

**Jelena Belanović**

***In vitro* ispitivanje sigurnosti oftalmičke primjene  
lecitinsko-kitozanskih nanočestica  
s melatoninom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Biofarmacija s farmakokinetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Anite Hafner.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, prenesenom znanju i brojnim savjetima te potpori i strpljenju prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.*

*Hvala doc. dr. sc. Jasmini Lovrić na strpljenju, savjetima i nesebičnoj pomoći koju mi je pružila pri izradi eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala Marini Juretić, mag. pharm., znanstvenoj novakinji Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na podršci, pomoći i savjetima.*

*Hvala kolegi Martinu Štefeku na pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala svim članovima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.*

*Hvala mojoj obitelji, kolegama i prijateljima na podršci.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Anatomija i fiziologija oka .....	1
1.1.1. Rožnica ( <i>cornea</i> ) .....	2
1.1.2. Bjeloočnica ( <i>sclera</i> ).....	5
1.1.3. Mrežnica ( <i>retina</i> ).....	6
1.2. Terapijski nanosustavi za oftalmičku primjenu .....	7
1.2.1. Liposomi.....	9
1.2.2. Polimerne nanočestice .....	10
1.2.3. Dendrimeri.....	11
1.2.4. Nanokristali.....	12
1.2.5. Niosomi.....	13
1.3. Kitozan.....	13
1.3.1. Topikalna oftalmička primjena otopina i nanočestica kitozana.....	14
1.3.2. Tolerancija i toksičnost kitozana <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> .....	16
1.4. Melatonin .....	17
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	20
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	22
3.1. MATERIJALI .....	22
3.2. METODE.....	23
3.2.1. Priprava nanočestica .....	23
3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja melatonina.....	23
3.2.3. Određivanje veličine nanočestica .....	24
3.2.4. Određivanje zeta-potencijala nanočestica.....	25
3.2.5. <i>In vitro</i> oslobađanje melatonina iz nanočestica .....	25
3.2.6. Stanična linija i uvjeti uzgoja .....	26
3.2.7. Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica <i>in vitro</i> .....	26
3.2.8. Statistička analiza .....	27
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	28
4.1. Priprava lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom .....	28
4.2. Uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice .....	28
4.3. Veličina i zeta potencijal nanočestica .....	29
4.4. <i>In vitro</i> oslobađanje melatonina iz nanočestica .....	31
4.5. Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica <i>in vitro</i> .....	32
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	35
<b>6. LITERATURA</b> .....	36
<b>7. SAŽETAK/ SUMMARY</b> .....	43

