

Primjenjivost gelan gume u pripravi in situ gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu lijekova

Čotić, 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:163:712193>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-08**



Repository / Repozitorij:

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



Lucija Čotić

**Primjenjivost gelan gume u pripravi *in situ*
gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu lijekova**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmaceutika 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, susretljivosti, savjetima i strpljenju 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 Zečević na ugodnom druženju prilikom izrade diplomskog rada te svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na ugodnom boravku u prostorijama zavoda.

Na kraju, posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na velikoj ljubavi i podršci tijekom cijelog studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Potencijal nazalne primjene lijeka	1
1.1.1. Gelovi kao terapijski sustavi za nazalnu primjenu.....	4
1.2. Gelan guma	5
1.2.1. Mehanizam geliranja.....	7
1.2.2. Upotreba gelan gume u farmaceutskoj industriji.....	9
1.3. Melatonin	15
1.3.1. Nazalna primjena melatonina.....	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME	19
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Materijali	21
3.2. Metode	22
3.2.1. Priprema <i>in situ</i> gelirajućih sustava temeljenih na gelan gumi.....	22
3.2.2. Ispitivanje reoloških svojstava.....	23
3.2.3. Određivanje osmolalnosti.....	24
3.2.4. <i>In vitro</i> oslobađanje lijeka.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Ispitivanje reoloških svojstava	26
4.1.1. Viskoznost <i>in situ</i> gelirajućih sustava temeljenih na gelan gumi.....	26
4.1.2. Reološka svojstva <i>in situ</i> gelova temeljenih na gelan gumi.....	27
4.2. Osmolalnost	35
4.3. <i>In vitro</i> oslobađanje lijeka	37
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	40
7. SAŽETAK/SUMMARY	50
8. Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card	

1. UVOD

1.1 Potencijal nazalne primjene lijeka

Nazalna primjena lijeka je neinvazivan način primjene koji se najviše koristi u lokalnoj terapiji oboljenja sluznice nosa, a mogućnost sistemske apsorpcije osigurava potencijal ovakve primjene i u liječenju niza kroničnih i akutnih bolesti, koje zahtijevaju sistemsku raspoloživost lijeka (Choudhary i Goswami, 2013).

Nazalna primjena lijeka je jednostavna i bezbolna, što osigurava dobru adherenciju bolesnika prema terapiji. Uslijed dobre prokrvljenosti sluznice nosa, nazalnom primjenom moguće je postići brzu apsorpciju i sistemsku raspoloživost lijeka uz brz početak djelovanja. Za razliku od oralne primjene, izbjegava se i razgradnja u probavnom sustavu te prvi prolaz kroz jetru. Sve to rezultira mogućnošću primjene manje doze lijeka za postizanje željenog terapijskog učinka. Zanimljiva je i mogućnost izravne dostave nazalno primijenjenog lijeka u središnji živčani sustav (SŽS) preko olfaktornog neuroepitela. Razvoj odgovarajućeg nazalnog terapijskog sustava koji bi potencirao izravnu dostavu lijeka u SŽS uvelike bi olakšao liječnje bolesti kao što su Parkinsonova te Alzheimerova bolest (Arora i sur., 2002; Choudhary i Goswami, 2013; Menzel i sur., 2016).

Prvi korak pri apsorpciji lijeka primijenjenog nazalno je prijelaz kroz sloj sluzi koja prekriva nosnu sluznicu, a prijelaz je otežan za veće molekule. Taj sloj je debljine od oko 5 μm , a sastoji se uglavnom od vode (95 %), mucina (2 %), soli (1 %), različitih proteina (1 %) kao što su albumin, imunoglobulini, lizosomi i laktoferin, te lipida (< 1 %). Navedeni sloj sluzi bitan je kao prva linija obrane od udahnutih čestica, bakterija i virusa, pružajući zaštitu samoj nosnoj sluznici, ali i nižim dišnim putovima. Sastoji se od dva sloja različite viskoznosti: donji sloj (sol faza) i gornji sloj (gel faza). Razlika u viskoznosti tih slojeva bitna je za pokretanje cilija koje se nalaze na površini epitelnih stanica i kretanje sloja sluzi koje se naziva mukocilijarni klirens (MCC) (Ugwoke i sur., 2005). Epitelne stanice prekrivene su nepokretnim mikrovilima koji povećavaju ukupnu površinu epitela, što je bitno za transcelularni transport lipofilnih lijekova.

MCC je jedan od glavnih ograničenja nazalne primjene lijekova. Radi se o obrambenom mehanizmu u nosnoj šupljini kojim se sluz s adheriranim česticama prenosi do nazofarinksa i nadomješta novom sluzi svakih 20-30 min. Time se sprječava prolazak štetnih čestica i mikroorganizama do pluća. Sluz se iz nazofarinksa dalje prenosi prema probavnom sustavu. Nazalno primijenjeni lijekovi također su podložni MCC-u, uslijed čega im se skraćuje vrijeme zadržavanja na mjestu djelovanja/apsorpcije (Arora i sur., 2002; Ghori i sur., 2015).

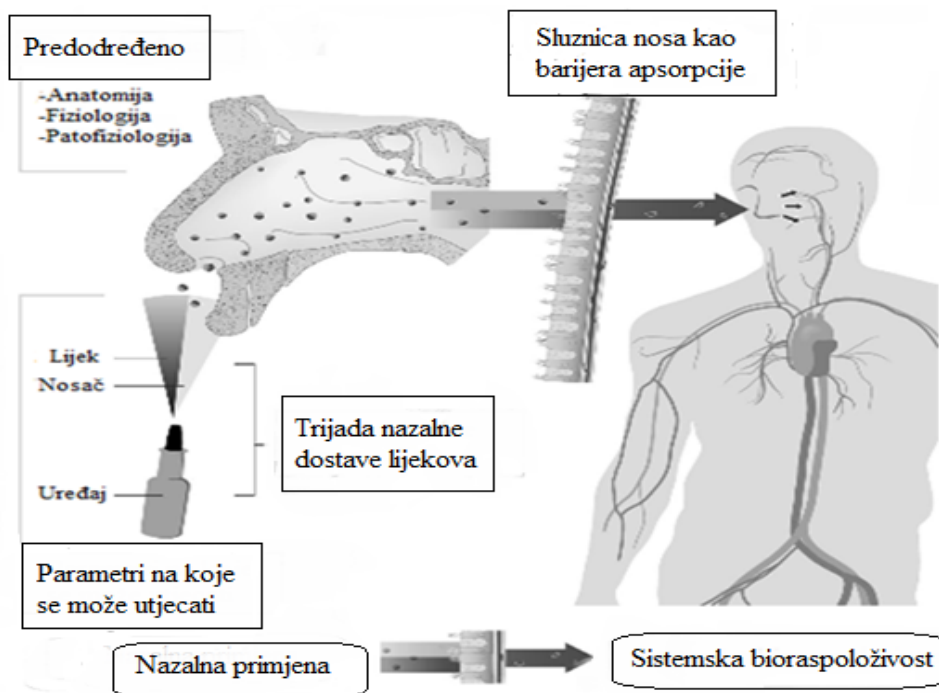
Još jedan nedostatak ovakve primjene je ograničeni volumen formulacije koji se može primijeniti po nosnici te može biti u rasponu od 25 do 200 μ l. Tako mali volumen nužan je zbog sprječavanja curenja lijeka u nazofarinks te radi smanjenja iritacije sluznice nosa (Choudhary i Goswami, 2013; Dale i sur., 2002).

Također, održavanje pH formulacije između 4,5 i 6,5 bitna je stavka za sprječavanje iritacije sluznice, omogućavanje održavanja lijeka u neioniziranom obliku za apsorpciju, sprječavanje rasta patogenih bakterija te održavanje fiziološkog cilijarnog kretanja (Choudhary i Goswami, 2013).

Nakon prolaska kroz sloj sluzi, nazalno primijenjeni lijekovi apsorbiraju se transcelularnim ili paracelularnim mehanizmom prijenosa. Transcelularnim putem (preko staničnih membrana) prenose se lipofilne molekule, a preko stanične membrane aktivnim prijenosom prolaze i molekule koje imaju odgovarajuće transportere. Paracelularnim putem, odnosno kretanjem između stanica, prenose se hidrofilne molekule. Ovakav put prijenosa je spor i pasivan, a primijećena je i slaba bioraspodivnost hidrofilnih lijekova molekulske mase veće od 1000 Daltona. Za povećanje bioraspodivosti hidrofilnih lijekova koriste se različiti pospješivači apsorpcije (Appasaheb i sur., 2013; Ghori i sur., 2015).

Razvoj terapijskog sustava za nazalnu primjenu uključuje detaljno poznavanje fizičko-kemijskih svojstava djelatne tvari, ograničenja nazalne primjene poput mukocilijarnog mehanizma čišćenja te relativno malog volumena formulacije koji se može primijeniti po nosnici, ali i enzimске aktivnosti u nosnoj šupljini koja može inaktivirati određene lijekove. Formulacija mora biti prilagođene pH vrijednosti, osmolalnosti i viskoznosti kako bi bila odgovarajuća za nazalnu primjenu (Thorat, 2016).

Slika 1. ukratko prikazuje najvažnije čimbenike koje valja razmotriti za uspješan razvitak terapijskog sustava za nazalnu primjenu.



Slika 1. Najvažniji čimbenici koji se moraju uzeti u obzir pri razvoju formulacije za nazalnu primjenu (preuzeto i prilagođeno prema Bitter i sur., 2011).

Trenutno se nazalno najviše primjenjuju lijekovi s lokalnim učinkom za liječenje različitih oboljenja nosne sluznice kao što su alergijski rinitis, kongestija i upale nosne sluznice. Za takva stanja lokalno se koriste antihistaminici, kortikosteroidi, antikolinergici i vazokonstriktori (Ghori i sur., 2015).

Nazalna primjena lijekova s ciljem postizanja sistemske raspoloživosti nerijetko je izbor kod stanja kod kojih je potrebno osigurati brzo djelovanje lijeka, kao na primjer u terapiji boli. S tim u skladu nazalno se primjenjuju antimigrenici kao što su sumatriptan, zolmitriptan, ergotamin (Illum, 2002), ali i fentanil, opioidni analgetik za liječenje probijajuće boli u bolesnika s karcinomom (Bell i Butler, 2013). Nazalno se primjenjuju i peptidi koji, usprkos maloj bioraspoloživosti, a zahvaljujući velikoj potentnosti, ostvaruju terapijski učinak nakon nazalne primjene. Ograničenja nazalne primjene peptida pokušavaju se riješiti korištenjem različitih pospješivača apsorpcije (Illum, 2012). Nazalno se primjenjuju i cjepiva uglavnom protiv respiratornih infekcija, s obzirom da se takvim načinom primjene postiže i lokalni i sistemski imunosni odgovor (Illum, 2002).

1.1.1. Gelovi kao terapijski sustavi za nazalnu primjenu

Gel je polučvrsti oblik koji se sastoji od dvije ili više komponenti od kojih je jedna tekuća i prisutna u većoj količini i u kojoj druga komponenta čini trodimenzionalnu mrežu kovalentno ili nekovalentno povezanih molekula ili agregata. Gelovi, s obzirom na reološka svojstva, mogu varirati od viskoznih tekućina koje, primjerice, čine hemiceluloza, metilceluloza, kitozan i ksantanska guma, do jako čvrstih gelova poput gelova gelan gume, pektina i alginata (Ghori i sur., 2015; Ban i sur., 2018), te kao takvi mogu imati bolje biofarmaceutske značajke od konvencionalnih farmaceutskih oblika za nazalnu primjenu. Naime, najveći nedostatak otopina i suspenzija kao konvencionalnih nazalnih farmaceutskih oblika je brzo uklanjanje iz nosne šupljine mukocilijarnim klirensom. Svi oblici koji nisu mukoadhezivni imaju vrijeme poluživota od 15 do 20 min nakon primjene na nosnu sluznicu. Mukoadhezivni gelovi mogu usporiti mukocilijarni klirens te produljiti zadržavanje lijeka na mjestu primjene i tako mu povećati bioraspoloživost. Sve to omogućava manju učestalost doziranja i bolju adherenciju pacijenata prema terapiji (Galgatte i sur., 2014; Ghori i sur., 2015). Također, konvencionalni tekući oblici mogu curiti iz nosa u grlo, što uzrokuje gubitak lijeka i loš okus za pacijenta (Ban i sur., 2018). No i kod nazalnih gelova nailazimo na probleme koji se tiču same njihove primjene jer se većina gelova ne može lako primijeniti klasičnim sprejevima za nos. Razvoj *in situ* gelirajućih sustava najbolje rješava taj problem jer su takvi sustavi prije primjene u obliku tekućine, a stvaranje gela događa se tek u dodiru s nosnom sluznicom.

Polimeri koji se najviše koriste u pripravi *in situ* gelirajućih sustava za nazalnu primjenu su pektin, Carbopol, gelan guma, kitozan, poloksamer i etil (hidroksietil) celuloza. *In situ* geliranje može biti potaknuto različitim mehanizmima. Fiziološki stimulansi koji potiču geliranje mogu biti temperatura, pH ili prisutnost iona. Nadalje, mehanizmi geliranja temeljeni na kemijskim reakcijama uključuju fotopolimerizaciju te enzimsko i ionsko povezivanje. Geliranje može biti potaknuto i fizičkim promjenama biomaterijala kao što su bubrenje ili difuzija otapala (Nirmal i sur., 2010; Ban i sur., 2018).

1.2. Gelan guma

Gelan guma je linearni, negativno nabijeni ekstracelularni polisaharid kojeg izlučuje mikroorganizam *Sphingomonas elodea* (stari naziv je *Pseudomonas elodea*) (Zia i sur., 2018). Zanimljiva je zbog svojih povoljnih fizičko-kemijskih svojstava i netoksičnosti, a poznata je kao prehrambeni aditiv kojeg je odobrila američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) i Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*), pod nazivom E418 (Bacelar i sur., 2016).

Primjena gelan gume raširena je u pripravi različitih farmaceutskih oblika, primjerice oblika s produljenim oslobađanjem djelatne tvari (Agnihotri i sur., 2006), u pripravi mikrosfera (Jana i sur., 2013) te u različitim farmaceutskim i biokemijskim istraživanjima kao što su genska terapija (Goyal i sur., 2011), bioinženjerstvo (Oliveira i sur., 2010) i slično. Materijali zasnovani na gelan gumi koriste se i u prehrambenoj i naftnoj industriji (Zia i sur., 2017).

Struktura

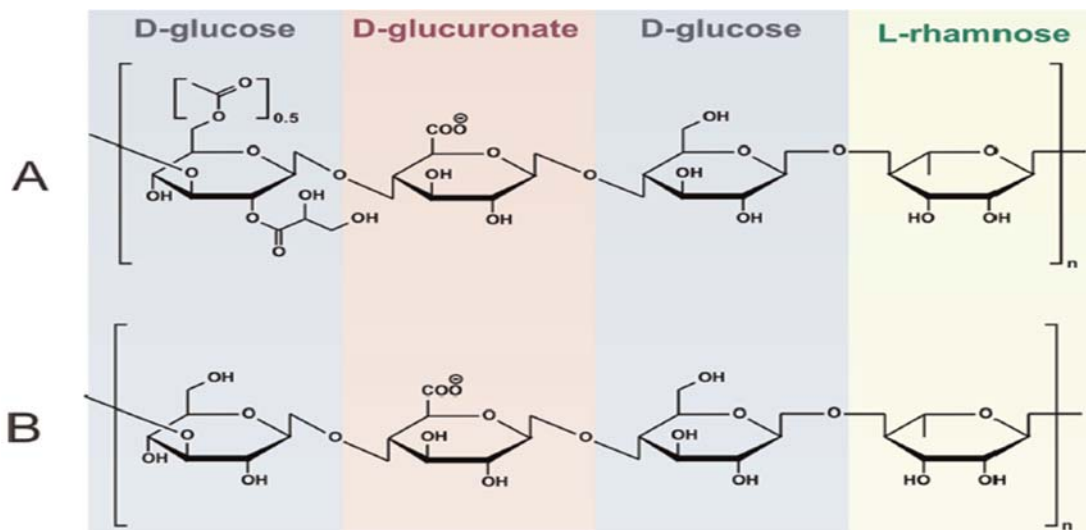
Primarnu strukturu gelan gume (Slika 2.) čini linearna ponavljajuća jedinica tetrasaharida koja sadrži polisaharidne osatke glukoze, glukuronske kiseline i ramnoze: $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D}\text{-glukoza}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D}\text{-glukuronska kiselina}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D}\text{-glukoze}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L}\text{-ramnoza}\text{-}(1\rightarrow]$ (Sworn, 2009).

