



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



**DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE
XXIX CICLO**

TESI

**“DAL NASO AL CERVELLO:
effetti clinici della dexmedetomidina per via
intranasale nel cane”**

Candidato

Dott.ssa Fabiana Micieli

Tutor

Prof. Giovanni Vesce

DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE - Segreteria *Dott.ssa Maria Teresa Cagiano*
Coordinamento - *Prof. Giuseppe Cringoli*

Ad Alessandra

Lista delle abbreviazioni	11
Lista delle figure	12
Lista delle tabelle	13
Abstract	14
Introduzione	19
Bibliografia	21
Capitolo 1	
1.1 La via intranasale	25
1.2 Meccanismi di assorbimento della via intranasale	26
1.2.1 La via olfattiva	27
La via transcellulare	29
La via paracellulare	29
Trasporto lungo il nervo olfattorio	29
1.2.2 La via trigeminale	29
1.2.3 Passaggio nel sangue	30
1.2.4 La via linfatica	30
1.3 Fattori che influenzano l'assorbimento dei farmaci per via IN	32
1.3.1 Proprietà fisico-chimiche dei farmaci	32
Peso molecolare	32
Solubilità	34
Lipofilia/Idrofilia	35
pKa	35
1.3.2 Anatomia e fisiologia delle cavità nasali	35
Flusso sanguigno	35
Clearance mucociliare	36
Degradazione enzimatica	36
Glicoproteina P	37
1.3.3 Formulazione dei farmaci	37
Viscosità	37
pH	37
Volume	37
Impiego di dispositivi di atomizzazione	38

1.4	Tecniche per migliorare l'assorbimento per via intranasale	40
1.4.1	Pro-farmaci	40
1.4.2	Inibitori enzimatici	41
1.4.3	Promotori dell'assorbimento	42
	Chitosano	42
	Ciclodestrine	43
	Mucoadesivi	44
1.4.4	Nuove strategie nelle formulazioni intranasali	44
	Liposomi	45
	Microsfere	45
	Nanoparticelle	45
1.5	La via intranasale negli animali	46
1.5.1	La via IN per la sedazione negli animali	46
	Gatti	46
	Suini	47
	Uccelli	48
	Leporidi	50
	Tartarughe	52
1.5.2	Cattura degli animali selvatici	53
1.5.3	Trattamento delle crisi convulsive nel cane	54
	Bibliografia	56
Capitolo 2		
2.1	α_2 -Agonisti	63
2.1.1	Brevi cenni storici	63
2.1.2	Recettori adrenergici	64
	Stimolazione recettori adrenergici	67
2.1.3	Effetti degli agonisti dei recettori α -adrenergici	67
	Sedazione	67
	Analgesia	68
	Effetti cardiovascolari	69
	Effetti respiratori	71
	Effetti sull'apparato gastroenterico	72
	Effetti endocrini	72
	Termoregolazione	72
2.2	Dexmedetomidina	73
2.2.1	Proprietà fisico-chimiche	73
2.2.2	Farmacocinetica	74

2.2.3	Farmacodinamica	74
	Effetti cardiocircolatori e respiratori	75
	Bibliografia	76
Capitolo 3		
3.1	Anatomia delle cavità nasali del cane	81
3.1.1	Narici e vestibolo	81
3.1.2	Cavità nasali propriamente dette	82
3.1.3	Mucosa nasale	83
	Bibliografia	86
Capitolo 4 - Studio sperimentale		
4.1	Introduzione	89
4.2	Valutazione degli effetti clinici di dexmedetomidina per via intranasale nel cane	90
4.2.1	Materiali e Metodi	90
	Animali	90
	Disegno dello studio	91
	Somministrazione della dexmedetomidina (IN - IM)	91
	Parametri valutati	92
	Analisi statistica	95
4.2.2	Risultati	95
	Dati demografici	95
	Sedazione	96
	Variabili cardiovascolari	97
	Variabili respiratorie	99
4.2.3	Discussione	101
4.3	Conclusioni	106
	Bibliografia	107

AMPc	Adenosina Monofosfato Ciclico
BEE	Barriera Emato Encefalica
CMC	<i>Clearance</i> mucociliare
CO	<i>Output</i> Cardiaco
DAP	Pressione Arteriosa Diastolica
DEX	Dexmedetomidina
DMB	Dexmedetomidina, Midazolam e Butorfanolo
GABA	Acido γ -amminobutirrico
HR	Frequenza Cardiaca
IN	Intranasale
LC	<i>Locus Coeruleus</i>
MAC	Concentrazione Alveolare Minima
MAD	<i>Mucosal Atomization Device</i>
MAP	Pressione Arteriosa Media
OVUD	Ospedale Veterinario Universitario Didattico
Pgp	Glicoproteina P
RR	Frequenza Respiratoria
SAP	Pressione Arteriosa Sistolica
SNC	Sistema Nervoso Centrale
SpO2	Saturazione dell'ossigeno nel sangue
SS	Sedation Score (grado di sedazione)
TN	Transnasale

- 1.1 Meccanismi di assorbimento attraverso la mucosa respiratoria ed olfattoria
- 1.2 Meccanismi di assorbimento dei farmaci per via IN
- 1.3 Assorbimento attraverso i neuroni olfattori
- 1.4 Fattori in grado di modificare l'assorbimento dei farmaci somministrati per via IN
- 1.5 Meccanismi di passaggio dell'epitelio respiratorio degli xenobiotici in relazione alle loro proprietà chimico-fisiche
- 1.6 Dispositivo di atomizzazione MAD
- 1.7 Somministrazione IN in un canarino
- 1.8 Somministrazione IN in tartarughe
- 2.1 Rappresentazione del neurone noradrenergico nel SNC
- 2.2 Classificazione dei recettori adrenergici
- 2.3 Schema sulle differenze funzionali tra etero e autorecettori α_2A .
- 2.4 Effetti dei diversi farmaci sulle diverse vie del dolore, effetti degli α_2 -agonisti su trasmissione, modulazione e percezione del dolore
- 2.5 Formula molecolare della dexmedetomidina
- 3.1 A Naso, aspetto laterale
- 3.1 B Cartilagini nasali viste in laterale
- 3.1 C Naso, aspetto rostrale
- 3.1 D Cartilagini nasali aspetto rostrale
- 3.2 Sezione sagittale delle cavità nasali
- 3.3 Vascolarizzazione delle cavità nasali, sezione sagittale
- 4.1 Somministrazione intranasale (IN) nel cane mediante l'ausilio di un dispositivo di atomizzazione (MAD)
- 4.2 Cartella di sedazione e di valutazione dei parametri cardio respiratori utilizzata per lo studio
- 4.3 Grado di sedazione nei due gruppi
- 4.4 Frequenza cardiaca nei due
- 4.5 Pressione arteriosa media nei due gruppi
- 4.6 Frequenza respiratoria nei due gruppi
- 4.7 Saturazione dell'ossigeno nel sangue nei due gruppi

- 1.1 Volume da somministrare per ottenere lo stesso volume per superficie studiato per l'uomo
- 1.2 Fattori che influenzano l'assorbimento e possibili soluzioni
- 2.1 Selettività per i recettori α - adrenergici dei comuni α_2 -agonisti
- 4.1 Dati demografici nei due gruppi

FROM NOSE TO BRAIN: CLINICAL EFFECTS OF
DEXMEDETOMIDINE VIA INTRANASAL ROUTE IN DOG

INTRODUCTION: The intranasal administration of drugs to induce systemic effects is a clinical option legitimized by the surprising absorbing features of the nasal mucosa. Among many other substances, neurotropic molecules such as anaesthetics benefit from the long known nose-to-brain pathway, only recently rediscovered in the clinical field. After describing the features of the intranasal pathway and the sedative and cardiovascular effects of dexmedetomidine, the published studies about veterinary intranasal anesthesia are conveyed.

OBJECTIVE: Aim of this study is to compare in dogs the sedative and cardiorespiratory effects of dexmedetomidine (DEX), administered by intranasal route (IN), comparing them to those produced after intramuscular administration.

METHODS: Twenty healthy ASA I or II dogs referred for diagnostic procedures were enrolled in the study. Dogs were randomly allocated to receive either IM or IN DEX (Dexdomitor 0.05%, Pfizer Italia srl, Italy) at dose of 0.02 mg/kg. In the IM group DEX was injected into the *rectus femoris* belly, while in the IN group DEX was delivered in both nostrils through a Mucosal Atomization Device (Mucosal Atomization Device, MAD 300, Wolfe Tory Medical Inc., Salt Lake City, USA) to obtain a better distribution of the drug in the nasal cavity. In both groups after drug administration sedation score and vital variables were assessed and recorded every 5 minutes for 45 minutes.

Differences over time and between the two groups were analysed using two-way repeated measures analysis of variance (2-way ANOVA) and the Scheier Ray Hare test for normally and non-normally distributed data, respectively. *Post hoc* analysis were performed with Sidak's multiple comparison test, Mann-Whitney U-test and Tukey test depending on normally and non-normally distributed data.

RESULTS: Treatments were effective in all dogs and no statistical difference was found in dexmedetomidine onset of action between IN and IM groups (IN 6.3 ± 3.3 minutes vs IM 9.4 ± 4.6 minutes). The sedation score (SS) was significantly higher in the IN group compared to the IM group ($p < 0.001$) from 10 minutes after drug administration to 45 minutes. A significant lower heart rate (HR) was found in the IM group compared to the IN group during the observation period ($p < 0.001$). Specifically, at the

peak sedative time a 56% decrease in HR was found in the IM group respect to a 18% HR decrease in IN group, compared to baseline values.

No significant differences were found between the two groups in the respiratory rate ($p = 0.067$) and in oxygen haemoglobin saturation ($p = 0.127$) for all the period monitored.

CONCLUSIONS: Compared to IM administration a deeper sedation and a lesser bradycardia were found after IN administration. The effective nose-to-brain transport could have supported the higher DEX brain concentrations and the lowered systemic distribution after IN administration, leading to the deeper sedation and the less peripheral effects. The IN administration of DEX could be considered as an easier, effective and less invasive alternative to the IM route for sedation in dogs

DAL NASO AL CERVELLO: EFFETTI CLINICI DELLA DEXMEDETOMIDINA PER VIA INTRANASALE NEL CANE

INTRODUZIONE: La somministrazione intranasale di farmaci per indurre effetti sistemici è una realtà clinica legittimata dalle insolite proprietà di assorbimento della mucosa nasale.

Tra molte altre sostanze, la somministrazione intranasale di molecole neurotrope, quali quelle anestetiche, si avvantaggia della via naso-cervello, nota alla medicina antica, ma solo da poco riscoperta in campo clinico.

Dopo aver descritto la via intranasale e caratterizzato la dexmedetomina, già impiegata nell'uomo per via IN, vengono riportate gli studi di anestesia intranasale in vari ordini di animali presenti in letteratura.

OBIETTIVO: Il presente studio si pone l'obiettivo di valutare l'efficacia clinica e gli effetti sulla funzionalità degli apparati cardiocircolatorio e respiratorio prodotti dalla dexmedetomidina (DEX) nel cane, dopo somministrazione per via intranasale (IN), confrontandoli con quelli conseguenti la più comune via di somministrazione intramuscolare (IM).

MATERIALI E METODI: Sono stati inclusi nello studio venti cani, tutti appartenenti alle classi di rischio anestesilogico ASA I o II, divisi, secondo randomizzazione, in due gruppi per la somministrazione IN o IM di DEX. In entrambi i gruppi veniva somministrata DEX (Dexdomitor 0.05%, Pfizer Italia srl, Italy) alla dose di 0.02 mg/kg. Nei soggetti del gruppo IM la DEX veniva somministrata nel ventre del muscolo retto femorale, mentre nel gruppo IN, la stessa dose di DEX veniva somministrata per via intranasale, con l'ausilio di un atomizzatore MAD (Mucosal Atomization Device, MAD 300, Wolfe Tory Medical Inc., Salt Lake City, USA), in grado di ottimizzare la distribuzione e l'assorbimento del farmaco all'interno delle cavità nasali. Tutti i soggetti, dal momento della somministrazione e per i 45 min. successivi, venivano monitorati costantemente i parametri vitali e il grado di sedazione annotandoli in cartella ogni 5 min.

Per valutare la variabilità all'interno di gruppi e tra i due gruppi, sono stati utilizzati: un'analisi della varianza a due vie (2-way ANOVA) per i dati parametrici, mentre per i dati non parametrici è stato impiegato il test Scheier Ray Hare. L'analisi post hoc è stata eseguita con il test di Sidak, il test di Mann-Whitney U-test o il test di Tukey, in relazione al tipo di distribuzione. Per tutti i test la significatività è stata posta a $p < 0.05$.

RISULTATI: La sedazione è risultata efficace in tutti i soggetti di entrambi i gruppi, mentre non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente

significativa tra i due gruppi nella latenza d'azione del farmaco (IN 6.3 ± 3.3 minuti vs IM di 9.4 ± 4.6 minuti).

Il grado di sedazione (SS) è risultato significativamente più alto nel gruppo IN rispetto al gruppo IM ($p < 0.001$) a tutti i tempi a partire da 10 minuti dopo la somministrazione di DEX. Per quanto concerne i parametri vitali, la frequenza cardiaca è risultata significativamente più alta nel gruppo IN rispetto al gruppo IM ($p < 0.001$); in particolare, in corrispondenza del picco di sedazione, la frequenza cardiaca è risultata diminuita del 18% rispetto ai valori basali nel gruppo IN, mentre nel gruppo IM la diminuzione della frequenza cardiaca ha raggiunto una riduzione in percentuale del 56%. Infine, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i due gruppi nell'andamento della frequenza respiratoria ($p = 0.067$) e saturazione dell'ossigeno nel sangue ($p = 0.127$).

CONCLUSIONI: Nonostante abbia prodotto una sedazione più profonda, la somministrazione IN ha determinato una minore incidenza della bradicardia. Il passaggio diretto dal naso al cervello, dimostrato da diversi studi nell'uomo e negli animali, può aver favorito una maggiore concentrazione del farmaco nel SNC ed una sua minore distribuzione sistemica, determinando così una parziale riduzione degli effetti periferici della DEX.

La somministrazione IN di DEX potrebbe costituire un'alternativa meno invasiva e di pari efficacia alla via di somministrazione intramuscolare.

Per raggiungere il sistema nervoso centrale (SNC), una sostanza deve possedere particolari requisiti chimico-fisici che le consentono di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE). Tale barriera, che ha la finalità fisiologica di proteggere il SNC da sostanze chimiche, proteiche o da batteri, limita enormemente il numero di farmaci che possono raggiungere il cervello, creando un ostacolo alle molecole somministrate per via sistemica. Le strategie in grado di veicolare al SNC sostanze terapeutiche, altrimenti bloccate dalla BEE, sono di tipo farmacologico, come l'impiego di profarmaci, nanocarriers, imballaggi molecolari, vettori biologici, etc.; altre sono di tipo invasivo, come la somministrazione intratecale, quella intracerebro-ventricolare e le strategie di rottura della BEE (BBB disruption strategies) e non ultima la somministrazione attraverso la via intranasale (IN) (Lu et al. 2014).

La via intranasale costituisce una strategia promettente per la somministrazione al cervello di molecole normalmente bloccate dalla BEE, e già da anni costituisce una realtà clinica per la somministrazione di diversi farmaci. Nel corso degli ultimi vent'anni questa via di somministrazione è stata largamente esplorata e impiegata come alternativa alle più comuni vie di somministrazione poiché in grado di evitare il primo passaggio epatico, di garantire un ottimo assorbimento ed un trasporto rapido e diretto dei farmaci al sistema nervoso centrale (Illum 2000).

Le specifiche caratteristiche dell'ampia superficie delle cavità nasali, rivestite in misura diversa da due diversi tipi di mucosa, una respiratoria e l'altra olfattoria rendono la via IN di particolare interesse. In particolare, a livello della mucosa respiratoria, grazie alla sua più ricca vascolarizzazione, le molecole somministrate irrompono rapidamente nella circolazione sistemica, mentre le molecole che raggiungono la mucosa olfattoria vengono trasportate direttamente al SNC. I meccanismi di trasporto diretto dalla mucosa olfattoria al cervello sono prevalentemente tre: il trasporto assonale attivo, il passaggio attraverso le giunzioni serrate cellulari e l'endocitosi nei neuroni olfattori (Illum 2000). Grazie a tali meccanismi, la via IN garantisce un tempo di latenza più breve rispetto alle comuni vie di somministrazione (ad eccezione della via endovenosa) e un'efficacia ed una durata paragonabili alle altre vie (Grassin-Delyle et al. 2012). Inoltre, nell'uomo, la somministrazione IN di alcune molecole anestetiche ha determinato una minore incidenza di effetti secondari sistemici rispetto alla via endovenosa (Han et al. 2014).

La somministrazione IN si caratterizza per essere una tecnica di semplice esecuzione, meno stressante e meno dolorosa rispetto alle vie di

somministrazione intramuscolare e sottocutanea. Per questi motivi, in medicina umana tale tecnica ha trovato largo sviluppo prevalentemente nella sedazione e nell'analgesia dei pazienti pediatrici (Grassin-Delyle et al. 2012).

Considerando che l'assorbimento attraverso questa via di somministrazione può essere limitato dalla presenza di giunzioni serrate cellulari della mucosa nasale, la quale è rivestita da uno spesso strato di muco ricco di enzimi (Pires et al. 2009), le caratteristiche chimico-fisiche delle molecole giocano un ruolo chiave nell'assorbimento dei farmaci somministrati per via IN (Kamble et al. 2013).

Le molecole anestetiche sono, potenzialmente, candidati ideali per la somministrazione IN, poiché grazie alle loro caratteristiche chimico-fisiche, necessarie per il superamento della BEE, vengono facilmente assorbiti dalla mucosa nasale e rapidamente trasportati al loro sito d'azione nel SNC.

La dexmedetomidina (DEX), il più selettivo degli α_2 -agonisti, grazie al suo basso peso molecolare (200.285 g/mol), si presta particolarmente a questa via di somministrazione ed è stata largamente studiata ed impiegata clinicamente per via IN nell'uomo. La somministrazione IN di DEX è in grado di determinare un'adeguata sedazione con una biodisponibilità del 65% (Iirola et al. 2011) e di limitare gli effetti indesiderati del farmaco sugli apparati cardiocircolatorio e respiratorio rispetto alla via endovenosa (Han et al. 2014).

Nonostante i numerosi vantaggi offerti dalla via IN nell'uomo non esistono sufficienti studi sull'utilizzo della via IN per la sedazione e l'analgesia dei piccoli animali.

Sulla base delle suddette considerazioni, obiettivo del presente studio è stato la valutazione degli effetti sedativi e cardiorespiratori della dexmedetomidina somministrata per via IN nel cane.

Nella prima parte del presente lavoro viene presentata una revisione della recente letteratura sulla via intranasale e i dati bibliografici relativi alla dexmedetomidina nel cane, mentre nella seconda parte viene riportato uno studio sperimentale condotto presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", teso a rivelare gli effetti cardio-respiratori e sedativi della dexmedetomidina per via IN nel cane.

- Grassin-Delyle S, Buenestado A, Naline E et al. (2012) Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids. *Pharmacol Ther* 134, 366-379.
- Han G, Yu WW, Zhao P (2014) A randomized study of intranasal vs. intravenous infusion of dexmedetomidine in gastroscopy. *Int J Clin Pharmacol Ther* 52, 756-761.
- Iirola T, Vilo S, Manner T et al. (2011) Bioavailability of dexmedetomidine after intranasal administration. *Eur J Clin Pharmacol* 67, 825-831.
- Illum L (2000) Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci* 11, 1-18.
- Kamble M, Bhalerao K, Bhosale A et al. (2013) A Review on Nose-to-Brain Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences* 2, 516 - 525.
- Lu CT, Zhao YZ, Wong HL et al. (2014) Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers. *Int J Nanomedicine* 9, 2241-2257.
- Pires A, Fortuna A, Alves G et al. (2009) Intranasal drug delivery: how, why and what for? *J Pharm Pharm Sci* 12, 288-311.

Capitolo 1

La via intranasale: Dal naso al cervello

Vengono discussi i meccanismi di assorbimento della via intranasale ed i fattori che influenzano e che possono migliorare l'assorbimento per tale via.

Un ampio paragrafo è dedicato ad una review della letteratura sull'impiego clinico di sedativi ed analgesici per via intranasale nelle diverse specie animali.

1.1 La via intranasale

La somministrazione di farmaci per via intranasale (IN) è stata per secoli associata a terapie di tipo topico per le affezioni locali e delle prime vie aeree; tuttavia, la ricca vascolarizzazione e l'alto grado di permeabilità della mucosa nasale favoriscono l'efficacia clinica di tale via per la somministrazione di farmaci ad azione sistemica. I principali vantaggi che offre la via IN sono la facilità di somministrazione, attuabile anche da personale non esperto, la non invasività della procedura e l'assenza di dolore legate al mancato impiego di aghi, una breve latenza d'azione e il mancato effetto di primo passaggio epatico (Grassin-Delyle et al. 2012).

L'assorbimento dei farmaci per via IN dipende sia dai requisiti fisico-chimici della molecola da somministrare, che dalle caratteristiche anatomiche e fisiologiche del paziente, tra cui la conformazione delle cavità nasali ed in particolare dall'estensione della mucosa olfattoria. Il destino di una sostanza somministrata per via IN è, inoltre, condizionato da innumerevoli altri fattori tra i quali la modalità di somministrazione (spray o gocce), il volume somministrato, la clearance muco-ciliare, la posizione della testa del paziente e la possibilità d'espulsione mediante starnuti.

I limiti di tale via di somministrazione sono legati alla presenza di eventuali patologie delle cavità nasali quali polipi, infezioni o di altre condizioni che potrebbero limitare l'assorbimento o condizionare la normale distribuzione del farmaco all'interno dei diversi meati nasali. Nonostante tale tecnica risulti non dolorosa, poco invasiva e in genere ben tollerata dagli animali, alcuni soggetti, specie se timorosi, possono sottrarsi alla manovra di somministrazione del farmaco e determinare di conseguenza la perdita totale o parziale della soluzione.

1.2 Meccanismi di assorbimento della via intranasale

Dopo la somministrazione per via IN, una quota di farmaco viene eliminata dalla clearance muco-ciliare, mentre la rimanente parte viene assorbita, in diverso grado e con meccanismi diversi, sia dalla mucosa respiratoria che da quella olfattoria.

La mucosa respiratoria, vascolarizzata più di un muscolo striato, assorbe prontamente le molecole del farmaco immettendole nella circolazione sistemica da dove, se in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, raggiungeranno il SNC (Illum 2000). La quota di farmaco che raggiunge la mucosa olfattoria subisce, invece, un trasporto diretto al SNC mediante diversi meccanismi di trasferimento transcellulare, paracellulare e di trasporto assonale lungo i nervi olfattori e il trigemino (Illum 2000) (Figura 1.1) che verranno illustrati più avanti.

