži koju čine α-(1→4)-D-GalA ostatci na koje su vezana 4 bočna lanca poznate duljine koji se sastoje od 12 različitih šećera povezanih s preko 20 različitih veza (Mohnen, 2008; Willats i sur., 2001). Razumijevanje organizacije ovih domena je bitno, no unatoč tome njihov točni prostorni raspored još je predmet rasprava. U tipičnom modelu pektin je predstavljen kao blok kopolimer u kojem se izmjenjuju "glatke" i "dlakave regije" (Slika 3.) (Munarin i sur., 2012).



Slika 3. Prikaz strukture pektina koja se sastoji od ramnogalaktouronan I (RG-I), homogalaktouronan (HG) i ramnogalaktouronan II (RG-II) domena (preuzeto i prilagođeno prema Willats i sur., 2001)

Proizvodnja

Komercijalni izvori pektina su komina jabuke i kora citrusa čijom ekstrakcijom nastaju pektini različitih svojstava. Ekstrakcija se uglavnom obavlja vrućim razrijeđenim kiselinama pri pH od približno 2 i temperaturi od 70°C. Pektin koji se najčešće dobiva industrijskom proizvodnjom je HM pektin s DE>70%, a LM pektin se proizvodi iz njega deesterifikacijom. Jedan od glavnih načina deesterifikacije je deesterifikacija uz amonijak pri čemu nastaje amidirani nisko metoksilirani pektin (engl. *amidated low methoxyl*, ALM) (May, 1990).

Svojstva

Pektin je topljiv u vodi pri čemu se njegove razrijeđene otopine ponašaju kao Newtonove tekućine. Pri umjerenim koncentracijama one pokazuju pseudoplastično ponašanje koje postaje izraženije s porastom koncentracije. Kada se pektin doda u vodu on se brzo hidratizira uz nastanak grudica koje sadrže polusuhe džepove i čija će daljnja hidratacija biti jako spora. Do spontane razgradnje pektina dolazi procesima deesterifikacije i depolimerizacije, pri čemu HM i LM pektini pokazuju različitu stabilnost. Stabilnost ovisi o pH i temperaturi čijim porastom dolazi do smanjenja viskoznosti i mogućnosti geliranja. LM pektin pokazuje bolju stabilnost ne samo u otopini, već i u suhom obliku (Srivastava i Malviya, 2011; Sriamornsak, 2003).

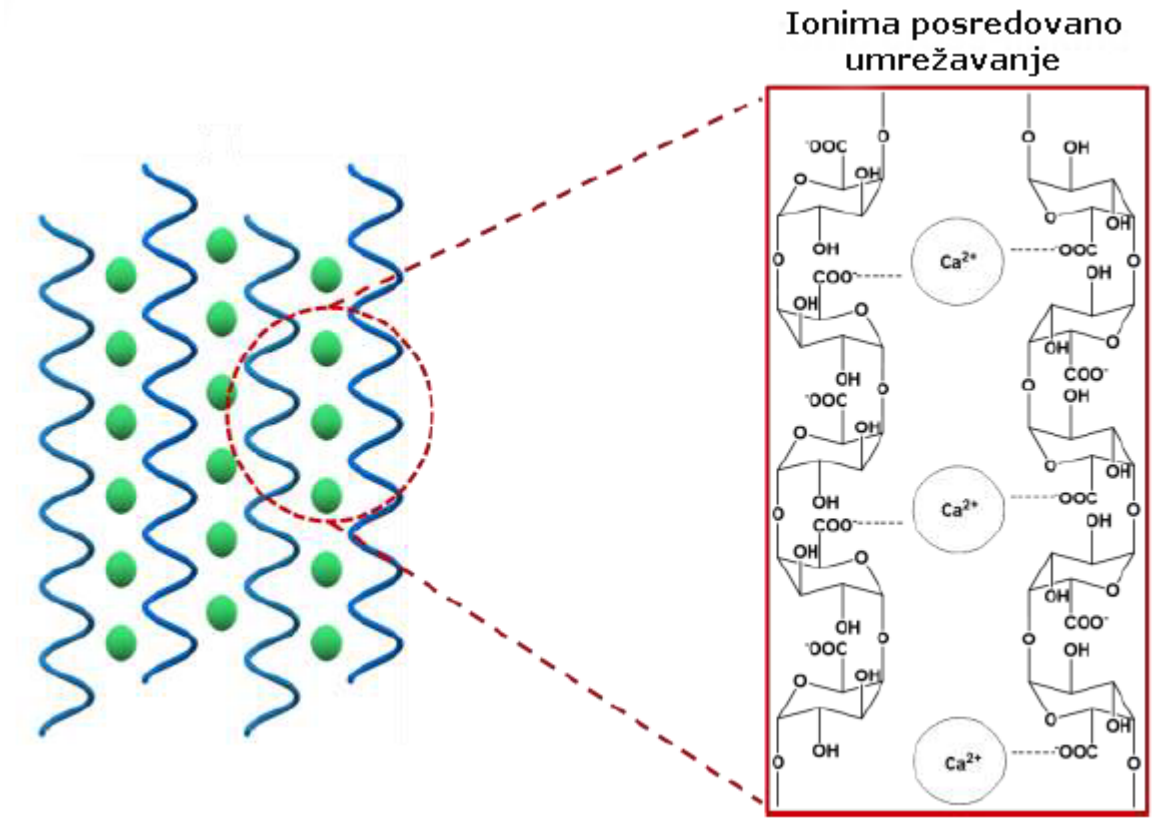
Uz HM, LM i ALM pektine za prihvatljiv dnevni unos (engl. *acceptable daily intake* – ADI) stoji oznaka "nije specificirano", što znači da je temeljem biokemijskih, kemijskih i toksikoloških podatka utvrđeno da je riječ o tvarima jako niske toksičnosti (JECFA, 2016) . U SAD-u pektin ima i GRAS (engl. *generaly recognised as safe*) status, što znači da je prepoznat kao siguran (FDA, 2017), dok u Europi ima dodijeljenu E440 oznaku prehrambenog aditiva (EFSA, 2017).

1.2.1 Geliranje pektina

Upravo je geliranje pektina ključno svojstvo na kojem se temelji njegova sve raširenija upotreba. Molekulska masa, stupanj i raspored esterifikacije intrinzična su svojstva koja određuju način i obujam geliranja te svojstva nastalog gela. Osim toga vanjski parametri poput pH, prisutnosti suotapala, prisutnosti kationa i temperature također imaju značajan utjecaj na reološka svojstva nastalog gela (Chan i sur., 2017).

HM pektin gelira pri pH<3,5 i masenoj koncentraciji šećera ili nekog drugog suotapala preko 55% (Munarin i sur., 2012). Za nastanak gela odgovorne su nekovalentne interakcije, odnosno hidrofobne i vodikove veze. Kod kiselog pH većina karboksilnih skupina je u neioniziranom stanju što smanjuje privlačenje vode i odbojne sile između inače negativno nabijenih pektinskih molekula, a uloga šećera je dodatna dehidracija čime se promiču hidrofobne interakcije između metilesterskih skupina. Budući da broj hidrofobnih interakcija ovisi i o stupnju esterifikacije, s njegovim porastom dolazi do porasta brzine geliranja i formiranja gela pri nižim koncentracijama šećera (Sriamornsak, 2003).

S druge strane geliranje LM pektina odvija se u širokom pH rasponu, sa ili bez šećera, u prisutnosti dvovalentnih kationa, prvenstveno kalcija. Taj proces slijedi takozvani "*egg-box*" model (u doslovnom prijevodu model kutije za jaja) koji je prvotno predložen za alginat. Prvi korak je dimerizacija koja započinje vezanjem Ca^{2+} iona za dva homogalaktouronanska lanca uzrokujući njihovo poravnavanje što za posljedicu ima olakšavanje vezanja sljedećeg kalcija. Dakle, dolazi do Ca^{2+} ionima posredovanog stvaranja dimera kooperativnim povezivanjem paralelno usmjerenih lanaca (Slika 4.), pri čemu je za stabilnost ovakve sekvencije potrebno sudjelovanje barem šest uzastopnih karboksilnih skupina na oba lanca. Prisustvo metoksiliranih karboksilnih skupina ograničava stvaranje ovakvih asocijacija pa se sa smanjenjem stupnja esterifikacije povećava sposobnost geliranja. Osim elektrostatskih interakcija i vodikove veze stabiliziraju stvaranje ovakvog kompleksa. Idući korak je agregacija prethodno stvorenih dimera u tetramere, heksamere, itd. (Chan i sur., 2017).



Slika 4. Shematski prikaz vezanja Ca^{2+} iona na poligalaktouronanske sekvencije pektina (preuzeto i prilagođeno prema Chan i sur., 2017)

Nove studije ukazuju na postojanje drugih mehanizama geliranja LM pektina neovisnih o kalciju kod niskog pH uslijed konformacijske promjene (Gilsenan i sur., 2000).

ALM pektini geliraju pri nižim koncentracijama kalcija uz smanjenu sklonost precipitaciji pri višim koncentracijama (May, 1990). Međutim, Capel i suradnici (2006) su u svojoj studiji ukazali na odsustvo povezanosti amidacije i smanjene osjetljivosti na razine kalcija, te snažno preferiranje geliranja pri niskom pH. Naime, u tim uvjetima dolazi do stvaranja vodikovih veza između amidnih skupina ALM pektina.

1.2.2. Upotreba pektina u farmaceutskoj industriji

Pektin je pronašao široku upotrebu ne samo u prehrambenoj industriji već i u biomedicinskom području. On je prirodni profilaktik koji veže toksične katione te se pokazao učinkovitim u uklanjanju željeza i olova iz probavnog i dišnog sustava. Smanjuje i vrijeme potrebno za koagulaciju pa je koristan kod zaustavljanja krvarenja (Thakur i sur., 1997). Postoje dokazi da snižava razinu kolesterola u dozama većim od 6 g na dan (Brouns i sur., 2012). Koristi se u pastilama kao demulcent i pomaže pri cijeljenju rana. Primjenjuje se i protiv dijaree, a zbog imobilizacije hrane koristan je i u terapiji pretilosti (Srivastava i Malviya, 2011).

U novije vrijeme razvija se sve više terapijskih sustava koji se temelje na pektinu. Razlog su svojstva poput sigurnosti primjene, povoljne cijene, dostupnosti, mukoadhezivnosti, stabilnosti pri niskom pH i specifičnih mehanizama geliranja ovisnih o pH i prisustvu Ca^{2+}. Razvijaju se različiti farmaceutski oblici uključujući hidrogelove, filmove, tablete, mikro- i nanočestice koje pokazuju mogućnost kontroliranog oslobođanja uklopljenog lijeka (Mishra i sur., 2012). Zbog odsustva enzima potrebnih za razgradnju pektina u slini i želucu, do degradacije dolazi tek u debelom crijevu djelovanjem intestinalne mikroflore. Mogućnost zaštite od gastrointestinalnih enzima je bitna kod proteina i peptida zbog njihove podložnosti razgradnji, dok je ciljano oslobađanje lijekova u debelom crijevu korisno kod Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa i karcinoma crijeva (Liu i sur., 2003; Sriamornsak, 2003). Još jedno zanimljivo svojstvo je sposobnost modificiranih pektina da se vežu na galektin-3 i inhibiraju njegove funkcije. Galektin-3 je protein koji je uključen u progresiju više različitih vrsta tumora. Testiranja na životinjama su pokazala obećavajuće rezultate kod nekoliko različitih vrsta karcinoma (Nangia-Makker i sur., 2002).

U području okularne primjene lijekova, istraživanja s pektinskim nanočesticama pokazala su određene prednosti u odnosu na tradicionalne terapijske sustave. Vrijeme zadržavanja i bioraspoloživost uklopljenog lijeka su povećani, dok su neki negativni učinci

poput zamućenja vida smanjeni (Sharma i sur., 2011). Vaginalno su pektinski sustavi korišteni kao pomoć kod suhoće rodnice, ali i kao nosači lijekova (Valenta, 2005). Bioadhezivne vaginalne tablete pripravljene iz smjese Carbopola 934 i pektina u masenom omjeru 2:1 istraživane su zajedno s nekim drugim kombinacijama polimera, pri čemu su pokazale najbolju bioadhezivnost, svojstva bubrenja i najmanju redukciju pH u odnosu na ostale istraživane smjese (Baloğlu i sur., 2003).

Nazalna primjena pektinskih sustava

Kod nazalnog puta primjene bioadhezivni *in situ* gelirajući pektinski sustavi su dobra alternativa klasičnim vodenim otopinama, pružajući dulje zadržavanje na mjestu primjene i mogućnost moduliranja oslobađanja lijeka. PecSys™ je patentirani terapijski sustav koji se temelji na vodenoj otopini LM pektina koja gelira u kontaktu s nosnom sluznicom. Prikladan je ne samo za nazalnu već i vaginalnu i okularnu primjenu. Gel se formira *in situ* kao posljedica interakcije s kalcijevim ionima. Ovakav sustav osigurava produljeno zadržavanje na mjestu primjene i modificirani farmakokinetički profil s još uvijek brzom apsorpcijom, ali moduliranom vršnom koncentracijom lijeka u plazmi u odnosu na primjenu klasične otopine lijeka. PecFent® (Archimedes) je primjer proizvoda koji koristi PecSys tehnologiju za brzo i efikasno liječenje napadaja maligne boli fentanilom (EMA, 2018; Watts i Smith, 2009).