Postoje dva tipa gelan gume koji se razlikuju u stupnju acilacije:

- HA gelan guma (engl. *high acil*)-nativna gelan guma
- LA gelan guma (engl. *low acil*)

Nativni polimer je poznat pod nazivom HA gelan guma jer u svojoj strukturi sadrži O-5-acetilne i O-2-glicerilne skupine na (1→3)-vezanom glukoznom ostatku.

Najčešće se za komercijalnu proizvodnju nativni polimer izlaže visokoj temperaturi i alkalnom mediju pri čemu se dobiva LA gelan guma (Morris i sur., 2012; Mahdi i sur., 2016).



Slika 2. Struktura HA gelan gume (A); struktura LA gelan gume (B): α -L-ramnoza, β -D-glukoza i β -D-glukuronat, u molarnim omjerima 1:2:1 (preuzeto i prilagođeno prema Osmalek i sur. 2014).

Proizvodnja

Gelan guma se industrijski proizvodi u mediju koji sadrži izvor ugljika, izvor dušika te odgovarajuće elemente u tragovima. Fermentirajući medij se inokulira mikroorganizmima i fermentacija se odvija u sterilnim uvjetima (Sworn, 2009). Najvažniji za dovoljnu proizvodnju i željena svojstva gelan gume je izvor ugljika, a za tu svrhu se mogu koristiti glukoza, saharoza, manitol, fruktoza ili maltoza (u kombinaciji ili odvojeno). Količina izvora ugljika obično je 2-4 % mase medija.

Drugi najvažniji faktor je količina i vrsta izvora dušika. Uz minimalnu količinu izvora dušika primijećen je najveći doprinos gelan gume. Naime, vrsta i koncentracija izvora dušika utječu na tok prisutnog ugljika ili prema biomasi ili prema nastanku željenog produkta. Izvori dušika mogu biti organski ili anorganski, a primijećeno je da organski izvori dušika ubrzavaju rast stanica mikroorganizama, a time i biosintezu gelan gume. Iako je gelan guma ekstracelularni polisaharid, rast stanica mikroorganizama povećava i proizvodnju gelan gume što je objašnjeno vezanjem gelan gume za stanice mikroorganizama u fermentirajućem mediju koje potom bivaju okružene i „zarobljene“ ovim biopolimerom. Bujon s većim prinosom gelan gume je onda i viskozniji te je potreban odgovarajući rotirajući sustav koji će omogućiti

dovoljnu opskrbu kisikom. U medij se dodaju i prekursori kao što su šećeri nukleotid fosfata: uridin-difosfat-glukoza (UDP-glukoza), timidin-difosfat-ramnoza (TDP-ramnoza), uridin-difosfat-glukuronska kiselina (UDP-glukuronska kiselina). Pretpostavlja se da sinteza gelan gume zahtjeva navedene aktivirane prekursore prije nego li se sastavi ponavljajuća jedinica. U medij se dodaju i vitamini i aminokiseline koji pojačavaju rast stanica mikroorganizama, a time opet i proizvodnju gelan gume. Također, bitan faktor u proizvodnji je pH koji mora biti između 6,5 i 7,0 za optimalan rast stanica mikroorganizama. Miješanje bujona u svrhu osiguravanja ujednačenih uvjeta odvija se spiralnim rotorom pri 250 okretaja u minuti. Temperatura proizvodnje je uglavnom 30°C, pri kojoj je uočen najveći rast stanica mikroorganizama (Giavasis i sur., 2000; Prajapati i sur., 2013). Nakon fermentacije bujon se pasteurizira, a nativni oblik gelan gume se izolira taloženjem s alkoholom (Sworn, 2009).

1.2.1. Mehanizam geliranja

Primjena gelan gume zanimljiva je upravo zbog mogućnosti stvaranja gelova u reakciji s kationima, pri koncentraciji puno manjoj u usporedbi s ostalim hidrokolidima.

Geliranje gelan gume je proces koji ima dva koraka (Slika 3.). U otopini zagrijanoj pri oko 80 °C polimer je u nasumičnom obliku klupka (engl. *coil*) te hlađenjem prelazi u sređeni oblik dvostruke uzvojnice (engl. *double helix*) što je poznato pod nazivom „*coil to helix transition*“ te je ovaj prijelaz termoreverzibilan (zagrijavanjem opet dolazi do prijelaza u oblik klupka). Potom slijedi agregiranje dvostrukih uzvojnica (Oliveira i sur., 2010; Iurciuc i sur., 2016).



Slika 3. Postupni prijelaz vodene otopine gelan gume u gel (preuzeto i prilagođeno prema Osmalek i sur. 2014).

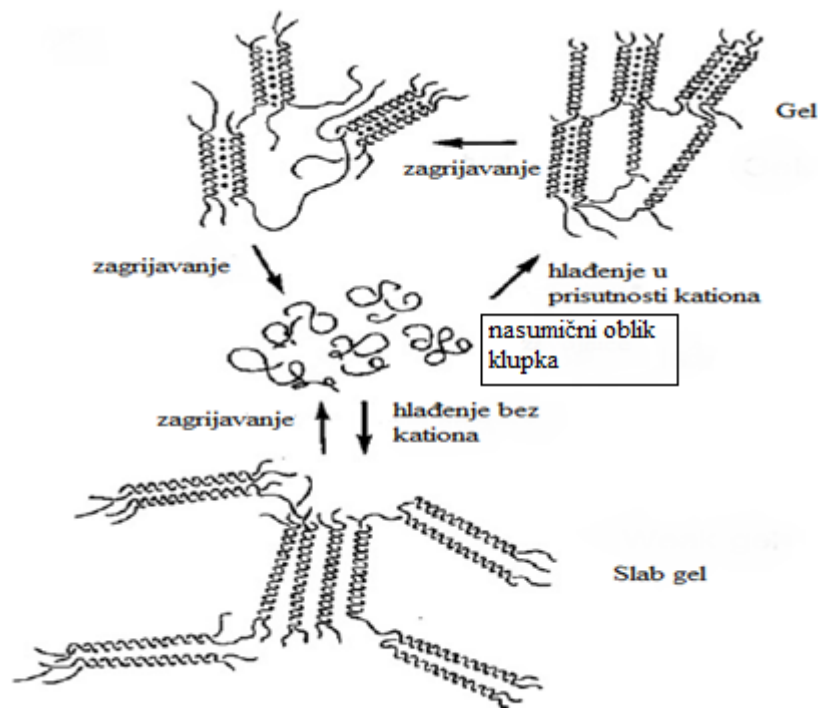
Ovisno u stupnju acilacije mogu se stvarati gelovi različitih svojstava. Za HA oblik karakteristični su mekani i elastični gelovi dok su za LA oblik karakteristični čvrsti i kruti

gelovi. Svojstva gelova su različita zbog toga što HA oblik u svojoj strukturi ima acetilne i glicerilne skupine koje ograničavaju agregaciju uzvojnica što onda rezultira mekanim gelovima. LA oblik stvara čvršće gelove ovisno o temperaturi te vrsti i koncentraciji prisutnih kationa (Grasdalen, Smidsrod, 1987; Iurciuc i sur., 2016).

Stabilniji gelovi gelan gume nastaju u prisutnosti monovalentnih i divalentnih kationa (Slika 4.). Monovalentni kationi utječu na geliranje tako što smanjuju elektrostatska odbijanja između ioniziranih karboksilnih skupina u lancima gelan gume. To omogućuje bolje agregiranje dvostrukih uzvojnica i stabilniji gel. Kod nižih koncentracija monovalentnih kationa stvaraju se slabi gelovi, dok porastom koncentracije nastaju čvršći gelovi.

U prisutnosti divalentnih kationa do agregacije i geliranja dolazi stvaranjem kemijskih veza između divalentnog kationa i dvije karboksilne skupine (potječu od glukuronske kiseline u strukturi gelan gume). Uz to, prisutan je i mehanizam smanjenja elektostatskih odbijanja kao kod monovalentnih iona. Ipak, prema Morris i sur. (2012) prevelika koncentracija divalentnih iona uzorkuje pretjeranu agregaciju i smanjenje jačine gela pa su najjači gelovi zapaženi pri približno jednakim stehiometrijskim omjerima divalentnih kationa i karboksilnih skupina gelan gume. Divalentni kationi uspješnije potiču geliranje gelan gume pa je tako za gelove iste jačine potrebno dodati veće koncentracije monovalentnih nego divalentnih iona.

Na proces geliranja utječe i pH. Smanjenje pH rezultira smanjenjem negativnog naboja polimera i elektostatskog odbijanja među uzvojnica. Time se potiče agregacija uzvojnica i stvaranje gela (Oliveira i sur., 2010; Morris i sur., 2012; Bacelar i sur., 2016).



Slika 4. Model geliranja gelan gume predložen od strane Robinson i sur. (1991)

U modelu znak • označava katione koji potiču agregaciju dvostrukih uzvojnica gelan gume (preuzeto i prilagođeno prema Morris i sur., 2012).

1.2.2. Upotreba gelan gume u farmaceutskoj industriji

Biopolimeri postaju sve zanimljiviji u farmaceutskoj industriji zbog svojih prednosti kao što su biorazgradljivost, niska cijena te relativno jednostavna proizvodnja. Iako se gelan guma trenutno više koristi u prehrambenoj industriji, činjenica da stvara čvrste gelove čak i pri niskoj koncentraciji te svojstvo mukoadhezivnosti čine ju materijalom koji je obećavajući za farmaceutsku industriju te se već široko koristi za pripremu farmaceutskih oblika s modificiranim oslobađanjem uklopljene djelatne tvari. Također, prisutnost funkcionalnih skupina u strukturi čini ju podložnom različitim modifikacijama koje mogu dodatno poboljšati njezina svojstva (Prezotti i sur., 2014).

U Tablici 1. navedeni su primjeri terapijskih sustava temeljenih na gelan gumi.

Oralna primjena lijekova inače je najzastupljenija i jako dobro prihvaćena od strane pacijenata pa je tako i primjena gelan gume pri oblikovanju oralnih farmaceutskih oblika najviše istraživana. Gelan guma se koristi kao sredstvo za raspadanje u oralnim farmaceutskim oblicima trenutnog oslobađanja ili kao ekscipijens koji tvori matriks oblika s odgođenim oslobađanjem. Iskorištena je i mogućnost *in situ* geliranja gelan gume u doticaju s ionima za proizvodnju granula i kapsula (Osmałek i sur., 2014). Istražuje se i moguća primjena oralnih *in situ* gelirajućih sustava koji bi omogućili kontrolirano oslobađanje lijeka u želucu, a oblici bi bili lakši za gutanje i time primjereniji za djecu, starije bolesnike i osobe s disfagijom (Gohel i sur., 2009).

Primjena gelan gume u pripravi terapijskih sustava za okularnu primjenu rezultira povećanjem bioraspoloživosti lijeka uslijed *in situ* geliranja i duljeg zadržavanja na površini oka. Naime, konvencionalni tekući oblici brzo se eliminiraju fiziološkim procesima kao što je treptanje i lakrimacija. Gelan guma ne pokazuje toksičnost, može se postići izotoničnost i dobro je podnošljiva za oko (Rozier i sur., 1989; Osmałek i sur., 2014).

Kod nazalne primjene gelan guma je zanimljiva za oblikovanje gelova i *in situ* gelirajućih sustava kao mukoadezivnih oblika. Takvi oblici pokazuju bolja svojstva od konvencionalnih tekućih formulacija kod kojih nailazimo na probleme kao što su slabo zadržavanje na mjestu primjene i curenje u grlo, što rezultira smanjenjem učinkovitosti i/ili bioraspoloživosti lijeka (Mahdi i sur., 2015; Ghori i sur., 2015).

Tablica 1. Primjeri terapijskih sustava temeljenih na gelan gumi

Terapijski sustav	Djelatna tvar	Put primjene	Cilj istraživanja	Komentar	Literatura
Nanočestice (kitozana i gelan gume)	Ketokonazol	Oralna primjena	Razvoj učinkovitog nosača za dulje antifungalno djelovanje ketokonazola	Bolji učinak nanočestica s ketokonazolom u odnosu na prazne nanočestice ili sami lijek	Kumar i sur., 2016
Gel	Diklofenak	Topikalna primjena	Usporedba komercijalno dostupnog gela s diklofenakom i gela s 1 % (<i>m/m</i>) 50:50 HA/LA gelan gume	Povećano prodiranje diklofenaka u kožu iz gela pripremljenog s gelan gumom; Utvrđena mogućnost jednostavnog prilagođavanja svojstava gela variranjem koncentracije gelan gume i iona	Mahdi i sur., 2016
Mikročestice	Metotreksat	Oralna primjena	Razvoj mikročestica s uklopljenim metotreksatom s ciljem nadilaženja ograničenja primjene metotreksata i postizanja ciljanog oslobađanja lijeka te veće raspoloživosti na mjestu djelovanja bez povećanja doze	Utvrđena potencijalna <i>in vivo</i> primjenjivost mikročestica pripremljenih iz gelan gume s uklopljenim metotreksatom	Dhanka i sur., 2018
Granule (gelan gume i sluzi sjemenki komorača)	Metformin hidroklorid	Oralna primjena	Razvoj mukoadhezivnih granula s produljenim oslobađanjem, s metformin hidrokolidom kao modelnim lijekom	Produljeno oslobađanje lijeka <i>in vitro</i> (tijekom 10 h); Utvrđena mukoadhezivnost i produljeni učinak <i>in vivo</i> (u štakora)	Nayak i Pal, 2014

Otopina gelan gume (1 %)	Paracetamol	Oralna primjena	Razmatranje potencijala postizanja odgođenog djelovanja paracetamola primjenom formulacija gelan gume i natrijevog alginata <i>in situ</i> geliranjem	Nastajanje gela u želucu zeca i štakora koji osigurava produljeno oslobađanje paracetamola (kroz 6 sati)	Kubo i sur., 2003
Gelovi i filmovi	Diklofenak natrij	Transdermalna primjena	Razvoj novih transdermalnih oblika koristeći gelan gumu kao gelirajući agens, uz pospješivače apsorpcije	Poboljšan transdermalni prijenos diklofenaka tijekom 24 h u odnosu na komercijalno dostupne oblike	Carmona-Moran i sur., 2016
Tablete	Metoklopramid	Oralna primjena	Testiranje upotrebe gelan gume kao sredstva za raspadanje u tabletama s trenutnim oslobađanjem	Utvrđen potencijal primjene gelan gume kao sredstva za raspadanje u tabletama	Shyani i sur., 2009
Polisfere (gelan gume i karagena)	Simvastatin	Oralna primjena	Istraživanje mogućnosti sniženja serumskih lipida polisferama pripremljenim od gelan gume i karagena s uklopljenim simvastatinom (polisfere su pripremljene geliranjem u prisutnosti iona i kovalentnim umrežavanjem)	Sporije oslobađanje lijeka iz polisfera pripremljenih kovalentnim umrežavanjem u odnosu na polisfere pripremljene geliranjem u prisutnosti iona; Učinkovito snižavanje razine kolesterola i triglicerida u štakora s oba tipa polisfera	Kulkarni i sur., 2013
Nazalni umetci (kitozana i gelan gume)	Ondansetron hidroklorid	Nazalna primjena	Razvoj liofiliziranog nazalnog umetka s ondansetron hidrokloridom pripremljen iz polielektrolitnog kompleksa kitozana i gelan gume	Poboljšana bioraspoloživost ondansetrona nakon nazalne primjene u odnosu na oralnu primjenu; Utvrđena mukoadhezivnost razvijenih	Sonje i Mahajan, 2016

				umetaka te prikladnost za nazalnu primjenu	
<i>In situ</i> gelirajući sustav (poloksamera i gelan gume)	Ketorolak trometamin	Nazalna primjena	Priprema <i>in situ</i> gelirajućeg sustava čije je geliranje temeljeno na prisustvu iona i promjeni temperature	Utvrđena dobra svojstva geliranja, dulje zadržavanje lijeka na sluznici te dobar analgetski učinak	Li i sur., 2015
<i>In situ</i> gelirajući sustav	Mometazon furoat	Nazalna primjena	Priprema <i>in situ</i> gelirajućeg sustava i provjera učinkovitosti pri liječenju alergijskog rinitisa	Veća učinkovitost <i>in situ</i> gelirajućeg sustava u odnosu na suspenziju, bez iritacije nazalne sluznice	Cao i sur., 2009
Mikročestice (gelan gume obložene škrobom i pektinom)	Inzulin	Oralna primjena	Razvoj mikročestica za oralnu primjenu inzulina	Poboljšan hipoglikemijski učinak inzulina uklopljenog u mikročestice; Zaštita inzulina od razgradnje tijekom inkubacije s enzimima	Meneguín i sur., 2018
<i>In situ</i> gelirajući sustav (karbopola 934P i gelan gume)	Dimenhidrinat	Nazalna primjena	Razvoj mukoadhezivnog <i>in situ</i> gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu antiemetika	Utvrđena stabilnost, učinkovitost, neiritabilnost i praktičnost primjene razvijenog sustava	Belgamwar i sur., 2009
<i>In situ</i> gelirajući sustav (gelan gume i HPMC)	Salbutamol sulfat	Nazalna primjena	Razvoj mukoadhezivnog <i>in situ</i> gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu salbutamol sulfata	Utvrđena bolja terapijska učinkovitost, odgovarajući pH i svojstva gela te neiritabilnost	Salunke i Patil, 2016