# 1. UVOD

## 1.1. Anatomija i fiziologija oka

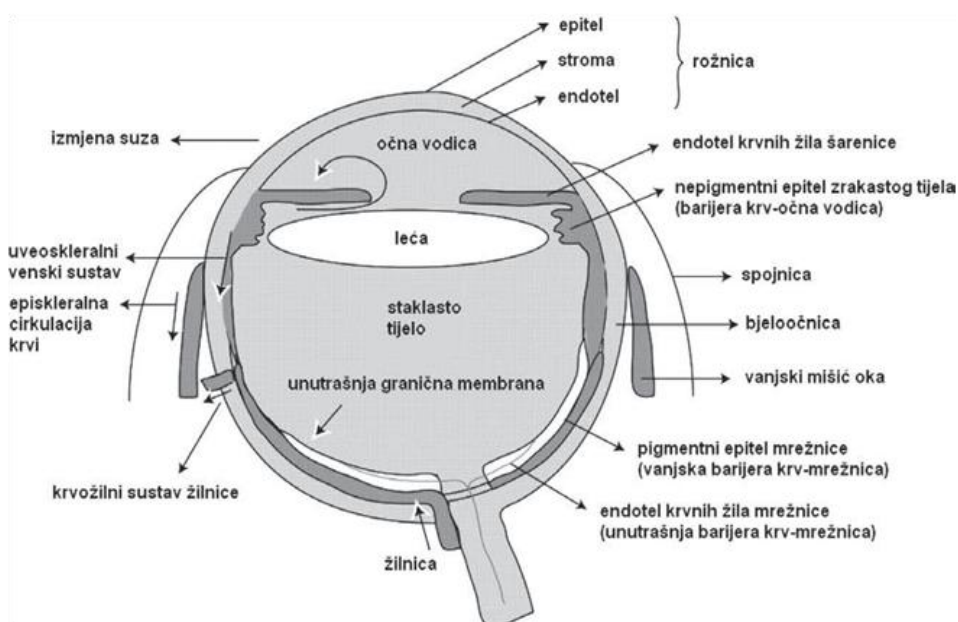
Oftalmička primjena lijeka jedan je od najvećih farmaceutsko-tehnoloških izazova. Jedinstvena struktura oka ograničava ulazak/dostavu molekule lijeka na ciljno mjesto djelovanja. Veliki problem predstavlja održavanje učinkovite koncentracije lijeka na mjestu djelovanja kroz odgovarajući vremenski period kako bi se postigao očekivani farmakološki učinak (Basaran i Yazan, 2012). Tijekom proteklih godina identificirano je nekoliko makromolekula s potencijalom liječenja različitih poremećaja oka. Međutim, njihova primjena ograničena je uslijed nedovoljne stabilnosti i slabe permeabilnosti. Za ostvarivanje odgovarajućeg terapijskog učinka potrebno je razviti terapijski sustav koji će učinkovito uklopiti lijek, zaštititi ga od biološkog okruženja, olakšati interakciju s površinom oka, omogućiti kontrolirano oslobađanje te transport preko bioloških barijera. Dosadašnjim istraživanjima pokazano je da zahtjeve idealnog sustava za oftalmičku primjenu lijeka mogu zadovoljiti terapijski nanosustavi (Paolicelli i sur., 2009).

Ljudsko oko je paran organ vida smješten u očnim šupljinama. Očna se jabučica (*bulbus oculi*) sastoji od triju koncentričnih ovojnica. Vanjska očna ovojnica je sloj veziva i sastoji se od prozirne rožnice (*cornea*) i neprozirne bjeloočnice (*sclera*). Srednja očna ovojnica (*uvea*) čini krvnu i živčanu opskrbu unutrašnjosti očne jabučice. Dijeli se, od straga prema naprijed, na tri dijela: žilnica (*choroidea*), zrakasto tijelo (*corpus ciliare*) i šarenica (*iris*). Unutrašnju očnu ovojnicu izrađuje tanka opna, mrežnica (*retina*). Dioptrični aparat oka sastoji se od potpuno prozirnih tvorbi kroz koje prolazi svjetlo na svojem putu do osjetnog sloja mrežnice. U njega ubrajamo: rožnicu, očnu vodicu (*humor aquosus*) koja ispunjava prednju očnu sobicu, leću (*lens*) i staklasto tijelo (*corpus vitreum*). Pomoćne tvorbe oka, koje upotpunjuju njegovu funkciju su: vanjski mišići očne jabučice (*musculi externi bulbi oculi*), obrva (*supercilium*), vjeđe (*palpebrae*), spojnica (*tunica conjunctiva*) i suzni sustav (*apparatus lacrimalis*) (Krmptić-Nemanić i Marušić, 2002). Specifična anatomska građa oka i različiti fiziološki zaštitni mehanizmi nameću detaljniji opis bioloških barijera oka s kojima se lijek susreće prilikom oftalmičke primjene.