1.3. H_1-antihistaminici

Histamin je jedan od glavnih medijatora upale i alergijskih reakcija koji svoje učinke ostvaruje preko specifičnih receptora (H_1, H_2, H_3 i H_4). H_1-receptori su histaminski receptori prisutni na endotelu, stanicama glatkih mišića i živčanim završecima. Spadaju u superporodicu s G-proteinom spregnutih receptora te sudjeluju u histaminom posredovanim procesima poput vazodilatacije, povećanja permeabilnosti krvnih žila, stvaranja edema, vazokonstrikcije većih žila, boli, svrbeža, peckanja, bronhokonstrikcije i kontrakcije gastrointestinalnih mišića (Brunton i sur., ured., 2011).

H_1-antihistaminici su inverzni agonisti H_1-receptora. Naime, H_1-receptori postoje u ravnoteži između aktivnog i inaktivnog stanja, a vezanjem histamina stabilizira se aktivna konformacija. H_1-antihistaminici ne antagoniziraju vezanje histamina, već se vežu na drugo vezno mjesto i pomiču ravnotežu prema inaktivnom stanju. Dakle, oni djeluju na suprotan način i njihove je učinke lako predvidjeti iz poznavanja posljedica aktivacije H_1-receptora histaminom. Većina antihistaminika ima slično djelovanje i terapijsku primjenu. Dijele se na

prvu i drugu generaciju lijekova čija su glavna razlika nuspojave. Prva generacija antihistaminika ima snažno sedacijsko djelovanje i pokazuje neselektivnost prema receptorima što uzrokuje antimuskarinske, antiserotoninske i anti-α-adrenergičke učinke. Prema strukturi dijele se na etanolamine, etilendiamine, alkilamine, piperazine, fenotiazine, piperidine i tricikličke dibenzoksepine. Druga generacija ne prelazi krvno-moždanu barijeru i nema sedirajući učinak (Katzung i sur., 2012; Church DS i Church MK, 2011).

Klinička primjena

H_1-antihistaminici se najčešće koriste za prevenciju i liječenje simptoma alergijskih reakcija. Oni su učinkoviti kod rinitisa, urtikarije i konjunktivitisa pri čemu se njihovo djelovanje temelji na supresiji učinka histamina kao primarnog medijatora ovih procesa. S druge strane, kod bronhijalne astme je uključeno više medijatora pa je njihova učinkovitost ograničena zbog čega se ne koriste u monoterapiji. Nadalje, pomažu pri postizanju olakšanja u terapiji kontaktnog i atopijskog dermatitisa te se koriste kao pomoćna terapija kod sistemske anafilaksije. Nasuprot tome, nemaju terapijske vrijednosti u borbi protiv prehlade. Neki H_1-antihistaminici koriste se u terapiji kinetoze i vestibularnih poremećaja poput Menierove bolesti. Također, zbog svog sedativnog učinka nalaze se u različitim OTC pripravcima za liječenje nesanice (Brunton i sur., ured. 2011).

Farmakokinetika

H_1-antihistaminici dobro se apsorbiraju nakon oralne primjene. Vršnu koncentraciju postižu nakon 1-2 h pri čemu im učinak uglavnom traje 4-6 h. Neki pokazuju dulje djelovanje u intervalu 12-24 h. Prva generacija opsežno se raspodjeljuje u tkivima te prelazi i krvno-moždanu barijeru. Nasuprot tome, lijekovi druge generacije imaju manju liposolubilnost i suspstrati su P-glikoproteina. Posljedično, njihova penetracija u središnji živčani sustav je ograničena ili onemogućena. Supstrati su citokroma P450 i izlučuju se u obliku metabolita. Na tržištu postoje formulacije aktivnih metabolita hidroksizina (cetirizin), terfenadina (feksonadin) i loratadina (desloratadin). Također, budući da je nekoliko antihistaminika druge generacije podložno metabolizmu putem CYP3A4, oni imaju povećan potencijal ulaska u terapijski značajne interakcije (Katzung i sur., 2012).

Toksičnost

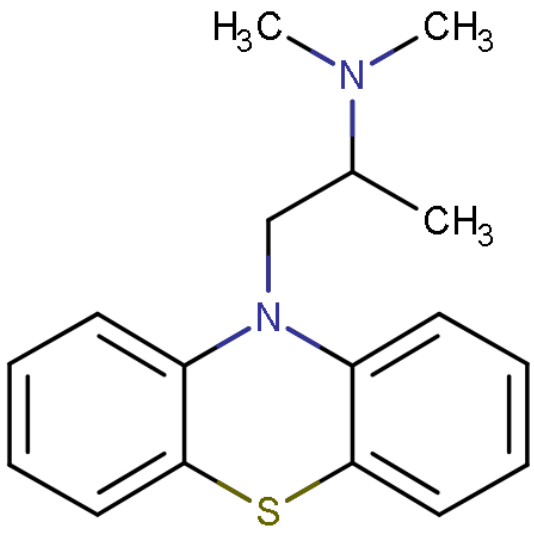
Nuspojave H_1-antihistaminika su uglavnom posljedica neselektivnosti prema receptorima što je karakteristika lijekova prve generacije. Sedacija je načešća nuspojava, a posljedica je prelaska krvno-moždane barijere i djelovanja na H_1-receptore u središnjem živčanom sustavu. Iako ona može biti korisna, djeluje ometajuće na obavljanje svakodnevnih radnji, što će se u kombinaciji s alkoholom ili drugim depresorima središnjeg živčanog sustava dodatno pogoršati. Zbog toga su antihistaminici s izraženim sedativnim učinkom kontraindicirani kod upravljanja vozilima i alatima. Može doći i do brojnih drugih neželjenih učinaka na središnji živčani sustav, uključujući vrtoglavicu, zamućenje vida, euforiju, anksioznost, tremor i nesanicu. Za smanjenje gastrointestinalnih nuspojava poput povraćanja, mučnine, konstipacije i proljeva, preporuča se uzimanje lijeka uz obrok. Nadalje, neki antihistaminici blokiraju muskarinske receptore što za posljedicu ima antikolinergičke nuspojave kao što su retencija urina, kserostomija (suhoća usta) i tahikardija. Blokada α-adrenergičkih receptora može uzrokovati ortostatsku hipotenziju u podložnih pojedinaca, a antiserotoninsko djelovanje uzrokuje povećanje apetita. Također, može doći do razvoja alergijske reakcije na lijek, posebice nakon topikalne primjene. Terfenadin i astemizol su antihistaminici druge generacije koji su povučeni s američkog tržišta zbog sklonosti interakcijama preko CYP3A4 i posljedičnog izazivanja smrtonosnih ventrikularnih aritmija. H_1-antihistaminici prelaze placentu i izlučuju se u majčino mlijeko zbog čega je potreban oprez kod primjene u trudnica i dojilja. Kod starijih osoba (>65 god.) i djece se zbog nuspojava preporučuju antihistaminici druge generacije (Katzung i sur., 2012; Brunton i sur., ured., 2011). U kliničkim studijama je dokazano da je kod primjene lijekova prve generacije došlo do pogoršanja sposobnosti učenja kod djece (Gunn i sur., 2001) .

1.3.1. Prometazin

Prometazin je fenotiazinski derivat (Slika 5.) koji spada u prvu generaciju H_1-antihistaminika. On ima značajan sedativni učinak te pokazuje izraženu antikolinergičku aktivnost i potentan je blokator α-adrenergičkih receptora. Najčešće se koristi kao antiemetik te je najučinkovitiji antihistaminik u prevenciji bolesti putovanja. Koristan je u terapiji mučnine i povraćanja poslije kemoterapije i zračenja (Katzung i sur., 2012). Pokazalo se da nakon neuspjele profilakse postoperativne mučnine i povraćanja ondansetronom, značajno bolje rezultate ima prometazin nego ponovljena upotreba ondansetrona (Habib i sur., 2007). Zbog sedirajućeg učinka može se koristiti kao pomoć kod nesanice i preoperativni sedativ.

Također, uzrokuje osjećaj olakšanja kad se koristi u terapiji pruritusa. On je potentniji lokalni anestetik nego prokain, a učinak postiže na isti način – blokiranjem natrijskih kanala. Odabire se tek u slučaju alergije na standardne lokalne anestetike (Brunton i sur., ured., 2011). Koristi se u ranim stadijima Parkinsonove bolesti gdje osigurava blago olakšanje kod simptoma poput tremora, rigidnosti i sijaloreje (hipersalivacije). Pomaže i kod akutne mišićne distonije izazvane antidopaminergicima. Zbog svojih antikolinergičkih i sedativnih karakteristika koristi se i za olakšanje kašlja u kombinaciji s različitim antitusicima i ekspektoransima (Tripathi, 2013). Ne smije se koristiti u djece mlađe od 2 godine zbog mogućnosti izazivanja fatalne respiratorne depresije (Starke i sur., 2005).

Prometazin je slaba lipofilna baza (pK_a=9,1, logP=4,81) koja se dobro apsorbira nakon oralne primjene (>80%). Međutim, zbog intenzivnog metabolizma prvog prolaska kroz jetru ima nisku bioraspoloživost. Naime, dolazi do hidroksilacije prstena putem CYP2D6, N-demetilacije putem CYP2B6 i S-oksidacije do sulfoksida. Prometazin pokazuje značajno vezanje za proteine plazme (93%), postiže vršnu koncentraciju za 1,5-4 h i ima vrijeme polueliminacije od 16-19 h. Terapijske doze za odrasle su 10-25 mg (www.drugbank.ca; Brunton i sur., 2011). Na tržištu postoje formulacije za oralnu, topikalnu, intravensku, intramuskularnu i rektalnu primjenu (www.drugbank.ca). U Hrvatskoj ne postoje odobreni pripravci s prometazinom (Halmed, 2018).



Slika 5. Struktura prometazina (preuzeto s www.drugbank.ca)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nazalna primjena, zbog brojnih prednosti, predstavlja dobru alternativu klasičnim putovima primjene različitih djelatnih tvari. Naime, specifične značajke nosne sluznice omogućuju brzu sistemsku apsorpciju lipofilnih lijekova molekulske mase manje od 1000 Da. Zaobilazi se metabolizam prvog prolaska kroz jetru te enzimska i kemijska razgradnja u probavnom sustavu. Zbog jednostavnosti i neinvazivnosti nazalne primjene povećana je suradljivost pacijenata što je osobito važno u terapiji kroničnih bolesti. Mogućnost direktne dostave lijeka u središnji živčani sustav predstavlja prednost u terapiji oboljenja poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. Ograničenja ovog puta primjene mogu se nadvladati razvojem novih i poboljšanih promotora apsorpcije te uklapanjem lijekova u nove terapijske sustave (Ghori i sur., 2015; Ilum, 2012; Illum, 2002).

In situ gelirajući sustavi su terapijski sustavi prikladni za primjenu na različite sluznice. Primjenjuju se u obliku otopine/suspenzije niske viskoznosti koja prelazi u gel na samom mjestu primjene uslijed promjene temperature, pH ili prisustva iona. Nazalna primjena takvih sustava smanjuje gubitak lijeka zbog curenja pripravka iz nosa i omogućuje produljeno zadržavanje na nosnoj sluznici uz posljedično smanjenje učestalosti doziranja i veću raspoloživost primijenjenog lijeka. S druge strane, izbjegnuta su ograničenja klasičnih gelova koja uključuju otežanu primjenu i nedostatno rasprostranjivanje. *In situ* gelovi mogu osigurati kontrolirano oslobađanje lijeka u ovisnosti o svojstvima nastale trodimenzionalne strukture (Madan i sur., 2009; Kublik i Vidgren, 1998).

Pektin je biljni polimer čija je važnost nadišla tradicionalnu primjenu u prehrambenoj industriji i koji se sve više koristi i u biomedicinskom području. Pektini se dijele s obzirom na stupanj esterifikacije na visoko metoksilirane (HM) i nisko metoksilirane (LM), te ovisno o tom svojstvu pokazuju različite mehanizme geliranja. HM pektin gelira pri niskom pH i u prisutnosti preko 55% suotapala, dok LM pektin pokazuje geliranje ovisno o koncentraciji kalcija ili nekog drugog dvovalentnog kationa. Pektin ima brojne pozitivne učinke na zdravlje, a zbog svojih specifičnih svojstava koristi se za oblikovanje novih farmaceutskih sustava. Naime, osim već navedenih svojstava geliranja, pektin ima prednosti koje uključuju sigurnost, mukoadhezivnost, otpornost na enzime gastrointestinalnog trakta i niski pH. To omogućuje razvoj sustava s kontroliranom i ciljanom dostavom lijeka. Razvoj nazalnih farmaceutskih oblika s pektinom temelji se na činjenici da sluz koja prekriva nosnu sluznicu sadrži kalcij čija je fiziološka koncentracija strogo kontrolirana. Posljedično, oblikovanje *in*

situ gelirajućih sustava utemeljinih na LM pektinu predstavlja obećavajuću opciju (Mishra i sur., 2012; Watts i Smith, 2009; Sriamornsak, 2003).

