



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Φαρμακευτικής
Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

«Ανάπτυξη και in vitro - ex vivo
αξιολόγηση πηκτώματος
Υδροχλωρικής Δονεπεξίλης για ρινική
χορήγηση με χρήση πειραματικού
σχεδιασμού»

**Διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού
προγράμματος «Βιομηχανική Φαρμακευτική» του
Μητσόπουλου Αναστάση**

Αθήνα 2020

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Γεωργία Βαλσαμή, Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (επιβλέπουσα)

Παρασκευάς Δάλλας, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Δημήτριος Ρέκκας, Αναπληρωτής Καθηγητής και Πρόεδρος του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	6
A. Θεωρητικό μέρος.....	7
A.1. Δονεπεξίλη	7
A.1.1. Ιστορικά στοιχεία.....	7
A.1.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	8
A.1.3. Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά	9
A.1.3.1 Απορρόφηση.....	9
A.1.3.2 Κατανομή	9
A.1.3.3 Βιομετατροπή και απέκκριση	9
A.1.3.4 Ειδικοί πληθυσμοί.....	10
A.1.3.5 Αλληλεπιδράσεις	10
A.1.4. Νόσος Alzheimer.....	10
A.1.4.1 Κλινική εικόνα.....	10
A.1.4.2 Φυσιολογία Alzheimer	11
A.1.4.3 Χολινεργική υπόθεση	11
A.1.4.4 Αμυλοειδής υπόθεση.....	12
A.1.4.5 Υπόθεση Ταυ	12
A.1.4.6 Άλλες υποθέσεις	12
A.1.5. Φαρμακολογικά χαρακτηριστικά.....	13
A.1.5.1 Μηχανισμός δράσης	13
A.1.5.2 Φαρμακοδυναμική	14
A.1.5.3 Κλινική χρησιμότητα στο Alzheimer	14
A.1.5.4 Άλλες κλινικές χρήσεις.....	14
A.1.5.6 Ασφάλεια και ανεκτικότητα	15
A.2. Ρινική κοιλότητα	16
A.2.1. Περιοχές ρινικής κοιλότητας.....	16
A.2.1.1. Εξωτερική μύτη	17
A.2.1.2. Ιγμόρεια.....	17
A.2.1.3. Τοιχώματα, κόγχες και πόροι.....	18
A.2.1.4. Όσφρηση	20
A.2.1.5. Ρινικός βλεννογόνος.....	20
A.2.1.6. Λεμφικός ιστός ρινικής κοιλότητας (AIPK)	23
A.2.2. Σύγκριση ρινικής κοιλότητας ανθρώπου και κουνελιού.....	24
A.3. Ρινική χορήγηση	24

A.3.1 Γενικές πληροφορίες.....	24
A.3.2 Πλεονεκτήματα	25
A.3.3 Μειονεκτήματα, περιορισμοί, προκλήσεις	26
A.3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την απορρόφηση	27
A.3.4.1. Χαρακτηριστικά του φαρμάκου	28
A.3.4.2. Χαρακτηριστικά του ασθενή	31
A.3.4.2.1 Αιματική ροή.....	31
A.3.4.2.2 Βλεννοκροσσωτή κάθαρση	31
A.3.4.2.3 Ενζυμική αποικοδόμηση	32
A.3.4.2.4 Μεταφορείς και συστήματα εκροής.....	32
A.3.4.3. Θεραπευτικός στόχος	33
A.3.4.3.1 Τοπική δράση.....	33
A.3.4.3.2 Συστηματική δράση	33
A.3.4.3.3 Ρινικά εμβόλια.....	34
A.4. Σχεδιασμός ρινικών σκευασμάτων	34
A.4.1 Μορφές	34
A.4.1.1. Υγρές.....	35
A.4.1.2. Ημιστερεές	35
A.4.1.3. Στερεές	36
A.4.1.4. Νανοτεχνολογικές	36
A.4.2 Έκδοχα ρινικών σκευασμάτων: Βελτιωτικά απορρόφησης και παράγοντες αύξησης ιξώδους.....	37
A.4.2.1. Χιτοζάνη.....	37
A.4.2.2. Άμυλο και παράγωγά του.....	38
A.4.2.3. Παράγωγα κυτταρίνης.....	39
A.4.2.4. Πολυμερή ακρυλικού οξέος.....	40
A.4.2.5. Κυκλοδεξτρίνες	40
A.4.3 Συσκευές χορήγησης	40
A.4.3.1. Σταγονομετρικές συσκευές.....	41
A.4.3.2. Ενστάλλαξη μέσω ρινικού καθετήρα.....	41
A.4.3.3. Περιέκτες μονοδόσεων	41
A.4.3.4. Συσκευές ψεκασμού δοσομετρικής αντλίας	42
A.4.3.5. Συσκευές για ημιστερεές μορφές.....	42
A.5. Βασικά φυσικοχημικά φαινόμενα και έννοιες.....	42
A.5.1 Ιξώδες	43
A.5.2 Διαπέραση.....	43
A.5.2.3.1 In vivo μοντέλα	45

A.5.2.3.2 <i>In vitro</i> μοντέλα	46
A.5.2.3.3 <i>Ex vivo</i> μοντέλα	46
A.5.2.3.4 Κύτταρα διάχυσης Franz	47
A.6. Σχεδιασμός πειραμάτων	48
A.6.1 Βασικές αρχές και ορισμοί	48
A.6.2 Σχεδιασμός σάρωσης	49
B. Πειραματικό μέρος	50
B.1. Στόχος	50
B.2. Πειράματα	50
B.2.1 Επιλογή μορφοποίησης.....	51
B.2.2 Ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου	51
B.2.3 Σχεδιασμός πειραμάτων	56
B.2.4 Design Expert και επεξεργασία αποτελεσμάτων	60
B.2.5 Διαδικασία παρασκευής συνταγών.....	62
B.2.6 Πειράματα διαπέρασης σε κύτταρα Franz.....	63
B.2.7 Μελέτη σταθερότητας	64
B.3. Αποτελέσματα	65
B.3.1 Μελέτη διαπέρασης δονεπεζίλης από μεμβράνη αναγεννημένης κυτταρίνης	65
B.3.2 Αποτελέσματα σχεδιασμού από το Design Expert	67
B.3.3 Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας	73
B.3.4 <i>Ex vivo</i> πείραμα σε κύτταρα Franz.....	77
B.4. Συμπεράσματα και συζήτηση	77
B.4.1 Συμπεράσματα για το σχεδιασμό πειραμάτων	77
B.4.2 Συμπεράσματα για τις καμπύλες διαπέρασης	79
B.4.3 Συμπεράσματα για τη σταθερότητα	80
Γ. Βιβλιογραφία	81
Δ. Παράρτημα	90
Δ.1 Ενδεικτικά χρωματογραφήματα και επικύρωση μεθόδου	90
Δ.2 Αναλυτικά αποτελέσματα	93

Περίληψη

Η ρινική χορήγηση αποτελεί μία εναλλακτική οδός χορήγησης, η οποία έχει αρχίσει να βγαίνει στο προσκήνιο της φαρμακευτικής έρευνας τα τελευταία χρόνια. Η πρόσβαση που προσφέρει στο κεντρικό νευρικό σύστημα στα φάρμακα αυτή η προσέγγιση μπορεί να βελτιστοποιήσει υπάρχουσες θεραπείες για καλύτερα αποτελέσματα. Η δονεπεξίλη είναι ένα φάρμακο πρώτης γραμμής για τη θεραπεία του Alzheimer που στοχεύει ένζυμα των νευρώνων του εγκεφάλου, εμφανίζει όμως δοσοεξαρτώμενες ανεπιθύμητες ενέργειες. Με την παρασκευή ενός πηκτώματος δονεπεξίλης για ρινική χορήγηση γίνεται εφικτή η χορήγηση του φαρμάκου πιο άμεσα στον τόπο δράσης με μικρότερες δόσεις.

Διεξάγοντας κατάλληλα πειράματα διάχυσης σε κύτταρα Franz με βάση πειραματικό σχεδιασμό ελέγχθηκε η διαπέραση της δονεπεξίλης, τόσο από μεμβράνη αναγεννημένης κυτταρίνης *in vitro*, όσο και από ρινικό βλεννογόνο κουνελιού *ex vivo*. Τα διάφορα πηκτώματα που δοκιμάστηκαν διέφεραν ως προς τη δόση, το pH και την περιεκτικότητα HPMC και ελέγχθηκε πώς αυτές οι διαφορές επηρεάζουν τη διαπέραση. Επίσης, για την αξιολόγηση της σταθερότητας των σκευασμάτων πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικά μελέτες χημικής και φυσικής σταθερότητας, όχι μόνο βραχυπρόθεσμα, αλλά και μακροπρόθεσμα, ώστε να εξασφαλιστεί η αν μπορούν τα σκευάσματα να διανεμηθούν στην αγορά και να χρησιμοποιηθούν από το κοινό.

Abstract

Nasal administration has proven to be an alternative route with great potential in the field of pharmaceutical research. The access to the brain the nasal cavity provides, can guide the pharmaceutical development into improving current therapeutical approaches even more. Donepezil leads a great example of a first-line drug in the treatment of Alzheimer's disease that lacks in efficiency and shows dose-dependent unwanted effects. Furthermore, Donepezil targets certain enzymes of the neurons, so developing a gelled formulation for nasal administration will grant the ability to achieve faster results with lower doses.

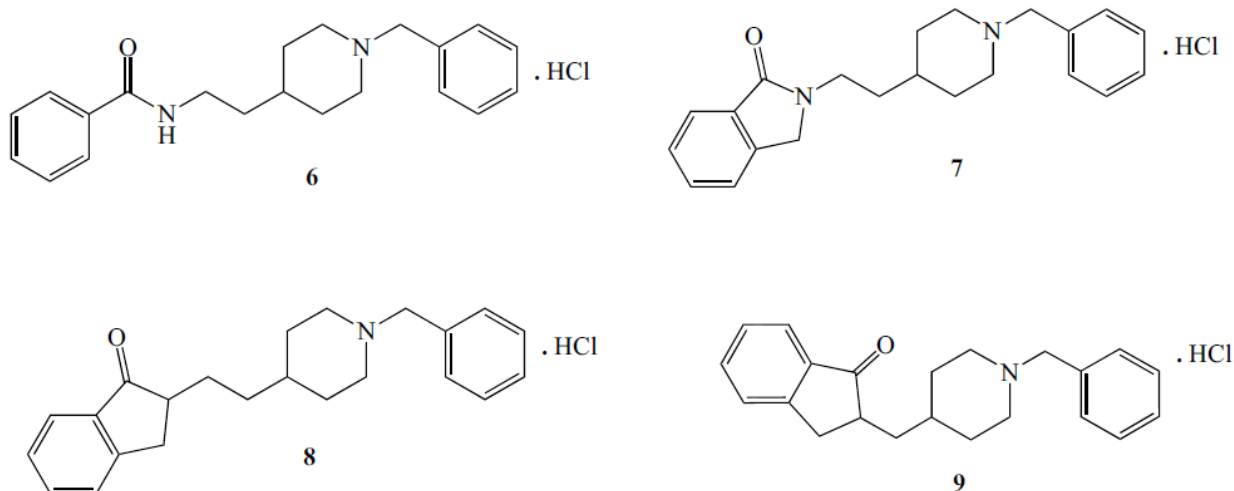
In this regard, Franz diffusion cells were used in several *in vitro* and *ex vivo* experiments to test the permeation through cellulose membrane as well as through nasal mucosa of rabbits. With the assistance of a design of experiments it became possible to map the effects of pH, dose and HPMC content on the amount of drug that can be diffused. In the search for the best formulation stability study was performed in a short- and in a long-term basis, in order to find out whether the formulations are fit for commercial distribution and public use.

A. Θεωρητικό μέρος

A.1. Δονεπεξίλη

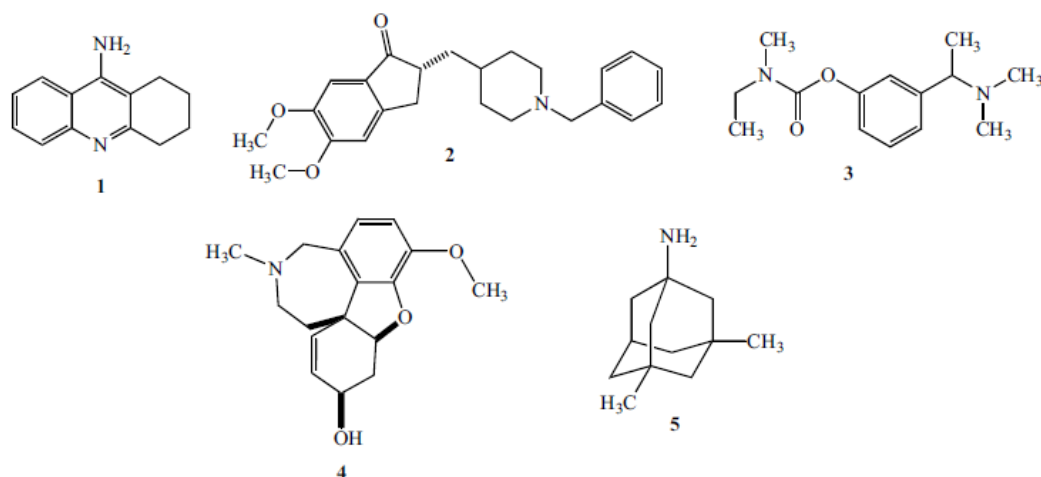
A.1.1. Ιστορικά στοιχεία

Η ιστορία της ανακάλυψης της δονεπεξίλης ως φάρμακο για τη νόσο του Alzheimer ακολούθησε μία κοινότυπη πορεία. Ήδη ήταν γνωστό, ότι η τακρίνη και η ριβαστιγμίνη δρουν στη βελτίωση της νοητικής λειτουργίας σε ασθενείς με Alzheimer μέσω της αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης. Ο ερευνητής Hachiro Sugimoto της εταιρίας Eisai Co. μαζί με τους συνεργάτες του ξεκίνησαν ένα καινούργιο, ευρύ project το 1984 με σκοπό τη διερεύνηση παραγώγων που θα ξεπεράσουν τα μειονεκτήματα των προηγούμενων ενώσεων (Sugimoto et al. 1990).



Εικόνα 1: Παράγωγα τακρίνης (αναλυτικά στο κείμενο)

Ξεκινώντας με παράγωγα τακρίνης απέτυχαν και έτσι έστρεψαν την προσοχή τους σε *N*-βενζυλοπιπεραζινικά παράγωγα (Sugimoto et al. 1995). Αρχικά, αυτά τα παράγωγα εμφάνιζαν μικρή δραστηριότητα, όμως ύστερα από πολλές προσπάθειες, με αντικατάσταση της *N*-βενζυλοπιπεραζίνης με *N*-βενζυλοπιπεριδίνης αυξήθηκε δραματικά. Έτσι, κατέληξαν στην ένωση 1-βενζυλ-4-[2-(*N*-βενζοϋλαμινο)αιθυλ]πιπεριδίνη (6, εικόνα 1). Σε μία άλλη στρατηγική σχεδιασμού που ακολούθησαν αντικατέστησαν την αλειφατική αμίνη με κυκλική και οδηγήθηκαν στο παράγωγο 7. Το παράγωγο αυτό που ονομάζεται 1-βενζυλο-4-(2-ισοβουλο-2-φαινο-1H-ινδολ-1-yl)πιπεριδίνη αναγνωρίστηκε ως το πιο δραστικό της σειράς τους και επιλέχθηκε ως η νέα πρότυπη ένωση. Έπειτα από αρκετές τροποποιήσεις όπως η αλλαγή του 2-ινδονίου σε 2-ινδάνιο που δεν επηρέασαν την δραστηριότητα, οι ερευνητές κατέληξαν στη δονεπεξίλη (Sugimoto 1999). Στη βιβλιογραφία έχει διατηρηθεί σε κάποιες περιπτώσεις η ονομασία E2020 που ήταν η κωδική ονομασία του φαρμάκου κατά την ανακάλυψή της (Shudo and Yoneto 2007).



Εικόνα 2: 1:τακρίνη, 2:δονεπεζίλη, 3:γαλανταμίνη, 4:ριβαστιγμίνη, 5:μεμαντίνη

Η δραστική δονεπεζίλη πέρασε επιτυχώς όλες τις δοκιμές ως που να φτάσει με ασφάλεια στον άνθρωπο. Οι κλινικές μελέτες ανέδειξαν την ουσία όχι μόνο ασφαλή, αλλά και αποτελεσματική με αποτέλεσμα ο FDA το 1996 την ενέκρινε με ένδειξη στην θεραπεία της ήπιας και μέτριας νόσου του Alzheimer. Έτσι, ξεπέρασε τα προβλήματα που υπήρχαν με τα προηγούμενα φάρμακα για το Alzheimer, την τακρίνη και τη ριβαστιγμίνη (εικόνα 2). Η Eisai Co. σε συνεργασία με την Pfizer κυκλοφόρησαν το πρώτο φαρμακευτικό σκεύασμα με υδροχλωρική δονεπεζίλη στην αγορά, το Aricept. Το Aricept κυκλοφορεί σήμερα σε δόσεις των 5 και 10mg σε μορφή επικαλυμμένων δισκίων. Από τότε μέχρι σήμερα, το Aricept είναι το φάρμακο με τις περισσότερες πωλήσεις για τη θεραπεία του Alzheimer, ενώ αρκετά αντίγραφά του κυκλοφορούν στην αγορά (Mount and Downton 2006).

A.1.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Η δονεπεζίλη (κατά IUPAC: 2-[(1-βενζυλοπιπεριдино-4-υλ)μεθυλ]-5,6-διμεθοξυ-2,3-διυδρο-1H-ινδεν-1-ονη) είναι μία οργανική ένωση που ανήκει στην κατηγορία n-βενζυλοπιπεριδίνες, επειδή το μόριο διαθέτει πιπεριδίνη, η οποία ενώνεται με ένα βενζολικό δακτύλιο. Η χημική ένωση απαντάται σε δύο εναντιομερή το R και το S και χορηγείται ως ρακεμικό μείγμα (Radwan et al. 2006) και έχει μοριακό βάρος 379,5. Πρόκειται για μία ουσία, η οποία σε καθαρή μορφή είναι στερεή λευκή κόνις. Όσον αφορά στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά είναι λίγο διάλυτη στο νερό με διαλυτότητα 2,93mg/L και με αρκετά υψηλό σημείο ζέσεως στους 223-227°C και σημείο βρασμού 527,9°C. Επίσης, είναι σχετικά λιπόφιλη με logP 4,61 και φυσικά είναι μία ασθενής βάση λόγω της πιπεριδίνης με pKa 8,9. Φυσικά, το υδροχλωρικό άλας που χορηγείται σαν φάρμακο έχει βελτιωμένες ιδιότητες διαλυτότητας (31mg/mL) και μορφοποίησης.

Όσον αφορά στη σταθερότητα, η υδροχλωρική δονεπεζίλη ως στερεό άλας είναι γνωστό ότι δεν αλλοιώνεται σε βάθος χρόνων (από τη χημική αξιολόγηση του πρωτότυπου σκευάσματος σε μορφή δισκίων από τον FDA των Ηνωμένων πολιτειών). Όμως, για πηκτώματα χρειάζεται να γνωρίζουμε και τη σταθερότητα τους σε διαλύματα. Από τη βιβλιογραφία (Chothe et al. 2010; Ruela et al. 2014) συνεπάγεται, ότι και τα διαλύματα είναι αρκετά σταθερά εκτός αν είναι όξινα ή αλκαλικά.

A.1.3. Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά

A.1.3.1 Απορρόφηση

Όντας ένα φάρμακο ευρείας χρήσης έχουν ήδη μελετηθεί εκτενώς όλοι οι φαρμακοκινητικοί παράμετροί του σε υγιείς εθελοντές. Κατ' αρχάς διαθέτει 100% βιοδιαθεσιμότητα ύστερα από *per os* χορήγηση, αν και μετά την απορρόφησή του φτάνει τη μέγιστη συγκέντρωση πλάσματος μέσα σε 3-5 ώρες και δεν επηρεάζεται από τη λήψη τροφής (Seltzer 2005). Σύμφωνα με μία ανάλυση μελετών, η κινητική του φαρμάκου περιγράφεται καλύτερα από ένα διδιαμερισματικό μοντέλο, ανοιχτό και γραμμικό. Σε ημερήσιες δόσεις από 1 έως 10mg το φάρμακο ακολουθεί μηδενοταξική κινητική. Ωστόσο, αν το φάρμακο λαμβάνεται από τον ασθενή καθημερινά στις θεραπευτικές δόσεις για 15-26 ημέρες το φάρμακο συσσωρεύεται σταδιακά μέχρι ένα σημείο σταθερής κατάστασης (*steady state*), όπου οι συγκεντρώσεις φαρμάκου στο αίμα παραμένουν σταθερές.

A.1.3.2 Κατανομή

Η κατανομή του φαρμάκου στο σώμα χαρακτηρίζεται από τον όγκο κατανομής. Για τη δονεπεξίλη είναι αρκετά μεγάλος (~12L/kg για δόσεις 5 και 10mg), ο οποίος ερμηνεύεται από εξωαγγειακή κατανομή και σύνδεση με πρωτεΐνες του πλάσματος. Το φάρμακο εμφανίζει επίσης 96% σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, συγκεκριμένα 75% συνδέεται με την αλβουμίνη και 21% με α_1 όξινη γλυκοπρωτεΐνη (Mihara et al. 1993). Επιπρόσθετα, το όργανο στόχος του φαρμάκου είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα για αυτόν το λόγο έχει εξεταστεί και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε συγκέντρωση φαρμάκου. Αποδείχθηκε, ότι η συγκέντρωση στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό αντιστοιχεί στο 15,7% της συγκέντρωσης φαρμάκου στο αίμα (Rogers et al. 2002).

A.1.3.3 Βιομετατροπή και απέκκριση

Η δονεπεξίλη βιομετατρέπεται στο ήπαρ, αν και μέρος της δόσης απεκκρίνεται ανεπηρέαστη (11-17%) στα ούρα. Επίσης, το φάρμακο παρουσιάζει έντονο μεταβολισμό πρώτης διόδου από το ήπαρ από το κυτόχρωμα P450, κυρίως από το ισοένζυμο CYP3A4 και σε μικρότερο βαθμό από το CYP2D6. Ωστόσο, *in vitro* μελέτες του παραγωγού υπέδειξαν ελάχιστη σύνδεση της δονεπεξίλης με το κυτόχρωμα. Οι κύριοι μεταβολίτες είναι η 6-O-δεσ-μεθυλ δονεπεξίλη, η οποία είναι η μόνη που διατηρεί δραστηριότητα όμοια με το αρχικό φάρμακο, το δονεπεξιλ-*cis*-N-οξειδιο, η 5-O-δεσ-μεθυλ δονεπεξίλη και το γλυκουρονίδιο της 5-O-δεσμεθυλ δονεπεξίλης. Διάφοροι άλλοι μεταβολίτες έχουν επίσης εντοπιστεί στα ούρα χωρίς να έχουν ταυτοποιηθεί.

Το μεγαλύτερο μέρος της δόσης απεκκρίνεται στα ούρα (23-57%), ενώ στα κόπρανα απεκκρίνεται μικρότερη ποσότητα (9-15%), επομένως η κύρια οδός απέκκρισης του φαρμάκου είναι τα νεφρά. Παράλληλα, η δόση και η συχνότητα χορήγησης φαίνεται πως δεν επηρεάζει τις παραμέτρους της κάθαρσης, ακόμα και αν οι συγκεντρώσεις στο αίμα βρίσκονται σε σταθερή κατάσταση. Ενώ λοιπόν, οι τιμές της κάθαρσης κυμαίνονται σταθερά μεταξύ 0,11 και 0,13 L/kg/h, ο χρόνος ημιζωής, που κανονικά είναι 70h, τείνει να μεγεθύνεται για τις επαναλαμβανόμενες δόσεις.

Συνοψίζοντας, οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες της δονεπεξίλης είναι αρκετά σταθερές σε διάστημα χορήγησης 21 ημερών (Dooley and Lamb 2000; Ohnishi et al. 1993).

A.1.3.4 Ειδικοί πληθυσμοί

Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε ειδικούς πληθυσμούς, όπου διερευνήθηκε κατά πόσο μεταβάλλεται η φαρμακοκινητική συμπεριφορά σε διάφορες περιπτώσεις. Για παράδειγμα, οι ηλικιωμένοι παρουσίασαν σαφώς μεγαλύτερους χρόνους ημιζωής και όγκο κατανομής. Αντίθετα, σε ασθενείς με μειωμένη νεφρική λειτουργία η συμπεριφορά δεν άλλαξε και τόσο. Η ηπατική λειτουργία φαίνεται να διαδραματίζει μεγαλύτερο ρόλο, αυξάνοντας διάφορες μεταβλητές, όπως τη c_{max} , τη c_{ss} , την $(AUC)_{0-24}$ και το χρόνο ημιζωής. Ακολούθως, το φύλο και η φυλή με τη μέχρι τώρα ανάλυση των δεδομένων δεν έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν το μεταβολισμό της δονεπεξίλης (Seltzer 2005).

A.1.3.5 Αλληλεπιδράσεις

Παρόλο που η δονεπεξίλη, όπως περιγράφηκε, συνδέεται σε μεγάλο ποσοστό με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και βιομετατρέπεται από το κυτόχρωμα σε μεγάλο βαθμό, οι αλληλεπιδράσεις της με άλλα φάρμακα είναι κλινικά ασήμαντες. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται από πολύ ασθενή σύνδεση του φαρμάκου με τα ένζυμα και τις πρωτεΐνες του πλάσματος *in vitro*. Πιο αναλυτικά, συγχορήγηση φαρμάκων όπως η φουροσεμίδα, η διγοξίνη και η βαρφαρίνη που είναι γνωστό ότι επίσης συνδέονται με πρωτεΐνες πλάσματος δεν επηρεάζονται, ούτε επηρεάζουν τη δονεπεξίλη. Ακόμη, η σιμετιδίνη και η κετοκοναζόλη φαίνεται να είναι τα μόνα φάρμακα που αυξάνουν την ποσότητα δονεπεξίλης στο σώμα του ασθενή (στατιστικά σημαντικά αυξημένες AUC και c_{max}). Αντίστροφα, η κετοκοναζόλη παραμένει ανεπηρέαστη στη συγχορήγηση, ενώ η σιμετιδίνη έχει αυξημένη c_{max} (Dooley and Lamb 2000; Seltzer 2005). Δεδομένου, ότι η δονεπεξίλη είναι ένα φάρμακο που απευθύνεται σχεδόν αποκλειστικά σε ηλικιωμένους, που ενδεχομένως να λαμβάνουν παραπάνω φάρμακα και αντιμετωπίζουν ταυτόχρονα και άλλες ασθένειες, το φαρμακοκινητικό της προφίλ την καθιστά πρώτης γραμμής θεραπεία (Barner and Gray 1998).

A.1.4. Νόσος Alzheimer

A.1.4.1 Κλινική εικόνα

Η νόσος Alzheimer ανήκει σε μία ευρύτερη κατηγορία νευροεκφυλιστικών ασθενειών που ονομάζονται άνοια και αποτελεί το 60-70% των περιπτώσεων άνοιας. Η άνοια, όπως και το Alzheimer, δεν αποτελούν φυσιολογική φθορά του κεντρικού νευρικού συστήματος λόγω του γήρατος, αλλά άτομα που ξεπερνούν την ηλικία των 65 έχουν αυξημένες πιθανότητες να εκδηλώσουν μία τέτοια ασθένεια. Η νόσος από τη στιγμή που θα εμφανίσει τα πρώτα ήπια συμπτώματα θα επιδεινώνεται σταδιακά όσο περνούν τα χρόνια, αν και με τους παρούσες θεραπευτικές προσεγγίσεις δίνεται η δυνατότητα επιβράδυνσης της εξέλιξης της ασθένειας με κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή, όχι όμως και ολοκληρωτική θεραπεία της. Το χαρακτηριστικό που καθιστά το

Alzheimer ξεχωριστό σε σύγκριση με τις άλλες μορφές άνοιας είναι η απώλεια της βραχυπρόθεσμης μνήμης, που αποτελεί και το βασικό σύμπτωμα της νόσου. Σε προχωρημένο στάδιο, φθίνουν τόσο οι νοητικές ικανότητες του ασθενή, που αδυνατεί να επικοινωνήσει με άλλους ανθρώπους και το περιβάλλον με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η ποιότητα ζωής του δραστηκά, με επιπτώσεις ακόμα και στην ψυχολογική υγεία, απαιτώντας την άμεση στήριξη και φροντίδα από συνανθρώπους του. Φυσικά, στο τέλος επέρχεται θάνατος, διότι η φυσιολογική λειτουργία ολόκληρου του οργανισμού επηρεάζεται από τα προβλήματα σωστής λειτουργίας του εγκεφάλου (Cummings 2002).

A.1.4.2 Φυσιολογία Alzheimer

Η νόσος Alzheimer χαρακτηρίζεται από εκφύλιση νευρικών εγκεφαλικών κυττάρων σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι συμβαίνει στο φυσιολογικό γήρας. Υφίστανται κάποιες βασικές υποθέσεις για τα αίτια, στα οποία οφείλεται η επιτάχυνση της εκφύλισης. Πρώτα από όλα, έχουν προσδιοριστεί γονίδια που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου, καθώς και ειδική μορφή της νόσου που κληρονομείται σε σπάνιες περιπτώσεις. Ωστόσο, στην συντριπτική πλειοψηφία των κρουσμάτων, η ασθένεια είναι σποραδική, δηλαδή παρουσιάζεται τυχαία, με παράγοντες κινδύνου να βρίσκονται υπό συζήτηση. Μία όχι και τόσο διαδεδομένη υπόθεση είναι αυτή της χολινεστεράσης. Χολινεστεράσες ονομάζουμε τα ένζυμα που χωρίζονται σε δύο τύπους: τις βουτυρυλοχολινεστεράσες και τις ακετυλοχολινεστεράσες, όπου ο πρώτος τύπος υδρολύει ταχύτερα τη βουτυρυλοχολίνη και ο δεύτερος την ακετυλοχολίνη. Η ακετυλοχολινεστεράση απαντάται στον οργανισμό μας σε 3 διαφορετικές μοριακές μορφές: την G1, G2 και G4. Η G4 εντοπίζεται στο φλοιό και τον ιππόκαμπο και απαρτίζει το 70 με 80% της προσυναπτικής ακετυλοχολινεστεράσης. Το υπόλοιπο ποσοστό είναι G1 που βρίσκεται στους μετασυναπτικούς νευρώνες, ενώ οι μύες περιέχουν κυρίως G4 και G2. Στη νόσο Alzheimer μειώνεται κατά κύριο λόγο η μορφή G4. Η υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, καθιστά τον νευροδιαβιβαστή ανενεργό, ώστε να μην μπορεί να συνδεθεί με τους μουςκαρινικούς υποδοχείς τους. Για την ακριβή αιτιολογία της ασθένειας, ωστόσο υπάρχουν κάποιες υποθέσεις και θα σχολιαστούν παρακάτω οι επικρατέστερες.

A.1.4.3 Χολινεργική υπόθεση

Η χολινεργική υπόθεση υποστηρίζει, ότι η ασθένεια οφείλεται στη μείωση ακετυλοχολίνης στο συναπτικό χάσμα. Αυτή η υπόθεση βρίσκει τις απαρχές της στην ανακάλυψη των αναστολέων της χολινεστεράσης και τη χρησιμότητά τους στη θεραπεία τους Alzheimer. Σήμερα, όμως, αυτή η θεωρία έχει εγκαταληφθεί, αφού έχει δειχθεί ότι η νοητική κατάπτωση επηρεάζεται μόνο έμμεσα από το χολινεργικό σύστημα και δεν ευθύνεται για την εκφύλιση νευρικών κυττάρων. Αργότερα, με τις νέες μεθόδους διάγνωσης και μελέτης του εγκεφάλου διατυπώθηκαν νέες υποθέσεις με τις πρωτεΐνες tau και τις αμυλοειδείς πλάκες να είναι οι επικρατέστερες (Francis et al. 1999).

A.1.4.4 Αμυλοειδής υπόθεση

Κύριος ύποπτος για την πρόκληση της ασθένειας θεωρείται σήμερα ένα μικροσκοπικό θραύσμα εγκεφαλικής πρωτεΐνης, που ονομάζεται βήτα-αμυλοειδής. Πρόκειται για μία κολλώδη ουσία που συναθροίζεται στον εγκέφαλο εμποδίζοντας την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, καταστρέφοντάς τα. Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη ποια ακριβώς μορφή των βήτα-αμυλοειδών είναι τοξική για τα κύτταρα.

Οι βήτα-αμυλοειδείς πρωτεΐνες αποτελούν κομμάτι μιας μεγαλύτερης που λέγεται «αμυλοειδής προκατόχος πρωτεΐνης» (amyloid precursor protein, APP). Η APP απαντάται φυσιολογικά στα εγκεφαλικά κύτταρα και όταν ενεργοποιείται κόβεται σε μικρότερα κομμάτια και ένα από αυτά είναι οι βήτα-αμυλοειδείς πρωτεΐνες. Οι βήτα-αμυλοειδείς λόγω της κολλώδους ιδιότητάς τους συσσωματώνονται συνεχώς σχηματίζοντας τελικά αμυλοειδείς πλάκες. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται εσφαλμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών και η νόσος έχει συνδεθεί άρρηκτα με αυτό κατατάσσοντάς την στις πρωτεοπάθειες. Σύμφωνα με την υπόθεση, όχι μόνο διακόπτεται η επικοινωνία των κυττάρων από τα συσσωματώματα, αλλά ενεργοποιούνται και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού για να δημιουργήσουν φλεγμονή. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται κατά κύριο λόγο σε γενετικές μελέτες σε ανθρώπους και ποντίκια. Έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια που συνδέονται με την εμφάνιση της νόσου και το σχηματισμό αμυλοειδών πλακών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν μάλιστα τα άτομα με σύνδρομο Down, τα οποία αποκτούν αμυλοειδείς πλάκες και συμπτώματα Alzheimer από την ηλικία των 40. Η συσχέτιση αυτή οφείλεται στην παρουσία του εν λόγω γονιδίου στο χρωμόσωμα 21, άρα εκφράζεται περισσότερο στην περίπτωση της τρισωμίας (Hardy 2009).

Μέχρι σήμερα έχουν αποπειραθεί διάφοροι επιστήμονες να βασίσουν μία καινούργια θεραπεία για το Alzheimer στοχεύοντας τις βήτα-αμυλοειδείς πρωτεΐνες και τις πλάκες που σχηματίζουν χωρίς επιτυχή αποτελέσματα. Είμαστε πια σίγουροι, ότι η παθολογία της νόσου είναι αρκετά πιο περίπλοκη από όσο γνωρίζουμε (Selkoe and Hardy 2016)

A.1.4.5 Υπόθεση Tau

Οι πρωτεΐνες tau λειτουργούν στη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων και βρίσκονται κυρίως σε κύτταρα του νευρικού συστήματος. Σε αυτήν την υπόθεση, οι πρωτεΐνες tau υπερφωσφορυλιώνονται και αρχίζουν να ενώνονται με άλλες tau σχηματίζοντας ένα νευροϊνώδες πλέγμα. Κατά αυτόν τον τρόπο διασπώνται οι μικροσωληνίσκοι διαλύοντας των κυτταρικό σκελετό μέχρι να καταρρεύσει. Τελικά, δυσλειτουργεί η νευρική επικοινωνία και αργότερα έχουμε κυτταρικό θάνατο (Trojanowski and Lee 2005).

A.1.4.6 Άλλες υποθέσεις

Η γλουταμινική υπόθεση (Maragos et al. 1987), η νευραγγειακή υπόθεση, η ομοιόσταση βιομετάλλων, η ρύπανση της ατμόσφαιρας, η δυσλειτουργία ολιγοδενδριτών, λοιμώξεις από σπιροχέτες και η ρετρογένεση είναι μερικές επιπλέον υποθέσεις που έχουν προταθεί από την επιστημονική κοινότητα για την εξήγηση της νόσου. Καμία επαρκή απόδειξη υφίσταται στην παρούσα περίοδο για την ακριβή

στοχοποίηση των υπεύθυνων παραγόντων για την ατροφία των νευρικών κυττάρων, αλλά πιθανότερα να πρόκειται για συμβολή παραγόντων που οδηγούν τελικά στην εξέλιξη του Alzheimer.

A.1.5. Φαρμακολογικά χαρακτηριστικά

Όπως αναλυτικά παρατέθηκε ανωτέρω, η δονεπεξίλη δεν πρωτοπόρησε στη φαρμακολογική της δράση, καθώς δεν αποτελεί τον πρώτο παράγοντα που αναστέλλει το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση. Ωστόσο, έχει βελτιωμένα χαρακτηριστικά ασφάλειας σε σχέση με τους προκατόχους της. Στη νόσο του Alzheimer, ειδικά, τίθεται το ερώτημα της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων αυτών στη θεραπεία της ασθένειας, διότι με τον παραπάνω μηχανισμό δράσης καταφέρνουν μόνο να απαλύνουν τα συμπτώματα της νόσου και όχι να επιβραδύνουν την εξέλιξή της.

A.1.5.1 Μηχανισμός δράσης

Η δονεπεξίλη ανήκει στους αναστρέψιμους αναστολείς χολινεστεράσης. Πιο ειδικά, έχει διαπιστωθεί, ότι η αναστολή γίνεται περισσότερο εκλεκτικά για την ακετυλοχολινεστεράση του εγκεφάλου έναντι της βουτυρυλοχολινεστεράσης (Stahl 2000). Η επιμήκης μοριακή δομή του φαρμάκου του επιτρέπει να παρεμβάλλεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλληλεπιδρώντας με την ανιονική κοιλότητα τόσο στο κάτω μέρος όσο και με το περιφερειακό μέρος εισόδου. Η εκλεκτικότητα οφείλεται πιθανόν στην απουσία της τρυπτοφάνης²⁷⁹ και της φαινυλαλανίνης³³⁰ στη βουτυρυλοχολινεστεράση που ενισχύουν της δυνάμεις van der Waals των αρωματικών δακτυλίων. Η εκλεκτικότητα δεν φαίνεται να προσφέρει κάποιο πλεονέκτημα έναντι μη εκλεκτικών αναστολέων στο τελικό κλινικό αποτέλεσμα ούτε να μειώνει τις ανεπιθύμητες ενέργειες σχετικές με την υπερβολική χολινεργική διέγερση στο κεντρικό νευρικό σύστημα και την περιφέρεια. Έπειτα, η δονεπεξίλη δεν έχει παρουσιάσει κάποια προτίμηση ως προς κάποια συγκεκριμένη μορφή ακετυλοχολινεστεράσης (Enz et al. 1993). Η δόση χορήγησης και το ποσοστό αναστολής του ενζύμου έχουν συσχετιστεί θετικά, επομένως αύξηση της δόσης προσφέρει περισσότερα θεραπευτικά αποτελέσματα εντείνοντας όμως έτσι τις ανεπιθύμητες ενέργειες (Cutler et al. 2009).

Στη θεραπευτική δράση της δονεπεξίλης φαίνεται να συμβάλλει ένας νέος υποδοχέας ο σ_1 . Σε μία μελέτη (Maurice et al. 2006) *in vitro* πειραμάτων βρέθηκε υψηλή σύνδεση με σ_1 υποδοχείς και χαμηλή με υποδοχείς NMDA. Με βάση το παραπάνω εύρημα μπορούμε να συμπεράνουμε, ότι η πιθανή νευροπροστατευτική δράση της δονεπεξίλης οφείλεται στον σ_1 υποδοχέα, ο οποίος είναι γνωστό ότι προστατεύει από τις αμυλοειδείς πρωτεΐνες και τα γλουταμινικά ιόντα.

Σε γενικές γραμμές, η δράση της δονεπεξίλης στο Alzheimer, ανακαλύπτεται με τις νέες εξελίξεις, ότι είναι αρκετά περίπλοκη, επειδή εμπλέκεται σχεδόν σε όλα τα στάδια της παθολογίας του (Jacobson and Sabbagh 2008).

A.1.5.2 Φαρμακοδυναμική

Χρειάζονται μόλις 4h μετά την χορήγηση της δόσης μέχρι να παρατηρηθεί η μέγιστη ανασταλτική ικανότητα στην ακετυλοχολινεστεράση, που βρίσκεται εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η μέγιστη αναστολή που μετρήθηκε (E_{max}), είχε εύρος 33 με 35% που συσχετίζεται άμεσα με τις συγκεντρώσεις πλάσματος. Με ίδιο χρόνο μέγιστης συγγέντρωσης (t_{max}) οι διάφορες διαφορετικές θεραπευτικές δόσεις οδηγούν σε διαφορετικές μέγιστες συγκεντρώσεις, οι οποίες έχουν συσχετιστεί γραμμικά και με την αναστολή του ενζύμου. Επιπλέον, λόγω της συσσώρευσης επαναλαμβανόμενων δόσεων η φαρμακοδυναμική δράση μπορεί μέχρι και να διπλασιαστεί (70%) μέχρι τη σταθερή κατάσταση. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι και τα δύο εναντιομερή έχουν δράση για το ένζυμο με την R-μορφή να είναι πιο ισχυρή σύμφωνα με *in vitro* πειράματα σε ακετυλοχολινεστεράση εγκεφάλου ποντικών (Wilkinson 1999).

A.1.5.3 Κλινική χρησιμότητα στο Alzheimer

Η αξιολόγηση ενός φαρμάκου για τη θεραπεία μίας νευρολογικής και ψυχιατρικής ασθένειας δεν είναι εύκολη υπόθεση. Οι παλιότερες έρευνες στην αποτελεσματικότητα του φαρμάκου σε ασθενείς ήταν ελλιπείς, επομένως τα δεδομένα τους δεν μπορούν να ληφθούν υπόψη. Σημεία, όπως η επιβάρυνση του φροντιστή, η συμμόρφωση ή η ψυχιατρική και συμπεριφορική κλιμάκωση δεν μελετήθηκαν επαρκώς, ώσπου να θεσπίσει ο οργανισμός τροφών και φαρμάκων της Αμερικής (FDA) οδηγίες αξιολόγησης για φάρμακα κατά της άνοιας. Η donepezil βελτιώνει τις νοητικές λειτουργίες και συμπεριφορές των ασθενών με Alzheimer σε σημαντικό βαθμό γεγονός που έχει επαληθευθεί από μετρήσεις με διάφορους δείκτες και μεθόδους, αποτελεί έτσι ένα από τα πιο χρήσιμα φάρμακα στη θεραπεία του Alzheimer. Το πεδίο της νόσου δεν έχει κατανοηθεί ακόμα πλήρως και η εκτίμηση των πλεονεκτημάτων της θεραπείας για τον ασθενή και τους γύρω του είναι αμφιλεγόμενη (Harry and Zakzanis 2005), ιδιαίτερα όταν πρόκειται για μακροπρόθεσμη θεραπεία, ωστόσο βασιζόμενοι στα μέχρι τώρα δεδομένα η επιστήμη τάσσεται υπέρ της χορήγησης του φαρμάκου (Jelic and Darreh-Shori 2010).

Ένας ασθενής που πάσχει από αυτή τη νόσο έχει να αντιμετωπίσει μία σειρά από εμπόδια στην καθημερινή του ζωή. Καταρχάς αποκτά απώλεια μνήμης, η οποία επιδεινώνεται με την εξέλιξη της ασθένειας. Η επίλυση προβλημάτων και ο προγραμματισμός στην καθημερινότητα γίνεται μία πρόκληση, ενώ ο ασθενής δυσκολεύεται να βγάλει σε πέρας εργασίες με τις οποίες μέχρι πρότινος δεν είχε κανένα πρόβλημα. Ακόμη, επικρατεί μία σύγχυση για το χρόνο και το χώρο, δυσκολία ομιλίας και έκφρασης. Σταδιακά, ο ασθενής αρχίζει και απομακρύνεται από την εργασία και οποιαδήποτε άλλη δραστηριότητα και αργότερα παρατηρείται αλλαγή στο χαρακτήρα και στη συμπεριφορά. Όλα αυτά είναι μερικά από τα συμπτώματα, τα οποία η donepezil μπορεί και χαλιναγωγεί (Patil Sonali et al. 2015).