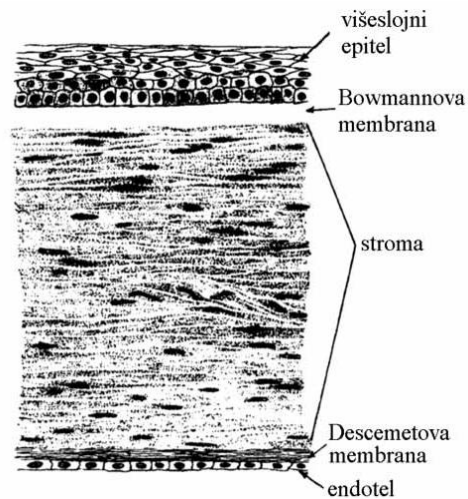
### 1.1.1. Rožnica (*cornea*)

Rožnica je prva biološka barijera oka u doticaju s vanjskim uvjetima i stranim tvarima. Uz bjeloočnicu, spojnicu, mrežnicu te barijeru krv-očna vodica i barijeru krv-mrežnica čini tkivnu (biološku) barijeru (Slika 1) (Pepić i sur., 2014). Jajolika je oblika s horizontalnim promjerom od 11 do 12 mm i vertikalnim od 10 do 11 mm. Na rožnici se razlikuju vrh, rub te vanjska i unutarnja strana. Na rubu rožnice završava očna spojnica, koja na tom mjestu tvori prsten. Rožnica nije jednako debela u svim dijelovima. Na rubu je najdeblja (0,8–1,5 mm), a u području vrha najtanja (0,5–1 mm). Rožnica je prozirna, glatka, vrlo podražljiva te omogućuje prolazak zraka svjetlosti u unutrašnjost oka do mrežnice. Predstavlja optičku leću koja sudjeluje u prelamanju svjetla koje ulazi u oko. Avaskularizirana je (nema krvnih žila, ali je bogata živčanim završecima) te kao takva hranjive tvari i dio kisika prima preko rubne mreže krvnih žila, dok ostali dio kisika prima iz atmosfere (Pepić, 2004; Ranade i Hollinger, 2003; Krmpotić-Nemanić i Marušić, 2002; Ledić, 1990a). Iako rožnica pokriva samo jednu šestinu ukupne površine očne jabučice smatra se glavnim putem dostave lijeka u oko (Alonso i Sánchez, 2003).

Apsorpcija lijeka preko rožnice je ograničena, što zbog njene relativno male površine (1,04 cm<sup>2</sup>), što zbog njene složene građe koja uključuje vanjski lipofilni epitel, Bowmannovu membranu, središnju hidrofilnu stromu, Descemetovu membranu i unutrašnji lipofilni endotel (Slika 2) (Pepić i sur., 2012; Pepić 2004).