Prometazin je fenotiazinski antihistaminik prve generacije. Primarne učinke ostvaruje blokadom djelovanja histamina preko H_1-receptora, ali zbog svoje neselektivnosti ima i antikolinergičku i anti-α-adrenergičku aktivnost. Najčešće se koristi kao antiemetik te u prevenciji bolesti putovanja. Osim toga, djeluje kao lokalni anestetik i sedativ te se može koristiti u terapiji alergije, Parkinsonove bolesti, akutne mišićne distonije i za olakšanje simptoma kašlja. Dobro se apsorbira, no zbog intenzivnog metabolizma prvog prolaska kroz jetru ima nisku bioraspoloživost. Nazalna primjena prometazina omogućuje zaobilaženje prvog prolaska kroz jetru i povećanje bioraspoloživosti, što je preduvjet za postizanje učinka uz primjenu manjih doza lijeka. Nazalni put primjene prometazina najprikladniji je u liječenju alergijskog rinitisa, a brži početak djelovanja predstavlja prednost u terapiji mučnine i povraćanja (Tripathi, 2013; Brunton i sur., 2011).

Cilj ovog rada je razvoj pektinskog *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu temeljem procjene utjecaja koncentracije pektina, prisustva Tween-a i manitola na reološka svojstva, osmolalnost i/ili profil oslobađanja uklopljenog lijeka.

Specifični ciljevi:

- Pripremiti pektinske *in situ* gelirajuće sustave s prometazinom kao modelnim lijekom
- Ispitati utjecaj koncentracije pektina, prisustva lijeka, neionskog surfaktanta Tween-a 80 (kao solubilizatora) i manitola (kao sredstva za izotonizaciju) na:
    - osmolalnost *in situ* gelirajućeg sustava i *in situ* gela nastalog nakon miješanja sa simuliranim nosnim fluidom (SNF) u volumnom omjeru 1:1
    - reološka svojstva *in situ* gelirajućeg sustava i *in situ* gela nastalog nakon miješanja sa SNF-om u volumnom omjeru 1:1
- Ispitati profil oslobađanja lijeka iz *in situ* gela korištenjem Franzove difuzijske ćelije i SNF-a kao receptorskog medija
- Usporediti profil oslobađanja lijeka iz otopine i pektinskih *in situ* gelova različite koncentracije pektina

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U izradi ovog diplomskog rada korišten je pektin (Amid CF 025-D, stupanj esterifikacije 23-28%, stupanj amidacije 22-25%), doniran od tvrtke Herbstreith & Fox, Njemačka. Kao sredstvo za izotonizaciju odabran je D(-) manitol (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Njemačka). Kao solubilizator korišten je neionski surfaktant Tween 80 (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Njemačka). Prometazin (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) je korišten kao modelni lijek.

Simulirani nazalni fluid (SNF) pripremljen je otapanjem 8,77 g natrijevog klorida (NaCl, Kemig, Hrvatska), 2,98 g kalijevog klorida (KCl, Kemig, Hrvatska) i 0,59 g kalcijevog klorida ($CaCl_2$, Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) u 1000 ml pročišćene vode.

3.2. METODE

3.2.1. Priprema pektinskih *in situ* gelirajućih sustava

Hidratacijom pektina u pročišćenoj vodi tijekom 24 sata uz kontinuirano miješanje na magnetskoj miješalici (600 rpm) pripremljena je vodena otopina pektina u koncentracijama od 0,6 % (*m/m*) i 1,0% (*m/m*). Za sustave s prometazinom kao modelnim lijekom, prometazin je rastrljan staklenim štapićem s neionskim surfaktantom Tween-om 80 pri masenom omjeru 2:1. Zatim je uz miješanje polako dodana otopina pektina čime su pripremljeni pektinski *in situ* gelirajući sustavi s prometazinom u koncentraciji od 0,05% (*m/m*). Sustavi su izotonizirani dodatkom manitola u koncentraciji od 4% (*m/m*). Ostali uzorci pripravljeni su istim postupkom izostavljajući prometazin i Tween 80 i/ili manitol. U Tablici 2. prikazani su pripremljeni sustavi.

Tablica 2. Sastav pripremljenih *in situ* gelirajućih sustava

Uzorak	Pektin (%)	Manitol	Prometazin/Tween 80
PPM1	0,6	+	+
PPM2	1,0	+	+
PP1	0,6	-	+
PP2	1,0	-	+
PM1	0,6	+	-
PM2	1,0	+	-
P1	0,6	-	-
P2	1,0	-	-

3.2.2. Ispitivanje reoloških svojstava

Reološka mjerenja provedena su na Anton Paar MCR 102 reometru (Anton Paar GmbH, Austrija) spojenim s osobnim računalom na kojem su uz pomoć RheoCompass™ softvera prikupljeni podaci procesuirani i analizirani (Slika 6.).

Rotacijskim testom mjerena je viskoznost *in situ* gelirajućih sustava u ovisnosti o gradijentu brzine smicanja ($\dot{\gamma}$) u području od 0,1 do 100 s^{-1} pri sobnoj temperaturi. Kao mjerno tijelo korišten je mjerni stožac CP50-1 (engl. *cone plate*, promjera 50 mm i nagibnog kuta 1°) pri fiksnoj udaljenosti od donjeg mjernog tijela (ploče) koja iznosi 0,102 mm. Viskoznost (η, Pa s) se računa kao omjer smičnog naprezanja (τ, Pa) i gradijenta brzine smicanja ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) (jednadžba 1) (Picout i Ross-Murphy, 2003).

$$\eta = \tau/\dot{\gamma} \quad (1)$$

Provedeno je i oscilacijsko mjerenje utvrđivanja vremena geliranja (t_{gel}) (engl. *Gelation time test*), gdje je odgovor *in situ* gelirajućeg sustava pomiješanog sa SNF-om na sinusoidno varirajuće opterećenje promatran kao funkcija vremena. Prije mjerenja *in situ* gelirajući sustavi su na magnetskoj miješalici miješani sa SNF-om u omjeru 1:1 tijekom jedne minute, te su ostavljeni u mirovanju kroz isto vrijeme. Mjerenja su rađena kroz 30 min pri smičnoj deformaciji od 0,6%, kutnoj frekvenciji (ω) od 6,28 rad/s i temperaturi od 37°C. Smična deformacija prethodno je određena testom promjene amplitude (engl. *Amplitude sweep*) kojim je utvrđeno linearno viskoelastično područje (engl. *linear viscoelastic range*, LVE *range*), odnosno područje u kojem viskoelastični moduli nisu ovisili o smičnoj deformaciji. Korišteno je mjerno tijelo paralelna ploča PP50 (engl. *parallel plate*, promjera 50 mm), pri udaljenosti od donjeg mjernog tijela (ploče) od 0,500 mm.

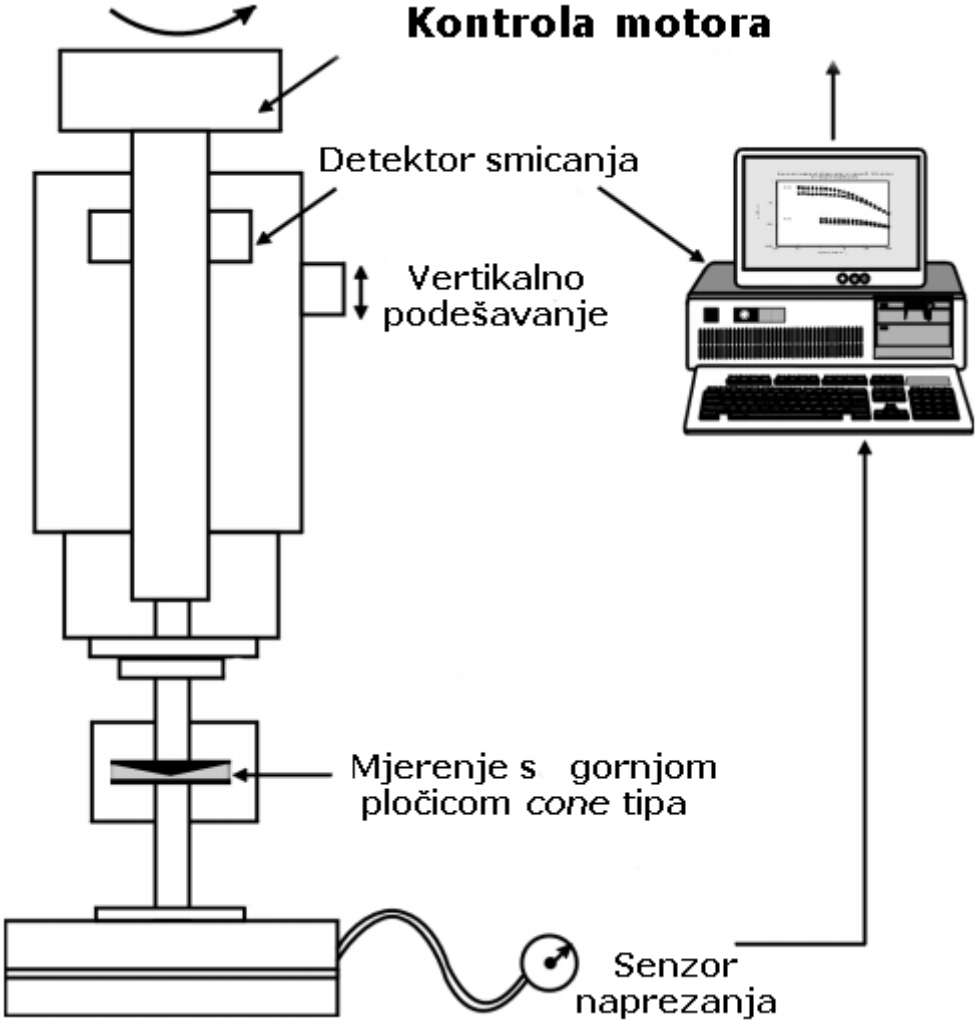
Iz smičnog naprezanja i brzine smicanja određeni su kompleksni modul smicanja (G*), fazni kut (δ), modul pohrane (G'), modul gubitka (G") i kompleksna viskoznost (η*). Međuovisnost navedenih parametara prikazana je sljedećim jednadžbama (Carlfors i sur., 1998):

$$G' = G^*\cos\delta \quad (2)$$

$$G'' = G^*\sin\delta \quad (3)$$

$$\eta^* = G''/\omega \quad (4)$$

S ciljem ispitivanja stabilnosti *in situ* gela proveden je oscilacijski test promjene frekvencije (engl. *Frequency sweep*) kojim se ispituje ovisnost modula pohrane i modula gubitka *in situ* gela o kutnoj frekvenciji. Gelovi su pripravljeni miješanjem *in situ* gelirajućih sustava i SNF-a u volumnom omjeru 1:1 na magnetskoj miješalici tijekom dvije minute, nakon čega su ostavljeni da se stabiliziraju kroz 20 minuta pri temperaturi od 37°C. Mjerenja su rađena u području kutne frekvencije od 100 do 0,01 rad/s pri konstantnoj deformaciji iz utvrđenog LVE područja. Korišteno je mjerno tijelo paralelna ploča PP50 pri udaljenosti od donjeg mjernog tijela (ploče) od 0,500 mm.



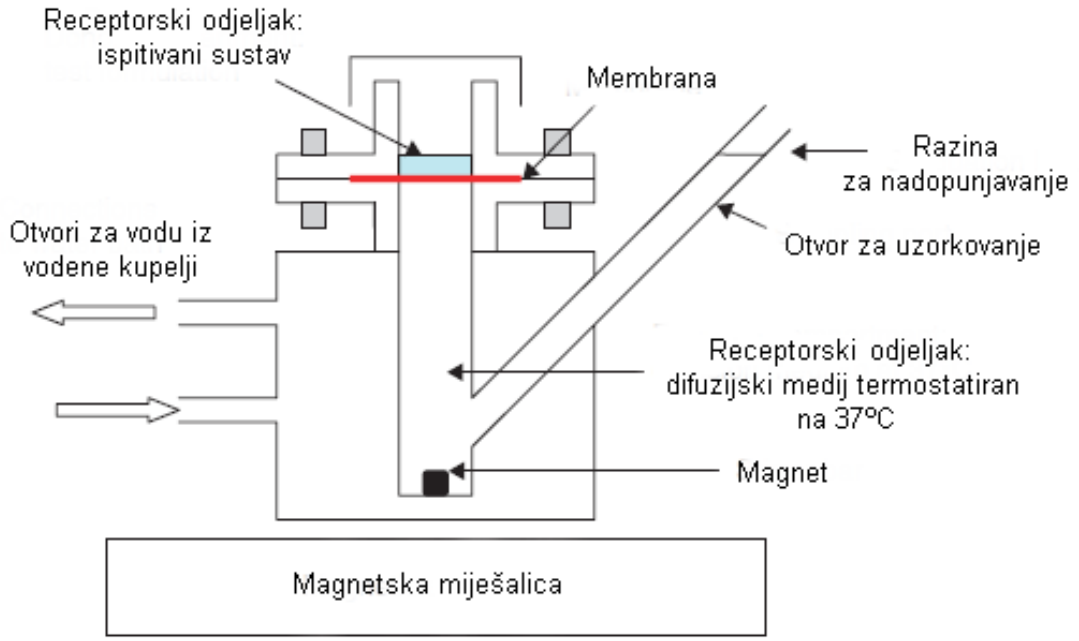
Slika 6. Shematski prikaz modernog reometra (preuzeto i prilagođeno prema Picout i Ross-Murphy, 2003)

3.2.3. Određivanje osmolalnosti

Osmolalnost *in situ* gelirajućih sustava i formiranih gelova određivana je uz pomoć krioskopskog osmometra (Advanced® 3D3 Single-Sample Osmometer, Advanced Instruments Inc., SAD) u Plivi Hrvatska d.o.o. Za mjerenje osmolalnosti uziman je volumen uzoraka od 250 µL. Gelovi su pripravljeni miješanjem *in situ* gelirajućih sustava i SNF-a u volumnom omjeru 1:1.