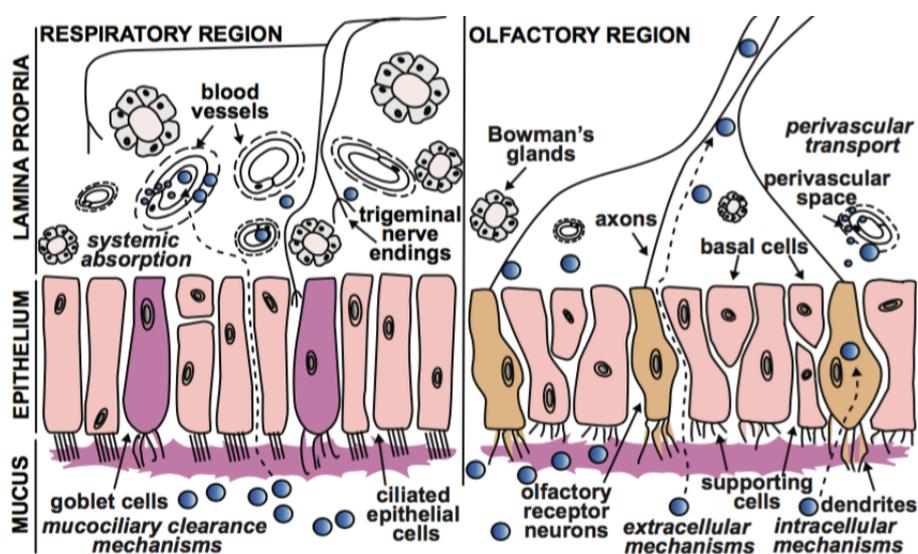


Figura 1.1 Meccanismi di assorbimento attraverso la mucosa respiratoria ed olfattoria (Dhuria et al. 2010)

I meccanismi di assorbimento in grado di garantire il trasporto dei farmaci dalla via IN al SNC non sono stati ancora completamente compresi ma, oltre al trasporto attraverso il torrente circolatorio e la BEE, vi sono evidenze

circa un trasporto diretto al cervello attraverso i nervi ed il sistema linfatico (Dhuria et al. 2010; Pardeshi & Belgamwar 2013) (Figura 1.2).

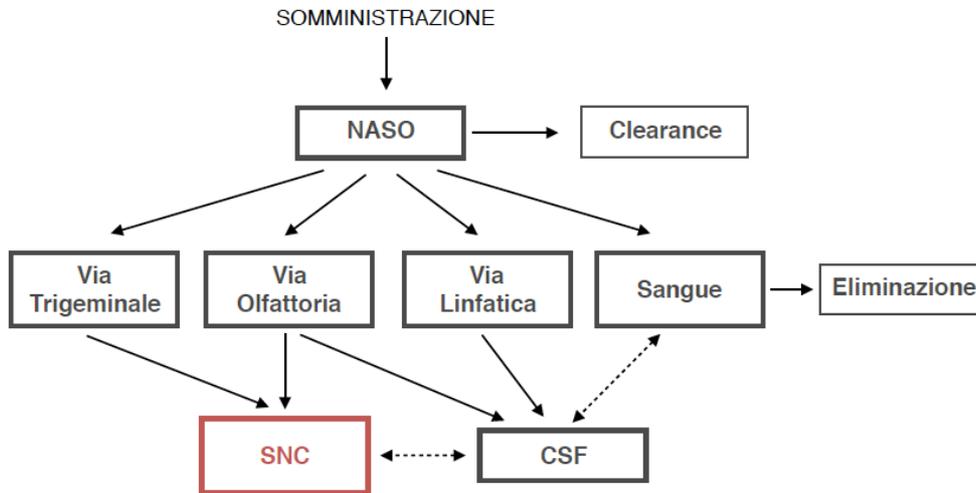


Figura 1.2 Meccanismi di assorbimento dei farmaci per via IN

Le diverse vie suddette collaborano nell'efficacia e nella rapidità d'azione riscontrata dopo somministrazione di farmaci per via IN, tuttavia il quantitativo di farmaco che viene assorbito per ciascuna via è fortemente influenzato dalle caratteristiche fisico-chimiche delle molecole, in particolare dalla lipofilia e dal peso molecolare, come verrà descritto più avanti (Illum 2000).

1.2.1 La via olfattiva

L'epitelio olfattivo è composto da tre tipi differenti di cellule: cellule olfattive, cellule di sostegno pigmentate e cellule basali disposte a ridosso della membrana basale. Le cellule olfattive sono dei neuroni bipolari i cui dendriti si estendono all'interno del muco mentre gli assoni, avvolti da cellule di Schwann, attraversano le perforazioni presenti sulla lamina

cribrosa dell'etmoide raggiungendo lo spazio subaracnoideo per prendere, infine, contatto con le cellule mitrali dei bulbi olfattori (Figura 1.3) (Dhuria et al. 2010).

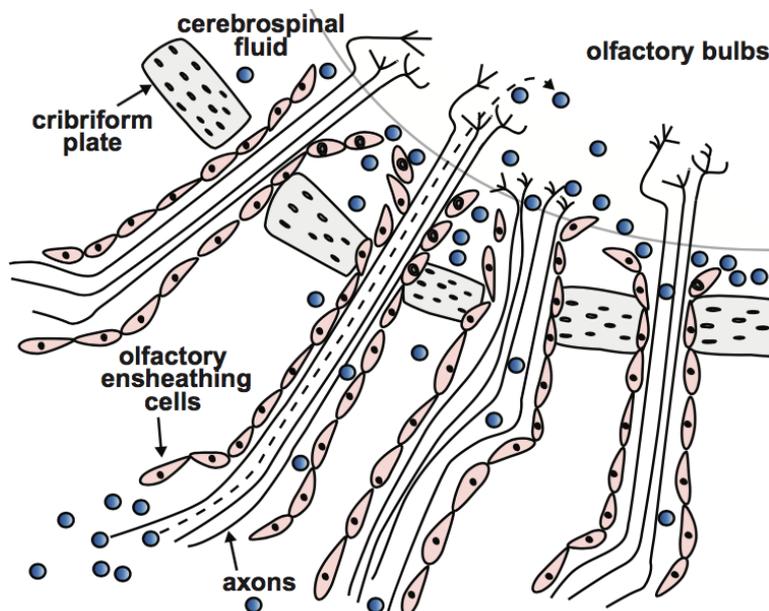


Figura 1.3 Assorbimento attraverso i neuroni olfattori (immagine tratta da Dhuria et al. 2010)

Mentre nell'uomo l'epitelio olfattivo costituisce una piccola area presente nella porzione dorsale delle cavità nasali che copre circa il 5% del totale delle cavità nasali, negli animali essa risulta molto più sviluppata: nel cane quest'area è 10 volte più grande rispetto a quella dell'uomo (Illum 2000) e nel ratto la mucosa olfattoria copre il 50% del totale della mucosa nasale (Graff & Pollack 2005); queste differenze anatomiche rendono gli animali maggiormente idonei alla deposizione sulla mucosa olfattoria e al trasporto diretto del farmaco nel SNC (Graff & Pollack 2005).

Infatti, sono proprio la mucosa olfattiva e le vie olfattive ad essa associate a rappresentare la maggior componente in grado di garantire l'accesso diretto dei farmaci al SNC dopo somministrazione IN (Dhuria et al. 2010). I meccanismi di trasporto diretto dal naso al cervello si verificano per via

transcellulare, per via paracellulare e attraverso il trasporto lungo il nervo olfattorio.

-La via transcellulare

La via transcellulare è caratterizzata prevalentemente da un passaggio delle molecole attraverso le cellule di sostegno dovuto, probabilmente, ad endocitosi o a diffusione passiva; quest'ultima è strettamente dipendente dalla lipofila delle molecole somministrate (Illum 2000; Pardeshi & Belgamwar 2013).

-La via paracellulare

La via paracellulare permette il passaggio delle molecole idrofile attraverso le giunzioni serrate cellulari poste tra le cellule di sostegno o tra gli spazi posti tra le cellule di sostegno e i neuroni olfattivi (Illum 2000).

-Trasporto lungo il nervo olfattorio

I farmaci penetrano nei neuroni attraverso meccanismi di endocitosi o pinocitosi; da qui vengono trasportati al bulbo olfattorio tramite trasporto assonale attivo (Pardeshi & Belgamwar 2013). È stato dimostrato come la via trans neuronale è molto lenta nel trasporto dei farmaci al SNC, pertanto tale via da sola non giustifica l'alta concentrazione di farmaco nel liquido cefalorachidiano osservabile poco dopo la somministrazione IN (Illum 2000).

Diversi studi hanno descritto un rapido trasporto nel SNC con effetti clinici immediati dopo somministrazione IN; questo è da imputare, prevalentemente, ai più rapidi meccanismi di trasporto extracellulare che permettono alle molecole di raggiungere rapidamente il bulbo olfattorio e le altre aeree dell'encefalo (Dhuria et al. 2010).

1.2.2 La via trigeminale

La via trigeminale rappresenta un ulteriore importante meccanismo di connessione naso-cervello. Thorne e Coll. nel 2004 hanno messo in evidenza la presenza di radioattività lungo tutte le branche del trigemino, nel

bulbo olfattorio e in diverse aree cerebrali dopo somministrazione IN di fattori di crescita insulino-simili marcati con iodio ([¹²⁵I]-IGF-I) (Thorne et al. 2004).

Il trigemino con i suoi rami innerva, tra l'altro, gli epiteli olfattorio e respiratorio delle cavità nasali; una piccola porzione del trigemino termina anche nel bulbo olfattorio, in una sede contigua a quella occupata dal nervo olfattorio, rendendo difficile differenziare il trasporto attraverso le due vie dopo somministrazione IN (Dhuria et al. 2010).

Il trigemino, infatti, penetra nel cervello dall'epitelio respiratorio delle cavità nasali attraverso due strade: la prima vicino al ponte di Varolio attraverso il *foramen lacerum* e la seconda attraverso la lamina cribrosa dell'etmoide vicino al bulbo olfattorio (Pardeshi & Belgamwar 2013).

1.2.3 Passaggio nel sangue

La mucosa nasale risulta ampiamente vascolarizzata attraverso i rami delle arterie oftalmiche e facciali. A livello della mucosa respiratoria la densità dei capillari è cinque volte maggiore di quanto riscontrato a livello della mucosa olfattoria, inoltre la permeabilità dei capillari alle macromolecole idrofile risulta significativamente maggiore a carico della mucosa respiratoria (Kumar et al. 2016).

I vasi della mucosa nasale presentano un endotelio fenestrato da cui piccole e grandi molecole possono passare nella circolazione sistemica dopo somministrazione IN (Dhuria et al. 2010); Kumar e Coll. (2016) hanno evidenziato, applicando la teoria idrodinamica, che i pori dei vasi presenti nella mucosa respiratoria sono di diametro maggiore (13-17 nm) rispetto a quelli presenti nella mucosa olfattoria (<9 nm). I farmaci somministrati per via IN, quindi, penetrano nella circolazione sistemica prevalentemente a livello della mucosa respiratoria e raggiungono il SNC attraversando la barriera ematoencefalica (Illum 2000).

1.2.4 La via linfatica

La connessione tra lo spazio sub-aracnoideo, contenente liquido cefalorachidiano, e lo spazio peri-neurale che circonda i nervi olfattori e i vasi linfatici nasali è importante poiché garantisce il drenaggio del liquido cefalorachidiano; questa connessione, inoltre, permette ai farmaci somministrati per via IN di essere trasportati dal liquido cefalorachidiano in

diverse aree del SNC (Dhuria et al. 2010). L'impiego di traccianti iniettati nello spazio subaracnoideo cerebrale ha permesso, infatti, di dimostrare che il liquido cefalorachidiano è in grado di drenare dallo spazio subaracnoideo ai vasi linfatici nasali in prossimità dei nervi olfattori (Walter et al. 2006). I farmaci somministrati per via IN possono raggiungere il SNC attraverso le stesse vie spostandosi con andamento retrogrado dai vasi linfatici al liquido cefalorachidiano; questo meccanismo è rilevante in alcune specie animali, come coniglio e ratto, che presentano una *clearance* del liquido cefalorachidiano del 50% (Dhuria et al. 2010).

1.3 Fattori che influenzano l'assorbimento dei farmaci per via intranasale

Nonostante l'ampia superficie di assorbimento delle cavità nasali, la permeabilità e la ricca vascolarizzazione della mucosa nasale, diversi altri fattori sono in grado di condizionare l'assorbimento dei farmaci attraverso la via IN.

Dopo somministrazione IN, per poter determinare sia il suo effetto sistemico che per raggiungere direttamente il SNC, un farmaco, deve attraversare la mucosa nasale, le cui cellule epiteliali presentano giunzioni serrate e uno strato di muco ricco di enzimi. Il passaggio attraverso l'epitelio è reso possibile, come precedentemente descritto, attraverso meccanismi transcellulari o paracellulari (Pires et al. 2009). L'assorbimento attraverso la via IN è, dunque, influenzato da una serie di caratteristiche strutturali, biochimiche e chimico fisiche delle molecole (peso molecolare, solubilità, lipofilia e pKa) (

Figura 1.4).

1.3.1 Proprietà fisico-chimiche dei farmaci

È noto come le proprietà fisico-chimiche di un farmaco influenzino in maniera diretta l'assorbimento, il metabolismo e l'escrezione del farmaco stesso.

-Peso molecolare

Il peso molecolare riveste un ruolo determinante nell'assorbimento dei farmaci per via IN; in particolare, l'assorbimento è fortemente limitato per le molecole con un peso molecolare > 1000 Da; l'elevato peso molecolare limita infatti il passaggio paracellulare attraverso le giunzioni serrate cellulari (Costantino et al. 2007; Grassin-Delyle et al. 2012). Per molecole con peso molecolare < 300 Da, l'assorbimento per via IN risulta, invece, rapido e scarsamente influenzato dalle altre caratteristiche chimico fisico della molecola (Pires et al. 2009; Kamble et al. 2013).

Per le molecole il cui peso molecolare è compreso tra 300 e 1000 Da la liposolubilità rappresenta una caratteristica determinate: le molecole lipofile, infatti, vengono facilmente assorbite attraverso diffusione passiva mentre l'assorbimento delle molecole idrofile è inversamente proporzionale

al loro peso molecolare (Figura 1.5) (Costantino et al. 2007; Kapoor et al. 2016b).

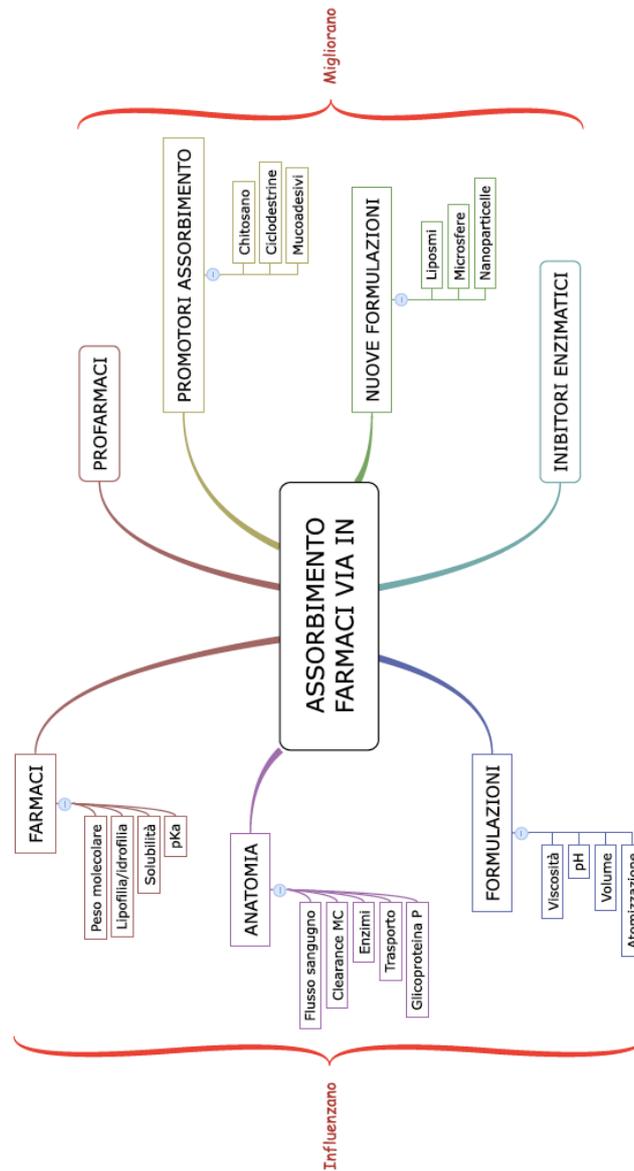


Figura 1.4 Fattori in grado di modificare l'assorbimento dei farmaci somministrati per via IN

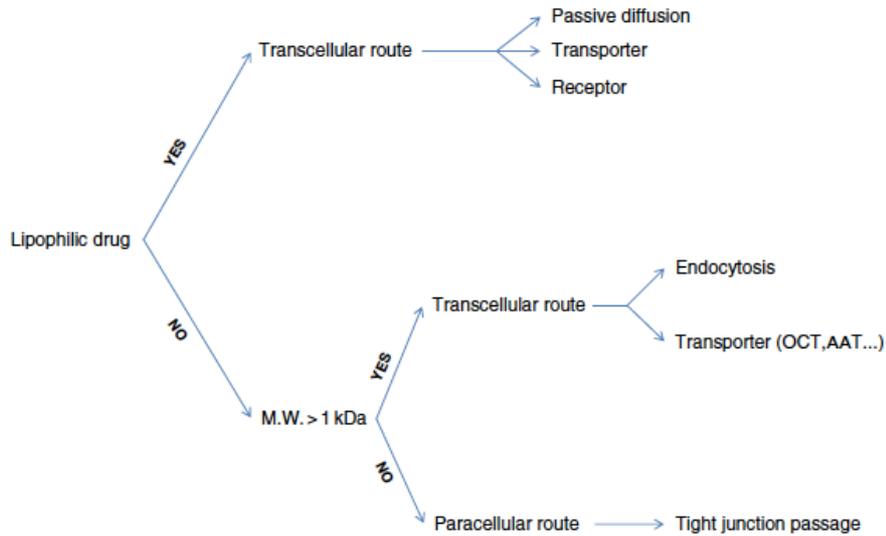


Figura 1.5 Meccanismi di passaggio dell'epitelio respiratorio degli xenobiotici in relazione alle loro proprietà chimico-fisiche (immagine tratta da: Grassin-Delyle et al. 2012).

-Solubilità

La solubilità è un requisito fondamentale per l'assorbimento dei farmaci in quanto solo la parte disciolta del farmaco può essere assorbita attraverso le membrane biologiche (Pires et al. 2009); pertanto, prima di essere assorbito, un farmaco somministrato per via IN deve essere disciolto nei fluidi acquosi presenti nelle cavità nasali (Kapoor et al. 2016b).

A causa del ridotto volume somministrabile per via IN, la solubilità del farmaco deve essere adeguata a garantire il raggiungimento di una concentrazione locale terapeutica; questo può rappresentare un problema per molecole altamente idrofobe e con bassa solubilità (Kapoor et al. 2016b). Per ovviare a questo problema può essere necessario aumentare la solubilità dei farmaci attraverso l'aggiunta di profarmaci, co-solventi, ciclodestrine o altri eccipienti (Costantino et al. 2007).

-Lipofilia/Idrofilia

La membrana nasale è prevalentemente lipofila, pertanto le molecole lipofile tendono ad essere più facilmente assorbite attraverso le cavità nasali (Pires et al. 2009; Kamble et al. 2013). In modelli murini, la somministrazione IN di differenti farmaci con diversa lipofilia ha dimostrato un aumento lineare delle concentrazioni nel liquido cefalorachidiano all'aumentare della lipofilia delle molecole (Costantino et al. 2007). Nonostante ciò farmaci troppo lipofili tendono a non disciogliersi rapidamente nei fluidi presenti nelle cavità nasali, risentendo maggiormente della *clearance* mucociliare (Pires et al. 2009): pertanto lipofilia/idrofilia delle molecole non possono essere considerate un valore assoluto nella capacità di assorbimento di farmaco dalle cavità nasali.

-pKa

Il passaggio dei farmaci nelle cellule e/o attraverso altre membrane avviene in funzione del pH dell'ambiente e della costante di dissociazione acida (pKa) del farmaco stesso; in accordo con la teoria di “ripartizione secondo pH”, e data la natura lipofila della membrana, il trasporto della frazione non ionizzata è favorito rispetto alla frazione ionizzata. I farmaci somministrati per via IN devono, pertanto, rimanere non ionizzati al pH nasale (5.5 – 6.5) e questo dipende dal pKa della molecola.

*1.3.2 Anatomia e fisiologia delle cavità nasali**-Flusso sanguigno*

Il flusso sanguigno influenza in maniera significativa l'assorbimento sistemico dei farmaci somministrati per via IN; come descritto, la lamina propria è caratterizzata da una elevata densità di vasi sanguigni la cui portata (costrizione/dilatazione) regola l'afflusso di sangue e il conseguente assorbimento IN (Pires et al. 2009; Kapoor et al. 2016b). Diversi autori hanno dimostrato che l'aggiunta di vasocostrittori, come la fenilefrina o efedrina, inibisce l'assorbimento per via IN mentre la presenza di vasodilatatori lo facilita (Kapoor et al. 2016b). Pertanto bisogna tener conto che fattori come temperatura, umidità, condizioni patologiche (che alterano

il flusso sanguigno delle cavità nasali) e stress possono influenzare l'assorbimento dei farmaci somministrati per questa via (Kapoor et al. 2016b).

-Clearance mucociliare

La *clearance* mucociliare (CMC) rappresenta il più importante meccanismo fisiologico di difesa delle vie aeree da polveri, corpi estranei e patogeni presenti nell'ambiente esterno. La mucosa nasale risulta rivestita da uno spesso strato di muco che intrappola tali agenti, i quali vengono poi trasportati dalle *cilia* verso il nasofaringe. La CMC influenza anche l'assorbimento dei farmaci somministrati per via IN, in particolare quello delle molecole polari, le quali sono più solubili nel muco mentre il loro passaggio attraverso le membrane biologiche risulta più lento. L'effetto della CMC sull'assorbimento dipende anche dal sito di deposizione dei farmaci poiché nella porzione posteriore delle cavità nasali i farmaci vengono più facilmente allontanati dalla CMC (Pires et al. 2009). È stato dimostrato che nella regione respiratoria vi è un *turnover* mucociliare di 15-20 minuti, mentre in quella olfattoria questo è di alcuni giorni (Kapoor et al. 2016b). L'impiego di spray nasali può favorire una deposizione della sostanza nella porzione più anteriore delle cavità nasali, rispetto alle gocce, andando a ridurre l'effetto della CMC sull'assorbimento dei farmaci (Pires et al. 2009).