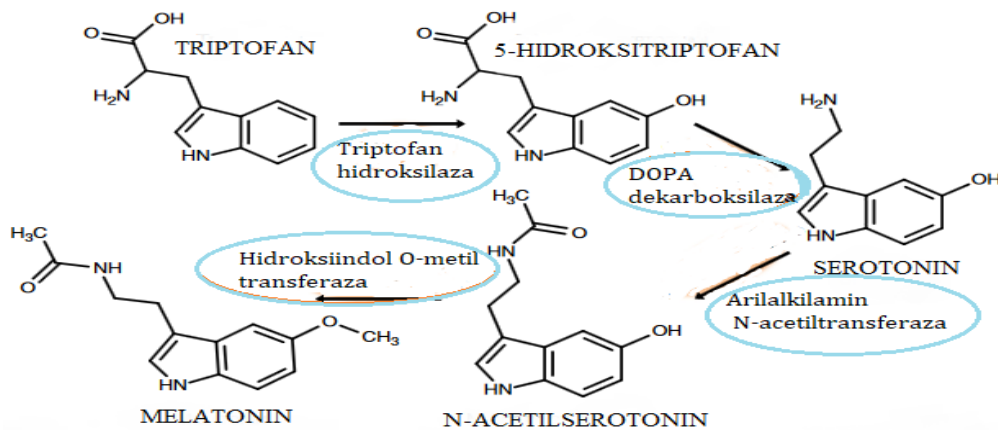
Hidrogel (gelan guma) s uklopljenim nanočesticama (lijek)	Natrijev aledronat	Lokalna primjena (u kost)	Razvoj hidrogela s uklopljenim nanočesticama natrijevog aledronata s ciljem postizanja produljenog oslobađanja lijeka	Utvrđena lokalna dostava lijeka s produljenim jednoličnim oslobađanjem; Postignuta inhibicija osteoklasta bez utjecaja na osteoblaste	Posadowska i sur., 2015
<i>In situ</i> gelirajući sustav	Skopolamin	Nazalna primjena	Razvoj novog terapijskog sustava i provjera učinkovitosti sprječavanja simptoma bolesti kretanja	Utvrđena sigurnost i neiritabilnost <i>in situ</i> gelova; Postignuto značajnije smanjenje simptoma u usporedbi sa subkutanom i oralnom primjenom skopolamina	Cao i sur., 2007
Mikrosfere	Sildenafil citrat	Nazalna primjena	Razvoj nazalnog terapijskog sustava s ciljem zaobilaska prvog prolaska kroz jetru	Utvrđena dobra mukoadhezivna svojstva, nije pokazana toksičnost	Shah i sur., 2010
<i>In situ</i> gelirajući sustav	Indometacin	Oftalmička primjena	Razvoj <i>in situ</i> gelirajućeg sustava za oftalmičku primjenu indometacina s ciljem povećanja okularne bioraspoloživosti	Pokazana terapijska učinkovitost <i>ex vivo</i> ; Postignuto produljeno oslobađanje (tijekom 8 h)	Balasubramani am i sur., 2003
<i>In situ</i> gelirajuća nanoemulzija	Terbinafin hidroklorid	Oftalmička primjena	Razvoj nanoemulzija s kontroliranim oslobađanjem lijeka za liječenje gljivičnog keratitisa	Utvrđen nastanak prozirnih, pseudoplastičnih i mukoadhezivnih <i>in situ</i> gelova sa sporijim oslobađanjem lijeka; Neiritabilnost pokazana <i>in vivo</i>	Tayel i sur., 2013

Kratice: HA - engl. *high acil*, LA - engl. *low acil* (gelan guma); HPMC - hidropsipilmetilceluloza

1.3. Melatonin

Melatonin ili N-acetil-5-metoksitriptamin je hormon koji nastaje iz triptofana i kod sisavaca ga najviše izlučuje epifiza, a luči se u manjoj mjeri i u drugim dijelovima organizma, kao što su retina, probavni sustav, stanice koštane srži, trombociti, limfociti te koža. U normalnim uvjetima sinteza i lučenje iz epifize odvijaju se uglavnom navečer, odnosno u tamnoj fazi ciklusa svjetla i tame. Hormon se ne skladišti u bitnoj količini nakon sinteze nego se brzo oslobađa u krv. Početak lučenja melatonina događa se između 21:00 i 22:00 h, najveća koncentracija u krvi postiže se između 02:00 i 04:00 h, a smanjenje se javlja između 07:00 i 09:00 h. To večernje povećanje i jutarnje smanjenje koncentracije melatonina označava „biološku noć“, odnosno služi za reguliranje cirkadijanog ritma što mu je najpoznatija biološka uloga (Arendt, 2014; Oliveira i sur., 2018).

Melatonin je po kemijskom sastavu indolamin, njegova biosinteza događa se u 4 koraka i prikazana je na Slici 5. Najprije dolazi do hidrosilacije L-triptofana u 5-hidroksitriptofan koji se dekarboksilira u serotonin. Serotonin se acetilira do N-acetilserotonina koji se O-metilira u melatonin.



Slika 5. Biosinteza melatonina (Preuzeto i prilagođeno prema Oliveira i sur., 2018).

Fiziološke funkcije i upotreba melatonina

Najvažnija fiziološka funkcija melatonina je regulacija cirkadijanog ritma i sna. Melatonin je somnogen - tvar koja potiče spavanje. Primarno djeluje vezanjem na melatoninske receptore MT1, MT2 i MT3 (koji ima manji afinitet za vezanje melatonina). Receptori MT1 i

MT2 su povezani s G-proteinima, točnije s G inhibitornim proteinima pa vezanje melatonina na njih uzrokuje inhibiciju adenilat ciklaze te time nastanak cAMP-a što dovodi do mijenjanja staničnog signaliziranja i do pojave pospanosti. MT3 receptori su bitni za zaštitu od staničnog stresa te sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa (Pavić i Zorc, 2013).

Melatonin pokazuje imunomodulatornu i jaku antioksidativnu aktivnost, te je jači antioksidans od vitamina C i E i pomaže u sniženju kolesterola u krvi. Ovakva antioksidativna svojstva mogla bi pomoći u liječenju različitih bolesti, od primjerice želučanih čireva i ulceroznog kolitisa pa sve do neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Egzogen primjena uzrokuje i vazodilataciju te smanjuje krvni tlak kod pacijenata s hipertenzijom uslijed vezanja na MT2 receptore, ali vezanje melatonina na MT1 receptore uzrokuje vazokonstrikciju pa je to međudjelovanje dosta složeno.

Primijećen je i utjecaj melatonina na reproduktivni sustav u životinja i ljudi. Kod pacijenata s mentalnim poremećajima kao što su depresija i bipolarni poremećaj, zabilježene su niže koncentracije melatonina.

Preko MT1 i MT2 receptora melatonin ima antiproliferativni učinak na različite vrste karcinoma, a potpuni mehanizam djelovanja još nije utvrđen (Chowdhury i sur., 2008; Pandi-Perumal i sur., 2006). Melatonin također utječe i na sintezu, proizvodnju i djelovanje steroidnih i nesteroidnih hormona, a primijećeno je kako pozitivno utječe na lučenje prolaktina, a negativno na lučenje hormona rasta. Uključen je i u metabolizam kalcija i fosfora preko paratiroidnih žlijezda.

U Hrvatskoj je registriran lijek Circadin koji sadrži melatonin, a indiciran je za primarnu insomniju u ljudi starijih od 55 godina (Halmed, 2018). Primjena melatonina pokazala se uspješnom kod prevencije ili liječenja *jet lag-a*, sindroma koji se javlja zbog poremećaja cirkadijanog ritma uslijed promjena vremenskih zona (Herxheimer i Petrie, 2002) te kod reguliranja cirkadijanog ritma u slijepih osoba i kod rada u noćnim smjenama (Pavić i Zorc, 2013).

Farmakokinetika i toksičnost

Oralno primijenjen melatonin potpuno se apsorbira u odraslih osoba, ali u starijih je moguće smanjenje apsorpcije za 50 %. Podliježe prvom prolazu kroz jetru gdje se

metabolizira 85 % doze lijeka pa mu je bioraspoloživost svega 15 % nakon oralne primjene. Kinetika apsorpcije mu je linearna u rasponu doze od 2 do 8 mg (terapijska doza iznosi 2 mg dnevno). Prisutnost hrane odgađa apsorpciju melatonina.

U metabolizam melatonina uključeni su CYP1A1, CYP1A2 te moguće CYP2C19, a glavni metabolit je neaktivni 6-sulfatoksi-melatonin koji se izluči iz organizma tijekom 12 h nakon oralne primjene. Taj metabolit konjugira se sa sulfatom ili glukuronidom te se izlučuje urinom. Maksimalna koncentracija lijeka je 3 do 4 puta veća u žena, no nikakve razlike u farmakodinamici tj. djelovanju lijeka nisu primijećene (Halmed, 2018; Vijayalaxmi i sur., 2002).

Melatonin primijenjen oralno uglavnom se jako dobro podnosi. Najčešće nuspojave kao što su pospanost tijekom dana, glavobolja i vrtoglavice, gotovo su se jednako javljale u osoba koje su uzimale melatonin kao i u onih na placebo. Ostale moguće nuspojave su razdražljivost, mučnina, povraćanje, blagi tremor i slično.

Melatonin se smatra sigurnim za primjenu do 2 mjeseca u odraslih, a u nekim slučajevima čak i do 9 mjeseci. U kraćim studijama nije pokazan toksičan učinak u djece, ali je upotreba ipak upitna zbog utjecaja melatonina na razvoj. Za trudnice i dojilje se ne preporuča, a u većim dozama može odgoditi ovulaciju (www.drugbank.ca).

1.3.1. Nazalna primjena melatonina

Iako se melatonin inače primjenjuje oralno, slaba i promjenjiva bioraspoloživost uslijed ekstenzivnog metabolizma prvim prolaskom kroz jetru potaknula je istraživanja o alternativnim putovima primjene (Zetner i sur., 2015).

Bioraspoloživost nazalno primijenjenog melatonina istraživana je *in vivo* (u zečeva). Korištena je otopina melatonina u 40 %-tnom polietilenglikolu, s dodatkom natrijevog glikolata ili bez njega. U oba slučaja postignuta je klinički značajna bioraspoloživost. Utvrđen je pozitivni utjecaj dodatka natrijevog glikolata na apsorpciju i bioraspoloživost melatonina. Brzina apsorpcije bila je velika te je vršna koncentracija postignuta za 5 minuta (Bechgaard i sur., 1999).

Istraživane su i mikrosfere škroba s melatoninom kao modelnim lijekom za nazalnu primjenu gdje je *in vivo* (u zečeva) utvrđena brza apsorpcija i velika bioraspoloživost (84 % u

usporedbi s 15 %-tnom bioraspoloživošću nakon oralne primjene) s kontroliranim oslobađanjem lijeka i duljim zadržavanjem na sluznici nosa (Mao i sur., 2004).

Istraživano je poboljšanje topljivosti i nazalne apsorpcije melatonina korištenjem inkluzijskih kompleksa melatonina i ciklodekstrina (hidroksipropil- β -ciklodekstrin i nasumično metilirani β -ciklodekstrin). Zabilježeno je linearno povećanje topljivosti s povećanjem koncentracije ciklodekstrina, a kod obe vrste ciklodekstrina primijećeno je poboljšanje nazalne apsorpcije melatonina (Babu i sur., 2008).

Ispitivan je i potencijal nanočestica lecitina i kitozana kao transmukoznih nanonosaa melatonina. Postignuto je kontrolirano oslobađanje melatonina koje je poželjno kod liječenja poremećaja cirkadijanog ritma. Suspenzija nanočestica koja je sadržavala S45 lecitin i omjer lecitina i kitozana 20:1 (*m/m*) nije uzrokovala toksičan učinak na stanice, a postignuto je povećanje permeabilnosti melatonina u usporedbi s otopinom. Točan mehanizam ovakvog poboljšanja transmukoznog prijelaza melatonina treba utvrditi dodatnim istraživanjima (Hafner i sur., 2009).

Povezanost nosne šupljine sa SŽS-om preko olfaktornog neuroepitela zanimljiva je za izravnu dostavu nazalno primijenjenih lijekova u mozak. Istraživane su suspenzije melatonina s Carbopolom, karboksimetilcelulozom i polietilenglikolom 400 (PEG 400). Permeabilnost *in vitro* (EpiAirway™) bila je povećana za uzorke melatonina s Carbopolom i karboksimetilcelulozom u usporedbi s kontrolom (melatonin i PEG 400). Zabilježena je i veća koncentracija melatonina u mozgu (u štakora) za sve uzorke u usporedbi s intravenskom primjenom što pokazuje potencijal izravne dostave nazalno primijenjenog lijeka u mozak (Babu i sur., 2011).

Razvijena je i formulacija melatonina s poloksamerom (Pluronic PF-127) sa ili bez PEG 400 i PEG 15000 u obliku termoreverzibilnog gela za nazalnu primjenu za liječenje poremećaja spavanja. Gelovi koji su sadržavali PEG 400 pokazali su dobru bioadhezivnost na nazalnoj sluznici ovce. U ispitivanjima provedenim u ljudi, gelovi za nazalnu primjenu osigurali su brz početak djelovanja te usnivanje kroz 15 minuta, pokazujući značajan terapijski potencijal (Pisal i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nazalna primjena lijekova prvi je izbor u liječenju oboljenja sluznice nosa, no predstavlja i zamjenu za klasične putove primjene (primjerice oralnu i intravensku primjenu) lijekova s ciljem postizanja njihove sistemske raspoloživosti. Nosna sluznica ima specifična svojstva koja omogućuju dobru apsorpciju lipofilnih lijekova molekulske mase do 1000 Da i brz početak djelovanja. Nazalna primjena zanimljiva je i zbog mogućnosti direktne dostave lijeka u središnji živčani sustav zaobilazanjem krvno-moždane barijere (Jadhav i sur., 2007, Ghori i sur., 2015, Ugwoke i sur., 2001). Problemi kod nazalne primjene jesu brzo uklanjanje lijeka s mjesta primjene mukocilijarnim klirensom, ograničen volumen/količina farmaceutskog oblika koji se mogu primijeniti po nosnici te slaba apsorpcija velikih i polarnih molekula. Apsorpcija takvih molekula može se poboljšati uključivanjem pospješivača apsorpcije te bioadhezivnih tvari u terapijske sustave za nazalnu primjenu (Ilium, 2003; Karavasili i Fatouros, 2016).

In situ gelirajući sustavi omogućuju jednostavnu (trans)mukoznu primjenu lijekova uz postizanje njihove veće učinkovitosti/bioraspoloživosti. Mogu biti formulirani u obliku otopine ili suspenzije koje geliraju na mjestu primjene uslijed promjene pH, temperature ili prisutnosti iona. Niska viskoznost *in situ* gelirajućih otopina i suspenzija osiguravaju mogućnost jednostavne primjene raspršivanjem, a viskoelastična svojstva gela osiguravaju dulje zadržavanje na mjestu primjene te posljedično bolji učinak i/ili opsežniju apsorpciju lijeka (Karavasili i Fatouros, 2016; Mura i sur., 2018).