3.2.4. *In vitro* oslobođanje lijeka

U ovom radu su za ispitivanje profila oslobađanja lijeka korištene Franzove difuzijske ćelije (Slika 7.) koje su uz pomoć vodene kupelji termostatirane pri 37°C. Ćelije se sastoje od donorskog i receptorskog odjeljka između kojih je stavljena poliamidna membrana s porama veličine 0,45 µm (Sartolon®, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka). Receptorski odjeljak (16 ml) ispunjen je SNF-om, te je kontinuirano miješan magnetskom miješalicom. *In situ* gelirajući sustav s prometazinom (1 ml) nanesen je na membranu namočenu receptorskim medijem. Uzorci volumena 0,5 ml uzimani su kroz 3 sata u određenim vremenskim razmacima, pri čemu je uzeti volumen nadoknađen jednakom količinom svježeg medija što je uzeto u obzir kod izračuna ukupne količine oslobođenog lijeka. Prikupljeni uzorci su razrijeđeni dodatkom 2 ml SNF-a nakon čega im je određivan sadržaj lijeka UV-Vis spektrofotometrom pri 249 nm. Usporedbe radi, na jednak način ispitan je i profil oslobađanja prometazina iz vodene otopine. Sva mjerenja su rađena u triplikatu.



Slika 7. Shematski dijagram Franzove difuzijske ćelije (preuzeto i prilagođeno prema Watts i Smith, 2009)

3.2.5. Određivanje količne *in vitro* oslobođenog lijeka

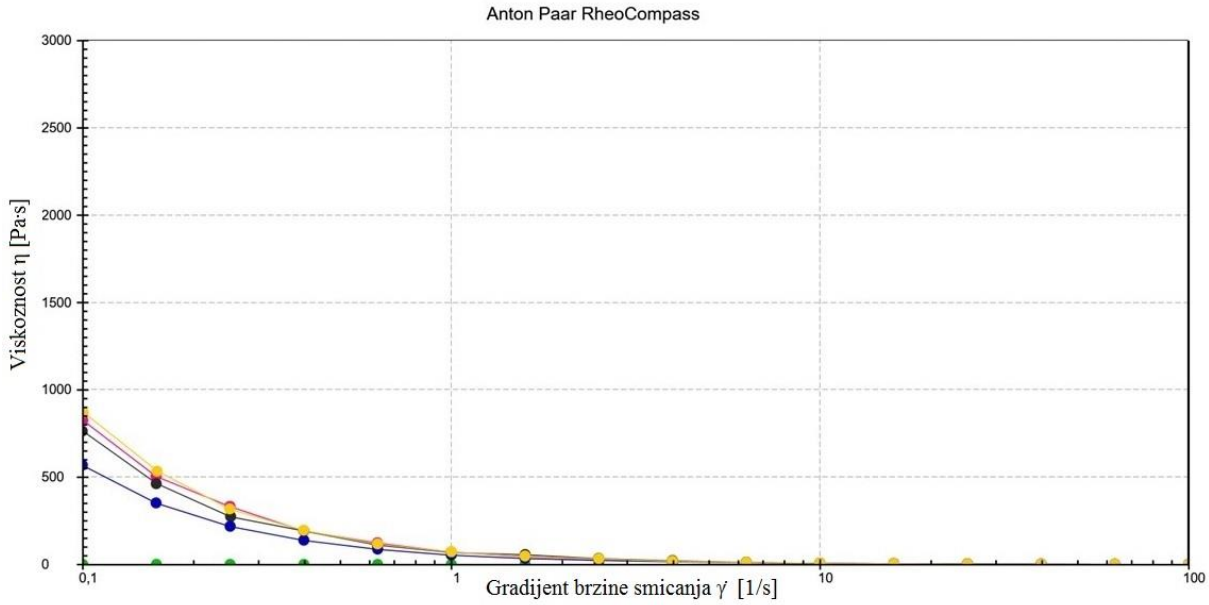
Količina oslobođenog prometazina određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 249 nm. Korišten je UV-Vis spektrofotmetar (UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Probe, Varian, SAD). Za izradu baždarnog dijagrama korišten je niz vodenih otopina koncentracija prometazina od 1, 2, 3, 4, 6 i 8 μg ml^{-1}. Uzorci su rađeni u duplikatu, a kao slijepa proba korištena je pročišćena voda. Iz ovisnosti apsorbancije pri 249 nm o koncentraciji pripravljenih vodenih otopina prometazina izrađen je baždarni pravac.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Reološka svojstva

4.1.1. Viskoznost pektinskih *in situ* gelirajućih sustava

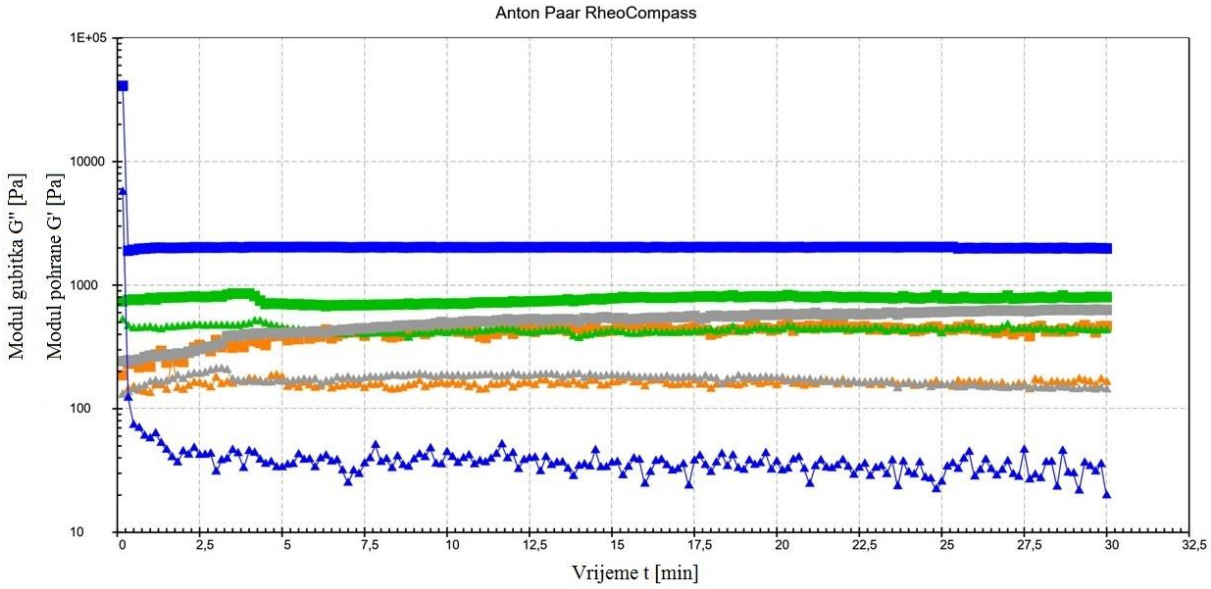
Viskoznost je svojstvo tekućina koje se može definirati kao otpor prema tečenju, iz čega se može zaključiti da tekućine koje imaju nisku viskoznost pokazuju minimalni otpor i dobra svojstva tečenja, dok za one jako viskozne vrijedi suprotno (Fossen, 2016). Viskoznost je ključan parametar koji određuje mogućnost i profil raspršivanja tekućih oblika (otopina i suspenzija) među kojima su i *in situ* gelirajući sustavi (Pathan i sur., 2013). Također, ona utječe i na stabilnost suspenzije što ju čini jednim od kritičnih formulacijskih parametara takvih sustava (Trows i sur., 2014). Na Slici 8. prikazana je viskoznost *in situ* gelirajućih sustava i pročišćene vode pri gradijentima brzine smicanja od 0,1 do 100 s^{-1}. Pročišćena voda je Newtonova tekućina pa pokazuje linearan odnos gradijenta brzine smicanja i smičnog naprezanja. S druge strane, svi mjereni *in situ* gelirajući sustavi (pektinski sustavi s prometazinom - PPM1 i PPM2, te pektinski sustavi bez uklopljenog prometazina - PM1 i PM2) su pri nižim gradijentima brzine smicanja pokazali ne-Newtonovo, odnosno pseudoplastično ponašanje, što znači da im se viskoznost smanjuje s povećanjem gradijenta brzine smicanja. Takvi rezultati su očekivani budući da je riječ o polimernim otopinama i mogu se objasniti fleksibilnim isprepletenim molekulama koje se s porastom gradijenta brzine smicanja otpetljavaju i orijentiraju u smjeru tečenja fluida (Picout i Ross-Murphy, 2003). Već iznad gradijenta brzine smicanja od 1 s^{-1} *in situ* gelirajući pektinski sustavi ponašaju se kao pročišćena voda. Primijećeno je da sustavi koji imaju prividnu viskoznost iznad 76 mPa ne mogu biti precizno dostavljeni koristeći standardne sprejeve za nos (Dua i sur., 1997). Međutim, procijenjeno je da pri raspršivanju nazalnih sprejeva gradijent brzine smicanja iznosi od 24 000 do 240 000 s^{-1}, što znači da se pektinski *in situ* gelirajući sustavi pripravljeni u ovom radu mogu primijeniti raspršivanjem u nosnu šupljinu, budući da u tom području gradijenta brzine smicanja njihova svojstva odgovaraju svojstvima vode (Eccleston i Hudson, 2010).



Slika 8. Ovisnost viskoznosti *in situ* gelirajućih sustava pripravljenih pri koncentraciji pektina od 0,6% i 1,0% (*m*/*m*) s prometazinom/Tween-om 80 (redom PPM1, ●; PPM2, ●), te bez prometazina/Tween-a 80 (redom PM1, ●; PM2, ●), o gradijentu brzine smicanja. Kao kontrolni uzorak korištena je pročišćena voda (●). Uzorci su izotonizirani dodatkom manitola (4%, *m*/*m*). Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi.

4.1.2. Oscilacijska mjerenja

Iako su pripravljeni uzorci slične viskoznosti, nakon dodatka SNF-a pokazuju značajnije razlike u viskoelastičnom ponašanju. Rezultati oscilacijskih mjerenja prikazani su na Slikama 9.-13. Vrijeme geliranja *in situ* gelirajućih sustava nakon dodatka SNF-a ispitano je mjerenjem modula pohrane (G') i gubitka (G") u ovisnosti o vremenu pri 37°C. G', koji se još naziva i elastični modul, govori o sposobnosti zadržavanja oblika, dok G" ili viskozni modul predstavlja sklonost tečenju. U ovom istraživanju je kao kriterij za točku geliranja uzeto sjecište dviju krivulja (G'=G") pri kutnoj frekvenciji od 6,28 rad/s. S obzirom da je kod svih uzoraka G'>G" za t≥0 (Slika 9.), može se zaključiti da su bili gelirani već pri samom početku mjerenja, što ukazuje na veoma brzo umrežavanje lanaca pektina ionima Ca^{2+} prisutnim u SNF-u. Takva brzina geliranja nije iznenađujuća, te su Urias-Orona i sur. (2010) zabilježili slične rezultate u istraživanju u kojem su koristili LM pektin u koncentracijama od 1% (točka geliranja za 3 min) i 2% (točka geliranja za 1 min).