-Degradazione enzimatica

All'interno delle cavità nasali, ed in particolare nel muco, sono presenti una grande varietà di enzimi in grado di degradare e metabolizzare i farmaci somministrati per via IN; pertanto, nonostante la via IN non risenta dell'effetto di primo passaggio epatico, bisogna tener conto di questo metabolismo locale, che Grassin-Delyle e Coll. (2012) definiscono "*nasal first-pass effect*". Nello specifico, enzimi come carbossilesterasi, aldeide deidrogenasi e glutatione-s-transferasi sono responsabili della degradazione dei farmaci depositati nelle cavità nasali. Inoltre, nelle cavità nasali è anche presente il citocromo P450 il quale è in grado di metabolizzare molecole quali cocaina, nicotina e progesterone somministrati per via IN (Kamble et al. 2013).

-Glicoproteina P

La glicoproteina P (Pgp) è una glicoproteina di membrana con azione protettiva, in grado di estrarre dal citoplasma sostanze penetrate nella cellula; è noto come tale glicoproteina svolga un ruolo rilevante nella barriera ematoencefalica limitando l'accesso dei farmaci nel SNC (Grassin-Delyle et al. 2012). La presenza della Pgp è stata descritta nella mucosa nasale dove sembrerebbe svolgere un ruolo nel limitare l'assorbimento attraverso questa via.

1.3.3 Formulazione dei farmaci

-Viscosità

Formulazioni molto viscosi dei farmaci possono aumentare l'assorbimento IN con due meccanismi: l'aumento della viscosità aumenta il tempo di contatto del farmaco con la mucosa nasale e, in secondo luogo, interferisce con la normale CMC rallentando il movimento delle *cilia* (Pires et al. 2009).

-pH

Un ruolo importante nell'assorbimento dei farmaci per via IN è dato dal pH dell'ambiente e dal pKa del farmaco; a questi va ad aggiungersi il pH della formulazione, in quanto modificando il pH è possibile modificare la percentuale di ionizzazione (Kamble et al. 2013). Le modificazioni del pH delle formulazioni da somministrare per via IN devono però tener conto dell'integrità della mucosa nasale al fine di evitare fenomeni di irritazione; in uno studio su ratti è stato dimostrato che soluzioni con pH compreso tra 3 e 10 determinano un ridotto rilascio di enzimi e proteine, mentre soluzioni con pH superiore a 10 ed inferiore a 3 risultano istotossiche (Pujara et al. 1995).

-Volume

Al fine di evitare la perdita di farmaco somministrato per via IN, a causa di deglutizione od espulsione dalle narici, bisogna tener conto delle dimensioni delle cavità nasali.

È stato riportato che nell'uomo il volume massimo di farmaco somministrabile nelle cavità nasali è di 150 µL per narice; tenuto conto di questo volume, della differente superficie delle cavità nasali per ogni specie e ammettendo una distribuzione uniforme in tutte le specie, Gizurarson (1990) ha ipotizzato che il volume massimo somministrabile per ogni narice in diverse specie è molto variabile, come sintetizzato nella tabella 1.1.

Tabella 1.1 Volume da somministrare per ottenere lo stesso volume per superficie studiata per l'uomo (tabella modificata da Gizurarson 1990)

Specie	Volume somministrabile per narice (µL)
Uomo	150
Cane	207
Cavia	25
Topo	3
Scimmia	58
Coniglio	58
Pecora	307

-Impiego di dispositivi di atomizzazione

I farmaci possono essere somministrati per via IN sia instillandoli in forma di gocce, sia spruzzandoli con l'ausilio di dispositivi di atomizzazione. Inoltre, l'assorbimento dei farmaci per questa via è fortemente correlato al diametro delle particelle; diversi studi nell'uomo e negli animali hanno dimostrato che i farmaci somministrati per via IN devono possedere un diametro tra i 10 e 100 µm: infatti particelle di diametro inferiore a 2 µm vengono convogliate dal flusso inspiratorio in trachea e nei polmoni, mentre

particelle troppo grandi tendono a confluire creando delle gocce successivamente espulse dalle cavità nasali, inficiando in entrambi i casi l'assorbimento del farmaco (Musulin et al. 2011).

I dispositivi di atomizzazione come il MAD (Mucosal Atomization Device, MAD 300, Wolfe Tory Medical Inc., USA) permettono di produrre particelle di diametro compreso tra i 30 e i 100 μm , che si depositano sulla mucosa nasale aumentando la superficie di distribuzione e pertanto favorendone l'assorbimento (Figura 1.6). L'atomizzazione, inoltre, consente al farmaco di depositarsi come un film di rivestimento sulla mucosa, contribuendo a diminuire la possibilità di espulsione del farmaco anche dopo eventuali starnuti (Musulin et al. 2011).



Figura 1.6 Dispositivo di atomizzazione MAD (immagine tratta dal video del sito: <http://www.lmaco.com/products/lma-mad-nasal>)

1.4 Tecniche per migliorare l'assorbimento per via intranasale

Nonostante l'elevata permeabilità della mucosa nasale, la biodisponibilità dei farmaci dopo somministrazione per via IN non è sempre elevata; questo, come precedentemente descritto, dipende da diversi fattori quali la solubilità dei farmaci, la degradazione enzimatica e la clearance mucociliare (Figura 1.2). Per aggirare questi ostacoli, nel corso degli anni, sono state sviluppate diverse strategie quali: i pro-farmaci, gli inibitori enzimatici, i promotori dell'assorbimento e le nuove formulazioni (Tabella 1.2).

Tabella 1.2 Fattori che influenzano l'assorbimento e possibili soluzioni. Immagine modificata da Pires et al. 2009

PROBLEMA	OBIETTIVO	SOLUZIONE
<i>Scarse caratteristiche fisico/chimiche del farmaco e/o della formulazione</i>	<i>Migliorare le caratteristiche</i>	<i>-Pro-farmaci -Cosolventi -Ciclodestrine -Eccipienti -Nuove formulazioni</i>
<i>Degradazione enzimatica</i>	<i>Ridurre l'affinità del farmaco con l'enzima Inibire gli enzimi Proteggere il farmaco dalla degradazione enzimatica</i>	<i>-Pro-farmaci -Inibitori enzimatici -Pro-farmaci -Cosolventi</i>
<i>Bassa permeabilità attraverso le membrane nasali</i>	<i>Aumentare la permeabilità e solubilità Modificare la membrana nasale Aumentare il tempo di contatto</i>	<i>-Pro-farmaci -Cosolventi -Promotori assorbimento -Mucoadisivi -Gelificanti</i>

1.4.1 Pro-farmaci

Con il termine “pro-farmaci” si designano quei composti che all'atto della somministrazione non posseggono un'intrinseca attività farmacologica ma, una volta penetrati nell'organismo subiscono una biotrasformazione, solitamente mediata da un enzima, che li attiva (Kapoor et al. 2016b). Come abbiamo accennato, i farmaci somministrati per via IN subiscono un

processo di degradazione all'interno delle cavità nasali strettamente dipendete dalle caratteristiche chimico fisiche della molecola. La scelta di creare pro-farmaci destinati alla via intranasale è dettata dalla necessità di aumentare la solubilità, il pKa e la stabilità rispetto alle molecole somministrate tal quali, così da migliorarne la permeabilità e la biodisponibilità (Kamble et al. 2013). Recenti studi hanno evidenziato che pro-farmaci idrosolubili delle benzodiazepine vengono rapidamente convertiti nel farmaco dai processi enzimatici di una proteasi derivata dall'*Aspergillus oryzae*, ottenendo diazepam e midazolam super-saturi in grado di attraversare le membrane circa 30 volte più velocemente dei corrispettivi composti saturi (Siegel et al. 2015; Kapoor et al. 2016a; Kapoor et al. 2016b).

Un'alternativa all'utilizzo dei pro-farmaci per aumentare la solubilità dei farmaci è rappresentata dai co-solventi; tra questi, i più utilizzati per le formulazioni IN sono il glicerolo, l'etanolo, il glicole propilenico e il glicole polietilenico (Pires et al. 2009). Studi clinici hanno però evidenziato un moderato dolore e poca tollerabilità correlata all'utilizzo di questi cosolventi, in particolare del glicofurolo (Kapoor et al. 2016b).

1.4.2 Inibitori enzimatici

La presenza di una "barriera enzimatica" all'interno delle cavità nasali e di un "*nasal first-pass effect*" rappresenta un ostacolo all'assorbimento dei farmaci somministrati per questa via. Come descritto in precedenza, nelle cavità nasali vi sono una grande varietà di enzimi contro i quali sono stati studiati diversi approcci al fine di ridurre la degradazione enzimatica, quali gli inibitori delle proteasi e delle peptidasi. È stato dimostrato che l'utilizzo di inibitori enzimatici aumenti l'assorbimento per via IN di diverse molecole quali gli ormoni vasopressina e desmopressina (Grassin-Delyle et al. 2012); nonostante ciò, in relazione al loro meccanismo, gli inibitori enzimatici non sono in grado, da soli, di garantire un significativo aumento dell'assorbimento dei principi attivi, e quindi della biodisponibilità totale dei farmaci, pertanto vengono solitamente associati a promotori dell'assorbimento (Grassin-Delyle et al. 2012). Inoltre, è evidente che alcuni promotori dell'assorbimento come il diossido etilendiamminotetraacetico (EDTA) riducano la degradazione enzimatica di alcuni peptidi utilizzati per il trattamento dell'Alzheimer (Pires et al. 2009).

1.4.3 Promotori dell'assorbimento

La difficoltà delle molecole idrofile di attraversare la mucosa nasale determina una riduzione della loro biodisponibilità quando esse vengono somministrate per via IN. Per migliorare l'assorbimento dei farmaci idrofili, così come dei peptidi, delle proteine e dei polisaccaridi che non superano agevolmente la membrana nasale, sono stati sviluppati un gran numero di promotori dell'assorbimento (Casettari & Illum 2014). Ad oggi non è ancora completamente chiarito come i promotori dell'assorbimento riescano a modificare temporaneamente la permeabilità delle cellule epiteliali modificando il doppio strato fosfolipidico, determinando un aumento della fluidità della membrana o un'apertura delle giunzioni serrate cellulari; tuttavia, questi meccanismi sono in grado di provocare un aumento del trasporto paracellulare (Pires et al. 2009). Idealmente, un promotore dell'assorbimento deve garantire un rapido, transitorio e reversibile aumento della capacità di assorbimento, senza arrecare danni alla mucosa e senza permettere che sostanze tossiche possano attraversarla (Grassin-Delyle et al. 2012).

Ad oggi sono stati sviluppati diversi tipi di promotori dell'assorbimento tra questi maggiormente utilizzati sono il chitosano, le ciclodestrine e i mucoadesivi.

-Chitosano

Il chitosano è un polisaccaride derivato dalla parziale deacetilazione della chitina proveniente dal guscio dei crostacei (Casettari & Illum 2014). Il chitosano è ampiamente utilizzato come promotore dell'assorbimento per le formulazioni intranasali poiché si caratterizza per un'elevata biodegradabilità, biocompatibilità e ottime proprietà bioadesive (Pires et al. 2009; Kamble et al. 2013). Il chitosano è considerato un adiuvante sicuro e non nocivo, al punto che in molti paesi, compresa l'Italia, il suo impiego è stato approvato nella formulazione di farmaci, integratori e perfino come additivo di alcuni prodotti alimentari. Nella formulazione di preparati per via IN, inoltre, è stato dimostrato che il chitosano non determina irritazione locale o tossicità sistemica (Casettari & Illum 2014). Il chitosano aumenta l'assorbimento dei farmaci somministrati per via IN attraverso due diversi meccanismi: in primo luogo esso è fortemente mucoadesivo, grazie all'alta densità di cariche positive della molecola che aderiscono fortemente ai siti negativi presenti sulla membrana nasale (Illum et al. 2002) permettendo alle

molecole di persistere sulla mucosa nasale per un tempo prolungato; in secondo luogo il chitosano riesce ad aprire temporaneamente le giunzioni serrate cellulari favorendo il passaggio di molecole idrofile attraverso le membrane (Casettari & Illum 2014). Diversi studi hanno dimostrato l'efficacia clinica e l'aumento della biodisponibilità di diversi farmaci, tra i quali insulina e morfina, in associazione al chitosano in svariate formulazioni farmaceutiche (soluzioni, microsfe, macrosfe, nanoparticelle e idrogeli) (Casettari & Illum 2014). In particolare, Illum e Coll. (2002) hanno riportato che la somministrazione di morfina in soluzione con il chitosano migliora la biodisponibilità del farmaco di circa tre volte nelle pecore con una riduzione del T_{max} di 14 minuti. Nello stesso studio, Illum e Coll. descrivono che, nell'uomo, la somministrazione IN di diverse formulazioni di morfina contenenti chitosano determina una rapidità d'azione ed un profilo plasmatico sovrapponibile a quello ottenuto per via endovenosa (Illum et al. 2002).

-Ciclodestrine

Le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici naturali formati da 6 a 8 monomeri di D-glucopiranosio uniti da un legame α -(1,4). Esse sono caratterizzate da una struttura cava centrale idrofobica e da una superficie esterna idrofila; questa particolare struttura permette alle ciclodestrine di intrappolare nella loro cavità centrale molecole idrofobe pur essendo idrosolubili (Kapoor et al. 2016b). Esistono tre tipi di ciclodestrine differenti per numero di monomeri, peso molecolare e solubilità, che vengono distinte in ciclodestrina α , β e γ .

Le ciclodestrine sono usate per migliorare l'assorbimento per via IN di alcuni farmaci lipofili e di oligopetidi (Merkus et al. 1999) al fine di aumentarne la stabilità e la solubilità; inoltre esse si comportano da promotori dell'assorbimento, interagendo con la componente lipofila delle membrane e alterandone la permeabilità (Pires et al. 2009).

L'impiego delle ciclodestrine, in particolare della β -ciclodestrina, determina un notevole incremento dell'assorbimento per via IN di molecole lipofile e di oligopetidi; tuttavia è importante sottolineare che esistono delle differenze di specie nell'efficacia delle ciclodestrine come promotori dell'assorbimento (Merkus et al. 1999). In particolare è stato riportato che la biodisponibilità dopo somministrazione IN di insulina in formulazione liquida con β -ciclodestrina risulti del 100% nei ratti e dello 0% in conigli e

nell'uomo; mentre nella formulazione in polvere la biodisponibilità dell'insulina per via IN risulta del 13% nei conigli e di circa il 5% nell'uomo (Merkus et al. 1999); tali differenze possono tuttavia essere correlate anche alla formulazione, alle differenze anatomiche e alla clearance mucociliare (Merkus et al. 1999).

Infine è rilevante sottolineare che la somministrazione IN di β -ciclodestrine è una pratica innocua e che i suoi effetti sono sovrapponibili a quelli seguenti la somministrazione di soluzione fisiologica (Merkus et al. 1999).

-Mucoadesivi

La clearance mucociliare rappresenta, come detto in precedenza, un'importante limitazione all'assorbimento dei farmaci per via IN poiché essa riduce il tempo di contatto del farmaco con la mucosa nasale; l'impiego di sostanze mucoadesive permette di aumentare il tempo di contatto del farmaco con la mucosa migliorandone la biodisponibilità (Pires et al. 2009). Per favorire la mucoadesione è necessario che il polimero bioadesivo si idrati, assorbendo acqua dal muco presente sulle mucose nasali; il grado di idratazione del polimero gioca un ruolo chiave nella mucoadesione poiché, se non adeguatamente idratato esso non riesce a legarsi efficacemente alla mucosa, mentre se l'idratazione è eccessiva il suo legame con la mucosa risulta debole (Ugwoke et al. 2005).

Alcuni mucoadesivi, come il chitosano e l'acido poliacrilico hanno, oltre alle proprietà mucoadesive, anche un'attività di inibizione enzimatica (Ugwoke et al. 2005).

Nell'uomo sono state studiate diverse formulazioni di fentanil per somministrazione IN contenenti mucoadesivi come il chitosano, il chitosan-poloxamer 188 o la pectina (Grassin-Delyle et al. 2012); inoltre, oggi, è disponibile sul mercato italiano una formulazione mucoadesiva di fentanil IN realizzata con l'aggiunta di pectina, commercializzata col nome Pecfent[®] (Fentanil citrato, Molteni & C. F.lli Alitti Spa, Milano, Italia).

1.4.4 Nuove strategie nelle formulazioni intranasali

Per migliorare l'assorbimento dei farmaci attraverso la mucosa nasale sono state sviluppate negli ultimi anni nuove strategie farmaceutiche che impiegano liposomi, microsfele e nanoparticelle.

-Liposomi

Per liposomi si intendono delle vescicole fosfolipidiche caratterizzate dalla presenza di un doppio strato lipidico separato da compartimenti acquosi, all'interno dei quali possono essere racchiusi principi terapeutici (Pires et al. 2009). Per la loro natura i liposomi sono considerati non-tossici, biocompatibili e biodegradabili; essi si caratterizzano per la capacità di trasportare molecole idrofile, lipofile e anfotere (Alam et al. 2010).

È stato dimostrato che i liposomi sono in grado di aumentare la persistenza sulla mucosa nasale di diversi peptidi, come l'insulina, di proteggere i peptidi contenuti al loro interno dalla degradazione enzimatica e di interrompere la continuità della mucosa, aumentando l'assorbimento delle molecole somministrate per via IN (Pires et al. 2009).

-Microsfere

L'impiego delle microsfere nella formulazione di preparati per via IN sta avendo un largo sviluppo negli ultimi anni poiché esse sono in grado di aumentare la persistenza delle molecole sulla mucosa nasale, favorendo l'assorbimento e la biodisponibilità dei farmaci (Kamble et al. 2013). L'aumento dell'assorbimento dei farmaci è dovuto all'azione delle microsfere che, assorbendo parte dell'acqua presente, disidratano la mucosa nasale, determinando così una temporanea separazione delle giunzioni serrate cellulari e favorendo trasporto dei farmaci attraverso la mucosa nasale (Kamble et al. 2013).

-Nanoparticelle

Le nanoparticelle sono particelle colloidali solide con diametro compreso tra 1-1000 nm, impiegate da anni per il trasporto dei farmaci attraverso le mucose nasali (Pires et al. 2009). L'elevata efficacia delle nanoparticelle può essere attribuita ai diversi meccanismi d'azione, grazie ai quali determinano un'alta concentrazione di farmaci nel cervello; le nanoparticelle, infatti, sembrano aumentare l'assorbimento delle molecole proteggendole dalla degradazione enzimatica e inibendo le Pgp (Alam et al. 2010).

1.5 La via intranasale negli animali

Per le caratteristiche sopra descritte e per la condizione macrosomatica di molte specie animali, la via IN sta destando un interesse crescente in medicina veterinaria, dove essa trova impiego anche in campo anestesilogico garantendo risultati vantaggiosi ai fini della sedazione, dell'analgesia e del trattamento delle crisi convulsive.

I primi studi sulla via intranasale negli animali erano di tipo traslazionale destinati a studi preclinici e al potenziale impiego di tale via per la somministrazione di farmaci e vaccini (Gizurason 1990). Negli ultimi anni invece, sono stati pubblicati diversi studi sull'impiego della via intranasale in ambito clinico, sia in animali da compagnia che in specie non convenzionali e selvatiche; molte specie animali sono, infatti, candidate ideali per questa via di somministrazione, grazie ad una mucosa nasale 10 volte più sviluppata di quella dell'uomo (Micieli et al. 2016).

Gli studi clinici negli animali riguardano prevalentemente la sedazione nel gatto, in diversi ordini di uccelli, nelle tartarughe, nei leporidi e nei maiali (Axiak et al. 2007; Schnellbacher et al. 2012; Marjani et al. 2015; Santangelo et al. 2016b; Yanmaz et al. 2016). Gli studi nel cane sono, invece, limitati al trattamento delle crisi convulsive (Musulin et al. 2011; Eagleson et al. 2012), mentre quelli negli animali selvatici sono focalizzati sulla riduzione dello stress da cattura (Cattet et al. 2004).

1.5.1 La via IN per la sedazione negli animali

La via IN offre innumerevoli vantaggi in termini di facilità di esecuzione, ridotta invasività, riduzione dello stress e del dolore della somministrazione per via iniettiva e rapidità di d'azione, come dimostrato da diversi studi nell'uomo e nei bambini. Per tali motivi diversi autori hanno voluto indagare l'efficacia di questa nuova e poco invasiva tecnica di somministrazione di farmaci per la sedazione di diverse specie animali.

- *Gatti*

Nel gatto la sedazione è, in genere, ottenuta mediante la somministrazione di anestetici per via IM; tale scelta è di frequente imposta dal temperamento di questi animali e dalla loro intolleranza per le manovre di contenimento e di cateterismo venoso. Inoltre, la somministrazione di sostanze irritanti per

via IM induce nei felini stress, vocalizzazioni e reazioni comportamentali di notevole entità (Marjani et al. 2015; Yanmaz et al. 2016). Su tali basi, la scelta della via IN, rappresenta nei gatti un'alternativa meno stressante e invasiva, ma di efficacia clinica paragonabile all'iniezione intramuscolare (Marjani et al. 2015).

In un recente studio clinico, Marjani e Coll. (2015) hanno paragonato gli effetti sedativi dell'associazione di ketamina (14 mg/kg) e midazolam (0.5 mg/kg) somministrata per via IN o per via IM nel gatto. Gli autori hanno dimostrato l'assenza di differenze statisticamente significative tra i due gruppi trattati, nei valori di frequenza cardiaca (HR), frequenza respiratoria (RR), saturazione dell'ossigeno nel sangue (SpO₂) e latenza della sedazione; nonostante il livello di sedazione risultasse sovrapponibile, il gruppo trattato per via IN presentava un risveglio più rapido rispetto a quello trattato per via IM (Marjani et al. 2015). In uno studio analogo, Yanmaz e Coll. (2016) hanno ottenuto risultati paragonabili a quelli di Marjani e Coll. (2015) dopo somministrazione di 10 mg/kg dell'associazione tiletamina-zolazepam (Zoletil) in due gruppi di gatti trattati rispettivamente per via IN e per via IM; anche in questo studio non si sono riscontrate differenze statisticamente significative tra i due gruppi riguardo i parametri vitali, i valori di pressione intraoculare e il livello di sedazione, ma si è verificato un risveglio più rapido nel gruppo IN rispetto al gruppo IM (Yanmaz et al. 2016). Secondo Yanmaz e Coll. il più rapido risveglio è verosimilmente da correlare ad un più veloce assorbimento dei farmaci somministrati per via IN dovuto all'importante vascolarizzazione della mucosa nasale (Yanmaz et al. 2016). I suddetti studi dimostrano che nel gatto la via IN rappresenta una valida alternativa alla somministrazione IM, in quanto riduce lo stress e i vocalismi, garantendo gli stessi effetti clinici e sedativi della più comune via intramuscolare.