**Slika 1.** Biološke barijere oka (preuzeto iz Pepić i sur., 2012)



**Slika 2.** Poprečni presjek rožnice (preuzeto iz Pepić, 2004)

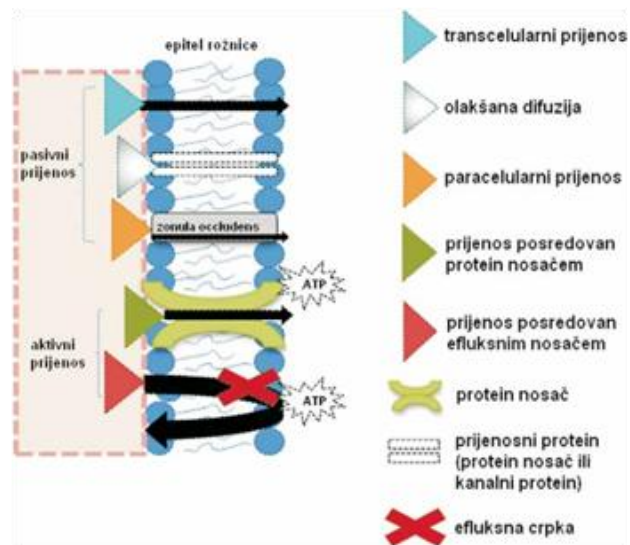
### **Epitel rožnice**

Prednju površinu rožnice pokriva višeslojni epitel koji se sastoji od 5-6 slojeva tijesno priljubljenih skvamoznih stanica u sredini i 8-10 slojeva istih stanica prema periferiji. Ukupne debljine 50-100  $\mu\text{m}$  s izmjenom (turnover) približno jednog staničnog sloja po danu. Epitel nije orožnjen, a između epitelnih stanica se granaju ogranci cilijarnih živaca pa je rožnica osobito osjetljiva na bol. Epitel posjeduje sposobnost regeneracije, stoga se pri ozljedi epitela ne stvaraju ožiljci i rožnica ne gubi providnost. Ovaj sloj čini značajnu biološku prepreku (zaštitu) oka od vanjskih utjecaja (Pepić i sur., 2012; Pepić, 2004). Prijenos tvari kroz epitel rožnice odvija se pasivno i aktivno (Slika 3). Pasivni prijenos uključuje difuziju tvari niz koncentracijski gradijent (transcelularno ili paracelularno bez posredovanja proteina) ili olakšanu difuziju (posredovanjem nosača ili kanalnih proteina). Aktivni prijenos tvari je prijenos suprotan koncentracijskom gradijentu posredovan proteinima nosačima ili efluksnom crpkom (Pepić i sur., 2012).

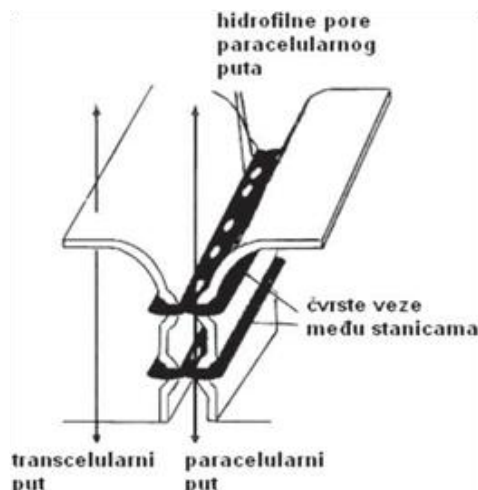
Kod prijenosa lijekova kroz epitel rožnice najčešće se razmatraju procesi pasivnog prijenosa. Taj prijenos je određen veličinom pora paracelularnog puta (3-5 nm) (Slika 4) i fizičko-kemijskim svojstvima lijeka kao što su molekulska masa, molekularni oblik, molekulske dimenzije i fleksibilnost proteinske molekule. Čvrste veze među stanicama (*zonula occludens-tight junctions*) ograničavajući su čimbenik prijenosa paracelularnim putem, dok druge strukture (*zonula adherens, gap junction, desmosomi*) ne predstavljaju prepreku.

Paracelularni put daje prednost hidrofilnim lijekovima i primarni je put pasivne ionske permeacije, dok transcelularni put daje prednost lipofilnim lijekovima, a uključuje pasivnu ili olakšanu difuziju pomoću intracelularnim nosačima (Pepić i sur., 2012; Pepić, 2004).

Ispod bazalne membrane epitela nalazi se sloj kolagenskih vlakana koja oblikuju Bowmannovu membranu. To je acelularna homogena ovojnica debljine oko 8-14  $\mu\text{m}$ . Ovaj sloj se ne može regenerirati pa nakon ozljede na rožnici ostaju udubine (Krpmotić-Nemanić i Marušić, 2002).