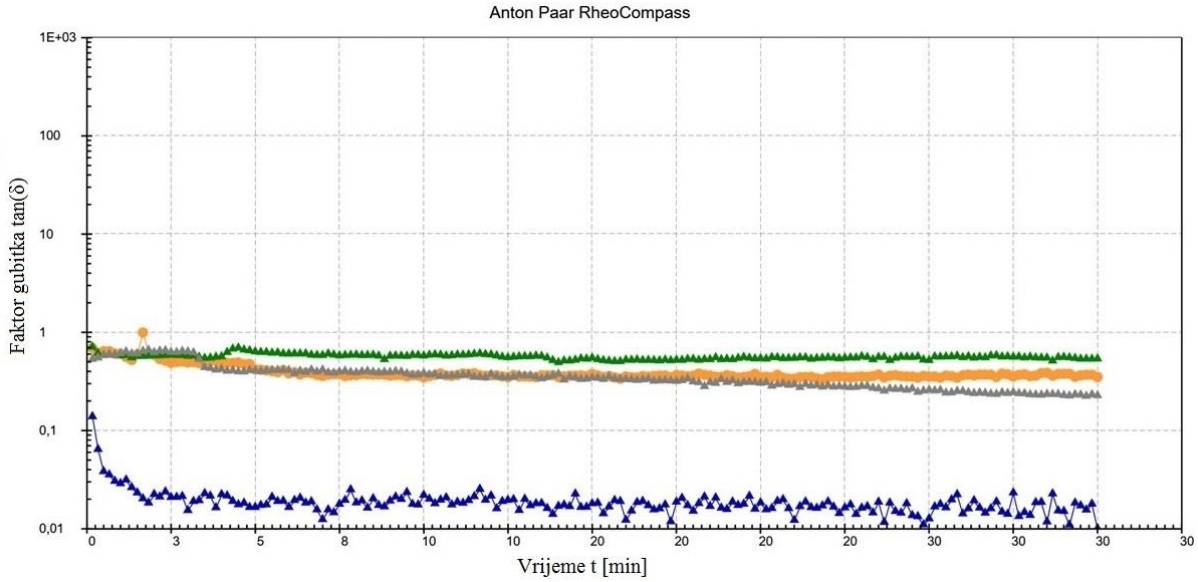


Slika 9. Ovisnost modula pohrane (*G*'; kvadrat) i modula gubitka (*G*''; trokut) *in situ* gelova s prometazinom/Tween-om 80 pri koncentracijama pektina od 0,6% (*m*/*m*; PPM1, ■) i 1,0% (*m*/*m;* PPM2, ■) i manitola od 4%, (*m*/*m*), o vremenu. Kao kontrolni uzorci korišteni su *in situ* gelovi bez prometazina/Tween-a 80 pri koncentraciji pektina od 0,6% (*m*/*m*) sa (PM1; ■ 4%, *m*/*m*) i bez (P1; ■) dodatka manitola. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 37°C.

Faktor gubitka (tanδ) koristi se da bi se opisalo viskoelastično stanje uzorka, a izračunava se prema jednadžbi 5 (Mezger, 2006):

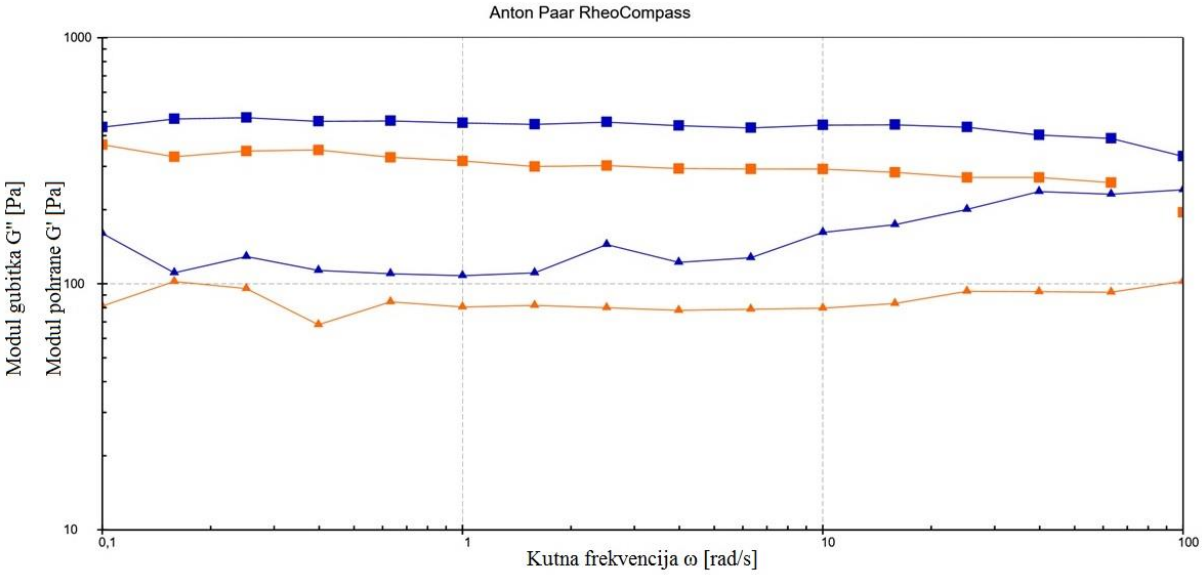
$$G''/G' = \tan\delta \qquad (5)$$

U točki geliranja faktor gubitka iznosi 1, a što je njegova vrijednost manja, izraženije je elastično ponašanje. PPM2 (koncentracija pektina 1%, *m*/*m*) na kraju mjerenja pokazuje tanδ u iznosu od 0,001 što znači da je riječ o izrazito elastičnom gelu. S druge strane, sustavi s 0,6% pektina pokazuju veći faktor gubitka, odnosno manju elastičnost sustava. Elastičnost raste u nizu PM1 (tanδ=0,533) <P1 (tanδ=0,342) <PPM1 (tanδ=0,225) <PPM2 (tanδ=0,001) (Slika 10.). Iz rezultata se može iščitati da sustavi s prometazinom i Tween-om 80 pokazuju veću elastičnost. Monge i sur. (2008) su primijetili da Tween 80 povećava inicijalno umrežavanje polimera, ali da konačna viskoelastična svojstva ne pokazuju značajnu razliku. I prisustvo manitola pokazuje utjecaj na smanjenje tanδ. Fu i Rao (2001) su kao šećer koristili saharozu koja je pokazala isti učinak, što je objašnjeno dodatnim OH skupinama koje stabiliziraju umreženu strukturu i potiču stvaranje vodikovih veza kojima se imobilizira slobodna voda.



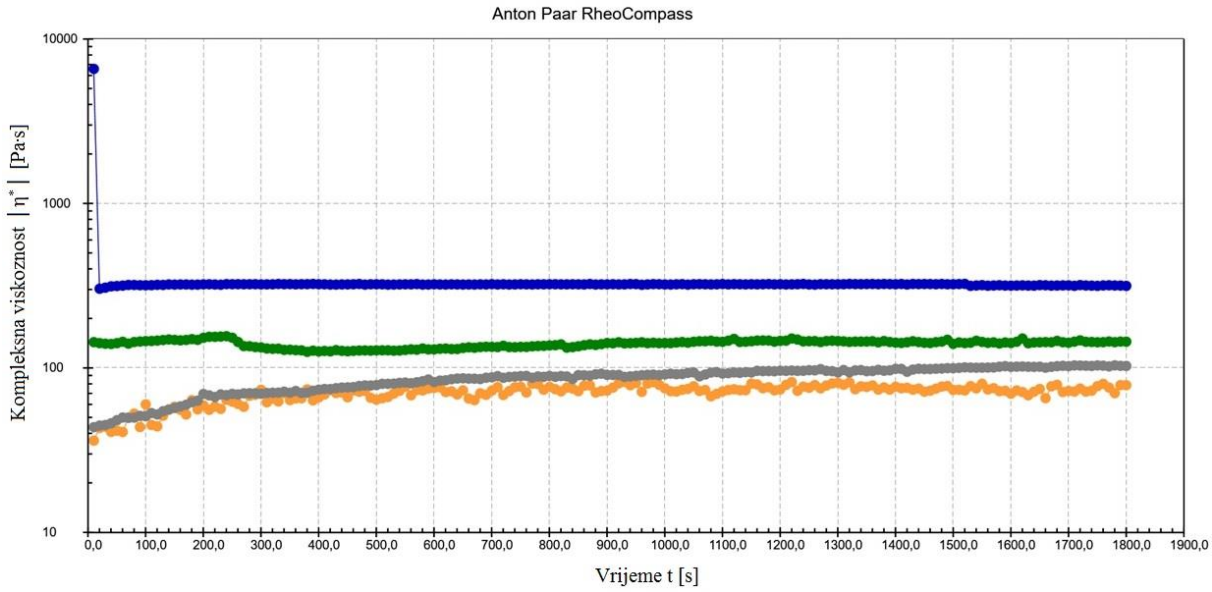
Slika 10. Ovisnost faktora gubitka (tanδ) *in situ* gelova s prometazinom/Tween-om 80 pri koncentraciji pektina od 0,6% (*m*/*m*; PPM1, ▲) i 1,0% (*m*/*m;* PPM2, ▲) i manitola od 4%, (*m*/*m*), o vremenu. Kao kontrolni uzorci korišteni su *in situ* gelovi bez prometazina/Tween-a 80 pri koncentraciji pektina od 0,6% (*m*/*m*) sa (PM1; ▲4%, *m*/*m*) i bez (P1; ●) dodatka manitola. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 37°C.

Ovisnost modula pohrane i modula gubitka o kutnoj frekvenciji je poznata i kao "mehanički spektar", te je korisna za određivanje čvrstoće nastalih gelova. Kod slabih gelova postoji ovisnost o frekvenciji, a razlika između modula pohrane i gubitka nije izražena. S druge strane, kod "pravih gelova" (engl. *"true gels"*) G' je veći od G" tijekom cijelog mjerenja, te je praktički neovisan o frekvenciji (Rao, 2014). PPM1 i PPM2 pokazuju upravo takvo ponašanje prikazano na Slici 11., što je u skladu s istraživanjem u kojem je korišten LM pektin istog proizvođača (CU701, DE = 38%, Herbstreith & Fox) (Moreira i sur., 2014). PPM2 je kao gel s najvećom koncentracijom pektina, već pri vizualnom pregledu izgledao najsnažnije geliran. To je potvrđeno reološkim mjerenjima, jer isti uzorak pokazuje najveći modul pohrane uz najmanji faktor gubitka.

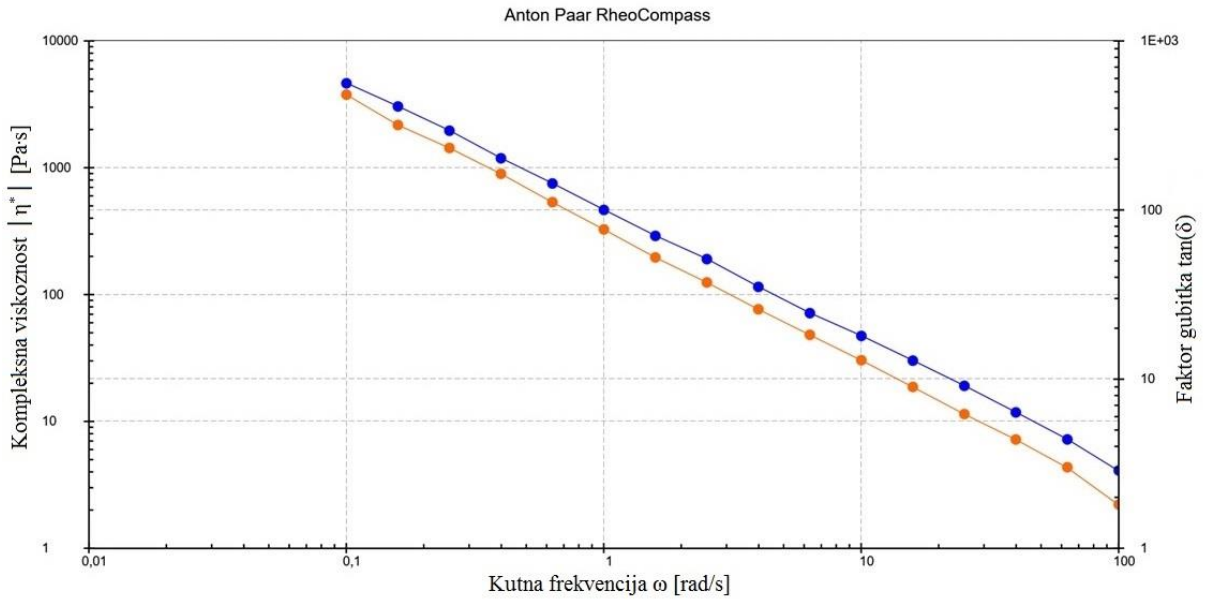


Slika 11. Ovisnost modula pohrane (*G*'; kvadrat) i gubitka (*G*''; trokut) *in situ* gelova s prometazinom/Tween-om 80 pri koncentraciji pektina od 0,6% (PPM1, *m*/*m*; ■) i 1% (PPM2, *m*/*m;* ■) i manitola od 4% (*m*/*m*), o kutnoj frekvenciji (ω). Mjerenja su provedena pri temperaturi od 37°C.