-Suini

Per ridurre lo stress e il dolore legato alla castrazione dei suinetti sono stati proposti negli anni diversi protocolli anestesiológicos; in particolare Axiak e Coll. (2007) hanno valutato l'efficacia clinica della somministrazione IN di ketamina (15 mg/kg), climaxolam (1.5 mg/kg) e azaperone (1 mg/kg) confrontandola alla via IM. Da questo studio si è evidenziato come la somministrazione IN dei tre farmaci abbia determinato un risveglio più rapido rispetto alla via IM e un minore discomfort alla castrazione (Axiak et al. 2007). Per la sedazione dei suinetti è stato descritto anche il midazolam

a 0.2 o 0.4 mg/kg per via IN (Lacoste et al. 2000). La somministrazione IN di midazolam ha dimostrato un'efficacia clinica nella qualità della tranquillizzazione dei suinetti con un tempo di latenza più breve rispetto a quanto riportato nei bambini (3/6 min vs 5/13.5) (Lacoste et al. 2000).

- *Uccelli*

Gli uccelli rappresentano la classe animale in cui l'impiego clinico della via IN è stato maggiormente studiato negli ultimi anni.

Negli uccelli la sedazione risulta spesso indispensabile anche per banali procedure di contenimento o di tipo clinico, di entità e durata limitate. Considerata la difficoltà della somministrazione endovenosa, le vie di scelta sono quelle sottocutanea ed intramuscolare.

La somministrazione IM di agenti anestetici viene abitualmente effettuata nei muscoli pettorali ma a volte, negli uccelli in cattività, le masse muscolari sono ridotte, condizione che aumenta il rischio di somministrazione accidentale endovenosa o intracelomatica (Harrison 1986; Vesal & Zare 2006). Inoltre, bisogna tenere in considerazione i potenziali rischi di danno ai nervi periferici e il dolore legato alla somministrazione IM di agenti potenzialmente irritanti (Vesal & Zare 2006).

La via IN, con le sue peculiarità di somministrazione, rappresenta un'eccellente alternativa alle comuni vie parenterali nei volatili e per questo motivo, nel corso degli ultimi anni, sono stati effettuati diversi studi concernenti la sedazione IN di svariati ordini di uccelli quali i passeriformi, gli psittaciformi e i columbidi, impiegando alcune classi di farmaci quali le benzodiazepine e gli α_2 -agonisti (Vesal & Zare 2006; Mans et al. 2012; Hornak et al. 2015).

Nei passeriformi, e in particolare nei canarini, la via IN costituisce una valida alternativa alle altre vie di somministrazione; infatti, grazie alla sua agevole esecuzione, effettuata con l'ausilio di una micropipetta, essa è ben tollerata anche in uccelli di ridotte dimensioni (Figura 1.7) (Vesal & Zare 2006; Bigham & Zamani Moghaddam 2013).

Nei canarini, la somministrazione IN di benzodiazepine quali il diazepam (12.5 – 15.6 mg/kg) e il midazolam (12.5 – 15.6 mg/kg) produce un'adeguata sedazione con una latenza di soli 1-2 minuti; la durata della sedazione risulta maggiore dopo somministrazione di diazepam rispetto al midazolam (Vesal & Zare 2006).

La somministrazione di α_2 -agonisti come xilazina (24-30 mg/kg) e detomidina (12-15 mg/kg) invece, determina una sedazione non adeguata

alle comuni manovre cliniche, sebbene mostri una durata significativamente maggiore (Vesal & Zare 2006). Risultati simili sono stati ottenuti anche in diamanti mandarini sedati con xilazina (27 ± 2.8 mg/kg), midazolam (13 ± 1 mg/kg) o diazepam (13 ± 1 mg/kg) per via IN (Bigham & Zamani Moghaddam 2013).



Figura 1.7 Somministrazione IN in un canarino (Vesal & Zare 2006)

Anche in questa specie di passeriformi, la sedazione prodotta dalla xilazina somministrata per via IN non risultava adeguata alle comuni manovre cliniche, e di durata maggiore rispetto a quella prodotta dalle benzodiazepine; sono stati inoltre riportati, dopo somministrazione di xilazina, episodi di convulsioni. Al contrario, la somministrazione di benzodiazepine per via IN determinava una soddisfacente sedazione, con una latenza di soli 1-2 minuti (Bigham & Zamani Moghaddam 2013).

In questi animali, inoltre, è stato dimostrato che l'impiego degli antagonisti flumazenil e yohimbina risulta efficace anche dopo somministrazione IN (Vesal & Zare 2006).

Anche negli psittaciformi, la via IN è stata esplorata per verificare gli effetti di midazolam, xilazina, detomidina e ketamina; i risultati sono sovrapponibili a quanto riportato per i passeriformi (Vesal & Eskandari 2006; Schaffer et al. 2016). In particolare, l'aggiunta di ketamina al

midazolam per via IN garantisce un'adeguata sedazione e analgesia nei parrocchetti dal collare (Vesal & Eskandari 2006).

Nonostante è stata riscontrata una sedazione non sufficiente dopo somministrazione IN di α_2 -agonisti in diversi ordini di uccelli, Hornak e Coll. (2015) hanno dimostrato nei columbiformi che l'aggiunta di dexmedetomidina (0.08 mg/kg) al midazolam (5 mg/kg), dopo somministrazione IN, determina una sedazione più profonda rispetto al midazolam somministrato da solo (Hornak et al. 2015).

In soggetti facilmente stressabili e particolarmente sensibili al contenimento fisico come gli uccelli, l'impiego del midazolam IN è capace di produrre una riduzione delle risposte fisiologiche allo stress (legato al contenimento e alle manipolazioni), quali l'aumento della frequenza respiratoria e della temperatura cloacale (Mans et al. 2012).

-Leporidi

I leporidi, ed in particolare i conigli, sono stati spesso utilizzati come modelli sperimentali in diversi studi preclinici (Gizurarson 1990).

In ambito clinico, la somministrazione IN di anestetici ed analgesici nel coniglio ha suscitato nel corso degli anni grande interesse; questa specie si caratterizza, infatti, per una mortalità peri-anestetica significativamente maggiore (1.39%) rispetto ai cani (0.17%) ed ai gatti (0.24%), pertanto, lo sviluppo di protocolli e tecniche anestetiche alternative a quelle tradizionali costituisce una sfida in continua evoluzione (Weiland et al. 2016).

Già nel 1994 Robertson ed Eberhart avevano indagato gli effetti di sei diversi protocolli di sedazione somministrati per via IN nel coniglio, riportando che la somministrazione IN di midazolam, alla dose di 2 mg/kg, è in grado di garantire una buona sedazione con una latenza di 3 minuti, senza determinare modificazioni nel tempo della frequenza cardiaca. Inoltre, se il midazolam veniva associato alla ketamina, la latenza era al di sotto di un minuto. Per ottenere livelli di sedazione e di analgesia adeguati al completamento di piccole procedure chirurgiche, gli autori suggerivano l'associazione xilazina - ketamina per via IN, poiché in grado di garantire una sedazione rapida (2 minuti), profonda e associata ad un'analgesia di 15-30 minuti (Robertson & Eberhart 1994).

Più di recente, in due studi condotti su conigli, presso l'università di Napoli, sono stati valutati gli effetti sedativi e cardiorespiratori dell'associazione anestetica "DMB" costituita da dexmedetomidina (0.1 mg/kg), midazolam (2 mg/kg) e butorfanolo (0.4 mg/kg), somministrata per via transnasale

(Santangelo et al. 2016b), nonché il comportamento farmacocinetico e farmacodinamico di tale associazione (Santangelo et al. 2016a). Tali studi hanno consentito di stabilire che la latenza della sedazione con l'associazione DMB per via transnasale (1.4 ± 1.1 min) è più breve di quella riportata per analoghe combinazioni di farmaci somministrate per via IM (Henke et al. 2005; Hedenqvist et al. 2013; Santangelo et al. 2016b). L'associazione DMB, inoltre, determina una profonda sedazione e una consistente analgesia accompagnate, come è abituale nei leporidi, da una marcata ipossia e ipotensione, entrambe ascrivibili agli effetti delle molecole e perciò indipendenti dalla via di somministrazione (Santangelo et al. 2016b).

Dalla valutazione delle concentrazioni plasmatiche nel coniglio si evince che la velocità di assorbimento delle tre molecole DMB dopo somministrazione transnasale è molto rapida, come dimostrato dalla T_{max} , che è pari a 6 ± 2.2 min per la dexmedetomidina, a 6 ± 2.2 min per il midazolam e a 10 ± 11.2 min per il butorfanolo (Santangelo et al. 2016a); tuttavia, le concentrazioni plasmatiche medie ottenute dopo somministrazione transnasale risultano essere più basse di quelle riportate per via IV in letteratura (Santangelo et al. 2016a). In particolare, le concentrazioni plasmatiche rilevate da Portnoy e Coll. dopo somministrazione IV di 0.5 mg/kg di butorfanolo risultano circa due volte più alte di quelle misurate nello studio per via transnasale (Portnoy & Hustead 1992; Santangelo et al. 2016a). In proposito, Raekallio e Coll. (2002) hanno segnalato che la somministrazione di 0.1 mg/kg IV del composto racemico medetomidina determinava concentrazioni plasmatiche circa tre volte maggiori di quelle misurate dopo somministrazione transnasale nel coniglio (Raekallio et al. 2002; Santangelo et al. 2016a).

Nonostante le concentrazioni plasmatiche risultassero minori per via IN, l'impiego di tale via di somministrazione determinava una sedazione profonda di lunga durata, protraendosi fino a 90 minuti. Tale effetto può essere spiegato almeno da due fattori: in primo luogo, l'associazione tra le tre molecole (DMB), che possiedono diversi meccanismi d'azione, si caratterizza per un potente sinergismo tra loro; in secondo luogo, il loro possibile passaggio assonale diretto al SNC, lungo i neuroni olfattori e la via trigeminale, potrebbe aver determinato concentrazioni di farmaco più elevate nel SNC, sottraendo una quota delle tre molecole al passaggio nel torrente circolatorio (Santangelo et al. 2016a).

La somministrazione IN di anestetici nei conigli sembra essere fortemente condizionata dalla posizione della testa; Weiland e Coll. (2016) hanno

riportato un aumento della mortalità, accompagnata da emorragie polmonari diffuse, in conigli in cui la somministrazione IN veniva effettuata in decubito dorsale, rispetto ai soggetti nei quali essa veniva effettuata in decubito sternale. Va detto che gli autori dello studio, ipotizzano, tra le possibili cause dei decessi osservati, anche fattori non legati direttamente alla posizione dei conigli durante la somministrazione intranasale. Lo stesso studio, inoltre, dimostra che le associazioni medetomidina-ketamina e medetomidina-S(+)-ketamina, somministrate per via IN nel coniglio, determinano un'adeguata sedazione e analgesia, con un tempo di latenza più breve rispetto a quanto riportato per le vie di somministrazione IM e SC (Weiland et al. 2016).

- Tartarughe

Il costante aumento della diffusione di specie non convenzionali come animali da compagnia richiede l'implementazione di nuovi protocolli anestesiológicos adeguati alla sedazione di questi animali. Nelle tartarughe risulta spesso difficile effettuare un completo esame clinico, prelevare campioni biologici e somministrare farmaci, data la loro attitudine a ritirarsi nel guscio (Schnellbacher et al. 2012).

Inoltre, nelle tartarughe acquatiche la sedazione è spesso difficoltosa a causa del metabolismo non sempre prevedibile e della variabilità della distribuzione degli anestetici dovuta al sistema portale-renale (Mosley 2005).

Schnellbacher e Coll. (2012) hanno valutato gli effetti sedativi di una combinazione di dexmedetomidina (0.2 mg/kg) e ketamina (10 mg/kg) somministrata per via IN in tartarughe dalle orecchie gialle (*trachemys scripta scripta*) mediante l'ausilio di una micropipetta (Figura 1. 8).

La somministrazione IN di tale combinazione determinava una sedazione idonea all'esecuzione di procedure diagnostiche minori, una latenza più breve rispetto ad altri studi condotti nelle tartarughe nei quali una simile miscela di dexmedetomidina e ketamina era somministrata per via IM; in tale studio non sono state riscontrate variazioni statisticamente significative della frequenza cardiaca e di quella respiratoria (Schnellbacher et al. 2012).



Figura 1. 8 Somministrazione IN di dexmedetomidina e ketamina in tartarughe (Schnellbacher et al. 2012).

1.5.2 Cattura degli animali selvatici

Nella cattura degli animali selvatici l'ausilio di fucili spara-reti (*net guns*) è oggi una tecnica ampiamente diffusa al fine di ridurre i rischi legati alla più classica teleanestesia. In seguito alla cattura con le reti, si possono verificare fenomeni di stress con depressione respiratoria, ipossia e aumento della temperatura. Al fine di ridurre lo stress da cattura e le sue temibili conseguenze, subito dopo la cattura vengono spesso somministrati IM bassi dosaggi di α_2 -agonisti per ottenere una leggera sedazione ed analgesia (Cattet et al. 2004). La necessità di ottenere una sedazione rapida per ridurre al minimo lo stress post-cattura ha condotto Cattet e Coll. (2004) ad ipotizzare che la somministrazione di xilazina (1.5 – 2 mg/kg) per via IN potesse determinare una rapida riduzione dello stress conseguente la cattura di cervi con fucili spara-reti. Tale studio ha in effetti confermato che la somministrazione di xilazina per via IN riduce lo stress da cattura, diminuendo le concentrazioni plasmatiche di cortisolo, creatinichinasi e γ -

glutamyltransferasi, e determinando un grado di sedazione sufficiente dopo solo un minuto dalla somministrazione IN (Cattet et al. 2004).

La via IN nelle specie selvatiche è stata, inoltre, utilizzata per antagonizzare gli effetti di carfentanil e medetomidina somministrati con dardi-siringe in cervi, mediante la somministrazione IN di atipamezolo e naltrexone, producendo effetti paragonabili alla via IM (Shury et al. 2010).

1.5.3 Trattamento delle crisi convulsive nel cane

Le convulsioni ricorrenti, quelle a grappolo, l'epilessia e lo *status epilepticus* rappresentano un'emergenza medica che necessita di un trattamento rapido per ridurre i rischi di complicanze quali traumi, danni neurologici e perfino la morte del paziente. La terapia sintomatica delle convulsioni è basata sulla somministrazione endovenosa di benzodiazepine che, se effettuata prima del termine della crisi, è in grado di determinarne l'arresto. Sebbene meno efficace e rapida, nei piccoli animali e nei bambini l'alternativa alla via EV è stata per anni la somministrazione rettale di diazepam. In questo contesto terapeutico la via IN per la somministrazione di benzodiazepine ha trovato largo sviluppo in medicina umana, specialmente nei pazienti non ospedalizzati nei quali la via endovenosa non è rapidamente accessibile.

Nel cane le crisi convulsive colpiscono lo 0.5 - 5.7% dei soggetti, non di rado con eziologia indefinita indicata come idiopatica, e nel 20–30% dei casi, nonostante la terapia, le crisi epilettiche non riescono ad essere controllate e nel tempo si sviluppano episodi di crisi epilettiche a grappolo o, in alcuni pazienti, può instaurarsi uno *status epilepticus* (Musulin et al. 2011).

Il trattamento delle convulsioni mediante somministrazione di una benzodiazepina per via IN costituisce un'attraente alternativa al trattamento convenzionale, perché attuabile a domicilio, o in qualsiasi altro contesto pubblico o privato, da familiari o da qualsiasi persona abile senza alcuna competenza medica; la manovra è rapida, atraumatica, scevra da rischi e altamente efficace.

Diversi studi nel cane hanno dimostrato che la biodisponibilità di midazolam o diazepam somministrati per via IN risulta maggiore rispetto a quella riportata per la via endorettale (Platt et al. 2000; Musulin et al. 2011; Eagleson et al. 2012). In particolare Platt e Coll. (2000) hanno documentato nel cane una biodisponibilità dell'80% dopo somministrazione IN di diazepam (0.5 mg/ml). Le concentrazioni plasmatiche efficaci per il

trattamento delle crisi convulsive nel cane sono state stimate pari a 300 ng/ml e tali concentrazioni si ottengono già dopo 5 minuti dalla somministrazione IN di diazepam (Musulin et al. 2011). Il rapido effetto clinico ottenuto dopo somministrazione IN rafforza la scelta di questa via come alternativa alla via rettale; nel cane, infatti, il T_{max} ottenuto dopo somministrazione IN di midazolam (0.2 mg/kg) risulta più breve rispetto alla somministrazione per via rettale (T_{max} IN 17.50 ± 2.64 min vs T_{max} rettale 39.00 ± 14.49 min) (Eagleson et al. 2012).

Dagli studi appena citati emerge anche che le concentrazioni plasmatiche ottenute mediante somministrazione IN di benzodiazepine nel cane risultano significativamente più basse rispetto alla via endovenosa, ma in tutti i casi adeguate al trattamento delle crisi convulsive. Le basse concentrazioni plasmatiche riscontrate dopo somministrazione IN di benzodiazepine possono essere spiegate dai meccanismi di trasporto diretto del farmaco nel SNC; tali supposizioni sono avvalorate dai risultati ottenuti in uno studio preclinico nel cane dove si evidenziano concentrazioni di midazolam più alte nel liquido cefalorachidiano rispetto a quelle riscontrate nel sangue periferico dopo somministrazione intranasale (Henry et al. 1998).

Per migliorare la deposizione e l'assorbimento delle benzodiazepine attraverso la via IN, anche nel cane risulta vantaggioso l'impiego di un atomizzatore (Henry et al. 1998; Musulin et al. 2011); infatti, le concentrazioni di midazolam nel liquido cefalorachidiano dieci minuti dopo la somministrazione IN risultano significativamente più alte con l'impiego di un atomizzatore rispetto all'instillazione diretta del midazolam nelle cavità nasali (Henry et al. 1998). Inoltre, circa la formulazione del midazolam, Eagleson e Coll. (2012) hanno dimostrato che la formulazione in gel ne favorisce l'assorbimento, aumentando la biodisponibilità e le concentrazioni plasmatiche del farmaco somministrato per via IN rispetto alla comune formulazione iniettabile.

- Alam MI, Beg S, Samad A et al. (2010) Strategy for effective brain drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 40, 385-403.
- Axiak SM, Jaggin N, Wenger S et al. (2007) Anaesthesia for castration of piglets: comparison between intranasal and intramuscular application of ketamine, clomazepam and azaperone. *Schweiz Arch Tierheilkd* 149, 395-402.
- Bigham AS, Zamani Moghaddam AK (2013) Finch (*Taeneopygia guttata*) sedation with intranasal administration of diazepam, midazolam or xylazine. *J Vet Pharmacol Ther* 36, 102-104.
- Casettari L, Illum L (2014) Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *J Control Release* 190, 189-200.
- Cattet MR, Caulkett NA, Wilson C et al. (2004) Intranasal administration of xylazine to reduce stress in elk captured by net gun. *J Wildl Dis* 40, 562-565.
- Costantino HR, Illum L, Brandt G et al. (2007) Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm* 337, 1-24.
- Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH, 2nd (2010) Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci* 99, 1654-1673.
- Eagleson JS, Platt SR, Strong DL et al. (2012) Bioavailability of a novel midazolam gel after intranasal administration in dogs. *Am J Vet Res* 73, 539-545.
- Gizurason S (1990) Animal models for intranasal drug delivery studies. A review article. *Acta Pharm Nord* 2, 105-122.
- Graff CL, Pollack GM (2005) Nasal drug administration: potential for targeted central nervous system delivery. *J Pharm Sci* 94, 1187-1195.
- Grassin-Delyle S, Buenestado A, Naline E et al. (2012) Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids. *Pharmacol Ther* 134, 366-379.
- Harrison G (1986) Anesthesiology. In: *Clinical Avian Medicine and Surgery*. Harrison G & Harrison L (eds). pp. 549 - 559.
- Hedenqvist P, Edner A, Fahlman A et al. (2013) Continuous intravenous anaesthesia with sufentanil and midazolam in medetomidine premedicated New Zealand White rabbits. *Bmc Veterinary Research* 9.
- Henke J, Astner S, Brill T et al. (2005) Comparative study of three intramuscular anaesthetic combinations (medetomidine/ketamine, medetomidine/fentanyl/midazolam and xylazine/ketamine) in rabbits. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 32, 261-270.

- Henry RJ, Ruano N, Casto D et al. (1998) A pharmacokinetic study of midazolam in dogs: nasal drop vs. atomizer administration. *Pediatr Dent* 20, 321-326.
- Hornak S, Liptak T, Ledecy V et al. (2015) A preliminary trial of the sedation induced by intranasal administration of midazolam alone or in combination with dexmedetomidine and reversal by atipamezole for a short-term immobilization in pigeons. *Vet Anaesth Analg* 42, 192-196.
- Illum L (2000) Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci* 11, 1-18.
- Illum L, Watts P, Fisher AN et al. (2002) Intranasal delivery of morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 391-400.
- Kamble M, Bhalerao K, Bhosale A et al. (2013) A Review on Nose-to-Brain Drug Delivery. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CHEMICAL SCIENCES* 2, 516 - 525.
- Kapoor M, Cheryala N, Rautiola D et al. (2016a) Chirally Pure Prodrugs and Their Converting Enzymes Lead to High Supersaturation and Rapid Transcellular Permeation of Benzodiazepines. *J Pharm Sci* 105, 2365-2371.
- Kapoor M, Cloyd JC, Siegel RA (2016b) A review of intranasal formulations for the treatment of seizure emergencies. *J Control Release* 237, 147-159.
- Kumar NN, Gautam M, Lochhead JJ et al. (2016) Relative vascular permeability and vascularity across different regions of the rat nasal mucosa: implications for nasal physiology and drug delivery. *Sci Rep* 6, 31732.
- Lacoste L, Bouquet S, Ingrand P et al. (2000) Intranasal midazolam in piglets: pharmacodynamics (0.2 vs 0.4 mg/kg) and pharmacokinetics (0.4 mg/kg) with bioavailability determination. *Lab Anim* 34, 29-35.
- Mans C, Guzman DS, Lahner LL et al. (2012) Sedation and physiologic response to manual restraint after intranasal administration of midazolam in Hispaniolan Amazon parrots (*Amazona ventralis*). *J Avian Med Surg* 26, 130-139.
- Marjani M, Akbarinejad V, Bagheri M (2015) Comparison of intranasal and intramuscular ketamine-midazolam combination in cats. *Vet Anaesth Analg* 42, 178-181.
- Merkus FW, Verhoef JC, Martin E et al. (1999) Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 36, 41-57.