**Slika 3.** Mehanizmi prijenosa tvari kroz epitel rožnice (preuzeto iz Pepić i sur., 2012)



**Slika 4.** Čvrste veze među stanicama (*tight junctions*) i hidrofilne pore paracelularnog puta (preuzeto iz Pepić i sur., 2012)

## **Stroma rožnice**

Stroma rožnice (*substantia propria corneae*) je središnja hidrofilna barijera rožnice ukupne debljine 300-500  $\mu\text{m}$ , što čini 90% debljine rožnice. Izgrađuju je pet tipova kolagenskih vlakana i dva tipa stanica (keratinociti i fibrociti) složenih u listove (200-250). Debljina svakog lista je 1,5 – 2,5  $\mu\text{m}$ , a pružaju čvrstoću i optičku transparentnost. Stroma rožnice sadrži približno 85% vode, što je čini izrazito hidrofilnom te je relativno propusna struktura, koja u normalnim uvjetima dopušta difuziju hidrofilnih tvari, ali predstavlja selektivnu prepreku lipofilnim lijekovima koji lako prolaze kroz epitel rožnice (Pepić, 2004; Alonso i Sánchez, 2003; Krmpotić-Nemanić i Marušić, 2002).

## **Endotel rožnice**

Između strome i endotelne membrane nalazi se Descemetova membrana koja je produkt endotela. Endotel rožnice je unutrašnji lipofilni dio rožnice ukupne debljine 5  $\mu\text{m}$ , građen od jednog sloja skvamoznih ili kubičnih stanica bogatih mitohondrijima koje su odgovorne za regulaciju protoka tekućine i hranjivih tvari između očne vodice i strome rožnice te omogućuje da očna vodica pasivnom difuzijom ide u smjeru strome. U slučaju većeg oštećenja funkcije endotela rožnice, stroma se prekomjerno hidratizira te nastaje edem strome i gubi se njena transparentnost (Pepić, 2004; Krmpotić-Nemanić i Marušić, 2002).

### **1.1.2. Bjeloočnica (*sclera*)**

Bjeloočnica je građena od gustih kolagenskih vlakana (28,8%) i pojedinih elastičnih vlakana (2%), proteoglikana (0,9%), proteina, stanica (3%) i vode (68%). Obuhvaća četiri petine površine očne jabučice. Ima mnogo otvora za prolaz vidnog živca, osjetnih i motoričkih živaca te za ulaz arterija i izlaz vena (Krmpotić-Nemanić i Marušić, 2002; Ledić, 1990b). Glavni mehanizam permeacije lijeka kroz bjeloočnicu je pasivna difuzija kroz hidrofilne pore unutar bjeloočnice. Relativno dobro je permeabilna za makromolekulske lijekove. Permeabilnost hidrofilnih polietilenglikola različite molekulske mase (PEG 200, PEG 400, PEG 600, PEG 1000) kroz bjeloočnicu upola je manja u odnosu na permeabilnost kroz spojnicu i 10 puta veća u odnosu na permeabilnost kroz rožnicu (Ranta i sur., 2006; Hamalainen i sur., 1997). Na bjeloočnicu se vežu mišići pokretači očne jabučice. Prednji dio bjeloočnice je spojen rijetkim vezivnim tkivom s očnom spojnicom (*tunica conjunctiva bulbi*) koja s unutarnje strane oblaže vjeđe (Krmpotić-Nemanić i Marušić, 2002; Keros i sur., 1999).



Nakon primjene na površinu oka, lijek se apsorbira transkornealnim putem - preko rožnice i/ili nekornealnim putem - preko spojnice i bjeloočnice. Spojnica je važna za intraokularnu i/ili sistemsku apsorpciju lijeka. Građena je od strome i višeslojnog cilindričnog epitela prekrivenog mikrovilima. Za razliku od epitela rožnice, epitel spojnice je deblji i ima vrčaste stanice koje izlučuju sluz (*mucus*) (Hosoya i sur., 2005). Epitel spojnice je ograničavajući čimbenik apsorpcije lijekova preko spojnice. Epitel spojnice ima dva puta veće pore paracelularnog puta i 16 puta veću gustoću takvih pora u odnosu na epitel rožnice. Stroma spojnice sadrži krvne i limfne žile, živce, žlijezde i njihove izvodne kanale, te melanocyte, fibroblaste, makrofage, mastocyte, plazma-stanice i limfocite (Hamalainen i sur., 1997). Spojnica pridonosi stvaranju prekornealnog suznog filma izlučivanjem elektrolita, tekućine i sluzi (Hosoya i sur., 2005).