Gelan guma je relativno novi polimer koji je zbog svojih povoljnih svojstava primjenu našao u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji. Gelan guma je biokompatibilna, biorazgradljiva, netoksična te stabilna pri povišenoj temperaturi i niskom pH. Gelan guma je egzopolisaharid kojeg izlučuje bakterija *Sphingomonas elodea* u procesu fermentacije, a izgrađena je od tetrasaharidne ponavljajuće jedinice α -L-ramnoze, dvije β -D-glukoze i β -D-glukuronata. Po sadržaju acilnih skupina razlikuju se LA (engl. *low acil*) i HA (engl. *high acil*) gelan guma. Zanimljiva je zbog izraženog svojstva geliranja, a mehanizam uključuje stvaranje dvostrukih uzvojnica te agregaciju istih u trodimenzionalnu mrežu uslijed kompleksiranja s kationima i stvaranja vodikovih veza. Gelan guma je jedan od polimera koji se koriste u pripravi *in situ* gelirajućih terapijskih sustava za (trans)mukoznu primjenu (Sultana i sur., 2006; Prajapati i sur., 2013; Salunke i Patil, 2016; Zia i sur., 2018). Pri nazalnoj primjeni, *in situ* geliranje takvih sustava potaknuto je prisustvom kationa na mjestu

primjene. Viskoelastična svojstva gela definiraju vrijeme zadržavanja formulacije na mjestu primjene, ali i profil oslobađanja uklopljenog lijeka (Balasubramaniam i sur., 2003).

Melatonin (N-acetyl-5-metoksitriptamin) je hormon epifize koji prati izmjenu ciklusa svjetlo/tama te se sintetizira i izlučuje većinom tijekom noći. Najpoznatija uloga melatonina je reguliranje cirkadijanog ritma i sna te sinkroniziranje tjelesnog ritma s okolišem. Koristi se u liječenju nesаницe, u prevenciji i smanjivanju simptoma *jet laga* te za reguliranje cirkadijanog ritma u slijepih osoba i kod rada u noćnim smjenama. Melatonin se nakon oralne primjene dobro apsorbira, ali podliježe ekstenzivnom metabolizmu tijekom prvog prolaza kroz jetru te mu je bioraspoloživost tek oko 15 %. Nazalnom primjenom melatonina zaobilazi se prvi prolaz kroz jetru te povećava bioraspoloživost, zbog čega se takav način primjene ispituje kao alternativa oralnoj primjeni melatonina (Chowdhury i sur., 2008; Reiter i sur., 2010; Pavić i Zorc, 2013; Bechgaard i sur., 1999).

Cilj ovog rada je ispitati primjenjivost gelan gume u pripravi *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu. Vrednovat će se utjecaj koncentracije gelan gume i/ili prisustva manitola (kao sredstva za izotonizaciju) na reološka svojstva, osmolalnost i profil oslobađanja uklopljenog modelnog lijeka.

Specifični ciljevi:

- Priprema *in situ* gelirajućih sustava temeljenih na gelan gumi, s melatoninom kao modelnim lijekom
- Ispitivanje utjecaja koncentracije gelan gume, prisutnosti lijeka i/ili manitola na:
 - reološka svojstva *in situ* gelirajućeg sustava (viskoznost) i *in situ* gela nastalog nakon miješanja sa simuliranim nosnim fluidom (SNF) (viskoelastičnost) u volumnom omjeru 1:1
 - osmolalnost *in situ* gelirajućeg sustava i *in situ* gela nastalog nakon miješanja sa SNF-om u volumnom omjeru 1:1
- Ispitivanje utjecaja koncentracije gelan gume na profil oslobađanja uklopljenog modelnog lijeka iz *in situ* gela

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U izradi ovog diplomskog rada korištena je gelan guma (Sigma-Aldrich, Phytigel Chemie GmbH, Njemačka). Kao sredstvo za izotonizaciju korišten je D(-)manitol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka), a kao modelni lijek korišten je melatonin (Sigma-Aldrich, Narodna Republika Kina).

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 (CaCl₂, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) u 1000 ml pročišćene vode (Jurišić Dukovski i sur., 2017).

3.2. Metode

3.2.1. Priprema *in situ* gelirajućih sustava temeljenih na gelan gumi

Vodene otopine gelan gume u koncentraciji od 0,2 % (*m/m*), 0,4 % (*m/m*) i 0,6 % (*m/m*) pripremljene su otapanjem gelan gume u pročišćenoj vodi uz miješanje na magnetskom mješaču pri temperaturi od 85°C tijekom 20 minuta (Salunke i Patil, 2016). *In situ* gelirajući sustavi s melatoninom kao modelnim lijekom pripremljeni su otapanjem melatonina u pripremljenim otopinama gelan gume, pri koncentraciji melatonina od 0,05 % (*m/m*). Izotonizacija je provedena dodavanjem manitola u koncentraciji od 4 % (*m/m*). Ostali uzorci pripremljeni su istim postupkom, ali su izostavljeni melatonin i/ili manitol. Prikaz pripremljenih sustava dan je u Tablici 2.

Tablica 2. Sastav pripremljenih *in situ* gelirajućih sustava temeljenih na gelan gumi

Uzorak	Gellan guma (%)	Manitol	Melatonin
Mel_GM1	0,6	+	+
Mel_GM2	0,4	+	+
Mel_GM3	0,2	+	+
Mel_G1	0,6	–	+
Mel_G2	0,4	–	+
Mel_G3	0,2	–	+
GM1	0,6	+	–
GM2	0,4	+	–
GM3	0,2	+	–
G1	0,6	–	–
G2	0,4	–	–
G3	0,2	–	–

3.2.2. Ispitivanje reoloških svojstava

Reološka mjerenja provedena su na Anton Paar MCR 102 reometru (Anton Paar GmbH, Austrija) koji je spojen s osobnim računalom, a podaci su obrađeni i analizirani preko RheoCompass™ softvera.

Viskoznost (η) *in situ* gelirajućih sustava u ovisnosti o gradijentu brzine smicanja (engl. *shear rate*, $\dot{\gamma}$) mjerena je rotacijskim testom u području $\dot{\gamma}$ od 0,1 do 100 s⁻¹ pri sobnoj temperaturi. Mjerni stožac CP50-1 (engl. *cone plate*, promjera 50 mm i nagibnog kuta 1°) korišten je kao mjerno tijelo pri fiksnoj udaljenosti od 0,102 mm od donjeg mjernog tijela, odnosno donje ploče (Zečević, 2018). Viskoznost (η , Pa s) računa se kao omjer smičnog naprezanja (τ , Pa) i gradijenta brzine smicanja ($\dot{\gamma}$, s⁻¹) (jednadžba 1) (Acharya i sur., 2018):

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

Oscilacijsko mjerenje utvrđivanja vremena geliranja (engl. *Gelation time test*, t_{gel}) provedeno je kroz 30 minuta pri smičnoj deformaciji od 0,6 %, kutnoj frekvenciji (ω) od 6,28 rad/s i temperaturi od 37°C. Korišteno je mjerno tijelo paralelna ploča PP50 (engl. *parallel plate*, promjera 50 mm). Udaljenost od donjeg mjernog tijela iznosila je 0,500 mm. Uzorci su pripremljeni miješanjem sa SNF-om u volumenom omjeru 1:1 tijekom jedne minute, potom su ostavljeni bez miješanja još jednu minutu i naneseni na donju ploču. Odgovor *in situ* gelirajućeg sustava na sinusoidno varirajuće opterećenje promatran je kao funkcija vremena.

Smična deformacija prethodno je određena testom promjene amplitude (engl. *Amplitude sweep*), a kao mjerno tijelo korištena je paralelna ploča PP50, pri udaljenosti od donjeg mjernog tijela (ploče) od 0,500 mm. Ovim testom definirano je linearno viskoelastično područje (engl. *linear viscoelastic range*) u kojem se viskoelastični moduli ne mijenjaju s promjenom smične deformacije.

Iz smičnog naprezanja i brzine smicanja određeni su modul pohrane (G'), modul gubitka (G''), kompleksni modul smicanja (G^*), fazni kut (δ) i kompleksna viskoznost (η^*) (Zečević, 2018). Međuovisnost ovih parametara dana je jednadžbama (2), (3) i (4) (Carlfors i sur., 1998).

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

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

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

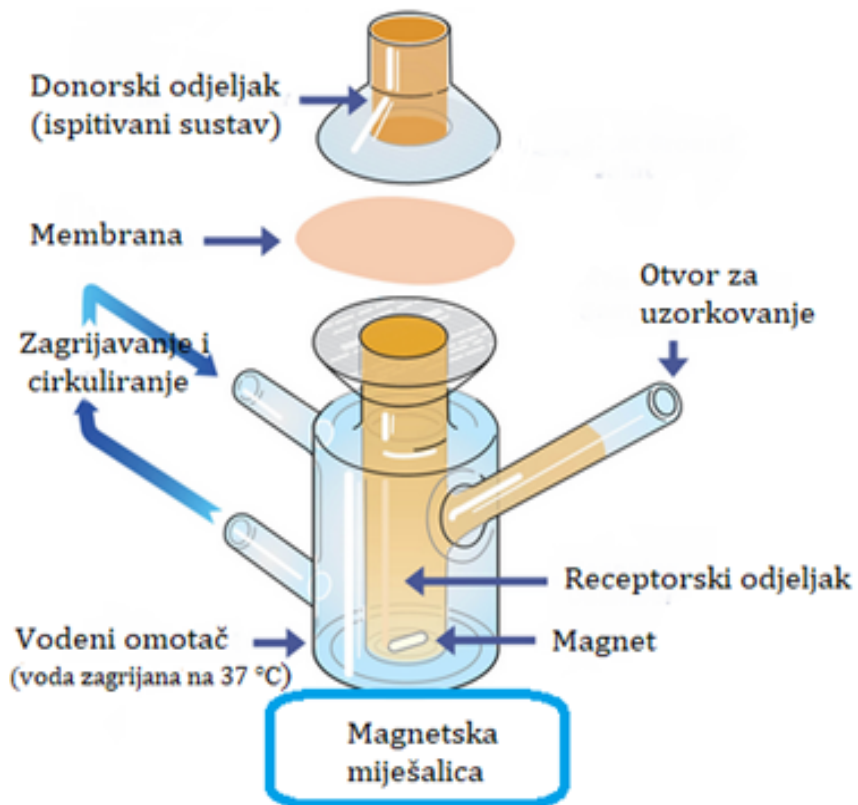
3.2.3. Određivanje osmolalnosti

Mjerenja osmolalnosti provedena su korištenjem krioskopskog osmometra (Advanced® 3D3 Single-Sample Osmometer, Advanced Instruments Inc., SAD) u Plivi Hrvatska d.o.o. Određena je osmolalnost *in situ* gelirajućih sustava te gelova nastalih miješanjem *in situ* gelirajućih sustava s SNF-om u volumnom omjeru 1:1. Volumen uzorka u kojem je mjerena osmolalnost iznosio je 250 µl.

3.2.4. *In vitro* oslobađanje lijeka

In vitro profil oslobađanja melatonina iz *in situ* gelirajućih sustava određen je korištenjem Franzove difuzijske ćelije (Slika 5.) sastavljene od donorskog i receptorskog odjeljka između kojih je postavljena poliamidna membrana veličine pora od 0,45 µm (Sartolon®, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka). Receptorski odjeljak (16 ml) ispunjen je SNF-om termostatiranim pri 37°C. SNF u receptorskom odjeljku konstantno je miješan magnetskom miješalicom *In situ* gelirajući sustav s melatoninom (1 ml) nanesen je na membranu namočenu SNF-om. Uzorci SNF-a volumena 0,5 ml uzimani su tijekom 2 sata u definiranim vremenskim razmacima. Volumen receptorskog odjeljka nadoknađivan je SNF-om nakon uzorkovanja. Prikupljeni uzorci razrijeđeni su dodatkom 2 ml SNF-a te je sadržaj lijeka određivan UV-Vis spektrofotometrom (UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Probe, Varian, SAD) pri 278 nm.

S ciljem utvrđivanja otpora membrane prema difuziji melatonina, na isti je način ispitana difuzija melatonina iz vodene otopine, preko membrane, iz donorskog u receptorski odjeljak. Sva mjerenja rađena su u triplikatu.



Slika 6. Prikaz Franzove difuzijske ćelije (preuzeto i prilagođeno prema <http://permegear.com/franz-cells/>)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ispitivanje reoloških svojstava

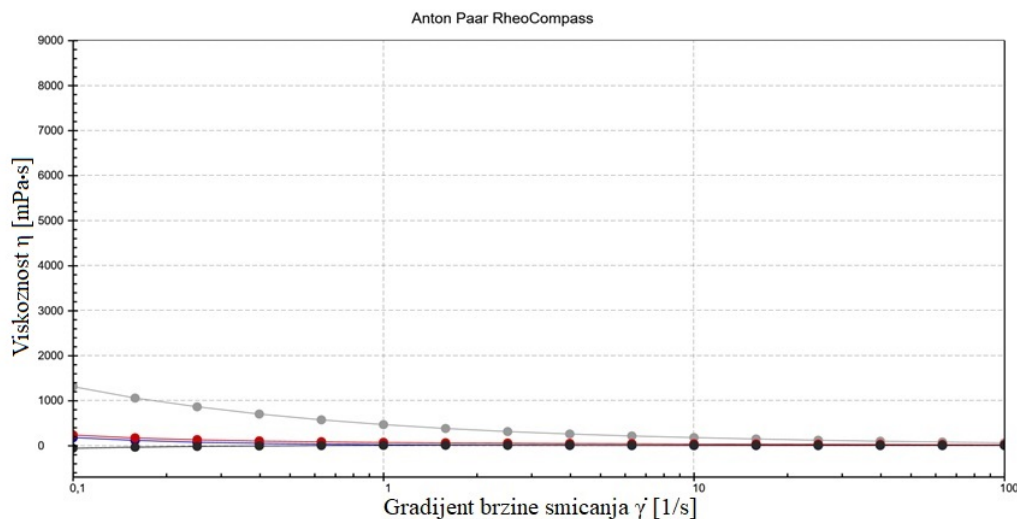
4.1.1. Viskoznost *in situ* gelirajućih sustava temeljenih na gelan gumi

Viskoznost je definirana kao otpornost tekućina tečenju. Kod pripravljanja farmaceutskih formulacija viskoznost je svojstvo koje je bitno zbog osiguravanja odgovarajućeg miješanja i olakšavanja uporabe formulacije (Acharya i sur., 2018). Viskoznost je jedan od ključnih faktora pri razvoju *in situ* gelirajućih sustava koji se primjenjuju raspršivanjem. Naime, potrebno je osigurati dovoljno nisku viskoznost kako bi se formulacija mogla raspršiti, a da nakon primjene dolazi do brzog geliranja potaknutog fiziološkim faktorima (što je u slučaju nazalno primijenjene gelan gume prisutnost kationa u nazalnom fluidu). S druge strane, čvrstoća gela mora biti dovoljno velika kako bi se osiguralo dulje zadržavanje gela na mjestu primjene i produljeno oslobađanje lijeka (Mahdi i sur., 2015). Na Slici 7. prikazana je prividna viskoznost *in situ* gelirajućih sustava i pročišćene vode pri gradijentu brzine smicanja (engl. *shear rate*) od 0,1 do 100 s⁻¹.

Pročišćena voda je Newtonova tekućina pa pokazuje linearan odnos gradijenta brzine smicanja i smičnog naprezanja. Netom nakon pripreve *in situ* gelirajući sustav Mel_GM1, pripravljen pri najvećoj koncentraciji gelan gume (0,6 % *m/m*; Tablica 2.) pokazuje ne-Newtonovo pseudoplastično ponašanje, što znači da mu se viskoznost smanjuje s porastom brzine smicanja. S obzirom na prilično malu viskoznost razrijeđenijih otopina gelan gume ($\leq 0,4$ % *m/m*) već pri malim brzinama smicanja, njihovo pseudoplastično ponašanje je manje izraženo, što je u skladu s literaturnim podacima (Carlfors i sur., 1998). Pseudoplastično ponašanje otopina gelan gume uobičajno je za polimerne otopine i objašnjeno je raspetljavanjem polimernih lanaca u otopini s povećanjem brzine smicanja, što omogućava lakše kretanje polimera u smjeru tečenja (Soong i Sheng, 1980).

Viskoznost *in situ* gelirajućih sustava povećava se proporcionalno koncentraciji gelan gume u nizu Mel_GM3 < Mel_GM2 < Mel_GM1, s tim da su uzorci Mel_GM2 i Mel_GM3 prilično male viskoznosti. Takvi rezultati u skladu su s očekivanjima i pripisuju se većoj interakciji polimernih lanaca u koncentriranoj otopini gelan gume (Salunke i Patil, 2016).