A.1.5.4 Άλλες κλινικές χρήσεις

Η donepezil έχει ελεγχθεί σε διάφορες νοητικές διαταραχές, κυρίως στις υπόλοιπες μορφές άνοιας, όπως σωματία Lewy (Rojas-Fernandez 2001) και αγγειακή

άνοια (Malouf and Birks 2004). Αν και η μοναδική ένδειξη του φαρμάκου μέχρι στιγμής είναι για το Alzheimer, η κλινική του χρησιμότητα στη διαχείριση ασθενειών που περιλαμβάνουν συμπτώματα προβληματικής συμπεριφοράς, υπερκινητικότητας και κοινωνικής επικοινωνίας έχει συζητηθεί. Ακόμα και στο Parkinson έχει την ικανότητα να βελτιώσει τη θεραπεία, γεγονός που καθιστά τη δονεπεξίλη πολλά υποσχόμενο δραστικό για τα αποτελέσματα που μπορεί να προσφέρει στο μέλλον (Bergman and Lerner 2002)

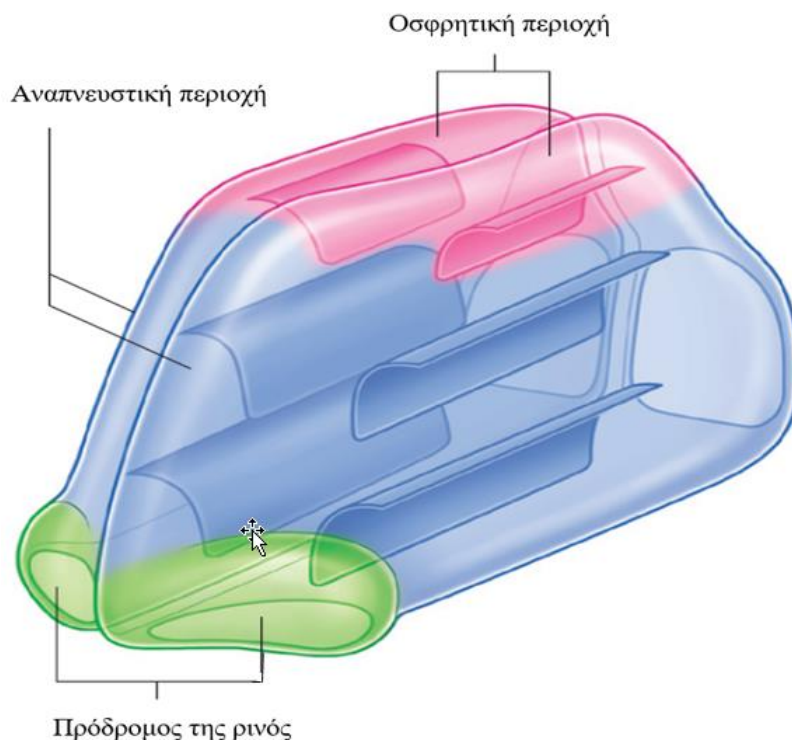
A.1.5.6 Ασφάλεια και ανεπιθύμητα

Η αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης ακετυλοχολίνης στο συναπτικό χάσμα, με αποτέλεσμα ο συγκεκριμένος νευροδιαβιβαστής του παρασυμπαθητικού συστήματος να διεγείρει πιο πολλούς μουσκαρινικούς υποδοχείς. Είναι εύλογο, λοιπόν, οι ανεπιθύμητες ενέργειες της χορήγησης δονεπεξίλης να συνδέονται με υπερδιέγερση του παρασυμπαθητικού συστήματος. Η γαστρεντερική παλινδρόμηση και έκκριση υδροχλωρικού οξέος στο στομάχι είναι οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες, ενώ η ναυτία, η διάρροια, οι μυϊκές κράμπες, η κόπωση και ο εμετός είναι λιγότερα συχνές. Η σοβαρότητά τους είναι είτε ήπια είτε μέτρια και τείνουν να παρέρχονται όσο συνεχίζεται η λήψη του φαρμάκου. Η βραδυκαρδία φαίνεται να είναι μία πιθανή ανεπιθύμητη ενέργεια, ωστόσο δεν έχει αποδειχθεί αν είναι επικίνδυνη, εφόσον έχει μόνο μικρή δράση. Παρόλα αυτά, προσοχή χρειάζεται σε ασθενείς φλεβοκομβικό σύνδρομο όταν θα χορηγείται δονεπεξίλη. Εξαιτίας του μεγάλου χρόνου t_{max} της δονεπεξίλης, κάποιοι ασθενείς ενδέχεται να βιώσουν έντονα όνειρα και αϋπνία, αλλά μπορεί να αντιμετωπιστεί εύκολα με τη λήψη του φαρμάκου πριν τον ύπνο (Seltzer 2005). Υπάρχουν μερικές σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που έχουν παρουσιαστεί σε κάποιους ασθενείς, όμως δεν έχει αποσαφηνιστεί αν οφείλονται στην ίδια την ασθένεια ή στο φάρμακο. Τελικά, όλες οι ανεπιθύμητες ενέργειες σχετίζονται με τη δόση (Dooley and Lamb 2000).

Με LD₅₀ σε αρουραίους 32,6 mg/kg μετά από του στόματος χορήγηση, υπερδοσολογία έχουμε στην δεκαπλάσια της αρχικής δόσης. Η μειωμένη ένταση και συχνότητα ανεπιθύμητων ενεργειών γενικότερα οφείλεται στην προτίμηση για σύνδεση με την ακετυλοχολινεστεράση έναντι της βουτυρυλοχολινεστεράσης. Σε κατάσταση τοξικότητας παρουσιάζονται έντονη ναυτία και εμετός, βραδυκαρδία, υπόταση, κρίσεις, εφίδρωση, μυϊκή αδυναμία, δύσπνοια και κατάρρευση. Ως αντίδοτα μπορούν να χορηγηθούν χολινεργικοί αναστολείς, όπως η ατροπίνη, και οι ασθενείς ανταποκρίνονται επιτυχώς στη διαχείριση των συμπτωμάτων χωρίς κάποιο ιδιαίτερο πρόβλημα (Shepherd et al. 1999).

A.2. Ρινική κοιλότητα

A.2.1. Περιοχές ρινικής κοιλότητας



Εικόνα 3: περιοχές της ρινικής κοιλότητας.

Στο εσωτερικό της η ρινική κοιλότητα μπορεί να χωριστεί σε 3 διακριτές περιοχές (βλ. εικόνα 3). Στο εσωτερικό της εξωτερικής μύτης συναντάται ο πρόδρομος της ρινός που περιβάλλεται από δέρμα με τρίχες. Όσο προχωράει προς τα μέσα φτάνει στην αναπνευστική περιοχή, η οποία είναι η μεγαλύτερη, διαθέτει μία πλούσια νευραγγειακή παροχέτευση και καλύπτεται από το αναπνευστικό επιθήλιο αποτελούμενο κυρίως από βλεφαριδοφόρα και βλεννώδη κύτταρα. Η αναπνευστική περιοχή συνορεύει με τον πρόδρομο της ρινός μπροστά, με το ρινοφάρυγγα πίσω και με την οσφρητική περιοχή στην κορυφή του. Η οσφρητική περιοχή βρίσκεται στο πάνω μέρος των ρινικών κοιλοτήτων και καλύπτεται από οσφρητικό επιθήλιο με οσφρητικούς υποδοχείς.

Οι περιοχές αυτές λειτουργούν συλλογικά ως όργανα όχι μόνο του αναπνευστικού, αλλά και του οσφρητικού συστήματος. Ο αέρας καθώς εισέρχεται από τον πρόδρομο, φιλτράρεται με τις τρίχες και τη βλέννη και ρυθμίζεται η θερμοκρασία και η υγρασία χάρη στην έντονη παροχή αίματος (Drake 2019).

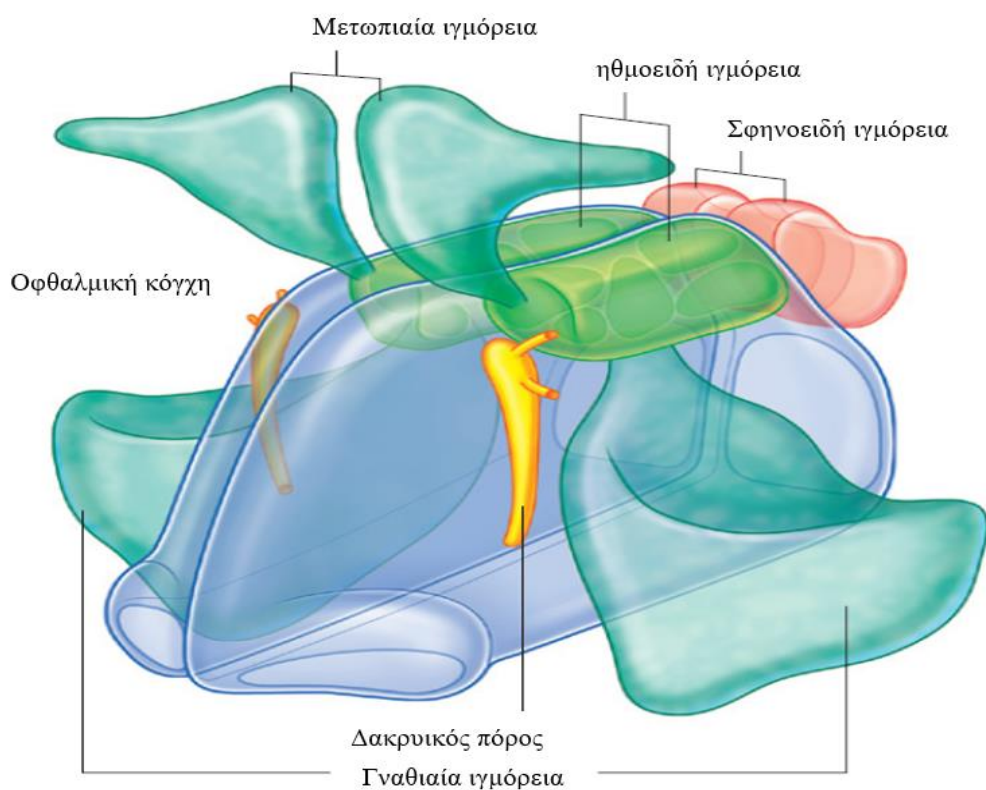
Η ρινική κοιλότητα αποτελεί τον βασικό φραγμό στην είσοδο σωματιδίων στο αναπνευστικό σύστημα. Μεγάλα σωματίδια που ενδέχεται να φράξουν την αναπνοή αποτρέπονται από το να εισέλθουν. Γενικά, σωματίδια που έχουν αεροδυναμική διάμετρο μεγαλύτερη από 10 μm εναποτίθενται στην ρινοφαρυγγική περιοχή (άνω διόδους αεραγωγού - μύτη, ρινική κοιλότητα και λαιμός) σε μεγάλο βαθμό με πρόσκρουση. Αυτός ο μηχανισμός είναι εμφανής λόγω της υψηλής ταχύτητας του αέρα και των πολλών στροφών στον ρινοφαρυγγικό αέρα. Οι αλλαγές στην κατεύθυνση της ροής του αέρα προκαλούν πολλά σωματίδια να χτυπήσουν τα τοιχώματα και έτσι τα

σωματίδια εναποτίθενται ή εγκατασταθούν σε αυτήν την περιοχή. Μικρότερα σωματίδια με αεροδυναμική διάμετρο περίπου 0,003 έως 5 μm εναποτίθενται στις τραχειοβρογχικές και κυψελιδικές περιοχές. Η καθίζηση είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος, διότι σε αυτό το σημείο ο αέρας έχει επιβραδυνθεί αρκετά ώστε τα σωματίδια να κατακαθίσουν. Όταν ο αέρας φτάνει στην κυψελιδική περιοχή (στην κάτω περιοχή των πνευμόνων), έχει επιβραδυνθεί ακόμη περισσότερο. Ο αέρας είναι ουσιαστικά ήρεμος εδώ. Τα σωματίδια που φτάνουν τόσο μακριά στους πνεύμονες είναι συνήθως 0,5 μm ή μικρότερα (Heyder 2004).

A.2.1.1. Εξωτερική μύτη

Η εξωτερική μύτη επεκτείνει τις ρινικές κοιλότητες στο μπροστινό μέρος του προσώπου και τα ρουθούνια είναι έτσι τοποθετημένα, ώστε να κατευθύνονται προς τα κάτω. Το σχήμα της είναι πυραμιδικό έχοντας την κορυφή του στο εμπρόσθιο μέρος. Η ανώτερη γωνία που σχηματίζεται ενώνει το μέτωπο με τη μύτη και βρίσκεται ανάμεσα στις οφθαλμικές κόγχες. Η δομή της μύτης χτίζεται από χόνδρους κυρίως, οι οποίοι περιβάλλουν τις ρινικές κοιλότητες με το ρινικό διάφραγμα να τις διαχωρίζει σε δύο (Drake 2019).

A.2.1.2. Ιγμόρεια

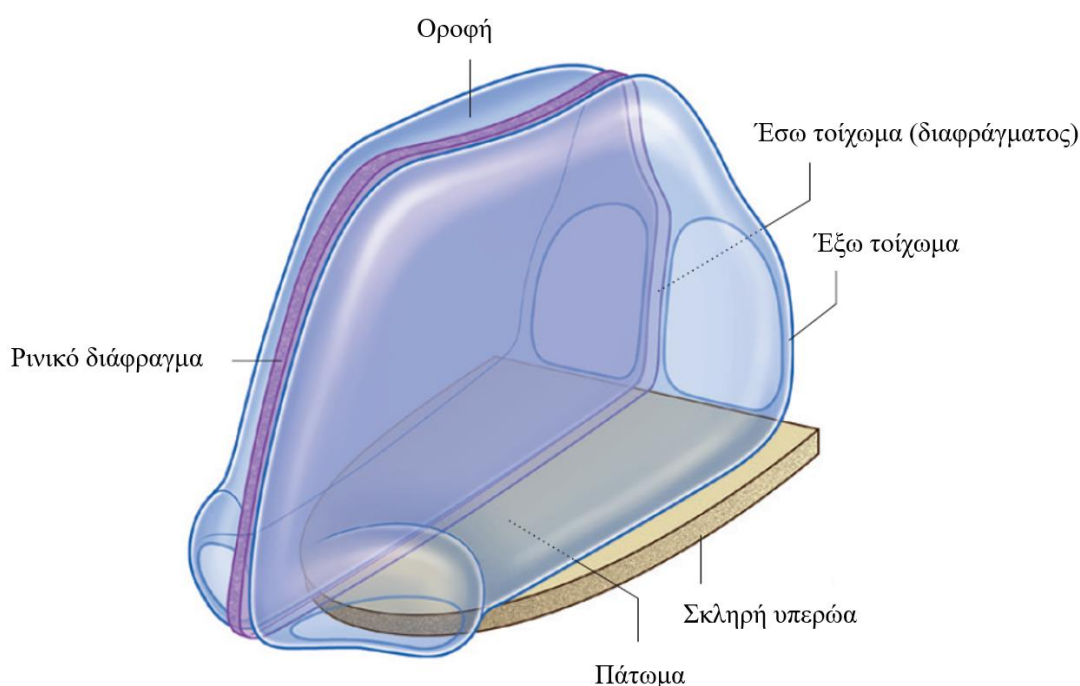


Εικόνα 4: Ιγμόρεια.

Οι ρινικοί κόλποι ή ιγμόρεια αποτελούν κοιλότητες γεμάτες αέρα περιφερικά της μύτης. Απαντώνται σε ζευγάρια και το κάθε ζευγάρι έχει ονομαστεί με βάση το κόκαλο,

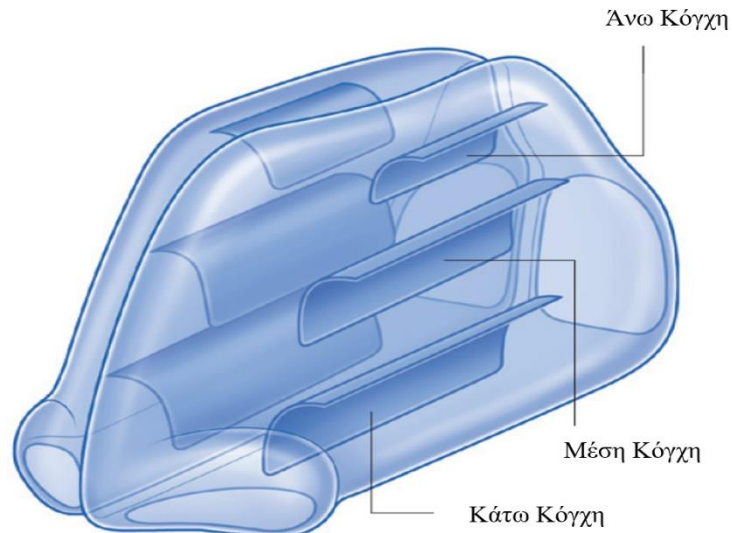
εντός του οποίου βρίσκεται. Έτσι, έχει τα σφηνοειδή, ηθμοειδή, μετωπιαία και γναθιαία ιγμόρεια. Τα άνω γναθιαία είναι τα μεγαλύτερα ιγμόρεια και εντοπίζονται κάτω από τους οφθαλμούς, τα μετωπιαία πάνω από τους οφθαλμούς, τα ηθμοειδή ανάμεσα στους οφθαλμούς, που αποτελούνται από ξεχωριστούς αεροθαλάμους και τέλος τα σφηνοειδή πίσω από τους οφθαλμούς. Τα ιγμόρεια σαν δομές διαγράφουν το πρόσωπο σε σχήμα Χ μεταξύ των φρυδιών και των ζυγωματικών. Οι κενές αυτές κοιλότητες συνορεύουν όλες με το αναπνευστικό σύστημα μέσω τους αναπνευστικού επιθηλίου. Η χρησιμότητά τους ως ανθρώπινα όργανα δεν είναι πλήρως κατανοητή μέχρι σήμερα, ωστόσο το πιθανότερο είναι να συμβάλλουν με κάποιον τρόπο στη λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος (Keir 2009).

A.2.1.3. Τοιχώματα, κόγχες και πόροι



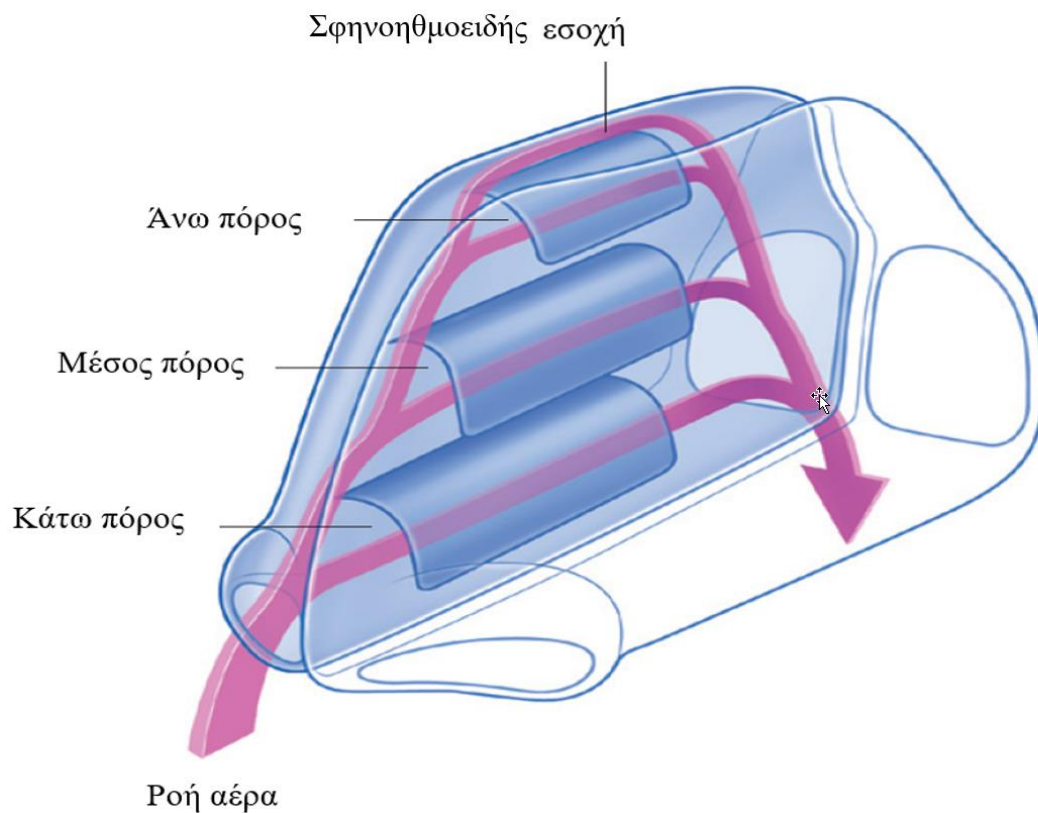
Εικόνα 5: Οριοθέτηση της ρινικής κοιλότητας.

Οροφή, έδαφος, έξω και έσω τοίχωμα οριοθετούν την περιοχή της ρινικής κοιλότητας. Η οροφή βρίσκεται στην οσφρητική περιοχή, όπου μέρη του ηθμοειδούς, σφηνοειδούς και μετωπιαίου οστού χωρίζουν την κρανιακή από τη ρινική κοιλότητα. Στο πάτωμα υπάρχει η σκληρή υπερώα, ενώ στο έσω τοίχωμα το ρινικό διάφραγμα που διαχωρίζει τις δύο ρινικές κοιλότητες.



Εικόνα 6: Ρινικές κόγχες.

Από την άλλη, το έξω τοίχωμα αποτελεί μία πιο σύνθετη δομή. Από αυτό εκφύονται τρεις κόγχες, η μία πάνω από την άλλη σε σειρά με κατεύθυνση προς τα κάτω σχηματίζοντας επιπλέον κοιλότητες σαν κεραμίδια. Αυτοί οι σχηματισμοί εξυπηρετούν στην αύξηση της επιφάνειας του ρινικού βλεννογόνου και τη διάνοιξη πολλαπλών δρόμων που μπορεί να ακολουθήσει η ροή του αέρα κατά την εισπνοή και την εκπνοή. Πιο συγκεκριμένα, έχουμε την άνω, μέση και κάτω κόγχη που επιτρέπουν σε 4 κανάλια να διασχίσουν την ρινική κοιλότητα (βλ. εικόνα 6 και 7).



Εικόνα 7: Ρινικοί Πόροι

- Μεταξύ εδάφους και κάτω κόγχης σχηματίζεται το πρώτο κανάλι, ο κάτω ρινικός πόρος.

- Μεταξύ της κάτω και μέσης κόγχης βρίσκεται ο μέσος ρινικός πόρος.
- Μεταξύ της μέσης και της άνω κόγχης βρίσκεται ο άνω ρινικός πόρος.
- Μεταξύ της άνω κόγχης και της οροφής υπάρχει η σφηνοηθμοειδής εσοχή (Moore et al. 2015).

A.2.1.4. Όσφρηση

Επειδή η όσφρηση αποτελεί μία τόσο θεμελιώδη φυσιολογική αίσθηση στα ζώα και στον άνθρωπο, φαίνεται λογικό, ότι η φυλογενετική ανάπτυξη της μύτης έχει επηρεαστεί από την ανάγκη βελτιστοποίησης και θωράκισης του οσφρητικού οργάνου. Η εξέλιξη της ρινικής κοιλότητας στα περισσότερα θηλαστικά, με εξαίρεση τον άνθρωπο και κάποιους ανώτερους πιθήκους, αντικατοπτρίζεται από τις απαιτήσεις για τη βασική λειτουργία της ως οσφρητικό όργανο. Τα σαρκοφάγα και φυτοφάγα ζώα έχουν αναπτύξει σύνθετες ρινικές κοιλότητες με μεγάλες περιοχές για όσφρηση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα λόγω της διαφοροποίησης στη βασική λειτουργία, κάποια ζώα να αναπνέουν υποχρεωτικά μόνο από τη μύτη εξαιτίας στη στενή διάταξη της επιγλωττίδας με την υπερώα, ενώ ο άνθρωπος μπορεί να αναπνέει και ρινικά και στοματορινικά (*Nasal Tumors in Animals and Man Vol. I* 2017).

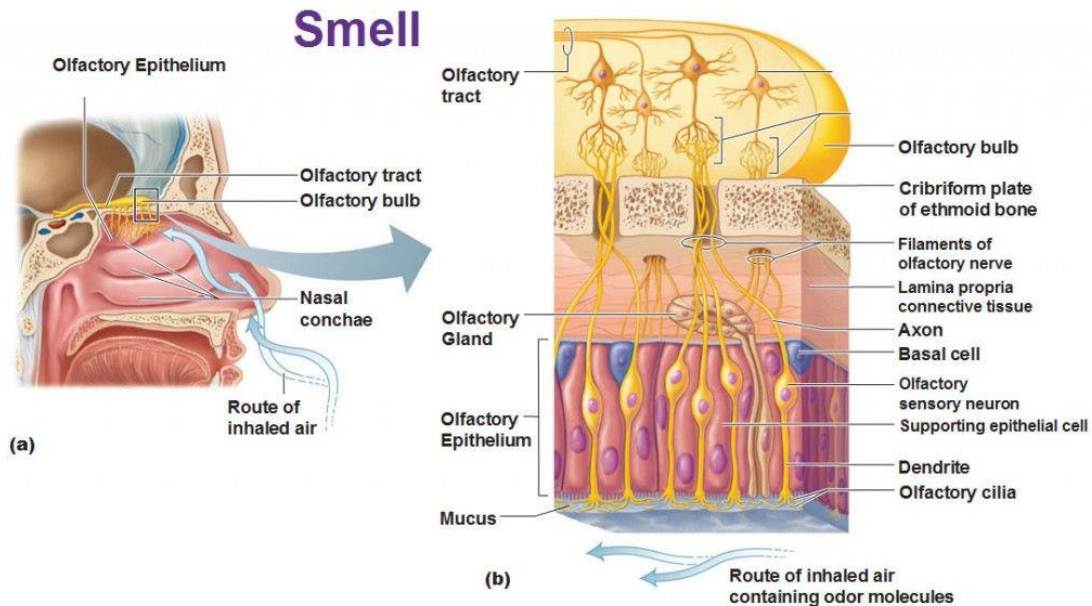
Το οσφρητικό σύστημα στον άνθρωπο είναι ικανό να διακρίνει όχι μόνο πάνω από ένα τρισεκατομμύριο μοναδικές οσμές (Bushdid et al. 2014), αλλά μπορεί επιπλέον να προσδιορίσει την κατεύθυνση προέλευσης της οσμής με βάση την καθυστέρηση εισροής της οσμής στα δύο ρουθούνια (Meister 2015). Η όσφρηση αποτελεί μία χημική αίσθηση που επιτρέπει στον άνθρωπο να ανιχνεύει τροφή, φερομόνες και κινδύνους, και σε συνδυασμό με τη γεύση να γεύεται. Ο μηχανισμός, με τον οποίο λειτουργεί η αίσθηση αυτή δεν είναι πλήρως κατανοητός. Το ήδη γνωστό είναι ότι τα μόρια μεταφέρονται με τον αέρα στην οσφρητική περιοχή, όπου διεγείρουν ειδικούς υποδοχείς και στέλνουν σήμα που συλλέγεται στο οσφρητικό σπείραμα και μέσω του οσφρητικού βολβού διασπείρεται σε διάφορα σημεία του εγκεφάλου μέχρι να αντιληφθούμε την οσμή, τη μνήμη ή το συναίσθημα (Barrett 2014).

A.2.1.5. Ρινικός βλεννογόνος

Η ρινική κοιλότητα καλύπτεται από 5 μορφές επιθηλίων.

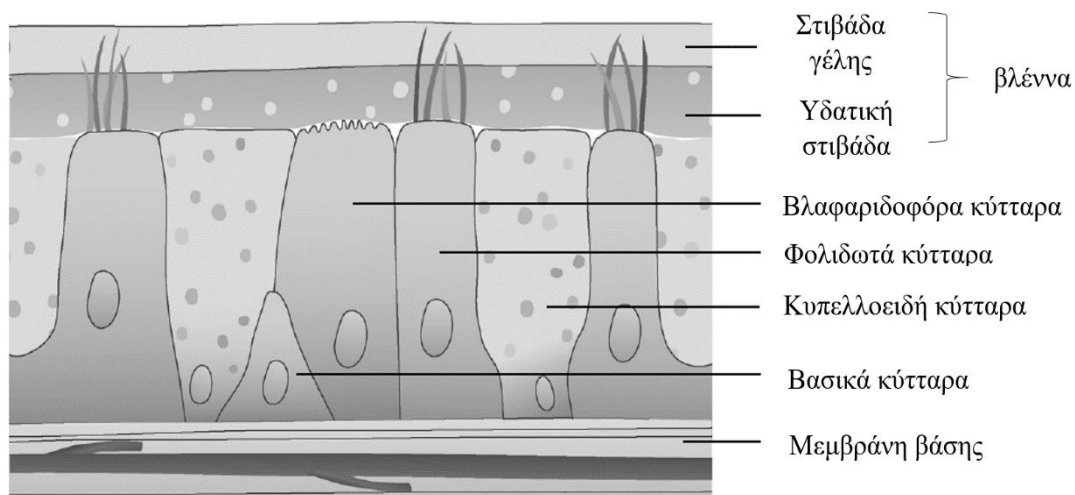
1. Ο πρόδρομος της ρινός, που αναλύθηκε και νωρίτερα, επιστρώνεται από μία κεράτινη στοιβάδα, ένα πολυστρωματώδες και φολιδωτό επιθήλιο. Το συγκεκριμένο επιθήλιο είναι πλούσιο σε ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες καθώς και σε τρίχες. Φολιδωτά επιθήλια σε άλλα μέρη του σώματος μοιάζουν με τη μόνη διαφορά ότι δε διαθέτουν τρίχες. Λειτουργία της περιοχής αυτής είναι να έρχεται σε επαφή με το περιβάλλον και να υποδέχεται τον αέρα κατά την εισπνοή και να τον προετοιμάζει θερμαίνοντας, αυξάνοντας την υγρασία και φιλτράροντάς τον από μικρόβια και σωματίδια.
2. Τα ιγμόρεια διαχωρίζονται από το αναπνευστικό σύστημα με ένα λεπτό επιθήλιο. Το επιθήλιο αυτό περιέχει λιγότερους αδένες, είναι πιο λεπτό, λιγότερο εξειδικευμένο, γραμμωτό και βλεφαριδοφόρο. Σε αυτό το σημείο είναι πιο εύκολη η πρόσβαση μικροοργανισμών.

3. Η μεταβατική περιοχή βρίσκεται στα σύνορα ρινικής κοιλότητας και τραχείας. Αυτό το επιθήλιο είναι δομημένο σε στρώματα, φολιδωτό και χωρίς κερατίνη. Η περιοχή χαρακτηρίζεται και ως αγωγός στο κατώτερο αναπνευστικό λειτουργώντας προστατευτικά, εφόσον διαθέτει λεμφοειδή συσσωματώματα.
4. Το οσφρητικό επιθήλιο βρίσκεται στην οροφή της κοιλότητας και καταλαμβάνει μόλις 1cm^2 . Μόνο σε αυτή την μικρή επιφάνεια λαμβάνει χώρα η αντίληψη της όσφρησης ουσιών.



Εικόνα 8: Οσφρητική περιοχή μακρο- και μικροσκοπικά

5. Το αναπνευστικό επιθήλιο είναι και το μεγαλύτερο καλύπτοντας 20cm^2 (Jafek 1983).



Εικόνα 9: Επιθηλιακά κύτταρα του ρινικού βλεννογόνου.

Από το αναπνευστικό επιθήλιο της ρινικής κοιλότητας 4 κύρια είδη επιφανειακών κυττάρων έχουν ταυτοποιηθεί:

1. Βλεφαριδοφόρα κύτταρα: Αυτά τα κύτταρα παράγουν 100-150 βλεφαρίδες ανά κύτταρο μήκους 5μm και διαμέτρου 0,2μm. Πλήρως αναπτυγμένα βλεφαριδοφόρα κύτταρα διαθέτουν και μικρολάχνες ανάμεσα στις βλεφαρίδες μήκους 1,5μm και διαμέτρου 0,08μm.
2. Κυπελλοειδή κύτταρα: Στην επιφάνειά τους αυτά τα κύτταρα εκθέτουν μικρολάχνες ποικίλου μεγέθους. Από αυτά τα κύτταρα εκλύεται η βλέννα μέσα από κρατήρες που δημιουργούνται στην επιφάνεια του κυττάρου. Η συσσώρευση βλέννας οδηγεί τελικά στην μείωση των μικρολάχνων και την κατάρρευση του κυττάρου που αρχίζει και εξέρχεται πάνω από τα υπόλοιπα κύτταρα του επιθηλίου.
3. Φολιδωτά κύτταρα: Είναι επίπεδα στην επιφάνειά τους και έχουν διακριτά σύνορα με τα υπόλοιπα κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα ανυψώνονται σταδιακά μέχρι που αποκόπτονται (Boysen and Reith 1982).
4. Βασικά κύτταρα: Βλαστοκύτταρα στη βάση της μεμβράνης που πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε άλλα ήδη κυττάρων.

Η μορφολογία του ρινικού βλεννογόνου είναι ευμετάβλητη και αποτελείται από διάφορους συνδυασμούς των ανωτέρων κυττάρων. Η ηλικία, το φύλο, καθώς και το περιβάλλον, στο οποίο εκτίθεται ο κάθε άνθρωπος μπορεί να παίζει μεγάλο ρόλο στο πώς κατανέμονται τα διάφορα είδη κυττάρων στην επιφάνεια των διάφορων επιθηλίων.

Στην κάτω πλευρά της μεμβράνης του βλεννογόνου βρίσκεται το χόριο, που αποτελεί ένα μέρος γεμάτο από αιμοφόρα αγγεία και νεύρα. Τα νευρικά κύτταρα σε αυτήν την περιοχή είναι πλούσια σε αδρενεργικούς υποδοχείς, άρα ελέγχονται κυρίως από το συμπαθητικό σύστημα. Η διέγερση του παρασυμπαθητικού συστήματος αυξάνει τη ρινόρροια και την αιματική ροή, όμως η διέγερση του συμπαθητικού μειώνει την αιματική ροή μέσω της αγγειοδιαστολής (Ugwoke et al. 2001). Πολλά ρινικά σκευάσματα της αγοράς στοχεύουν αγωνιστικά τους αδρενεργικούς υποδοχείς, διότι η τοπική αγγειοσυστολή προκαλεί την αποσυμφόρηση της μύτης.

Στην επιφάνεια του αναπνευστικού επιθηλίου εκτείνεται μία βλέννα πάχους 5μm, η οποία διαθέτει 2 διακριτές στιβάδες, την υδατική στιβάδα και την στιβάδα γέλης. Η μεγαλύτερη ποσότητα της βλέννας παράγεται από τους αδένες, όπου τα βλεννώδη κύτταρα παράγουν τη γέλη της βλέννας και τα ορογόνα κύτταρα το υδαρές μέρος της (Lansley 1993). Επίσης, τα κυπελλοειδή κύτταρα παράγουν βλέννα μέσω εξωκύτωσης. Η βλέννα είναι αποτέλεσμα ενός μείγματος με την εξής σύνθεση: 95% νερό, 2% βλεννίνη, 1% άλατα, 1% άλλες πρωτεΐνες (αλβουμίνη, λυσοζύμη, λακτοφερρίνη, ανοσοσφαιρίνες) και λιγότερο από 1% λιπίδα (Kaliner et al. 1984). Μέσα σε μία ημέρα περίπου 1,5-2L βλέννας παράγονται στο ρινικό βλεννογόνο. Ο ρινικός βλεννογόνος είναι μεγάλης σημασίας για το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς αποτελεί τον πιο εκτεθειμένο φραγμό στα ξενοβιοτικά της ατμόσφαιρας. Στην προστασία του βλεννογόνου από βακτήρια και ιούς συμβάλλουν κυρίως οι ανοσοσφαιρίνες της βλέννας μαζί με τον μηχανισμό κίνησης της βλέννας με τη βοήθεια των βλεφαρίδων και των λάχνων (Lansley 1993).

Ο μηχανισμός κίνησης της βλέννας από τη ρινική κοιλότητα στον φάρυγγα ονομάζεται βλεννοκροσσωτή κάθαρση. Με αυτήν την κίνηση ο οργανισμός εμποδίζει αποτελεσματικά την εγκατάσταση μικροβίων στο ρινικό βλεννογόνο και στο κατώτερο αναπνευστικό, είτε μεταφέροντάς τους στο γαστρεντερικό σύστημα προς

εξουδετέρωση, είτε αποβάλλοντάς τους με το βήχα και το πτέρνισμα. Οι άκρες των βλεφαρίδων βρίσκονται εμβαπτισμένες και στις δύο στιβάδες όταν είναι τεντωμένες με αποτέλεσμα η κάθε τους κίνηση να μετακινεί τη βλέννα. Για να επανέλθουν οι βλεφαρίδες στην αρχική τους θέση κινούνται μόνο μέσα στη στιβάδα με περιεχόμενου χαμηλού ιξώδους. Αυτός ο κύκλος κινήσεων είναι ρυθμικός και επαναλαμβάνεται περίπου 1000 φορές το λεπτό και η βλέννα κινείται 5mm το λεπτό. Όπως είναι λογικό, ένα φαρμακευτικό σκεύασμα δεν μπορεί παραμένει για πολλή ώρα στο ρινικό βλεννογόνο λόγω αυτού του μηχανισμού. Έχει υπολογιστεί, ότι ο χρόνος ημιζωής φαρμάκων στη ρινική κοιλότητα είναι περίπου 20 λεπτά (Illum 2002).

Η βλεννοκροσική κάθαρση σα φυσιολογικός μηχανισμός του ανθρώπου αποτελεί αντικείμενο εκτενούς μελέτης, διότι δεν είναι πλήρως κατανοητός, επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από πολλούς παράγοντες, όπως οι συνθήκες περιβάλλοντος ή κάποια ασθένεια και επίσης υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα στο ρυθμό κίνησης των βλεφαρίδων ανά άτομο (Ugwoke et al. 2001).

A.2.1.6. Λεμφικός ιστός ρινικής κοιλότητας (ΛΙΡΚ)

Ο λεμφικός ιστός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετρήσιμη βιοδιαθεσιμότητα και αποτελεί την ειδοποιό διαφορά μεταξύ *in vivo* και *in vitro*. Ο ΛΙΡΚ στους ανθρώπους συνδέεται συνήθως με το δακτύλιο του Waldeyer, δηλαδή τις αμυγδαλές και τα αδενοειδή. Ο ΛΙΡΚ περιέχει εξειδικευμένα κύτταρα τύπου Μ παρόμοια με αυτά παρόντα στις πλάκες του Peyer στο έντερο. Ωστόσο, ο λεμφοειδής ιστός του βλεννογόνου είναι επίσης παρόν αμέσως κάτω από τον ρινικό βλεννογόνο, όπου μπορεί κανείς να βρει Β και Τ λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά είναι ικανά να προσλαμβάνουν αντιγόνα και προκαλούν τη διέγερση του ανοσοποιητικού. Γενικά, αναγνωρίζεται ότι τα διαλυτά αντιγόνα μπορούν να διεισδύσουν στο σύνολο του ρινικού βλεννογόνου και να φτάσει στους επιφανειακούς λεμφαδένες για την παραγωγή, κυρίως, μιας συστημικής ανοσολογικής απόκρισης. Αντίθετα, τα σωματίδια απορροφούνται κυρίως από τα κύτταρα Μ στο ΛΙΡΚ. Αυτά υποβάλλονται σε επεξεργασία και φτάνουν στον οπίσθιο χώρο των λεμφαδένων, όπου προκαλείται η κύρια εκκριτική ανοσοαπόκριση.

Παρόλα αυτά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι *in vitro* μελέτες σε κύτταροκαλλιέργειες ή σε ρινικό ιστό που έχει αποκοπεί, έχουν δείξει, ότι (τουλάχιστον) υπό τέτοιες συνθήκες τα σωματίδια μπορούν επίσης να ενδοκυτταρώνουν σε ρινικό επιθήλιο. Από τους λεμφαδένες υπάρχει πιθανότητα τα σωματίδια να διαφύγουν και τελικά να φτάσουν στη ροή του αίματος. Μελέτες πρόσληψης σωματιδίων από το έντερο (μέσω των κυττάρων Μ) έχουν δείξει, ότι τα μικρά σωματίδια (50nm) προσλήφθηκαν εκτενέστερα από τα μεγαλύτερα σωματίδια (500nm και 3μm) αν και το συνολικό ποσό ήταν μικρό, δηλαδή λιγότερο από 3%. Ωστόσο, δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για την αξιολόγηση του βέλτιστου εύρους μεγεθών για την πρόσληψη σωματιδίων από κύτταρα τύπου Μ στο ΛΙΡΚ. Δυνητικά, ωστόσο, δεδομένης της ομοιότητας των κυττάρων, το εύρος μεγεθών για βέλτιστη πρόσληψη θα μπορούσε να είναι το ίδιο (Illum 2007).

A.2.2. Σύγκριση ρινικής κοιλότητας ανθρώπου και κουνελιού

Μία από τις πιο όμοιες με τον άνθρωπο ρινικές κοιλότητες τις έχουν τα κουνέλια. Ένα αρκετά σημαντικό χαρακτηριστικό που συνδέει τη ρινική κοιλότητα του ανθρώπου και του κουνελιού είναι η ανατομία των ιγμορείων και η τοπική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με την μελέτη της ρινοϊγμορίτιδας διεκπεραιώθηκαν σε κουνέλια, διότι το μέγεθος των ιγμορίων είναι κατάλληλο και έχουμε εύκολη πρόσβαση σε αυτά. Πέρα από την ίδια την ασθένεια, οι επιστήμονες εξέτασαν και φάρμακα για τη θεραπεία της τοπικά. Φάνηκε, μάλιστα, αποτελεσματικότερη η τοπική σε σχέση με τη συστηματική χορήγηση. Μία ακόμη ομοιότητα έγκειται στην αγγείωση του συγκεκριμένου βλεννογόνου. Και στα δύο είδη η τροφοδοσία αίματος είναι αρκετά πλούσια, πράγμα που σημαίνει ότι τα φάρμακα θα έχουν συγκρίσιμη διαπέραση (Al-Sayed et al. 2017).

Από την άλλη, πρέπει να υπογραμμιστεί, ότι υπάρχουν και σημαντικές διαφορές στη μορφολογία και τη λειτουργία της ρινικής κοιλότητας μεταξύ ανθρώπου και κουνελιού. Επειδή τα κουνέλια δε διαθέτουν ιδρωτοποιούς αδένες, η ρινική κοιλότητα χρησιμοποιείται και σαν όργανο για τη θερμορύθμιση, ενώ η οσμή τους είναι πιο ισχυρή. Ο άνθρωπος έχει τρεις κόγχες, όμως στα κουνέλια είναι περισσότερο αναδιπλωμένες και διακλαδισμένες κάνοντας τη μορφολογία της κοιλότητας αρκετά πιο περίπλοκη (Mills and Christmas 1990).

Το σύνολο των διαφορών σίγουρα παίζει μεγάλο ρόλο στην εξαγωγή συμπερασμάτων για την απορρόφηση φαρμάκων από το ρινικό βλεννογόνο, όμως με τα κουνέλια μπορούμε να κατασκευάσουμε μοντέλα αρκετά βοηθητικά για το σχεδιασμό ρινικών σκευασμάτων για τον άνθρωπο. Από τα κουνέλια έχουμε μάλιστα τη δυνατότητα να απομονώσουμε χειρουργικά το ρινικό διάφραγμα, ώστε να χρησιμοποιήσουμε τη μεμβράνη που εφάπτεται στο χόνδρο και από τις δύο πλευρές σε *ex vivo* μελέτες με σχετική ευκολία σε σύγκριση με άλλα ζώα παρέχοντάς μας με επαρκείς μεγέθους μεμβράνη (Badran et al. 2017).

A.3. Ρινική χορήγηση

A.3.1 Γενικές πληροφορίες

Η ρινική χορήγηση είναι μια οδός χορήγησης, στην οποία τα φάρμακα εισπνέονται μέσω της μύτης. Μπορεί να είναι μια μορφή τοπικής ή συστημικής χορήγησης, καθώς τα φάρμακα που χορηγούνται τοπικά σε αυτό το είδος μπορεί να έχουν είτε καθαρά τοπικά είτε συστημικά αποτελέσματα. Τα ρινικά σπρέι είναι φάρμακα που δρουν τοπικά, όπως αποσυμφορητικά για θεραπεία κρύου και αλλεργίας, των οποίων τα συστημικά αποτελέσματα είναι συνήθως ελάχιστα. Παραδείγματα συστηματικά δραστικών φαρμάκων που διατίθενται ως ρινικά σπρέι είναι φάρμακα ημικρανίας, αντικατάσταση νικοτίνης και θεραπείες ορμονών.

Η ρινική κοιλότητα καλύπτεται από λεπτό βλεννογόνο, ο οποίος είναι καλά αγγειωμένος (Ugwoke et al. 2001). Ως εκ τούτου, ένα μόριο φαρμάκου μπορεί να μεταφερθεί γρήγορα διαμέσου της μονής επιθηλιακής στιβάδας κυττάρων απευθείας στην συστηματική κυκλοφορία του αίματος χωρίς μεταβολισμό πρώτης διόδου του

ήπατος και του εντέρου. Η ρινική χορήγηση μπορεί ως εκ τούτου να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση στην από του στόματος χορήγηση, με σύνθλιψη ή άλεση δισκίων ή καψουλών και σπρώξιμο ή εισπνοή της προκύπτουσας σκόνης, παρέχοντας μια ταχεία έναρξη των αποτελεσμάτων. Εάν επιδιώκεται γρήγορη επίδραση ή εάν το φάρμακο αποικοδομείται εκτεταμένα στο έντερο ή στο ήπαρ, χορήγηση με αυτήν τη οδό αποτελεί μία εναλλακτική για φάρμακα που απορροφώνται ελάχιστα από το στόμα (Ghori et al. 2015).

Οι δυνατοί τρόποι διάβασης ενός μορίου μέσα από μία βιολογική μεμβράνη είναι:

1. Μέσα από τα κύτταρα, δηλαδή παρακυτταρικά.
2. Ανάμεσα από τα κύτταρα, δηλαδή διακυτταρικά.