Mjerena je i kompleksna viskoznost gelova u ovisnosti o vremenu (Slika 12.) i frekvenciji (Slika 13.). Ona se s vremenom ne mijenja značajno, a veća je za *in situ* gel s višom koncentracijom pektina (1%, *m*/*m*; PPM2). S druge strane, njena vrijednost se smanjuje s porastom frekvencije, odnosno gelovi pokazuju pseudoplastično ponašanje koje je zabilježeno i u drugim ispitivanjima (Moreira i sur., 2014).



Slika 12. Ovisnost kompleksne viskoznosti (η*) *in situ* gelova s prometazinom/Tween-om 80 pri koncentraciji pektina od 0,6% (*m*/*m*; PPM1, ●) i 1,0% (*m*/*m;* PPM2, ●) i manitola od 4%, (*m*/*m*), o vremenu. Kao kontrolni uzorci korišteni su *in situ* gelovi bez prometazina/Tween-a 80 pri koncentraciji pektina od 0,6% (*m*/*m*), sa (PM1; ● 4%, *m*/*m*) i bez (P1; ●) dodatka manitola. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 37°C.



Slika 13. Ovisnost kompleksne viskoznosti (η*) i faktora gubitka (tanδ) *in situ* gelova s prometazinom/Tween-om 80 pri koncentraciji pektina od 0,6% (PPM1, *m*/*m*; ●) i 1,0% (*m*/*m;* ●) i manitola od 4% (*m*/*m*), o kutnoj frekvenciji. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 37°C.

4.2. Osmolalnost

Osmolalnost je jedno od svojstava nazalnih formulacija koja utječu na depoziciju i apsorpciju lijeka te sigurnost primjene (Lee i Desai, ured., 2007). Iritirajući učinak na nosnu sluznicu može se predvidjeti temeljem oslobađanja enzima laktat dehidrogenaze (LDH) iz epitelnih stanica nosne sluznice. Istraživanja su pokazala minimalan utjecaj hipertoničnih i izotoničnih otopina na oslobađanje ovog markera, dok su otopine niske osmolalnosti pokazale značajno oslobađanje LDH iz nosnog epitela iz čega se može zaključiti da su hipertonične i izotonične otopine sigurnije za primjenu (Pujara i sur., 1995). S druge strane, hipertonične otopine mogu uzrokovati smežuravanje stanica i smanjenje ili prestanak mukocilijarnog klirensa (Dhakar i sur., 2011). Međutim, potrebno je još istraživanja da bi došlo do boljeg razmijevanja učinaka osmolalnosti i optimiziranja nazalnih formulacija (Bhise i sur., 2008).

Preporučena osmolalnost vodenih formulacija za dostavu lijeka preko nosne sluznice je 290-500 mOsm/kg. Izotonične otopine su prikladne za kroničnu primjenu, dok se hipertonične otopine mogu koristiti jednokratno i kod hitnih situacija. Hipotonične formulacije nisu prikladne i treba ih izbjegavati (Bitter i sur., 2011). Prema FDA (2002) osmolalnost treba ispitati u nazalnim pripravcima koji sadrže sredstvo za izotonizaciju ili imaju naznačenu osmolalnost.

U ovom radu kao sredstvo za izotonizaciju korišten je manitol. Njegova najveća zabilježena koncentracija u kapima i sprejevima za nos je 4% (FDA, 2018), a vodena otopina sa 5,07% (*m*/*V*) manitola je izoosmotska sa serumom (Rowe i sur., ured., 2006). Ispitana je osmolalnost *in situ* gelirajućih pektinskih sustava sa i bez flutikazona/Tween-a 80 te sa ili bez 4% (*m*/*m*) manitola, prije i nakon dodatka SNF-a u volumnom omjeru 1:1. U Tablici 3. prikazani su dobiveni rezultati. Osmolalnost SNF-a iznosi 358,5 mOsm/kg.

Tablica 3., Osmolalnost *in situ* gelirajućih pektinskih sustava prije i nakon dodatka SNF-a u volumnom omjeru 1:1.

	Osmolalnost bez SNF-a (mOsm/kg)	**Osmolalnost nakon dodatka SNF-a (mOsm/kg)**
PPM1	244,5	303,0
PPM2	257,5	311,0
PP1	23,0	191,0
PP2	34,0	209,0
PM1	242,0	295,5,0
PM2	257,0	308,5,0
P1	21,0	188,5,0
P2	30,0	206,0

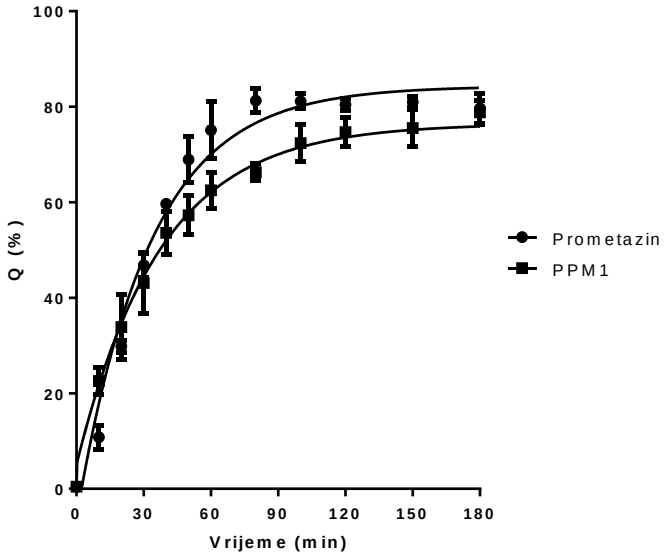
Pektinski sustavi bez manitola su hipotonični s vrijednostima koje se kreću od 21,0 mOsm/kg za P1 (koncentracija pektina 0,6 %, *m*/*m*, bez uklopljenog prometazina) do 34,0 mOsm/kg za P2 (koncentracija pektina 1,0 %, *m*/*m*, s uklopljenim prometazinom). Dakle, sam pektin nema značajnu osmotsku aktivnost. Utjecaj lijeka je također zanemariv budući da su razlike u mjerenjima sa i bez prometazina svega nekoliko mOsm/kg.

Dodatak manitola kao sredstva za izotonizaciju, rezultira očekivanim porastom osmolalnosti. Primjerice, kod *in situ* gelirajućih sustava pri koncentraciji pektina od 0,6% (*m*/*m*), dodatak manitola uzrokuje povećanje osmolalnosti za 221,0 i 221,5 mOsm/kg, redom kod sustava bez i sa prometazinom. Budući da kod primjene *in situ* gelirajućih sustava na nosnu sluznicu dolazi do miješanja istih s nazalnim fluidom i nastajanja gela *in situ*, izmjerena je i osmolalnost smjese *in situ* gelirajućih sustava i SNF-a u volumnom omjeru 1:1. Rezultati pokazuju da su sustavi s manitolom odgovarajuće osmolalnosti za nazalnu primjenu, te se u tom smislu može pretpostaviti nizak potencijal izazivanja iritacija te prikladnost za kroničnu primjenu.

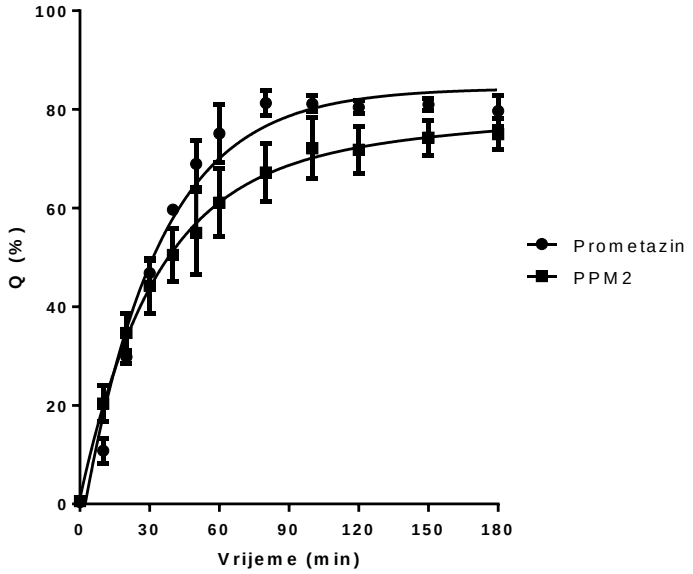
4.3. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja

Na Slici 14. prikazana je usporedba *in vitro* profila oslobođanja prometazina iz vodene otopine i *in situ* gelirajućih sustava sa 0,6% (*m*/*m*; PPM1) i 1,0% (*m*/*m*; PPM2) pektina u vremenskom intervalu od 180 min. Na kraju svakog eksperimenta Franzova difuzijska ćelija je rastavljena, a membrana vizualno ispitana. Do geliranja je došlo i kod PPM1 i kod PPM2, zahvaljujući difundiranju Ca^{2+} iona kroz poliamidnu membranu postavljenu između *in situ* gelirajućeg sustava u donorskom odjeljku i receptorskog medija (SNF-a) u receptorskom odjeljku. Utvrđeno je da lijek ima bifazni profil oslobođanja iz vodene otopine i gela. Naime, tijekom prvog sata lijek se oslobađa brzo, a nakon toga slijedi sporija faza gdje nastupa plato. Očekivano, tijekom tri sata najviše se lijeka oslobodilo iz otopine (80%). Brzina oslobađanja prometazina iz pektinskih *in situ* gelova usporediva je s brzinom oslobađanja prometazina iz otopine tijekom prvih 30 minuta, nakon čega je oslobađanje iz *in situ* gelova blago usporeno. U pravilu, viskoznost sustava/polimernog matriksa u koji je uklopljen lijek igra važnu ulogu kada je difuzija najsporiji korak pri oslobađanju lijeka. Odnos između brzine difuzije prometazina i viskoznosti sustava/polimernog matriksa može se opisati Stokes-Einsteinovom jednadžom. Prema njoj porast viskoznosti rezultira sporijim oslobađanjem lijeka, odnosno manjim difuzijskim koeficijentom. Viskoznost PPM1 i PPM2 je veća nego ona čiste vode, a u kontaktu s medijem za oslobađanje lijeka dolazi do geliranja što znači da bi trebalo doći do usporenog profila oslobađanja lijeka (Charlton i sur., 2007). Međutim, budući da su zabilježene razlike male, ne možemo reći da se mjerenja u potpunosti podudaraju s navedenim tvrdnjama. Također, nije uočena razlika u brzini oslobađanja lijeka iz *in situ* gelova pri različitim koncentracijama pektina (0,6 *vs* 1,0%, *m/m*). Postoje i druge studije sustava utemeljnih na hidrofilnim polimerima koje pokazuju neznatnu promjenu difuzije lijeka kroz širok spektar koncentracija polimera i viskoznosti polimernih sustava (Alvarez-Lorenzo i sur., 1998; Smidt i sur., 1991). To je objašnjeno tvrdnjom da se makroskopske kretnje sustava (viskoznost) ne podudaraju nužno sa kretnjama na mikroskopskoj skali, odnosno s difuzijom lijeka ("mikroviskoznost") koja ovisi prvenstveno o veličinama pora formiranog gela. Naime, pri niskim koncentracijama polimera, kao što je to slučaj kod PPM1 i PPM2, difuzija lijeka primarno ovisi o viskoznosti otapala, u ovom slučaju vode. Dakle, moguće je da sustav ima visoku "makroviskoznost" uz nisku "mikroviskoznost", pri čemu će difuzija lijeka iz njega biti brza. Istraživanja su pokazala da LM pektini pri geliranju formiraju otvorenu mrežu s mnoštvom velikih pora promjera oko 500 nm što podupire ovo objašnjenje (Löfgren i sur., 2002).

a)



b)



Slika 14. *In vitro* profil oslobađanja prometazina iz *in situ* gela pri koncentraciji pektina od 0,6% (*m*/*m*; a) i 1,0% (*m*/*m*; b). Usporedbe radi, prikazan je profil oslobađanja prometazina iz vodene otopine pri istim eksperimentalnim uvjetima. Prikazane su srednje vrijednosti kumulativne količine oslobođenog lijeka u ovisnosti o vremenu ± SD (n=3).

5. ZAKLJUČCI

Pripremljeni su *in situ* gelirajući sustavi za nazalnu primjenu s prometazinom (0,05%, *m/m*) kao modelnim lijekom, pektinom u koncentraciji od 0,6 i 1,0% (*m*/*m*), neionskim surfaktantom Tween-om 80 (0,025%, *m/m*) kao solubilizatorom, te manitolom (4%, *m/m*) kao sredstvom za izotonizaciju.