Svi mjereni uzorci imaju svojstva slična pročišćenoj vodi pri brzini smicanja iznad 10 s^{-1} (Slika 7.), odnosno pokazuju pseudoplastična svojstva. Smatra se da brzina smicanja u sprejevima za nos iznosi približno 10^5 - 10^6 s^{-1} (Pennigton i sur., 2008) pa u tom rasponu svi pripremljeni *in situ* gelirajući sustavi mogu biti primijenjeni raspršivanjem.



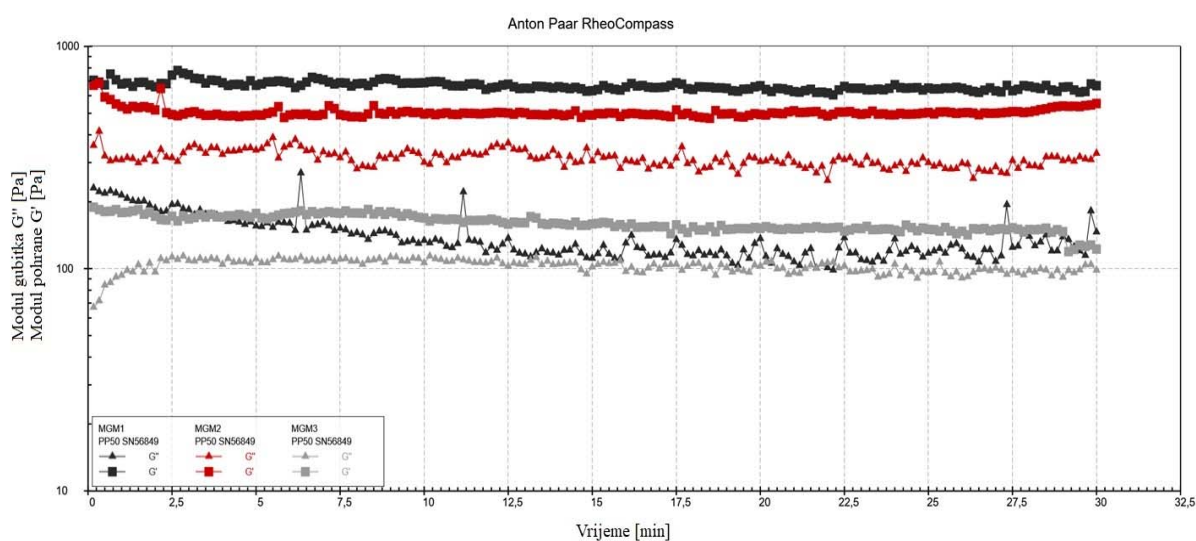
Slika 7. Pravidna viskoznost *in situ* gelirajućih sustava s melatoninom (0,05 %, *m/m*) pripremljenih pri koncentraciji gelan gume od 0,6 %, 0,4 % i 0,2 % (*m/m*) (redom Mel_GM1 ●, Mel_GM2 ●, Mel_GM3 ●). Kontrolni uzorak je pročišćena voda (●). Uzorci su izotonizirani korištenjem manitola (4 %, *m/m*). Mjerenja su rađena pri sobnoj temperaturi.

4.1.2. Reološka svojstva *in situ* gelova temeljenih na gelan gumi

Dodatak SNF-a *in situ* gelirajućim sustavima rezultira promjenom njihovih viskoelastičnih svojstava. Vrijeme geliranja *in situ* gelirajućih sustava nakon dodatka SNF-a ispitano je mjerenjem modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') u ovisnosti o vremenu pri 37°C (Slika 8.). Modul pohrane (G') govori o elastičnoj komponenti gela, odnosno o zadržavanju oblika, dok modul gubitka (G'') govori o viskoznoj komponenti gela, odnosno njegovoj sklonosti tečenju (Suri i Banerjee, 2006). U ovom istraživanju kao kriterij za točku geliranja uzeto je sjecište dviju krivulja ($G' = G''$) pri kutnoj frekvenciji od $6,28 \text{ rad/s}$. Za sve mjerene uzorke vrijedi da je $G' > G''$ za $t \geq 0$, što znači da su gelirali prije početka mjerenja. Takvo vrijeme

geliranja govori o brzom umrežavanju lanaca gelan gume u prisutnosti kationa iz SNF-a. Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim podacima. Primjerice, Oliveira i suradnici (2009) ispitivali su vrijeme geliranja 1 %-tne otopine gelan gume (m/V) u koju je dodana sol CaCl_2 s ciljem postizanja koncentracije od 0,03 % (m/V) u otopini, te su zabilježili vrijednosti vremena geliranja od oko 20 sekundi.

Što je razlika između modula G' i G'' veća, to je izraženija elastična komponenta uzorka, odnosno veća je čvrstoća gela (Munizaga i Cánovas, 2005). Kod mjerenih *in situ* gelirajućih sustava razlika između G' i G'' modula na kraju mjerenja iznosila je 519,68 Pa u slučaju gelan gume u koncentraciji od 0,6 % (m/m), 223,66 Pa za gelan gumu u koncentraciji od 0,4 % (m/m) te 24,33 Pa za gelan gumu u koncentraciji od 0,2 % (m/m) (redom Mel_GM1, Mel_GM2, Mel_GM3; Slika 8.). Iz navedenih mjerenja vidljivo je kako čvrstoća gelova raste s povećanjem koncentracije gelan gume što je potvrđeno mjerenjem faktora gubitka ($\tan\delta$; Slika 9.).

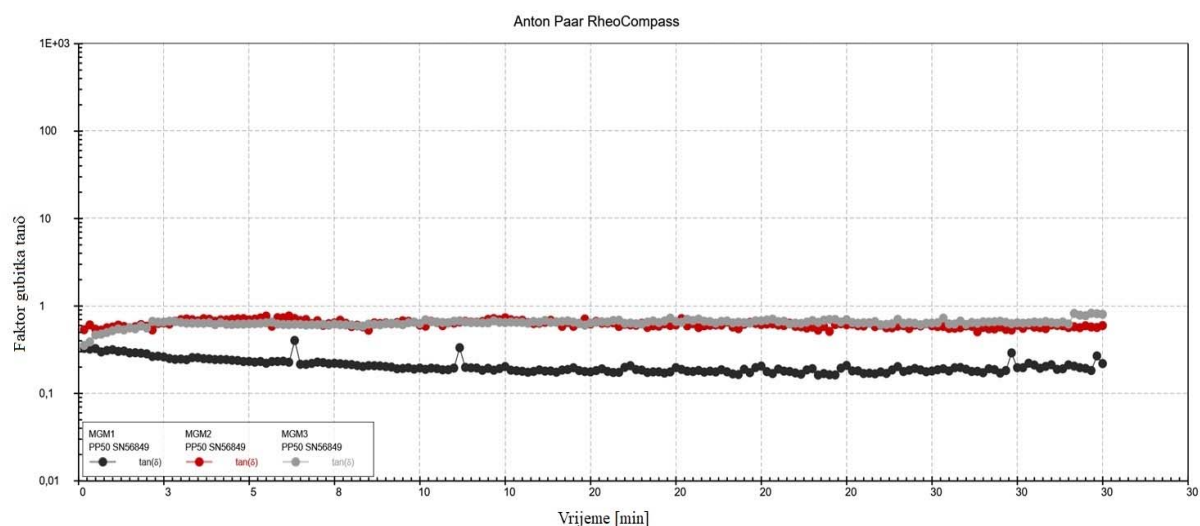


Slika 8. Ovisnost modula pohrane (G' , kvadrat) i modula gubitka (G'' , trokut) *in situ* gelova s melatoninom pripremljenih pri koncentraciji gelan gume od 0,6 % (m/m ; Mel_GM1■), 0,4 % (m/m ; Mel_GM2■) i 0,2 % (m/m ; Mel_GM3■), o vremenu. Uzorci su izotonizirani korištenjem manitola (4 %, m/m). Mjerenja su provedena pri temperaturi od 37°C.

Faktor gubitka ($\tan\delta$) kvantificira relativni doprinos elastičnog i viskoznog modula uzorka, a izračunava se prema jednadžbi 5:

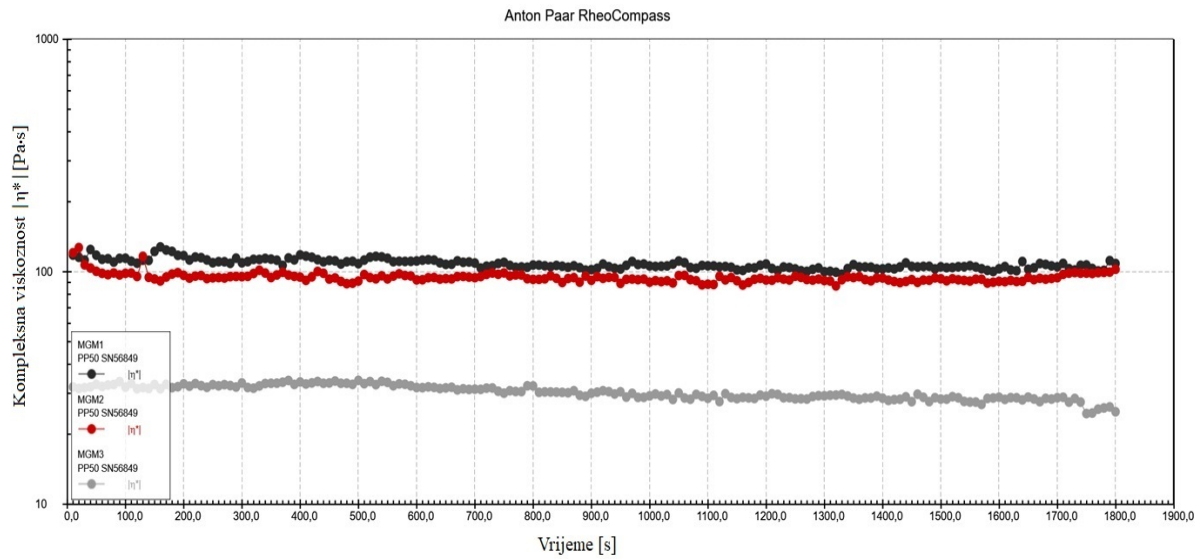
$$\tan\delta = G''/G' \quad (5)$$

Vrijednosti faktora gubitka manje od 1 pokazuju da je uzorak u stanju gela, odnosno da je elastično ponašanje uzorka izraženije od viskoznog (Suri i Banerjee, 2006). Što je gel čvršći, to je vrijednost $\tan\delta$ manja (za čvrste gelove je $\tan\delta < 0,1$) (Saha i Bhattacharya, 2010). Svi mjereni uzorci imaju faktor gubitka manji od 1, što pokazuje da se radi o sustavima u kojima je elastična komponenta veća od viskozne, dakle o gelovima (Slika 9.). Elastičnost, odnosno čvrstoća gelova raste u nizu Mel_GM3 ($\tan\delta = 0,801$) < Mel_GM2 ($\tan\delta = 0,595$) < Mel_GM1 ($\tan\delta = 0,219$), tj. s porastom koncentracije gelan gume (Galgatte i sur., 2014).



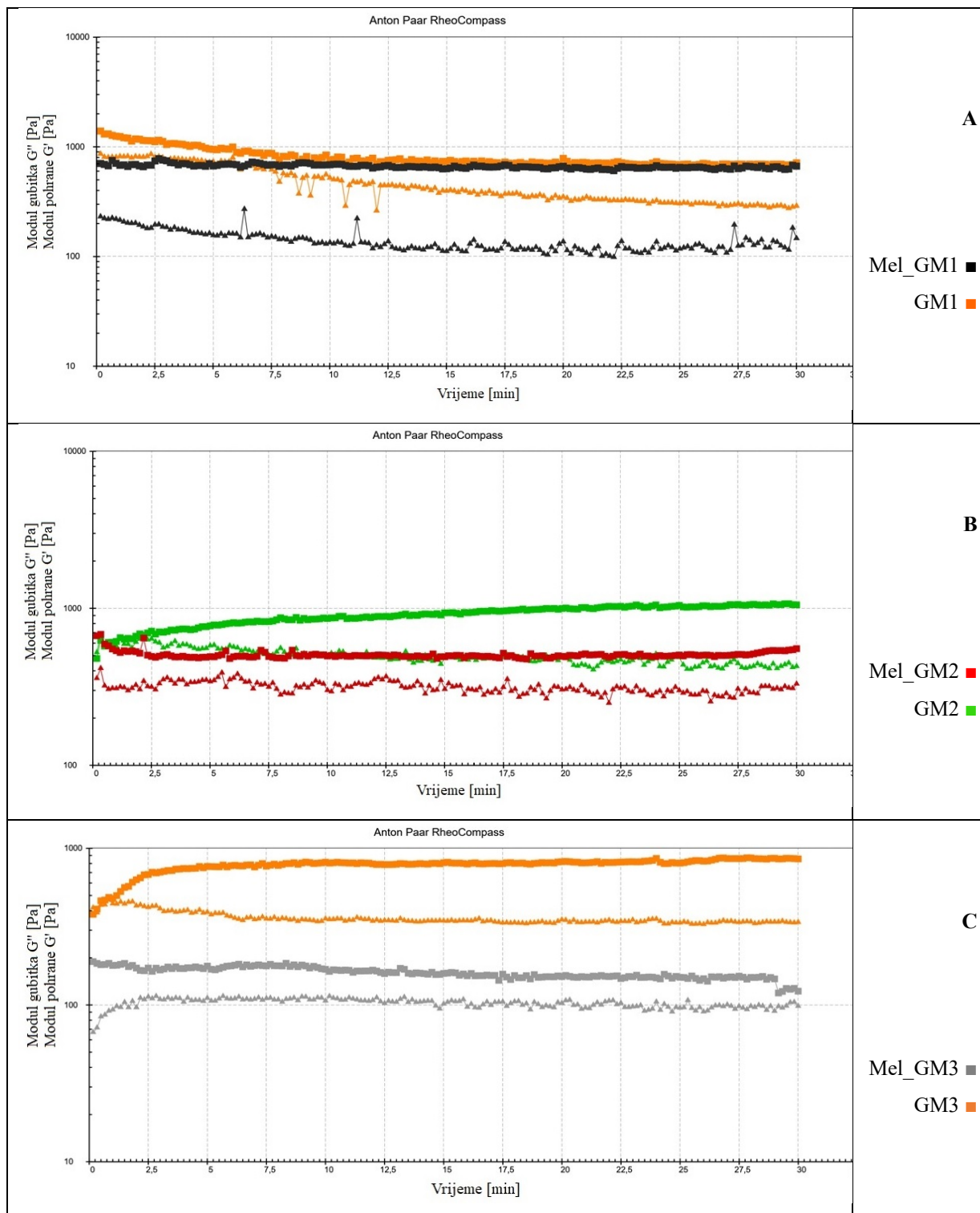
Slika 9. Ovisnost faktora gubitka ($\tan\delta$) *in situ* gelova s melatoninom pripremljenih pri koncentraciji gelan gume od 0,6 % (*m/m*; Mel_GM1 ●), 0,4 % (*m/m*; Mel_GM2 ●) i 0,2 % (*m/m*; Mel_GM3 ●), o vremenu. Uzorci su izotonizirani korištenjem manitola (4 %, *m/m*). Mjerenja su provedena pri temperaturi od 37°C.

Slika 10. prikazuje kompleksnu viskoznost (η^*) *in situ* gelova temeljenih na gelan gumi u ovisnosti o vremenu. Kompleksna se viskoznost ne mijenja značajno u ovisnosti o vremenu, a očekivano je veća za uzorke s većom koncentracijom gelan gume (Lorenzo i sur., 2013).



Slika 10. Ovisnost kompleksne viskoznosti (η^*) *in situ* gelova s melatoninom pripremljenih pri koncentraciji gelan gume od 0,6 % (*m/m*; Mel_GM1 ●), 0,4 % (*m/m*; Mel_GM2 ●) i 0,2 % (*m/m*; Mel_GM3 ●), o vremenu. Uzorci su izotimizirani korištenjem manitola (4 %, *m/m*). Mjerenja su provedena pri temperaturi od 37°C.

U ovom radu kao modelni lijek u svrhu optimiranja formulacije korišten je melatonin. Istražen je njegov utjecaj na vrijeme geliranja, faktor gubitka i kompleksnu viskoznost *in situ* gelirajućih sustava pripremljenih pri različitoj koncentraciji (0,2-0,6 %, *m/m*) gelan gume i korištenjem manitola kao sredstva za izotonizaciju (4 %, *m/m*) (Slike 11.-13.).