- Micieli F, Napoleone G, Santangelo B et al. (2016) Intranasal anesthesia: a review of the veterinary literature. In: Proceedings of the 70° Congresso Nazionale SIAARTI|. Conference Location|. pp. Pages|.
- Mosley C (2005) Anesthesia and analgesia in reptiles. *Sem Avian Exotic Pet Med* 4, 243-262.
- Musulini SE, Mariani CL, Papich MG (2011) Diazepam pharmacokinetics after nasal drop and atomized nasal administration in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 34, 17-24.
- Pardeshi CV, Belgamwar VS (2013) Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opin Drug Del* 10, 957-972.
- Pires A, Fortuna A, Alves G et al. (2009) Intranasal drug delivery: how, why and what for? *J Pharm Pharm Sci* 12, 288-311.
- Platt SR, Randell SC, Scott KC et al. (2000) Comparison of plasma benzodiazepine concentrations following intranasal and intravenous administration of diazepam to dogs. *Am J Vet Res* 61, 651-654.
- Portnoy LG, Hustead DR (1992) Pharmacokinetics of butorphanol tartrate in rabbits. *Am J Vet Res* 53, 541-543.
- Pujara C, Shao Z, Duncan M et al. (1995) Effects of formulation variables on nasal epithelial cell integrity: Biochemical evaluations. *International Journal of Pharmaceutics* 114, 197 - 203.
- Raekallio M, Ansah OB, Kuusela E et al. (2002) Some factors influencing the level of clinical sedation induced by medetomidine in rabbits. *J Vet Pharmacol Ther* 25, 39-42.
- Robertson SA, Eberhart S (1994) Efficacy of the intranasal route for administration of anesthetic agents to adult rabbits. *Lab Anim Sci* 44, 159-165.
- Santangelo B, Micieli F, Marino F et al. (2016a) Plasma concentrations and sedative effects of a dexmedetomidine, midazolam, and butorphanol combination after transnasal administration in healthy rabbits. *J Vet Pharmacol Ther* 39, 408-411.
- Santangelo B, Micieli F, Mozzillo T et al. (2016b) Transnasal administration of a combination of dexmedetomidine, midazolam and butorphanol produces deep sedation in New Zealand White rabbits. *Vet Anaesth Analg* 43, 209-214.
- Schaffer DP, Raposo AC, Liborio FA et al. (2016) Intranasal administration of midazolam in blue-and-yellow macaws (*Ara araruana*): evaluation of sedative effects. *Vet Anaesth Analg* 43, 459-460.

- Schnellbacher R, Hernandez SM, Tuberville TD et al. (2012) The Efficacy of Intranasal Administration of Dexmedetomidine and Ketamine to Yellow-Bellied Sliders (*Trachemys scripta scripta*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 22, 91-98.
- Shury TK, Caulkett NA, Woodbury MR (2010) Intranasal naltrexone and atipamezole for reversal of white-tailed deer immobilized with carfentanil and medetomidine. *Can Vet J* 51, 501-505.
- Siegel RA, Kapoor M, Cheryala N et al. (2015) Water-soluble benzodiazepine prodrug/enzyme combinations for intranasal rescue therapies. *Epilepsy Behav* 49, 347-350.
- Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V et al. (2004) Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience* 127, 481-496.
- Ugwoke MI, Agu RU, Verbeke N et al. (2005) Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 1640-1665.
- Vesal N, Eskandari MH (2006) Sedative effects of midazolam and xylazine with or without ketamine and detomidine alone following intranasal administration in Ring-necked Parakeets. *J Am Vet Med Assoc* 228, 383-388.
- Vesal N, Zare P (2006) Clinical evaluation of intranasal benzodiazepines, alpha-agonists and their antagonists in canaries. *Vet Anaesth Analg* 33, 143-148.
- Walter BA, Valera VA, Takahashi S et al. (2006) The olfactory route for cerebrospinal fluid drainage into the peripheral lymphatic system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32, 388-396.
- Weiland LC, Kluge K, Kutter AP et al. (2016) Clinical evaluation of intranasal medetomidine-ketamine and medetomidine-S(+)-ketamine for induction of anaesthesia in rabbits in two centres with two different administration techniques. *Vet Anaesth Analg*.
- Yanmaz LE, Dogan E, Okur S et al. (2016) Comparison of the effects of intranasal and intramuscular administrations of zolazepam-tiletamine combination on intraocular pressure in cats. *Vet Ophthalmol* 19 Suppl 1, 115-118.

Capitolo 2

Gli α_2 -agonisti: Dexmedetomidina

In questo capitolo vengono discusse la distribuzione e le funzioni dei recettori α -adrenergici, il loro legame con gli α_2 -agonisti e gli effetti farmacocinetici e farmacodinamici della dexmedetomidina nel cane.

2.1 α_2 -AGONISTI

2.1.1 Brevi cenni storici

Gli α_2 -agonisti sono una classe di farmaci utilizzata da oltre mezzo secolo in medicina veterinaria. Inizialmente tali molecole vennero impiegate nel trattamento dell'ipertensione (clonidina) nell'uomo, ma dopo la sintesi della xilazina, nel 1962 in Germania, se ne apprezzarono gli effetti sedativi e deprimenti sul SNC. Tra la fine degli anni '60 e i primi anni '70, la xilazina fu introdotta sul mercato veterinario per le sue spiccate proprietà sedative, analgesiche e miorilassanti legate alla stimolazione dei recettori α_2 adrenergici (Greene & Thurmon 1988).

A partire dalla xilazina, sono state sintetizzate numerose altre molecole α_2 -agoniste, quali la detomidina, la romifidina, la medetomidina e la dexmedetomidina, con diversa selettività verso i recettori α_2 -adrenergici (Tabella 2.1), con struttura chimica e con farmacocinetica differente.

Tabella 2.1: Selettività per i recettori α -adrenergici dei comuni α_2 -agonisti.

AGONISTA	SELETTIVITA' α_2 : α_1
Xilazina	160:1
Detomidina	260:1
Romifidina	340:1
Medetomidina	1620:1
Dexmedetomidina	1620:1

2.1.2 Recettori adrenergici

I recettori adrenergici, classificati in α e β adrenergici, sono dei recettori di membrana, localizzati in vari distretti dell'organismo, che interagiscono con adrenalina, noradrenalina, dopamina ed altre catecolamine.

Il primo a suggerirne la classificazione in α e β adrenergici fu Raymond Ahlquist nel 1948 in seguito a studi sugli effetti di tre differenti catecolamine in diversi tessuti.

Successivamente, nel 1974 Langer suggerì l'esistenza di siti recettoriali localizzati a livello pre-sinaptico nei neuroni noradrenergici in grado di inibire il rilascio di noradrenalina con un meccanismo di feedback negativo; tali recettori, classificati come α_2 differiscono dai recettori α_1 , che sono localizzati a livello postsinaptico e sono responsabili della risposta dell'organo effettore (Clarke & Trim 2014) (Figura 2.1).

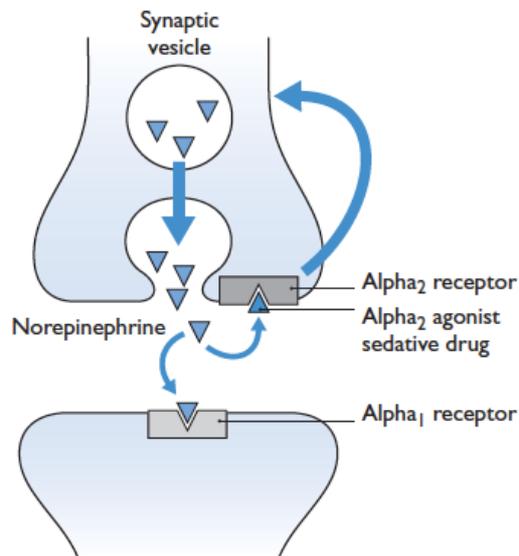


Figura 2.1 Rappresentazione del neurone noradrenergico nel SNC. (Clarke & Trim 2014)

Ad oggi è nota la presenza di recettori α_2 anche a livello post-sinaptico, rendendo la classificazione dei recettori α adrenergici molto più complessa; in particolare sono stati individuati diversi sottotipi recettoriali per i recettori

α -adrenergici quali: α_{1D} ; α_{1B} ; α_{1C} ; α_{2A} ; α_{2B} ; α_{2C} e α_{2D} e 9 sotto-sottotipi (Figura 2.2).

In particolare per quanto riguarda gli effetti dei singoli recettori α_2 , i recettori α_{2A} , localizzati nella corteccia cerebrale e nel tronco encefalico, sono responsabili della sedazione, dell'analgia sopra-spinale e degli effetti emodinamici mediati dalla stimolazione centrale (Rankin 2015). Tale sottotipo recettoriale è responsabile, inoltre, dell'inibizione del rilascio dell'insulina dalle cellule β delle isole pancreatiche (Gilsbach & Hein 2012). La stimolazione dei recettori α_{2B} determina analgesia spinale, vasocostrizione e bradicardia mediata da stimolazione periferica; tali recettori sono localizzati nel midollo spinale e nell'endotelio vascolare. I recettori α_{2C} , localizzati nel midollo spinale, modulano l'analgia spinale e la termoregolazione (Rankin 2015).

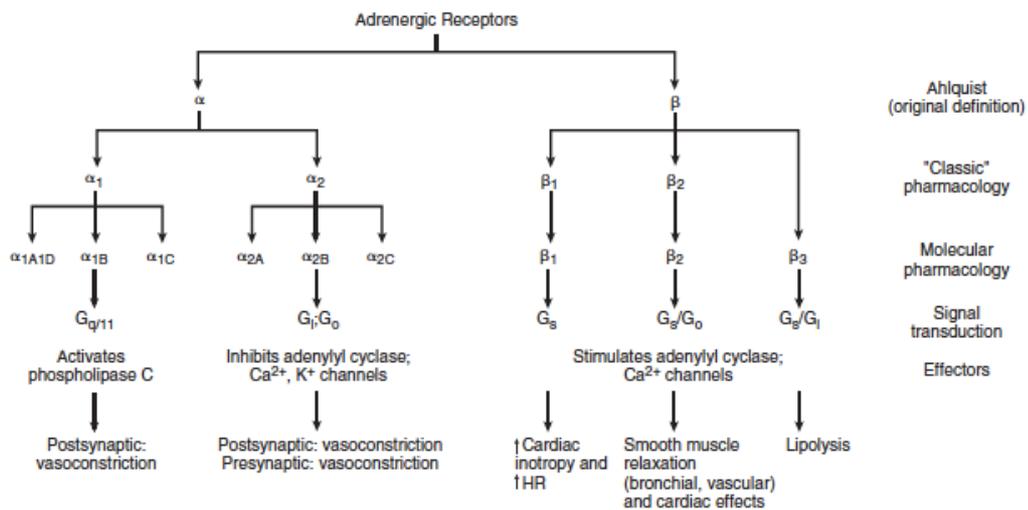


Figura 2.2 Classificazione dei recettori adrenergici. (Miller et al. 2015)

In relazione alla localizzazione e al tipo di neurotrasmettitore in grado di modularne la risposta, i recettori α_2 sono stati ulteriormente classificati in "autorecettori" ed "eterorecettori" (Figura 2.3).

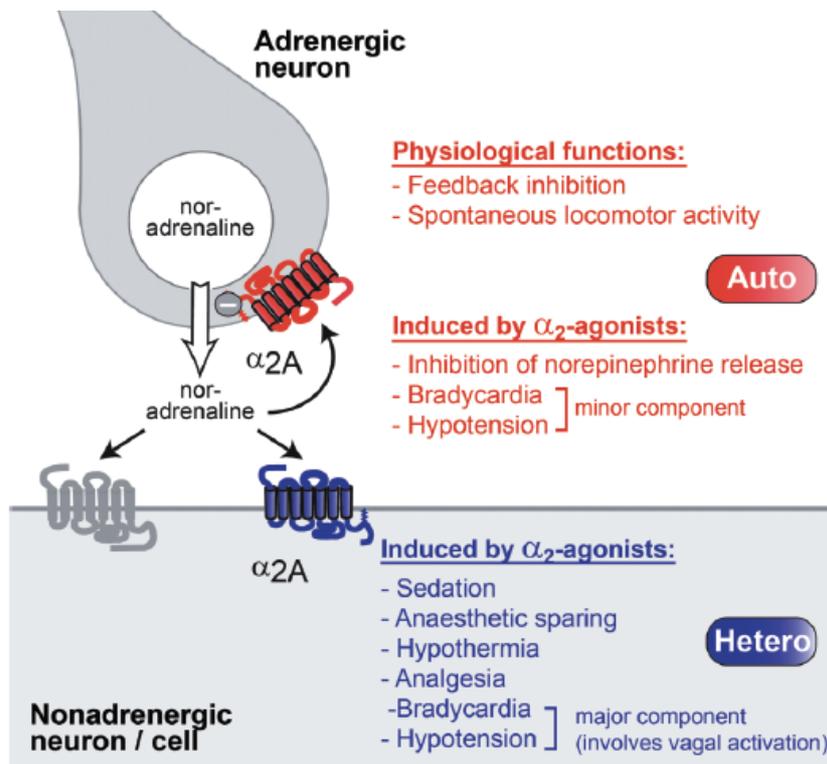


Figura 2.3 Schema sulle differenze funzionali tra etero e autorecettori α_{2A} . (Gilsbach & Hein 2012)

Nello specifico, con il termine “autocerettori” si identificano i recettori α_2 localizzati a livello della membrana presinaptica dei neuroni adrenergici, responsabili dell’inibizione, per fenomeni di *feedback negativo*, dell’esocitosi dei neurotrasmettitori quali adrenalina e noradrenalina (Gilsbach & Hein 2012); gli “eterorecettori”, invece, sono recettori presinaptici, localizzati su neuroni non-adrenergici nel sistema nervoso centrale e periferico, in grado di inibire il rilascio di molti neurotrasmettitori inclusi serotonina, dopamina e GABA (Gilsbach & Hein 2012). Gli eterorecettori α_2 hanno una forte influenza sugli effetti farmacologici degli α_2 -agonisti in quanto la loro attivazione determina analgesia, ipotermia, sedazione, bradicardia ed ipotensione (Figura 2.3); il loro ruolo fisiologico ad oggi non è ancora totalmente chiarito (Gilsbach & Hein 2012).

- *Stimolazione recettori adrenergici*

A seguito della stimolazione dei recettori adrenergici avviene la trasduzione del segnale all'interno della cellula e l'attivazione delle proteine G, le quali attivano la produzione o il rilascio del secondo messaggero intracellulare.

Ogni recettore adrenergico è collegato a diversi sottotipi di proteina G quali le proteine G_q (collegata ai recettori α_1), G_i (collegata ai recettori α_2), e G_s (collegata ai recettori β) la cui attivazione comporta: attivazione della fosfolipasi C (α_1), inibizione dell'adenilato ciclasi con conseguente diminuzione della sintesi di adenosina monofosfato ciclico (AMPC) (α_2), o stimolazione dell'adenilato ciclasi (β) (Miller et al. 2015).

L'attivazione dei recettori α_2 determina, inoltre, una regolazione dei canali ionici riducendo l'ingresso di Ca^{2+} nelle terminazioni nervose e promuovendo la fuoriuscita di K^+ con conseguente inibizione dell'eccitabilità neuronale (Figura 2.2).

2.1.3 Effetti degli agonisti dei recettori α -adrenergici

Come abbiamo visto, l'ampia distribuzione dei recettori α_2 determina una grande varietà di risposte che possono essere mediate dalla somministrazione di agonisti dei recettori α -adrenergici.

-*Sedazione*

L'azione sedativa degli α_2 -agonisti è determinata dall'attivazione dei recettori α_{2A} adrenergici localizzati nel *locus coeruleus* (LC).

In passato si riteneva che l'attivazione degli autorecettori α_{2A} posti nel *locus coeruleus* (LC) era responsabile della sedazione ma, successivamente, è stato dimostrato come gli effetti sedativi ed ipnotici degli α_2 -agonisti sono mediati dall'attivazione degli eterorecettori α_{2A} e non degli autorecettori α_{2A} ; è stato descritto, infatti, che la somministrazione di alte dosi di agonisti dei recettori α_2 adrenergici è in grado di determinare una profonda sedazione, caratterizzata dalla perdita del riflesso di raddrizzamento, in ratti con la sola attivazione degli eterorecettori α_{2A} (Gilsbach & Hein 2012). Più recentemente è stato dimostrato che la sedazione e la perdita del riflesso di raddrizzamento, indotte dagli α_2 agonisti, sono determinate dall'attivazione di diverse aree del cervello (Zhang et al. 2015). In particolare sembrerebbe che la sedazione indotta da basse dosi di dexmedetomidina non dipenda

dall'inibizione dei recettori presenti nel LC, che risultano essere responsabili della perdita del riflesso di raddrizzamento, ma bensì dall'attivazione dell'area ipotalamica preottica (Zhang et al. 2015).

L'attivazione recettoriale determina un'inibizione della liberazione di noradrenalina, acetilcolina, sostanza P, dopamina e serotonina con conseguente riduzione dell'attivazione neuronale, producendo così una sedazione simile al sonno.

L'inibizione del rilascio di noradrenalina a livello del LC influenza anche la riduzione del fabbisogno di farmaci anestetici; dopo somministrazione di romifidina e medetomidina si osserva infatti una riduzione del 60-75% della dose di propofol e tiopentale (Sinclair 2003). Gli α_2 -agonisti sono, inoltre, in grado di ridurre la concentrazione alveolare minima (MAC) di diversi alogenati; nel cane la somministrazione di xilazina (1.1 mg/kg) determina una riduzione della MAC dell'alotano del 39%, mentre medetomidina (0.03 mg/kg) e dexmedetomidina (0.01 mg/kg) riducono rispettivamente la MAC dell'isoflurano e dell'alotano del 47.2 % e del 90% (Sinclair 2003).

-Analgesia

Gli α_2 -agonisti mediano i loro effetti antinocicettivi stimolando i recettori situati in vari siti del midollo spinale e del cervello; il sottotipo recettoriale maggiormente coinvolto è l' α_{2A} ; una grande concentrazione di questi recettori è localizzata nelle corna dorsali del midollo spinale.

Gli α_2 -agonisti possono sopprimere il segnale nocicettivo in diversi punti della via del dolore (Figura 2.4): 1) inibendo il rilascio del neurotrasmettitore dalle fibre afferenti primarie ai neuroni di secondo ordine; 2) limitando la modulazione del segnale nocicettivo pre- e post-sinaptico, come dimostrato in studi elettrofisiologici (Sinclair 2003); 3) influenzando i sistemi modulatori discendenti o alterando la modulazione ascendente dei segnali nocicettivi nel diencefalo e nell'area limbica (Murrell & Hellebrekers 2005).

Nella modulazione del dolore si verifica un'interazione tra gli α_2 -adrenocettori e i recettori oppiacei localizzati nelle stesse aree del SNC, in particolare modo a livello della sostanza grigia periacqueduttale, che risulta essere responsabile della modulazione del dolore attraverso la sua influenza (grazie al rilascio dell'encefalina) sulla via discendente rafe-spinale.

Il legame degli α_2 -agonisti o degli oppioidi ai loro rispettivi recettori determina l'attivazione dello stesso segnale di trasduzione (proteina G e AMPc), che conduce ad una cascata di eventi culminanti nell'apertura dei

canali del K^+ delle membrane neuronali, con conseguente iperpolarizzazione della membrana e riduzione dell'eccitabilità, che rendono le cellule non responsive alla trasduzione del segnale nocicettivo (Sinclair 2003).

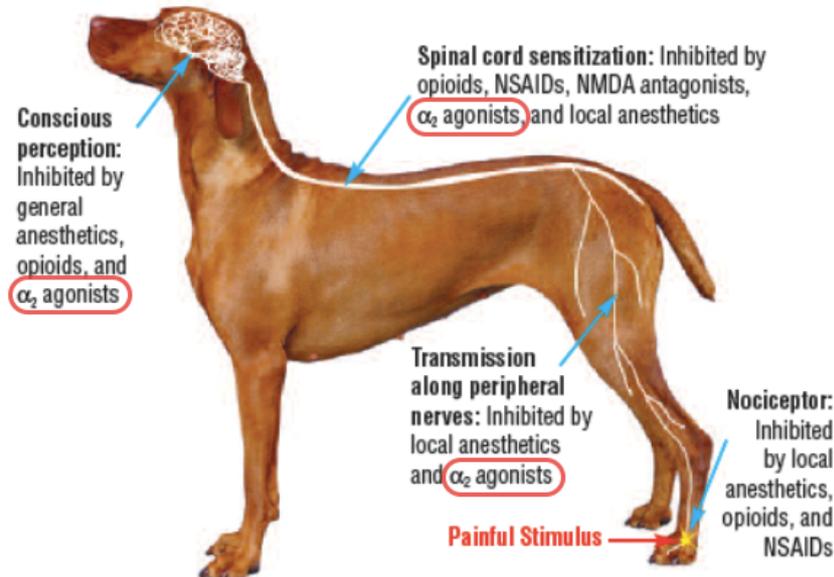


Figura 2.4 Effetti dei diversi farmaci sulle diverse vie del dolore, effetti degli α_2 -agonisti su trasmissione, modulazione e percezione del dolore (immagine modificata da www.vetfolio.com/.png)

Gli α_2 -agonisti, pertanto, sono in grado di produrre analgesia con meccanismi simili a quelli conosciuti per gli oppioidi μ -agonisti.

-Effetti cardiovascolari

I farmaci α_2 -agonisti alterano la funzionalità cardiovascolare attraverso stimolazione dei recettori α_2 -adrenergici centrali e periferici; gli effetti emodinamici di tali sostanze dipendono dalla diversa selettività delle diverse molecole verso i recettori α_2 -adrenergici, dalla dose somministrata, dalla via di somministrazione e dalle condizioni cliniche del soggetto.

Gli effetti negativi più rilevanti conseguenti la somministrazione di α_2 -agonisti includono: una severa bradicardia, spesso associata a bradiaritmie con blocchi atrioventricolari di I e II grado e un significativo aumento delle resistenze periferiche con conseguente riduzione dell'*output* cardiaco (CO) fino al 50% (Sinclair 2003). Tali effetti sono prevalentemente mediati dagli α_2 -eterorecettori localizzati nelle cellule non-adrenergiche (Gilsbach & Hein 2012) (Figura 2.3).

Gli effetti emodinamici degli α_2 -agonisti si caratterizzano per un andamento bifasico: nella prima fase si osserva una ipertensione prodotta dalla vasocostrizione periferica dipendente dall'attivazione dei recettori α_{2B} post-sinaptici localizzati nella muscolatura liscia vascolare; tale condizione induce un aumento del tono vagale con diminuzione della frequenza cardiaca (Murrell & Hellebrekers 2005). Nella seconda fase, invece, si verifica una moderata ipotensione, con scomparsa della vasocostrizione, mediata dall'attivazione dei recettori centrali $\alpha_{2A/D}$ e α_{2C} (Murrell & Hellebrekers 2005). La riduzione del tono nervoso simpatico determina, anche in questa seconda fase, una prolungata riduzione della frequenza cardiaca (Murrell & Hellebrekers 2005).