Οι παραπάνω τρόποι μπορούν να αναλυθούν περαιτέρω ανάλογα με το αν η μεταφορά γίνεται μέσω διάχυσης (παθητική μεταφορά) ή καταναλώνει ενέργεια (ενεργητική μεταφορά). Στο ρινικό βλεννογόνο η διάχυση φαίνεται να είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός μεταφοράς. Για πολικά μόρια, η διάχυση γίνεται μόνο ανάμεσα από τα κύτταρα, που σημαίνει, ότι αν είναι πολύ μεγάλα ($>1000\text{Da}$) δεν μπορούν να περάσουν, ενώ για τα λιπόφιλα γίνεται μέσα από τα κύτταρα. Με την ενεργητική μεταφορά η ένωση περνάει υποχρεωτικά μέσα από το κύτταρο ανεξαρτήτως πολικότητας (Illum 2003).

A.3.2 Πλεονεκτήματα

1. Εύκολη στη χρήση, μη επεμβατική, γρήγορη και άνετη.
2. Συμμόρφωση ασθενών.
3. Εύκολη προσβασιμότητα στα τριχοειδή αγγεία.
4. Αποφυγή ανεπιθύμητων ενεργειών, όπως ναυτία και έμετο, που συνήθως παρατηρούνται μετά από χορήγηση από το στόμα.
5. Αποφυγή της ενζυμικής και χημικής αποικοδόμησης φαρμάκων στη γαστρεντερική οδό, του φαινομένου πρώτης διόδου και του μεταβολισμού του εντερικού τοιχώματος, επιτρέποντας την μείωση της δόσης σε σύγκριση με την από του στόματος χορήγηση, που οδηγεί στην μείωση παρενεργειών.
6. Τα φάρμακα που δεν απορροφώνται από το στόμα ή είναι ασταθή σε γαστρικά υγρά μπορούν να χορηγηθούν στη συστηματική κυκλοφορία με ρινική χορήγηση.
7. Η ρινική οδός είναι μία εναλλακτική της παρεντερικής οδού, ειδικά για τις πρωτεΐνες και τα πεπτίδια.
8. Πιο κατάλληλη για τους ασθενείς, σε σύγκριση με μακροχρόνια θεραπεία παρεντερικής φαρμακευτικής αγωγής.
9. Καλή διείσδυση, λιπόφιλων φαρμάκων χαμηλού μοριακού βάρους μέσω του ρινικού βλεννογόνου.
10. Ταχεία απορρόφηση και γρήγορη έναρξη της δράσης λόγω της σχετικά μεγάλης επιφάνειας απορρόφησης και της υψηλής αγγείωσης.
11. Η βιοδιαθεσιμότητα των μεγαλύτερων μορίων φαρμάκου μπορεί να βελτιωθεί μέσω ενισχυτή απορρόφησης ή άλλου είδους προσέγγιση.
12. Μικρή πιθανότητα αλληλεπίδρασης φαρμάκου-φαρμάκου.

13. Διαπιστώνεται ταχεία επίτευξη των μέγιστων επιπέδων για ορισμένες κατηγορίες φαρμάκων.
14. Για άμεση μεταφορά φαρμάκου στο κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω της οσφρητικής περιοχής, παρακάμπτοντας έτσι το αιματοεγκεφαλικό φραγμό.
15. Άμεση απελευθέρωση του εμβολίου στον λεμφικό ιστό και πρόκληση εκκριτικής ανοσοαπόκρισης σε απομακρυσμένη περιοχή βλεννογόνου.
16. Διευκολύνει τη θεραπεία πολλών νευρολογικών και ψυχιατρικών διαταραχών (Ghori et al. 2015; Patil Sonali et al. 2015).

A.3.3 Μειονεκτήματα, περιορισμοί, προκλήσεις

Ο κύριος περιορισμός στην υιοθέτηση της ρινικής οδού είναι ότι δεν μπορεί να εφαρμοστεί για όλα τα φάρμακα. Η έκταση της απορρόφησης του φαρμάκου μπορεί να εξαρτάται από πολλές φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της σταθεράς διάστασης (pKa) και του συντελεστή κατανομής, του μοριακού βάρους, του μεγέθους των σωματιδίων και της διαλυτότητας του φαρμάκου. Γενικά, για να απορροφηθεί ένα φάρμακο πρέπει να είναι σε διάλυμα και αυτό μπορεί να είναι προβληματικό για φάρμακα με χαμηλή διαλυτότητα. Για παράδειγμα, τα πολικά φάρμακα και ορισμένα μακρομόρια δεν απορροφώνται σε επαρκείς συγκεντρώσεις λόγω της κακής διαπερατότητας της μεμβράνης, της ταχείας κάθαρσης και της ενζυματικής αποικοδόμησης μέσα στη ρινική κοιλότητα. Ο ρινικός βλεννογόνος είναι ευαίσθητος στον τοπικό ερεθισμό είτε από φάρμακο είτε από έκδοχο. Ο σχεδιασμός της μορφοποίησης, όπως ο τύπος της σύνθεσης (υγρό, πήκτωμα και σκόνη), τα έκδοχα (διαλυτοποιητής ή ενισχυτής απορρόφησης), η συγκέντρωση του φαρμάκου, το pH και ο όγκος που χορηγείται έχουν επίσης σημαντική επίδραση.

Εκτός από τα παραπάνω, πρέπει να προσέξουμε και τους φυσιολογικούς και ανατομικούς παράγοντες. Αυτοί περιλαμβάνουν τη ρινική ροή αίματος, την ενζυμική αποικοδόμηση, τη βλεννοκροσσωτή κάθαρση και τη φυσική κατάσταση της μύτης ορισμένες παθήσεις, όπως ρινική ατροφική ρινίτιδα και σοβαρή αγγειοκινητική ρινίτιδα μπορούν να μειώσουν την ικανότητα απορρόφησης ρινικών φαρμάκων και το φάρμακο μπορεί να χαθεί με στάξιμο από τη μύτη ή κάτω από το πίσω μέρος του λαιμού, μειώνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα. Η κάθαρση του ρινικού βλεννογόνου μπορεί επίσης να μειώσει το χρόνο επαφής και την απορρόφηση του φαρμάκου με τη μεταφορά του φαρμάκου στο ρινοφάρυγγα και μετά στη γαστρική εντερική οδό. Η βλεννοκροσσωτή κάθαρση του βλεννογόνου μπορεί να ξεπεραστεί με την ενσωμάτωση βλεννοπροσκολλητικών πολυμερών στη σύνθεση, γεγονός που μπορεί να αυξήσει τη ρινική απορρόφηση. Η στιβάδα βλέννας μπορεί επίσης να αποτελεί εμπόδιο για την απορρόφηση του φαρμάκου είτε περιορίζοντας τη διάχυση φαρμάκου είτε συνδέοντας φάρμακα με βλεννίνες. Ορισμένες καταστάσεις, όπως το κοινό κρυολόγημα και η αλλεργική ρινίτιδα, μπορούν επίσης να αλλάξουν τις συνθήκες εντός της μύτης, είτε αυξάνοντας ή μειώνοντας την εκκαθάριση των βλεννογόνων ή μεταβάλλοντας τη διαπερατότητα του απορροφητικού βλεννογόνου. Αυτοί οι περιορισμοί πρέπει να αναγνωριστούν και να αντιμετωπιστούν κατά το σχεδιασμό μορφών για την απορρόφηση ενός φαρμάκου από τη ρινική οδό (Ghori et al. 2015).

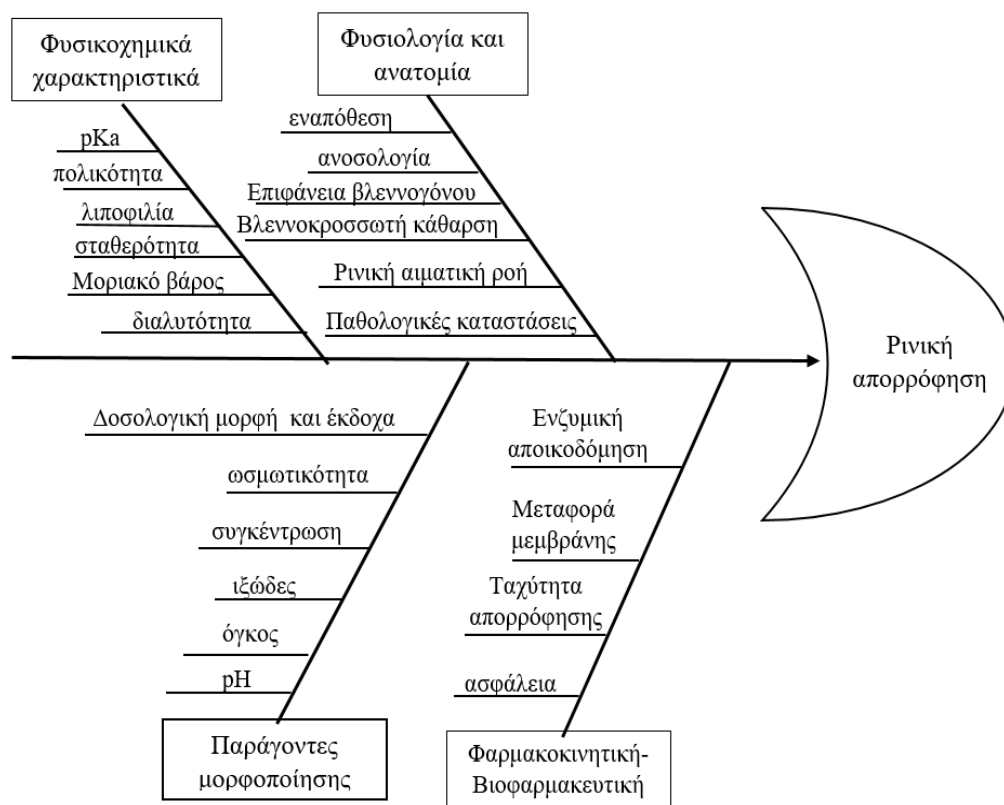
Η ρινική χορήγηση είναι κατά κύριο λόγο κατάλληλη για ισχυρά φάρμακα, καθώς μόνο ένας περιορισμένος όγκος μπορεί να ψεκαστεί μέσα στη ρινική κοιλότητα. Τα φάρμακα για συνεχή και συχνή χορήγηση ενδέχεται να είναι λιγότερο κατάλληλα λόγω του κινδύνου επιβλαβών μακροπρόθεσμων επιδράσεων στο ρινικό επιθήλιο. Η ρινική χορήγηση έχει επίσης συσχετισθεί με υψηλή μεταβλητότητα στην ποσότητα του φαρμάκου που απορροφάται. Οι λοιμώξεις των ανώτερων αεραγωγών μπορεί να αυξάνουν τη μεταβλητότητα όπως και η έκταση του αισθητικού ερεθισμού του ρινικού βλεννογόνου, οι διαφορές στην ποσότητα του υγρού ψεκασμού που καταπίνονται και δεν διατηρούνται στη ρινική κοιλότητα και οι διαφορές στη διαδικασία ενεργοποίησης ψεκασμού. Ωστόσο, η μεταβλητότητα της ποσότητας που απορροφάται μετά τη ρινική χορήγηση θα πρέπει να είναι συγκρίσιμη με εκείνη μετά την από του στόματος χορήγηση (Kublik and Vidgren 1998).

A.3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την απορρόφηση

Η καλή κατανόηση των διαφόρων παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν την απορρόφηση φαρμάκου από τη ρινική κοιλότητα είναι πολύ μεγάλης σημασίας στο σχεδιασμό τόσο της σύνθεσης όσο και της συσκευής που χρησιμοποιείται για ενδορρινική χορήγηση. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που κυμαίνονται από τις φυσιολογικές συνθήκες, τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου και τη χορήγηση (Chien et al 1989, Gizurarson 1993).

Οι παράγοντες που σχετίζονται με τη ρινική φυσιολογία περιλαμβάνουν: βλεννοκροσσωτή κάθαρση, παθολογικές καταστάσεις όπως λοιμώξεις, αλλεργία, ρινική απόφραξη, σύνδρομο Kartagener κ.λπ., που επηρεάζουν είτε τη βλέννα είτε το ρυθμό κίνησης των τριχών και των βλεφαρίδων, συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία, υγρασία), ενζυμική αποικοδόμηση, ανοσολογία; και τη ρινική αιματική ροή.

Οι παράγοντες που σχετίζονται με τη δοσολογική μορφή είναι: φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δραστικών συστατικών, pH και ερεθιστικότητα του βλεννογόνου, οσμωτικότητα, ιξώδες (διάλυμα, πήκτωμα) και πυκνότητα (σκόνη) του σκευάσματος, συγκέντρωση και όγκος που χορηγείται και ο τύπος δοσολογικής μορφής.



Εικόνα 10: διάγραμμα Ισιγκάουα για τους παράγοντες ρινικής απορρόφησης.

Τέλος, παράγοντες που σχετίζονται με τη συσκευή χορήγησης περιλαμβάνουν: το μέγεθος των σωματιδίων του σταγονιδίου ή της σκόνης, μέρος και τρόπος εναπόθεσης, απώλεια από τη ρινική κοιλότητα μετά τη χορήγηση (αποστράγγιση λόγω βαρύτητας στο λάρυγγα ή έξω από το ρουθούνι και όχι από τη βλεννοκροσσωτή κάθαρση) (Ugwoke et al. 2001).

A.3.4.1. Χαρακτηριστικά του φαρμάκου

Ο ρυθμός και η έκταση της απορρόφησης του φαρμάκου μπορεί να εξαρτάται με πολλούς φυσικοχημικούς παράγοντες όπως ο συντελεστής κατανομής υδατικής και λιπαρής φάσης του φαρμάκου, το pKa, το μοριακό βάρος του φαρμάκου, το ρυθμό διάχυσης και όγκος διάχυσης και pH διαλύματος και συγκέντρωση φαρμάκου. Έχουμε καταλήξει στο συμπέρασμα ότι *in vivo* ρινική απορρόφηση των ενώσεων μοριακού βάρους μικρότερες από 300, δεν επηρεάζεται σημαντικά από το φυσικοχημικό ιδιότητες του φαρμάκου. Υπάρχει μια άμεση συσχέτιση μεταξύ του λογαρίθμου του ποσοστού του δόση που θα απορροφηθεί ρινικά και το λογάριθμο του μοριακού βάρους.

Η επίδραση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των μορίων του φαρμάκου σχετικά με την ταχύτητα και την έκταση της απορρόφησης μέσω βιολογικών

μεμβρανών έχει διερευνηθεί γενικά καλά. Σε πολλές, κυρίως, μελέτες σε ζώα, μελετήθηκε η επίδραση των χαρακτηριστικών του φαρμάκου στη ρινική απορρόφηση. Τα λιπόφιλα φάρμακα είναι γενικά καλά απορροφήσιμα από τη ρινική κοιλότητα, παρουσιάζοντας φαρμακοκινητικά προφίλ συχνά παρόμοια με αυτά που συλλέχθηκαν μετά από ενδοφλέβια χορήγηση. Λιπόφιλα μόρια με μοριακά βάρη μικρότερα από 1kDa απορροφούνται διακυτταρικά, ταχέως και αποτελεσματικά κατά μήκος της ρινικής μεμβράνης. Η έκταση της απορρόφησης για λιπόφιλα μόρια μεγαλύτερα από το 1 kDa είναι σημαντικά χαμηλότερη. Απορρόφηση υδρόφιλων φαρμάκων είναι γενικά χαμηλή και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μοριακό βάρος. Απορρόφηση μέσω των μεμβρανών επηρεάζεται όχι μόνο από την λιποφιλία/υδροφιλία ή το μοριακό βάρος, αλλά επίσης από την ποσότητα μη ιονισμένου φαρμάκου που υπάρχει. Αυτό εξαρτάται από το pKa και το pH στο και στο σημείο απορρόφησης - το μη ιονισμένο κλάσμα του φαρμάκου είναι περισσότερο διαπερατό από το ιονισμένο. Το pH του ρινικού επιθηλίου είναι 5,5- 6,5. Ένα pH μικρότερο από 5,5 ή μεγαλύτερο από 6,5 σε συνδυασμό με χωρητικότητα ρυθμιστικού διαλύματος μεγαλύτερη από αυτήν του ρινικού επιθηλίου μπορεί να προκαλέσει τοπικά δυσμενείς επιπτώσεις και συνεπώς μπορεί να επηρεάσουν τη διαπερατότητα φαρμάκων. Μόνο η μοριακά διαλυμένη μορφή του φαρμάκου στη θέση απορρόφησης μπορεί να διασχίσει το ρινικό επιθήλιο. Επομένως, επαρκής διαλυτότητα φαρμάκου αποτελεί προϋπόθεση για οποιαδήποτε απορρόφηση. Εξαιτίας της περιορισμένης ποσότητας της δόσης που μπορεί να παραμείνει σταθερή στην ρινική κοιλότητα χωρίς να χαθεί φάρμακο, η διαλυτότητα του φαρμάκου πρέπει να εγγυάται επαρκή βιοδιαθεσιμότητα για την επίτευξη κλινικού αποτελέσματος (Türker et al. 2004).

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την επιλογή ενός υποψήφιου δραστικού συστατικού μικρού μοριακού βάρους για ρινική χορήγηση σε υδατική μορφή.

Σημαντικότητα	Χαρακτηριστικό φαρμάκου	Προβλεπόμενο εύρος	Σχόλια / προτάσεις για βελτίωση
+++	Δραστικότητα	Μέγιστη ποσότητα 20mg/δόση	Η ρινική βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου πρέπει να θεωρείται ότι φτάνει στο θεραπευτικό στόχος / καμία
+++	Τοπική τοξικότητα στο βλεννογόνο	Καμία τοξικότητα ή βλάβη ιστών	Μικρές ζημιές ανεκτές για έκτακτη ανάγκη ή μία εφάπαξ χορήγηση, χωρίς τοξικότητα ή βλάβη για χρόνια χρήση / καμία
+++	Διαλυτότητα	>100mg/mL (για δραστικότητα 2-mg/δόση	Κανένα / η διαλυτότητα μπορεί να βελτιωθεί με προφάρμακα, ενισχυτές διαλυτότητας, άλλες μορφές άλατος, πολυμορφικές μορφές
+++	Όγκος	Μέγιστος όγκος 100-200μL (1 ή 2 ψεκασμοί με 100μL)	Οι όγκοι ψεκασμού μπορεί να αυξηθούν με βλεννοσυγκολλητικούς παράγοντες έως 150μL για έναν ψεκασμό χωρίς προβλήματα καταρροής / καμία
+++	Σταθερότητα σε διάλυμα	≥2 χρόνια	Προϋπόθεση για επαρκή διάρκεια ζωής / η σταθερότητα του διαλύματος μπορεί να βελτιωθεί με ενισχυτές διαλυτότητας, σταθεροποιητές και προφάρμακα
+++	Μοριακό βάρος	<1000Da	Το μικρό μέγεθος είναι πλεονέκτημα / ενισχυτές διαπερατότητας όπως η χιτοζάνη μπορούν να ενισχύσουν την παρακυτταρική απορρόφηση
++	Συμβατότητα με άλλα συστατικά	Συμβατά όλα, χωρίς αλληλεπιδράσεις	Επιλέξτε τα κατάλληλα έκδοχα, την τριάδα της ρινικής χορήγησης (φάρμακο, μορφοποίηση και συσκευή) πρέπει να είναι σε ισορροπία, μικρές αλλαγές ενδέχεται να μεταβάλλουν τα κλινικά αποτελέσματα / καμία
++	logP	1-5	Κανένα / ενισχυτές διαπερατότητας όπως η χιτοζάνη μπορεί να ενισχύσει την παρακυτταρική απορρόφηση των υδρόφιλων φαρμάκων, πολύ λιπόφιλα μόρια χρειάζονται ειδική μορφοποίηση
++	pH διαλύματος	3,5-7,5	Συνιστάται ελαφρώς όξινο, βλάβη της λειτουργίας των κροσσών του βλεννογόνου σε πολύ χαμηλό και πολύ υψηλό pH, αποφεύγετε τα ρυθμιστικά / κανένα
+	ωσμωτικότητα	290-500 mosm/kg	Υψηλότερες τιμές ανεκτές για έκτακτες καταστάσεις ή μία χορήγηση εφάπαξ, ισότονες συνθήκες για χρόνια χρήση, υπότονα διαλύματα πρέπει να αποφεύγονται / αν το διάλυμα είναι υπέρτονο, αναθεώρησης συνταγής

Στο πλαίσιο αυτό γίνεται προφανές, ότι η επιλογή των υποψηφίων φαρμάκων δύναται να αποδειχθεί σε μία πρόκληση. Μερικά χαρακτηριστικά φαίνονται ιδιαίτερα σημαντικά κατά την επιλογή ενός υποψηφίου φαρμάκου για ρινική χορήγηση δια του βλεννογόνου σε υγρή μορφή. Το βιοφαρμακευτικό σύστημα ταξινόμησης φαρμάκων αποκαλύπτει ότι φάρμακα που εντάσσονται στην κατηγορία I (υψηλή διαπερατότητα, υψηλή διαλυτότητα) έχουν το μεγαλύτερες δυνατότητες για ρινική χορήγηση. Για τη βελτιστοποίηση των κριτηρίων επιλογής για τα μικρά μόρια σε υδατικό περιβάλλον μπορούμε να εφαρμόσουμε τον Κανόνα των Πέντε, που όρισε ο Lipinski (Lipinski et al. 2001):

- Χαρακτηριστικά φαρμάκου: μοριακό βάρος <500Da, logP <5.
- Δόση ανά ψεκάσμο (αριστερό και δεξί ρουθούνι): Δραστικότητα <5 mg/δόση.
- Μέγιστος όγκος 100 μl / ψεκάσμο: διαλυτότητα > 50 mg/mL.
- Φάρμακο σε διάλυμα με pH περίπου 5,5, ωσμωτικότητα <500 mosm/kg.

A.3.4.2. Χαρακτηριστικά του ασθενή

Όπως επεξηγήθηκε λεπτομερώς στο κεφάλαιο A.2., η ρινική κοιλότητα και η μύτη σαν όργανα έχουν μία αρκετά περίπλοκη δομή και λειτουργία, που μάλιστα ποικίλλουν από άνθρωπο σε άνθρωπο. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που πρέπει να εξετάσουμε διεξοδικά προτού ξεκινήσουμε οποιοδήποτε σχεδιασμό ενός σκευάσματος.

A.3.4.2.1 Αιματική ροή

Η ρινική κοιλότητα παροχετεύεται με αφθονία αίματος σε ολόκληρη την επιφάνεια του βλεννογόνου προσφέροντας εξαιρετικές συνθήκες για την συστηματική απορρόφηση φαρμάκων από εκεί. Ο βασικός μηχανισμός μεταφοράς του φαρμάκου διαμέσου της μεμβράνης είναι η διάχυση, οπότε η γρήγορη ροή του αίματος εξασφαλίζει συνεχώς χαμηλή συγκέντρωση στο σημείο της απορρόφησης για να συνεχίζεται και η κίνηση των μορίων. Συνεπώς, η αγγειοδιαστολή και η αγγειοσυστολή είναι φαινόμενα που ενδέχεται να επηρεάσουν σημαντικά το ρυθμό απορρόφησης. Γι' αυτό το λόγο, όπως φαίνεται και από ερευνητικά άρθρα, φάρμακα που προκαλούν αγγειοσυστολή μειώνουν αισθητά την απορρόφηση στο αίμα (Pires et al. 2009).

A.3.4.2.2 Βλεννοκροσσωτή κάθαρση

Το μεγαλύτερο εμπόδιο αυτή τη στιγμή στο σχεδιασμό ρινικών σκευασμάτων είναι η βλεννοκροσσωτή κάθαρση. Όπως εξηγείται αναλυτικά ο προστατευτικός αυτός μηχανισμός λειτουργεί αδιάκοπα με ρυθμό που ρυθμίζεται από πολλούς εξωγενείς παράγοντες, όπως η υγρασία, το διοξείδιο του θείου και η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, αλλά και από ενδογενείς παράγοντες, όπως συγκεκριμένες παθήσεις του αναπνευστικού (βλ. εικόνα) και το τσιγάρο. Αν λοιπόν έχουμε ένα φάρμακο που έχει αργό ρυθμό διαπέρασης από τη μεμβράνη, όπως συμβαίνει συχνά με τα πολικά μόρια, η βλεννοκροσσωτή κάθαρση θα διώξει το σκεύασμα από το σημείο εφαρμογής προς στο πεπτικό σύστημα πριν προλάβει να απορροφηθεί επαρκώς. Σε αυτό το πλαίσιο γίνεται κατανοητό, ότι το μέρος του φαρμάκου που βρίσκεται πιο κοντά στο

ρινοφάρρυγγα θα απομακρυνθεί και πιο γρήγορα, άρα και το σημείο εφαρμογής θα διαδραματίσει σημαντικό ρόλο. Έτσι, τα ρινικά σπρέυ σε σύγκριση με τις ρινικές σταγόνες καθαίρονται πιο αργά, εφόσον εναποτίθενται στην εξωτερική πλευρά περισσότερο.

Πίνακας 2: παθολογικές καταστάσεις που επηρεάζουν τη βλεννοκροσσωτή κάθαρση.

Παθολογική κατάσταση	Βλεννοκροσσωτή κάθαρση
Πρωτογενής δυσκινησία βλεφαρίδων	Προβληματική: απουσία ή μείωση κίνησης βλεφαρίδων
Άσθμα	Αυξημένη: φλεγμονή και ενόχληση Μειωμένη: βλάβη επιθηλίου
Κυστική ίνωση	Προβληματική: αφυδάτωση βλέννας
Ιική και βακτηριακή λοίμωξη	Διακινδυνευμένη: απώλεια βλεφαρίδων και αλλαγή ιδιοτήτων βλέννας
Διαβήτης	Προβληματική: αφυδάτωση και μικροαγγειακή βλάβη

Εν κατακλείδι, αξίζει να σημειωθεί, ότι πέρα από τους εξωτερικούς και διατομικούς παράγοντες, ρόλο παίζουν και οι ενδογενείς, όπως ο έμμηνος κύκλος και ο κιρκάδιος ρυθμός. Για παράδειγμα, τις γόνιμες μέρες η βλεννοκροσσωτή κάθαρση αυξάνεται, ενώ τη νύχτα μειώνεται. Στο σχεδιασμό σκευάσματος, ωστόσο, υπάρχει η δυνατότητα να αντιμετωπίσουμε αυτές τις δυσκολίες με τα κατάλληλα έκδοχα ή συσκευή χορήγησης (Pires et al. 2009).

A.3.4.2.3 Ενζυμική αποικοδόμηση

Αν και η ρινική χορήγηση υπερκερεί το φαινόμενο πρώτης διόδου, ο μεταβολισμός στο ρινικό επιθήλιο είναι αδύνατον να αποφευχθεί. Καρβοξυλεστεράσες, αλδευδαφυδρογονάσες υδρολάσες εποξειδίου και S-τρανσφεράσες γλουταθιόνες έχουν ανιχνευθεί στο ρινικό βλεννογόνο και δύναται να προκαλέσουν την αποικοδόμηση των φαρμάκων. Μέχρι και ισοένζυμα κυτοχρώματος P450 παρουσιάζονται εκεί με αποτέλεσμα να μεταβολίζουν φάρμακα, ουσίες όπως η κοκαΐνη, η νικοτίνη, το αλκοόλ, προγεστερόνη και αποσυμφορικά. Επιπροσθέτως, πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως αμινοπεπτιδάσες και πρωτεάσες, είναι παρόντα και είναι ικανά να αποικοδομήσουν πεπτιδικά φάρμακα, όπως την καλσιτονίνη, την ινσουλίνη και τη δεσμοπρεσσίνη. Καταλήγοντας, η ενζυμική διάσπαση δραστικών συστατικών στη ρινική κοιλότητα επηρεάζει άμεσα τα φαρμακοκινητικά και φαρμακοδυναμικά χαρακτηριστικά τους, άρα δεν πρέπει να αγνοηθεί (Sarkar 1992).

A.3.4.2.4 Μεταφορείς και συστήματα εκροής

Πρόκειται για ένα θέμα που βρίσκεται υπό διερεύνηση, καθώς δε γνωρίζουμε ακόμα πολλές πληροφορίες για αυτό. Μερικές Ρ-γλυκοπρωτεΐνες, δηλαδή μεταφορείς που επιστρέφουν φάρμακα που έχουν καταφέρει να περάσουν το ρινικό επιθήλιο, έχουν ταυτοποιηθεί. Τέτοιες πρωτεΐνες δεν είναι εκλεκτικές, μπορούν, λοιπόν, να συνδεθούν με διάφορες υδρόφοβες και αμφίφιλες ενώσεις και να τις απομακρύνουν. Επίσης,

αυτές βρίσκονται στον αναπνευστικό και οσφρητικό βλεννογόνο, ενώ η δράση τους φαίνεται να επηρεάζει πιο ενεργά τη μεταφορά από τη μύτη στον εγκέφαλο (Oliveira et al. 2016).

A.3.4.3. Θεραπευτικός στόχος

Σε συζήτηση περί φαρμάκων που θεραπεύουν ασθένειες, δεν πρέπει να παραλείπεται ποτέ η προτεραιότητα του χρήστη και των απαιτήσεων που έχει από το φάρμακο. Η ρινική χορήγηση μπορεί πράγματι να δίνει λύσεις σε επιστημονικά προβλήματα, ωστόσο αν ο ασθενής δεν την αποδεχτεί, τότε δεν ολοκληρώνεται και ο σκοπός του σκευάσματος. Άλλες απαιτήσεις έχει ένας ασθενής που θέλει να ανακουφιστεί από το συνάχι, άλλες αυτός που έχει μία χρόνια πάθηση και άλλες αυτός που θέλει να εμβολιαστεί.

A.3.4.3.1 Τοπική δράση

Η λογική επιλογή του ασθενή που ψάχνει για θεραπεία της μύτης είναι να αγοράσει ένα ρινικό σκεύασμα. Στην αγορά τα αντισταμινικά, τα κορτικοστεροειδή και τα αποσυμφορητικά ρινικά σκευάσματα είναι από τα πιο διαδεδομένα είδη που κυκλοφορούν. Η τοπική τους δράση προσφέρει άμεση ανακούφιση από τα συμπτώματα και ευνοϊκό προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών. Αξίζει να τονιστεί ιδιαίτερος το δεύτερο σημείο, καθώς η ασφάλεια των φαρμάκων αυτή τη στιγμή είναι το μεγαλύτερο εμπόδιο για να εγκριθεί ένα φάρμακο στη σύγχρονη αγορά. Όταν αποσκοπείται τοπική δράση, η απαιτούμενη ποσότητα δραστικού συστατικού στο σκεύασμα για να είναι δραστικό είναι σαφώς μικρότερη από ότι αν η χορήγηση γίνεται συστηματικά, συνεπώς δεν θα φτάσει ποτέ αρκετό φάρμακο στην κυκλοφορία του αίματος ικανό να βλάψει κάποιο άλλο όργανο (Salib and Howarth 2003). Για τον παραπάνω λόγο, ακόμα και για αντιβιοτική θεραπεία έχει προταθεί η ρινική χορήγηση για την αντιμετώπιση λοίμωξης από ανθεκτικά στην συστηματική θεραπεία βακτήρια βιοφίλμ, παρακάμπτοντας πλήρως την συστηματική χορήγηση και την τοξικότητά της (Desrosiers and Salas-Prato 2001).

A.3.4.3.2 Συστηματική δράση

Η φυσιολογία και ανατομία της μύτης επιτρέπει τη χορήγηση φαρμάκων για να περάσουν στη συστηματική κυκλοφορία με άμεση έναρξη δράσης αποφεύγοντας όλα τα μειονεκτήματα της παραντερικής δράσης. Έχει αποδειχθεί, ότι η επαναλαμβανόμενες ρινικές χορηγήσεις στο σπίτι μπορούν να αντικαταστήσουν την παρεντερική χορήγηση του νοσοκομείου ή την *per os* χορήγηση. Η ρινική χορήγηση πλεονεκτεί σημαντικά στην περίπτωση που η από του στόματος λήψη έχει ανεπαρκή βιοδιαθεσιμότητα. Όμως, μόνο συγκεκριμένα φάρμακα μπορούν να επιλεγθούν για αυτό το σκοπό, διότι υπάρχουν μεγάλοι περιορισμοί ως προς τη δόση που πρακτικά ανέχεται η ρινική κοιλότητα και τη διαπερατότητά τους.

A.3.4.3.3 Ρινικά εμβόλια

Μια αρκετά ενδιαφέρουσα και πρωτοπόρα ιδέα για ρινική χορήγηση είναι τα εμβόλια. Η ρινική κοιλότητα είναι το πρώτο σημείο επαφής του αντιγόνου κατά την εισπνοή, γι' αυτό η χρήση εμβολίων ειδικά για λοιμώξεις του αναπνευστικού έχει μελετηθεί διεξοδικά. Αναλυτικότερα, ο ρινικός εμβολιασμός είναι μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική στην κλασική παρεντερική οδό, διότι αυξάνει τα επίπεδα ανοσοσφαιρινών G και A. Η ανοσολογική απόκριση του ανώτερου αναπνευστικού διενεργούνται κυρίως από τον λεμφικό ιστό που βρίσκεται κάτω από το ρινικό επιθήλιο. Παρόλα αυτά ο ρινικός εμβολιασμός δεν περιορίζεται μόνο σε παθογόνους του ανώτερου αναπνευστικού, επειδή έχει παρατηρηθεί ότι μετά από ρινική ανοσοποίηση οι ανοσοσφαιρίνες εκκρίνονται και σε άλλους βλεννογόνους (Slütter et al. 2008).

A.4. Σχεδιασμός ρινικών σκευασμάτων

Λαμβάνοντας υπόψη όλους τους παράγοντες που καθιστούν τη ρινική χορήγηση μία μεγάλη πρόκληση, ο επιστήμονας, που καλείται να σχεδιάσει ένα καινούργιο σκεύασμα, πρέπει να χρησιμοποιήσει τα διαθέσιμα εργαλεία-γνώσεις για να φτιάξει ένα προϊόν ικανό να βγει στην αγορά και να βοηθήσει τους ασθενείς. Η μορφή, αν θα είναι δηλαδή υγρό, στερεό ή πήκτωμα, τα έκδοχα και η συσκευή χορήγησης αποτελούν τους βασικούς άξονες γύρω από τους οποίους μπορεί να κινηθεί στην προσπάθειά του ο επιστήμονας.

A.4.1 Μορφές

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να καταστεί σαφές, ότι η επιλογή του κατάλληλου φορέα και συσκευής χορήγησης μπορεί να κάνει μεγάλη διαφορά στο θεραπευτικό αποτέλεσμα και την απορρόφηση. Οι διάφορες διαθέσιμες συσκευές αναλύονται στην παράγραφο A.4.3. Ο όρος φορέας αναφέρεται στο σύνολο εκδόχων που θα συνδυαστούν με το φάρμακο για να δώσουν την τελική μορφή. Ανάλογα, βέβαια, με τα χαρακτηριστικά της δραστικής υπάρχει δυνατότητα μορφοποίησης του φαρμάκου σε υγρή, στερεή, ημιστερεή μορφή, αλλά και σε πιο τεχνολογικά εξελιγμένες και σύγχρονες μορφές όπως τα λιποσώματα .

Ένα φαινόμενο που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα όσον αφορά στις διάφορες μορφές είναι η «μεταμόρφωση» του φορέα. Αυτό σημαίνει, ότι όταν βρεθεί στο περιβάλλον της ρινικής κοιλότητας το σκεύασμα, ενδέχεται να αλλάξει τα φυσικοχημικά του χαρακτηριστικά και κατ' επέκταση τη μορφή του. Η πρόβλεψη αυτού του φαινομένου είναι πολύ χρήσιμη και μας επιτρέπει να φτιαχτεί ένα προϊόν που, όχι μόνο θα είναι εύκολο στη χρήση, αλλά όταν χορηγείται θα μεταβάλλεται με τέτοιο τρόπο που θα βελτιστοποιείται και η απορρόφηση. Τη γνώση του φαινομένου δεν την έχουν εκμεταλλευτεί ακόμα οι επιστήμονες στο έπακρο, υπάρχουν όμως *in situ* μορφοποιήσεις, οι οποίες είναι σχεδιασμένες με τέτοιο τρόπο που «μεταμορφώνονται», μόλις χορηγηθούν (Bitter et al. 2011).

A.4.1.1. Υγρές

Σε αυτή την κατηγορία κατατάσσονται τα υγρά σπρέι και οι σταγόνες. Όπως συμβαίνει και με τις άλλες οδούς χορήγησης, αυτή η μορφοποίηση είναι η πιο απλή και βολική. Το δραστικό συστατικό βρίσκεται ήδη διαλυμένο έτοιμο να απορροφηθεί, όμως μειονεκτεί σημαντικά ως προς τη σταθερότητα. Επιπλέον, σε αυτή τη μορφή παρατηρείται η μεγαλύτερη μεταβλητότητα απορρόφησης, αφού είναι πιο ταχεία η απομάκρυνση του σκευάσματος από τη ρινική κοιλότητα και γι' αυτό έχει παρατηρηθεί και μεγαλύτερη πιθανότητα υπερδοσολογίας. Η συγκεκριμένη μορφή προτιμάται για φάρμακα που προορίζονται για τοπική δράση.

Σε αυτή την ομάδα μπορούν να προστεθούν και τα εναιωρήματα. Αφορά δραστικά συστατικά με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, όμως δεν προτιμούνται επειδή οι ημιστερεές μορφές υπερτερούν.

A.4.1.2. Ημιστερεές

Αρχικά, σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα γαλακτώματα. Όπως και στην *per os* χορήγηση, τα γαλακτώματα παρέχουν ανώτερη βιοδιαθεσιμότητα έναντι των εναιωρημάτων σε φάρμακα με χαμηλή διαλυτότητα. Αυτή η παρατήρηση έγκειται στην καλύτερη διαλυτοποίηση του δραστικού συστατικού στα γαλακτώματα, αλλά και στα έκδοχα που βελτιώνουν την απορρόφηση των μορφοποιήσεων. Το ίδιο ισχύει και στη ρινική χορήγηση, όπως διαπίστωσαν οι συγγραφείς. Επίσης, νανογαλακτώματα έχουν προταθεί για τη διάβαση από τη ρινική κοιλότητα απευθείας στο κεντρικό νευρικό σύστημα υπερπηδώντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Έπειτα έχουμε τις γέλες ή πηκτώματα, με τα οποία ασχοληθήκαμε πειραματικά στην παρούσα εργασία. Πρόκειται για ημιστερεές ουσίες, οι οποίες απαρτίζονται από ένα υγρό σώμα και από παράγοντες αύξησης ιξώδους που προσδίδουν στο σύστημα ιδιαίτερες ρεολογικές ιδιότητες. Η σκληρότητα της σύστασης μπορεί να κυμαίνεται από ένα υδαρές διάλυμα σε ένα πηκτό ζελέ. Οι μηχανικές ιδιότητες που θα προσδοθούν στη μορφοποίηση εξαρτώνται από τη φύση του πολυμερούς ή των πολυμερών που θα συνδυαστούν, τη συγκέντρωσή τους και τη θερμοκρασία. Τη θερμοκρασία δεν μπορεί να ελεγχθεί, οπότε η επιλογή του πολυμερούς και της ποσότητας που θα βάλουμε είναι κρίσιμη. Οι υδρογέλες ως μορφοποιήσεις για ρινική χορήγηση διαθέτουν βιοπροσκολλητικές ιδιότητες, ώστε να αυξάνουν τη διάρκεια παραμονής τους στο επιθήλιο, αλλά και να μειώνουν την ταχύτητα της βλεννοκροσσώτης κάθαρσης. Η βιοπροσκόλληση είναι μία περίπλοκη διαδικασία, επειδή τα συστατικά του σκευάσματος αλληλεπιδρούν με τα στοιχεία της ρινικής κοιλότητας. Το πολυμερές διασπείρεται στην επιφάνεια και εγκαθίσταται μεγιστοποιώντας το χρόνο επαφής και παραμονής του φαρμάκου και κατά συνέπεια την βιοδιαθεσιμότητα (Chaturvedi et al. 2011).

In situ γέλες είναι μία παραλλαγή των ημιστερεών μορφών, όπου το σύστημα έχει πολύ χαμηλό ιξώδες για να μπορεί να ψεκάζεται με απλή συσκευή δοσομετρητή στη μύτη και περιέχει ειδικό πολυμερές που στο περιβάλλον του βλεννογόνου να μετατρέπεται σε πήκτωμα. Παράγοντες, όπως θερμοκρασία, pH και ιοντική ισχύς της ρινικής κοιλότητας διαφέρουν από το αρχικό σκεύασμα με αποτέλεσμα με αποτέλεσμα

να προκαλούνται αλλαγές στην φυσική κατάσταση του συστήματος (Mahdi et al. 2015).

A.4.1.3. Στερεές

Οι στερεές μορφές παρασκευάζονται με απλή ανάμειξη των εκδόχων με το φάρμακο με τη μέθοδο είτε της λυοφιλοποίησης, είτε του ψεκασμού-ξηρανσης (spray-drying). Οι συγκεκριμένες μορφές βασίζονται στο μηχανισμό της βιοπροσκόλλησης. Στο μείγμα μπορεί να προσθεθούν πολυμερή, τα οποία στο περιβάλλον της ρινικής κοιλότητας έχουν την ικανότητα να προσροφούν νερό και να σχηματίσουν μία γέλη ή πήκτωμα πολλαπλασιάζοντας τη διάρκεια παραμονής. Αυτό είναι ένα είδος μεταμόρφωσης του συστήματος. Η χρήση αυτής της μορφοποίησης επιδεικνύει μεγάλες προοπτικές για τη ρινική χορήγηση πεπτιδίων χάρη στα πλεονεκτήματα της διαδικασίας παρασκευής και της σταθερότητας που παρέχει. Αυτή η δυνατότητα μελετήθηκε ήδη από νωρίς το 1984, αλλά μία σειρά προβλημάτων παρουσιάστηκε στην πορεία ανάπτυξης ενός τέτοιου προϊόντος.

Δυστυχώς, ακόμα και σήμερα εκατομμύρια ασθενείς δεν μπορούν να αποφύγουν πλήρως την παρεντερική χορήγηση ινσουλίνης, εξαιτίας της ανωτερότητας των ενέσεων ως προς την ακρίβεια των δόσεων και την επαναλήψιμη αποτελεσματικότητα. Ένα από τα βασικότερα προβλήματα στην ανάπτυξη στερεών ρινικών σκευασμάτων είναι η αδυναμία ταχείας απομάκρυνσης των στερεών σωματιδίων από την επιφάνεια του βλεννογόνου με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η απορρόφηση μετά από επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις. Αν και αυτό μπορεί να τροποποιηθεί με την επιλογή κατάλληλων πολυμερών και αναλογιών, η βιοπροσκόλληση δεν είναι η ιδανική λύση. Ωστόσο, φαίνεται πως οι στερεές ρινικές μορφές όσο περισσότερη ώρα παραμένουν προσκολλημένες, τόσο μεγαλύτερη η βιοδιαθεσιμότητα τουλάχιστον για την πρώτη χορήγηση. Οι πιο κρίσιμοι παράγοντες που επηρεάζουν την βιοπροσκόλληση και κατ' επέκταση την απόρροφηση είναι η προσρόφηση νερού από το ρινικό περιβάλλον, το ιζώδες του συστήματος στο σημείο εφαρμογής και η διάλυση των συστατικών του συστήματος. Πάντως, στερεές μορφοποιήσεις πρέπει να λαμβάνουν υπόψη ότι σωματίδια μικρότερα από 10μm μπορούν να περάσουν στο κατώτερο αναπνευστικό, άρα η αεροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων θέλει προσοχή κατά το σχεδιασμό (Ugwoke et al. 1999).

A.4.1.4. Νανοτεχνολογικές

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για ρινικά σκευάσματα που περιέχουν λιποσώματα, μικροσφαιρίδια ή νανοσωματίδια. Ακόμα, όμως, δεν είναι ξεκάθαρο αν τα σύνθετα αυτά συστήματα πλεονεκτούν έναντι των υπόλοιπων μορφοποιήσεων ως προς την απορρόφηση. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται εδώ έχουν βιοπροσκολλητικές ιδιότητες και ενισχύουν την απορρόφηση, αλλά ενδεχομένως να αλληλεπιδρούν διαφορετικά με το ανοσοποιητικό σύστημα και τους διάφορους υποδοχείς και πρωτεΐνες λόγω του μεγέθους των σωματιδίων. Αυτή η προσέγγιση στο σχεδιασμό είναι προτιμότερη για εμβόλια παρά για φάρμακα με συστηματική δράση. Η παραγωγή τέτοιων μορφοποιήσεων παρουσιάζει μεγάλα εμπόδια στην εφαρμογή της σε

βιομηχανικό επίπεδο και στην ευρεία χρήση, ώστε να καθίσταται δύσκολη η επιλογή τους τουλάχιστον μέχρι να βρεθούν επαρκή δεδομένα που να υποστηρίζουν την ανώτερη ποιότητά του (Mara Mainardes et al. 2006).