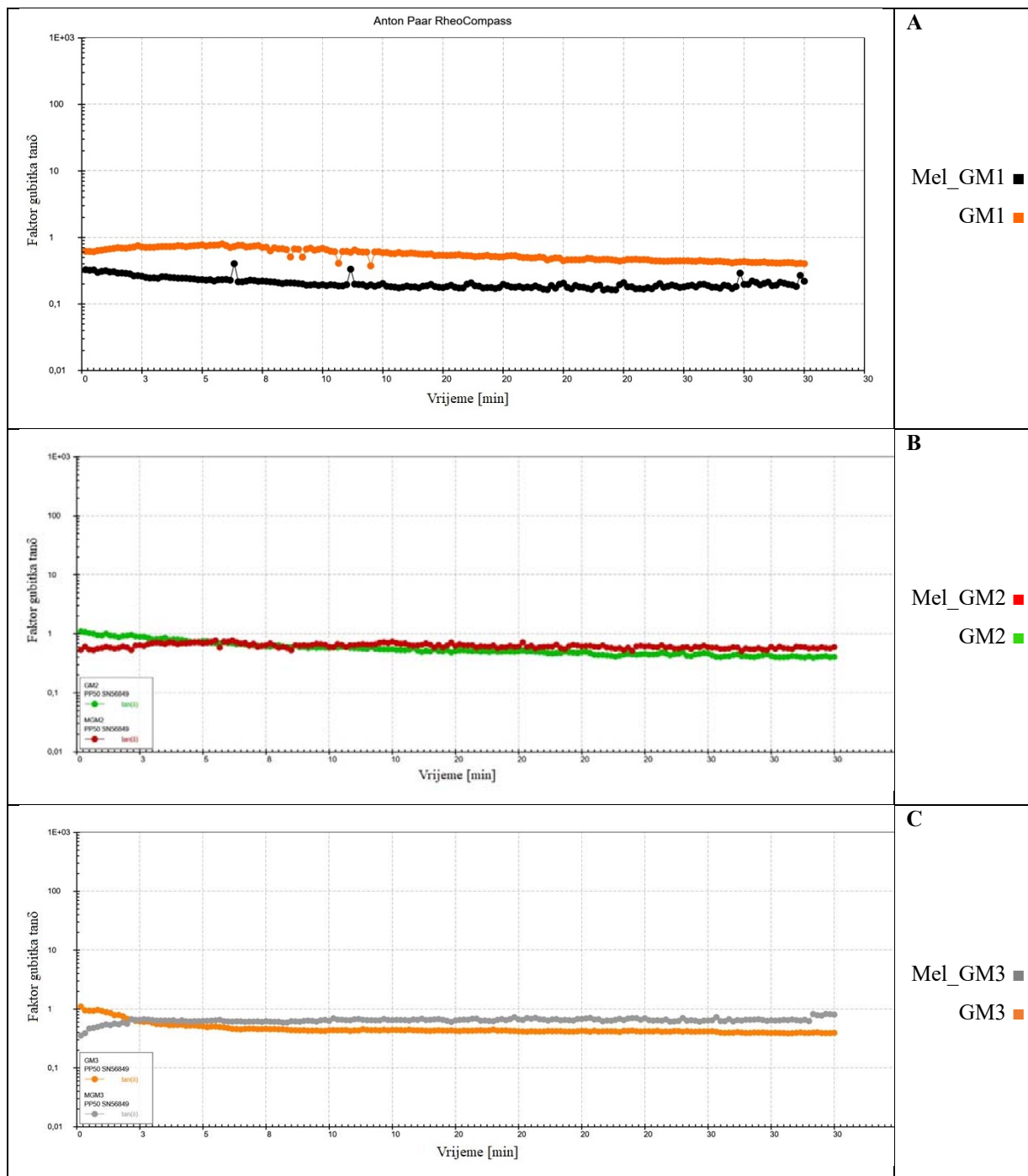


Slika 11. Modul pohrane (G' , kvadrat) i modul gubitka (G'' , trokut) *in situ* gelova pripremljenih pri različitoj koncentraciji gelan gume: 0,6 % (A), 0,4 % (B) i 0,2 % (C) (*m/m*), sa (uzorci Mel_GM1-3) i bez melatonina (GM1-3). Uzorci su izotonizirani korištenjem manitola (4 %, *m/m*). Mjerenja su provedena pri temperaturi od 37°C.

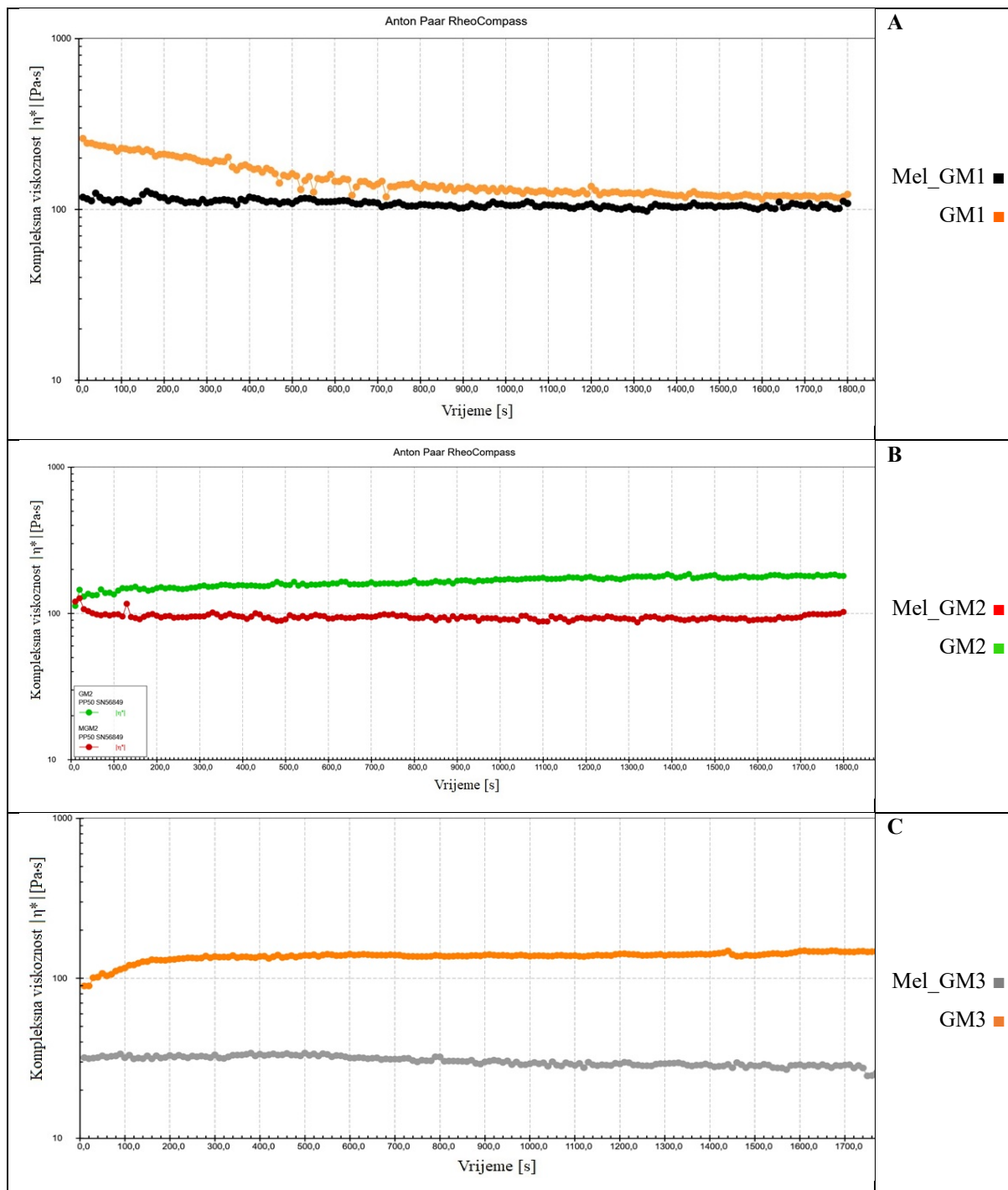
In situ gelirajući sustavi pripremljeni pri koncentraciji gelan gume od 0,6 % (*m/m*) gelirali su prije početka mjerenja, neovisno o sadržaju lijeka ($G' > G''$ za $t \geq 0$ za uzorke Mel_GM1 (sa melatoninom) i GM1 (bez melatonina); Slika 11.a). U slučaju *in situ* gelirajućih sustava pripremljenih pri koncentraciji gelan gume od 0,4 % i 0,2 % (*m/m*) bez melatonina (redom GM2 i GM3), vrijeme geliranja iznosilo je 0,67 min za GM2 (Slika 11.b) te 0,33 min za GM3 (Slika 11.c), dok je kod odgovarajućih uzoraka koji sadrže melatonin (redom Mel_GM2 i Mel_GM3) geliranje nastupilo trenutno. Odgođeno geliranje GM2 i GM3 sustava upućuje na zaključak da bi daljnje snižavanje koncentracije gelan gume ($< 0,2$ %, *m/m*) moglo rezultirati nedostatnim svojstvima geliranja na mjestu primjene, odnosno pri fiziološkoj koncentraciji kationa u nazalnom fluidu (Pérez-Campos i sur., 2012, Miyoshi i Nishinari, 1999). Gelan guma pri koncentraciji manjoj od 0,2 % (*m/m*) ispitivana je kao gelirajuća tvar u razvoju *in situ* gelirajućih sustava za nazalnu primjenu temeljenih na barem još jednoj polimernoj sastavnici, primjerice hidrokispropilmetilcelulozi (Salunke i Patil, 2016).

Slika 12. prikazuje utjecaj uklapanja melatonina kao modelnog lijeka na faktor gubitka ($\tan\delta$) *in situ* gelova pripremljenih pri različitoj koncentraciji gelan gume. Za *in situ* gelove s najvećom koncentracijom gelan gume (0,6 % (*m/m*), sa (Mel_GM1) i bez melatonina (GM1), $\tan\delta$ na kraju mjerenja iznosio je redom 0,219 i 0,402 (Slika 12.a). Može se zaključiti da je uklapanje melatonina u takav sustav rezultiralo većom elastičnošću tj. većom čvrstoćom gela. *In situ* gelovi s manjom koncentracijom gelan gume (0,4 % i 0,2 %, *m/m*) s uklopljenim melatoninom bili su karakterizirani većom vrijednošću $\tan\delta$, odnosno manjom elastičnošću (čvrstoćom), u odnosu na gelove bez melatonina (Mel_GM2 vs GM2 0,592 vs 0,404, Slika 12.b; Mel_GM3 vs GM3 0,801 vs 0,393, Slika 12.c).

Slika 13. prikazuje utjecaj uklapanja melatonina kao modelnog lijeka na kompleksnu viskoznost *in situ* gelova pripremljenih pri različitoj koncentraciji gelan gume. Kod svih mjerenih uzoraka uočeno je smanjenje kompleksne viskoznosti uklapanjem melatonina.



Slika 12. Faktor gubitka ($\tan\delta$) *in situ* gelova pripravljenih pri različitoj koncentraciji gelan gume: 0,6 % (A), 0,4 % (B) i 0,2 % (C) (*m/m*), sa (uzorci Mel_GM1-3) i bez melatonina (GM1-3). Uzorci su izotonizirani korištenjem manitola (4 %, *m/m*). Mjerenja su provedena pri temperaturi od 37°C.



Slika 13. Kompleksna viskoznost *in situ* gelova pripremljenih pri različitoj koncentraciji gelan gume: 0,6 % (A), 0,4 % (B) i 0,2 % (C) (*m/m*), sa (uzorci Mel_GM1-3) i bez melatonina (GM1-3). Uzorci su izotonizirani korištenjem manitola (4 %, *m/m*). Mjerenja su provedena pri temperaturi od 37°C.

Utjecaj melatonina na reološka svojstva *in situ* gelova s gelan gumom može se objasniti amfoternim svojstvima melatonina koji ima sposobnost stvaranja vodikovih veza (preko kiskovog atoma iz karbonilne i metoksi skupine) s hidroksilnim skupinama gelan gume. Vodikove veze između lanaca gelan gume imaju važnu ulogu u formiranju i agregaciji dvostrukih uzvojnica (engl. „*coil to helix transition*“) te u samom prijelazu gelan gume u gel stanje (Matsukawa i sur., 1999). Moguće je da melatonin stvaranjem vodikovih veza s polimernim lancima utječe na međusobno povezivanje samih lanaca i tako utječe na strukturu i svojstva nastalog gela. Povezivanje melatonina vodikovim vezama s polioksietilenskim lancima Pluronic F127 korištenog u pripravi termoreverzibilnog *in situ* gela zabilježili su Pisal i suradnici (2014). Uočili su negativan utjecaj prisutnosti melatonina na sposobnost geliranja razvijenog sustava. Naime, sustavi s uklopljenim melatoninom bili su karakterizirani većom temperaturom geliranja u odnosu na sustave bez uklopljenog lijeka. U ovom radu utjecaj melatonina na reološka svojstva *in situ* gela pokazao se ovisnim o koncentraciji gelan gume.

4.2. Osmolalnost

Osmolalnost pripravaka za nazalnu primjenu utječe na apsorpciju lijeka i sigurnost primjene (Bhise i sur., 2014). Iritacija nazalnog epitela može se, primjerice, predvidjeti mjerenjem naglog povećanja koncentracije ukupnih proteina oslobođenih iz nazalnog epitela, što pokazuje nespecifično oštećenje te mjerenjem dvaju enzima-laktat dehidrogenaze (LDH; citosolni protein) i 5'-nukleotidaze (5'-NT; membranski protein). Povećanje oslobađanja LDH i 5'-NT zabilježeno je kod primjene hipotoničnih otopina, dok kod hipertoničnih i izotoničnih otopina takvo povećanje nije zabilježeno (Pujara i sur., 1995).

Osmolalnost pripravaka za nazalnu primjenu prema Bitter i sur. (2011) trebala bi iznositi 290–500 mOsm/kg. Iako se i hipertonični pripravci smatraju sigurnima, preporuča se samo hitna ili jednokratna upotreba takvih pripravaka jer su pronađene promjene na stanicama epitela u vidu smežuravanja pa kronična terapija može dovesti do štetnog učinka na mjestu primjene. Za kroničnu primjenu preporučuju se izotonični pripravci, a hipotonični bi se trebali potpuno izbjegavati (Dondeti i sur., 1996; Bitter i sur., 2011; Lenoir i sur., 2013).

Kao sredstvo za izotonizaciju u ovom radu korišten je manitol. Ispitana je osmolalnost *in situ* gelirajućih sustava pripremljenih pri različitim koncentracijama gelan gume, sa ili bez melatonina (0,05 %, *m/m*) te sa ili bez manitola (4 %, *m/m*). Mjerenja osmolalnosti rađena su prije i nakon dodatka SNF-a u volumnom omjeru 1:1 (osmolalnost samog SNF-a iznosi 358,5 mOsm/kg).

U Tablici 3. prikazani su rezultati mjerenja. *In situ* gelirajući sustavi s različitim koncentracijama gelan gume su hipotonični s vrijednostima od 8,5 mOsm/kg (0,6 %-tna otopina gelan gume, *m/m*), 6,5 mOsm/kg (0,4 %-tna otopina gelan gume, *m/m*) i 4,5 mOsm/kg (0,2 %-tna otopina gelan gume, *m/m*). Sustavi s dodanim melatoninom ne pokazuju značajno različitu osmolalnost, razlike su tek 1,5-2 mOsm/kg. Prema očekivanjima, sama gelan guma nema značajnu osmotsku aktivnost, a utjecaj melatonina na osmolalnost je zanemariv. Sustavi s manitolom očekivano pokazuju veću osmolalnost (218,5-251,0 mOsm/kg). Mjerena je osmolalnost i *in situ* gelova pripremljenih miješanjem SNF-a i *in situ* gelirajućeg sustava u volumnom omjeru 1:1, kako bi se simulirali uvjeti *in vivo*. Dobiveni rezultati pokazuju prikladnost mjerenih *in situ* gelirajućih sustava s manitolom za nazalnu primjenu te se može pretpostaviti i prikladnost za kroničnu uporabu imajući u vidu ispitivani aspekt osmotske aktivnosti formulacije.