Vale la pena di ricordare che la regolazione centrale dell'omeostasi circolatoria e della pressione arteriosa avviene nelle aree ventromediali e rostro-ventrolaterali del midollo allungato. A questo livello arrivano fibre afferenti dalla carotide e dai barocettori aortici, strutture che costituiscono il nucleo del tratto solitario. Le alterazioni della pressione sanguigna vengono captate da queste componenti afferenti e ciò si traduce in un aumento o una diminuzione degli effetti mediati dal simpatico o dal parasimpatico, con l'obiettivo di mantenere l'omeostasi emodinamica (Ormas & Belloli 2009). La riduzione della pressione arteriosa è inoltre legata alla stimolazione di recettori α_2 presinaptici localizzati sulle vie facilitatorie del SNC e alla riduzione del tono simpatico mediato dall'attivazione di autorecettori presinaptici α_2 centrali e periferici (Ormas & Belloli 2009).

Gli effetti emodinamici degli α_2 -agonisti sono da considerarsi dose dipendenti: bassi dosaggi possono essere associati a maggiori effetti sul SNC, mentre dosaggi più alti determinano una maggiore stimolazione dei recettori α -adrenergici periferici responsabili della vasocostrizione (Pypendop & Verstegen 1998).

Anche la via di somministrazione gioca un ruolo importante nell'aumento delle resistenze periferiche; in particolare, l'iniziale ipertensione è maggiore quando gli α_2 -agonisti vengono somministrati per via IV rispetto a alla via IM (Sinclair 2003); in merito a ciò, Vanio & Palmu (1989) riscontrarono un

aumento del 26% della MAP dopo somministrazione di xilazina o medetomidina per via IV rispetto ad un aumento del 18% dopo somministrazione per via IM (Vainio & Palmu 1989). A tale proposito la somministrazione di α_2 -agonisti per via IN potrebbe rivelarsi vantaggiosa in quanto capace di ridurre gli effetti sistemici rispetto alle vie iniettive.

Nonostante l'andamento emodinamico bifasico descritto, nel cane non si osserva una significativa fase ipotensiva in seguito alla somministrazione di α_2 -agonisti per via endovenosa (Pypendop & Verstegen 1998; Kuusela et al. 2000; Murrell & Hellebrekers 2005); in merito a ciò Pypendop & Verstegen (1998) non hanno riscontrato pressioni arteriose medie inferiori a 60 mmHg in cani sedati con medetomidina a diversi dosaggi. Questo potrebbe essere determinato da una maggiore sensibilità dei cani agli effetti di vasocostrizione indotti dagli α_2 -agonisti, rispetto a quanto avviene nell'uomo dove l'ipotensione è il principale effetto emodinamico riportato (Murrell & Hellebrekers 2005).

Tra gli effetti emodinamici indotti alla somministrazione degli α_2 -agonisti si registra anche una marcata riduzione del CO (Pypendop & Verstegen 1998; Sinclair 2003), il cui meccanismo non è stato ancora completamente chiarito ed è oggetto di diverse ipotesi, quali: un effetto deprimente diretto sul miocardio, un aumento del post-carico, o un'ipossia miocardica conseguente la vasocostrizione coronarica (Murrell & Hellebrekers 2005).

-Effetti respiratori

In seguito alla somministrazione di α_2 -agonisti si verifica una depressione respiratoria caratterizzata da una riduzione della frequenza respiratoria secondaria alla stimolazione dei recettori α -adrenergici posti nel SNC e della conseguente sedazione.

Nonostante la suddetta depressione respiratoria, non sono stati riscontrate riduzioni della PaO₂ clinicamente rilevanti, dopo somministrazione di α_2 -agonisti in diverse specie animali (Sinclair 2003; Rankin 2015). Se usati in combinazione con altri agenti, quali oppioidi, anestetici inalatori o propofol, gli α_2 -agonisti possono, d'altro canto, contribuire alla comparsa di una depressione respiratoria accompagnata da acidosi e ipossiemia (Sinclair 2003).

-Effetti sull'apparato gastroenterico

È noto che gli α_2 -agonisti determinano una riduzione della motilità intestinale, aumentano il tempo di svuotamento gastrico e riducono la secrezione acida gastrica; tali effetti sono possibili poiché la funzionalità gastroenterica è fortemente dipendente dall'inibizione o dall'attivazione di α_2 -adrenorecettori localizzati a livello pre- e post-sinaptico. Inoltre, attivando recettori α_2 localizzati nella *chemoreceptor trigger zone* posta in prossimità del LC, gli α_2 -agonisti sono in grado di indurre vomito, come riportato nell' 8-20% dei cani e nel 90% dei gatti premedicati con medetomidina e nel 50% dei cani e nel 90% dei gatti premedicati con xilazina (Sinclair 2003).

-Effetti endocrini

Diversi studi hanno dimostrato che la somministrazione di α_2 -agonisti determina una riduzione dei livelli post-operatori degli ormoni dello stress attraverso la riduzione dell'attività simpatica e la caduta dei livelli di catecolamine circolanti.

Gli α_2 -agonisti, ed in particolar modo la xilazina, determinano, inoltre, un incremento delle concentrazioni sieriche di glucosio mediante inibizione del rilascio di insulina e/o stimolazione del rilascio di glucagone nelle cellule α e β pancreatiche; tale azione è dovuta alla stimolazione sia dei recettori α_1 - che α_2 -adrenergici (Sinclair 2003).

Altri effetti endocrini degli α_2 -agonisti sono rappresentati dalla inibizione del rilascio e/o della produzione dell'ormone antidiuretico (ADH) con conseguente aumento della produzione urinaria.

-Termoregolazione

In generale, dopo somministrazione di α_2 -agonisti, si osserva una riduzione della temperatura; tale effetto va ascritto alla depressione del SNC in combinazione con la riduzione dell'attività muscolare; ciò è da ascrivere prevalentemente all'inibizione dei sottotipi recettoriali α_{2A} e α_{2C} (Gilsbach & Hein 2012).

2.2 Dexmedetomidina

La dexmedetomidina (DEX) è il più recente, selettivo e specifico degli α_2 -agonisti attualmente in commercio, largamente impiegato per la sedazione, l'analgesia ed il contenimento di cani e gatti. È singolare che la DEX sia entrata prima nella farmacopea dell'uomo, concedendo per una volta ai pazienti animali di beneficiare dell'esperienza accumulata nella specie umana.

2.2.1 Proprietà fisico-chimiche

La denominazione chimica della dexmedetomidina cloridrato è: (S)-4-[1-(2,3-dimethylphenyl)ethyl]-1H-imidazole, la cui formula molecolare ($C_{13}H_{16}N_2 \times HCl$) è di seguito rappresentata (Figura 2.5).

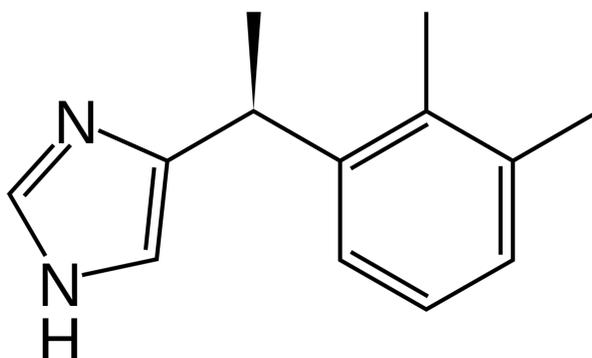


Figura 2.5 Formula molecolare della dexmedetomidina ($C_{13}H_{16}N_2 \times HCl$).

La DEX viene isolata come enantiometro (destrogiro) della molecola racemica medetomidina. Si tratta di una molecola facilmente solubile in acqua (LogP 2.8), con una costante di dissociazione acida (pKa) pari a 7.1 e peso molecolare pari a 200.285 g/mol (PubChem).

2.2.2 Farmacocinetica

La dexmedetomidina, come la maggioranza delle molecole anestetiche, è caratterizzata da un forte legame proteico; infatti nel plasma il 94% della DEX è legata alle proteine circolanti; inoltre la DEX mostra una rapida fase di distribuzione ed un rapido attraversamento della BEE e di quella placentare (Weerink et al. 2017).

Nel cane la farmacocinetica della DEX e del composto racemico medetomidina risultano essere molto simili; la somministrazione endovenosa di 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di medetomidina o di 10 o 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di DEX determina una sedazione profonda e un'adeguata analgesia, con un picco di effetto registrato dopo 10-20 minuti dalla somministrazione, caratterizzato, rispettivamente, da concentrazioni plasmatiche di 18.5 ± 4.7 ng/ml per la medetomidina e di 5.5 ± 1.3 ng/ml per i due dosaggi di DEX (Kuusela et al. 2000). L'emivita media della DEX nel cane è di 0.78 ± 0.23 h dopo somministrazione di 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IV e di 0.66 ± 0.18 h se somministrata a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IV (Kuusela et al. 2000).

Nell'uomo è descritto che la dexmedetomidina viene metabolizzata in larga parte dal fegato con un indice di estrazione epatica pari a 0.7; meno dell'1% della dose somministrata viene escreta tal-quala, il 95% viene escreto con le urine e il 4% con le feci, sotto forma di metaboliti, i quali risultano essere cento volte meno potenti verso il sito recettoriale e, pertanto, considerati inattivi (Weerink et al. 2017). Tali informazioni possono essere considerate indicative anche per il cane, anche se, a conferma di tale ipotesi, non vi sono studi specifici in letteratura veterinaria.

2.2.3 Farmacodinamica

La DEX è in grado di produrre sedazione ed analgesia analogamente a quanto riportato per gli altri α_2 -agonisti. Kuusela e Coll. (2000) hanno dimostrato che la somministrazione di 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di DEX per via endovenosa nel cane determina un grado di sedazione sovrapponibile per intensità, nonostante le differenti concentrazioni plasmatiche rispetto ai due dosaggi. Ciò suggerisce che la DEX abbia un "effetto tetto" oltre il quale l'aumento della dose non determinerebbe un approfondimento del grado di sedazione. Gli stessi autori hanno dimostrato che all'aumentare della dose corrispondeva un aumento della durata della sedazione; infatti, a 90 minuti

dalla somministrazione, i soggetti trattati con dosaggi più alti di DEX presentavano ancora una significativa sedazione rispetto a quelli trattati con DEX a dosaggi più bassi (Kuusela et al. 2000).

Come descritto per gli altri α_2 -agonisti, la DEX determina un significativo effetto risparmio sugli altri anestetici; in particolare 30 minuti dopo la somministrazione IV di 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di DEX è stata riportata una riduzione della MAC dell'isoflurano dell'88% nel cane (Rankini 2015). Anni prima, Pascoe e Coll. (2006) avevano riportato che un'infusione endovenosa continua (CRI) di DEX a 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ era in grado di ridurre la MAC dell'isoflurano del 18%, mentre con una CRI a 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ si otteneva una riduzione del 59% (Pascoe et al. 2006).

-Effetti cardiocircolatori e respiratori

Gli effetti della dexmedetomidina sull'apparato cardiocircolatorio, quali la riduzione della frequenza cardiaca, la riduzione del CO, l'aumento delle resistenze periferiche e l'andamento bifasico della pressione, sono simili a quelli riscontrati dopo somministrazione di medetomidina e di altri α_2 -agonisti (Rankin 2015).

Nel cane la DEX (10 o 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) determina una riduzione della frequenza cardiaca tra il 60 e il 66%, già cinque minuti dopo la sua somministrazione IV; in molti soggetti è possibile osservare la comparsa di arresto sinusale e blocchi atrio-ventricolari di I e II grado (Kuusela et al. 2000). La somministrazione di DEX per via endovenosa determina alterazioni della morfologia e delle dimensioni cardiache, conseguenti alla bradicardia e all'aumento del tempo di riempimento diastolico, accompagnati dalla comparsa di rigurgito valvolare di diversa entità (Wang et al. 2016). Se utilizzata in CRI, la DEX dimostra effetti cardiocircolatori dipendenti dalla velocità d'infusione, dalla dose del bolo di carico somministrata e dalla concomitante somministrazione di altri anestetici. In particolare, a bassi dosaggi (bolo di carico a 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e CRI a 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) i valori cardiocircolatori restano nei limiti di riferimento (Pascoe 2015).

Gli effetti sull'apparato respiratorio includono una riduzione della frequenza respiratoria e della pressione arteriosa di ossigeno (PaO_2), mentre la pressione arteriosa di anidride carbonica (PaCO_2) resta nei valori di riferimento dopo somministrazione di diversi dosaggi di DEX per via endovenosa nel cane (Kuusela et al. 2000).

- Clarke K, Trim C (2014) *Veterinary Anaesthesia*. (11th Edition edn).
- Gilsbach R, Hein L (2012) Are the pharmacology and physiology of alpha(2) adrenoceptors determined by alpha(2)-heteroreceptors and autoreceptors respectively? *Br J Pharmacol* 165, 90-102.
- Greene SA, Thurmon JC (1988) Xylazine - a Review of Its Pharmacology and Use in Veterinary-Medicine. *J Vet Pharmacol Ther* 11, 295-313.
- Kuusela E, Raekallio M, Anttila M et al. (2000) Clinical effects and pharmacokinetics of medetomidine and its enantiomers in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 23, 15-20.
- Miller DD, Eriksson LI, Fleisher LA et al. (2015) *Miller's Anesthesia*. (8th edn).
- Murrell JC, Hellebrekers LJ (2005) Medetomidine and dexmedetomidine: a review of cardiovascular effects and antinociceptive properties in the dog. *Vet Anaesth Analg* 32, 117-127.
- Ormas P, Belloli C (2009) Farmaci attivi sulla neurotrasmissione adrenergica. In: *Farmacologia Veterinaria*. Idelson-Gnocchi (ed). pp. 195-231.
- Pascoe PJ (2015) The cardiopulmonary effects of dexmedetomidine infusions in dogs during isoflurane anesthesia. *Vet Anaesth Analg* 42, 360-368.
- Pascoe PJ, Raekallio M, Kuusela E et al. (2006) Changes in the minimum alveolar concentration of isoflurane and some cardiopulmonary measurements during three continuous infusion rates of dexmedetomidine in dogs. *Vet Anaesth Analg* 33, 97-103.
- Pypendop BH, Verstegen JP (1998) Hemodynamic effects of medetomidine in the dog: a dose titration study. *Vet Surg* 27, 612-622.
- Rankin DC (2015) Sedatives and Tranquilizers. In: *Veterinary Anesthesia and Analgesia The Fifth Edition of Lumb and Jones*. (5th edn). Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, et al. (eds). pp. 196 - 206.
- Rankini D (2015) Sedative and Tranquilizers. In: *Veterinary Anesthesia and Analgesia the fifth edition of Lumb and Jones*. Blackwell (ed). pp. 196 - 206.
- Sinclair MD (2003) A review of the physiological effects of alpha(2)-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *Can Vet J* 44, 885-897.
- Vainio O, Palmu L (1989) Cardiovascular and respiratory effects of medetomidine in dogs and influence of anticholinergics. *Acta Vet Scand* 30, 401-408.

- Wang HC, Hung CT, Lee WM et al. (2016) Effects of Intravenous Dexmedetomidine on Cardiac Characteristics Measured Using Radiography and Echocardiography in Six Healthy Dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 57, 8-15.
- Weerink MA, Struys MM, Hannivoort LN et al. (2017) Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Dexmedetomidine. *Clin Pharmacokinet*.
- Zhang Z, Ferretti V, Guntan I et al. (2015) Neuronal ensembles sufficient for recovery sleep and the sedative actions of alpha2 adrenergic agonists. *Nat Neurosci* 18, 553-56.

Capitolo 3

Anatomia delle cavità nasali del cane: Il naso in una specie macrosmatica

Brevi cenni sull'anatomia delle cavità nasali del cane: narici, vestibolo, cavità nasali propriamente dette e mucosa nasale.

3.1 Anatomia delle cavità nasali del cane

Le cavità nasali sono due condotti, separati simmetricamente dal setto nasale, che si estendono in senso anteroposteriore nello splancnocranio. Esse si aprono all'esterno mediante un orifizio, la narice, e aboralmente si continuano con la faringe a livello delle coane. In ciascuna cavità nasale si identificano, procedendo in senso oro-aborale: la narice, il vestibolo e la cavità nasale propriamente detta (Pelagalli & Botte 2001).

3.1.1 Narici e vestibolo

Le narici sono due orifizi situati nella parte anteriore della faccia con estensione e forma variabile; queste vengono sostenute da un'impalcatura osseo cartilaginea costituita dalle cartilagini del setto, laterali e accessorie. La cartilagine del setto è una lamina quadrangolare impari e mediana che nella porzione caudale è in continuità con la lamina perpendicolare dell'etmoide, mentre ventralmente si articola al vomere (Pelagalli & Botte 2001). Dorsalmente, la cartilagine settale si salda all'osso frontale e alla sutura mediana delle ossa nasali continuandosi con le cartilagini laterali dorsali del naso, le quali si portano latero-ventralmente fino ad occupare l'angolo nasoincisivo (Barone 2004).

Meno sviluppate delle dorsali, le cartilagini ventrali, originano dal margine inferiore della cartilagine del setto e sono in rapporto con il processo nasale dell'incisivo fornendo sostegno alle pareti dorsale e laterale delle cavità nasali. Le cartilagini accessorie vanno a rinforzare medialmente la plica alare, collegandosi aboralmente con il cornetto inferiore, mentre lateralmente sono comprese nel margine ventrolaterale della narice (Pelagalli & Botte 2001) (Figura 3.6).

Tra le narici e le cavità nasali propriamente dette, procedendo in senso oro-aborale, si sviluppa un breve canale, il vestibolo, dalla cui parete laterale si solleva la plica alare che sporge nel lume del vestibolo stesso. Nel vestibolo il rivestimento cutaneo, inizialmente rappresentato da epitelio pavimentoso stratificato, si trasforma progressivamente in mucosa respiratoria, procedendo verso la cavità nasale propriamente detta (Pelagalli & Botte 2001).

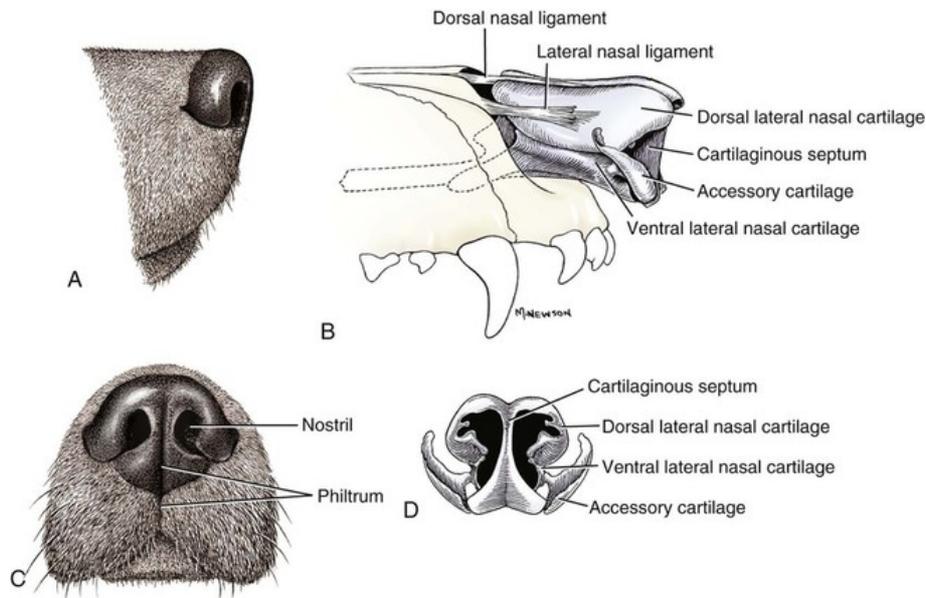


Figura 3.6: A Naso, aspetto laterale B Cartilagini nasali viste in laterale C Naso, aspetto rostrale D Cartilagini nasali aspetto rostrale. (immagini tratte da <http://veteriankey.com/the-respiratory-system/>)

3.1.2 Cavità nasali propriamente dette

Le cavità nasali si estendono dal *limen nasi* fino all'etmoide e sono caratterizzate da un lume reso molto anfrattoso dalla presenza di numerosi rilievi formati dai cornetti nasali. Detti anche conche o turbinati, i cornetti sono formati da sottili lamine di tessuto osso papiraceo impiantate con il margine prossimale sullo scheletro osseo; i margini liberi dei cornetti delimitano dei recessi, stretti ed allungati, che concorrono a caratterizzare ciascuna cavità nasale (Barone 2004).

Per la presenza delle volute dei cornetti, ciascuna cavità nasale appare suddivisa in tre corridoi, i meati dorsale, medio e ventrale che comunicano medialmente attraverso un interstizio verticale: il meato nasale comune (Figura 3.7). Il meato dorsale, posto tra il meato nasale e il cornetto superiore, è il più stretto e la sua estremità caudale termina sulla volta del labirinto etmoidale; il meato medio corre tra i cornetti superiore ed inferiore e ha inizio sulla faccia dorsale della plica alare, mentre il meato ventrale è il più largo e breve dei tre e costituisce il principale passaggio dell'aria; è

situato sotto il cornetto ventrale e termina a livello delle coane (Barone 2004).

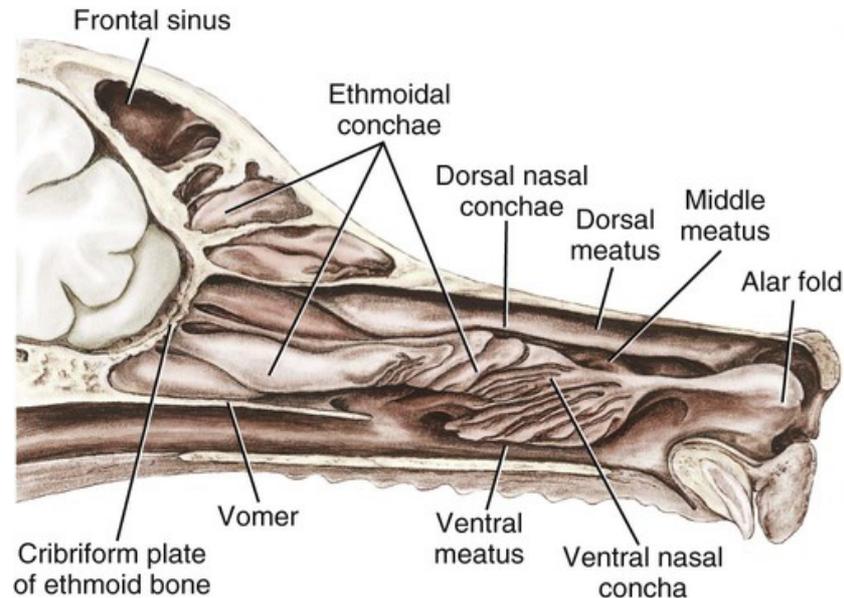


Figura 3.7 Sezione sagittale delle cavità nasali. (immagine tratta da <http://veteriankey.com/the-respiratory-system/>)

3.1.3 Mucosa nasale

La mucosa nasale è fornita di una spessa lamina propria che aderisce in modo intimo al periostio e al pericondrio delle cavità nasali e dei cornetti; la sua superficie risulta rivestita da un abbondante muco con funzione protettiva, espletata attraverso meccanismi sia fisici che enzimatici. La mucosa nasale è distinta in una mucosa respiratoria e una olfattoria, differenziate per struttura, aspetto, colore, localizzazione, vascolarizzazione e funzione. L'estensione di ciascuno dei due tipi di mucosa varia tra le specie e grossolanamente caratterizza i fenotipi macrosmatico e microsomatico. La mucosa respiratoria si estende sulla maggior parte delle cavità nasali, ad

eccezione del labirinto etmoidale, ed è caratterizzata da una spessa lamina propria, fornita di un epitelio cilindrico pseudo-stratificato ricco di cellule ciliate e cellule caliciformi mucipare.