- Pripremljeni *in situ* gelirajući sustavi pokazuju pseudoplastična svojstva, pri čemu im je viskoznost pri gradijentu brzine smicanja koji odgovara raspršivanju iz nazalnih sprejeva približno jednaka viskoznosti vode.
- Geliranje razvijenih pektinskih *in situ* gelirajućih sustava događa se vrlo brzo, neposredno nakon miješanja s SNF-om. Formirani gelovi pokazuju svojstva "pravih gelova" s G' većim od G" u ispitivanom rasponu kutne frekvencije (0,1-100 rad/s).
- Kompleksna viskoznost formiranih gelova smanjuje se s porastom frekvencije, odnosno gelovi su pseudoplastični.
- Čvrstoća gela raste s porastom koncentracije pektina te s dodatkom Tween-a 80 i manitola.
- Sustavi s 4% (*m/m*) manitola prikladne su osmolalnosti za nazalnu primjenu. Pektin i prometazin nisu značajnije utjecali na osmolalnost.
- Brzina oslobađanja prometazina iz pektinskih *in situ* gelova usporediva je s brzinom oslobađanja prometazina iz otopine tijekom prvih 30 minuta, nakon čega je oslobađanje iz *in situ* gelova blago usporeno.
- Nije uočena razlika u brzini oslobađanja prometazina iz *in situ* gelova pri različitim koncentracijama pektina (0,6 *vs* 1,0%, *m/m*), što upućuje na vrlo poroznu trodimenzionalnu strukturu formiranog pektinskog gela.

6. LITERATURA

Agrawal AK, Gupta PN, Khanna A, Sharma RK, Chandrabanshi HK, Gupta N, Patil UK, Yadav SK. Development and characterization of in situ gel system for nasal insulin delivery. *Pharmazie*, 2010, 65, 188–193.

Alagusundaram M, Chengaiah B, Gnanaprakash K, Ramkanth S, Madhusudhana Chetty C, Dhachinamoorthi D. Nasal drug delivery system - an overview. *Int J Res Pharm Sci*, 2010, 4, 454-465.

Almdal K, Dyre J, Hvidt S, Kramer O. Towards a Phenomenological Definition of the Term 'Gel'. *Polymer Gels and Networks*, 1993, 1, 5-17.

Alvarez-Lorenzo C, Gomez-Amoza JL, Martinez-Pacheco R, Souto C, Concheiro A. Microviscosity of hydroxypropylcellulose gels as a basis for prediction of drug diffusion rates. *Int J Pharm*, 1999, 180, 91–103.

Baloğlu E, Ozyazici M, Hizarcioğlu SY, Karavana HA. An in vitro investigation for vaginal bioadhesive formulations: bioadhesive properties and swelling states of polymer mixtures. *Farmaco*, 2003, 58, 391-336.

Baza lijekova, http://www.halmed.hr, pristupljeno 20.5.2018.

Belgamwar VS, Chauk DS, Mahajan HS, Jain SA, Gattani SG, Surana SJ. Formulation and evaluation of in situ gelling system of dimenhydrinate for nasal administration. *Pharm Dev Technol*, 2009, 14, 240–248.

Bhalerao AV, Lonkar SL, Deshkar SS, Shirolkar SV, Deshpande AD. Nasal Mucoadhesive *in situ* Gel of Ondansetron Hydrochloride. *Indian J Pharm Sci*, 2009, 71, 711–713.

Bhandwalkar MJ, Avachat AM. Thermoreversible nasal in situ gel of venlafaxine hydrochloride: formulation, characterization, and pharmacodynamic evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 2013, 14, 101-110.

Bhise SB, Yadav AV, Avachat AM, Malayandi R. Bioavailability of intranasal drug delivery system. *Asian J Pharm*, 2008 , 2, 201-215.

Bitter C, Suter- Zimmermann K, Surber C. Nasal drug delivery in humans. *Curr Probl Dermatol*, 2011, 40, 20−35.

Brouns F, Theuwissen E, Adam A, Bell M, Berger A, Mensink RP. Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women. *Eur J Clin Nutr*, 2012, 66, 591-559.

Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC, urednici. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York, McGraw-Hill, 12th edition, 2011, str. 911-924, 1967.

Cao SL, Rena XW, Zhanga QZ, Chena E, Xua F, Chena J, Liub LC, Jiang XG. In situ gel based on gellan gum as new carrier for nasal administration of mometasone furoate. *Int J Pharm*, 2009, 365, 109–115.

Capel F, Nicolai T, Durand D, Boulenguer P, Langendorff V. Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. *Food Hydrocoll*, 2006, 20, 901-907.

Carlfors J, Edsman K, Petersson R, Jörnving K. Rheological evaluation of Gelrite in situ gels for ophthalmic use. *Eur J Pharm Sci*, 1998, 6, 113-119.

Chan SY, Choo WS, Young DJ, Loh XJ. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohyr Polym*, 2017, 161, 118-139.

Charlton ST , Davis SS, Illum L. Evaluation of bioadhesive polymers as delivery systems for nose to brain delivery: In vitro characterisation studies. *J Controlled Release*, 2007, 118, 225–234.

Chelladurai S, Mishra M, Mishra B. Design and evaluation of bioadhesive in-situ nasal gel of ketorolac tromethamine. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56, 1596-1599.

Church DS, Church MK. Pharmacology of antihistamines. *World Allergy Organ J*, 2011, 4, 22-27.

Code of federal regulations, Pectin, https://www.accessdata.fda.gov, pristupljeno 24.5.2018.

Costantino HR, Illum L, Brandt G, Johnson PH, Quay SC. Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm*, 2007, 337, 1–24.

Dhakar RC, Maurya SD, Tilak VK, Gupta A . A review on factors affecting the design of nasal drug delivery system. *Int J Drug Deliv*, 2011, 3, 194-208.

DrugCard, Promethazine, https://www.drugbank.ca, pristupljeno 25.5.2018.

Dua R, Zia H, Needham T. The influence of tonicity and viscosity on the intranasal absorption of salmon calcitonin in rabbits. *Int J Pharm* , 1997, 147, 233–242.

Eccleston GM, Hudson NE. The use of capillary rheometer to determine the shear and extensional flow behavior of nasal spray suspensions. *J Pharm Pharmacol*, 2000, 52, 1223–1232.

Evaluation of JEFCA on food aditives, Pectins, http://apps.who.int , pristupljeno 24.5.2018.

Farid RM, Etman MA, Nada AH, Ebian Ael A. Formulation and in vitro evaluation of salbutamol sulphate in situ gelling nasal inserts. *AAPS PharmSciTech*, 2013, 14, 712-718.

Food ingridients and packaging, Pectin, https://www.efsa.europa.eu, pristupljeno 24.5.2018.

Fossen H. Structural Geology. Cambridge, Cambridge University Press, 2nd edition, 2016, 107.

Fu JT, Rao MA. Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: the effect of sucrose. *Food Hydrocoll*, 2001, 15, 93-100.

Gaikwad V. Formulation and evaluation of In-Situ gel of metoprolol tartrate for nasal delivery. *J Pharm* Res, 2010, 3, 788-793.

Ghori MU, Mahdi MH, Smith AM, Conway BR. Nasal Drug Delivery Systems: An Overview. *Am J Pharmacol Sci*, 2015, 3, 110-119.

Gilsenan P, Richardson RK, Morris ER. Thermally reversible acid-induced gelation of low-methoxy pectin. *Carbohydr Polym*, 2000, 41, 339-349.

Grassin-Delyle S, Buenestado A, Naline E, Faisy C, Blouquit-Laye S, Couderc LJ, Le Guen M, Fischler M, Devillier P. Intranasal drug delivery: An efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids. *Pharmacol Ther*, 2012, 134, 366–379.

Guidance for Industry : Nasal Spray and Inhalation Solution, Suspension, and Spray Drug Products — Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation, https://www.fda.gov, pristupljeno 11.6.2018.

Gunn VL, Taha SH, Liebelt EL, Serwint JR. Toxicity of over-the-counter cough and cold medications. *Pediatrics*, 2001, 108, E52

Habib AS, Reuveni J, Taguchi A, White WD, Gan TJ. A comparison of ondansetron with promethazine for treating postoperative nausea and vomiting in patients who received prophylaxis with ondansetron: a retrospective database analysis. *Anesth Analg*, 2007, 104, 548-551.

Illum L. Nasal drug delivery — Recent developments and future prospects. *J Control Release*, 2012, 161, 254–263.

Illum L. Nasal drug delivery: new developments and strategies. *Drug Discov Today*, 2002, 7, 1184-1189.

Inactive Ingredient Database, Mannitol, https://www.accessdata.fda.gov, pristupljeno 11.06.2018.

Jadhav KR, Gambhire MN, Shaikh IM, Kadam VJ, Pisal SS. Nasal drug delivery system-factors affecting and applications *Curr Drug ther*, 2007, *2*, 27-38.

Katzung BG, Masters SB and Trevor AJ. Basic and Clinical Pharmacology. New York, McGraw-Hill, 12th edition, 2012, str. 274-280.

Kaur P, Garg T, Rath G, Goyal AK. In situ nasal gel drug delivery: A novel approach for brain targeting through the mucosal membrane. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016, 44, 1167-1176.

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

Lee M, Desai A, urednici. Gibaldi's Drug Delivery Systems in Pharmaceutical Care. Bethesda, American Society of Health-System Pharmacists, 2007, str. 69.

Liu L, Fishman ML, Kost J, Hicks KB. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*, 2003, 24, 3333-3343.

Löfgren C, Walkenström P, Hermansson AM. Microstructure and rheological behavior of pure and mixed pectin gels. *Biomacromolecules*, 2002, 3, 1144-1153.

Madan M, Bajaj A, Lewis S, Udupa N, Baig JA . In situ forming polymeric drug delivery systems. *Indian J Pharm Sci*, 2009, 71(3), 242-245.

Majithiya RJ, Ghosh PK, Umrethia ML, Murthy RSR. Thermoreversible-mucoadhesive gel for nasal delivery of sumatriptan. *AAPS PharmSciTech*, 2006, 7, 67.

Marttin E, Schipper NGM, Verhoef JC, Merkus FWHM. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 29, 13–38.

May CD. Industrial Pectins: Sources, Production and Applications. *Carbohydr Polym*, 1990, 12, 79-99.

Mezger TG. The Rheology Handbook: For Users of Rotational and Oscillatory Rheometers. Hannover, Vincentz Network GmbH & Co KG, 2nd edition, 2006, str. 119.

Mishra RK, Banthia AK, Majeed ABA. Pectin based formulations for biomedical applications: a review. *Asian J Pharm Clin Res*, 2012, 5, 1-7.

Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11, 266–277.

Monge ME, Bulone D, Giacomazza D, Negri M, Bernik DL. Electronic nose screening of limonene release from multicomponent essential oils encapsulated in pectin gels. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2004, 7, 337-344.

Moreira HR, Munarin F, Gentilini R, Visai L, Granja PL, Tanzi MC, Petrini P. Injectable pectin hydrogels produced by internal gelation: pH dependence of gelling and rheological properties. *Carbohydr Polym*, 2014, 103, 339-347.

Munarin F, Tanzi MC, Petrini P. Advances in biomedical applications of pectin gels. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51, 681– 689.

Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Tait L, Bresalier R, Raz A. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94, 1854-1862.

Pathan IV, Chudiwal V, Farooqui I, Shingare P. Formulation design and evaluation of nasal in situ gel as a novel vehicle for azelastine hydrochloride. *Int J Drug Deliv*, 2013, 5, 284-290.

Picout DR, Ross-Murphy SB. Rheology of biopolymer solutions and gels. *ScientificWorldJournal*, 2003, 3, 105-121.

Product information, PecFent, http://www.ema.europa.eu, pristupljeno 24.5.2018.

Pujara CP, Shao Z, Duncan MR, Mitra AK. Effects of formulation variables on nasal epithelial cell integrity: Biochemical evaluations. *Int J Pharmaceut*, 1995, 114, 197-203.

Rao MA. Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods. Food Engineering Series. Boston, Springer Science+Business Media, 3rd edition, 2014, str. 113, 247.

Ravi PR, Aditya N, Patil S, Cherian L. Nasal in-situ gels for delivery of rasagiline mesylate: improvement in bioavailability and brain localization. *Drug Deliv*, 2015, 22, 903-910.

Rogovina LZ, Vasil'ev VG, Braudo EE. Definition of the concept of polymer gel. *Polym Sci Ser C*, 2008, 50, 85–92.

Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC, urednici. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London, Pharmaceutical Press, 5th edition, 2006, str. 449-453.

Sažetak opisa svojstava lijeka, Imigran 20 mg sprej za nos, http://www.halmed.hr, pristupljeno 20.5.2018.

Sharmaa R, Ahujaa M, Kaur H. Thiolated pectin nanoparticles: Preparation, characterization and ex vivo corneal permeation study. *Carbohydr Polym*, 2012, 87, 1606–1610.

Singh RMP, Kumar A, Pathak K. Thermally triggered mucoadhesive in situ gel of loratadine: β-cyclodextrin complex for nasal Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 2013, 14, 412-424.

Smidt JH, Offringa JCA, Crommelin DJA. Dissolution kinetics of theophylline in aqueous polymer solutions. *Int J Pharm*, 1991, 77, 255–257.

Sreeja CN, Mable SJ, Anoop KR. In situ gel: An innovative approach for safe and sustained nasal drug delivery. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2014, 24, 1-7.

Sriamornsak P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses : a review. *Silpakorn Univ Int J*, 2003, 3, 206–228.

Srivastava P, Malviya R. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry − An overview. *Indian J Nat Prod Resour*, 2011, 2, 10-18.