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

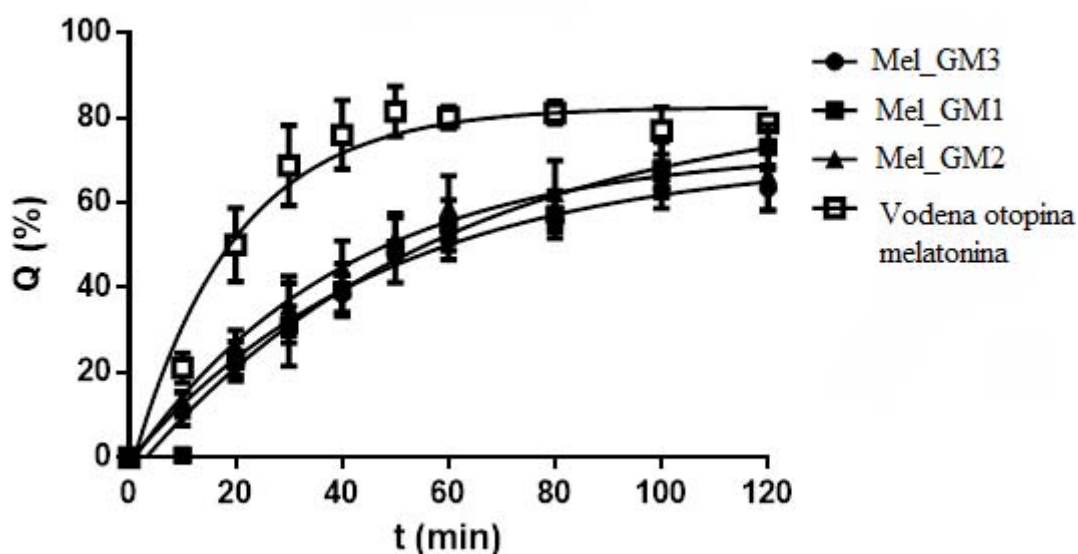
Uzorak	Osmolalnost bez SNF-a (mOsm/kg)	Osmolalnost nakon dodatka SNF-a (mOsm/kg)
Mel_GM1	251	287,5
Mel_GM2	230	308
Mel_GM3	231	304
Mel_G1	10,5	203
Mel_G2	9	190,5
Mel_G3	6	163,5
GM1	218,5	300
GM2	234	307,5
GM3	221	296,5
G1	8,5	210,5
G2	6,5	199,5
G3	4,5	140,5

4.3. *In vitro* oslobađanje lijeka

Na Slici 14. prikazani su profili oslobađanja melatonina *in vitro* iz vodene otopine melatonina te iz *in situ* gelirajućih sustava pripremljenih pri koncentraciji gelan gume od 0,6% (*m/m*; Mel_GM1), 0,4 % (*m/m*; Mel_GM2) i 0,2 % (*m/m*; Mel_GM3).

Nakon svakog mjerenja Franzova difuzijska ćelija je rastavljena i membrana je vizualno ispitana te je utvrđeno geliranje svih mjerenih uzoraka. Razlog geliranja je difundiranje kationa iz receptorskog medija (SNF-a) kroz poliamidnu membranu postavljenu između *in situ* gelirajućeg sustava i receptorskog medija u receptorskom odjeljku (Zečević, 2018).

Vidljivo je kako je oslobađanje lijeka iz *in situ* gelirajućih sustava sporije u usporedbi s difuzijom lijeka u receptorski medij iz otopine, preko poliamidne membrane. Brzina oslobađanja lijeka iz *in situ* gelirajućeg sustava može biti određena brzinom difuzije lijeka iz trodimenzionalnog polimernog matriksa gela. Utjecaj viskoznosti gela na difuziju lijeka može se opisati Stokes–Einsteinovom jednačbom koja govori kako povećanje viskoznosti formulacije uzrokuje sporiju difuziju lijeka kroz matriks gela u receptorski medij (Rupenthal i sur., 2011). Sukladno tome, značajno povećanje viskoznosti *in situ* gelirajućih sustava u kontaktu s kationima iz SNF-a rezultiralo je sporijom difuzijom lijeka kroz polimerni matriks i sporijim oslobađanjem lijeka (Bhardwaj i sur., 2000). Profil *in vitro* oslobađanja lijeka sličan je za sve pripravljene *in situ* gelirajuće sustave, odnosno nije se značajnije mijenjao s promjenom koncentracije gelan gume. Slična zapažanja u literaturi pripisuju se mogućnosti nastajanja veoma poroznih struktura trodimenzionalne polimerne mreže (Dhiman, 2016).



Slika 14. *In vitro* profil oslobađanja melatonina iz *in situ* gelova pripremljenih pri koncentraciji gelan gume od 0,6 % (Mel_GM1; *m/m*), 0,4 % (Mel_GM2; *m/m*) i 0,2 % (Mel_GM3; *m/m*). Usporedbe radi, prikazan je i profil difuzije melatonina iz otopine kroz poliamidnu membranu u receptorski odjeljak. Prikazane su srednje vrijednosti kumulativne količine oslobođenog lijeka u ovisnosti o vremenu \pm SD ($n=3$).

5. ZAKLJUČCI

Pripremljeni su *in situ* gelirajući sustavi temeljeni na gelan gumi (0,6 %, 0,4 % i 0,2 %; *m/m*), s manitolom (4 %, *m/m*) kao sredstvom za izotonizaciju te melatoninom (0,05 %, *m/m*) kao modelnim lijekom.

- Pri brzinama smicanja koje odgovaraju raspršivanju iz nazalnih sprejeva, viskoznost svih mjerenih *in situ* gelirajućih sustava približno je jednaka viskoznosti vode te se isti mogu primijeniti raspršivanjem u nosnu šupljinu.
- Geliranje pripremljenih *in situ* gelirajućih sustava nastupa ubrzo nakon miješanja sa SNF-om u volumnom omjeru 1:1. Čvrstoća gelova raste s porastom koncentracije gelan gume u *in situ* gelirajućim sustavima.
- Uklapanje modelnog lijeka melatonina ubrzava geliranje, ali smanjuje čvrstoću nastalih gelova kod nižih koncentracija gelan gume (0,4 i 0,2 %; *m/m*). Kod svih mjerenih sustava uklapanje melatonina smanjilo je kompleksnu viskoznost sustava.
- S aspekta osmotske aktivnosti, ispitivani *in situ* gelirajući sustavi, izotonizirani manitolom, sigurni su za nazalnu primjenu.
- *In situ* gelirajući sustavi karakterizirani su produljenim oslobađanjem uklopljenog modelnog lijeka. Nije uočena razlika u profilu *in vitro* oslobađanja lijeka iz *in situ* gelirajućih sustava pripremljenih pri različitim koncentracijama gelan gume, što upućuje na nastajanje veoma porozne strukture trodimenzionalne polimerne mreže.

6. LITERATURA

Acharya PC, Soares D, Shetty S, Fernandes C, Tekade RK. Chapter 16 - Rheology and its implications on performance of liquid dosage forms. U: Dosage Form Design Considerations. Tekade RK, urednik, UK, Academic Press, 2018, str. 549-597.

Agnihotri SA, Jawalkar SS, Aminabhavi TM. Controlled release of cephalexin through gellan gum beads: Effect of formulation parameters on entrapment efficiency, size, and drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006, 63, 249–261.

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.

Appasaheb PS, Manohar SD, Bhanudas SR. A Review on intranasal drug delivery system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research Edu. & Res.* 2013, 3, 333-346.

Arendt J. Melatonin. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, 2004, 228-237.

Arora P, Sharma S, Garg S. Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discov Today*, 2002, 7, 967-975.

Babu R, Dayal P, Singh M. Effect of cyclodextrins on the complexation and nasal permeation of melatonin. *Drug Deliv*, 2008, 15, 381-388.

Babu R, Dayal PP, Pawar K, Singh M. Nose-to-brain transport of melatonin from polymer gel suspensions: a microdialysis study in rats. *J Drug Target*, 2011, 9, 731-740.

Bacelar AH, Silva-Correia J, Oliviera JM, Reis RL. Recent progress on gellan gum hydrogels provided by functionalization strategies. *J. Mater. Chem. B*, 2016, 4, 6164-6174.

Balasubramaniam J, Kant S, Pandit JK. In vitro and in vivo evaluation of the Gelrite® gellan gum-based ocular delivery system for indomethacin. *Acta Pharm*, 2003, 53, 251–261.

Ban MM, Chakote VR, Dhembre GN, Rajguru JR, Joshi DA. In-situ gel for nasal drug delivery. *International Journal of Development Research*, 2018, 8, 18763-18769.

Baza lijekova- Circadin, www.halmed.hr. pristupljeno 14. 8. 2018.

Bechgaard E, Lindhardt K, Martinsen L. Intranasal absorption of melatonin in vivo bioavailability study. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 182, 1–5.

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. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2009, 14, 240–248.

Bell BC, Butler EB. Management of predictable pain using fentanyl pectin nasal spray in patients undergoing radiotherapy. *Journal of pain research*, 2013, 6, 843.

Bhardwaj TR, Kanwar M, Lal R. Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2000, 26, 1025–1038.

Bhise SB, Yadav AV, Avachat AM, Malayandi R. Bioavailability of intranasal drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 2014, 2.

Bitter C, Suter-Zimmermann K, Surber C. Nasal drug delivery in humans. U: Topical Applications and the Mucosa. Surber C, Elsner, P, Farage MA, urednici, Basel, Karger Publishers, 2011, str. 20-35.

Cao S, Zhang Q, Jiang X. Preparation of ion-activated in situ gel systems of scopolamine hydrobromide and evaluation of its antinotion sickness efficacy. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 584–590.

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

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.

Carmona-Moran CA, Zavgorodnya O, Penman AD, Kharlampieva E, Bridges SL, Hergenrother RW, Singh JA, Wick TM. Development of gellan gum containing formulations for transdermal drug delivery: Component evaluation and controlled drug release using

temperature responsive nanogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 509, 465-476.

Choudhary R, Goswami L. Nasal route: a novelistic approach for targeted drug delivery to CNS. *International research journal of pharmacy*, 2013, 4, 59-62.

Chowdhury I, Sengupta A, Maitra SK. Melatonin: Fifty years of scientific journey from the discovery in bovine pineal gland to delineation of functions in human. *Indian journal of biochemistry & biophysics*. 2008, 45, 289-304.

Dale O, Hjortkjaer R, Kharasch ED. Nasal administration of opioids for pain management in adults. *Acta anaesthesiologica scandinavica*, 2002, 46, 759-770.

Dhanka M, Shetty C, Srivastava R. Methotrexate loaded gellan gum microparticles for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 110, 346-356.

Dhiman N. Hydrocolloid-based hydrogels in drug delivery. U: *Natural Polymers for Drug Delivery*. Kharkwal H, Janaswamy S, urednici, UK, CABI, 2016, str. 22-37.

Dondeti P, Zia H, Needham TE. Bioadhesive and formulation parameters affecting nasal absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 127, 115-133.

DrugCard , Melatonin, www.drugbank.ca, pristupljeno 17. 8. 2018.

Galgatte UC, Kumbhar AB, Chaudhari PD. Development of in situ gel for nasal delivery: design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Drug Deliv*, 2014, 21, 62–73.

Ghori MU, Mahdi MH, Smith AM, Conway BR. Nasal drug delivery systems: An overview. *American Journal of Pharmacological Sciences*, 2015, 3, 110-119.

Giavasis I, Harvey LM, McNeil B. Gellan gum. *Critical reviews in biotechnology*, 2000, 20, 177-211.

Gohel MC, Parikh RK, Nagori SA, Shah SN, Dabhi MR. Preparation and evaluation of soft gellan gum gel containing paracetamol. *Indian J Pharm Sci.*, 2009, 71, 120–124.

Goyal R, Tripathi, SK, Tyagi S, Ram KR, Ansari KM, Kumar P, Shukla Y, Chowdhuri DK, Gupta K.C. Gellan gum-PEI nanocomposites as efficient gene delivery agents. *Journal of biomedical nanotechnology*, 2011, 7, 38-39.

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

Herxheimer A, Petrie KJ. Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002, 2.

<http://permeagear.com/franz-cells/>, pristupljeno 20. 8 .2018.

Illum L, Nasal drug delivery—possibilities, problems and solutions. *Journal of Controlled Release*, 2003, 87, 187–198.

Illum L. Nasal drug delivery — Recent developments and future prospects. *Journal of Controlled 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 1. 9. 2018.

Iurciuc C, Savin A, Lungu C, Martin P, Popa M. Gellan food applications. *Cellulose chemistry and technology*, 2016, 50, 1-13.

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

Jana S, Das A, Nayak AK, Sen KK, Basu SK. Aceclofenac-loaded unsaturated esterified alginate/gellan gum microspheres: In vitro and in vivo assessment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 57, 129–137.

- Jurišić Dukovski B, Plantić I, Čunčić I, Krtalić I, Juretić M, Pepić I, Lovrić J, Hafner A. Lipid/alginate nanoparticle-loaded in situ gelling system tailored for dexamethasone nasal delivery. *International journal of pharmaceutics*, 2017, 533, 480-487.
- Karavasili C, Fatouros DG. Smart materials: *in situ* gel-forming systems for nasal delivery. *Drug Discovery Today* 2016, 21, 157-166.
- Kubo W, Miyazaki S, Attwood D. Oral sustained delivery of paracetamol from in situ-gelling gellan and sodium alginate formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, 258, 55–64.
- Kulkarni RV, Nagathan, Biradar PR, Naikawadi AA. Simvastatin loaded composite polyspheres of gellan gum and carrageenan: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 57, 238–244.
- Kumar S, Kaur P, Bernela M, Rani R, Thakur R. Ketoconazole encapsulated in chitosan-gellan gum nano complexes exhibits prolonged antifungal activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93, 988-994.
- Lenoir J, Bachert C, Remon JP, Adriaens E. The Slug Mucosal Irritation (SMI) assay: A tool for the evaluation of nasal discomfort. *Toxicology in Vitro*, 2013, 27, 1954–1961.
- Li X, Du L, Chen X, Ge P, Wang Y, Fu Y, Sun H, Jiang Q, Jin Y. Nasal delivery of analgesic ketorolac tromethamine thermo- and ion-sensitive in situ hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 489, 252-260.
- Lorenzo G, Zaritzky N, Califano A. Rheological analysis of emulsion-filled gels based on high acyl gellan gum. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30, 672-680.
- Mahdi MH, Conway BR, Mills T, Smith AM. Gellan gum fluid gels for topical administration of diclofenac. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 515, 535-542.
- Mahdi MH, Conway BR, Smith AM. Development of mucoadhesive sprayable gellan gum fluid gels. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 488, 12-19.

Malhotra S, Sawhney G, MD, Pandhi P. The Therapeutic Potential of Melatonin: A Review of the Science. *MedGenMed*. 2004, 6, 46.

Mao S, Chen J, Wei Z, Liu H, Bi D. Intranasal administration of melatonin starch microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 272, 37–43.

Matsukawa S, Tang Z, Watanabe T. Hydrogen-bonding behavior of gellan in solution during structural change observed by ^1H NMR and circular dichroism methods. U: Physical Chemistry and Industrial Application of Gellan Gum. Progress in Colloid and Polymer Science, vol 114. Nishinari K, urednik, Berlin, Heidelberg, Springer, 1999, str. 15-24.

Meneguín AB, Beyssac E, Garrat G, Hsein H, Cury BSF. Retrograded starch/pectin coated gellan gum-microparticles for oral administration of insulin: A technological platform for protection against enzymatic degradation and improvement of intestinal permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2018, 123, 84–94.

Menzel C, Lejkmann M, Laffleur F, Bernkop-Schnürch A. Nasal drug delivery: Design of a novel mucoadhesive and *in situ* gelling polymer. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 517, 196-202.

Miyazaki S, Aoyama H, Kawasaki N, Kubo W, Attwood D. In situ-gelling gellan formulations as vehicles for oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 1999, 60, 287–295.

Miyoshi E, Nishinari K. Rheological and thermal properties near the sol-gel transition of gellan gum aqueous solutions. U: Physical Chemistry and Industrial Application of Gellan Gum. Progress in Colloid and Polymer Science, vol 114. Nishinari K, urednik, Berlin, Heidelberg, Springer, 1999, str. 68-82.

Morris ER, Nishinari K, Riunaldo M, Gelation of gellan-A review. *Food Hydrocolloids*, 2012, 28, 373-411.

Munizaga GT, Cánovas GVB. Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 2005, 67, 147–156.