Φαίνεται, επίσης, από *in vitro* μελέτες, ότι τα νανοσωματίδια προσλαμβάνονται από τον ρινικό ιστό ανάλογα με το μέγεθος και τα χαρακτηριστικά της επιφάνειάς τους χωρίς απαραίτητα μεταφέρονται σε μεγάλο βαθμό στον ιστό. Ωστόσο, *in vivo* μοντέλα υποδηλώνουν ότι τα σωματίδια μπορούν να παραληφθούν από Μ-κύτταρα στο ΛΙΡΚ, να μεταφερθούν στο λεμφικό σύστημα και από εκεί στην κυκλοφορία του αίματος. Σε αρουραίους μια τέτοια μεταφορά είναι της τάξης του 2-3% της χορηγηθείσας δόσης σε διάστημα 3 ωρών έκθεσης. Αυτό παρέχει μια εξήγηση για τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα που φαίνεται να έχουν τα συστήματα νανοσωματιδίων που δίδονται ρινικά. Αντίθετα, νανοσωματιδιακά συστήματα είναι ιδανικά για την παράδοση ρινικού εμβολίου. Νανοσωματίδια που περιέχουν (ή επικαλύπτονται με) αντιγονικές ύλες μεταφέρονται στον λεμφικό ιστό από τα Μ-κύτταρα. Για εμβολιασμό απαιτούνται πολύ χαμηλότερες ποσότητες υλικού προκειμένου να επιτευχθεί ανοσοποιητικό απόκριση σε σύγκριση με την ανάγκη για υψηλά επίπεδα φαρμάκων για θεραπευτική απόκριση. Ωστόσο, απαιτείται πολλή δουλειά για τη βελτιστοποίηση αυτών των ειδικά συστημάτων νανοσωματιδίων για τη χορήγηση εμβολίων όσον αφορά το βέλτιστο μέγεθος σωματιδίων και χαρακτηριστικά επιφάνειας (Illum 2007).

A.4.2 Έκδοχα ρινικών σκευασμάτων: Βελτιωτικά απορρόφησης και παράγοντες αύξησης ιξώδους

Μία πληθώρα υλικών έχουν εγκαθιδρυθεί στη φαρμακευτική επιστήμη ως απόλυτα ασφαλή και χρήσιμα έκδοχα για την παρασκευή φαρμάκων. Ανάλογα με την επιθυμητή μορφή και τις ιδιότητές της, συνδυάζονται διάφορα έκδοχα και δοκιμάζονται ποικίλες συνταγές έως ότου επιτευχθεί ο στόχος. Η διαδικασία του σχεδιασμού, λοιπόν, προϋποθέτει γνώση περί των υλικών. Πιο συγκεκριμένα, στη ρινική χορήγηση ενδιαφέρον έχουν υλικά που επιτρέπουν την μεγιστοποίηση της απορρόφησης του δραστικού συστατικού και του χρόνου ζωής του προϊόντος. Τέτοια υλικά πρέπει να μπορούν να ενισχύουν τη διαπέραση, να προκαλούν βιοπροσκόλληση, να βελτιώνουν τα χαρακτηριστικά του φαρμάκου, όπως διαλυτότητα, ή ένα συνδυασμό των παραπάνω. Υλικά που ενισχύουν τη διαπέραση από τη μεμβράνη εντείνουν την ανησυχία για την ασφάλειά τους, γιατί όσο αυξάνεται η χαλάρωση των επιθηλιακών κυττάρων αυξάνεται και η πιθανότητα βλάβης.

A.4.2.1. Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη [2-αμινο-2-δεοξυ-(1→4)-β-d-γλυκοπυρανάνη] είναι ένας γραμμικός κατιονικός πολυσακχαρίτης που παραλαμβάνουμε από την απακετυλίωση της χιτίνης ένα φυσικό προϊόν από τα κελύφη καρκινοειδών (υποσυννομοταξία των αρθροπόδων) και κυτταρικά τοιχώματα μυκήτων. Ο συγκεκριμένος πολυσακχαρίτης αναφέρεται στη συντριπτική πλειοψηφία των δημοσιεύσεων που πραγματεύονται τη ρινική χορήγηση. Κάτι τέτοιο ήταν εύλογο, εφόσον η χιτοζάνη είναι βιοδιασπώμενη, βιοσυμβατή, οικονομική, βιοπροσκολλητική, βλετιώνει τη διαπέραση και φυσικά δεν είναι τοξική ή

ερεθιστική. Επιπλέον, λόγω της ελεύθερης αμινομάδας δεν διαλύεται σε ουδέτερο και αλκαλικό pH, ωστόσο υπάρχει η δυνατότητα να σχηματίσει αλάτια όταν αντιδράσει με οξέα, όπως το γλουταμικό, το υδροχλωρικό, το λακτικό και το οξικό. Έτσι, επιτυγχάνονται βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Τελικά, η χιτοζάνη μπορεί να χαρακτηριστεί από το μοριακό βάρος και το είδος του αλατιού που σχηματίζει.

Ένα περαιτέρω πλεονέκτημα της χιτοζάνης είναι ότι τα διαλύματά της μετατρέπονται σε πηκτώματα σε θερμοκρασία σώματος, καθιστώντας την εξαιρετική επιλογή για σχεδιασμό *in situ* γελών. Παράλληλα, έχει συγκριθεί η απορρόφηση φαρμάκων με και χωρίς χιτοζάνη και διαπιστώθηκε ότι αυξάνει δραστικά την απορρόφηση. Εν μέρει αυτό οφείλεται στη βιοπροσκόλληση και την παραγωγή πηκτωμάτων, αλλά έχει αποδειχθεί ότι βοηθάει την παρακυττάρια διάβαση υδρόφιλων φαρμάκων διευρύνοντας το στενό χάσμα μεταξύ κυττάρων. Η πρωτεϊνική κίνηση C ρυθμίζει την απόσταση μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και η χιτοζάνη και άλλα πολυκατιονικά υλικά την επηρεάζουν διευκολύνοντας την παρακυττάρια διάβαση. Τέλος, πρέπει να τονιστεί, ότι διαλύματα χιτοζάνης μεγαλώνουν δόσοεξαρτώμενα το άνοιγμα των κυτταρικών κενών, αλλά όχι τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, τα οποία φαίνεται να επιτυγχάνουν τις υψηλές απορροφήσεις με άλλους μηχανισμούς (Illum 2007).

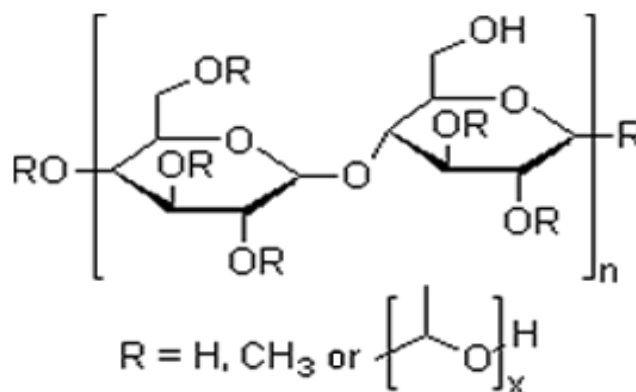
A.4.2.2. Άμυλο και παράγωγά του

Το άμυλο είναι ένα από τα πιο αρχαία υλικά που έχει ανακαλύψει η ανθρωπότητα, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι χρησιμοποιήθηκε από ανθρώπους πριν από 100.000 χρόνια. Αυτό το γεγονός ήταν αναμενόμενο, διότι το άμυλο περιέχεται σε πολλές από τις βασικές τροφές και εμφανίζει πολλαπλά οφέλη και χρήσεις. Ανήκει στους πολυσακχαρίτες με μόνο δομικό λίθο τη γλυκόζη φτιάχνοντας πολύπλοκα πολυμερή που διαφέρουν ανάλογα με το φυτό προέλευσης. Στη φαρμακευτική αυτή η ουσία δεν έμεινε ανεκμετάλλευτη, αφού είναι δεδομένο ότι είναι ασφαλές και σχηματίζει πηκτώματα που συγκρατούν τα μόρια του νερού σταθερά σε μία επιφάνεια για αρκετή ώρα.

Επιπρόσθετα, η σύγχρονη τεχνογνωσία μας επιτρέπει τη βελτίωση των ιδιοτήτων του αμύλου ακόμα περισσότερο με κατάλληλες τεχνικές. Μία καινούργια προσέγγιση που αποκτά αυξημένο ενδιαφέρον είναι τα μικροσφαιρίδια βιοδιασπώμενου αμύλου (MBA) (οι δεξτράνες και η αλβουμίνη είναι όμοιες εναλλακτικές). Τα MBA παρασκευάζονται με τον εγκλωβισμό του δραστικού σε σωματίδια μεγέθους μικρομέτρων. Ουσιαστικά, το άμυλο λειτουργεί ως επικάλυψη που όταν διασπάται στον οργανισμό απελευθερώνει σταδιακά το περιεχόμενο (Manjappa et al. 2010). Αυτή η μορφοποίηση έχει δείξει θετικά αποτελέσματα σε διάφορα φάρμακα και ταυτόχρονα μπορεί να λειτουργήσει συνεργιστικά με ενισχυτές διαπέρασης.

A.4.2.3. Παράγωγα κυτταρίνης

Ένας ακόμη πασίγνωστος πολυσακχαρίτης με βάση τη γλυκόζη είναι η κυτταρίνη, που αποτελεί το βασικότερο συστατικό κυτταρικών τοιχωμάτων φυτικών κυττάρων. Η μηχανική αντοχή της κυτταρίνης έγινε αμέσως αντιληπτή. Τα παράγωγα κυτταρίνης, όμως παρουσιάζουν τροποποιημένες ιδιότητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στη φαρμακευτική. Έχουν και αυτά βιοπροσκολλητικές ιδιότητες χάρη στην ικανότητά τους να σχηματίζουν γέλες, ελέγχοντας επίσης τη το ρυθμό διάχυσης. Πολλαπλές είναι σήμερα οι εφαρμογές τους σε αμέτρητους κλάδους και βιομηχανίες. Σε αντίθεση με το άμυλο, τα παράγωγα κυτταρίνης παρέχουν ατελείωτη ευελιξία, γιατί μπορούν να προσαρμοστούν για κάθε είδους χρήση. Με απλές μεθόδους μεταβάλλουμε τις ελεύθερες ομάδες και το βαθμό πολυμερισμού της κυτταρίνης στα μέτρα μας. Υδροξυπροπυλ-μεθυλοκυτταρίνη (HPMC), υδροξυπροπυλ-κυτταρίνη (HPC), καρβοξυμεθυλο-κυτταρίνη (CMC), μεθυλο-κυτταρίνη (MC) και αδιάλυτα παράγωγα κυτταρίνης, όπως είναι η μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (MCC) και η αιθυλο-κυτταρίνη είναι μερικά παραδείγματα εκδόχων που βελτιώνουν την απορρόφηση ρινικών φαρμάκων.



Εικόνα 11: χημική δομή HPMC.

Το HPMC είναι ένα παράγωγο κυτταρίνης το οποίο αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά έκδοχα στα φαρμακευτικά προϊόντα παρατεταμένης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης, εξαιτίας κυρίως της ιδιότητάς του να διογκώνεται. Διαλύεται τόσο σε υδατικά μέσα όσο και σε οργανικούς διαλύτες.

Συγκεκριμένα, το HPMC είναι ένα φαρμακολογικά αδρανές ιξωδοελαστικό και υδρόφιλο πολυμερές. Έχει τη χαρακτηριστική ιδιότητα της υψηλής διόγκωσης η οποία συμβαίνει ύστερα από επαφή με νερό ή βιολογικά υγρά. Αυτά διαχέονται μέσα στο σύστημα οδηγώντας σε επέκταση της πολυμερικής αλυσίδας και εν συνεχεία αύξηση του όγκου του συστήματος (Siermann and Peppas 2000). Σε σύγκριση με άλλα διογκωτικά πολυμερή τα οποία χρησιμοποιούνται με σκοπό την ελεγχόμενη αποδέσμευση ενός φαρμάκου, το HPMC είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο πολυμερές χάρη στην γρήγορη ενυδάτωσή του, την καλή συμπιεστότητα και τα χαρακτηριστικά γέλης που διαθέτει. Παράλληλα έχει πολύ χαμηλή τοξικότητα και είναι ευρέως διαθέσιμο για χρήση (Nokhodchi et al. 2012).

A.4.2.4. Πολυμερή ακρυλικού οξέος

Τα πολυμερή ακρυλικού οξέος έχουν εξεταστεί πολλές φορές για την χρήση τους στην φαρμακευτική ως βλεννοπροσκολλητικά και παράγοντες αύξησης ιξώδους. Αυτά χωρίζονται σε πολυακρυλικά ή καρβομερή και πολυκαρβόφιλα, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις συνθήκες που χρειάζονται για να γίνουν οι κατάλληλες συνδέσεις των μορίων και το πώς επηρεάζουν το ιξώδες. Οι μέχρι τώρα έρευνες δείχνουν υψηλή ασφάλεια στην επαναλαμβανόμενη χρήση των πολυμερών στο ρινικό βλεννογόνο χωρίς να του προκαλούν αξιοσημείωτη αλλοίωση. Επίσης, έχει παρατηρηθεί, ότι η αποδέσμευση από τις γέλες που σχηματίζουν καθυστερείται γεγονός που οδηγεί στην παρατεταμένη αποδέσμευση, πιο ελεγχόμενα επίπεδα στο αίμα και καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα. Σε σύγκριση με απλή λακτόζη, τα πολυμερή ακρυλικού οξέος αυξάνουν τη διάρκεια παραμονής ρινικών σκευασμάτων στο σημείο εφαρμογής εμποδίζοντας τη βλεννοκροσσώτη κάθαρση να τα απομακρύνει αμέσως. Τα καρβομερή έχουν δοκιμαστή και σε στερεές μορφοποιήσεις (Chaturvedi et al. 2011).

A.4.2.5. Κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες που απαρτίζονται από μονάδες γλυκόζης ενωμένες μεταξύ τους με α-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Με βάση τον αριθμό των μορίων γλυκόζης που φτιάχνουν την κυκλική αλυσίδα χωρίζονται σε α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνες με 6,7 και 8 μόρια γλυκόζης αντίστοιχα. Η στερεοχημική δομή των κυκλοδεξτρινών μοιάζει με κώνο, ώστε στο εσωτερικό τους να μπορούν να εγκλωβιστούν άπολα μόρια βελτιώνοντας τη διαλυτότητα σε υπό άλλες συνθήκες δυσδιάλυτα φάρμακα. Αυτός ο εγκλωβισμός παρέχει σαφή πλεονεκτήματα και στη σταθερότητα των ενώσεων, αφού το νερό δεν έχει εύκολη πρόσβαση στα συμπλοκοποιημένα μόρια για να τα υδρολύσει. Ταυτόχρονα όμως, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τη χοληστερόλη βιολογικών μεμβρανών τροποποιώντας με τέτοιο τρόπο τις ρεολογικές ιδιότητές τους, ώστε να διευκολύνεται η διαπέραση. Αυτή η δράση έχει προξενήσει ανησυχίες ως προς την ασφάλεια χορήγησης κυκλοδεξτρινών, οι οποίες αντιμετωπίστηκαν επιτυχώς με τα παράγωγα κυκλοδεξτρινών, όπως η διμέθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη, που εμφανίζουν ανώτερο προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών και ικανότητας εγκλεισμού (Merkus 1999).

A.4.3 Συσκευές χορήγησης

Ανεξάρτητα από τη μορφή και τα έκδοχα που θα επιλεγθούν η συσκευή χορήγησης είναι εξίσου σημαντική. Κατά κύριο λόγο η μορφή του σκευάσματος θα καθορίσει το είδος της συσκευής, όμως θα εξεταστούν και μερικές καινοτόμες ιδέες που μπορούν να βρουν ευρεία εφαρμογή. Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την απελευθέρωση του φορέα από τη συσκευή θα καθορίσουν και την τελική ποσότητα φαρμάκου που θα φτάσει στο ρινικό βλεννογόνο. Κύριοι μηχανισμοί είναι η πρόσκρουση των σωματιδίων, η διάχυση κατά Brown και η βαρυτική καθίζηση και δευτερεύοντες είναι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και η παρεμπόδιση. Μία άλλη σημαντική παράμετρος είναι η τεχνική του χειριστή, εφόσον η γωνία και το

σημείο εισαγωγής και η ιδιομορφία μίας συσκευής οδηγούν σε υψηλή μεταβλητότητα της δόσης (Kublik and Vidgren 1998).

A.4.3.1. Σταγονομετρικές συσκευές

Μία από τις πιο παλιές συσκευές χορήγησης είναι τα σταγονόμετρα. Πρόκειται για εξαιρετικά απλές και οικονομικές συσκευές που στερούνται την ακρίβεια της δόσης και την ευκολία χρήσης. Χρησιμοποιούνται μόνο για υγρές μορφοποιήσεις χωρίς όμως να τις προστατεύουν από επιμολύνσεις. Η σωστή εφαρμογή της δόσης με σταγόνες απαιτεί περίπλοκη και μη πρακτική τεχνική χορήγησης, όμως παραμένει αρκετά διαδεδομένη για φάρμακα αποσυμφόρησης λόγω της ευκολίας παραγωγής και του χαμηλού κόστους στον καταναλωτή. Για χορήγηση του σκευάσματος σε σταγόνες υπάρχει η απλούστερη επιλογή του πεπιεζόμενου φιαλιδίου, δηλαδή ένα πλαστικό φιαλίδιο, που όταν το πιέξεις εξωθεί το υγρό περιεχόμενο. Τα πεπιεζόμενα φιαλίδια δεν είναι τίποτα παραπάνω από μία εκδοχή σταγονομετρικής συσκευής (Bhise et al. 2008).

A.4.3.2. Ενστάλλαξη μέσω ρινικού καθετήρα

Οι *in vivo* μελέτες χρειάζονται μεγάλη ακρίβεια και ελάχιστη μεταβλητότητα στη δόση και το σημείο εφαρμογής για να δώσουν έγκυρα αποτελέσματα. Για τέτοιου είδους πειραματικούς σκοπούς αυτή η συσκευή είναι ιδανική, ενώ δεν βρίσκει εφαρμογή για το ευρύ κοινό. Η συσκευή λειτουργεί ως εξής: Η δόση είναι προετοιμασμένη και με τη βοήθεια μίας σύριγγας μεταφέρεται μέσα από κατάλληλα τοποθετημένο καθετήρα στη ρινική κοιλότητα. Συνεπώς η χρήση της συσκευής γίνεται μόνο από ειδικό. Συνήθως, η συσκευή αυτή χρησιμοποιείται για υγρά, με μικρές τροποποιήσεις, όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για στερεά και αέρια (Hughes et al. 1993).

A.4.3.3. Περιέκτες μονοδόσεων

Σημαντικό πλεονέκτημα των μονοδόσεων έναντι των άλλων συσκευών αποτελεί η δυνατότητα αποφυγής προσθήκης συντηρητικών. Πολλά φάρμακα που είναι ευαίσθητα και κοστίζουν εκτεταμένα στον παραγωγό θα μπορούν να παρασκευάζονται με στείρες διεργασίες ή να αποστειρώνονται στον τελικό γυάλινο περιέκτη με μειωμένα ή χωρίς καθόλου συντηρητικά. Οι μονοδόσεις μπορούν να χορηγηθούν από φιαλίδιο μίας χρήσης, είτε στάγδην, είτε με μηχανισμό ψεκασμού. Στην περίπτωση του ψεκασμού μάλιστα υπάρχει και η επιλογή της διπλής μονοδόσης, μία για κάθε ρουθούνι. Όπως είναι λογικό οι σταγόνες στην πρώτη εκδοχή αντιμετωπίζουν τα ίδια προβλήματα ακρίβειας με τις προηγούμενες συσκευές, όχι όμως και ο ψεκασμός (Kublik and Vidgren 1998).

A.4.3.4. Συσκευές ψεκασμού δοσομετρικής αντλίας

Τη σήμερα ημέρα το μεγαλύτερο ποσοστό των υγρών ρινικών σκευασμάτων φαρμακευτικών και μη διατίθενται στην αγορά σε συσκευές με δοσομετρητή. Οι συσκευές αυτές απελευθερώνουν συγκεκριμένο όγκο με σταγονίδια συγκεκριμένου μεγέθους κατευθείαν στη ρινική κοιλότητα με ένα απλό πάτημα. Ανάλογα και με τα χαρακτηριστικά του υγρού φορέα η συσκευή μπορεί να ρυθμιστεί από τον κατασκευαστή, ώστε να αποδεσμεύει κάθε φορά την ίδια επιθυμητή ποσότητα με την ίδια ταχύτητα. Αν και οι συσκευές αυτές είναι ανώτατης ποιότητας για υγρές μορφοποιήσεις η γωνία και το βάθος τοποθέτησης του στομίου θα επηρεάσει την κατανομή στα διάφορα διαμερίσματα της ρινικής κοιλότητας.

Πέρα από τις κλασικές συσκευές ψεκασμού έχουν αναπτυχθεί και πιο εξελιγμένες εκδόσεις τους με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Δύο από τις σημαντικότερες είναι οι συσκευές κενού και νεφελοποιητές συμπίεσμένου αέρα. Οι συσκευές κενού είναι αεροστεγώς σφραγισμένες, ώστε να εμποδίζουν την είσοδο αέρα στον περιέκτη. Η απουσία αέρα εντός του περιέκτη σημαίνει και απίθανη ανάπτυξη μικροβίων, άρα δεν θα χρειάζονται τη χρήση συντηρητικών. Ωστόσο, ερμητικά σφραγισμένοι περιέκτες για να κατασκευαστούν χρειάζονται ανθεκτικά και ακριβά υλικά. Από την άλλη πλευρά, οι νεφελοποιητές δε χρησιμοποιούν κενό αλλά ένα αδρανές αέριο υπό πίεση. Ο νεφελοποιητής δίνει τη δυνατότητα προσαρμογής της δόσης και των σταγονιδίων που απελευθεώνει για την ορθότερη μελέτη όλων των παραγόντων μεταβλητότητας ταυτόχρονα δυσχεραίνοντας τη χρήση του από τον ασθενή εξαιτίας της υψηλής πολυπλοκότητας της συσκευής (Der Yu et al. 1984).

A.4.3.5. Συσκευές για ημιστερεές μορφές

Το υψηλό ιξώδες των ημιστερεών μορφών δυσκολεύει σημαντικά τη χρήση των μέχρι τώρα γνωστών συσκευών, διότι είναι αδύνατον να μετατραπεί σε μικροσκοπικά σωματίδια που θα διαχυθούν ομοιόμορφα στο βλεννογόνο. Επομένως, οι ημιστερεές μορφές αντιμετωπίζουν δύο σημαντικά προβλήματα στο σχεδιασμό συσκευής χορήγησής τους. Πρώτον, πώς θα φτάσει το σκεύασμα στα δύσκολα προσβάσιμα σημεία υψηλής απορρόφησης της ρινικής κοιλότητας και δεύτερον, πώς θα ρυθμίζεται η δοσολογία. Σε αυτή τη φάση μόνο σε πειραματικό επίπεδο υπάρχουν συσκευές ικανές να λύσουν αυτά τα δύο προβλήματα και δεν ξέρουμε κατά πόσο θα είναι αποδεκτές από τους ίδιους τους ασθενείς. Η μόνη παρούσα συσκευή-περιέκτης είναι σωληνάκια με μακρόστενο στόμιο για τη χορήγηση στη μύτη, στα οποία δεν μπορούμε να μετρήσουμε τη δόση παρά μόνο για τοπικά δρώντα φάρμακα (Vyas et al. 2006).

A.5. Βασικά φυσικοχημικά φαινόμενα και έννοιες

Η διπλωματική εργασία ασχολείται διεξοδικά με τη μελέτη ρινικής διαπέρασης ενός πηκτώματος δονεπεξίλης. Πρέπει πρώτα λοιπόν, να γίνουν κατανοητοί επακριβώς τους μηχανισμούς διαπέρασης, αλλά και τη συμπεριφορά του πηκτώματος για την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Σε αυτό το σημείο, θα αποσαφηνιστούν κάποιες έννοιες, οι οποίες θα μας φανούν χρήσιμες στη συνέχεια.

A.5.1 Ιξώδες

Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά ενός ημιστερεού σκευάσματος είναι το ιξώδες του. Το ιξώδες διαδραματίζει κατευθυντήριο ρόλο στο σχεδιασμό οποιουδήποτε φαρμακευτικού σκευάσματος, όχι μόνο επειδή ενδέχεται να επηρεάζει τη δράση του σκευάσματος, αλλά και επειδή σχετίζεται με την εμπειρία του ασθενή από τη χορήγηση.

Το ιξώδες συμβολίζεται με το ελληνικό γράμμα η (ή μ σε κάποιες βιβλιογραφίες) και περιγράφει, βάσει ορισμού, την αντίσταση ενός σώματος στην παραμόρφωση ή πιο απλά πόσο παχύρευστο είναι. Με τις υδρογέλες να αποτελούν το σημείο αναφοράς της εργασίας, επικεντρώθηκε περισσότερη προσοχή στα υγρά σώματα. Το ιξώδες είναι ένα φυσικό μέγεθος που αναπαριστά τις συγκρούσεις μεταξύ γειτονικών σωματιδίων ενό ρευστού, όταν αυτό κινείται. Για παράδειγμα, όταν ένα υγρό ρέει μέσα από ένα σωλήνα, τότε παρατηρούμε ότι κοντά στα τοιχώματα του σωλήνα το υγρό ρέει με μικρότερη ταχύτητα από ότι στο κέντρο του.

Μηδενικό ιξώδες μπορεί να μετρηθεί μόνο σε υπερρευστά και σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες, όπου δεν εμφανίζουν αντίσταση σε τάση διάτμησης. Όλα τα ρευστά λόγω του δεύτερου θερμοδυναμικού νόμου έχουν, συνεπώς, θετικό ιξώδες. Ρευστά με υψηλό ιξώδες ονομάζονται ημιστερεά λόγω της πολύ αργής ροής τους. Ταυτόχρονα, υπάρχουν και κάποια ρευστά που δεν εμφανίζουν σταθερό ιξώδες, δεν συμπεριφέρονται δηλαδή με βάση τους νόμους του Νεύτωνα, το οποία αλλάζουν συμπεριφορά όταν αναδεύονται και ονομάζονται θιξότροπα ή μη-νευτωνικά ρευστά (Symon 1980).

Μία υδρογέλη από πολυμερές κυτταρίνης, όμως, έχει σταθερό ιξώδες που εξαρτάται από τη θερμοκρασία και την περιεκτικότητα του πολυμερούς. Για να μετρηθεί χρησιμοποιείται το ιξωδόμετρο. Η αρχή λειτουργίας όλων των ιξωδομέτρων βασίζεται στην αντίσταση των ρευστών, όταν ρέουν. Είτε το ρευστό παραμένει σταθερό και ένα αντικείμενο το διαπερνά, είτε το ρευστό περνά από ένα αντικείμενο.

Αν και υπάρχει μια πληθώρα τύπων ιξωδομέτρων, το περιστρεφόμενο ιξωδόμετρο είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα ιξωδόμετρα στις βιομηχανίες. Το συγκεκριμένο όργανο μπορεί και ανιχνεύει την αντίσταση, που εμφανίζει ένα ειδικό εξάρτημα (spindle) που εμβαπτίζουμε στο ρευστό ενώ περιστρέφεται. Η μονάδα μέτρησης αυτών των οργάνων λέγεται centipoise (cps ή cP) που αντιστοιχεί σε millipascal-second (mPa·s) σε μονάδες SI (Lide and Kehiaian 1994).

A.5.2 Διαπέραση

Η διαδικασία, κατά την οποία μία ουσία περνά μέσα από ένα στερεό σώμα ονομάζεται διαπέραση. Η ικανότητα ενός σώματος να επιτρέπει τη διαπέραση άλλων ουσιών ονομάζεται διαπερατότητα. Το κυριότερο μοντέλο διαπέρασης ορίζεται από τους νόμους του Fick για τη διάχυση. Σύμφωνα με αυτούς τους νόμους η ταχύτητα κίνησης της ουσίας μέσα από το στερεό σώμα σχετίζεται άμεσα με τη διαπερατότητα του στερεού, τη διαφορά συγκέντρωσης και την ικανότητα διάχυσης της ουσίας.

Παρόλο που διαπέραση μπορεί να συμβεί μεταξύ διάφορων υλικών, στη φαρμακευτική επιστήμη μας ενδιαφέρει κυρίως η διαπέραση ουσιών σε υγρά μέσα μέσα από ημιπερατές μεμβράνες. Η διαπέραση, στην περίπτωση της διάχυσης, πραγματοποιείται πάντα από τις περιοχές υψηλής συγκέντρωσης στις περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης. Εξωτερικοί παράγοντες μπορούν εξίσου να επηρεάσουν τη διαπέραση, όπως θερμοκρασία και πίεση. Η μέτρηση της ταχύτητας κίνησης των μορίων, ωστόσο, μπορεί να μετρηθεί στις περιοχές πίσω από τη μεμβράνη που δεν είχαν προηγουμένως ουσία, ώστε να βγάλουμε συμπεράσματα σχετικά με τον τρόπο διαπέρασης (Massey 2003).

A.5.2.1 Διαπέραση από βιολογικές μεμβράνες

Πιο συγκεκριμένα, η διαπέραση μέσα από βιολογικές μεμβράνες ακολουθεί συγκεκριμένους μηχανισμούς μεταφοράς. Οι βιολογικές μεμβράνες αποτελούνται από διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων μέσα στην οποία βρίσκονται ενσωματωμένες πρωτεΐνες και άλλες ουσίες, που τις καθιστούν αρκετά μοναδικές δομές. Η σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης των έμβιων όντων είναι τόσο περίπλοκη και μοναδική που στην βιολογία ονομάζεται μωσαϊκό. Η μελέτη του μωσαϊκού είναι ένα τεράστιο πεδίο έρευνας, όμως στη διαπέραση μπορούμε να κατατάξουμε τη μεταφορά ουσιών σε ενεργή και παθητική.

Η παθητική μεταφορά ουσιών μέσα από βιολογικές μεμβράνες γίνεται αυθόρμητα στη φύση λόγω του φαινομένου της διάχυσης. Η διάχυση επιτρέπει σε σχετικά άπολα μόρια μικρού μοριακού βάρους να περάσουν μέσα από τις δομές μιας μεμβράνης με κατεύθυνση από τις περιοχές υψηλής συγκέντρωσης στις περιοχές χαμηλή. Αν ο ρυθμός μεταφοράς της ουσίας περιγράφεται από το νόμο του Fick, τότε έχουμε απλή διάχυση (Fickian diffusion). Σε αντίθετη περίπτωση, η διάχυση είναι ανώμαλη (non-Fickian diffusion). Κάποιους από τους κανόνες της διάχυσης το κύτταρο μπορεί να τους προσπεράσει με την αρωγή ειδικών πρωτεϊνών-μεταφορέων. Μόρια υψηλού μοριακού βάρους και φορτισμένα ιόντα, που δεν είναι ικανά να διαπεράσουν μία βιολογική μεμβράνη, συνδέονται με πρωτεΐνες στην επιφάνεια της διπλοστιβάδας και φτάνουν στην άλλη πλευρά. Αυτή η μεταφορά ονομάζεται διευκολυνόμενη διάχυση.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν περιπτώσεις που δεν είναι επιθυμητή η διάχυση στη γνωστή κατεύθυνση, αλλά προς την αντίθετη. Το πρόβλημα λύνεται με την ενεργή μεταφορά, η οποία επιτρέπει στα κύτταρα να ελέγχουν καλύτερα τη διαπέραση ουσιών με κόστος μία ποσότητα ενέργειας.

Εκτός από τη διαπέραση, τα κύτταρα διαθέτουν και μία άλλη μέθοδο μεταφοράς ουσιών, την ενδοκυττάρωση και την εξωκυττάρωση. Αυτές οι μέθοδοι συμβαίνουν σε ειδικές περιστάσεις μεγαλομοριακών ενώσεων ακόμα και μικροοργανισμών, επομένως δεν αφορά τα φάρμακα. Το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα εντοπίζεται στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, όπου τα φαγοκύτταρα ενδοκυτταρώνουν αντιγόνα (φαγοκυττάρωση) προκειμένου να τα αντιμετωπίσουν.

A.5.2.2 Οι νόμοι του Fick

Το 1855 ο Γερμανός γιατρός Adolf Eugen Fick διατύπωσε τη θεωρία του για τη διάχυση. Μελετώντας τη συμπεριφορά ουσιών σε διαλύματα όταν αυτές διαχέονται κατέγραψε κάποιες μαθηματικές σχέσεις για να την ερμηνεύσει.

Ο πρώτος νόμος του Fick: $J = -D \frac{dC}{dx} = \frac{dM}{S dt}$

J : ροή

D : συντελεστής διάχυσης, σταθερά διάχυσης ή διαχυτικότητα

C : συγκέντρωση

x : απόσταση

M : μάζα

S : επιφάνεια

t : χρόνος

Με το αρνητικό πρόσημο η εξίσωση αποτυπώνει την κίνηση από το χώρο υψηλής στο χώρο χαμηλής συγκέντρωσης. Επίσης, ο συντελεστής D δεν είναι πάντα σταθερός, καθώς αλλάζει σε υψηλές συγκεντρώσεις και επηρεάζεται από εξωτερικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η πίεση, η χημική φύση του διαχεόμενου υλικού και οι ιδιότητες του διαλύτη.

Δεύτερος νόμος του Fick: $\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} = -\frac{\partial J}{\partial x}$

Σε αντίθεσή με τον πρώτο νόμο, ο δεύτερος αποτυπώνει τις μεταβολές συγκέντρωσης σε σχέση με το χρόνο και την απόσταση.

Η ειδοποιός διαφορά των δύο νόμων είναι η σταθερή κατάσταση. Ο πρώτος νόμος ισχύει όταν ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης είναι σταθερός, δηλαδή $dC/dt=0$. Σε οποιαδήποτε άλλη περίπτωση εφαρμόζουμε το δεύτερο νόμο, ο οποίος υπολογίζει και το χρόνο t ως μεταβλητή.

A.5.2.3 Πειραματικές μέθοδοι για τη μελέτη της ρινικής απορρόφησης

Διατίθενται σήμερα αρκετά στοιχεία που υποστηρίζουν τη μεταφορά φαρμάκων στο κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω της ρινικής οδού τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους. Τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται στις μελέτες ρινικής χορήγησης αποσκοπούν στην ανίχνευση της απορρόφησης, της διαπέρασης, του τοξικολογικού, φαρμακοκινητικού και φαρμακοδυναμικού προφίλ. Τέτοιου είδους μοντέλα διαχωρίζονται σε 3 μεγάλες κατηγορίες ανάλογα το πού και πώς γίνονται: *in vivo*, *in vitro*, και *ex vivo* (Erdő et al. 2018).

A.5.2.3.1 In vivo μοντέλα

Τα πιο περίπλοκα και ταυτόχρονα τα πιο σημαντικά μοντέλα πειραμάτων είναι τα *in vivo* μοντέλα. Πιο ειδικά, στη ρινική χορήγηση μας ενδιαφέρει η ανατομία της ρινικής κοιλότητας του ζώου που θα επιλέξουμε. Αρχικά, δοκιμάστηκαν οι αρουραίοι και αργότερα προστέθηκαν ποντίκια, κουνέλια, σκύλοι, πρόβατα, και μαϊμούδες.

Τα ποντίκια και οι αρουραίοι είναι αρκετά χρήσιμα στις προκαταρκτικές μελέτες απορρόφησης από την μύτη κατευθείαν στον εγκέφαλο, ενώ τα υπόλοιπα για τις φαρμακοκινητικές μελέτες. Ωστόσο, κανένα ζωικό μοντέλο δεν είναι απαραίτητα αντιπροσωπευτικό για τους ανθρώπους λόγω των ανατομικών και φυσιολογικών μορφών που υπάρχουν.

Οι περιοριστικοί παράγοντες στην απορρόφηση από τη μύτη είναι η διαλυτότητα και η δραστηριότητα. Από τη μία η κάθαρση του φαρμάκου από τη ρινική κοιλότητα είναι πολύ γρήγορη και από την άλλη μέσω της οδού αυτής αποφεύγονται πολλές μεταβολικές διαδικασίες από το να απομακρύνουν τη δραστική ουσία. Άρα, αρκεί το φάρμακο να είναι διαλυμένο και να φτάσει στο φαρμακολογικό στόχο. Κάτι τέτοιο πολλές φορές χρειάζεται πολύ μικρότερες δοσολογίες σε σύγκριση με την *per os* χορήγηση για να επιτευχθεί.

Στα πειραματόζωα, με τη βοήθεια γεμισμένων πιπετών τοποθετείται το φαρμακευτικό σκεύασμα ποσότητας 5-50μL κατευθείαν στα ρουθούνια σε ύπτια θέση. Μετά τη χορήγηση λαμβάνονται δείγματα από το αίμα και στο τέλος και από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό για να καταγράψουμε και να αξιολογηθεί η απορρόφηση (Bhavna et al. 2014).

A.5.2.3.2 *In vitro* μοντέλα

Τα πλεονεκτήματα των *in vitro* μοντέλων συνδέονται με τη δυνατότητα που προσφέρουν στον ερευνητή να ελέγχει καλύτερα τις συνθήκες και με την εμβάθυνση στους μηχανισμούς μεταφορά και απορρόφησης. Κυρίως, δύο κυτταρικές σειρές, RPMI 2650 και CaCo-2, χρησιμοποιούνται για τη μίμηση του ρινικού επιθηλίου. Παρόλα αυτά συναντάμε πολλά μειονεκτήματα, όπως η αδυναμία προσομοίωσης των φυσιολογικών συνθηκών που επικρατούν σε έναν βλεννογόνο, όπως η παραγωγή βλέννας, η κάθαρση και η ανατομική μορφολογία. Αξίζει να σημειωθεί, ότι και τμηματικές αναγεννημένης κυτταρίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά σε τέτοιου είδους πειράματα (Schmidt et al. 1998).

A.5.2.3.3 *Ex vivo* μοντέλα

Σε μία προσπάθεια εξέλιξης των *in vitro* μοντέλων αναπτύχθηκαν τα ελαφρώς ανώτερα *ex vivo*. Αυτά τα μοντέλα βασίζονται στην αφαίρεση ιστών από ζώα. Ουσιαστικά απομονώνεται ο ρινικός βλεννογόνος από το επιλεγμένο ζώο και τοποθετείται ως μεμβράνη στις δομές *in vitro* μοντέλων. Ο απομονωμένος ιστός επιτρέπει στους επιστήμονες να ελέγξουν πιθανή τοξικότητα των εκδόχων και τη διαμεμβρανική διαπεράση. Ωστόσο, παραμένει μοντέλο περιορισμένων δυνατοτήτων, καθώς παύει να έχει αιματική ροή και να νεκρώνει. Αν και μπορούν να αντληθούν πολύτιμες πληροφορίες από *ex vivo* μοντέλα, υπάρχουν ακόμα μεγάλα εμπόδια στην προέκταση συμπερασμάτων σε μοντέλα *in vivo*.

A.5.2.3.4 Κύτταρα διάχυσης Franz

Μία *in vitro* και *ex vivo* τεχνική μελέτης της διάχυσης φαρμάκων από μεμβράνες είναι τα στατικά κύτταρα διάχυσης, γνωστά και ως κύτταρα Franz. Πρόκειται για μία δομή που αποτελείται από δύο κύριους θαλάμους, οι οποίοι ονομάζονται δότης και δέκτης και διαχωρίζονται από μεμβράνη. Στη διαδερμική χορήγηση έχουν μελετηθεί ποικίλα φάρμακα με αυτή την τεχνική χρησιμοποιώντας την κεράτινη στιβάδα ως μεμβράνη. Στην περίπτωση της ρινικής χορήγησης η αρχή λειτουργίας είναι ίδια, με τη διαφορά, ότι επιλέγουμε το ρινικό επιθήλιο του βλεννογόνου για μεμβράνη, ενώ έχει ήδη δοκιμαστεί για πηκτώματα (Horváth Tamás et al. 2015).

Στα κύτταρα Franz ο θάλαμος του δότη είναι ένας γυάλινος σωλήνας ανοιχτός και προς τις δύο πλευρές, ο οποίος εφάπτεται μέσω μιας μεμβράνης με το δέκτη. Ο δέκτης επίσης είναι ένας σωλήνας ίδιας διαμέτρου με δύο ανοιχτές πλευρές σε σχήμα του μικρού γράμματος ν. Η μία πλευρά του δέκτη βρίσκεται σε επαφή με το δότη, ενώ η άλλη μας δίνει πρόσβαση για δειγματοληψία. Ο δέκτης γεμίζει με διάλυμα που προσομοιώνει τις συνθήκες του αίματος και στο δότη εμβολιάζουμε το σκεύασμα.

Επειδή η θερμοκρασία πρέπει να είναι σταθερή, γιατί επηρεάζει σημαντικά τη διάχυση, το σώμα του δέκτη βρίσκεται βυθισμένος σε θερμαινόμενο λουτρό καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Επιπρόσθετα, πρέπει υποχρεωτικά σε όλο το σύστημα να επικρατούν συνθήκες δεξαμενής και το διάλυμα του δέκτη να είναι ομοιογενές. Για αυτό το σκοπό, στο δέκτη τοποθετούμε πάντα και έναν μαγνητικό αναδευτήρα. Για τη δειγματοληψία μετράμε ανά τακτά χρονικά διαστήματα τη συγκέντρωση φαρμάκου στο δέκτη και καταγράφουμε τις μετρήσεις.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός κυττάρου Franz.

A.6. Σχεδιασμός πειραμάτων

Ο σχεδιασμός πειραμάτων είναι μία συστηματική μέθοδος για τον προσδιορισμό της σχέσης μεταξύ παραγόντων που επηρεάζουν μία συγκεκριμένη διεργασία. Με άλλα λόγια, πρόκειται για μία μέθοδο διερεύνησης της σχέσης αιτίου και αιτιατού. Μέσα από τα συμπεράσματα του σχεδιασμού οι επιστήμονες μπορούν να ρυθμίζουν τις ανεξάρτητες μεταβλητές (τα x ή inputs), ώστε να βελτιστοποιήσουν τις εξαρτημένες μεταβλητές της διεργασίας (τα y ή outputs).

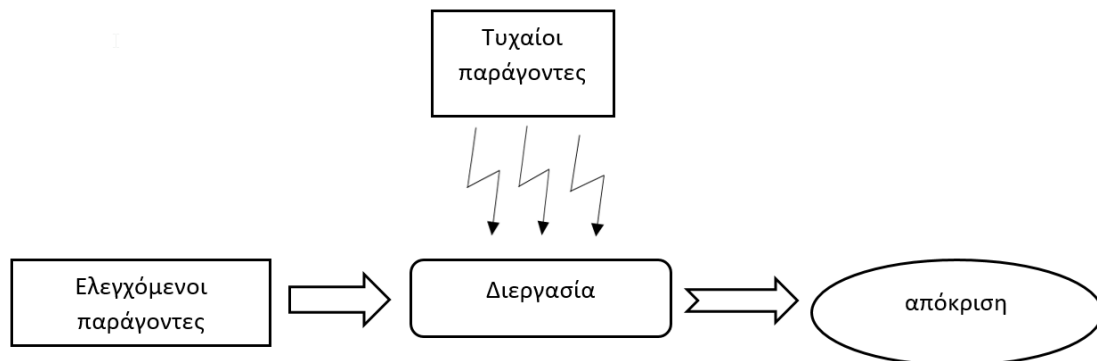
Όχι μόνο είναι ένα πολυχρηστικό εργαλείο, αλλά βρίσκει εφαρμογές σε πάρα πολλές επιστήμες. Ωστόσο, η χρήση του απαιτεί βασικές γνώσεις στη στατιστική και στην πρακτική πειραμάτων. Η ανάλυση του σχεδιασμού πειραμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί από πολλαπλά λογισμικά προγράμματα, για αυτόν το λόγο ο χρήστης χρειάζεται να κατανοεί βασικές αρχές και εφαρμογές του σχεδιασμού (Cash et al. 2016).

A.6.1 Βασικές αρχές και ορισμοί

Οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι και σημαντικοί όροι ενός σχεδιασμού πειραμάτων είναι: ελεγχόμενοι και τυχαίοι παράγοντες, απόκριση, έλεγχος της υπόθεσης, αλληλεπίδραση, σχηματισμός μπλοκς και επανάληψη.

- Οι ελεγχόμενοι παράγοντες είναι οι μεταβλητές x που μπορούν να ελεγχθούν σε ένα πείραμα ή διεργασία. Για παράδειγμα, ο χρόνος που χρειάζονται τα ποπ κορν στο φούρνο μικροκυμάτων για να ψηθούν μπορεί να ρυθμιστεί από τον χειριστή και επηρεάζει το αποτέλεσμα.
- Οι τυχαίοι παράγοντες είναι παράμετροι που δεν μπορούν να ελεγχθούν στα πλαίσια του πειράματος και επηρεάζουν και αυτοί το αποτέλεσμα. Στο παράδειγμα με τα ποπ κορν είναι η ατμοσφαιρική υγρασία μέσα στο φούρνο.
- Η απόκριση είναι το αποτέλεσμα των πειραμάτων, δηλαδή η γεύση του ποπ κορν.
- Ο έλεγχος της υπόθεσης βοηθάει να εξακριβωθούν οι σημαντικοί παράγοντες χρησιμοποιώντας τη στατιστική. Υπάρχουν δύο πιθανότητες στην διατύπωση της υπόθεσης: μηδενική ή εναλλακτική. Συνήθως σε ένα επίπεδο εμπιστοσύνης 95% σκοπός είναι εντοπίσουμε αν ισχύει ή όχι η μηδενική υπόθεση.
- Με το σχηματισμό μπλοκς υπάρχει η δυνατότητα να ομαδοποιηθούν τα δεδομένα με τέτοιο τρόπο που να εξαλείφονται πιθανές ανεπιθύμητες επιρροές στη διεργασία.
- Με την επανάληψη του ίδιου πειράματος υπολογίζεται το τυπικό σφάλμα που παίζει ρόλο στη διεργασία.