Starke PR, Weaver J, Chowdhury BA. Boxed warning added to promethazine labeling for pediatric use. *N Engl J Med*, 2005, 352, 2653.

Swamy NGN, Abbas Z. Mucoadhesive in situ gels as nasal drug delivery systems: an overview. *Asian J Pharm Sci*, 2012, 7, 168-180.

Talegaonkar S, Mishra PR. Intranasal delivery: An approach to bypass the blood brain barrier. *Indian J Pharmacol*, 2004, 36, 140-147.

Thakur BR, Singh RK, Handa AK. Chemistry and uses of pectin - a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1997, 37, 47-73.

Touitou E, Illum L. Nasal drug delivery. *Drug Deliv and Transl Res*, 2013, 3, 1–3.

Tripathi KD. Essentials of Medical Pharmacology. New Delhi, Jaypee Brothers Medical Publishers, 7th edition, 2013, str. 165, 168, 220.

Trows S, Wuchner K, Spycher, Steckel H. Analytical challenges and regulatory requirements for nasal drug products in Europe and the U.S. *Pharmaceutics*, 2014, *6*, 195-219.

Ugwoke MI, Agu RU, Verbeke N, Kinget R. Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 1640– 1665.

Urias-Orona V, Rascón-Chu A, Lizardi-Mendoza J, Carvajal-Millán E, Gardea AA, Ramírez-Wong B. A novel pectin material: extraction, characterization and gelling properties. *Int J Mol Sci*, 2010, 11, 3686–3695.

Valenta C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 1692-1712.

Watts P, Smith A. PecSys: in situ gelling system for optimised nasal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, 6, 543-552.

Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Paul Knox JP. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol*, 2001, 47, 9–27.

Zaki NM, Awada GA, Mortadaa ND, El Hady SSA. Enhanced bioavailability of metoclopramide HCl by intranasal administration of a mucoadhesive in situ gel with modulated rheological and mucociliary transport properties. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 32, 296–307.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Nazalna primjena, zbog brojnih prednosti, predstavlja dobru alternativu klasičnim putovima primjene različitih djelatnih tvari. Posljedično, razvijaju se novi nazalni terapijski sustavi, među kojima važno mjesto zauzimaju *in situ* gelirajući sustavi. Takvi sustavi primjenjuju se u obliku otopine/suspenzije te geliraju na mjestu primjene uslijed odgovora na neki od fizioloških stimulansa. Time se postiže produljeno zadržavanje lijeka na mjestu primjene uz mogućnost kontroliranog oslobađanja. S obzirom na prikladna svojstva geliranja, pektin je jedan od vodećih polimera u izradi *in situ* gelirajućih sustava.

Cilj ovog rada je razvoj pektinskog *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu temeljem procjene utjecaja koncentracije pektina, prisustva Tween-a i manitola na reološka svojstva, osmolalnost i/ili profil oslobađanja uklopljenog lijeka. Kao modelni lijek odabran je prometazin koji se primjenjuje nazalno u terapiji rinitisa, ali i protiv mučnine i povraćanja pri čemu nazalna primjena omogućuje brz početak djelovanja i značajno povećanje bioraspoloživosti.

Pripremljeni su *in situ* gelirajući sustavi s 0,6% (*m/m*) i 1,0% (*m/m*) amidiranog nisko metoksiliranog pektina, 4% (*m/m*) manitola kao sredstva za izotonizaciju, 0,025% (*m/m*) Tween-a 80 kao solubilizatora, te 0,05% (*m/m*) prometazina. Utvrđeno je da su *in situ* gelirajući pektinski sustavi pseudoplastični, te da pri gradijentu brzine smicanja koji odgovara raspršivanju iz nazalnih sprejeva imaju viskoznost sličnu viskoznosti vode. Nakon miješanja sa simuliranim nazalnim fluidom pokazuju izrazito brzo geliranje, pri čemu su nastali gelovi pseudoplastični, te imaju svojstva "pravih gelova" s modulom pohrane većim od modula gubitka u ispitivanom rasponu kutne frekvencije (0,1-100 rad/s). Čvrstoća gela raste s porastom koncentracije pektina te s dodatkom Tween-a 80 i manitola. Sustavi s manitolom prikladne su osmolalnosti za nazalnu primjenu. Brzina oslobađanja prometazina iz pektinskih *in situ* gelova usporediva je s brzinom oslobađanja prometazina iz otopine tijekom prvih 30 minuta, nakon čega je oslobađanje iz *in situ* gelova blago usporeno. Nije uočena razlika u brzini oslobađanja lijeka iz *in situ* gelova pri različitim koncentracijama pektina (0,6 *vs* 1,0%, *m/m*), što upućuje na vrlo poroznu trodimenzionalnu strukturu formiranog pektinskog gela. Rezultati provedenog istraživanja razjašnjavaju međuovisnost ispitivanih formulacijskih parametara i ključnih svojstava *in situ* gelirajućih pektinskih sustava te predstavljaju temelj za daljnja istraživanja u području.

Nasal drug delivery presents a good alternative to classical routes of administration due to numerous advantages. Consequently, innovative nasal delivery systems are being developed, among which *in situ* gelling systems are of significant importance. These systems are instilled as solutions/suspensions, but once administered undergo *in situ* gelation in response to different physiological stimuli. Such transformation prolongs the residence time of the drug at the site of administration assuring also the possibility for the controlled release. Due to its gelling properties, pectin represents one of the leading polymers in the design of *in situ* gelling systems.

The aim of this study is to develop an *in situ* gelling pectin system for nasal delivery based on the screening of influence of pectin concentration, presence of Tween 80 and mannitol on the rheological properties, osmolality and/or release profile of the drug entrapped. In this study promethazine was used as the model drug. It is administered nasally for the treatment of rhinitis, but also in the therapy of nausea and vomiting considering that in that case nasal delivery provides rapid response and significant increase in bioavailability.

In this study, *in situ* gelling systems consisting of amidated low methoxyl pectin (0.6%, and 1.0%, *w/w*), mannitol as an isotonic agent (4%, *w/w*), Tween 80 as solubilizing agent (0.025%, *w/w*) and promethazine (0.05%, *w/w*) have been prepared. *In situ* gelling systems showed pseudoplastic behavior, with the viscosity similar to the viscosity of water at standard nasal spray shear rates. After mixing with simulated nasal fluid, they gelled very quickly, while formed gels showed pseudoplastic characteristics and behaved like "true gels" with storage modulus being constantly higher than loss modulus at the angular frequency tested range (0.1-100 rad/s). The gel strength increased with the increase of the pectin concentration and with the addition of Tween 80 and mannitol. Systems with mannitol showed the appropriate osmolality for the nasal application. Promethazine release rate from the *in situ* gels was comparable to its release rate from the solution during the first 30 minutes of release study, after which the release from *in situ* gels was moderately retarded. No significant difference in the release rate between the *in situ* gels differing in pectin concentration (0.6 vs 1.0%, *w/w*) was observed, indicating highly porous tridimensional structure of the pectin gel formed. In conclusion, the results obtained in this study revealed the relationship between the investigated formulation parameters and the key properties of the *in situ* gelling pectin system and represent the basis for the further investigations within this field.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Razvoj *in situ* gelirajućeg pektinskog sustava kao platforme za nazalnu primjenu lijekova

Lucija Zečević

SAŽETAK

Nazalna primjena, zbog brojnih prednosti, predstavlja dobru alternativu klasičnim putovima primjene različitih djelatnih tvari. Posljedično, razvijaju se novi nazalni terapijski sustavi, među kojima važno mjesto zauzimaju *in situ* gelirajući sustavi. Takvi sustavi primjenjuju se u obliku otopine/suspenzije te geliraju na mjestu primjene uslijed odgovora na neki od fizioloških stimulansa. Time se postiže produljeno zadržavanje lijeka na mjestu primjene uz mogućnost kontroliranog oslobađanja. S obzirom na prikladna svojstva geliranja, pektin je jedan od vodećih polimera u izradi *in situ* gelirajućih sustava.

Cilj ovog rada je razvoj pektinskog *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu temeljem procjene utjecaja koncentracije pektina, prisustva Tween-a i manitola na reološka svojstva, osmolalnost i/ili profil oslobađanja uklopljenog lijeka. Kao modelni lijek odabran je prometazin koji se primjenjuje nazalno u terapiji rinitisa, ali i protiv mučnine i povraćanja pri čemu nazalna primjena omogućuje brz početak djelovanja i značajno povećanje bioraspoloživosti. Pripremljeni su *in situ* gelirajući sustavi s 0,6% (*m/m*) i 1,0% (*m/m*) amidiranog nisko metoksiliranog pektina, 4% (*m/m*) manitola kao sredstva za izotonizaciju, 0,025% (*m/m*) Tween-a 80 kao solubilizatora, te 0,05 % (*m/m*) prometazina. Utvrđeno je da su *in situ* gelirajući pektinski sustavi pseudoplastični, te da pri gradijentu brzine smicanja koji odgovara raspršivanju iz nazalnih sprejeva imaju viskoznost sličnu viskoznosti vode. Nakon miješanja sa simuliranim nazalnim fluidom pokazuju izrazito brzo geliranje, pri čemu su nastali gelovi pseudoplastični, te imaju svojstva "pravih gelova" s modulom pohrane većim od modula gubitka u ispitivanom rasponu kutne frekvencije (0,1-100 rad/s). Čvrstoća gela raste s porastom koncentracije pektina te s dodatkom Tween-a 80 i manitola. Sustavi s manitolom prikladne su osmolalnosti za nazalnu primjenu. Brzina oslobađanja prometazina iz pektinskih *in situ* gelova usporediva je s brzinom oslobađanja prometazina iz otopine tijekom prvih 30 minuta, nakon čega je oslobađanje iz *in situ* gelova blago usporeno. Nije uočena razlika u brzini oslobađanja pektina iz *in situ* gelova pri različitim koncentracijama pektina (0,6 vs 1,0%, *m/m*), što upućuje na vrlo poroznu trodimenzionalnu strukturu formiranog pektinskog gela. Rezultati provedenog istraživanja razjašnjavaju međuovisnost ispitivanih formulacijskih parametara i ključnih svojstava *in situ* gelirajućih pektinskih sustava te predstavljaju temelj za daljnja istraživanja u području.

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

Rad sadrži: 43 stranica, 14 grafičkih prikaza, 3 tablica i 87 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Pektin; *In situ* gelirajući sustav; Nazalna primjena; Reološka svojstva, Osmolalnost

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

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

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

DEVELOPMENT OF *IN SITU* GELLING PECTIN SYSTEM AS NASAL DRUG DELIVERY PLATFORM

Lucija Zečević

SUMMARY

Nasal drug delivery presents a good alternative to classical routes of administration due to numerous advantages. Consequently, innovative nasal delivery systems are being developed, among which *in situ* gelling systems are of significant importance. These systems are instilled as solutions/suspensions, but once administered undergo *in situ* gelation in response to different physiological stimuli. Such transformation prolongs the residence time of the drug at the site of administration assuring also the possibility for the controlled release. Due to its gelling properties, pectin represents one of the leading polymers in the design of *in situ* gelling systems.

The aim of this study is to develop an *in situ* gelling pectin system for nasal delivery based on the screening of influence of pectin concentration, presence of Tween 80 and mannitol on the rheological properties, osmolality and/or release profile of the drug entrapped. In this study promethazine was used as the model drug. It is administered nasally for the treatment of rhinitis, but also in the therapy of nausea and vomiting considering that in that case nasal delivery provides rapid response and significant increase in bioavailability. In this study, *in situ* gelling systems consisting of amidated low methoxyl pectin (0.6%, and 1.0%, *w/w*), mannitol as an isotonic agent (4%; *w/w*), Tween 80 as solubilizing agent (0.025%, *w/w*) and promethazine (0.05%, *w/w*) have been prepared. *In situ* gelling systems showed pseudoplastic behavior, with the viscosity similar to the viscosity of water at standard nasal spray shear rates. After mixing with simulated nasal fluid, they gelled very quickly, while formed gels showed pseudoplastic characteristics and behaved like "true gels" with storage modulus being constantly higher than loss modulus at the angular frequency tested range (0.1-100 rad/s). The gel strength increased with the increase of the pectin concentration and with the addition of Tween 80 and mannitol. Systems with mannitol showed the appropriate osmolality for the nasal application. Promethazine release rate from the *in situ* gels was comparable to its release rate from the solution during the first 30 minutes of release study, after which the release from *in situ* gels was moderately retarded. No significant difference in the release rate between the *in situ* gels differing in pectin concentration (0.6 vs 1.0%, *w/w*) was observed, indicating highly porous tridimensional structure of the pectin gel formed. In conclusion, the results obtained in this study revealed the relationship between the investigated formulation parameters and the key properties of the *in situ* gelling pectin system and represent the basis for the further investigations within this field.

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

Thesis includes: 43 pages, 14 figures, 3 tables and 87 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Pectin; *In situ* gelling system; Nasal delivery; Rheological properties; Osmolality

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

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

The thesis was accepted: July 2018