Mura P, Mennini N, Nativi C, Richichi B. In situ mucoadhesive-thermosensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of opiorphin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2018, 122, 54-61.

Nayak AK, Pal D. Trigonella foenum-graecum L. seed mucilage gellan mucoadhesive beads for controlled release of metformin HCl. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 107, 31–40.

Nirmal HB, Bakliwal SR, Pawar SP. In-situ gel: new trends in controlled and sustained drug delivery system. *International Journal of PharmTech Research*, 2010, 2, 1398-1408.

Oliveira JT, Martins L, Picciochi R, Malafaya PB, Sousa RA, Neves NM, Mano JF, Reis RL. Gellan gum: a new biomaterial for cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, 93, 852-863.

Oliveira JT, Santos TC, Martins L, Picciochi R, Marques AP, Castro AG, Neves NM, Mano JF, Reis RL. Gellan gum injectable hydrogels for cartilage tissue engineering applications: in vitro studies and preliminary in vivo evaluation. *Tissue Engineering Part A*, 2009, 16, 343-353.

Oliveira PF, Sousa M, Monteiro MP, Silva B, Alves MG. Pineal Gland and Melatonin Biosynthesis. U: Encyclopedia of Reproduction (Second Edition). Skinner MK, urednik, San Diego, USA, Elsevier Science Publishing Co Inc, 2018, str. 465-471.

Osmalek T, Froelich A, Tasarek S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 466, 328-340.

Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal. *FEBS J*, 2006, 273, 2813.

Pavić K, Zorc B. Melatonin. *Farmaceutski glasnik: glasilo Hrvatskog farmaceutskog društva*, 2013, 69, 249-265.

Pérez-Campos SJ, Chavarría-Hernández N, Tecante A, Ramírez-Gilly M, Rodríguez-Hernández AI. Gelation and microstructure of dilute gellan solutions with calcium ions. *Food hydrocolloids*, 2012, 28, 291-300.

Pisal SS, Reddy P, Paradkar AR, Mahadik KR, Kadam SS. Nasal melatonin gels using pluronic PF-127 for chronobiological treatment of sleep disorder. *Indian Journal of Biotechnology*, 2004, 3, 369-377.

Posadowska U, Parizek M, Filova E, Wlodarczyk-Biegun M, Kamperman M, Bacakova L, Pamula E. Injectable nanoparticle-loaded hydrogel system for local delivery of sodium alendronate. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 485, 31-40.

Prajapati VD, Jani GK, Zala BS, Khutliwala TA. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 93, 670–678.

Prezotti FG, Cury BSF, Evangelista RC. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlledelivery of drugs. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 113, 286–295.

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

Reiter, RJ, Tan D, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Progress in brain research*, 2010, 181, 127-51.

Rozier A, Mazuel C, Grove J, Plazonne B. Gelrite®: A novel, ion-activated, in situ gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect on bioavailability of timolol. *International Journal of Pharmaceutics*, 1989, 57, 163-168.

Rupenthal ID, Greena CR, Alany RG. Comparison of ion-activated in situ gelling systems for ocular drug delivery. Part 1: Physicochemical characterisation and in vitro release. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 411, 69–77.

Saha D, Bhattacharya S. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *Journal of food science and technology*, 2010, 47, 587-597.

Salunke SR, Patil SB. Ion activated in situ gel of gellan gum containing salbutamol sulphate for nasal administration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 87, 41–47.

Shah V, Sharma M, Parmar V, Upadhyay U. Formulation of sildenafil citrate loaded nasal microspheres: An in vitro, ex vivo characterization. *International Journal of Drug Delivery*, 2010, 2, 213-220.

Shi-lei, Ren X, Zhang O, Chen E, Xu F, Chen J, Liu L, Jiang X. In situ gel based on gellan gum as new carrier for nasal administration of mometasone furoate. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 365, 109–115.

Shiyani BG, Dholakiya RB, Akbari BV, Lodhiya DJ, Ramani GK. Development and evaluation of novel immediate release tablets of Metoclopramide HCl by direct compression using treated gellan gum as a disintegration-accelerating agent. *Journal of Pharmacy Research*, 2009, 2, 1460-1464.

Sonje AG, Mahajan HS. Nasal inserts containing ondansetron hydrochloride based on Chitosan-gellan gum polyelectrolyte complex: In vitro–in vivo studies. *Materials Science and Engineering*, 2016, 64, 329–335.

Sultana Y, Aqil M, Ali A. Ion-activated, Gelrite[®]-based in situ ophthalmic gels of pefloxacin mesylate: Comparison with conventional eye drops. *Drug Delivery*, 2006, 13, 215–219.

Suri S, Banerjee R. In vitro evaluation of in situ gels as short term vitreous substitutes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, 79, 650-664.

Sworn G. Gellan gum. U: Handbook of Hydrocolloids (Second Edition). Phillips GO, Williams PO, Urednici, UK, Woodhead Publishing Limited, 2009, str. 204-227.

Tayel SA, El-Nabarawi MA, Tadros MI, Abd-Elsalam WH. Promising ion-sensitive in situ ocular nanoemulsion gels of terbinafine hydrochloride: Design, in vitro characterization and in vivo estimation of the ocular irritation and drug pharmacokinetics in the aqueous humor of rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 443, 293–305.

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

Ugwoke MI, Verbeke N, Kinget R. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2001, 53, 3-22.

Varshosaz J, Sadrai H, Heidari A. Nasal Delivery of Insulin Using Bioadhesive Chitosan Gels. *Drug Delivery*, 2006, 13, 31–38.

Vijayalaxmi, Thomas CR, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Onco.* 2002, 20, 2575-601.

Zečević L. Razvoj in situ gelirajućeg pektinskog sustava kao platforme za nazalnu primjenu lijekova. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018.

Zia KM, Tabasum S, Khan MF, Akram N, Akhter N, Noreen A, Zube M. Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 109, 1068–1087.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Nazalna primjena lijekova prvi je izbor u liječenju oboljenja sluznice nosa, no predstavlja i zamjenu za klasične putove primjene lijekova s ciljem postizanja njihove sistemske raspoloživosti. *In situ* gelirajući sustavi prikladni su terapijski sustavi za nazalnu primjenu lijekova. Mogu biti formulirani u obliku otopine ili suspenzije koje geliraju na mjestu primjene uslijed promjene pH, temperature ili prisutnosti iona. Niska viskoznost *in situ* gelirajućih sustava omogućuje jednostavnu primjenu raspršivanjem, a viskoelastična svojstva gela osiguravaju dulje zadržavanje na mjestu primjene te posljedično bolji učinak i/ili opsežniju apsorpciju lijeka.

Cilj ovog rada je procjena primjenjivosti gelan gume u pripravi *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu. Kao modelni lijek odabran je melatonin koji se koristi u terapiji nesаницe, u prevenciji i smanjivanju simptoma *jet laga* te za reguliranje cirkadijanog ritma. Primjenjuje se oralno uz slabu i promjenjivu bioraspoloživost pa nazalna primjena predstavlja alternativni put s mogućnošću povećanja njegove bioraspoloživosti.

Pripremljeni su *in situ* gelirajući sustavi temeljeni na gelan gumi (0,6 %, 0,4 % i 0,2 %; *m/m*), s manitolom (4 %, *m/m*) kao sredstvom za izotonizaciju te melatoninom (0,05 %, *m/m*) kao modelnim lijekom. Viskoznost pripremljenih *in situ* gelirajućih sustava bila je približno jednaka viskoznosti vode pri brzini smicanja koja odgovara raspršivanju iz nazalnih sprejeva. Geliranje sustava nastupilo je ubrzo nakon miješanja sa simuliranim nazalnim fluidom. Čvrstoća gelova rasla je s porastom koncentracije gelan gume u *in situ* gelirajućim sustavima. Utjecaj uklapanja modelnog lijeka na vrijeme geliranja i čvrstoću gela ovisio je o koncentraciji gelan gume u *in situ* gelirajućem sustavu. Zabilježen je profil produljenog oslobađanja uklopljenog melatonina iz *in situ* gelova, no nije uočena razlika u brzini oslobađanja pri različitim koncentracijama gelan gume, što upućuje na nastajanje veoma porozne strukture trodimenzionalne polimerne mreže.

Zaključno, gelan guma prikladan je konstituent nazalnih *in situ* gelirajućih sustava. U koncentraciji većoj od 0,2 % (*m/m*) može osigurati *in situ* geliranje nakon raspršivanja u nosnoj šupljini. Dodatak gelan gume pri koncentraciji manjoj od 0,2 % (*m/m*) moguće je razmotriti s ciljem optimiranja reoloških svojstava sustava temeljenih na barem još jednoj sastavnici sa sposobnošću *in situ* geliranja.

Nasal drug administration is the first choice for the treatment of topical nasal disorders, however it represents an alternative route to classic administration routes with the aim to reach the systemic circulation of the drug. *In situ* gelling systems represent suitable nasal drug delivery platform. They can be formulated in solutions or suspensions that gel at the site of administration due to change in pH, temperature or due to the presence of ions. Low viscosity of *in situ* gelling systems enables simple administration by spraying, while viscoelastic gel properties ensures prolonged retention at the site of administration and consequent improved therapeutic effect and/or improved drug absorption.

The aim of this study is to evaluate the applicability of gum gel in the preparation of an *in situ* gelling system for nasal drug administration. Melatonin was chosen as the model drug. It is commonly used in the treatment of insomnia, prevention and reduction of the jet lag symptoms, and circadian rhythm regulation. It is commonly administered orally resulting in low and variable bioavailability, therefore nasal administration of melatonin represents an alternative route of administration with the potential to improve its bioavailability.

In this study, gellan gum based (0.6 %, 0.4 % and 0.2 %; *m/m*) *in situ* gelling systems with mannitol (4 %, *m/m*) as an isotonicizing agent and melatonin (0.05 %, *m/m*) as a model drug, have been prepared. Viscosity of the *in situ* gelling systems was approximately equal to the viscosity of the purified water at the standard nasal spray shear rates. Gelation of the *in situ* gelling systems occurred soon after mixing with simulated nasal fluid. Gel strength increased with increasing gellan gum concentration in *in situ* gelling systems. Influence of the incorporation of the model drug on the gelation time and gel strength was shown to be dependent on the gellan gum concentration. Prolonged melatonin release profile was observed for all the formulations, however, there was no significant difference in the melatonin release rate from the *in situ* gels differing in gellan gum concentration, indicating very porous tridimensional structure of the gel formed.

Conclusively, gellan gum is a suitable constituent of nasal *in situ* gelling systems. At concentrations above 0.2 % (*m/m*) it can provide *in situ* gelation after spraying in the nasal cavity. The addition of gellan gum at concentration below 0.2 % (*m/m*) can be considered with the aim to optimize the rheological properties of the system based on at least one other component with the *in situ* gelling ability.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Primjenjivost gelan gume u pripravi *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu lijekova

Lucija Čotić

SAŽETAK

Nazalna primjena lijekova prvi je izbor u liječenju oboljenja sluznice nosa, no predstavlja i zamjenu za klasične putove primjene lijekova s ciljem postizanja njihove sistemske raspoloživosti. *In situ* gelirajući sustavi prikladni su terapijski sustavi za nazalnu primjenu lijekova. Mogu biti formulirani u obliku otopine ili suspenzije koje geliraju na mjestu primjene uslijed promjene pH, temperature ili prisutnosti iona. Niska viskoznost *in situ* gelirajućih sustava omogućuje jednostavnu primjenu raspršivanjem, a viskoelastična svojstva gela osiguravaju dulje zadržavanje na mjestu primjene te posljedično bolji učinak i/ili opsežniju apsorpciju lijeka.

Cilj ovog rada je procjena primjenjivosti gelan gume u pripravi *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu. Kao modelni lijek odabran je melatonin koji se koristi u terapiji nesanicice, u prevenciji i smanjivanju simptoma *jet laga* te za reguliranje cirkadijanog ritma. Primjenjuje se oralno uz slabu i promjenjivu bioraspoloživost pa nazalna primjena predstavlja alternativni put s mogućnošću povećanja njegove bioraspoloživosti.

Pripremljeni su *in situ* gelirajući sustavi temeljeni na gelan gumi (0,6 %, 0,4 % i 0,2 %; *m/m*), s manitolom (4 %, *m/m*) kao sredstvom za izotonizaciju te melatoninom (0,05 %, *m/m*) kao modelnim lijekom. Viskoznost pripremljenih *in situ* gelirajućih sustava bila je približno jednaka viskoznosti vode pri brzini smicanja koja odgovara raspršivanju iz nazalnih sprejeva. Geliranje sustava nastupilo je ubrzo nakon miješanja sa simuliranim nazalnim fluidom. Čvrstoća gelova rasla je s porastom koncentracije gelan gume u *in situ* gelirajućim sustavima. Utjecaj uklapanja modelnog lijeka na vrijeme geliranja i čvrstoću gela ovisio je o koncentraciji gelan gume u *in situ* gelirajućem sustavu. Zabilježen je profil produljenog oslobađanja uklopljenog melatonina iz *in situ* gelova, no nije uočena razlika u brzini oslobađanja pri različitim koncentracijama gelan gume, što upućuje na nastajanje veoma porozne strukture trodimenzionalne polimerne mreže.

Zaključno, gelan guma prikladan je konstituent nazalnih *in situ* gelirajućih sustava. U koncentraciji većoj od 0,2 % (*m/m*) može osigurati *in situ* geliranje nakon raspršivanja u nosnoj šupljini. Dodatak gelan gume pri koncentraciji manjoj od 0,2 % (*m/m*) moguće je razmotriti s ciljem optimiranja reoloških svojstava sustava temeljenih na barem još jednoj sastavnici sa sposobnošću *in situ* geliranja.

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

Rad sadrži: 51 stranicu, 14 grafičkih prikaza, 3 tablice i 97 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Gelan guma; *In situ* gelirajući sustavi; Nazalna primjena; Reološka svojstva; Osmolalnost; *In vitro* oslobađanje lijeka

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. Ivan Pepić docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Applicability of gellan gum in the preparation of an *in situ* gelling system for nasal drug delivery

Lucija Čotić

SUMMARY

Nasal drug administration is the first choice for the treatment of topical nasal disorders, however it represents an alternative route to classic administration routes with the aim to reach the systemic circulation of the drug. *In situ* gelling systems represent suitable nasal drug delivery platform. They can be formulated in solutions or suspensions that gel at the site of administration due to change in pH, temperature or due to the presence of ions. Low viscosity of *in situ* gelling systems enables simple administration by spraying, while viscoelastic gel properties ensures prolonged retention at the site of administration and consequent improved therapeutic effect and/or improved drug absorption.

The aim of this study is to evaluate the applicability of gum gel in the preparation of an *in situ* gelling system for nasal drug administration. Melatonin was chosen as the model drug. It is commonly used in the treatment of insomnia, prevention and reduction of the jet lag symptoms, and circadian rhythm regulation. It is commonly administered orally resulting in low and variable bioavailability, therefore nasal administration of melatonin represents an alternative route of administration with the potential to improve its bioavailability.

In this study, gellan gum based (0.6 %, 0.4 % and 0.2 %; *m/m*) *in situ* gelling systems with mannitol (4 %, *m/m*) as an isotonicizing agent and melatonin (0.05 %, *m/m*) as a model drug, have been prepared. Viscosity of the *in situ* gelling systems was approximately equal to the viscosity of the purified water at the standard nasal spray shear rates. Gelation of the *in situ* gelling systems occurred soon after mixing with simulated nasal fluid. Gel strength increased with increasing gellan gum concentration in *in situ* gelling systems. Influence of the incorporation of the model drug on the gelation time and gel strength was shown to be dependent on the gellan gum concentration. Prolonged melatonin release profile was observed for all the formulations, however, there was no significant difference in the melatonin release rate from the *in situ* gels differing in gellan gum concentration, indicating very porous tridimensional structure of the gel formed.

Conclusively, gellan gum is a suitable constituent of nasal *in situ* gelling systems. At concentrations above 0.2 % (*m/m*) it can provide *in situ* gelation after spraying in the nasal cavity. The addition of gellan gum at concentration below 0.2 % (*m/m*) can be considered with the aim to optimize the rheological properties of the system based on at least one other component with the *in situ* gelling ability.

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

Thesis includes: 51 pages, 14 figures, 3 tables and 97 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Gellan gum; *In situ* gelling systems; Nasal delivery; Rheological properties; Osmolality; *In vitro* drug release

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

Ivan Pepić, Ph.D. Assistant 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: September 2018.