Negli strati più profondi della lamina propria, per tutta l'estensione della mucosa e in modo particolare a livello dei cornetti, si espande il plesso pseudo-cavernoso, ossia una ricca rete venosa a maglie strette, la cui funzione è quella di favorire il riscaldamento dell'aria e regolarne l'umidità (Figura 3.8). Inoltre, la ricca vascolarizzazione di quest'area favorisce l'assorbimento dei farmaci somministrati per via intranasale permettendone il passaggio diretto nella circolazione sistemica (Graff & Pollack 2005) ed evitando l'effetto di primo passaggio epatico.

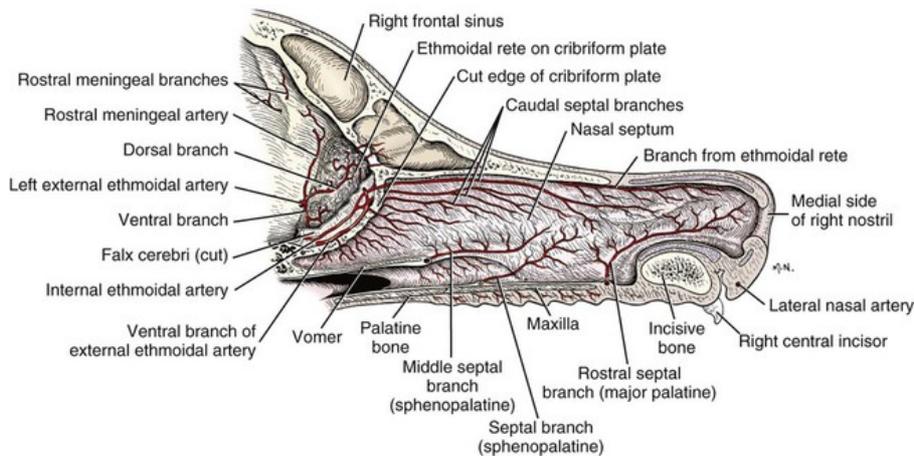


Figura 3.8 Vascolarizzazione delle cavità nasali, sezione sagittale. (immagine tratta da <http://veteriankey.com/the-respiratory-system/>)

La mucosa olfattoria è localizzata nel labirinto etmoidale; nei carnivori, essa invade la parte adiacente ai seni, è costituita da epitelio cilindrico pseudostratificato e dalla lamina propria. Nell'epitelio della mucosa olfattiva si distinguono cellule di sostegno, che conferiscono un colore giallastro alla mucosa, cellule basali disposte a ridosso della membrana basale e cellule sensoriali olfattive con forma allungata e nucleo globoso. Le cellule

recettrici sono dei tipici neuroni bipolari primari che nella regione apicale si allargano in una vescicola olfattiva; dall'estremo prossimale di tali cellule emergono fibre nervose amieliniche che, avvolte da una guaina di Schwann, attraversano la lamina cribrosa dell'etmoide e terminano nel bulbo olfattorio dove contraggono rapporti sinaptici con i dendriti delle cellule mitrali.

- Barone R (2004) Anatomia comparata dei mammiferi domestici.
- Graff CL, Pollack GM (2005) Nasal drug administration: potential for targeted central nervous system delivery. *J Pharm Sci* 94, 1187-1195.
- Pelagalli G, Botte V (2001) Anatomia veterinaria sistematica e comparata. (Terza edizione edn).

Capitolo 4

Studio sperimentale Effetti clinici della dexmedetomidina per via intranasale nel cane

Vengono presentati i materiali e metodi, i risultati e la discussione di uno studio clinico condotto su venti cani, volto a valutare gli effetti clinici della dexmedetomidina per via intranasale nel cane confrontandola alla via intramuscolare.

I risultati del presente studio sono attualmente in fase di pubblicazione.
Micieli F., Santangelo B., Reynaud F., Mirra A., Napoleone G., Della Valle G., Portier KG., Vesce G.
Sedative and cardiovascular effects of intranasal or intramuscular dexmedetomidine in healthy dogs.
Veterinary Anaesthesia and Analgesia doi: 10.1016/j.vaa.2016.08.009.

4.1 Introduzione

La somministrazione intranasale costituisce una strategia attraente e innovativa per la somministrazione di diverse molecole ed in particolare di quelle anestetiche che, grazie alle loro caratteristiche chimico-fisiche, risultano particolarmente adatte a tale via di somministrazione. Nel corso degli ultimi anni la via IN ha suscitato largo consenso nei pazienti umani e in misura maggiore in quelli pediatrici.

La via IN si caratterizza per essere poco invasiva, facilmente tollerata, in grado di evitare il primo passaggio epatico, garantendo un notevole assorbimento sistemico ed un trasporto rapido dei farmaci al sistema nervoso centrale (Illum 2000). L'ampia superficie delle cavità nasali e la ricca vascolarizzazione della mucosa respiratoria assicurano, infatti, un rapido assorbimento ed una elevata biodisponibilità dei farmaci somministrati per questa via (Grassin-Delyle et al. 2012). A tale meccanismo si aggiunge l'azione della mucosa olfattoria, attraverso la quale le molecole ivi depositate vengono trasportate direttamente al SNC, sia attraverso i nervi olfattori e trigemino, sia attraverso il sistema linfatico, come descritto in precedenza (Dhuria et al. 2010).

Grazie a tali meccanismi, la latenza d'effetto dei farmaci somministrati per via IN risulta più breve (Grassin-Delyle et al. 2012), con una ridotta incidenza degli effetti collaterali sistemici (Han et al. 2014), mentre la durata e l'efficacia clinica appaiono paragonabili alle altre più comuni vie di somministrazione.

La dexmedetomidina, il più selettivo degli α_2 -agonisti, si presta particolarmente a questa via di somministrazione, come dimostrato in diversi studi nell'uomo in cui la sua biodisponibilità è risultata del 65% dopo somministrazione IN (Iirola et al. 2011). Quando viene somministrata per via IN nell'uomo, la DEX si caratterizza per una latenza di 25-30 minuti e una durata della sedazione di 55-100 minuti, non accompagnata da depressione cardio-respiratoria (Han et al. 2014). Alla luce di tali dati, la somministrazione intranasale di DEX viene considerata una valida alternativa alla sedazione per via endovenosa nell'uomo. Nonostante l'efficacia dimostrata nella specie umana, non esistono studi clinici sulla somministrazione della DEX per via IN come unico agente sedativo negli animali.

Pertanto, considerato che il cane è una specie macrosomatica, obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare l'efficacia clinica della sedazione

e gli effetti sugli apparati cardiovascolare e respiratorio della DEX somministrata per via IN paragonandoli a quelli conseguenti le stesse dosi impiegate per via iniettiva.

4.2 Valutazione degli effetti clinici di dexmedetomidina per via in nel cane

4.2.1 Materiali e Metodi

Il presente studio è stato approvato dal Comitato Etico-scientifico per la sperimentazione animale (*Organismo Preposto al Benessere Animale* "OPBA") dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", con numero di licenza 2015/0016561. Inoltre, prima di includere un soggetto nello studio, il proprietario firmava un consenso informato in cui venivano illustrati i vantaggi e i rischi legati alla somministrazione IN.

Per stimare la dimensione minima del campione da inserire nello studio è stata eseguita una *power analysis calculation*, che ha indicato un numero minimo di 10 cani per gruppo per avere una probabilità del 90% (livello di significatività posta a 0.05) di rivelare una differenza di 15 ± 10 battiti minuto (bpm) della frequenza cardiaca media tra i due gruppi. Questo calcolo veniva basato sui dati di uno studio sperimentale nel quale si paragonavano gli effetti della DEX, con e senza atropina, per via IM nel cane (Congdon et al. 2011).

- *Animali*

Venivano inclusi nello studio venti cani adulti di varie razze, età e sesso, pervenuti presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", al fine di eseguire accertamenti diagnostici (eco-addome) in sedazione.

Tutti i soggetti inclusi nello studio venivano considerati sani sulla base dell'anamnesi, della visita clinica e degli esami emato-biochimici; venivano arruolati solo soggetti appartenenti alle classi di rischio anestesilogico ASA I o II.

Erano pertanto esclusi dallo studio tutti i soggetti con alterazioni cliniche e/o degli esami emato-biochimici biochimici tali da determinarne una

compromissione dell'omeostasi, nonché quelli affetti da patologie delle cavità nasali, in atto o pregresse.

- Disegno dello studio

La nostra indagine costituisce uno studio clinico prospettico randomizzato. La distribuzione casuale del campione veniva realizzata con l'ausilio di un programma online di randomizzazione (www.randomizer.org). Tutti i soggetti inclusi nello studio venivano sottoposti ad un digiuno di 12 ore con acqua a disposizione fino ad un'ora prima dell'inizio dello studio. Ogni soggetto veniva acclimatato nella sala di premedicazione per 15 minuti prima di procedere con l'incannulazione di una vena cefalica dell'avambraccio e dare inizio ad una fluido-terapia con un volume di Ringer Lattato di 10 ml/kg/h.

-Somministrazione della dexmedetomidina (IN - IM)

In seguito all'esame clinico e alla randomizzazione, ciascun soggetto veniva assegnato ad uno di due gruppi: IM per la somministrazione intramuscolare di dexmedetomidina (DEX) o IN per quella intranasale, fino a raggiungere il numero di 10 soggetti per gruppo. In entrambi i gruppi veniva somministrata DEX (Dexdomitor 0.05%, Pfizer Italia srl, Italy) alla dose di 0.02 mg/kg, corrispondente ad un volume di 0.04 ml/kg.

Nel gruppo IM la DEX veniva somministrata nel ventre del muscolo retto femorale impiegando una siringa da 2.5 ml con ago ipodermico 21 G, mentre nel gruppo IN, la stessa dose di DEX, veniva somministrata per via intranasale con l'ausilio di un atomizzatore MAD (MAD 300, Mucosal Atomization Device, Wolfe Tory Medical Inc., Salt Lake City, USA) collegato ad una siringa luer-lock da 2.5 ml (Figura 4.1).



Figura 4.1 Somministrazione intranasale (IN) nel cane mediante l'ausilio di un dispositivo di atomizzazione (MAD).

La dose totale di farmaco da somministrare per via IN veniva divisa in maniera equa tra le due narici, mantenendo la testa di ogni soggetto sollevata con un angolo di circa 30° durante e per dieci secondi dopo la somministrazione.

- Parametri valutati

Per ciascun soggetto di entrambi i gruppi veniva compilata un'apposita cartella clinica (Figura 4.2) dove erano riportati i corrispondenti valori numerici derivanti dalla valutazione di parametri comportamentali e clinici, utili a misurare il grado di sedazione (Sedation Score = SS). Il SS veniva registrato ogni 5 minuti per un totale di 45 minuti dopo la somministrazione della DEX.

Il SS si otteneva tenendo conto della capacità di mantenere la stazione [*spontaneous posture (0 = standing; 1 = sternally recumbent; 2 = laterally recumbent)*], dei caratteri del riflesso palpebrale [*palpebral reflex (0 = brisk; 1 = slow; 2 = absent)*], della posizione dell'occhio [*eye position (0 = central; 1 = rotated upward; 2 = rotated downward)*], della risposta ai rumori [*response to sound (handclap) (0 = body movement; 1 = head movement; 2 = no reaction)*], della resistenza ad assumere il decubito laterale [*resistance to lateral recumbency (0 = full, stands; 1 = moderate restraint required; 2 = no resistance)*] nonché una valutazione generica del grado di sedazione osservato [*general attitude (0 = no apparent sedation; 1*

= *mild sedation*; 2 = *moderate sedation*; 3 = *intense sedation*)] (Figura 4.2).

La scala, modificata da quella proposta in un precedente lavoro (Gurney et al. 2009), prevedeva un valore minimo di 0 ed un valore massimo (corrispondente al più alto grado di sedazione) di 13.

Per ogni soggetto il massimo valore di SS registrato era considerato il picco (valore massimo) di sedazione mentre la latenza del farmaco veniva calcolata dal momento della somministrazione a quello in cui si verificava la perdita della resistenza ad assumere il decubito laterale.

Quando i soggetti non opponevano resistenza a mantenere il decubito laterale, si procedeva ad eseguire l'esame ecografico. Nel caso di insufficiente sedazione era prevista la somministrazione di propofol IV fino a raggiungere l'effetto desiderato (Propofol, 10 mg/ml Merial Italia spa, Italy), annotandone la dose totale somministrata in cartella (Figura 4.2).

Oltre al grado di sedazione, venivano rilevati i seguenti parametri vitali: frequenza respiratoria (RR), ottenuta osservando le escursioni toraciche; frequenza cardiaca (HR), saturazione dell'ossigeno nel sangue (SpO₂) e pressione arteriosa non invasiva sistolica (SAP), diastolica (DAP) e media (MAP), grazie all'ausilio di un monitor multiparametrico (Mindray Express PM-9000, Mindray Medical S.r.l., Italy). Per la misurazione della pressione arteriosa non invasiva, rilevata automaticamente dal suddetto monitor, veniva impiegato un bracciale di larghezza compresa tra il 33 ed il 40% della circonferenza del segmento cui esso veniva applicato. Il bracciale veniva posizionato al centro dell'avambraccio e ciascuna misurazione veniva ripetuta tre volte per ogni tempo della sedazione, riportando in cartella i valori medi derivanti dalle tre misurazioni. Tutti i parametri ed il SS venivano annotati in cartella a tempo 0 (T-0), e ogni 5 minuti per 45 minuti: 5 min (T-5), 10 min (T-10), 15 min (T-15), 20 min (T-20), 25 min (T-25), 30 min (T-30), 35 min (T-35), 40 min (T-40) e 45 min (T-45) (Figura 4.2).



Protocollo di ricerca:
Valutazione degli effetti cardiorespiratori e sedativi di dexmedetomidina (0.02 mg/kg) per via intranasale nel cane

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	
Spontaneous posture											Data: Caso n.
0 standing											Nome:
1 sternally recumbent											
2 laterally recumbent											
Palpebral reflex											Razza:
0 brisk											Età: Sesso:
1 slow											
2 absent											Peso: ASA I II
Eye position											
0 forward (normal position)											Onset (decubito laterale) min:
2 rotated ventrally											
Response to sound (handclap)											
0 Body movement											Eventuali reazioni avverse:
1 Head movement											
2 No reaction											
Resistance to lateral recumbency											
0 full (stands)											
1 moderate restraint required											
2 no resistance											
Overall appearance											
0 no sedation apparent											
1 mild sedation											
2 moderate sedation											
3 well sedated											
TOT											

PARAMETRI	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Ora valutazione										
HR										
RR										
SpO ₂										
SAP										
MAP										
DAP										

Note:

Figura 4.2 Cartella di sedazione e di valutazione dei parametri cardio respiratori utilizzata per lo studio.

- Analisi statistica

Tutti i dati numerici sono stati inseriti in cartelle di lavoro Excel (Microsoft Excel 2011) e successivamente importati in un programma per l'analisi statistica dei dati (GraphPadPrism 6.01, 2012; GraphPad Software, Inc., USA e Real Statistics, www.real-statistics.com).

Per tutti i dati è stata valutata la normalità attraverso un test di Shapiro-Wilk. I dati demografici, l'età, il sesso ed il peso sono stati comparati mediante test di Student.

Per valutare la variabilità all'interno di gruppi e tra i due gruppi, sono stati utilizzati: per i dati parametrici un'analisi della varianza a due vie (2-way ANOVA), mentre per i dati non parametrici il test Scheier Ray Hare.

L'analisi *post hoc* per i dati parametrici è stata eseguita con un test per le comparazioni multiple di Sidak, mentre per i dati non parametrici sono stati utilizzati il Mann-Whitney U-test per la comparazione tempo per tempo tra i due gruppi e il test di Tukey per la comparazione tra i differenti tempi in ogni singolo gruppo.

Per tutti i test la significatività è stata posta a $p < 0.05$.

Tutti i dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (SD) quando parametrici, o come mediana (min, max) quando non-parametrici.

4.2.2 Risultati

La sedazione è risultata sufficiente in tutti i soggetti di entrambi i gruppi e in nessun caso è stato necessario incrementare il livello della sedazione con propofol per eseguire gli esami ecografici prestabiliti.

Inoltre, nelle 8 ore successive la sedazione, in nessuno dei soggetti sono stati osservati effetti collaterali o reazioni avverse riferibili al farmaco o alla via di somministrazione.

-Dati demografici

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative per età, peso e sesso tra i due gruppi (Tabella 4.1).

Tabella 4.1 Dati demografici nei due gruppi (IN e IM). i dati sono espressi come media \pm SD, significatività al test di Student ($p < 0.05$).

	Gruppo IN	Gruppo IM	<i>p</i> -value
N. di cani	10	10	
Età (anni)	1.7 ± 1.4	1.5 ± 0.9	0.852
Peso (kg)	12.7 ± 4.5	11.6 ± 4.8	0.601
Sesso (M:F)	5:5	3:7	0.500

In entrambi i gruppi la razza maggiormente rappresentata era quella meticcia: gruppo IN (6:10), gruppo IM (8:10), ma non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi circa la distribuzione delle razze ($p = 0.105$).

-Sedazione

Non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi nella latenza del farmaco, la quale, nel gruppo IN è risultata di 6.3 ± 3.3 minuti, mentre nel gruppo IM di 9.4 ± 4.6 minuti ($p = 0.120$).

Nel gruppo IN il picco di sedazione è stato individuato a 23.5 ± 4.7 minuti, mentre nel gruppo IM a 28.0 ± 4.8 minuti; anche per tale valore non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ($p = 0.049$).

Il grado di sedazione (SS) è risultato significativamente più alto nel gruppo IN rispetto al gruppo IM ($p < 0.001$); tale differenza è stata riscontrata a tutti i tempi, da T-10 a T-45 ($p < 0.01$) (Figura 4.3).

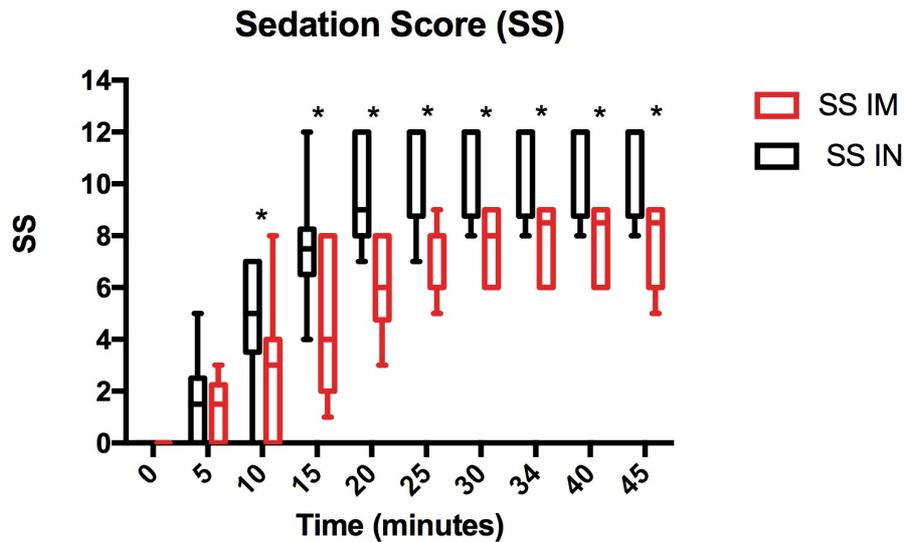


Figura 4.3 Grado di sedazione (Sedation score = SS) nei due gruppi (IN e IM) dopo somministrazione di 0.02 mg/kg di dexmedetomidina (time points T-0 – T-45). I dati sono rappresentati come mediana (linea orizzontale), intervallo interquartile (box) e range (linea verticale). *Differenza significativa tra i due gruppi ($p < 0.05$).

-Variabili cardiovascolari

La frequenza cardiaca (HR) è risultata significativamente più alta nel gruppo IN rispetto al gruppo IM ($p < 0.001$); tale differenza è stata riscontrata a tutti i tempi successivi la somministrazione di DEX (da T-5 a T-45) ($p < 0.01$) (Figura 4.4).

Nel gruppo IN la frequenza cardiaca (HR) è risultata più bassa rispetto ai valori basali (HR T0 = 120 [72-160]) solo ai tempi T-20, T-40 e T-45 ($p < 0.01$) (T-20 = 93 [82-120]; T-40 = 97 [85-100] e T-45 = 92 [85-120]), mentre nel gruppo IM essa è risultata più bassa rispetto ai valori basali a tutti i tempi da T-20 a T-45 ($p < 0.001$) (T-20 = 48 [30-60]; T-25 = 50 [32-60]; T-30 = 50 [38-58]; T-35 = 50 [40-60]; T-40 = 48 [40-60]; T-45 = 48 [40-58]).