- Στην περίπτωση περισσότερων από 3 παράγοντες, αλληλεπίδραση ονομάζουμε την επίδραση συνδυασμού παραγόντων στην απόκριση (Anderson and Whitcomb 2016).

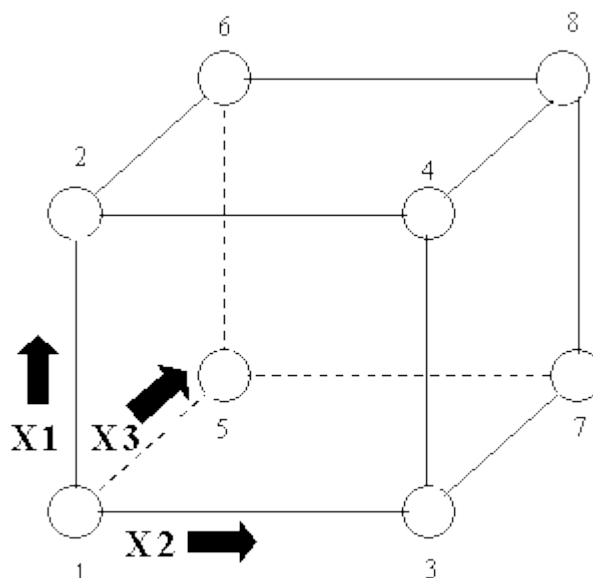


Εικόνα 13: Διάγραμμα ροής διεργασίας και απόκρισης.

A.6.2 Σχεδιασμός σάρωσης

Ανέκαθεν, ο κύριος στόχος μελετών σχεδιασμού ήταν να ανακαλυφθούν στρατηγικές και διεργασίες που δυνητικά θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή ενός καλύτερου προϊόντος. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος, όμως, χρειαζόμαστε πολλές πληροφορίες για το πώς επηρεάζεται το τελικό αποτέλεσμα από όλους τους παράγοντες, ελεγχόμενους και μη. Η διαδικασία κατά την οποία διερευνώνται ποιοι παράγοντες έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στο αποτέλεσμα ονομάζεται σχεδιασμός σάρωσης. Ενώ παλιότερα χρησιμοποιούνταν η μέθοδος του ενός παράγοντα τη φορά, σήμερα είναι εφικτό να μειωθεί σημαντικά ο αριθμός των πειραμάτων, ώστε να βγουν αξιόπιστα αποτελέσματα και επιπλέον εντοπίζονται πιθανές αλληλεπιδράσεις (Cash et al. 2016).

A.6.2.1. Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού 2 επιπέδων, 3 παραγόντων (X1,X2,X3) με 8 πειράματα.

$$\text{Αριθμός πειραμάτων} = \text{επίπεδα}^{\text{παράγοντες}}$$

Με βάση των παραπάνω κανόνα μπορεί να υπολογιστεί ο αριθμός πειραμάτων για οποιονδήποτε παραγοντικό σχεδιασμό. Στην περίπτωση των δύο επιπέδων θέτουμε τα επίπεδα ίσον 2. Στα δύο επίπεδα, αυτό που πρακτικά συμβαίνει είναι, ότι θα μετριούνται όλοι τους παράγοντες σε δύο τιμές, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάζουν το αποτέλεσμα. Η επιλογή κατάλληλων παραγόντων και μέγιστων και ελάχιστων τιμών γίνεται με βάση το στόχο που έχει τεθεί και ύστερα από σχολαστική βιβλιογραφική αναζήτηση.

B. Πειραματικό μέρος

B.1. Στόχος

Πριν από την έναρξη οποιασδήποτε πειραματικής διαδικασίας πρέπει πρώτα να διαλευκανθεί ποιος είναι ο στόχος της διπλωματικής εργασίας. Το θέμα της εργασίας πλαισιώνεται από τον ανθρώπινο ρινικό βλεννογόνο και τη χορήγηση φαρμάκων μέσω αυτού. Σύμφωνα με τις επιστημονικές εξελίξεις, διαπιστώνεται, ότι η χορήγηση μέσω της συγκεκριμένης οδού παρέχει εύκολη και άμεση πρόσβαση στην κυκλοφορία του αίματος του κεντρικού νευρικού συστήματος χωρίς να χρειάζεται το φάρμακο να περάσει ούτε από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ούτε το μεταβολισμό πρώτης διόδου (Bitter et al. 2011).

Κατόπιν, επιλέχθηκε μία δραστική ουσία, τη δονεπεξίλη, η οποία εμφανίζει κλινικά αποτελέσματα στη θεραπεία του Alzheimer, όταν βρίσκεται εντός του εγκεφάλου και αναστέλλει το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση. Επίσης, παρατηρώντας το προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών της γίνεται συνειδητό, ότι η υπερδοσολογία είναι ο μεγαλύτερος κίνδυνος κατά τη χρήση της δονεπεξίλης. Συνεπώς, αν ξεπεραστούν τα όρια και φτάσει το φάρμακο σε υψηλές συγκεντρώσεις στον εγκέφαλο και στο αίμα ακόμα και σε θεραπευτικές δοσολογίες, θα αυξηθούν δραστικά και οι ανεπιθύμητες ενέργειές του.

Με τη βοήθεια των *in vitro* πειραμάτων που διεξάχθηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, θα επιδιωχθεί ο εντοπισμός της βέλτιστης μορφοποίησης για τη ρινική χορήγηση της δονεπεξίλης. Θα μπορούν να βγουν συμπεράσματα για το πώς διαπερνά το συγκεκριμένο φάρμακο τις μεμβράνες και αν υπάρχουν άλλοι παράγοντες πέρα από το δραστικό συστατικό που την επηρεάζουν.

B.2. Πειράματα

Έχοντας θεμελιώσει τον στόχο μπορεί να προχωρήσει ο σχεδιασμός της μελέτης. Αρχικά επιλέχθηκε η μέθοδος μέτρησης της δονεπεξίλης σε διαλύματα, η οποία αναλύεται παρακάτω. Τα *in vitro* πειράματα λαμβάνουν χώρα σε κύτταρα Franz με βάση συγκεκριμένη διαδικασία που περιγράφουμε στη συνέχεια. Με όμοιο τρόπο θα ακολουθήσει και 1 *ex vivo* πείραμα για σύγκριση.

Το επόμενο βήμα είναι η επιλογή των παραγόντων που θα εξεταστούν. Σε αυτή τη φάση πρέπει να γίνει αναζήτηση στην υπάρχουσα βιβλιογραφία για να προκύψει η

κατάλληλη μορφοποίηση για το φάρμακο, το είδος και τα μεγέθη των παραγόντων που έχουν ενδιαφέρον.

B.2.1 Επιλογή μορφοποίησης

Έχοντας μελετήσει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της δονεπεξίλης παρατηρείται, ότι υφίσταται ως ελεύθερη βάση ή ως υδροχλωρικό άλας. Η διαλυτότητα του άλατος είναι σαφώς ανώτερη και προτιμάται στην πλειοψηφία των διαθέσιμων εμπορικών σκευασμάτων για καλύτερη απορρόφηση.

Επιπλέον, δίνεται η δυνατότητα να επιλεγθεί ανάμεσα σε στερεή, υγρή ή ημιστερεή μορφοποίηση. Η στερεή δεν μπορεί να επιλεγθεί, διότι η εισπνοή κόνεως δονεπεξίλης προκαλεί την τοπική διέγερση του παρασυμπαθητικού συστήματος, αυξάνοντας τις εκκρίσεις και συστέλλοντας τα βρογχιόλια, μία ιδιαίτερα επικίνδυνη δράση σε ασθματικούς ασθενείς (Dooley and Lamb 2000). Καταληκτικά, επιλέχθηκε το πήκτωμα για τους εξής λόγους. Η υδροχλωρική δονεπεξίλη έχει επαρκή διαλυτότητα στο νερό, ώστε να μη χρειάζεται να προσθέσουμε μη υδατικό διαλύτη για τη διάλυσή της. Επίσης, ένα πήκτωμα επιτυγχάνει μεγάλους χρόνους παραμονής στο ρινικό επιθήλιο χάρη στο ιξώδες του, ενώ αντίθετα ένα διάλυμα θα απομακρυνόταν άμεσα εξαιτίας της βλεννοκροσσωτής κάθαρσης. Ο μεγάλος χρόνος παραμονής είναι σημαντικός για το συγκεκριμένο σκεύασμα εφόσον επιδιώκεται η μέγιστη απορρόφηση και είσοδος στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ακόμη, η παρασκευή μίας γέλης, τόσο στο εργαστήριο, όσο και σε μία βιομηχανία αποτελεί σήμερα κοινή πρακτική χαμηλού κόστους με απλά μηχανήματα. Τέλος, λαμβάνεται υπόψιν η εμπειρία του ασθενή. Ένα ρινικό πήκτωμα είναι εύκολο στη χρήση από τον ασθενή με μη επεμβατικό τρόπο χορήγησης, ενώ υπάρχουν ήδη αρκετά ρινικά σκευάσματα στην αγορά. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σκευάσματος σε νερό, αυτό ενυδατώνει τοπικά τον βλεννογόνο και δεν προκαλεί κάποια ενόχληση ή ερεθισμό της μύτης.

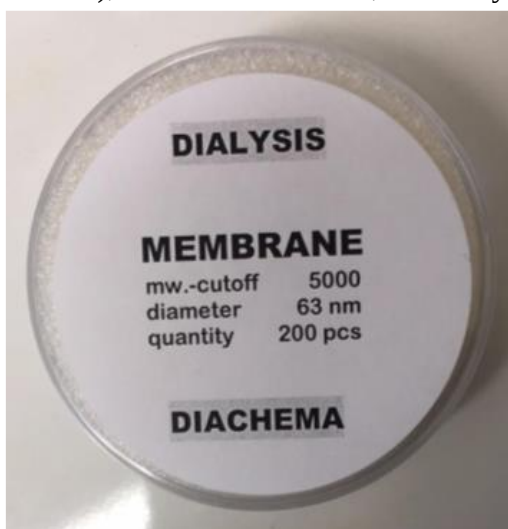
Παράλληλα, η συγκεκριμένη μορφοποίηση εμφανίζει και κάποια μειονεκτήματα. Η σταθερότητα λόγω υδρόλυσης του δραστικού συστατικού μέσα σε ένα σκεύασμα πλούσιο σε νερό αποτελεί κίνδυνος για την τυποποίηση ενός σκευάσματος. Επιπρόσθετα, οι φαρμακοκινητικές μελέτες γίνονται πιο περίπλοκες, διότι μέρος του σκευάσματος θα καταλήξει στο γαστρεντερικό σύστημα αναπόφευκτα μέσω της κατάποσης που θα επηρεάσει τα επίπεδα στο αίμα και τα επίπεδα του φαρμάκου στο κεντρικό νευρικό σύστημα θα διαφέρουν από τα αναμενόμενα μίας *per os* χορήγησης.

B.2.2 Ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου

Με βάση την αναλυτική μέθοδο της βιβλιογραφίας (Sastry et al. 2008) εφαρμόστηκε HPLC αντίστροφης φάσης για τη μέτρηση της δονεπεξίλης στα δείγματα. Το σύστημα HPLC του εργαστηρίου διαθέτει αυτόματο δειγματολήπτη, αντλία, degasser, φούρνο φύλαξης στήλης και ανιχνευτές PDA υπεριώδους-ορατού και RF φθορισμού. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται Luna 5u C18 25cm.

B.2.2.1. Υλικά, εργαλεία και αντιδραστήρια

1. Millipore 0.45μm Millex filter
2. Ογκομετρικές φιάλες 10mL
3. Ποτήρια ζέσεως 1L, 600mL
4. Φιάλες Duran
5. Ρολό χαρτί
6. Σκαφίδια και φύλλα ζύγισης
7. Σταγονόμετρα
8. Πιπέτες ακριβείας 200μL
9. Σιφόνια
10. Νυστέρια
11. Σπάτουλες
12. Ψαλίδια
13. Αντικειμενοφόρες πλάκες
14. Φιαλίδια Eppendorf
15. φιαλίδα για HPLC
16. Μεθανόλη (HPLC grade)
17. Τριαιθυλαμίνη (analytical grade 99%)
18. H_3PO_4
19. KH_2PO_4
20. NaOH 1M
21. Νερό (HPLC grade)
22. Donepezil Hydrochloride (Cipla Ltd.)
23. Methocel E4M (Hydroxypropylmethylcellulose)
24. Μembrάνη αναγεννημένης κυτταρίνης (διάμετρος πόρων 63nm, μοριακό βάρος που τη διαπερνά: 5000), DIANORM GmbH, Germany

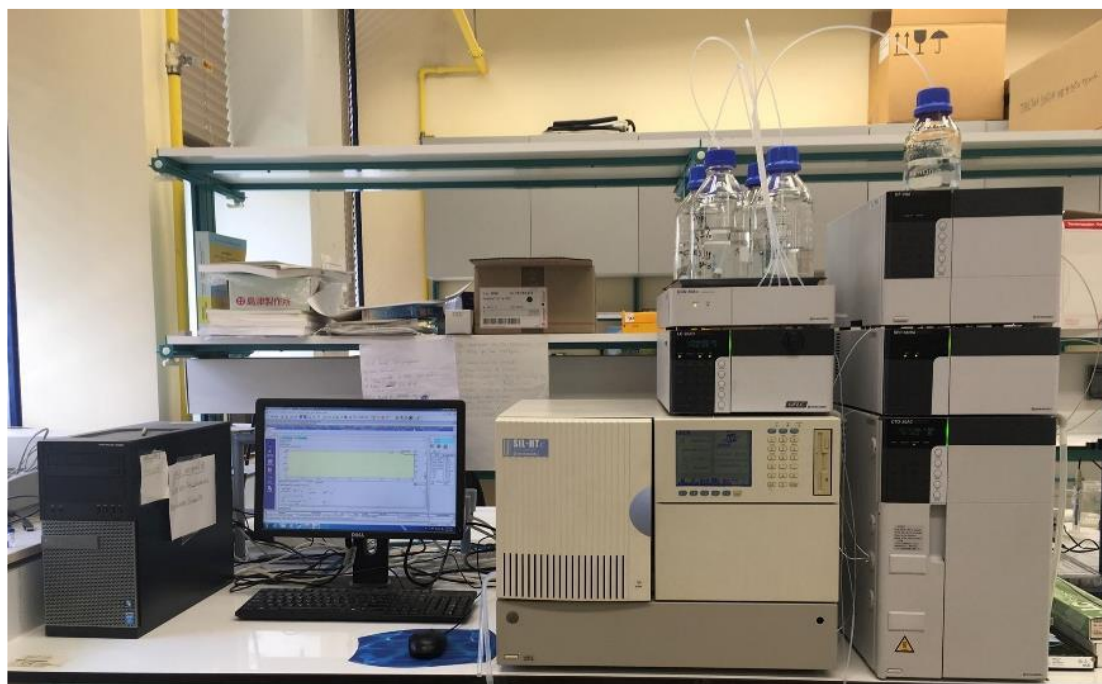


Εικόνα 15: Μembrάνες αναγεννημένης κυτταρίνης.

B.2.2.2. Μηχανήματα και εξοπλισμός

1. Σύστημα HPLC

- i. Degassing unit (DGU-20A 5R)
- ii. Αντλία (LC-20AD)
- iii. Αυτόματος δειγματολήπτης (SIL-HTc, Shimadzu)
- iv. Φούρνος φύλαξης στήλης (CTO-20AC)
- v. Ανιχνευτής diode array detector (SPD-M20A)
- vi. Στήλη Phenomenex Luna 5u C18(2) 100A 250x4,6mm



Εικόνα 16: Σύστημα HPLC.

2. Ηλεκτρονικός ζυγός (ακρίβεια 1 δεκαδικού του mg)
3. Λουτρό υπερήχων
4. Αυτόματος αναδευτήρας, Vortex
5. Κύτταρα Franz



Εικόνα 17: Δέκτες,μανταλάκια, δότες, μαγνητικοί αναδευτήρες και βάσης στήριξης κυττάρων.

6. Θερμαινόμενο λουτρό για κύτταρα Franz



Εικόνα 18: Θερμαινόμενο λουτρό με κύτταρα Franz και μαγνητικούς ανδευτήρες.

7. Αναδευόμενο λουτρό



Εικόνα 19: Αναδευόμενο λουτρό σταθερής θερμοκρασίας (shaking bath).

B.2.2.2. Προετοιμασία διαλυτών ανάλυσης

Η διαδικασία ξεκινάει με την παρασκευή της κινητής φάσης. Αρχικά ζυγίζεται στο ζυγό ποσότητα στερεού άλατος φωσφορικού διόξινου καλίου (KH_2PO_4), ώστε όταν τη διαλύεται σε νερό καθαρότητας HPLC να έχει συγκέντρωση 0,0025M. Αφού διαλυθεί πλήρως το άλας στο νερό προστίθεται τριαιθυλαμίνη όγκου 0,5% v/v. Το τελικό διάλυμα είναι αρκετά βασικό και για να μην καταστρέψει τη στήλη ρυθμίζεται το pH του διαλύματος σε 7,0 με φωσφορικό οξύ (H_3PO_4) στάγδην. Η μέτρηση του pH γίνεται με το ηλεκτρονικό πεχάμετρο. Μετά τη ρύθμιση του pH απομένει η διήθηση του διαλύματος μέσα από φίλτρο Millipore 0,45μm και εξαέρωση σε λουτρό υπερήχων για 15 min. Στο τέλος, μία φιάλη Duran με το διάλυμα που δημιουργήθηκε (phosphoric buffer solution, PBS) και μία ακόμη με διάλυμα ακετονιτρίλιου υψηλής καθαρότητας για ανάλυση HPLC συνδέεται με τις γραμμές τροφοδοσίας του συστήματος της HPLC.

B.2.2.3. Προετοιμασία καμπύλης αναφοράς

Από την κόνις υδροχλωρικής δονεπεξίλης φτιάχνεται πρώτα ένα διάλυμα παρακαταθήκης (stock) διαλύοντας τη δονεπεξίλη σε μεθανολικό διάλυμα, ώστε να έχει συγκέντρωση 1mg/mL. Το διάλυμα παρακαταθήκης φυλάσσεται πάντα σε κατάψυξη στους -70°C . Κατά την προετοιμασία δειγμάτων σε κάθε ανάλυση γίνεται ταυτόχρονα και η προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων για καμπύλη αναφοράς. Μεταφέρονται 20, 40, 60, 80, 100, 120μL από το διάλυμα παρακαταθήκης σε ογκομετρικές φιάλες των 10mL. Στη συνέχεια, γεμίζουν οι φιάλες με διάλυμα 40% PBS – 60% ακετονιτρίλιο μέχρι τη χαραγή. Αναδεύεται με vortex και μεταφέρω σε φιαλίδια για ανάλυση HPLC.

B.2.2.4. Συνθήκες ανάλυσης

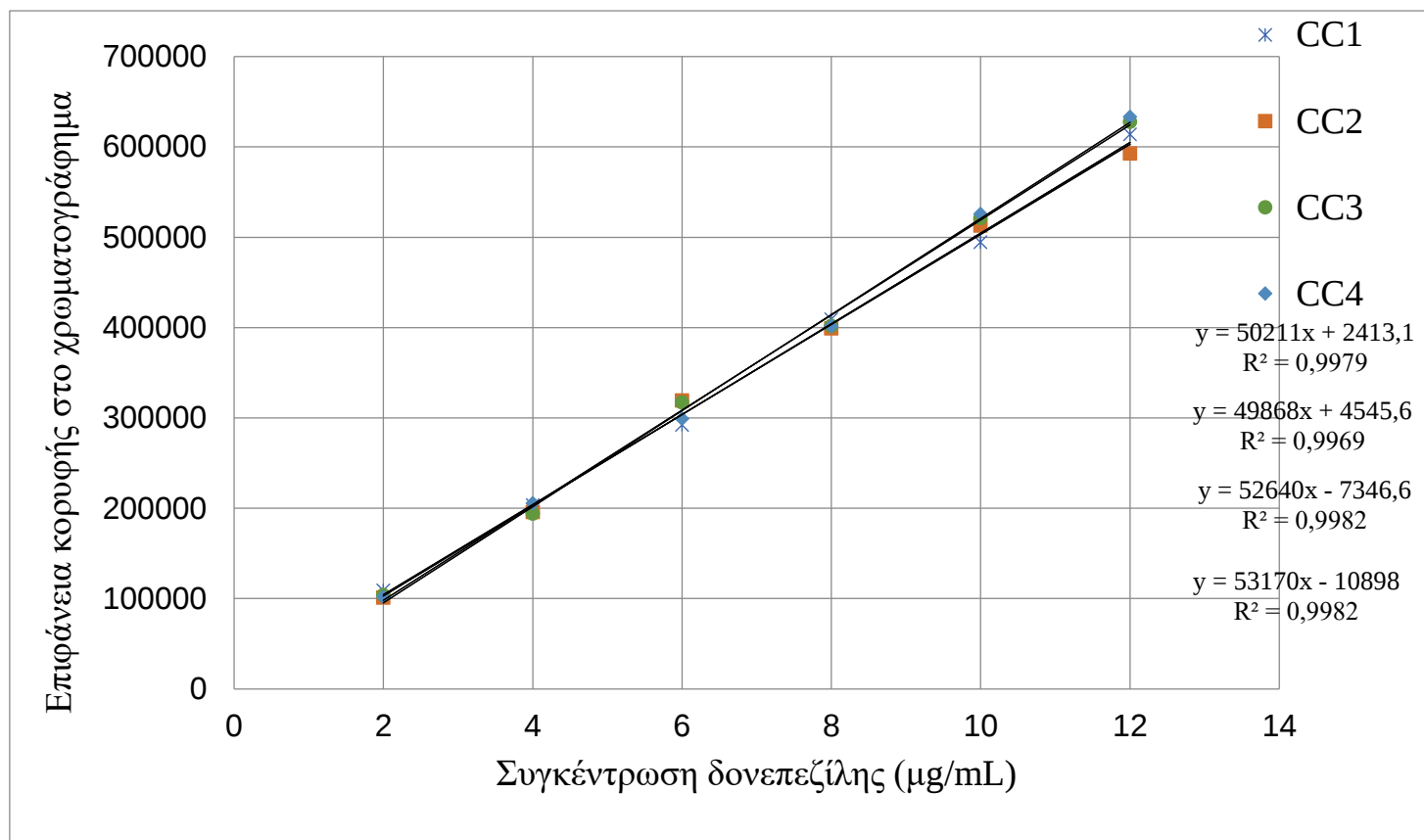
High Performance Liquid Chromatography αντίστροφης φάσης με ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (RP-HPLC-PDA)

- Θερμοκρασία δωματίου (25°C)
- Στήλη: Phenomenex Luna 5u C18
- Κινητή φάση: 40% ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος και τριαιθυλαμίνη 0,5% v/v pH 7,0
- Μήκος κύματος: 228nm
- Δειγματοληψία: 20μL από κάθε δείγμα
- Ταχύτητα ροής: 1mL/min
- Χρόνος χρωματογραφήματος: 11min (αναμενόμενος χρόνος έκλουσης δονεπεξίλης: 7min)

B.2.2.5. Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Η αναλυτική μέθοδος είναι επιλεγμένη από τη βιβλιογραφία, είναι δοκιμασμένη και επικυρωμένη. Με βάση τα αποτελέσματα των ερευνητών (Sastry et al. 2008) η μέθοδος είναι ακριβής και επαναλήψιμη. Όμως, εξαιτίας μεταφοράς τεχνογνωσίας σε διαφορετικό εργαστήριο πρέπει να επιβεβαιωθεί, ότι θα ισχύει το ίδιο παρόλο που

χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός εξοπλισμός και τροποποιήθηκε η μέθοδος για να προσαρμοστεί στην παρούσα μελέτη.



Εικόνα 20: 4 καμπύλες βαθμονόμησης και οι εξισώσεις ευθειών τους.

Έτσι λοιπόν, φτιάχτηκαν καμπύλες βαθμονόμησης από διαφορετικά διαλύματα παρακαταθήκης με διαφορετικά δείγματα πάντα μετρώντας 6 πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 2, 4, 6, 8, 10 και 12 $\mu\text{g/mL}$. Με βάση τις απορροφήσεις κάθε δείγματος στις συνθήκες που περιγράφηκαν, εφαρμόστηκε γραμμική παλινδρόμηση ελαχίστων τετραγώνων για να δείχθει, αν τα πρότυπα συνδέονται με γραμμική σχέση και αν οι καμπύλες μεταξύ τους είναι όμοιες και επαναλήψιμες.

B.2.3 Σχεδιασμός πειραμάτων

Αφού παγιώθηκε ο στόχος της εργασίας, το επόμενο βήμα είναι η επιλογή των παραγόντων που θα τεθούν υπό διερεύνηση. Έχοντας κατά νου ένα φαρμακευτικό πρήκτωμα που αναπτύσσεται για να χορηγείται στη μύτη σημειώνεται ότι υπάρχουν πολλοί ελεγχόμενοι και τυχαίοι παράγοντες όσον αφορά στη διαπέραση του φαρμάκου μέσα από το φραγμό του επιθηλίου. Με βάση τη φυσιολογία και την ανατομία της ρινός, μπορούν ήδη να κατονομαστούν οι τυχαίοι παράγοντες. Τέτοιοι μπορεί να είναι: η θερμοκρασία, η υγρασία, η παθολογία (εάν υπάρχει), η επιφάνεια και το σχήμα της ρινικής κοιλότητας, η μορφολογία του βλεννογόνου (πολλά ή λίγα βλεφαριδοφόρα κύτταρα), η έκκριση και σύσταση βλέννας είναι μερικοί από αυτούς τους παράγοντες

που διαφέρουν όχι μόνο από ασθενή σε ασθενή αλλά και από στιγμή σε στιγμή στον ίδιο ασθενή.

Η πειραματική πράξη απαιτεί τον περιορισμό ή και τον έλεγχο όλων αυτών των τυχαίων παραγόντων εντός μίας *in vitro* μελέτης. Αυτό, οι επιστήμονες το επιτυγχάνουν συνήθως επιλέγοντας δομές ικανές να προσομοιώσουν τις συνθήκες ενός ρινικού βλεννογόνου σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον. Η δομή που χρησιμοποιείται στην παρούσα διπλωματική εργασία ονομάζεται κύτταρο Franz, το οποίο θα περιγραφεί και θα εξηγηθεί αναλυτικά σε επόμενη παράγραφο.

Λύνοντας το πρόβλημα των τυχαίων μεταβλητών, εξετάζονται επιλεγμένοι παράγοντες που ελέγχονται από τον ερευνητή μέχρι να καταλήξει στο βέλτιστο προϊόν. Τα συστατικά ενός φαρμακευτικού σκεύασματος που λέγονται έκδοχα, είναι οι πρώτες μεταβλητές που αναλύονται στην ανάπτυξη οποιουδήποτε προϊόντος.

B.2.3.1. Επιλογή δραστικής

Ο στόχος της διπλωματικής εργασίας είναι να εκμεταλλευτεί τα πλεονεκτήματα της ρινικής χορήγησης επιλέγοντας το κατάλληλο φάρμακο που θα μπορεί να βοηθήσει ασθενείς σε όλον τον κόσμο. Η ρινική κοιλότητα βρίσκεται σε στενή επικοινωνία με το κεντρικό νευρικό σύστημα, που σημαίνει ότι τα φάρμακα μπορούν να διαπερνούν το κυτταρικό επιθήλιο και να εισέρχονται κατευθείαν στον εγκέφαλο χωρίς να βιομετατρέπονται ή να απομακρύνονται. Άρα, φάρμακα που συνδέονται με υποδοχείς του εγκεφάλου είναι ιδανικοί εθελοντές.

Η δονεπεξίλη, το φάρμακο που τελικά επιλέχθηκε, χαρακτηρίζεται από πολύ καλό φαρμακοκινητικό προφίλ και οι ανεπιθύμητες ενέργειές της είναι κυρίως δόσοεξαρτώμενες. Το φάρμακο βρίσκεται πολλά χρόνια στην αγορά και διατίθεται ακόμα και μέχρι σήμερα χωρίς αμφιβολίες για την ασφάλειά του. Η ρινική χορήγηση της δονεπεξίλης έχει ήδη εξεταστεί με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Al Harthi et al. 2019; Bhavna et al. 2014; Erdő et al. 2018; Espinoza et al. 2018; Patil et al. 2019; Patil Sonali et al. 2015), όχι όμως για τη μελέτη συγκεκριμένων παραγόντων και συστατικών σε υδρογέλες με παραγοντικό σχεδιασμό πειραμάτων.

B.2.3.2. Επιλογή πολυμερούς

Η παρασκευή μίας υδρογέλης είναι πολύ απλή, διότι τα μόνα συστατικά που χρειάζεται κανείς είναι νερό και έναν ή παραπάνω παράγοντα αύξησης ιξώδους. Για την απλοποίηση της μελέτης και του σχεδιασμού τελικά επιλέχθηκε το πολυμερές Methocell E4M, που είναι γνωστό μελετημένο υλικό με πολλές εφαρμογές και υψηλή ασφάλεια. Η ποσότητα του πολυμερούς επηρεάζει εμφανώς και το ιξώδες του πηκτώματος, άρα πρέπει να βρεθεί κατά πόσο η ποσότητα του πολυμερούς και το ιξώδες θα επηρεάζουν τη διαπεράση. Έπειτα, το ιξώδες θα επηρεάσει τη διάρκεια παραμονής και την ευκολία εφαρμογής ενδορρινικά και με βάση αυτό το κριτήριο οριοθετήθηκε το ελάχιστο και το μέγιστο ποσοστό πολυμερούς στο μείγμα που θα παράξει αρκετά παχύρρευστη υδρογέλη, η οποία δε θα στάζει από τη μύτη και αρκετά

λεπτόρευστη για να εφαρμόζεται με ευκολία από τον ασθενή και να μεταφέρεται μεταξύ περιεκτών κατά τη διεργασία παρασκευής.

Υδρογέλες από πολυμερή κυτταρίνης συμπεριφέρονται σαν μη νευτώνικά ημιστερεά. Για την μέτρηση του ιξώδους στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε ένα περιστρεφόμενο ιξωδόμετρο με συγκεκριμένο εξάρτημα spindle 25 ειδικό για δείγματα περίπου 7mL όταν βρίσκονται στον περιέκτη. Ο περιέκτης επηρεάζει την μέτρηση του ιξώδους, γι' αυτό επιλέξαμε συγκεκριμένα φιαλίδια ίδια μεταξύ τους για την φύλαξη των μορφοποιήσεων. Έπειτα, ξέρουμε από τη βιβλιογραφία τη ρεολογική συμπεριφορά υδρογελών από μη ιονικά πολυμερή κυτταρίνης είναι ψευδοπλαστική. Ουσιαστικά το ρευστό είναι μη νευτώνικό (προσεγγίζει τα νευτώνικά ρευστά μόνο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις πολυμερούς) και όταν αυξάνεται η ενέργεια που εφαρμόζεται στο σύστημα, το ιξώδες μειώνεται. Συνεπώς, όσο αυξάνεται η ταχύτητα περιστροφής του περιστρεφόμενου ιξωδομέτρου, τόσο θα μειώνεται η μέτρηση του ιξώδους (Constructionchemcails 2018).

Βέβαια, πρέπει να τονιστεί πόσο ευμετάβλητη είναι η τιμή του ιξώδους από τους εξωτερικούς παράγοντες. Αν πρόκειται να εφαρμοστεί υδρογέλη με HPMC στη ρινική κοιλότητα, αυτή θα προσαρμοστεί στις συνθήκες του περιβάλλοντος τοπικά, οι οποίες δεν παραμένουν ποτέ σταθερές, ούτε είναι ελεγχόμενες. Άρα, η μέτρηση του ιξώδους σε διαφορετικές μορφοποιήσεις του ίδιου πολυμερούς έχει αξία μόνο για τη σύγκριση μεταξύ τους, αλλά και την παρατήρηση της σταθερότητάς τους στο χρόνο.

B.2.3.3. Επιλογή δοσολογίας

Με βάση τη γνωστή κλινική *per os* δοσολογία της δονεπεζίλης πρέπει να οριστεί το εύρος δόσεων του φαρμάκου που ταιριάζει για τη ρινική χορήγηση. Όπως εξηγήθηκε η δόση για ρινική χορήγηση θα είναι αρκετά μικρότερη από την *per os*, εφόσον θα περάσει από πολύ λιγότερες μεταβολικές οδούς και πρέπει να καταστεί σίγουρο ότι η τοπική δράση δεν εμφανίζει κάποια τοξικότητα που θα ερεθίσει το βλεννογόνο.

Εν κατακλείδι, στα 100μL που επιτρέπονται να χορηγούνται στη μύτη, πρέπει να περιέχεται ποσότητα ίση με το 1/10 της *per os* δοσολογίας. Το φάρμακο χορηγείται στην κλινική πράξη στα 5mg και στα 10mg, οπότε τα 100μL περιέχουν από 0,5mg έως 1mg ποσότητα φαρμάκου. Η συγκέντρωση των υδρογελών που υπολογίστηκε για το σχεδιασμό είναι 5mg/mL και 10mg/mL.

Στη διπλωματική χρησιμοποιήθηκαν όγκοι υδρογελών και όχι βάρη, όπως συνηθίζεται, για μεγαλύτερη ευκολία στη μετατροπή από συγκεντρώσεις μορφοποιήσεων σε συγκεντρώσεις διαλυμάτων. Αυτό είναι εφικτό, επειδή μετρήθηκε η πυκνότητα όλων των πηκτωμάτων και είναι πρακτικά 1g/mL, δηλαδή ίδια με το νερό. Αυτό είναι λογικό εφόσον το νερό είναι το συστατικό των σκευασμάτων που βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα από ότι όλα τα άλλα συστατικά.

B.2.3.4. Επιλογή pH

Ο τρίτος παράγοντας που επιλέχθηκε προς μελέτη στην εργασία είναι το pH. Τα μη ιονισμένα μόρια δεν επηρεάζονται από το pH τόσο όσο τα ιονισμένα. Όταν πρόκειται

για τη διαπέραση από μεμβράνες, τα φορτισμένα μόρια δυσχεραίνονται περισσότερο στη διάβασή τους μέσω διάχυσης λόγω της υψηλής πολικότητας. Όλα τα φάρμακα συμπεριφέρονται σε διαλύματα, είτε ως ασθενείς βάσεις, είτε ως ασθενή οξέα. Ανάλογα με το pH λοιπόν, μετακινείται η ισορροπία μεταξύ φορτισμένης και μη φορτισμένης μορφής με αποτέλεσμα αυτό να ενδέχεται να επηρεάζει και τη διαπέραση που μελετάμε.

Παράλληλα, πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη, ότι το τελικό φαρμακευτικό σκεύασμα προορίζεται για ρινική χορήγηση στον άνθρωπο, άρα το pH που επιλέξαμε έπρεπε να είναι συμβατό με τις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπου, ώστε να μην είναι ερεθιστικό για το βλεννογόνο. Συνεπώς, με βάση τη βιβλιογραφία (Bitter et al. 2011) περιορίσαμε το pH των μορφοποιήσεων μεταξύ 5,5 και 6,5. Αν η επιτρεπόμενη διαφορά pH μίας μονάδας είναι αρκετή για να επηρεάσει την διαπέραση μένει να εξεταστεί από το σχεδιασμό πειραμάτων της εργασίας.

B.2.3.5. Αριθμός πειραμάτων

Τα κύτταρα Franz σαν πειραματικές δομές εμφανίζουν μεγάλη μεταβλητότητα αποτελεσμάτων από κύτταρο σε κύτταρο, έτσι κρίθηκε απαραίτητο να ελαχιστοποιηθεί αυτή τη μεταβλητότητα κάνοντας το ίδιο πείραμα σε τρία ξεχωριστά κύτταρα κάθε φορά. Έπειτα, στα αποτελέσματα υπολογίσαμε τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση κάθε τριπλέτας μετρήσεων. Η τυπική απόκλιση είναι ενδεικτική για να συγκριθούν οι τριπλέτες μεταξύ τους ως προς την επαναληψιμότητα, ενώ ο μέσος όρος αποτελεί την απόκριση του σχεδιασμού.

B.2.3.6. Επιλογή απόκρισης και σχεδιασμού

Έχοντας επιλέξει ήδη τους 3 παράγοντες ο μισός σχεδιασμός έχει ήδη ολοκληρωθεί. Αυτό που απομένει είναι η επιλογή της εξαρτημένης μεταβλητής, ή αλλιώς της απόκρισης, που θα μελετηθεί και το κατάλληλο είδος του σχεδιασμού. Η απόκριση που μετρήθηκε είναι η συγκέντρωση του δέκτη, αλλά κεντρικής σημασίας είναι η ποσότητα της συνολικής δόσης που έχει διαπεράσει τη μεμβράνη σε μία δεδομένη χρονική στιγμή. Επομένως, τη συγκέντρωση θα μετατραπεί σε αθροιστική ποσότητα. Τελικά, την αθροιστική ποσότητα θα μετατραπεί σε ποσοστό (%) σε σχέση με την ποσότητα δονεπεζίλης που εμπεριέχεται στα 100μL υδρογέλης. Η μετατροπή αυτή έγινε με σκοπό να είναι πιο συγκρίσιμα τα αποτελέσματα και οι αποκρίσεις μεταξύ τους, ώστε να βρίσκονται στα ίδια αριθμητικά μεγέθη.

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, ένα σκεύασμα υδρογέλης δεν θα είναι ικανό να παραμείνει στο ρινικό βλεννογόνο για μεγάλο χρονικό διάστημα λόγω της βλεννοκροκροσσωτής κάθαρσης. Η επίδραση μίας τόσο περίπλοκης φυσιολογικής λειτουργίας μόνο με *in vivo* μοντέλα μπορεί να προβλεφθεί τόσο στην απορρόφηση όσο και στο χρόνο επαφής του σκευάσματος στο βλεννογόνο. Λίγα δεδομένα διατίθενται που στηρίζουν, ότι οι υδρογέλες αυξάνουν το χρόνο παραμονής τους στο βλεννογόνο σημαντικά σε σχέση με τα διαλύματα, που δεν ξεπερνούν τις 2-3 ώρες (Ugwoke et al. 2000). Συνεπώς, επιλέχθηκε η μισή ώρα ως χρονικό σημείο απόκρισης για το σχεδιασμό που εφαρμόστηκε.

Ένας από τους 3 παράγοντες είναι το pH, δηλαδή όχι κάποιο συστατικό, επομένως αποκλείεται ο σχεδιασμός μείγματος ως επιλογή. Επίσης, ιδιαίτερου ενδιαφέροντος αποτελεί ο εντοπισμός, όχι μόνο της επιρροή των παραγόντων, αλλά και των αλληλεπιδράσεων που μπορεί να εμφανίζουν. Ο πιο κατάλληλος σχεδιασμός για αυτή την εργασία είναι ο παραγοντικός σχεδιασμός 3 παραγόντων σε 2 επίπεδα. Τα επίπεδα είναι δύο, εφόσον ο σχεδιασμός βρίσκεται σε φάση της σάρωσης.

B.2.4 Design Expert και επεξεργασία αποτελεσμάτων

Ένα πολύ διαδεδομένο λογισμικό πρόγραμμα για σχεδιασμό πειραμάτων είναι το Design Expert. Το πρόγραμμα καθοδηγεί το χρήστη βήμα-βήμα, ώστε να χτίσει το σχεδιασμό του μειώνοντας στο ελάχιστο δυνατό τα έξοδα. Βασίζεται εξ ολοκλήρου στη στατιστική μελέτη αποτελεσμάτων, όμως παρουσιάζει όλα τα αποτελέσματα με τρόπο κατανοητό, σε ένα φιλικό για το χρήστη περιβάλλον.

Ουσιαστικά, το πρόγραμμα ζητάει να συμπληρωθούν τα στοιχεία του σχεδιασμού για να θεμελιώσει τους υπολογισμούς. Αρχικά, δηλώνεται το είδος του σχεδιασμού, τα επίπεδα, ο αριθμός των πειραμάτων και τα κεντρικά σημεία. Τα κεντρικά σημεία αποσκοπούν στον εντοπισμό καμπυλότητας, αν αυτή υπάρχει. Αν δηλαδή οι υπολογισμοί του λογισμικού μας υποδείξουν την ύπαρξη καμπυλότητας, ενδεχομένως τα γραμμικά μοντέλα να μην περιγράφουν πλήρως την επιρροή των παραγόντων στην απόκριση.

- ▼ Standard Designs
- ▼ Factorial
 - ▼ Randomized
 - Regular Two-Level
 - Min-Run Characterize
 - Min-Run Screen
 - Multilevel Categoric
 - Optimal (Custom)
- > Miscellaneous
- > Split-Plot
- > Response Surface
- > Mixture
- ▼ Custom Designs
 - Optimal (Combined)
 - User-Defined
 - Historical Data
 - Simple Sample

Regular Two-Level Factorial Design

Design for 2 to 21 factors where each factor is set to 2 levels. Useful for estimating main effects and interactions. Fractional factorials can be used for screening many factors to find the significant few. The color coding represents the design resolution: **Green** (Characterization) = Res V or higher, **Yellow** (Screening) = Res IV, and **Red** (Ruggedness testing) = Res III.

Replicates: Blocks: Center points per block: ☐ Show Generators

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4	2 ²	2 ³⁻¹ III									
8		2 ³	2 ⁴⁻¹ IV	2 ⁵⁻² III	2 ⁶⁻³ III	2 ⁷⁻⁴ III					
16			2 ⁴	2 ⁵⁻¹ V	2 ⁶⁻² IV	2 ⁷⁻³ IV	2 ⁸⁻⁴ IV	2 ⁹⁻⁵ III	2 ¹⁰⁻⁶ III	2 ¹¹⁻⁷ III	2 ¹²⁻⁸ III

Εικόνα 21: Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός 3 επιπέδων με 3 κεντρικά σημεία.

Στη συνέχεια, εμφανίζεται ένας πίνακας που δίνεται η δυνατότητα υποβολής των παραγόντων, των μονάδων μέτρησής τους και του εύρους που ορίστηκε.

Regular Two-Level Factorial Design

Factors: 3 ☒ Horizontal
☐ Vertical

	Name	Units	Type	Low	High
A [Numeric]	pH		Numeric	5,5	6,5
B [Numeric]	Δόση	mg/mL	Numeric	5	10
C [Numeric]	HPMC	%w/v	Numeric	2,5	3,5

Εικόνα 22: Οι παράγοντες του σχεδιασμού και οι τιμές τους.

Επιπρόσθετα, ορίστηκε η απόκριση που θα μελετηθεί μαζί με το σήμα και το θόρυβο που παρατηρείται. Επειδή χρησιμοποιούνται ποσοστά, ως θόρυβος ορίζεται το 1% και ως σήμα 3% με βάση την ποσότητα που αντιστοιχεί σε αυτά τα ποσοστά και την κλινική σημασία τόσο μικρών ποσοτήτων. Με τις τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων που καταγράφηκε για κάθε τριπλέτα, αυτή η επιλογή επιβεβαιώνεται.

Regular Two-Level Factorial Design

Optional Power Wizard: For each response, you may enter the minimum change the design should detect as statistically significant and the estimated standard deviation (generally obtained from historical data). The ratio will then be calculated in the Delta/Sigma field. Press **Next** to see the calculated power for each response.

Responses: (1 to 999) ☒ Horizontal ☐ Vertical ☐ Edit response types

	Name	Units	Diff. to detect Delta("Signal")	Est. Std. Dev. Sigma("Noise")	Delta/Sigma (Signal/Noise Ratio)
	Μέσος όρος	%	3	1	3

Εικόνα 23: Απόκριση, σήμα και θόρυβος του σχεδιασμού.

Σε αυτό το σημείο, η προετοιμασία του σχεδιασμού έχει ολοκληρωθεί επιτυχώς και το πρόγραμμα μετράει τη στατιστική ισχύ που θα έχουν τα αποτελέσματα που θα δώσει.

Design Power

	Name	Units	Delta (Signal)	Sigma (Noise)	Signal/Noise	Power for A	Power for B	Power for C
	Μέσος όρος 0,5h	%	3	1	3	95,1%	95,1%	95,1%

Power is reported at a 5,0% alpha level to detect the specified signal/noise ratio.

Power should be approximately 80% or greater for the effects you want to detect.

Εικόνα 24: Στατιστική ισχύς, θόρυβος και σήμα του σχεδιασμού

Στο τέλος, το πρόγραμμα αναπαράγει αυτόματα 11 συνταγές που πρέπει να ετοιμαστούν τυχαία σειρά και να δοκιμαστούν σε κύτταρα Franz.

Πίνακας 3: Σύνθεση συνταγών για παρασκευή υδρογελών υδροχλωρική δονεπεζίλης.