### **1.1.3. Mrežnica (*retina*)**

Mrežnica je funkcionalno najvažniji dio oka te čini unutrašnju očnu ovojnici. Sastoji se od dvaju listova: vanjskog lista (*stratum pigmenti*) i unutarnjeg lista (*stratum cerebrale*). Vanjski list sadrži pigmentne stanice s zrcima i štapićima pigmenta, dok unutarnji list ima tri dijela, šarenični i cilijarni gdje nema osjetilnih stanica pa čine slijepi dio, *pars caeca*, te vidni dio, *pars optica*. Između slijepog i vidnog dijela mrežnice granični dio je nazupčana pruga *ora serrata*, udaljena 7 do 8 mm od rožničnog ruba. Mrežnica u stražnjem vidnom dijelu ima devet slojeva poredanih prema nutrini oka. U površinskom sloju uz pigmentni list nalaze se osjetilne stanice – čunjići (koji reagiraju na jaku svjetlost i njihova funkcija je središnji vid i osjet boja) i štapići (ostvaruju periferni vid, te obiluju pigmentom rodopsinom i omogućuju prilagodbu na oskudnu svjetlost/sumrak). Ostale slojeve oblikuju živčane stanice i živčana vlakna te krvne žile (Krpmotić-Nemanić i Marušić, 2002; Keros i sur., 1999). Intraretinalnu barijeru čini slojevita građa neuralne mrežnice koja je prepreka transretinalnoj difuziji makromolekula. Interfotoreceptorski sloj kojeg čine glikozaminoglikani i proteini razdvaja neuralnu mrežnicu od pigmentnog epitela mrežnice. Taj sloj oblaže vanjske i unutrašnje dijelove fotoreceptora. Značajan otpor difuziji tvari kroz neuralnu mrežnicu pružaju vanjska granična membrana te vanjski i unutrašnji mrežasti sloj (Bunt-Milam i sur., 1985).

## **Barijera krv-očna vodica**

Ovu barijeru čini endotel krvnih žila šarenice i nepigmentni epitel zrakastog tijela koji su povezani čvrstim međustaničnim vezama (*tight junctions*) te regulira prijenos lijekova između prednjih i stražnjih segmenata oka. Sprečava ulazak lijekova u dublja tkiva oka te sudjeluje u održavanju očne transparentnosti. Male lipofilne molekule mogu lakše i brže prijeći kroz čvrste međustanične veze i barijeru krv-očna vodica od velikih hidrofilnih molekula (Cholkar i sur., 2013).