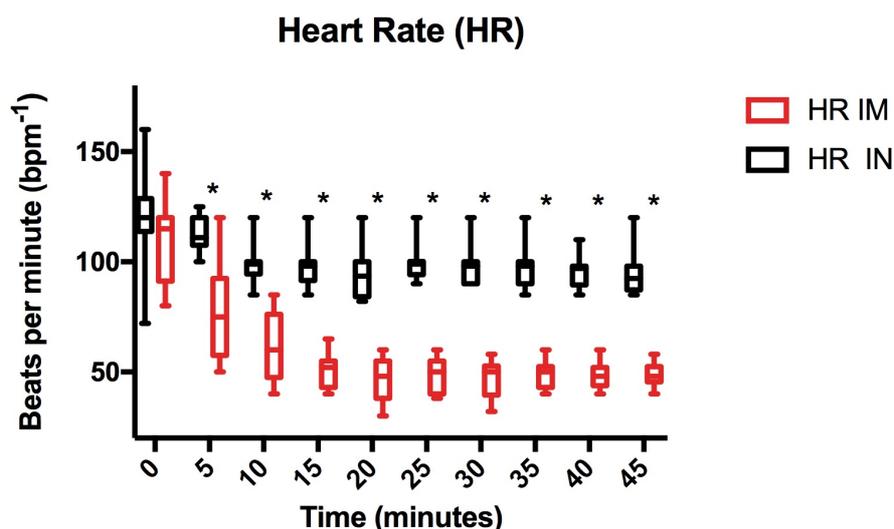


Figura 4.4 Frequenza cardiaca (Heart rate= HR) nei due gruppi (IN e IM) dopo somministrazione di 0.02 mg/kg di dexmedetomidina (time points T-0 – T-45). I dati sono rappresentati come mediana (linea orizzontale), intervallo interquartile (box) e range (linea verticale). *Differenza significativa tra i due gruppi ($p < 0.05$).

Inoltre, in corrispondenza del picco di sedazione, la frequenza cardiaca è risultata diminuita del 18% rispetto ai valori basali nel gruppo IN, mentre nel gruppo IM la diminuzione della frequenza cardiaca ha raggiunto una riduzione del 56%.

È stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi nel tempo ($p < 0.001$), per la pressione arteriosa media (MAP) (Figura 4.5).

Tale differenza è risultata statisticamente significativa a T-15 ($p = 0.014$) (IN = 123 ± 18 vs IM = 106 ± 12.1) e a T-30 ($p = 0.006$) (IN = 84 ± 9.8 vs IM = 103 ± 19.8).

Nel gruppo IN, infatti, è stato registrato un aumento della MAP del 21% rispetto al valore basale a T-15 ($p = 0.005$) mentre a T-30 la MAP è diminuita del 17% rispetto al valore basale ($p = 0.020$). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative rispetto ai parametri basali della MAP nel gruppo IM.

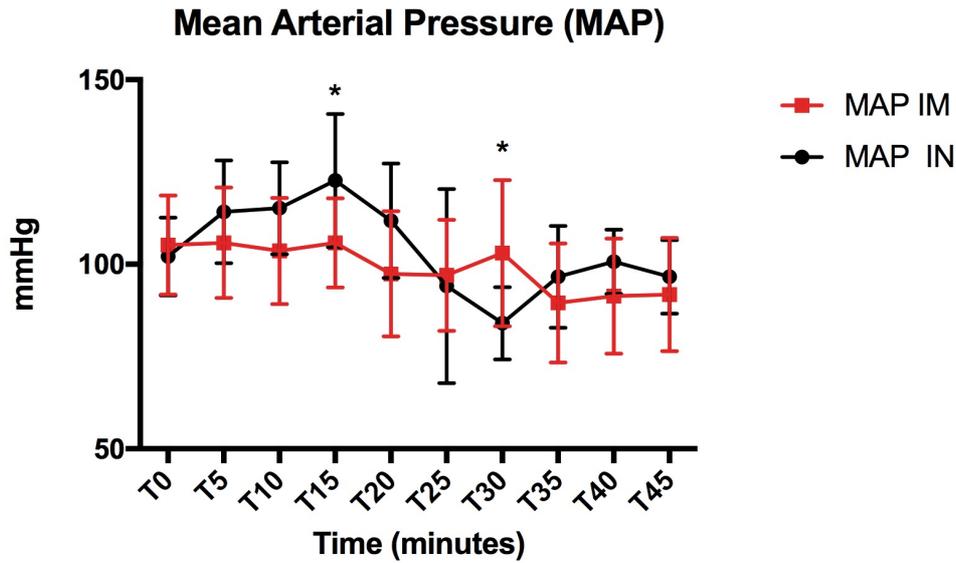


Figura 4.5 Pressione arteriosa media (mean arterial pressure = MAP) nei due gruppi (IN e IM) dopo somministrazione di 0.02 mg/kg di dexmedetomidina (time points T-0 – T-45). I dati sono rappresentati come media (punto) e deviazione standard (linea verticale). *Differenza significativa tra i due gruppi ($p < 0.05$).

-Variabili respiratorie

La frequenza respiratoria (RR) non ha rivelato differenze statisticamente significative tra i due gruppi ($p = 0.067$). In entrambi i gruppi si è verificata una riduzione della RR di circa il 42% a T-5 (IN = 20 [12-30]; IM = 17 [16-30]) rispetto ai valori basali (IN = 36 [20-48]; IM = 30 [20-60]). Dopo tale riduzione, la RR è rimasta stabile in entrambi i gruppi fino a T-45 (Figura 4.6).

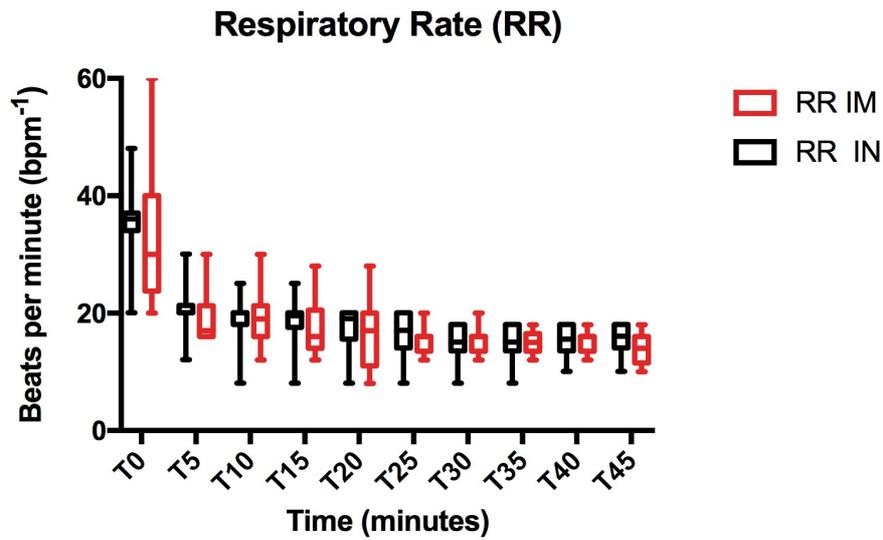


Figura 4.6 Frequenza respiratoria (Respiratory Rate = RR) nei due gruppi (IN e IM) dopo somministrazione di 0.02 mg/kg di dexmedetomidina (time points T-0 – T-45). I dati sono rappresentati come mediana (linea orizzontale), intervallo interquartile (box) e range (linea verticale).

La saturazione dell'ossigeno nel sangue (SpO₂) non ha mostrato differenze statisticamente significative nel tempo tra i due gruppi ($p = 0.127$) (Figura 4.7).

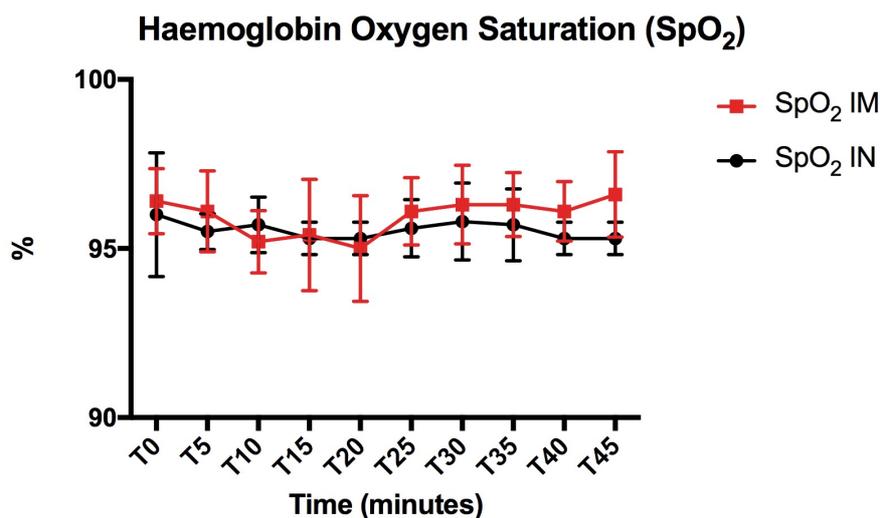


Figura 4.7 Saturazione dell'ossigeno nel sangue (SpO₂) nei due gruppi (IN e IM) dopo somministrazione di 0.02 mg/kg di dexmedetomidina (time points T-0 – T-45). I dati sono rappresentati come media (punto) e deviazione standard (linea verticale).

4.2.3 Discussione

Questo studio costituisce il primo lavoro sulla sedazione per via intranasale nel cane, nonostante le intuibili potenzialità di tale via nelle specie macroscatiche. I risultati ottenuti nel presente studio dimostrano che la somministrazione IN di DEX determina un grado di sedazione maggiore rispetto alla via IM, producendo anche una minore riduzione della frequenza cardiaca. Inoltre, sebbene non siano state riscontrate differenze statisticamente significative tra i due gruppi nella latenza della sedazione, i soggetti trattati per via IM raggiungevano in media il decubito laterale in un tempo leggermente più lungo rispetto a quelli trattati per via IN (IN = 6.3 ± 3.3 minuti vs IM 9.4 ± 4.6 minuti). Il tempo di latenza ottenuto dopo somministrazione IN (6.3 ± 3.3 minuti) risulta notevolmente più breve rispetto a quanto viene riportato in letteratura per l'uomo, nel quale la latenza media è di circa 45 minuti (Yuen et al. 2008; Iriola et al. 2011); questa differenza è da attribuire al più basso dosaggio comunemente utilizzato nell'uomo e alle differenze anatomiche tra le due specie. In particolare, le differenze anatomiche potenzialmente responsabili di un migliore assorbimento delle molecole

somministrate per via IN nel cane sono legate alla superficie di assorbimento, che risulta maggiore nel cane (221 cm^2) rispetto all'uomo (160 cm^2) (Gizurason 1990) e all'estensione della mucosa olfattoria, che risulta essere 10 volte più grande nel cane (Illum 2000).

Gli studi sulla via intranasale presenti nella letteratura veterinaria riportano gli effetti sedativi della DEX in associazione ad altre molecole. Schnellbacher e Coll. (2012) hanno dimostrato che l'associazione di DEX e ketamina per via IN nelle tartarughe dalle orecchie gialle (*trachemys scripta scripta*) induce una soddisfacente sedazione dopo 5 minuti mentre, nel coniglio, Santangelo e Coll. (2016b) hanno riportato una latenza d'azione di soli 1.4 minuti dopo somministrazione di DMB per via transnasale. Uno studio clinico condotto sui piccioni ha documentato che la somministrazione di 0.8 mg/kg di DEX associati a 5 mg/kg di midazolam per via IN è in grado di produrre una sedazione profonda. Questi dati avvalorano l'ipotesi di una maggiore efficacia della via IN negli animali, in termini di rapidità d'azione e di potenza d'effetto.

Nel nostro campione di cani il picco della sedazione veniva raggiunto in un tempo significativamente più breve dopo somministrazione per via IN rispetto alla via IM (IN = $23.5 \pm 4.7 \text{ min}$ vs IM = $28 \pm 4.8 \text{ min}$). Il picco della sedazione da noi riscontrato per via IM è in accordo con quanto riportato in altri studi nel cane in cui la DEX veniva somministrata per tale via (Granhholm et al. 2007; Congdon et al. 2011). Il più rapido picco di sedazione osservato nei nostri pazienti dopo somministrazione IN rispecchia quanto riportato in letteratura umana, dove la via IN è considerata in grado di garantire una più rapida efficacia clinica rispetto alle vie intramuscolare, orale e alle altre vie transmucosali (Grassin-Delyle et al. 2012).

I risultati del nostro studio dimostrano inoltre che il livello di sedazione ottenuto dopo somministrazione per via IN è maggiore rispetto a quanto osservato dopo somministrazione IM. Tale dato è probabilmente dovuto sia ad un maggiore assorbimento sistemico del farmaco dopo somministrazione IN, sia al suo passaggio diretto dal naso al cervello: tali circostanze possono aver determinato concentrazioni di farmaco nell'organo bersaglio più alte, in un tempo ridotto. Questa ipotesi è avvalorata da quanto riportato da altri autori i quali, dopo somministrazione IN di midazolam nel cane, hanno riscontrato concentrazioni di farmaco più alte nel liquido cefalorachidiano rispetto al sangue periferico (Henry et al. 1998). Le differenze nell'assorbimento possono, in parte, dipendere dalla maggiore vascolarizzazione per cm^2 della mucosa respiratoria rispetto a quella della muscolatura striata (Dale et al. 2002). Nel presente studio, al fine di limitare

al massimo la variabilità dell'assorbimento dopo somministrazione IM, è stato scelto di eseguire l'iniezione sempre nel ventre muscolare del retto femorale, sulla base di uno studio condotto nel cane da Carter e Coll. (2013), i quali hanno confrontato la somministrazione di DEX ed idromorfone in diversi gruppi muscolari, dimostrando che il sito d'iniezione è in grado di condizionare gli effetti delle due molecole, sia in termini della latenza che della qualità della sedazione prodotta (Carter et al. 2013).

L'assorbimento per via intranasale è fortemente influenzato oltre che dalle caratteristiche anatomiche del paziente, dal metodo di somministrazione e dalla formulazione del farmaco, anche, e in maniera rilevante, dalle caratteristiche chimico-fisiche della molecola impiegata quali: il peso molecolare, la solubilità, la lipofilia ed il pKa (Pires et al. 2009). La dexmedetomidina, con il suo basso peso molecolare (236.7 Da) e quindi la possibilità di raggiungere rapidamente il SNC, è un candidato ideale a questa via di somministrazione. È stato dimostrato, infatti, che per le molecole con peso molecolare < 300 Da l'assorbimento per via IN risulta rapido e meno influenzato da altre caratteristiche chimico fisiche della molecola (Pires et al. 2009; Kamble et al. 2013).

Gli effetti maggiormente indesiderati degli α_2 -agonisti sono legati all'azione sull'apparato cardiocircolatorio quale, in particolare, la grave bradicardia, la riduzione dell'output cardiaco, l'aumento delle resistenze periferiche ed il tipico andamento bifasico della pressione arteriosa. Congdon e Coll. (2011) riportano una riduzione della frequenza cardiaca del 55%, dopo 15 minuti dalla somministrazione IM di DEX (0.01 mg/kg) nel cane; questi dati sono in accordo con i nostri risultati dai quali si evince una riduzione della frequenza cardiaca del 54,7% dopo 15 minuti dalla somministrazione IM. In accordo con quanto riportato in letteratura umana, la somministrazione IN, invece, ha determinato una minore riduzione della frequenza cardiaca per tutto il periodo di osservazione. In particolare, nel momento del picco della sedazione, nel gruppo IN i pazienti mostravano una riduzione della frequenza cardiaca del 18% rispetto ai valori basali, mentre nel gruppo IM la frequenza cardiaca si riduceva del 56%. Tuttavia, nonostante il contenuto effetto bradicardizzante, l'andamento bifasico della pressione arteriosa nei nostri pazienti è risultato più evidente dopo somministrazione IN.

Diversi autori descrivono nell'uomo una riduzione degli effetti sistemici di diverse molecole dopo somministrazione IN; in particolare, l'impiego della DEX per via IN determina nei 30 minuti successivi la somministrazione un aumento della frequenza cardiaca rispetto a quanto si riscontra dopo somministrazione IV (Iirola et al. 2011). In un confronto tra la

somministrazione IN e quella IV di DEX in pazienti umani sedati per eseguire una gastroscopia, Han e Coll. (2014) hanno registrato una maggiore stabilità dei parametri cardiovascolari dopo somministrazione IN.

Nella nostra esperienza, oltre ad aver prodotto una sedazione più profonda, la somministrazione IN ha determinato una minore incidenza dei temuti effetti cardiovascolari comunemente riscontrati dopo somministrazione di DEX per via IV o IM. Verosimilmente, tali effetti sono da ascrivere ai peculiari meccanismi di assorbimento e di trasporto al SNC dei farmaci somministrati per via IN; in tali circostanze, il passaggio diretto dal naso al cervello può aver favorito una maggiore concentrazione del farmaco nel SNC ed una sua minore distribuzione sistemica, contenendo gli effetti periferici, spesso indesiderati, dell' α_2 -agonista.

I principali limiti del presente lavoro comprendono il ridotto numero di soggetti inclusi e la mancanza di uno studio farmacocinetico sia sul sangue che sul liquido cefalo rachidiano. Quest'ultimo avrebbe potuto supportare l'ipotesi che la più profonda sedazione e la minore bradicardia osservate dopo somministrazione di DEX per via IN conseguano il trasporto diretto della DEX dal naso al cervello.

Ulteriori limiti del presente lavoro sono costituiti dal ridotto periodo di osservazione e dalla mancanza di dati numerici relativi ai tempi e alla qualità del risveglio.

Nonostante ciò abbiamo potuto constatare che nelle otto ore successive la somministrazione di DEX non sono stati osservati fenomeni indesiderati in alcun soggetto; nei soggetti sedati per via intranasale, inoltre, non sono stati riportati fenomeni di irritazione o sanguinamento delle cavità nasali, e ciò è in accordo con quanto riportato in letteratura per l'uomo (Iirola et al. 2011). La somministrazione IN è risultata agevole in tutti i soggetti, anche in quelli più timorosi, nei quali era sufficiente coprirne gli occhi prima di avvicinare il dispositivo di atomizzazione alle narici. Come riportato da Musulin e Coll. (2011), l'impiego dell'atomizzatore MAD ha reso la somministrazione intranasale più agevole e precisa nel cane.

L'impiego dell'atomizzatore, inoltre, ha ridotto il rischio di espulsione accidentale del farmaco migliorandone l'assorbimento. E' stato dimostrato che il MAD riduce il farmaco in particelle di diametro compreso tra i 30 e i 100 μm che, depositandosi sulla mucosa nasale, creano un film di rivestimento sulla stessa, diminuendo la possibilità di espulsione accidentale del farmaco anche in seguito a starnuti (Musulin et al. 2011). Aumentando la superficie di distribuzione, tale dispositivo favorisce l'assorbimento dei farmaci per questa via. Questa vantaggiosa caratteristica è stata constatata

in uno studio condotto su cani in cui, dopo somministrazione IN, si riscontravano concentrazioni di midazolam nel liquido cefalorachidiano significativamente più alte con l'impiego dell'atomizzatore rispetto all'instillazione diretta del farmaco nelle cavità nasali (Henry et al. 1998).

4.3 Conclusioni

La via intranasale è una promettente via di somministrazione per la maggior parte delle molecole anestetiche, grazie alla scarsa invasività della tecnica, al rapido assorbimento dei farmaci, al passaggio diretto al SNC e all'efficacia clinica dimostrata in diversi studi nell'uomo e negli animali. Questa via di somministrazione costituisce una valida alternativa alle comuni vie impiegate per i farmaci anestetici ed analgesici, i quali necessitano di un trasporto rapido al SNC per poter espletare la loro azione centrale. Inoltre, grazie alle loro caratteristiche chimico-fisiche che gli permettono di attraversare rapidamente la BEE, queste molecole si prestano particolarmente all'assorbimento per via IN perché già provviste dei requisiti necessari a percorrere la via naso-cervello.

Un'altra importante osservazione è la possibilità di impiegare per via IN la stessa formulazione farmacologica della maggior parte degli anestetici, con gli stessi dosaggi impiegati per le vie IM o IV.

Rispetto alla via IM se somministrata per via IN, la DEX nel cane mostra una minore latenza e una maggiore efficacia clinica, grazie ad un più rapido assorbimento ed al possibile trasporto diretto del farmaco al SNC. Ulteriori studi farmacocinetici ed ecocardiografici nel confronto delle due vie di somministrazione sono al momento in fase di progettazione.

La somministrazione intranasale di dexmedetomidina alla dose di 0.02 mg/kg in cani sani e senza alterazioni delle cavità nasali determina una efficace sedazione e più profonda rispetto alla via IM, riducendo l'incidenza di bradicardia.

Essa, pertanto, potrebbe costituire un'alternativa meno invasiva e di pari efficacia alla via di somministrazione intramuscolare.

- Carter JE, Lewis C, Beths T (2013) Onset and quality of sedation after intramuscular administration of dexmedetomidine and hydromorphone in various muscle groups in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 243, 1569-1572.
- Congdon JM, Marquez M, Niyom S et al. (2011) Evaluation of the sedative and cardiovascular effects of intramuscular administration of dexmedetomidine with and without concurrent atropine administration in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 239, 81-89.
- Dale O, Hjortkjaer R, Kharasch ED (2002) Nasal administration of opioids for pain management in adults. *Acta Anaesthesiol Scand* 46, 759-770.
- Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH, 2nd (2010) Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci* 99, 1654-1673.
- Gizurarson S (1990) Animal models for intranasal drug delivery studies. A review article. *Acta Pharm Nord* 2, 105-122.
- Granhholm M, McKusick BC, Westerholm FC et al. (2007) Evaluation of the clinical efficacy and safety of intramuscular and intravenous doses of dexmedetomidine and medetomidine in dogs and their reversal with atipamezole. *Vet Rec* 160, 891-897.
- Grassin-Delyle S, Buenestado A, Naline E et al. (2012) Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids. *Pharmacol Ther* 134, 366-379.
- Gurney M, Cripps P, Mosing M (2009) Subcutaneous pre-anaesthetic medication with acepromazine-buprenorphine is effective as and less painful than the intramuscular route. *J Small Anim Pract* 50, 474-477.
- Han G, Yu WW, Zhao P (2014) A randomized study of intranasal vs. intravenous infusion of dexmedetomidine in gastroscopy. *Int J Clin Pharmacol Ther* 52, 756-761.
- Henry RJ, Ruano N, Casto D et al. (1998) A pharmacokinetic study of midazolam in dogs: nasal drop vs. atomizer administration. *Pediatr Dent* 20, 321-326.
- Iirola T, Vilo S, Manner T et al. (2011) Bioavailability of dexmedetomidine after intranasal administration. *Eur J Clin Pharmacol* 67, 825-831.
- Illum L (2000) Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci* 11, 1-18.
- Kamble M, Bhalerao K, Bhosale A et al. (2013) A Review on Nose-to-Brain Drug Delivery. *International journal of pharmaceutical and chemical sciences* 2, 516 - 525.

- Musulini SE, Mariani CL, Papich MG (2011) Diazepam pharmacokinetics after nasal drop and atomized nasal administration in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 34, 17-24.
- Pires A, Fortuna A, Alves G et al. (2009) Intranasal drug delivery: how, why and what for? *J Pharm Pharm Sci* 12, 288-311.
- Yuen VM, Hui TW, Irwin MG et al. (2008) A comparison of intranasal dexmedetomidine and oral midazolam for premedication in pediatric anesthesia: a double-blinded randomized controlled trial. *Anesth Analg* 106, 1715-1721.