Συνταγή	Υδροχλωρική δονεπεζίλη (mg/mL)	HPMC (% w/v)	pH
1	5	2,5	5,5
2	5	2,5	6,5
3	10	2,5	5,5
4	10	2,5	6,5
5	5	3,5	5,5
6	5	3,5	6,5
7	10	3,5	5,5
8	10	3,5	6,5
9	7,5	3	6
10	7,5	3	6
11	7,5	3	6

B.2.5 Διαδικασία παρασκευής συνταγών

Ύστερα από αρκετές προσπάθειες εγκαθιδρύθηκε μία πολύ συγκεκριμένη διαδικασία για την παρασκευή αυτών των πηκτωμάτων που επαναλαμβανόταν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο κάθε φορά για την αποφυγή οποιασδήποτε μεταβολή στην απόκριση που μπορεί να οφείλεται στον τρόπο παρασκευής. Τα βήματα παρασκευής είναι τα εξής:

1. Ζυγίζεται σε ένα σκαφίδιο ζυγίσεως στο ζυγό ποσότητα KH_2PO_4 τέτοια, ώστε στο τελικό διάλυμα να σχηματίζεται συγκέντρωση 0,2M.
2. Διαλύεται το άλας σε επαρκή ποσότητα νερού HPLC καθαρότητας σε ένα ποτήρι ζέσεως με μαγνητική ανάδευση.
3. Ρυθμίζεται το pH με προσθήκη NaOH 1M στάγδην στο διάλυμα, ενώ αναδεύεται και μετριέται το pH με ηλεκτρονικό πεχάμετρο (σε διαφορετική περίπτωση για την παρασκευή διαλυμάτων με διαφορετικό pH ρυθμίζεται πρώτα στη χαμηλότερη τιμή και στη συνέχεια κρατώντας ποσότητα του διαλύματος συνεχίζεται η ρύθμιση pH έως ότου παραληφθούν διαλύματα σε όλες τις επιθυμητές τιμές pH).
4. Για την τελική μορφοποίηση μεταφέρεται σε τελικό περιέκτη (γυάλινο φιαλίδιο) 7mL διαλύματος με κατάλληλο pH.
5. Ζυγίζεται, με βάση τη συνταγή, ποσότητα υδροχλωρικής δονεπεζίλης που να δίνει την κατάλληλη συγκέντρωση στο διάλυμα. Διαλύεται άμεσα με ανάδευση vortex.
6. Ζυγίζεται, με βάση τη συνταγή, ποσότητα HPMC που να δίνει την κατάλληλη περιεκτικότητα στο τελικό σκεύασμα.
7. Το HPMC δύσκολα διαλύεται, αφού αυξάνει σταδιακά το ιξώδες, δε διαβρέχεται αμέσως και επιπλέει στην επιφάνεια (πυκνότητα στοίβαξης). Με

αρκετή ανάδευση vortex και μετά από μία μέρα ηρεμίας σε σκιερό δροσερό μέρος, παραλαμβάνεται ένα διαυγές, ομοιογενές πήκτωμα.

B.2.6 Πειράματα διαπέρασης σε κύτταρα Franz

Πριν την έναρξη κάθε πειράματος προετοιμάζονται πρότυπα δείγματα από το διάλυμα παρακαταθήκης και αραιώνεται ποσότητα σκευάσματος για την ποσοτικοποίηση στην ανάλυση. Με βάση την ποσοτικοποίηση κάθε φορά υπολογίζονται και τα ποσοστά που θα αποτελούν την απόκριση στο σχεδιασμό.

Έχοντας προετοιμάσει 2 συνταγές υδρογέλης υδροχλωρικής δονεπεξίλης από την προηγούμενη μέρα, ξεκινούν οι μετρήσεις στα κύτταρα Franz. Με όμοιο τρόπο κάθε φορά ακολουθούνται οι εξής οδηγίες για την εκτέλεση του πειράματος.

1. Προετοιμασία μεμβράνης αναγεννημένης κυτταρίνης:
 - i. Με προσοχή ένα φύλλο μεμβράνης απομονώνεται από τη συσκευασία του.
 - ii. Μεταφέρεται σε ένα ποτήρι ζέσεως και τη βυθίζεται σε απιονισμένο νερό για 15 λεπτά.
 - iii. Έπειτα, γίνεται ανανέωση με καινούργιο απιονισμένο νερό και αφήνεται για άλλα 30 λεπτά.
 - iv. Τέλος, αδειάζοντας το νερό και προσθέτοντας το επιθυμητό διάλυμα αφήνεται για 15 λεπτά.
2. Παρασκευάζονται 50mL διαλύματος KH_2PO_4 0,2M σε νερό HPLC grade ρυθμίζοντας το pH με NaOH σε 7,4 (φυσιολογικό pH αίματος), το οποίο ονομάζεται PBS.
3. Με έμβολο κόβονται κατάλληλα στρογγυλά κομμάτια από τη μεμβράνη και τα απλώνονται πάνω στους δέκτες των κυττάρων, ώστε να καλυφθεί το κενό.
4. Κρατώντας σταθερό το δέκτη τοποθετούμε το δότη ακριβώς από πάνω και στερεώνουμε ένα μανταλάκι που σφίγγει κολλητά δότη και δέκτη, ώστε να στέκεται συμπαγές όλο το σώμα, σαν ενιαίο σύστημα.
5. Έλεγχος για πιθανές διαρροές και διόρθωση.
6. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 2.-4. μέχρι να ετοιμαστούν 6 κύτταρα.
7. Σε κάθε δέκτη κυττάρου προστίθενται 5mL PBS και μεταφέρονται σε θερμαινόμενο λουτρό θερμοκρασίας 36,3°C, όπου αφήνονται για 15min για εξισορρόπηση της θερμοκρασίας.
8. Στο χρονικό σημείο 0 εμβολιάζονται τα κύτταρα με 100μL πηκτώματος (με τη βοήθεια ειδικής πιπέτας ακριβείας για ημιστερεά). Από κάθε συνταγή εμβολιάζονται με την ίδια ποσότητα 3 διαφορετικά κύτταρα κάθε φορά.
9. Μετά από τον εμβολιασμό γίνεται δειγματοληψία ανά τακτά χρονικά διαστήματα στα χρονικά σημεία 0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 3h και 4h με σύριγγα Hamilton 250μL συλλέγοντας 500μL σε κάθε δειγματοληψία.
10. Μετά τις 4 ώρες αποσυναρμολογούνται οι δότες και με μία σπάτουλα μεταφέρεται το εναπομείναν πήκτωμα σε φιαλίδια με 10mL κινητή φάση και την ίδια τη μεμβράνη σε φιαλίδια με 1mL κινητή φάση.
11. Τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα, όπου χρειάζεται και μεταφέρονται σε φιαλίδια HPLC για ανάλυση.

Από την άλλη πλευρά, η διαδικασία του ex vivo πειράματος ελάχιστα διαφέρει από αυτό που περιγράψαμε στην περίπτωση της τεχνητής μεμβράνης. Ο ρινικός βλεννογόνο από τα κουνέλια αφαιρείται χειρουργικά από τα διάφραγμα της μύτης και απλώνεται στα κύτταρα όπως ακριβώς κάναμε και με τη μεμβράνη κυτταρίνης. Επίσης, για την απομάκρυνση του πηκτώματος από τους δότες γίνεται εκχύλιση με την κινητή φάση προσθέτοντας και φυλάσσοντας λίγη λίγη ποσότητα κινητής φάσης μέχρι να συλλέξουμε 4mL. Αντίθετα, η μεμβράνη εκχυλίζεται σε Eppendorf με νερό και στο τέλος με οργανική φάση. Επίσης, προστέθηκαν, επιπλέον, τα χρονικά σημεία 0,25h, 0,75h για δειγματοληψία για καλύτερη παρατήρηση των αποτελεσμάτων και χρησιμοποιήθηκαν 4 κύτταρα αντί για 3 με το ίδιο σκεύασμα. Τέλος, απαραίτητη είναι και η χρήση προστήλης στην ανάλυση των δειγμάτων λόγω υψηλού κινδύνου βιολογικής πρόσμειξης.

B.2.7 Μελέτη σταθερότητας

Ο τελικός σκοπός κάθε φαρμακευτικού προϊόντος, όταν αναπτύσσεται είναι η διάθεση και η διανομή του στην αγορά. Μια πολύ σημαντική παράμετρος που διαφαίνεται από τα πρώτα κιόλας βήματα είναι η σταθερότητα. Αν και είναι γνωστό ότι το φάρμακο είναι σταθερό, αξίζει να εξεταστεί πώς συμπεριφέρεται σε πρωτότυπες συνταγές και κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Ενδέχεται, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων με κύτταρα Franz να προκύπτει απώλεια δονεπεξίλης για λόγους σταθερότητας. Αυτό μπορεί να διαπιστωθεί μελετώντας τη σταθερότητα διαλυμάτων σε ανακινούμενο – θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (shaking bath) για να προσομοιωθούν οι συνθήκες του δέκτη. Η διαδικασία για το shaking bath είναι πολύ απλή:

1. Παρασκευάζεται διάλυμα δονεπεξίλης 8μL/mL με PBS 0,2M pH 7,4.



Εικόνα 25: Περιστροφικό ιζωδόμετρο

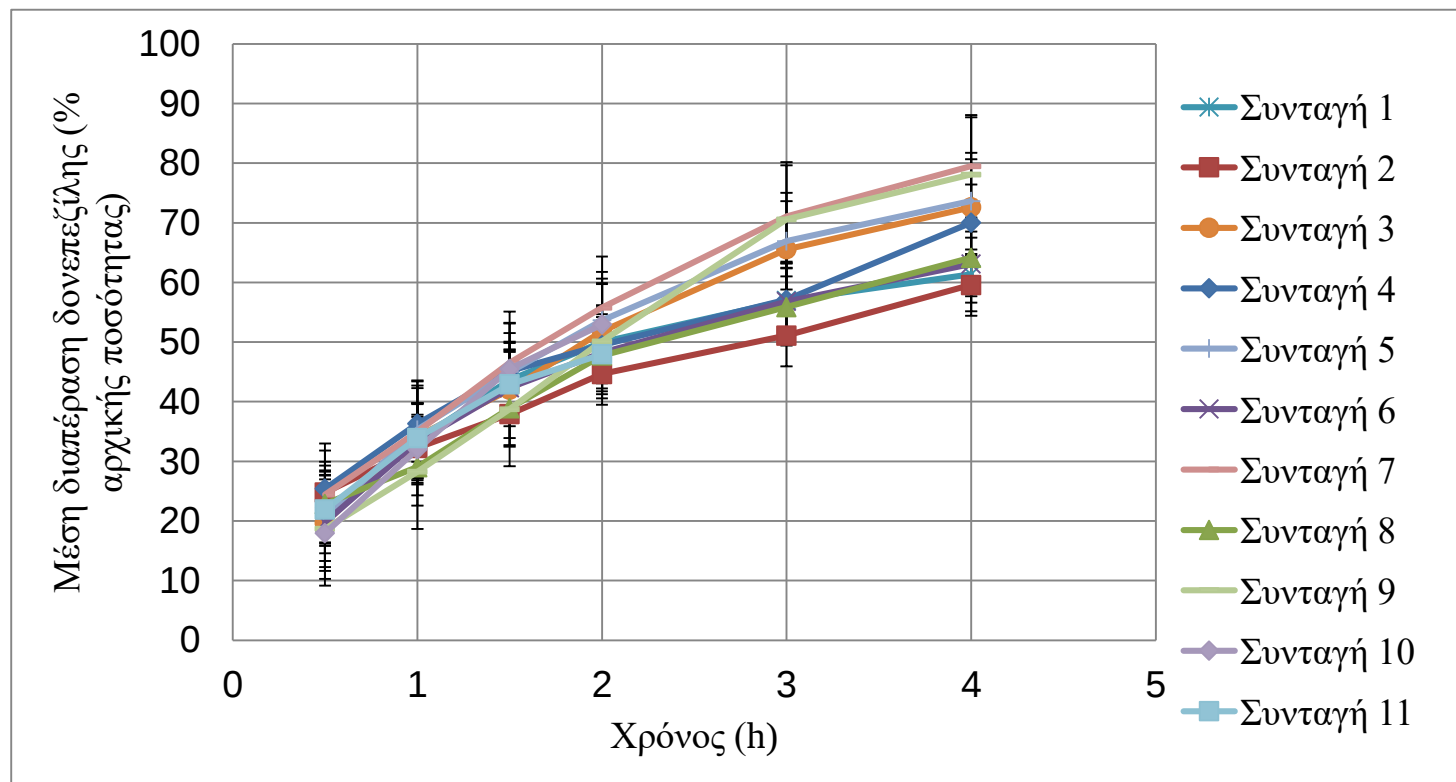
2. Το διάλυμα χωρίζεται σε 5 ίσα μέρη και το μεταφέρω σε 5 κωνικές φιάλες.
3. Σε θερμοκρασία 36,3°C με ανακίνηση 50rpm αφήνονται οι κωνικές στο υδατόλουτρο.
4. Με σύριγγα Hamilton 250μL συλλέγονται 500μL στα χρονικά σημεία 0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 3h, 4h από κάθε κωνική και αναλύω τα δείγματα.

Για να εξεταστεί η μακροπρόθεσμη σταθερότητα των συνταγών φτιάχτηκαν 2 σειρές από τις 9 διαφορετικές συνταγές πηκτωμάτων που διατηρήθηκαν σε συνθήκες δωματίου προστατευόμενες από το φως και στο ψυγείο. Με την πάροδο των ημερών, γίνονται δειγματοληψία ανά τακτά χρονικά διαστήματα από κάθε σκεύασμα και μετρήθηκε η συγκέντρωση της δονεπεξίλης των σκευασμάτων και ύστερα μετρήθηκε το ιξώδες στο ιξωδόμετρο. Το περιστροφικό ιξωδόμετρο μετράει την ακρίβεια σε ποσοστό (% accuracy) και το ιξώδες σε CPS. Η ακρίβεια πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 10 και 90% για είναι δυνατή η καταγραφή της τιμής του ιξώδους.

B.3. Αποτελέσματα

B.3.1 Μελέτη διαπέρασης δονεπεξίλης από μεμβράνη αναγεννημένης κυτταρίνης

Στο 4^ο μέρος της διπλωματικής έχουν αρχειοθετηθεί όλα τα αποτελέσματα με πίνακες αναλυτικά, αλλά μπορούν να παρουσιαστούν συγκεντρωτικά σε ένα γράφημα, ώστε να μπορούν να γίνουν παρατηρήσεις για τη διαπέραση κάθε συνταγής και σύγκριση μεταξύ των συνταγών.



Εικόνα 26: Απεικόνιση μεταβολής % διαπέρασης δονεπεξίλης από μεμβράνη αναγεννημένης κυτταρίνης σε κύτταρα Franz.

Με μία πρώτη ματιά στην εικόνα που σχηματίζουν τα γραφήματα μπορούν να διακριθούν κάποια βασικά στοιχεία και χαρακτηριστικά της διαπέρασης. Αρχικά, η πορεία κάθε καμπύλης μπορεί να χωριστεί σε δύο μέρη: 0,5h μέχρι 2h και 2h μέχρι 4h. Στο πρώτο μέρος που έχουν γίνει και οι περισσότερες δειγματοληψίες, οι καμπύλες των συνταγών διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους και φαίνεται πώς ακολουθούν μια γραμμική πορεία. Αντίθετα, στο δεύτερο μέρος αυτή η συμπεριφορά φαίνεται πώς αλλάζει. Οι διαφορές μεταξύ των καμπυλών αρχίζουν να εμφανίζονται, καθώς οι καμπύλες απομακρύνονται η μία από την άλλη. Επίσης, αντί να συνεχίζουν την γραμμική τους πορεία, φαίνεται πως τείνουν να φτάσουν σε ένα πλατώ.

Εύλογα συμπεραίνει κάποιος, ότι όλα τα σκευάσματα είναι ικανά να απελευθερώσουν το φάρμακο σε επαρκή ποσότητα σε βάθος χρόνου. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι στις 4 ώρες έχει διαχυθεί το 60-80% της ουσίας που εμβολιάστηκε από όλα τα πειράματα, ενώ ήδη από το πρώτο μισάωρο ανιχνεύεται τουλάχιστον το 20% της ουσίας στο δέκτη.

Επίσης, έγινε γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των καμπυλών διάχυσης για τα σημεία 0,5h, 1h, 1,5h, και 2h για κάθε μία ξεχωριστά (Πίνακας 4), καθώς και z test για τη σύγκριση των κλίσεων.

Πίνακας 4: Γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των σημείων 0,5h, 1h, 1,5h, και 2h των καμπυλών διάχυσης δονεπεζίλης από μεμβράνη αναγεννημένης κυτταρίνης (: Στατιστικά σημαντικά διαφορετικές κλίσεις με συνταγές 7,9,10 και 11)*

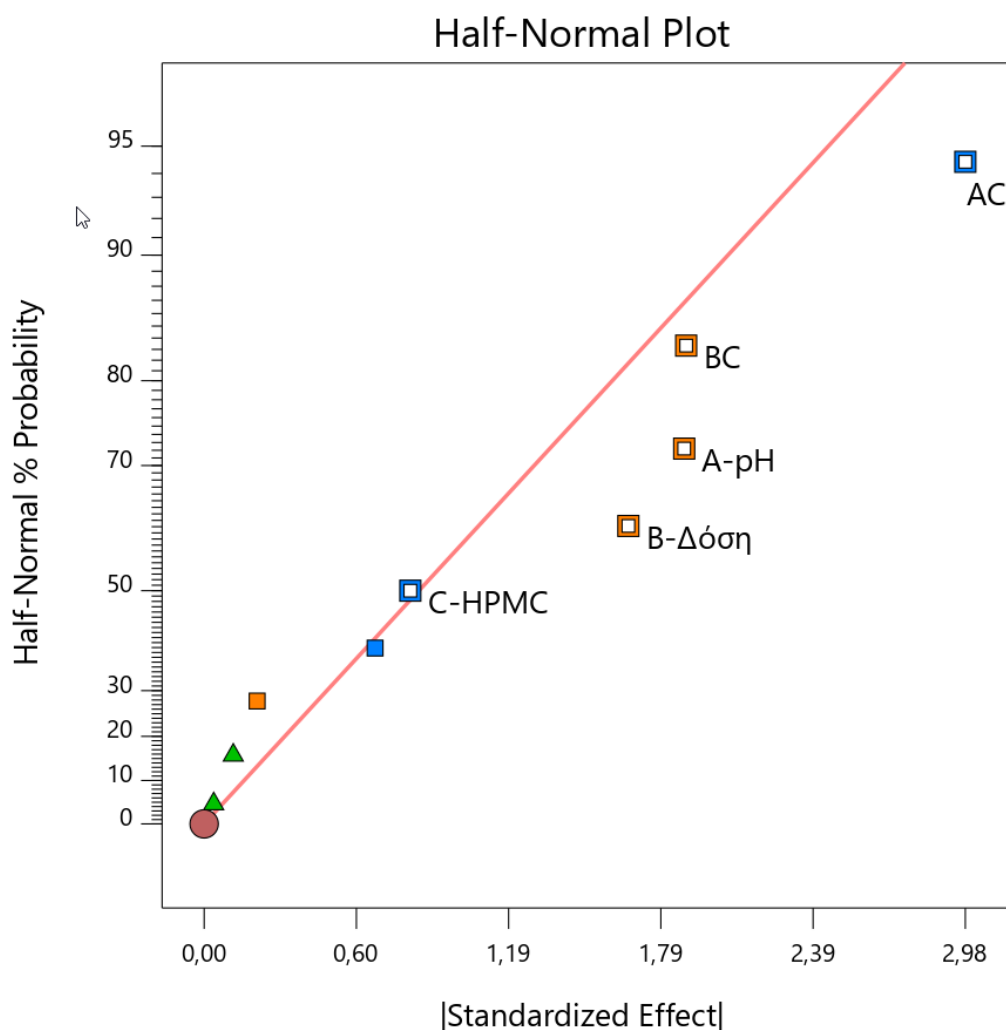
Συνταγή	Κλίση $\pm$ SE	Διακύμανση	Τομή $\pm$ SE	Διακύμανση	R ²
1	19.55 $\pm$ 4.08	16.61	12.562 $\pm$ 5.58	31.15	0.979
2	13.063 $\pm$ 0.94*	0.89	18.575 $\pm$ 1.29	1.67	0.997
3	20.829 $\pm$ 3.89	15.13	10.891 $\pm$ 5.33	28.38	0.983
4	16.201 $\pm$ 4.20	17.65	18.842 $\pm$ 5.75	33.09	0.968
5	21.889 $\pm$ 5.94	35.33	11.23 $\pm$ 8.14	66.24	0.983
6	18.878 $\pm$ 4.85	23.55	12.299 $\pm$ 6.65	44.16	0.968
7	21.125 $\pm$ 1.27	1.61	14.014 $\pm$ 1.74	3.03	0.998
8	16.914 $\pm$ 2.14	4.60	13.498 $\pm$ 2.94	8.62	0.992
9	20.959 $\pm$ 1.18	1.39	7.7661 $\pm$ 1.61	2.60	0.998
10	23.676 $\pm$ 4.47	19.98	7.519 $\pm$ 6.12	37.45	0.983
11	20.836 $\pm$ 2.99	8.93	9.479 $\pm$ 4.09	16.75	0.990

Οι συντελεστές προσδιορισμού (R²) βρίσκονται όλοι πολύ κοντά στο 1. Από τη σύγκριση των κλίσεων με εφαρμογή z test προκύπτει, ότι μόνο η κλίση της καμπύλης της συνταγής 2 διαφέρει στατιστικά σημαντικά από όλες τις άλλες λόγω της πολύ μικρής τυπικής απόκλισής της (Πίνακας 5).

B.3.2 Αποτελέσματα σχεδιασμού από το Design Expert

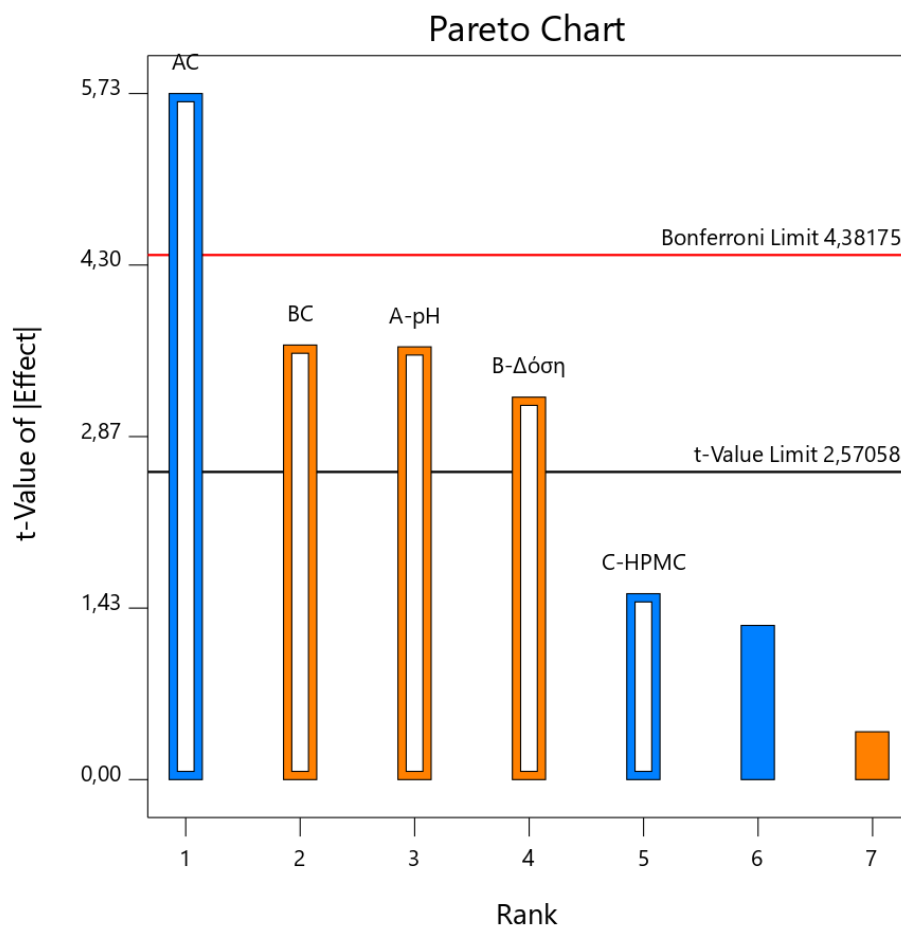
Μετά το πέρας όλων των πειραμάτων ακολουθεί η συλλογή όλων των αποτελεσμάτων και η καταγραφή στο Design Expert, ώστε να ερμηνευθούν και τελικά να βγουν κάποια συμπεράσματα για τη διαπέραση.

Αρχικά, γίνεται έλεγχος του διαγράμματος ημι-κανονικότητας και επιλέγονται οι παράγοντες και οι αλληλεπιδράσεις τους που φαίνεται να έχουν επιρροή στην απόκριση. Με οπτική παρατήρηση επιλέχθηκαν τα σημεία που απέχουν σημαντικά από την ευθεία του διαγράμματος, καθώς και οι 3 βασικοί παράγοντες.



Εικόνα 27: Διάγραμμα ημι-κανονικότητας με επιλεγμένους τους στατιστικά σημαντικούς παράγοντες. Μπλε τετράγωνα: αρνητική επίδραση, πορτοκαλί τετράγωνα: θετική επίδραση, πράσινα τρίγωνα: υπολογισμένα σφάλματα

Ο έλεγχος της σημαντικότητας της επίδρασης των παραγόντων γίνεται και μέσω του διαγράμματος Pareto.



Εικόνα 28: διάγραμμα Pareto

Μόνο η αλληλεπίδραση pH και HPMC ξεπερνάει το όριο Bonferroni, που σημαίνει, ότι με μεγάλη βεβαιότητα η αλληλεπίδραση αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στην μετρούμενη απόκριση. Στατιστικά σημαντικοί φαίνονται να είναι και άλλοι παράγοντες, όπως η δόση, το pH και η αλληλεπίδραση της δόσης με το HPMC.

Ακολουθεί η ανάλυση της μεταβλητότητας (ANOVA):

ANOVA for selected factorial model

Response 1: Μέσος όρος 0,5h

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	38,84	5	7,77	14,34	0,0116	significant
A-pH	7,08	1	7,08	13,06	0,0225	
B-Δόση	5,53	1	5,53	10,20	0,0331	
C-HPMC	1,31	1	1,31	2,41	0,1956	
AC	17,79	1	17,79	32,84	0,0046	
BC	7,14	1	7,14	13,17	0,0222	
Curvature	27,15	1	27,15	50,11	0,0021	
Residual	2,17	4	0,5417			
Lack of Fit	0,9842	2	0,4921	0,8321	0,5458	not significant
Pure Error	1,18	2	0,5914			
Cor Total	68,15	10				

Factor coding is **Coded**.

Sum of squares is **Type III - Partial**

The **Model F-value** of 14,34 implies the model is significant. There is only a 1,16% chance that an F-value this large could occur due to noise.

P-values less than 0,0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, AC, BC are significant model terms. Values greater than 0,1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The **Lack of Fit F-value** of 0,83 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 54,58% chance that a Lack of Fit F-value this large could occur due to noise.

Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

Εικόνα 29: Ανάλυση της μεταβλητότητας (ANOVA)

Παρατηρείται, ότι και το μοντέλο (model) και η καμπυλότητα (curvature) παρουσιάζουν τιμή p μικρότερη από 0,05. Αυτό σημαίνει, ότι το μοντέλο που κατασκεύασε το πρόγραμμα περιγράφει ικανοποιητικά τα δεδομένα και τα επιπλέον κεντρικά σημεία που μετρήθηκαν υποδεικνύουν την ύπαρξη καμπυλότητας στο χώρο σχεδιασμού. Καμπυλότητα σημαίνει, ότι η απόκριση για συνταγές με τιμές παραγόντων ενδιάμεσες από αυτές που ορίστηκαν, δεν μπορεί να προβλεφθεί από το συγκεκριμένο μοντέλο με αξιοπιστία.

Ακόμη, ο αναλυτικός πίνακας της εικόνας 24 επιβεβαιώνει τους στατιστικά σημαντικούς παράγοντες που επιλέχθηκαν αρχικά, οι οποίοι είναι το pH (A), η δόση (B), η αλληλεπίδραση δόσης και HPMC (BC) και η αλληλεπίδραση pH και HPMC

(AC). Επιπλέον, δεν εντοπίστηκε κάποια αδυναμία στην προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα (lack of fit).

Με συντελεστή προσδιορισμού (R^2) κοντά στο 1, το γραμμικό μοντέλο που περιγράφει τα αποτελέσματα πιθανώς να είναι κατάλληλο. Ωστόσο, το πρόγραμμα προειδοποιεί ότι ο διορθωμένος και ο προβλεπόμενος συντελεστής προσδιορισμού διαφέρουν αρκετά, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε πρόβλημα με το μοντέλο ή τα δεδομένα.

Fit Statistics

	Std. Dev.	0,7360	R²	0,9471
	Mean	21,30	Adjusted R²	0,8811
	C.V. %	3,46	Predicted R²	0,5510
			Adeq Precision	11,0297

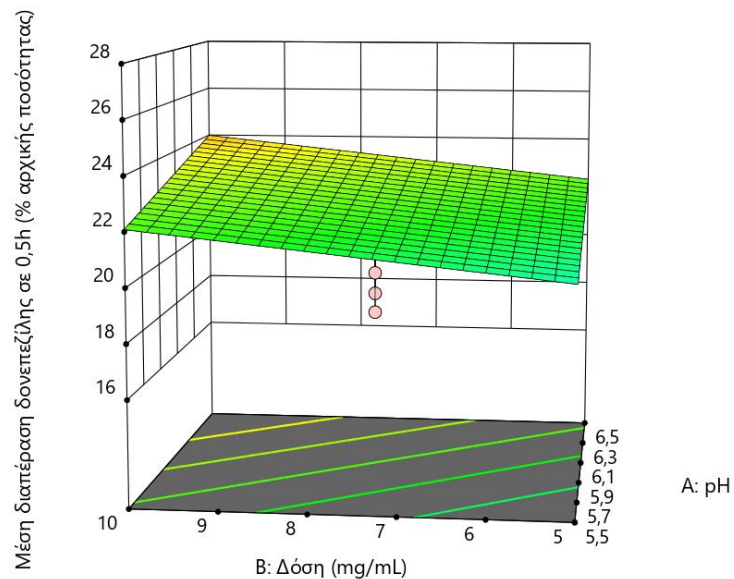
The **Predicted R²** of 0,5510 is not as close to the **Adjusted R²** of 0,8811 as one might normally expect; i.e. the difference is more than 0.2. This may indicate a large block effect or a possible problem with your model and/or data. Things to consider are model reduction, response transformation, outliers, etc. All empirical models should be tested by doing confirmation runs.

Adeq Precision measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 11,030 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

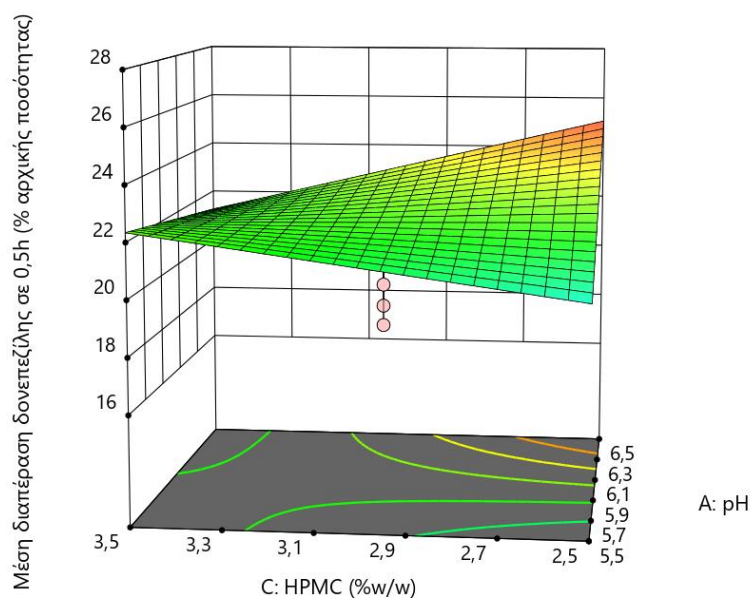
Εικόνα 30: Στατιστική προσαρμογής των δεδομένων στο μοντέλο.

Μια εξερεύνηση στα διαγνωστικά του προγράμματος αρκεί για να καταλάβουμε, ότι κανένα αποτέλεσμα δεν φαίνεται να αποκλίνει από τα υπόλοιπα και το μοντέλο, δηλαδή δεν υπάρχουν αποκλίνουσες τιμές (outliers), που θα προκαλούσαν προβλήματα δίνοντας ψευδή αποτελέσματα.

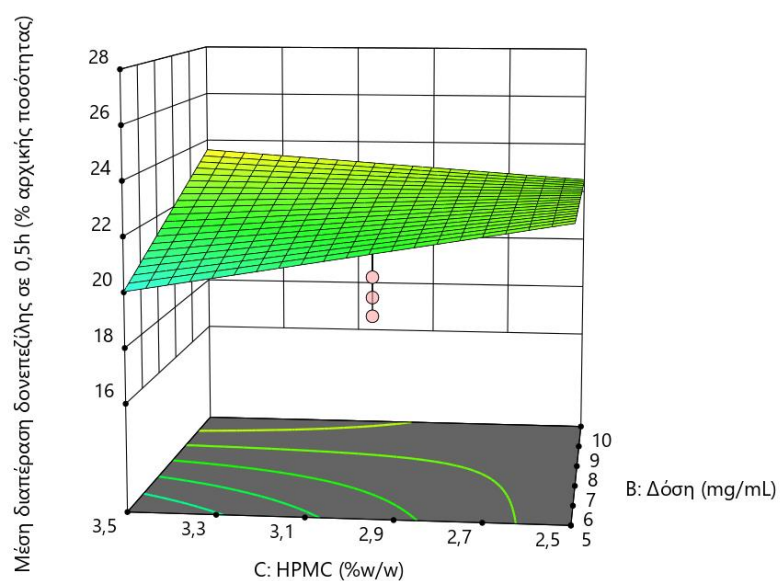
Μία επιπλέον δυνατότητα του Design Expert είναι η τρισδιάστατη αναπαράσταση του πειραματικού χώρου που περιγράφεται από το μοντέλο. Τα 3 κεντρικά σημεία που δεν επηρεάζουν το μοντέλο αυτό, βρίσκονται σαν σημεία στο κέντρο του κύβου. Τα σημεία βρίσκονται όλα κάτω από το επίπεδο που σχηματίζουν οι υπόλοιπες αποκρίσεις, που σημαίνει πως όντως στο κέντρο και γύρω από αυτό πρέπει να υπάρχει καμπυλότητα για να εξηγηθεί η μακρινή απόσταση των σημείων από το επίπεδο. Μάλιστα, η καμπυλότητα αυτή φαίνεται να είναι εις βάρος της απόκρισης, δηλαδή να μειώνεται στα κεντρικά σημεία και γύρω τους. Παράλληλα, οι στατιστικές σημαντικές αλληλεπιδράσεις απεικονίζονται ως κυρτά πεδία σε αντίθεση με το επίπεδο που σχηματίζει η ασήμαντη αλληλεπίδραση pH και δόση. (εικόνες 35-35).



Εικόνα 31: τρισδιάστατη αναπαράσταση απόκρισης ως προς δόση και pH.

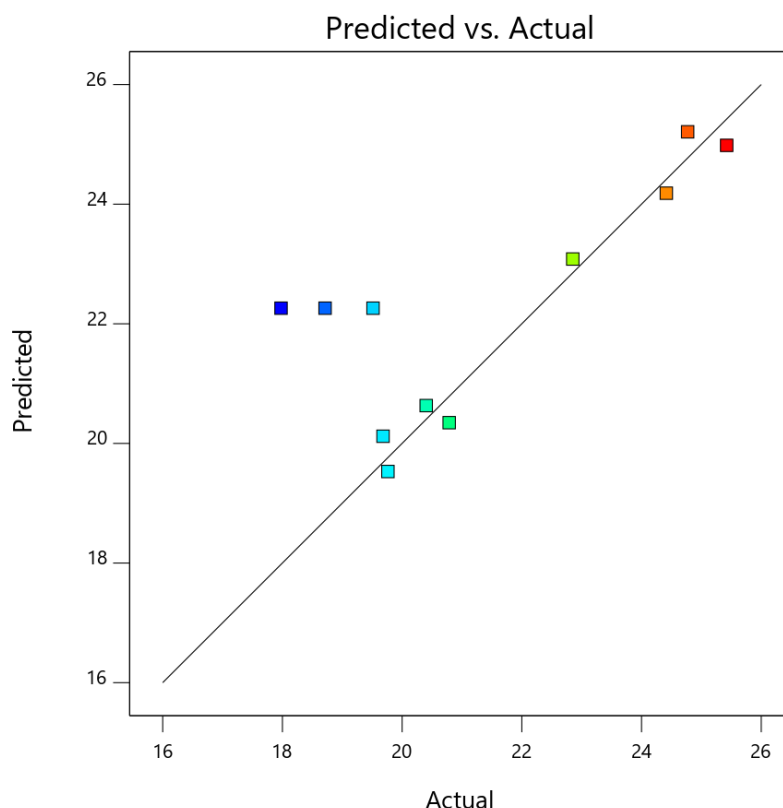


Εικόνα 32: τρισδιάστατη αναπαράσταση απόκρισης ως προς pH και HPMC.



Εικόνα 33: τρισδιάστατη αναπαράσταση απόκρισης ως προς δόση και HPMC.

Μία εναλλακτική οπτική γωνία των σημείων προσφέρει και η απεικόνιση των προβλεπόμενων και των πραγματικών τιμών. Εδώ, αναγνωρίζεται εύκολα η μεγάλη διαφορά των κεντρικών σημείων από την ευθεία των υπολοίπων.



Εικόνα 34: διάγραμμα πραγματικών τιμών ως προς τις προβλεπόμενες (τα τρία μπλε σημεία που απέχουν από τη γραμμικότητα είναι τα κεντρικά σημεία του σχεδιασμού).

Η πιο σημαντική και πολύτιμη πληροφορία που παράγεται από το design expert είναι η εξίσωση του μοντέλου που περιγράφει τα πειραματικά δεδομένα, η οποία αποτυπώνεται στην εξής συνάρτηση:

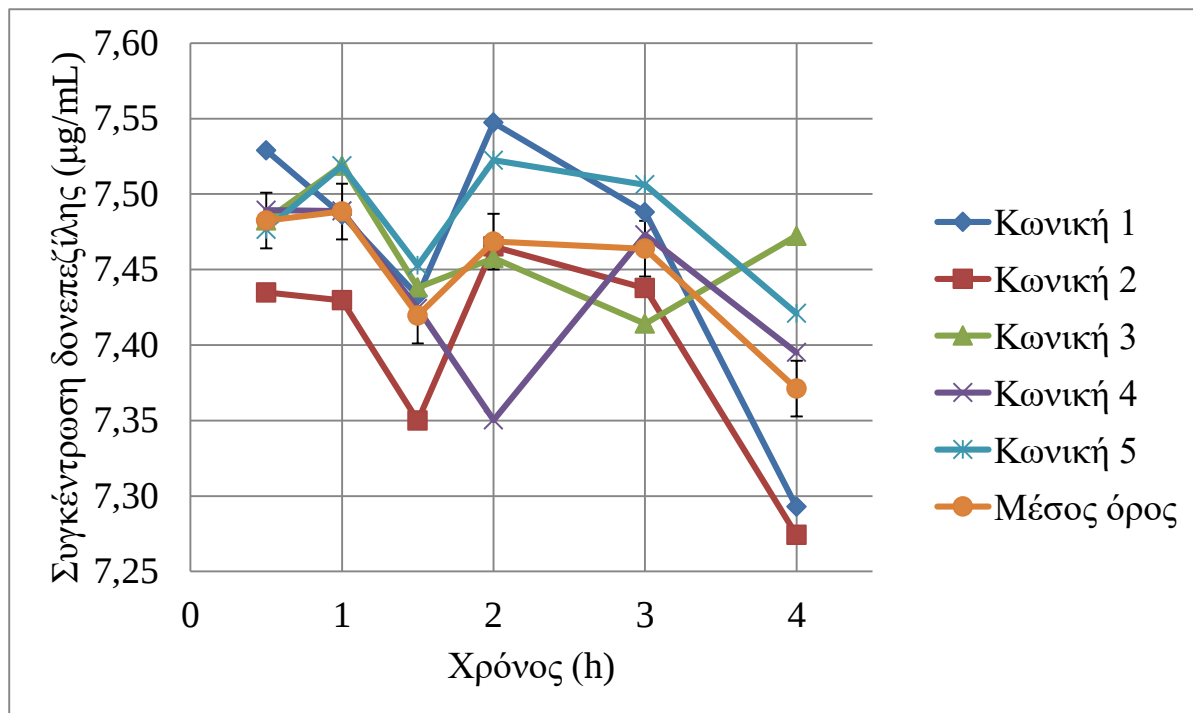
$$\begin{aligned} \text{Μέση διαπέραση δονεπεζίλης (\% αρχικής ποσότητας)} = & 19,77561 \cdot \text{pH} - \\ & 1,93418 \cdot \text{Δόση} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) + 29,31466 \cdot \text{HPMC} \left(\frac{\text{w}}{\text{v}} \% \right) - 5,96487 \cdot \text{pH} \cdot \text{HPMC} \left(\frac{\text{w}}{\text{v}} \% \right) + \\ & 0,755559 \cdot \text{Δόση} \cdot \text{HPMC} \left(\frac{\text{w}}{\text{v}} \% \right) - 79,46172, \end{aligned}$$

όπου η μέση διαπέραση (% αρχικής ποσότητας) μέσος όρος αντιστοιχεί στην εξαρτημένη μεταβλητή Y ενώ το pH, η δόση και το HPMC είναι οι ανεξάρτητες μεταβλητές x.

B.3.3 Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας

B.3.3.1. Σταθερότητα στις συνθήκες πειράματος διαπέρασης

Συλλέχθηκαν τα αποτελέσματα από 5 κωνικές φιάλες ίδιας συγκέντρωσης και τα αποτυπώθηκαν ως σημεία σε διάγραμμα.

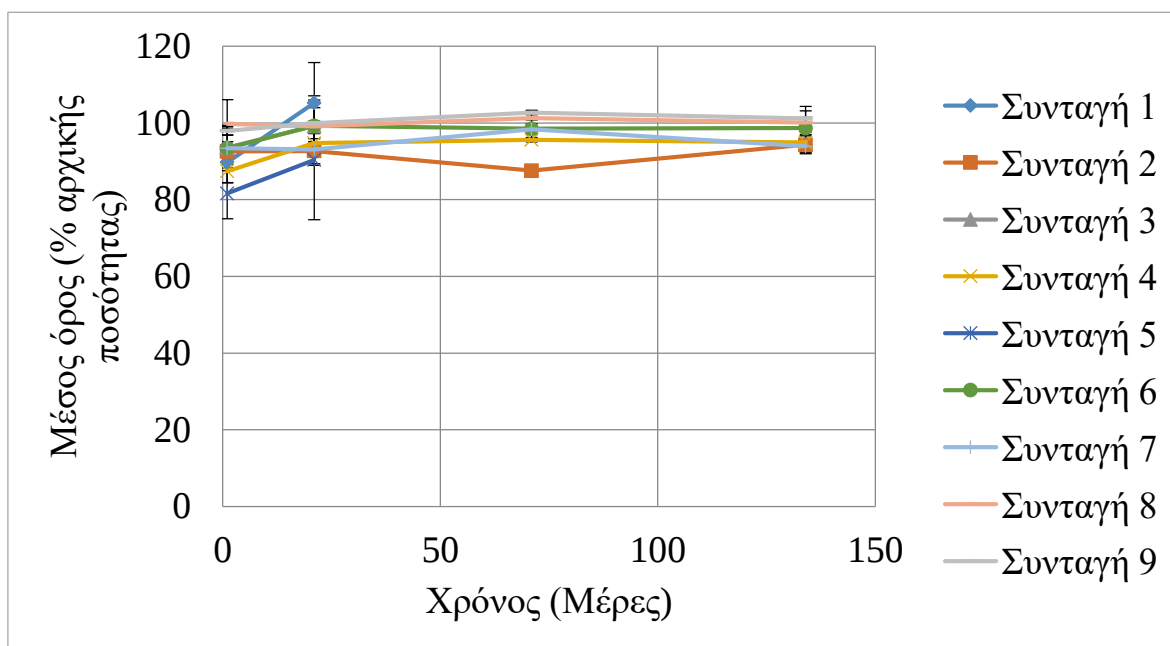


Εικόνα 35: Διάγραμμα σταθερότητας διαπέρασης

Αν συγκριθούν η πρώτη και η τελευταία δειγματοληψία σε όλες τις κωνικές υπάρχει μείωση στη συγκέντρωση των διαλυμάτων, η οποία με βάση τον έλεγχο t του μέσου δύο δειγμάτων συσχετισμένων ζευγών για τις πρώτες και τελευταίες μετρήσεις κάθε κωνικής είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,026$). Αυτή η μείωση όμως είναι αρκετά μικρή, της τάξεως του 1-3% της αρχικής συγκέντρωσης των δειγμάτων. Μία τόσο μικρή απώλεια δε θα είναι ικανή να επηρεάσει τα αποτελέσματα των πειραμάτων Franz.

B.3.3.2. Μελέτη χημικής σταθερότητας σε συνθήκες δωματίου και στο ψυγείο

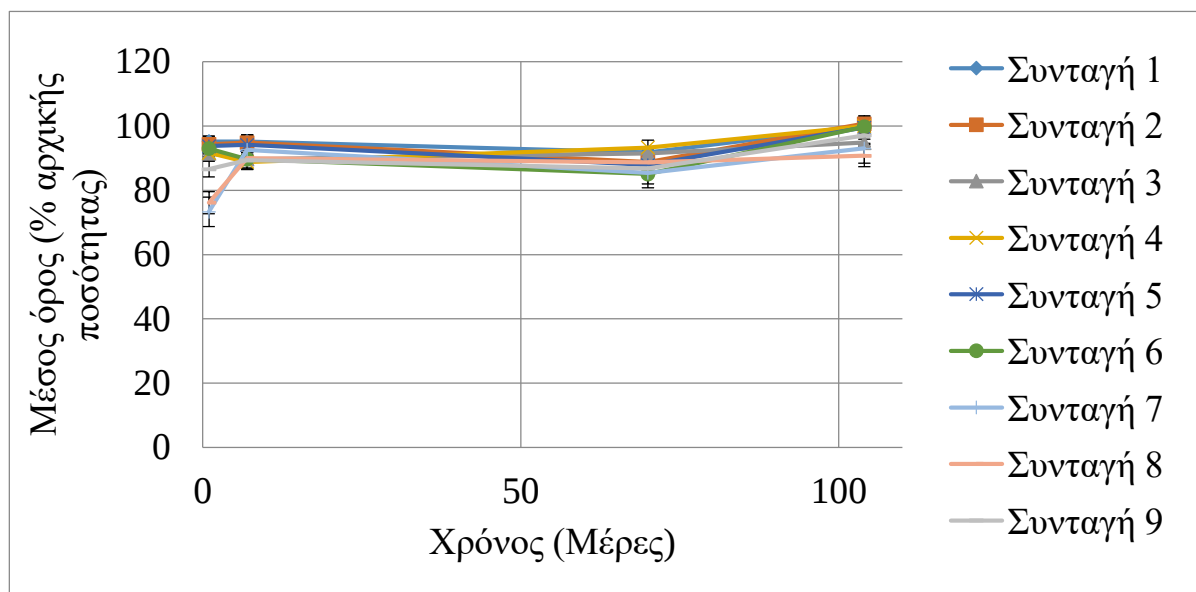
Δεδομένης της φύσης των δειγμάτων και για να ελαχιστοποιηθεί το σφάλμα δειγματοληψίας έγινε λήψη δείγματος από τρία διαφορετικά σημεία του περιέκτη κάθε συνταγής (επιφάνεια, μέσον, πυθμένας) και ακολούθησε ποσοτικοποίηση εις τριπλούν με την αναλυτική μέθοδο HPLC-PDA. Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης παρουσιάζονται στην Εικόνα 37 ως μεταβολή του μέσου όρου % της αρχικής ποσότητας από τρεις δειγματοληψίες με το χρόνο.



Εικόνα 36: Σταθερότητα των 9 συνταγών σε 134 μέρες μετά την παρασκευή τους

Στο παραπάνω διάγραμμα (εικόνα 37) διακρίνονται 3 συνταγές, οι οποίες παρουσίασαν σημαντική μείωση της μικροβιολογικής και κατά συνέπεια και της φυσικής σταθερότητάς μετά από 71 ημέρες φύλαξης σε συνθήκες δωματίου. Πιο συγκεκριμένα, οι συνταγές (1,3,5) αφαιρέθηκαν από τη μελέτη σταθερότητας, διότι σχηματίστηκαν αποικίες μυκήτων ορατές με γυμνό μάτι γεγονός, που πολύ πιθανόν να οφείλεται αφενός μεν στην απουσία συντηρητικού παράγοντα από όλες τις συνταγές, αφετέρου δε στη χαμηλή τιμή pH=5,5 που ευνοεί την ανάπτυξη μυκήτων, οι οποίοι ευδοκιμούν σε όξινο περιβάλλον. Ταυτόχρονα, όμως, όλες οι συνταγές διατήρησαν πολύ υψηλά ποσοστά του φαρμάκου ακόμα και μισό χρόνο μετά την παρασκευή τους.

Μετά την απαλοιφή δειγμάτων λόγω ανάπτυξης μυκήτων, δοκιμάστηκε παρόμοια μελέτη σταθερότητας διατηρώντας τις συνταγές αυτή τη φορά στο ψυγείο.

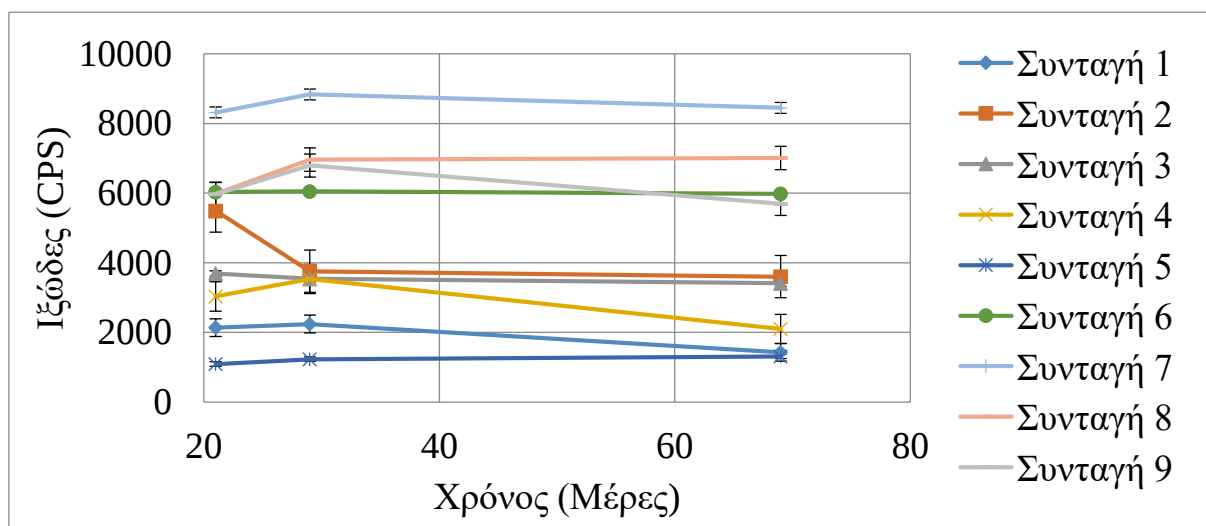


Εικόνα 37: Σταθερότητα των 9 συνταγών σε 104 μέρες μετά της παρασκευή τους

Οι μετρήσεις για τη σταθερότητα των σκευασμάτων στο ψυγείο (εικόνα 33) δείχνουν, ότι, τελικά, τα δείγματα παραμένουν σταθερά σε διάστημα 4 μηνών σε θερμοκρασία 4°C από άποψη τόσο φυσικής και μικροβιολογικής σταθερότητας, όσο και χημικής σταθερότητας.

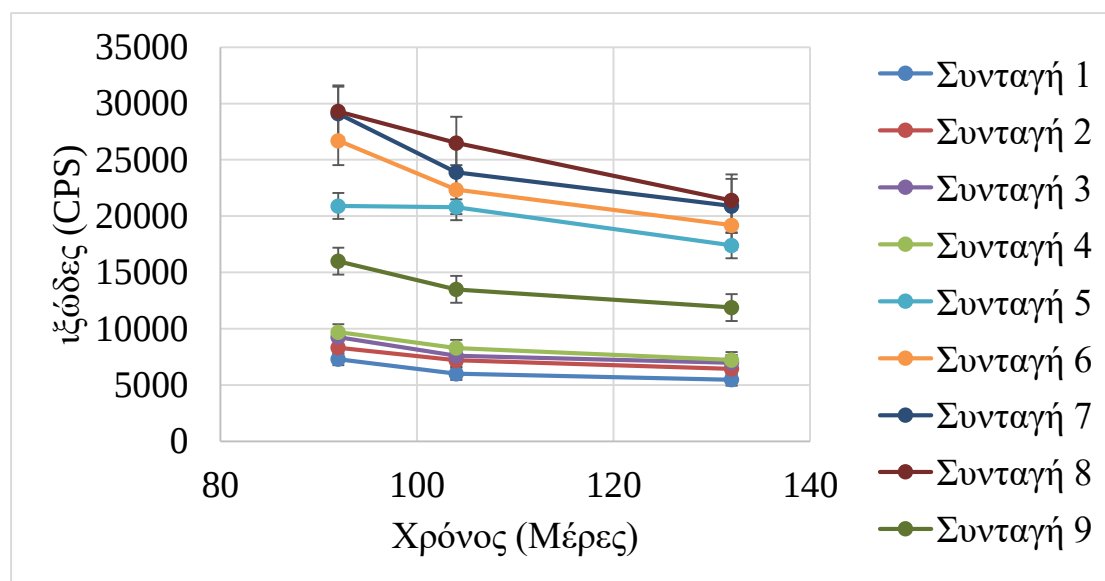
B.3.3.3. Μελέτη φυσικής σταθερότητας σε συνθήκες δωματίου και στο ψυγείο

Για την απόκτηση μίας πλήρους εικόνας για τη φυσική σταθερότητα των σκευασμάτων μετρήθηκε και το ιξώδες των σκευασμάτων στη διάρκεια της μελέτης σταθερότητας τόσο σε συνθήκες δωματίου όσο και στο ψυγείο.



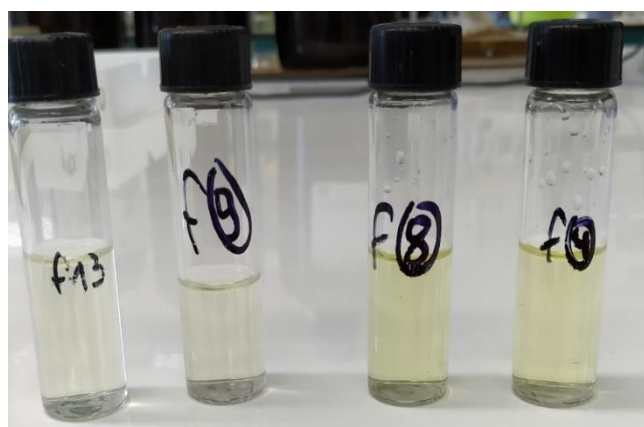
Εικόνα 38: Μεταβολή ιξώδους (rpm 30) σε φύλαξη σε συνθήκες δωματίου.

Σε αντιδιαστολή, τα πηκτώματα που αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά. Καταρχάς γίνεται αισθητή η διαφορά μεταξύ των συνταγών που διαφέρουν ως προς τη περιεκτικότητα του HPMC. Επίσης, με το πέρας των ημερών όλες οι συνταγές παρουσιάζουν μία τάση μείωσης ιξώδους.



Εικόνα 39: Μεταβολή ιξώδους (rpm 12) σε φύλαξη σε συνθήκες ψυγείου

Αρχικά, πρέπει να σημειωθεί ότι με οπτικό έλεγχο, όπως παρατηρήθηκε η ανάπτυξη μικροβίων, γίνεται αισθητή η αλλαγή στο χρώμα των πηκτωμάτων. Σταδιακά, κάποια και μετά όλα τα πηκτώματα που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες δωματίου μακριά από φως αποκτούν ωχροκίτρινες αποχρώσεις, άλλα πιο έντονη και άλλα λιγότερο (εικόνα 38). Πιο συγκεκριμένα, οι συνταγές 4 και 8 γίνονται κίτρινες, ενώ τα υπόλοιπα πηκτώματα αποκτούν ένα ωχροκίτρινο χρώμα.

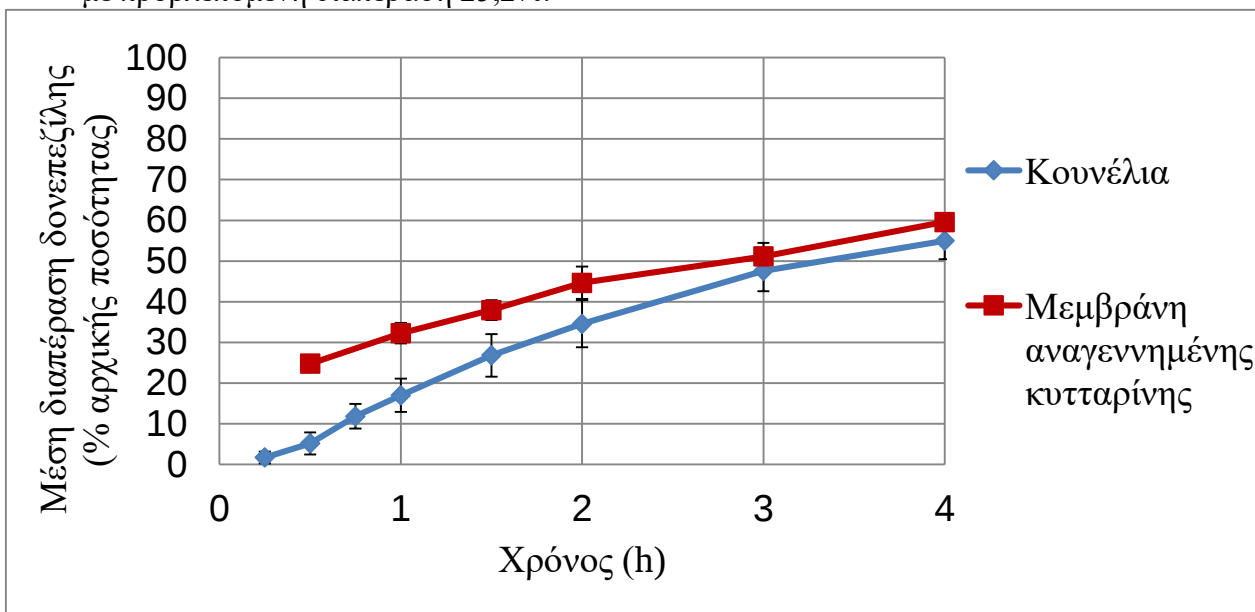


Εικόνα 40: Πηκτώματα που απέκτησαν ωχροκίτρινο χρώμα σε βάθος χρόνου.

Το ιξώδες στην παρούσα εργασία λίγες πληροφορίες μπορεί να παρέχει για ένα ψευδοπλαστικό ρευστό, όπως είναι το πηκτωμα από HPMC. Παρόλα αυτά, το ιξώδες μετρήθηκε σαν ένδειξη της φυσικής σταθερότητας των σκευασμάτων, αλλά δεν σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές με το πέρας των ημερών. Αντίθετα, ο οπτικός έλεγχος είναι πολύ σημαντικός για την αναγνώριση αλλοιώσεων των πηκτωμάτων σε βάθος χρόνου.

B.3.4 Ex vivo πείραμα σε κύτταρα Franz

Με τον τερματισμό του σχεδιασμού πειραμάτων επιδιώχθηκε η δοκιμή του σκευάσματος με τη μεγαλύτερη ικανότητα διαπέρασης από την τεχνητή μεμβράνη και σε μεμβράνη από κουνέλια. Προκειμένου να ανιχνευθεί η βέλτιστη συνταγή χρησιμοποιήθηκε ο σχεδιασμός που πραγματοποιήθηκε στο Design Expert. Εκεί, υπάρχει η δυνατότητα εντοπισμού της συνταγής, η οποία με βάση το μοντέλο θα έχει τη μέγιστη διαπέραση. Το αποτέλεσμα που προτείνει το πρόγραμμα είναι η συνταγή 2 με προβλεπόμενη διαπέραση 25,2%.



Εικόνα 41: Καμπύλες διαπέρασης από πειράματα με κύτταρα Franz μέσα από μεμβράνη αναγεννημένης κυτταρίνης και μέσα από απομονωμένη ρινική βλεννογόνο κουνελιών.

Η χρήση μεμβράνης αναγεννημένης κυτταρίνης σε σύγκριση με τη βιολογική μπορεί να οδηγήσει σε πολύ διαφορετικά συμπεράσματα για τη διαπέραση του ίδιου ακριβώς φαρμακομορίου. Στο γράφημα της εικόνας 41 που απεικονίζονται συγκριτικά οι 2 καμπύλες, η διαπέραση της δονεπεζίλης, από την μεμβράνη αναγεννημένης κυτταρίνης είναι αρκετά πιο γρήγορη στην αρχή, αλλά μετά από 4 ώρες φαίνεται πως πλησιάζει εκείνην της απομονωμένης ρινικής βλεννογόνου από κουνέλια.

B.4. Συμπεράσματα και συζήτηση

Ολοκληρώνοντας την παρούσα εργασία, είναι κρίσιμης σημασίας να δοθεί μία ερμηνεία σε όσα αποτελέσματα έχουν συλλεχθεί με τη βοήθεια της βιβλιογραφίας, σχηματίζοντας ίσως κάποιες θεωρίες και υποθέσεις. Σε δεύτερο χρόνο θα αναφερθούν προτάσεις για το πώς μπορεί να εξελιχθεί περαιτέρω αυτή η γνώση και πού θα μπορούσε να εφαρμοστεί.

B.4.1 Συμπεράσματα για το σχεδιασμό πειραμάτων

Το τελικό συμπέρασμα από τον πειραματικό σχεδιασμό που εφαρμόστηκε είναι ότι στη διαπέραση της δονεπεζίλης από τα πηκτώματα ρινικής χορήγησης που

παρασκευάστηκαν οι παράγοντες pH και δόση είναι στατιστικά σημαντικοί, το ίδιο και η αλληλεπίδραση pH με HPMC. Ειδικότερα, θα σχολιαστεί ο κάθε παράγοντας ξεχωριστά.

pH: Το pH, στο εύρος που μελετήθηκε, θεωρητικά, δε θα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εφαρμογή ρινικού πηκτώματος στον ανθρώπινο βλεννογόνο, καθώς ο όγκος και το pH της βλέννας του περιβάλλοντος σε σύγκριση με τα 100μL του σκευάσματος, κυριαρχεί. Το φυσιολογικό pH της ρινικής κοιλότητας κυμαίνεται 5,5-6,5, ενώ μπορεί να αυξηθεί μέχρι και 8,3 σε φλεγμονώδεις καταστάσεις (England et al. 1999). Επιπρόσθετα, η βλέννα που παράγεται καθημερινά στο επιθήλιο, φτάνει τα 200g ή 2L (Beule 2010). Ωστόσο, φαίνεται πως έχει σημασία για τη σταθερότητα του σκευάσματος, διότι όξινα pH ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων. Δεδομένου ότι το λογισμικό Design Expert που χρησιμοποιήθηκε για τον πειραματικό σχεδιασμό, χαρακτηρίζει το pH ως σημαντικό παράγοντα στη διαπέραση, τότε μία λογική εξήγηση θα ήταν πως ο βαθμός ιονισμού του φαρμάκου επηρεάζει τη διαπέραση, τουλάχιστον στο πρώτο μισάωρο. Με $pK_a > pH + 2$ να ισχύει για όλες τις συνταγές, η διαφορά είναι αρκετά μεγάλη, ώστε το φάρμακο να βρίσκεται πρακτικά μόνο στη μία μορφή του. Εφόσον είναι ασθενής βάση το φάρμακο, σε όξινο pH θα βρίσκεται κυρίως στη μη ιονισμένη μορφή του. Άρα, δεν μπορεί να ευθύνεται ο ιονισμός του μορίου για την αύξηση της διαπέρασης.

Μία άλλη εξήγηση θα μπορούσε να στηριχτεί στην επίδραση του pH στη μεμβράνη αναγεννημένης κυτταρίνης. Οι μεμβράνες αυτές μπορούν να αλλοιωθούν, είτε λόγω της χημικής υδρόλυσης, είτε λόγω της βιολογικής υδρόλυσης είτε λόγω συμπίεσης. Με σταθερή τη θερμοκρασία και χωρίς την επίδραση κάποιας ισχυρής πίεσης η μεμβράνη δεν μπορεί να συμπιεστεί. Με όλα τα διαλύματα παρασκευασμένα αρκετά πρόσφατα, δύσκολο να υποψιαστούμε την ύπαρξη κάποιου μικροβίου που θα μπορούσε να υδρολύσει την κυτταρίνη. Χημική υδρόλυση, όμως, μπορεί να συμβεί εξαιτίας του pH. Το προτεινόμενο pH χρήσης για τέτοιες μεμβράνες είναι 5. Με το δέκτη σε pH 7,4 και το δότη σε εύρος pH 5,5-6,5 βρισκόμαστε αρκετά κοντά στις προδιαγραφές. Το ενδεχόμενο η αύξηση του pH στο σκεύασμα να διευρύνει ελαφρώς τους πόρους της μεμβράνης διευκολύνοντας τη διάχυση δεν αποκλείεται (Moran 2018). Βέβαια, με τον παράγοντα αυτό να μην ξεπερνά το όριο Bonferroni δεν είμαστε 100% σίγουροι για την επιρροή αυτού του παράγοντα.

Δόση: Αρχικά, αξίζει να υπογραμμιστεί, ότι σαν απόκριση επιλέχθηκε το ποσοστό της συνολικής δόσης δονεπεξίλης που διαχέεται και σαν παράγοντας δηλώθηκε η ποσότητα της δονεπιζίλης σε κάθε πήκτωμα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του σχεδιασμού η αύξηση της δόσης επιταχύνει το ποσοστό της αρχικής δόσης που θα διαπεράσει μέσα από τη μεμβράνη. Αν λοιπόν, η απόκριση επηρεάζεται από τη δόση, τότε αυτή παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, όχι μόνο στη ποσότητα που θα διαχυθεί, αλλά και στην ταχύτητα της διάχυσης. Θα αναλύσουμε περαιτέρω το μηχανισμό της διάχυσης σε επόμενη παράγραφο.

HPMC: Το πολυμερές του σκευάσματος HPMC αποτελεί το βασικότερο συστατικό για την παρασκευή πηκτωμάτων. Η κύρια επίδρασή του στο σύστημα εντοπίζεται με την αύξηση του ιξώδους. Ωστόσο, από τα αποτελέσματα του σχεδιασμού συνεπάγεται, ότι αν και από μόνο του το HPMC δεν επηρεάζει την

απόκριση, αλληλεπιδρά με τους άλλους δύο παράγοντες. Η αλληλεπιδράσεις αυτές είναι δύσκολο να ερμηνευτούν μόνο με αυτά τα δεδομένα, για πιο συγκεκριμένα συμπεράσματα, πάντως, απαιτείται περισσότερη μελέτη. Μάλιστα, η θετική αλληλεπίδραση HPMC και pH είναι πολύ σημαντική σύμφωνα με τα δεδομένα. Στην βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι όντως το pH μπορεί να τροποποιήσει την μακρομοριακή δομή του πολυμερούς στο μείγμα (Punitha et al. 2020). Πιθανόν μία τέτοια αλληλεπίδραση να προσδίδει διαφορετικά χαρακτηριστικά στο σκεύασμα και σαν απόρροια και στη διαπέραση.

Η αλληλεπίδραση της δόσης με το HPMC, αν και λιγότερο σημαντική, είναι πιθανό να σχετίζεται με την ύπαρξη μοριακής αλληλεπίδρασης του συγκεκριμένου φαρμάκου με το πολυμερές. Ένα παράδειγμα θα ήταν ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου που θα δέσμευε το περισσότερο φάρμακο στο δέκτη ή κάποια άλλη χημική αλληλεπίδραση που ευθύνεται για αυτά τα αποτελέσματα (Dahlberg et al. 2010).

B.4.2 Συμπεράσματα για τις καμπύλες διαπέρασης

Τα γραφήματα των *in vitro* πειραμάτων επιτρέπουν την παρατήρηση μας πολλών στοιχείων της διαπέρασης της δονεπεζίλης από τα διαφορετικά πηκτώματα (συνταγές) που παρασκευάστηκαν. Η μεμβράνη αναγεννημένης κυτταρίνης είναι ένα πολύ απλό, πορώδες υλικό που λειτουργεί ως ημιπερατή μεμβράνη, επιτρέπει δηλαδή συγκεκριμένα μόρια μόνο να τη διαπεράσουν. Ο κυρίαρχος μηχανισμός διαπέρασης σε τέτοιες μεμβράνες είναι η διάχυση, όπως αυτή περιγράφεται από τους νόμους του Fick. Η γραμμική συμπεριφορά στις πρώτες δύο ώρες αποτελεί σημαντική ένδειξη διάχυσης του φαρμάκου σύμφωνα με τον πρώτο νόμο του Fick. Η διάχυση σε αυτό το μέρος γίνεται με σταθερό ρυθμό, όταν όμως περνάνε περισσότερες ώρες αυτή η γραμμικότητα χάνεται και πια έχουμε μεταβαλλόμενο ρυθμό διάχυσης. Αλλαγή του ρυθμού διαπέρασης στα δύο αυτά χρονικά μέρη πιθανώς να οφείλεται στο ότι 40-50% του φαρμάκου έχει διαχυθεί και αρχίζει να επέρχεται μία ισορροπία μεταξύ δότη και δέκτη. Τόσο με βάση τα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού για την απόκριση στη 0,5h όσο και με βάση την αρχική κλίση των καμπυλών διάχυσης, όπως υπολογίζεται με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης στα πρώτα σημεία των καμπυλών γίνεται σαφές πως οι συνταγές μεταξύ τους δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα στη διαπέραση, άρα οι παράγοντες που επιλέχθηκαν οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα, όταν μεταβάλλονται.

Τα αποτελέσματα της *ex vivo* μελέτης, όπως αποτυπώνονται στο γράφημα της εικόνας 40 συμφωνούν με τα συμπεράσματα των *in vitro* πειραμάτων. Η γραμμικότητα που διαπιστώθηκε στις πρώτες 2 ώρες διατηρείται και σε αυτό το γράφημα. Ωστόσο, σε σύγκριση με την ίδια συνταγή *in vitro* έχουμε σαφώς μεγαλύτερες μετρήσεις στις συγκεντρώσεις του δέκτη. Αυτό μπορεί να είναι απόρροια διαφόρων παραγόντων, όπως το διαφορετικό πάχος και η σύσταση της βιολογικής μεμβράνης. Η ύπαρξη επιπλέον μηχανισμών διαπέρασης από τη βιολογική μεμβράνη απαιτεί επιπλέον πειράματα για να αξιολογηθεί.

B.4.3 Συμπεράσματα για τη σταθερότητα

Η μελέτη σταθερότητας που ολοκληρώθηκε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ενδεικτική για την κατάσταση των σκευασμάτων που παρασκευάστηκαν σε βάθος χρόνου. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα είναι αρκετά ενθαρρυντικά, διότι το φάρμακο φαίνεται να υπάρχει διαθέσιμο σε ποσότητα ίση με την αρχική στα σκευάσματα ακόμα και 4 μήνες μετά την παραγωγή τους. Ωστόσο, κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη συντηρητικών σε όλες τις συνταγές για να μην μπορούν να αναπτυχθούν επικίνδυνοι μικροοργανισμοί.

Οι συνταγές 4 και 8, οι οποίες εμφάνισαν έντονη χρωματική αλλαγή, όταν μελετήθηκε η σταθερότητά τους σε συνθήκες δωματίου και μακριά από ηλιακή ακτινοβολία. Οι δύο αυτές συνταγές έχουν κοινά χαρακτηριστικά την υψηλή δόση (10mg/mL) και το υψηλό pH (6,5), αλλά διαφέρουν στην περιεκτικότητα HPMC. Συμπεραίνοντας, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να εξηγούν την αλλαγή χρώματος και απαιτούνται επιπλέον μελέτες σταθερότητας, αν και στη χημική σταθερότητα δεν εντοπίστηκε η παραγωγή κάποιου παραπροϊόντος.

Όσον αφορά στη φυσική και μικροβιολογική σταθερότητα των σκευασμάτων, η διατήρηση των πηκτωμάτων στους 4°C στο ψυγείο εμποδίζει τόσο την ανάπτυξη μικροβίων όσο και την αλλαγή του χρώματος που παρατηρήθηκε στα ίδια σκευάσματα που διατηρήθηκαν σε συνθήκες δωματίου.

Γ. Βιβλιογραφία

- Al Harthi, S., Alavi, S. E., Radwan, M. A., El Khatib, M. M., and AlSarraf, I. A. 2019. “Nasal Delivery of Donepezil HCl-Loaded Hydrogels for the Treatment of Alzheimer’s Disease,” *Scientific Reports* (9:1), p. 9563. (<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46032-y>).
- Al-Sayed, A. A., Agu, R. U., and Massoud, E. 2017. “Models for the Study of Nasal and Sinus Physiology in Health and Disease: A Review of the Literature: Models for Sinonasal Physiology and Pathology,” *Laryngoscope Investigative Otolaryngology* (2:6), pp. 398–409. (<https://doi.org/10.1002/lio2.117>).
- Anderson, M. J., and Whitcomb, P. J. 2016. *DOE Simplified: Practical Tools for Effective Experimentation, Third Edition*, CRC Press.
- Badran, K. W., Chang, J. C., Kuan, E. C., and Wong, B. J. F. 2017. “Anatomy and Surgical Approaches to the Rabbit Nasal Septum,” *JAMA Facial Plastic Surgery* (19:5), pp. 386–391. (<https://doi.org/10.1001/jamafacial.2017.0116>).
- Bergman, J., and Lerner, V. 2002. “Successful Use of Donepezil for the Treatment of Psychotic Symptoms in Patients With Parkinson’s Disease:,” *Clinical Neuropharmacology* (25:2), pp. 107–110. (<https://doi.org/10.1097/00002826-200203000-00009>).
- Barner, E. L., and Gray, S. L. 1998. “Donepezil Use in Alzheimer Disease,” *Annals of Pharmacotherapy* (32:1), pp. 70–77. (<https://doi.org/10.1345/aph.17150>).
- Barrett, K. E. 2014. *Ganong’s Ιατρική Φυσιολογία*.
- Beule, A. G. 2010. “Physiology and Pathophysiology of Respiratory Mucosa of the Nose and the Paranasal Sinuses,” *GMS Current Topics in Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*; 9:Doc07; ISSN 1865-1011, German Medical Science GMS Publishing House. (<https://doi.org/10.3205/CTO000071>).
- Bhavna, Md, S., Ali, M., Ali, R., Bhatnagar, A., Baboota, S., and Ali, J. 2014. “Donepezil Nanosuspension Intended for Nose to Brain Targeting: In Vitro and in Vivo Safety Evaluation,” *International Journal of Biological Macromolecules* (67), pp. 418–425. (<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.022>).
- Bhise, S., Yadav, A., Avachat, A., and Malayandi, R. 2008. “Bioavailability of Intranasal Drug Delivery System,” *Asian Journal of Pharmaceutics* (2:4), p. 201. (<https://doi.org/10.4103/0973-8398.45032>).
- Bitter, C., Suter-Zimmermann, K., and Surbera, C. 2011. “Nasal Drug Delivery in Humans,” in *Current Problems in Dermatology* (Vol. 40), C. Surber, P. Elsner, and M. A. Farage (eds.), Basel: KARGER, pp. 20–35. (<https://doi.org/10.1159/000321044>).

- Boysen, M., and Reith, A. 1982. "The Surface Structure of the Human Nasal Mucosa. II. Metaplasia, Dysplasia and Carcinoma in Nickel Workers. A Correlated Study by Scanning/Transmission Electron and Light Microscopy," *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology* (40:3), pp. 295–309.
- Bushdid, C., Magnasco, M. O., Vosshall, L. B., and Keller, A. 2014. "Humans Can Discriminate More than 1 Trillion Olfactory Stimuli," *Science* (343:6177), pp. 1370–1372. (<https://doi.org/10.1126/science.1249168>).
- Cash, P., Stanković, T., and Štorga, M. (eds.). 2016. *Experimental Design Research*, Cham: Springer International Publishing. (<https://doi.org/10.1007/978-3-319-33781-4>).
- Chaturvedi, M., Kumar, M., and Pathak, K. 2011. "A Review on Mucoadhesive Polymer Used in Nasal Drug Delivery System," *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* (2:4), p. 215. (<https://doi.org/10.4103/2231-4040.90876>).
- Chothe, P. P., Subramanian, R. C., and Kadam, V. J. 2010. "Stability Assessment Of Donepezil Hydrochloride Using Validated RP-HPLC Method," *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* (1:3), p. 296.
- Constructionchemcails. 2018. "Viscosity Properties of Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC)," *A Cellulose Ether Factory & Manufacturer & Supplier Include HPMC, HEC, CMC, MHEC, Hypromellose (HPMC) Vacant Capsules*, , November 26. (<https://www.icelluloseether.com/viscosity-properties-of-hydroxypropyl-methylcellulose-hpmc/>, accessed August 28, 2020).
- Cummings, J. L. 2002. "Alzheimer Disease," *JAMA* (287:18), p. 2335. (<https://doi.org/10.1001/jama.287.18.2335>).
- Cutler, N. R., Polinsky, R. J., Sramek, J. J., Enz, A., Jhee, S. S., Mancione, L., Hourani, J., and Zolnouni, P. 2009. "Dose-Dependent CSF Acetylcholinesterase Inhibition by SDZ ENA 713 in Alzheimer's Disease," *Acta Neurologica Scandinavica* (97:4), pp. 244–250. (<https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1998.tb00645.x>).
- Dahlberg, C., Millqvist-Fureby, A., Schuleit, M., and Furó, I. 2010. "Polymer–Drug Interactions and Wetting of Solid Dispersions," *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (39:1–3), pp. 125–133. (<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.11.005>).
- Der Yu, C., Jones, R. E., and Henesian, M. 1984. "Cascade Impactor Method for the Droplet Size Characterization of a Metered-Dose Nasal Spray," *Journal of Pharmaceutical Sciences* (73:3), pp. 344–348. (<https://doi.org/10.1002/jps.2600730314>).
- Desrosiers, M. Y., and Salas-Prato, M. 2001. "Treatment of Chronic Rhinosinusitis Refractory to Other Treatments with Topical Antibiotic Therapy Delivered by Means of a Large-Particle Nebulizer: Results of a Controlled Trial,"

- Otolaryngology–Head and Neck Surgery* (125:3), pp. 265–269. (<https://doi.org/10.1067/mhn.2001.117410>).
- Dooley, M., and Lamb, H. M. 2000. “Donepezil: A Review of Its Use in Alzheimer’s Disease,” *Drugs & Aging* (16:3), pp. 199–226. (<https://doi.org/10.2165/00002512-200016030-00005>).
- Drake, R. L. 2019. *Gray’s Anatomy for Students*, (4th edition.), Philadelphia, MO: Elsevier.
- England, R. J. A., Homer, J. J., Knight, L. C., and Ell, S. R. 1999. “Nasal PH Measurement: A Reliable and Repeatable Parameter,” *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences* (24:1), pp. 67–68. (<https://doi.org/10.1046/j.1365-2273.1999.00223.x>).
- Enz, A., Amstutz, R., Boddeke, H., Gmelin, G., and Malanowski, J. 1993. “Chapter 53: Brain Selective Inhibition of Acetylcholinesterase: A Novel Approach to Therapy for Alzheimer’s Disease,” in *Progress in Brain Research* (Vol. 98), Elsevier, pp. 431–438. ([https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)62429-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62429-2)).
- Erdő, F., Bors, L. A., Farkas, D., Bajza, Á., and Gizurarson, S. 2018. “Evaluation of Intranasal Delivery Route of Drug Administration for Brain Targeting,” *Brain Research Bulletin* (143), pp. 155–170. (<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.009>).
- Espinoza, L. C., Vacacela, M., Clares, B., Garcia, M. L., Fabrega, M.-J., and Calpena, A. C. 2018. “Development of a Nasal Donepezil-Loaded Microemulsion for the Treatment of Alzheimer’s Disease: In Vitro and Ex Vivo Characterization,” *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* (17:1), pp. 43–53. (<https://doi.org/10.2174/1871527317666180104122347>).
- Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., and Wilcock, G. K. 1999. “The Cholinergic Hypothesis of Alzheimer’s Disease: A Review of Progress,” *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* (66:2), pp. 137–147. (<https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137>).
- Ghori, M. U., Mahdi, M. H., Smith, A. M., and Conway, B. R. 2015. “Nasal Drug Delivery Systems: An Overview,” *American Journal of Pharmacological Sciences* (3:5), Science and Education Publishing, pp. 110–119. (<https://doi.org/10.12691/ajps-3-5-2>).
- Hardy, J. 2009. “The Amyloid Hypothesis for Alzheimer’s Disease: A Critical Reappraisal: Amyloid Hypothesis for Alzheimer’s Disease,” *Journal of Neurochemistry* (110:4), pp. 1129–1134. (<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06181.x>).
- Harry, R. D. J., and Zakzanis, K. K. 2005. “A Comparison of Donepezil and Galantamine in the Treatment of Cognitive Symptoms of Alzheimer’s Disease: A Meta-Analysis,” *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* (20:3), pp. 183–187. (<https://doi.org/10.1002/hup.676>).

- Heyder, J. 2004. "Deposition of Inhaled Particles in the Human Respiratory Tract and Consequences for Regional Targeting in Respiratory Drug Delivery," *Proceedings of the American Thoracic Society* (1:4), pp. 315–320. (<https://doi.org/10.1513/pats.200409-046TA>).
- Horváth Tamás, null, Ambrus, R., and Szabóné, R. P. 2015. "[Investigation of permeability of intranasal formulations using Side-Bi-Side horizontal diffusion cell]," *Acta Pharmaceutica Hungarica* (85:1), pp. 19–28.
- Hughes, B. L., Allen, D. L., Dorato, M. A., and Wolff, R. K. 1993. "Effect of Delivery Devices on Nasal Deposition and Mucociliary Clearance in Rhesus Monkeys," *Aerosol Science and Technology* (18:3), pp. 241–249. (<https://doi.org/10.1080/02786829308959601>).
- Illum, L. 2002. "Nasal Drug Delivery: New Developments and Strategies," *Drug Discovery Today* (7:23), pp. 1184–1189. ([https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02529-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02529-1)).
- Illum, L. 2003. "Nasal Drug Delivery—Possibilities, Problems and Solutions," *Journal of Controlled Release* (87:1–3), pp. 187–198. ([https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00363-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00363-2)).
- Illum, L. 2007. "Nanoparticulate Systems for Nasal Delivery of Drugs: A Real Improvement over Simple Systems?," *Journal of Pharmaceutical Sciences* (96:3), pp. 473–483. (<https://doi.org/10.1002/jps.20718>).
- Jacobson, S. A., and Sabbagh, M. N. 2008. "Donepezil: Potential Neuroprotective and Disease-Modifying Effects," *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* (4:10), pp. 1363–1369. (<https://doi.org/10.1517/17425255.4.10.1363>).
- Jafek, B. W. 1983. "ULTRASTRUCTURE OF HUMAN NASAL MUCOSA;," *The Laryngoscope* (93:12), pp. 1576–1599. (<https://doi.org/10.1288/00005537-198312000-00011>).
- Jelic, V., and Darreh-Shori, T. 2010. "Donepezil: A Review of Pharmacological Characteristics and Role in the Management of Alzheimer Disease," *Clinical Medicine Insights: Therapeutics* (2), CMT.S5410. (<https://doi.org/10.4137/CMT.S5410>).
- Kaliner, M., Marom, Z., Patow, C., and Shelhamer, J. 1984. "Human Respiratory Mucus," *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (73:3), pp. 318–323. ([https://doi.org/10.1016/0091-6749\(84\)90403-2](https://doi.org/10.1016/0091-6749(84)90403-2)).
- Keir, J. 2009. "Why Do We Have Paranasal Sinuses?," *The Journal of Laryngology & Otology* (123:1), pp. 4–8. (<https://doi.org/10.1017/S0022215108003976>).
- Kublik, H., and Vidgren, M. T. 1998. "Nasal Delivery Systems and Their Effect on Deposition and Absorption," *Advanced Drug Delivery Reviews* (29:1–2), pp. 157–177. ([https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00067-7)).

- Lansley, A. B. 1993. "Mucociliary Clearance and Drug Delivery via the Respiratory Tract," *Advanced Drug Delivery Reviews* (11:3), pp. 299–327. ([https://doi.org/10.1016/0169-409X\(93\)90014-U](https://doi.org/10.1016/0169-409X(93)90014-U)).
- Lide, D. R., and Kehiaian, H. V. 1994. *CRC Handbook of Thermophysical and Thermochemical Data*, Boca Raton: CRC Press.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., and Feeney, P. J. 2001. "Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings 1PII of Original Article: S0169-409X(96)00423-1. The Article Was Originally Published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1," *Advanced Drug Delivery Reviews* (46:1–3), pp. 3–26. ([https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)).
- Mahdi, M. H., Conway, B. R., and Smith, A. M. 2015. "Development of Mucoadhesive Sprayable Gellan Gum Fluid Gels," *International Journal of Pharmaceutics* (488:1–2), pp. 12–19. (<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.04.011>).
- Malouf, R., and Birks, J. 2004. "Donepezil for Vascular Cognitive Impairment," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (Cochrane Dementia and Cognitive Improvement Group, ed.). (<https://doi.org/10.1002/14651858.CD004395.pub2>).
- Manjanna, K. M., Shivakumar, B., and Pramod Kumar, T. M. 2010. "Microencapsulation: An Acclaimed Novel Drug-Delivery System for NSAIDs in Arthritis," *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* (27:6), pp. 509–545. (<https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v27.i6.20>).
- Mara Mainardes, R., Cristina Cocenza Urban, M., Oliveira Cinto, P., Vinicius Chaud, M., Cesar Evangelista, R., and Palmira Daflon Gremiao, M. 2006. "Liposomes and Micro/Nanoparticles as Colloidal Carriers for Nasal Drug Delivery," *Current Drug Delivery* (3:3), pp. 275–285. (<https://doi.org/10.2174/156720106777731019>).
- Maragos, W. F., Greenamyre, J. T., Penney, J. B., and Young, A. B. 1987. "Glutamate Dysfunction in Alzheimer's Disease: An Hypothesis," *Trends in Neurosciences* (10:2), pp. 65–68. ([https://doi.org/10.1016/0166-2236\(87\)90025-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(87)90025-7)).
- Massey, L. K. 2003. *Permeability Properties of Plastics and Elastomers: A Guide to Packaging and Barrier Materials*, (2nd ed.), Norwich, NY, USA: Plastics Design Library/William Andrew Pub.
- Maurice, T., Meunier, J., Feng, B., Ieni, J., and Monaghan, D. T. 2006. "Interaction with σ_1 Protein, but Not *N*-Methyl-d-Aspartate Receptor, Is Involved in the Pharmacological Activity of Donepezil," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (317:2), pp. 606–614. (<https://doi.org/10.1124/jpet.105.097394>).
- Meister, M. 2015. "On the Dimensionality of Odor Space," *ELife* (4), p. e07865. (<https://doi.org/10.7554/eLife.07865>).

- Merkus, F. 1999. "Cyclodextrins in Nasal Drug Delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews* (36:1), pp. 41–57. ([https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00054-4)).
- Mihara, M., Ohnishi, A., Tomono, Y., Hasegawa, J., Shimamura, Y., Yamazaki, K., and Morishita, N. 1993. "Pharmacokinetics of E2020, a New Compound for Alzheimer's Disease, in Healthy Male Volunteers," *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology* (31:5), pp. 223–229.
- Mills, R. P., and Christmas, H. E. 1990. "Applied Comparative Anatomy of the Nasal Turbinates," *Clinical Otolaryngology* (15:6), pp. 553–558. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2273.1990.tb00798.x>).
- Moore, K. L., Agur, A. M. R., and Dalley, A. F. 2015. *Essential Clinical Anatomy*, Philadelphia: Wolters Kluwer Health.
- Moran, S. 2018. "Clean Water Unit Operation Design," in *An Applied Guide to Water and Effluent Treatment Plant Design*, Elsevier, pp. 69–100. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811309-7.00007-2>).
- Mount, C., and Downton, C. 2006. "Alzheimer Disease: Progress or Profit?," *Nature Medicine* (12:7), pp. 780–784. (<https://doi.org/10.1038/nm0706-780>).
- Nasal Tumors in Animals and Man Vol. I: Anatomy, Physiology, and Epidemiology*. 2017. CRC Press. (<https://doi.org/10.1201/9780203711293>).
- Nokhodchi, A., Raja, S., Patel, P., and Asare-Addo, K. 2012. "The Role of Oral Controlled Release Matrix Tablets in Drug Delivery Systems," *BioImpacts*; ISSN 2228-5660, Tabriz University of Medical Sciences. (<https://doi.org/10.5681/BI.2012.027>).
- Ohnishi, A., Mihara, M., Kamakura, H., Tomono, Y., Hasegawa, J., Yamazaki, K., Morishita, N., and Tanaka, T. 1993. "Comparison of the Pharmacokinetics of E2020, A New Compound for Alzheimer's Disease, in Healthy Young and Elderly Subjects," *The Journal of Clinical Pharmacology* (33:11), pp. 1086–1091. (<https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1993.tb01945.x>).
- Oliveira, P., Fortuna, A., Alves, G., and Falcao, A. 2016. "Drug-Metabolizing Enzymes and Efflux Transporters in Nasal Epithelium: Influence on the Bioavailability of Intranasally Administered Drugs," *Current Drug Metabolism* (17:7), pp. 628–647. (<https://doi.org/10.2174/1389200217666160406120509>).
- Patil, R. P., Pawara, D. D., Gudewar, C. S., and Tekade, A. R. 2019. "Nanostructured Cubosomes in an *in Situ* Nasal Gel System: An Alternative Approach for the Controlled Delivery of Donepezil HCl to Brain," *Journal of Liposome Research* (29:3), pp. 264–273. (<https://doi.org/10.1080/08982104.2018.1552703>).
- Patil Sonali, K., Dhage Azad, N., Patil Sachinkumar, V., and Patil Shitalkumar, S. 2015. "Formulation and Evaluation of Nasal *in Situ* Gel for Alzheimer Disease," *International Research Journal of Pharmaceutical and Biosciences* (2:2), pp. 41–58.

- Pires, A., Fortuna, A., Alves, G., and Falcão, A. 2009. "Intranasal Drug Delivery: How, Why and What For?," *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* (12:3), p. 288. (<https://doi.org/10.18433/J3NC79>).
- Punitha, S., Uvarani, R., and Panneerselvam, A. 2020. "Effect of PH in Aqueous (Hydroxy Propyl Methyl Cellulose) Polymer Solution," *Results in Materials* (7), p. 100120. (<https://doi.org/10.1016/j.rinma.2020.100120>).
- Radwan, M., Abdine, H., Alquadeb, B., Aboulenein, H., and Nakashima, K. 2006. "Stereoselective HPLC Assay of Donepezil Enantiomers with UV Detection and Its Application to Pharmacokinetics in Rats," *Journal of Chromatography B* (830:1), pp. 114–119. (<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.031>).
- Rogers, Cooper, Sukovaty, Pederson, Lee, and Friedhoff. 2002. "Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Donepezil HCl Following Multiple Oral Doses: Multiple Oral Doses of Donepezil," *British Journal of Clinical Pharmacology* (46:S1), pp. 7–12. (<https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1998.0460s1007.x>).
- Rojas-Fernandez, C. H. 2001. "Successful Use of Donepezil for the Treatment of Dementia with Lewy Bodies," *Annals of Pharmacotherapy* (35:2), pp. 202–205. (<https://doi.org/10.1345/aph.10192>).
- Ruela, A. L. M., Santos, M. G., Figueiredo, E. C., and Pereira, G. R. 2014. "LC-PDA and LC-MS Studies of Donepezil Hydrochloride Degradation Behaviour in Forced Stress Conditions," *Journal of the Brazilian Chemical Society*. (<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140199>).
- Salib, R. J., and Howarth, P. H. 2003. "Safety and Tolerability Profiles of Intranasal Antihistamines and Intranasal Corticosteroids in the Treatment of Allergic Rhinitis," *Drug Safety* (26:12), pp. 863–893. (<https://doi.org/10.2165/00002018-200326120-00003>).
- Sarkar, M. A. 1992. "Drug Metabolism in the Nasal Mucosa," *Pharmaceutical Research* (09:1), pp. 1–9. (<https://doi.org/10.1023/A:1018911206646>).
- Sastry, B. S., Gananadhamu, S., Devadasu, C., and Balaji, K. 2008. *NEW RP-HPLC METHOD FOR ESTIMATION OF DONEPEZIL HYDROCHLORIDE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS*, p. 9.
- Schmidt, M. C., Peter, H., Lang, S. R., Ditzinger, G., and Merkle, H. P. 1998. "In Vitro Cell Models to Study Nasal Mucosal Permeability and Metabolism," *Advanced Drug Delivery Reviews* (29:1–2), pp. 51–79. ([https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00061-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00061-6)).
- Selkoe, D. J., and Hardy, J. 2016. "The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years," *EMBO Molecular Medicine* (8:6), pp. 595–608. (<https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>).
- Seltzer, B. 2005. "Donepezil: A Review," *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* (1:3), pp. 527–536. (<https://doi.org/10.1517/17425255.1.3.527>).

- Shepherd, G., Klein-Schwartz, W., and Edwards, R. 1999. "Donepezil Overdose: A Tenfold Dosing Error," *Annals of Pharmacotherapy* (33:7–8), pp. 812–815. (<https://doi.org/10.1345/aph.18273>).
- Shudo, J., and Yoneto, K. 2007. *Gelled Donepezil Compositions and Methods for Making and Using the Same*. (<https://patents.google.com/patent/US20070026075A1/en>).
- Siepmann, J., and Peppas, N. A. 2000. "Hydrophilic Matrices for Controlled Drug Delivery: An Improved Mathematical Model to Predict the Resulting Drug Release Kinetics (the 'Sequential Layer' Model)," *Pharmaceutical Research* (17:10), pp. 1290–1298. (<https://doi.org/10.1023/a:1026455822595>).
- Slütter, B., Hagenaaars, N., and Jiskoot, W. 2008. "Rational Design of Nasal Vaccines," *Journal of Drug Targeting* (16:1), pp. 1–17. (<https://doi.org/10.1080/10611860701637966>).
- Stahl, S. M. 2000. "The New Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease, Part 2: Illustrating Their Mechanisms of Action: (Brainstorms)," *The Journal of Clinical Psychiatry* (61:11), pp. 813–814. (<https://doi.org/10.4088/JCP.v61n1101>).
- Sugimoto, H. 1999. "Structure-Activity Relationships of Acetylcholinesterase Inhibitors: Donepezil Hydrochloride for the Treatment of Alzheimer's Disease," *Pure and Applied Chemistry* (71:11), pp. 2031–2037. (<https://doi.org/10.1351/pac199971112031>).
- Sugimoto, H., Iimura, Y., Yamanishi, Y., and Yamatsu, K. 1995. "Synthesis and Structure-Activity Relationships of Acetylcholinesterase Inhibitors: 1-Benzyl-4-[(5,6-Dimethoxy-1-Oxoindan-2-Yl)methyl]Piperidine Hydrochloride and Related Compounds," *Journal of Medicinal Chemistry* (38:24), pp. 4821–4829. (<https://doi.org/10.1021/jm00024a009>).
- Sugimoto, H., Tsuchiya, Y., Sugumi, H., Higurashi, K., Karibe, N., Iimura, Y., Sasaki, A., Kawakami, Y., and Nakamura, T. 1990. "Novel Piperidine Derivatives. Synthesis and Anti-Acetylcholinesterase Activity of 1-Benzyl-4-[2-(N-Benzoylamino)Ethyl]Piperidine Derivatives," *Journal of Medicinal Chemistry* (33:7), pp. 1880–1887. (<https://doi.org/10.1021/jm00169a008>).
- Symon, K. R. 1980. *Mechanics*, (3. ed.), Addison-Wesley World Student Series Edition, Reading, Mass.: Addison-Wesley.
- Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M.-Y. 2005. "Pathological Tau: A Loss of Normal Function or a Gain in Toxicity?," *Nature Neuroscience* (8:9), pp. 1136–1137. (<https://doi.org/10.1038/nn0905-1136>).
- Türker, S., Onur, E., and Ózer, Y. 2004. "Nasal Route and Drug Delivery Systems," *Pharmacy World & Science* (26:3), pp. 137–142. (<https://doi.org/10.1023/B:PHAR.0000026823.82950.ff>).
- Ugwoke, M. I., Agu, R. U., Vanbilloen, H., Baetens, J., Augustijns, P., Verbeke, N., Mortelmans, L., Verbruggen, A., Kinget, R., and Bormans, G. 2000.

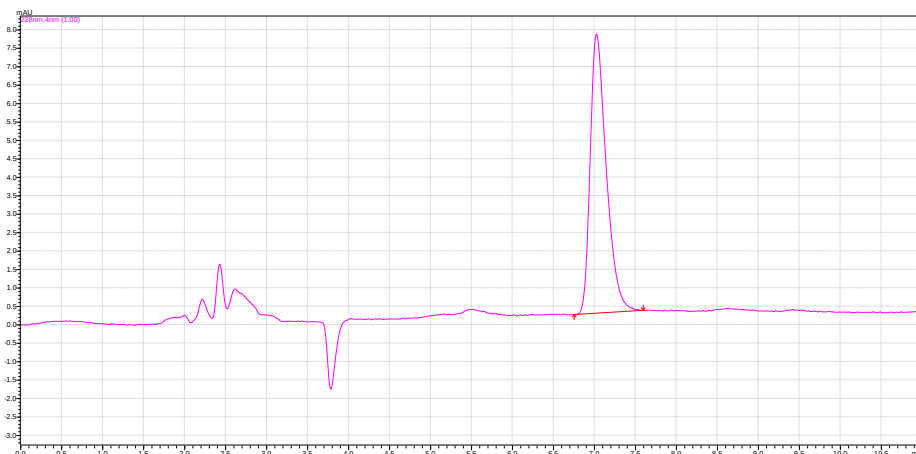
- “Scintigraphic Evaluation in Rabbits of Nasal Drug Delivery Systems Based on Carbopol 971p® and Carboxymethylcellulose,” *Journal of Controlled Release* (68:2), pp. 207–214. ([https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00258-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00258-3)).
- Ugwoke, M. I., Sam, E., Van Den Mooter, G., Verbeke, N., and Kinget, R. 1999. “Nasal Mucoadhesive Delivery Systems of the Anti-Parkinsonian Drug, Apomorphine: Influence of Drug-Loading on in Vitro and in Vivo Release in Rabbits,” *International Journal of Pharmaceutics* (181:1), pp. 125–138. ([https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00018-6)).
- Ugwoke, M. I., Verbeke, N., and Kinget, R. 2001. “The Biopharmaceutical Aspects of Nasal Mucoadhesive Drug Delivery,” *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (53:1), pp. 3–22. (<https://doi.org/10.1211/0022357011775145>).
- Vyas, T. K., Tiwari, S. B., and Amiji, M. M. 2006. “Formulation and Physiological Factors Influencing CNS Delivery upon Intranasal Administration,” *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* (23:4), pp. 319–347. (<https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v23.i4.20>).
- Wilkinson, D. G. 1999. “The Pharmacology of Donepezil: A New Treatment for Alzheimer’s Disease,” *Expert Opinion on Pharmacotherapy* (1:1), pp. 121–135. (<https://doi.org/10.1517/14656566.1.1.121>).

Δ. Παράρτημα

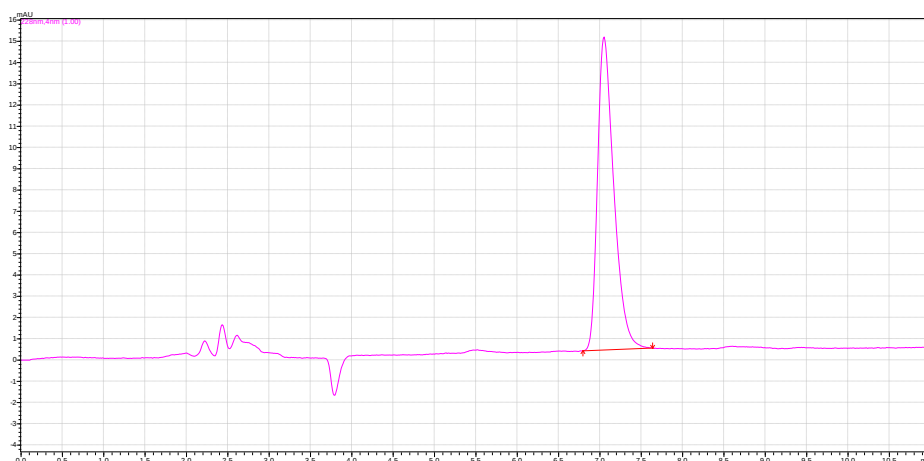
Στο παράρτημα της εργασίας αναφέρονται τα αποτελέσματα αναλυτικά σε πίνακες όπως έχουν καταγραφεί και κάποια ενδεικτικά χρωματογραφήματα.

Δ.1 Ενδεικτικά χρωματογραφήματα και επικύρωση μεθόδου

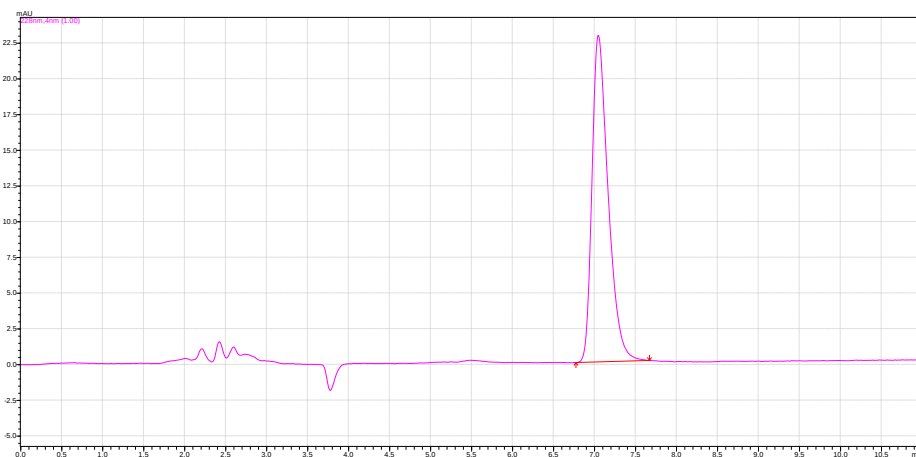
Πρότυπο 1 καμπύλης βαθμονόμησης (2μg/mL):



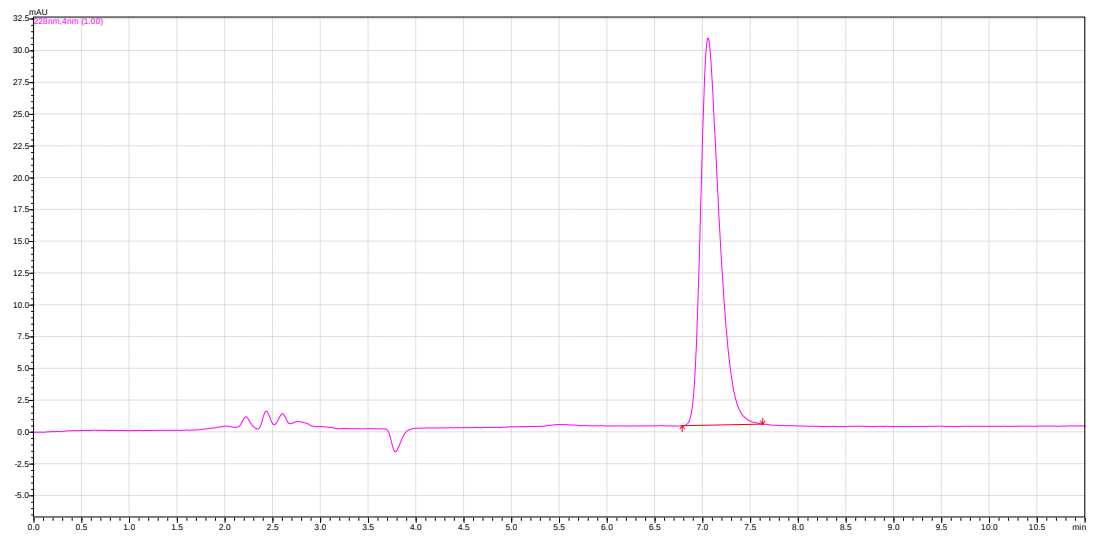
Πρότυπο 2 καμπύλης βαθμονόμησης (4μg/mL):



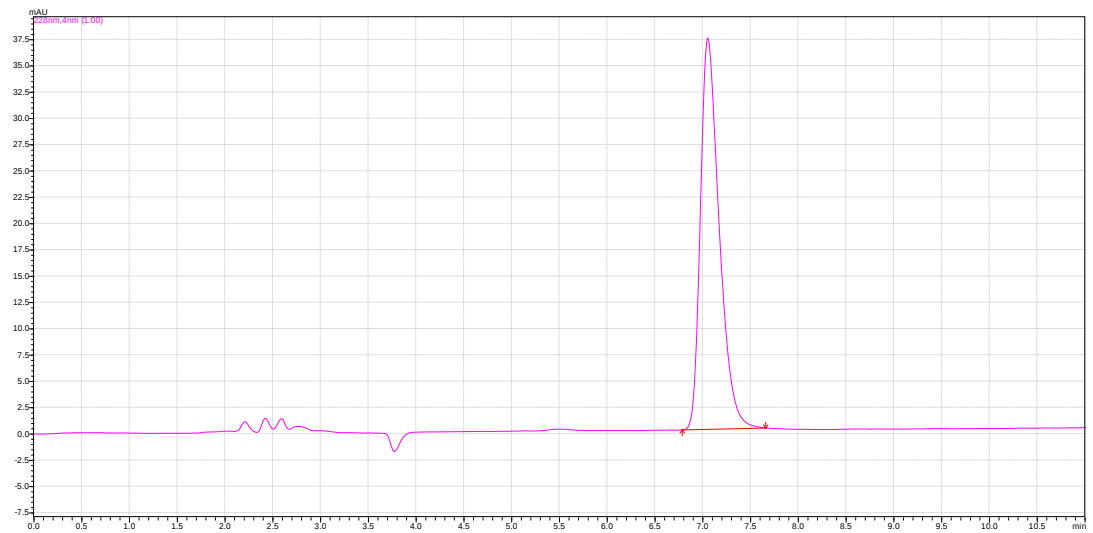
Πρότυπο 3 καμπύλης βαθμονόμησης (6μg/mL):



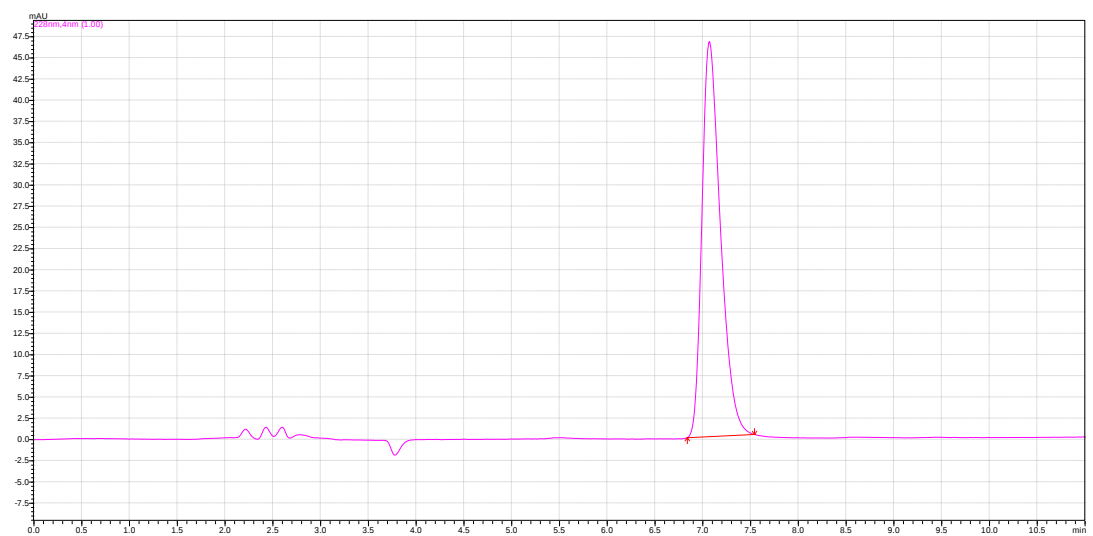
Πρότυπο 4 καμπύλης βαθμονόμησης (8μg/mL):



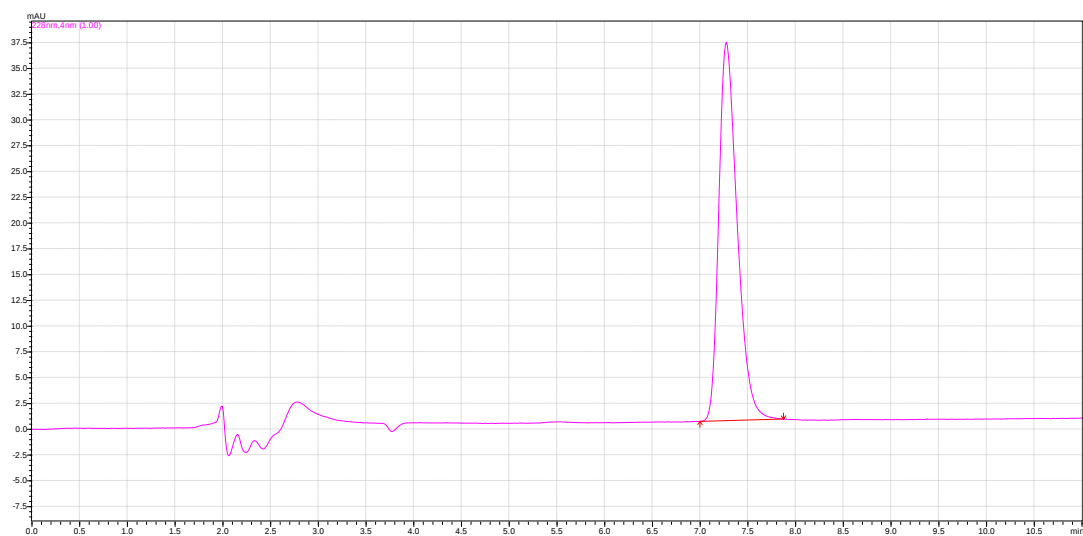
Πρότυπο 5 καμπύλης βαθμονόμησης (10μg/mL):



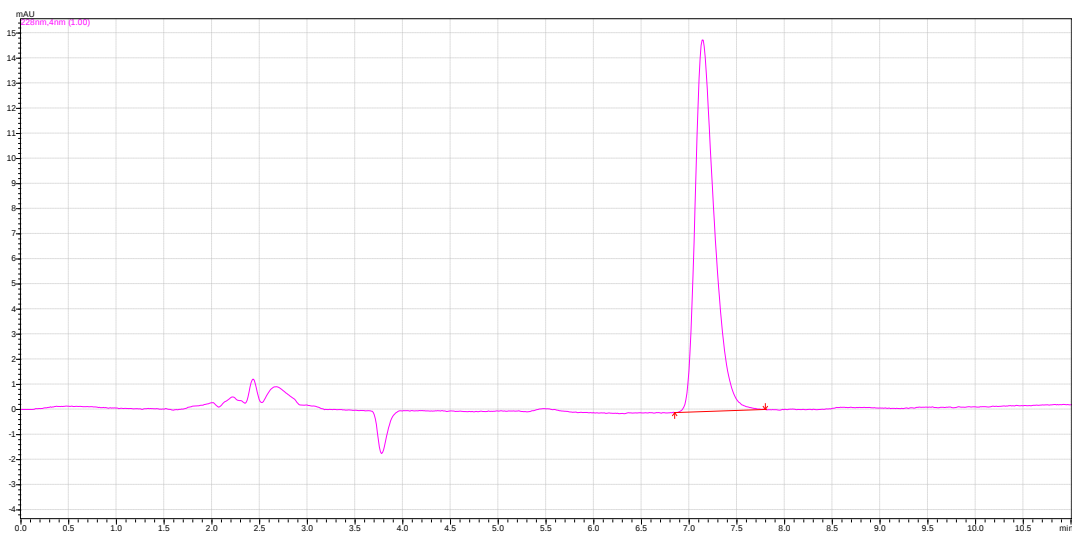
Πρότυπο 6 καμπύλης βαθμονόμησης (12μg/mL):



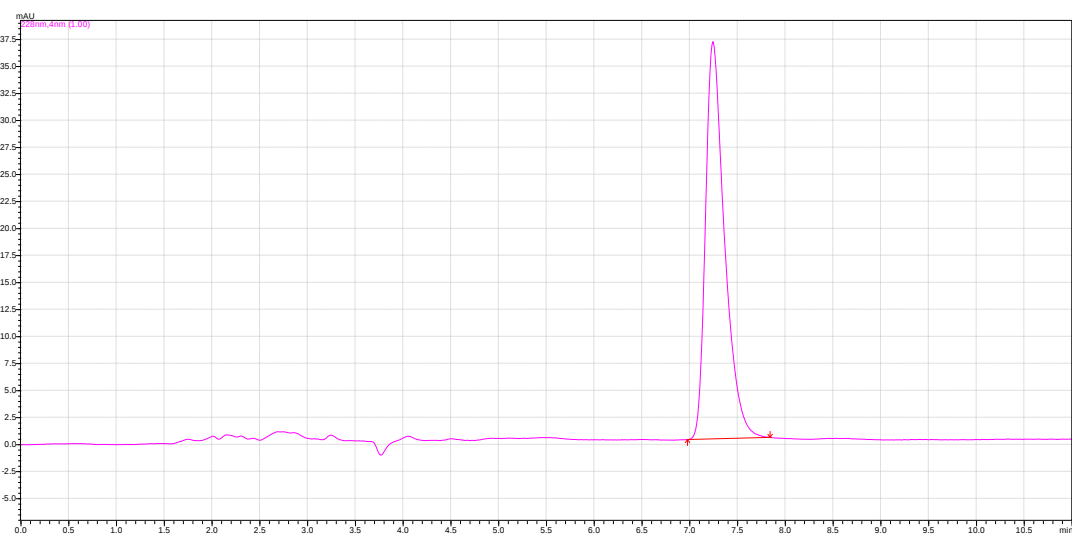
Τυχαίο δείγμα από δειγματοληψία:



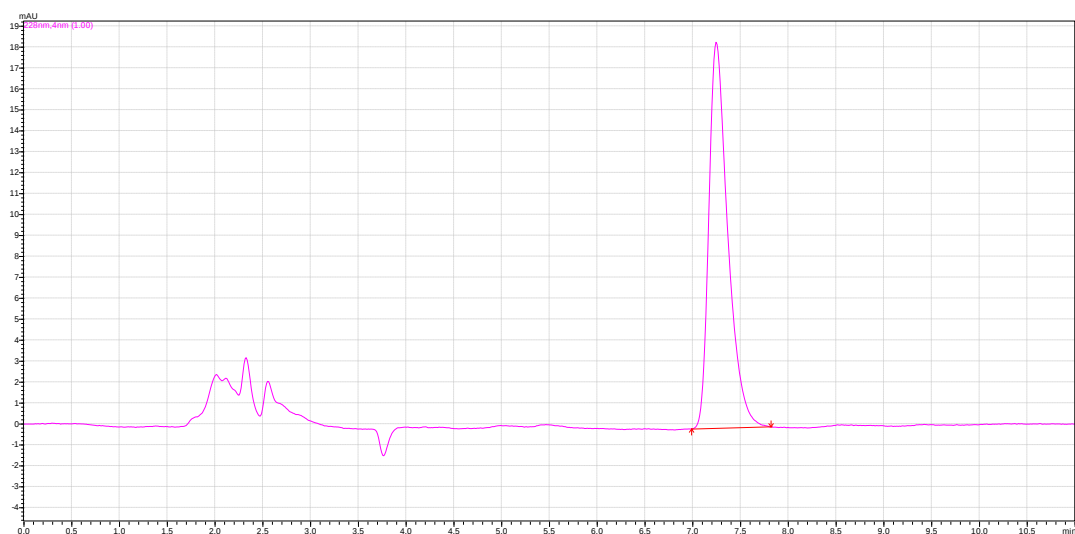
Δείγμα από ποσοτικοποίηση πηκτώματος:



Δείγμα από εκχύλιση δότη:



Δείγμα από εκχύλιση τεχνητής μεμβράνης:



Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου με 4 καμπύλες βαθμονόμησης

Συγκέντρωση (μg/mL)	CC1	CC2	CC3	CC4
2	109351	101072	104067	101790
4	203410	195842	194300	205615
6	292362	319603	317233	299314
8	409307	399193	402060	401612
10	494837	513020	521233	525879
12	614053	592999	627899	633556

Δ.2 Αναλυτικά αποτελέσματα

Υπολογισμός μέσου όρου από τα κύτταρα Franz *in vitro* για τις 9 συνταγές

Cells F1	13.2.2020		21.1.2020		21.1.2020					
hours	Q1	Q1 (%)	Q2	Q2 (%)	Q3	Q3 (%)	Average Q	Standard Deviation	Average Q (%)	Standard Deviation %
0,5	92,39	19,55	104,04	20,16	116,92	22,65	104,45	12,27	20,79	1,64
1	129,30	27,36	178,89	34,66	199,37	38,63	169,19	36,03	33,55	5,71
1,5	199,84	42,29	207,49	40,20	250,31	48,49	219,21	27,20	43,66	4,31
2	243,40	51,51	215,39	41,73	292,96	56,76	250,58	39,28	50,00	7,63
3	293,30	62,07	224,92	43,58	337,08	65,30	285,10	56,53	56,98	11,72
4	326,87	69,17	234,64	45,46	358,13	69,38	306,55	64,21	61,34	13,75
initial Quantification	472,55		516,16		516,16					

Cells F2	12.2.2020		12.2.2020		12.2.2020					
hours	Q1	Q1 (%)	Q2	Q2 (%)	Q3	Q3 (%)	Average Q	Standard Deviation	Average Q (%)	Standard Deviation %
0,5	142,58	25,15	150,80	26,60	127,94	22,57	140,44	11,58	24,77	2,04
1	166,22	29,32	191,40	33,76	191,04	33,70	182,89	14,43	32,26	2,55
1,5	199,31	35,16	219,79	38,77	226,06	39,87	215,05	13,99	37,93	2,47
2	227,39	40,11	269,17	47,48	262,90	46,37	253,15	22,53	44,65	3,97
3	269,21	47,48	293,90	51,84	306,19	54,01	289,77	18,84	51,11	3,32
4	337,88	59,60	339,21	59,83	336,41	59,34	337,83	1,40	59,59	0,25
initial Quantification	566,93		566,93		566,93					

Cells F3	11.2.2.2020		11.2.2.2020		11.2.2.2020					
hours	Q1	Q1 (%)	Q2	Q2 (%)	Q3	Q3 (%)	Average Q	Standard Deviation	Average Q (%)	Standard Deviation %
0,5	190,91	17,54	217,66	20,00	233,96	21,50	214,17	21,73	19,68	2,00
1	342,28	31,46	396,21	36,41	378,61	34,79	372,37	27,50	34,22	2,53
1,5	445,08	40,90	464,60	42,70	461,49	42,41	457,05	10,49	42,00	0,96
2	595,69	54,74	547,81	50,34	547,60	50,32	563,70	27,70	51,80	2,55
3	721,16	66,27	718,25	66,01	701,26	64,44	713,56	10,75	65,57	0,99
4	796,51	73,20	763,37	70,15	810,13	74,45	790,00	24,05	72,60	2,21
initial Quantification	1088,17		1088,17		1088,17					

Cells F4	11.2.2.2020		11.2.2.2020		11.2.2.2020					
hours	Q1	Q1 (%)	Q2	Q2 (%)	Q3	Q3 (%)	Average Q	Standard Deviation	Average Q (%)	Standard Deviation %
0,5	279,01	25,14	311,34	28,06	255,99	23,07	282,11	27,80	25,42	2,51
1	408,42	36,81	438,64	39,53	362,08	32,63	403,05	38,56	36,32	3,48
1,5	501,53	45,20	530,29	47,79	470,92	42,44	500,91	29,69	45,14	2,68
2	556,20	50,12	576,77	51,98	514,37	46,35	549,11	31,80	49,48	2,87
3	748,00	67,41	605,80	54,59	547,55	49,34	633,79	103,11	57,12	9,29
initial Quantification	2796,20	71,74	2796,20	71,82	2796,20	66,52	777,05	33,72	70,03	3,04
Cells F5	11.1.2020		11.1.2020		11.1.2020					
hours	Q1	Q1 (%)	Q2	Q2 (%)	Q3	Q3 (%)	Average Q	Standard Deviation	Average Q (%)	Standard Deviation %
0,5	102,99	21,88	97,73	20,76	87,37	18,56	96,03	7,95	20,40	1,69
1	171,93	36,53	164,19	34,88	162,39	34,50	166,17	5,07	35,30	1,08
1,5	227,37	48,31	204,80	43,51	203,38	43,21	211,85	13,46	45,01	2,86
2	276,65	58,78	245,25	52,11	235,64	50,06	252,51	21,45	53,65	4,56
3	336,27	71,44	299,84	63,70	309,13	65,68	315,08	18,93	66,94	4,02
4	381,58	81,07	312,21	66,33	346,21	73,56	346,67	34,69	73,65	7,37
initial Quantification	470,68		470,68		470,68					
Cells F6	21.1.2020		21.1.2020		21.1.2020					
hours	Q1	Q1 (%)	Q2	Q2 (%)	Q3	Q3 (%)	Average Q	Standard Deviation	Average Q (%)	Standard Deviation %
0,5	116,92	20,62	112,78	19,89	106,42	18,77	112,04	5,29	19,76	0,93
1	199,37	35,17	190,25	33,56	176,39	31,11	188,67	11,57	33,28	2,04
1,5	250,31	44,15	242,21	42,72	227,63	40,15	240,05	11,49	42,34	2,03
2	292,96	51,67	277,07	48,87	249,86	44,07	273,29	21,80	48,21	3,84
3	337,08	59,46	324,64	57,26	304,48	53,71	322,06	16,45	56,81	2,90
4	358,13	63,17	375,94	66,31	338,87	59,77	357,65	18,54	63,08	3,27
initial Quantification	566,93		566,93		566,93					
Cells F7	22.1.2020		22.1.2020		13.2.2020					
hours	Q1	Q1 (%)	Q2	Q2 (%)	Q3	Q3 (%)	Average Q	Standard Deviation	Average Q (%)	Standard Deviation %
0,5	225,01	23,45	226,97	23,65	251,42	26,15	234,46	14,71	24,42	1,51
1	345,30	35,98	361,83	37,70	299,97	31,20	335,70	32,03	34,96	3,37
1,5	447,29	46,61	481,84	50,21	411,52	42,81	446,88	35,16	46,54	3,70
2	547,27	57,02	580,72	60,51	478,38	49,76	535,46	52,18	55,76	5,48
3	683,19	71,19	687,45	71,63	676,50	70,37	682,38	5,52	71,06	0,64
4	749,07	78,05	762,51	79,45	778,24	80,95	763,27	14,60	79,48	1,45
initial Quantification	959,73		959,73		961,36					
Cells F8	12.2.2.2020		12.2.2.2020		12.2.2.2020					
hours	Q1	Q1 (%)	Q2	Q2 (%)	Q3	Q3 (%)	Average Q	Standard Deviation	Average Q (%)	Standard Deviation %
0,5	224,24	21,30	257,82	24,49	239,57	22,76	240,54	16,81	22,85	1,60
1	347,05	32,97	292,91	27,83	276,99	26,32	305,65	36,73	29,04	3,49
1,5	408,52	38,81	433,26	41,16	387,44	36,81	409,74	22,94	38,93	2,18
2	478,95	45,50	593,61	56,39	435,16	41,34	502,58	81,82	47,75	7,77
3	631,86	60,03	648,75	61,63	483,77	45,96	588,13	90,77	55,87	8,62
4	684,76	65,05	733,25	69,66	607,52	57,72	675,18	63,41	64,14	6,02
initial Quantification	1052,60		1052,60		1052,60					
Cells F9	13.2.2020		13.2.2020		13.2.2020					
hours	Q1	Q1 (%)	Q2	Q2 (%)	Q3	Q3 (%)	Average Q	Standard Deviation	Average Q (%)	Standard Deviation %
0,5	151,40	18,99	183,30	23,00	112,79	14,15	149,16	35,31	18,71	4,43
1	223,80	28,08	227,87	28,59	223,92	28,09	225,19	2,32	28,25	0,29
1,5	311,85	39,12	251,66	31,57	363,05	45,55	308,85	55,76	38,75	6,99
2	366,71	46,01	412,01	51,69	420,42	52,74	399,71	28,89	50,15	3,62
3	555,18	69,65	571,71	71,72	561,32	70,42	562,73	8,35	70,60	1,05
4	611,22	76,68	633,01	79,41	623,27	78,19	622,50	10,91	78,09	1,37
initial Quantification	797,11		797,11		797,11					
Cells F10	10.6.2020		10.6.2020		10.6.2020					
hours	Q1	Q1 (%)	Q2	Q2 (%)	Q3	Q3 (%)	Average Q	Standard Deviation	Average Q (%)	Standard Deviation %
0,5	123,19	17,84	136,48	19,76	112,79	16,33	124,15	11,87	17,98	1,72
1	202,48	29,32	237,11	34,33	223,92	32,42	221,17	17,48	32,02	2,53
1,5	284,10	41,14	295,88	42,84	363,05	52,57	314,34	42,59	45,52	6,17
2	322,61	46,71	353,83	51,23	420,42	60,87	365,62	49,96	52,94	7,23
initial Quantification	690,63		690,63		690,63					
Cells F11	10.6.2020		10.6.2020		10.6.2020					
hours	Q1	Q1 (%)	Q2	Q2 (%)	Q3	Q3 (%)	Average Q	Standard Deviation	Average Q (%)	Standard Deviation %
0,5	135,43	20,26	148,34	22,19	107,53	16,09	130,43	20,86	19,51	3,12
1	192,08	28,74	217,72	32,57	189,84	28,40	199,88	15,49	29,90	2,32
1,5	277,08	41,45	301,18	45,06	278,05	41,60	285,43	13,64	42,70	2,04
2	319,47	47,80	354,02	52,96	328,61	49,16	334,03	17,90	49,97	2,68
initial Quantification	668,40		668,40		668,40					

Υπολογισμός μέσου όρου από τα κύτταρα Franz ex vivo για τη συνταγή 2:

Cells κουνέλια	29.6.2020		29.6.2020		29.6.2020							
hours	Q1	Q1 (%)	Q2	Q2 (%)	Q3	Q3 (%)	Q4	Q4 (%)	Average Q	SD	Average Q (%)	SD(%)
0,25	3,17	0,69	1,30	0,28	16,13	3,50	10,60	2,30	7,80	6,86	1,69	1,49
0,5	26,70	5,80	17,16	3,73	40,12	8,71	11,21	2,44	23,80	12,61	5,17	2,74
0,75	51,13	11,10	36,98	8,03	69,95	15,19	59,79	12,99	54,46	13,97	11,83	3,03
1	75,10	16,31	53,39	11,60	96,82	21,03	87,37	18,98	78,17	18,76	16,98	4,07
1,5	118,03	25,63	93,24	20,25	150,02	32,58	132,61	28,80	123,48	24,03	26,82	5,22
2	152,88	33,20	127,34	27,66	191,65	41,62	164,98	35,83	159,21	26,72	34,58	5,80
3	222,90	48,41	185,64	40,32	233,61	50,74	233,98	50,82	219,03	22,84	47,57	4,96
4	252,79	54,90	225,33	48,94	275,16	59,76	259,68	56,40	253,24	20,83	55,00	4,52
initial Quantification	460,43		460,43		460,43		460,43					

Μετρήσεις σταθερότητας σε ανακινούμενο – θερμοστατούμενο υδατόλουτρο με 5 κωνικές:

Ώρες	C1 (µg/mL)	C2 (µg/mL)	C3 (µg/mL)	C4 (µg/mL)	C5 (µg/mL)	μέσος όρος	SD
0,5	7,53	7,43	7,48	7,49	7,48	7,48	0,03
1	7,49	7,43	7,52	7,49	7,52	7,49	0,04
1,5	7,43	7,35	7,44	7,42	7,45	7,42	0,04
2	7,55	7,47	7,46	7,35	7,52	7,47	0,08
3	7,49	7,44	7,41	7,47	7,51	7,46	0,04
4	7,29	7,27	7,47	7,40	7,42	7,37	0,08

Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις για τα C1 και C5 από τις μετρήσεις σταθερότητας σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο :

	Μεταβλητή 1	Μεταβλητή 2
Μέσος	7,48245546	7,3711029
Διακύμανση	0,00112965	0,00720458
Μέγεθος δείγματος	5	5
Διάμεση διακύμανση	0,00416712	
Υποτιθέμενη διαφορά μέσων	0	
βαθμοί ελευθερίας	8	
t	2,72742239	
P(T<=t) μονόπλευρη	0,01297452	
t κρίσιμο, μονόπλευρο	1,85954804	
P(T<=t) δίπλευρη	0,02594904	
t κρίσιμο, δίπλευρο	2,30600414	

Υπολογισμός σταθερότητας πηκτωμάτων σε συνθήκες δωματίου:

Συνταγή/Μέρες	1(%)	21(%)	71(%)	134(%)
1	89,79	105,23	-	-
2	92,55	92,71	87,55	94,32
3	93,61	99,16	-	-
4	87,42	94,73	95,63	94,91
5	81,63	90,37	-	-
6	93,46	99,26	98,50	98,67
7	93,40	93,09	98,38	93,92
8	99,78	99,12	101,28	100,11
9	97,95	99,94	102,65	101,20
Μέσος όρος	92,1765	97,06757	97,33056	101,1
SD	5,430930	4,655660	5,386088	3,192548

Υπολογισμός σταθερότητας στο ψυγείο:

Συνταγή\Μέρες	1(%)	7(%)	70(%)	104(%)
1	95,18	95,17	91,73	99,88
2	94,25	94,83	88,81	100,70
3	91,55	89,71	91,42	94,80
4	91,63	88,80	93,26	99,94
5	93,71	94,14	87,84	99,50
6	92,96	89,71	85,06	99,72
7	73,31	92,59	85,41	93,03
8	76,15	89,93	88,68	90,75
9	86,56	89,35	86,81	97,03
Μέσος όρος	88,37	91,58	88,78	97,26
SD	7,68	2,44	2,70	3,39

Υπολογισμός ιξώδους με περιστρεφόμενο ιξωδόμετρο συνταγών που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες δωματίου:

Συνταγή\Μέρες	21(rpm 30) (CPS)	29(rpm 30) (CPS)	69(rpm 30) (CPS)
1	2137	2240	1430
2	5490	3755	3600
3	3690	3540	3410
4	3033	3530	2100
5	1090	1230	1310
6	6030	6050	5980
7	8315	8835	8450
8	5980	6965	7010
9	5970	6795	5690

Υπολογισμός ιξώδους με περιστρεφόμενο ιξωδόμετρο συνταγών που αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο:

Συνταγή\Μέρα	92 (12rpm)(CPS)	104 (12rpm) (CPS)	132 (12rpm) (CPS)
1	7300	6010	5490
2	8330	7200	6450
3	9270	7600	7000
4	9700	8300	7240
5	20900	20800	17400
6	26700	22350	19200
7	29100	23900	20900
8	29300	26500	21400
9	16000	13500	11900

Υπολογισμός της πυκνότητας των πηκτωμάτων:

Συνταγή	Μέτρηση	μάζα νερού (mg)	μάζα πηκτώματος (mg)	πυκνότητα
2	1	99,7	102,0	1,023
2	2	98,7	102,4	1,037
2	3	98,0	100,8	1,029
	Μέσος όρος	98,8	101,7	1,0
	SD	0,854400375	0,8326664	0,007276105
4	1	100,8	100,5	0,997
4	2	99,9	100,6	1,007
4	3	98,9	101,8	1,029
	Μέσος όρος	99,9	101,0	1,0
	SD	0,950438495	0,723417814	0,01653711
6	1	99,9	105,4	1,055
6	2	99,1	101,8	1,027
6	3	99,5	101,9	1,024
	Μέσος όρος	99,5	103,0	1,0
	SD	0,4	2,050203242	0,017029832
7	1	99,2	100,9	1,017
7	2	100,1	100,5	1,004
7	3	101,3	100,2	0,989
	Μέσος όρος	100,2	100,5	1,0
	SD	1,053565375	0,351188458	0,014006705
8	1	100,1	101,6	1,015
8	2	102,0	102,1	1,001
8	3	101,1	102,0	1,009
	Μέσος όρος	101,1	101,9	1,0
	SD	0,950438495	0,264575131	0,007022401
9	1	100,2	104,2	1,040
9	2	99,8	101,4	1,016
9	3	102,3	102,1	0,998
9	4	99,6	101,7	1,021
9	5	99,8	101,3	1,015
9	6	98,9	101,5	1,026
	Μέσος όρος	100,1	102,0	1,0
	SD	1,15931014	1,098483804	0,013840893

12	1	98,7	101,2	1,025
12	2	98,5	100,5	1,020
12	3	101,4	101,0	0,996
	Μέσος όρος	99,5	100,9	1,0
	SD	1,619670748	0,360555128	0,015653799
13	1	99,3	103,5	1,042
13	2	99,1	101,3	1,022
13	3	98,9	101,7	1,028
	Μέσος όρο	99,1	102,2	1,0
	SD	0,2	1,171893055	0,010301962
14	1	97,1	101,4	1,044
14	2	98,0	100,8	1,029
14	3	98,6	101,7	1,031
	Μέσος όρος	97,9	101,3	1,0
	SD	0,754983444	0,458257569	0,008367522
15	1	100,2	101,9	1,017
15	2	99,4	100,9	1,015
15	3	99,5	100,2	1,007
	Μέσος όρος	99,7	101,0	1,0
	SD	0,435889894	0,854400375	0,005276191
16	1	97,7	101,0	1,034
16	2	98,0	101,2	1,033
16	3	98,6	100,6	1,020
	Μέσος όρος	98,1	100,9	1,0
	SD	0,458257569	0,305505046	0,007486826
17	1	99,2	101,4	1,022
17	2	99,2	101,2	1,020
17	3	99,1	102,2	1,031
	Μέσος όρος	99,2	101,6	1,0
	SD	0,057735027	0,529150262	0,005924659
	Συνολικός μέσος όρος	99,47	101,55	1,02099
	Συνολικό SD	1,134842609	1,027739419	0,014298841