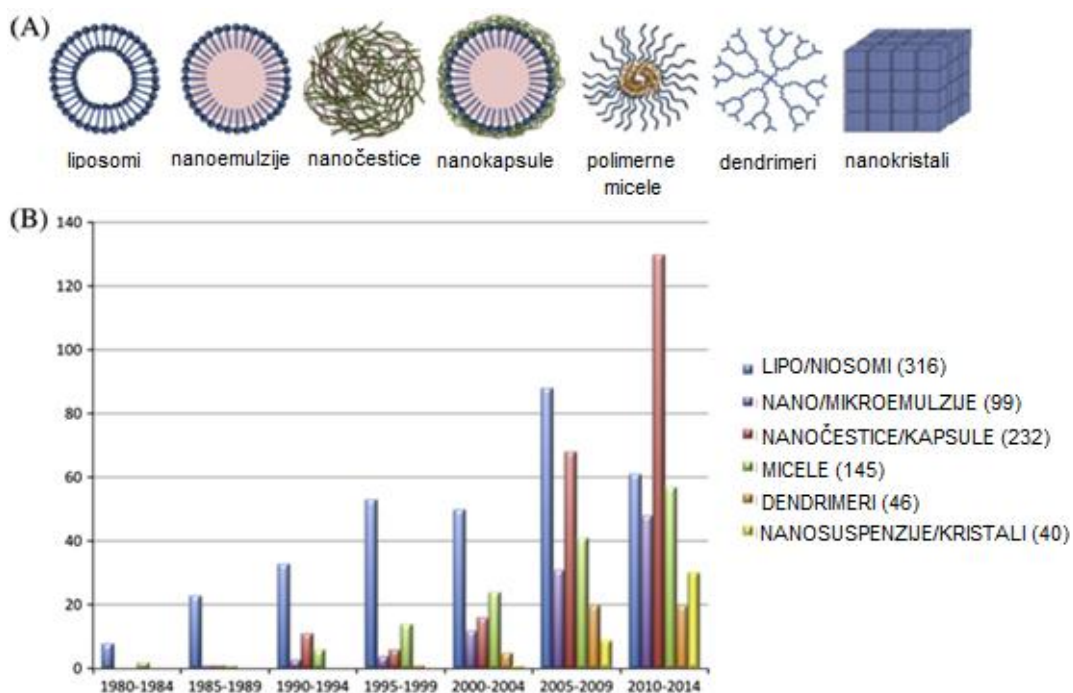
## **Barijera krv-mrežnica**

Ovu barijeru čini vanjska i unutrašnja barijera krv-mrežnica. Vanjsku barijeru čini pigmentni epitel mrežnice građen od jednog sloja visoko specijaliziranih stanica između neutralne mrežnice i žilnice. Biokemijske funkcije pigmentnog epitela su ključne u procesu vida, a to su fagocitoza vanjskih dijelova fotoreceptora, prijenos tvari između fotoreceptora i kapilara žilnice i konverzija retinoida. Čvrste veze među epitelnim stanicama učinkovito sprječavaju permeaciju tvari ovisno o veličini molekule (male molekule; CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>) i lipofilnosti. Unutrašnju barijeru krv-mrežnica čini endotel krvnih žila mrežnice i vrlo je slična krvno-moždanoj barijeri. Smještena je u stražnjem dijelu oka i razdvaja tkivo mrežnice od krvi iz sistemske cirkulacije. Unutrašnja barijera krv-mrežnica ograničava prijenos proteina i malih hidrofilnih molekula, dok lipofilne tvari relativno dobro permeiraju preko endotelnih stanica (Cholkar i sur., 2013; Hornof i sur., 2005).

### **1.2. Terapijski nanosustavi za oftalmičku primjenu**

Oftalmička primjena lijeka je jedno od najizazovnijih područja u farmaceutskoj industriji/tehnologiji. Razvoj formulacije za oftalmičku primjenu lijeka zahtjeva prevladavanje tkivne (biološke) barijere (različite slojeve rožnice, bjeloočnice, mrežnice, barijere krv-očna vodica i barijere krv-mrežnica) i dinamičke barijere (žilnice, očne vodice i suženje oka) oka. Formulacija za oftalmičku primjenu mora biti sterilna, materijali koji se koriste za pripremu terapijskog sustava moraju biti biokompatibilni i podnošljivi za tkivo oka. Ciljano mjesto na koje lijek treba doći određuje način primjene lijeka. Oftalmička primjena lijeka uključuje topikalnu, intraokularnu i periokularnu dostavu lijeka (Herrero-Vanrell i sur., 2013).

Općenito je prihvaćeno da nanotehnologija nudi mogućnost razvoja terapijskih sustava koji osiguravaju uspješno prevladavanje prepreka oftalmičke primjene lijeka. Uporaba nanosustava za oftalmičku primjenu lijekova započela je 80-ih godina prošlog stoljeća (Slika 5). Prednosti terapijskih nanosustava u odnosu na konvencionalne oftalmičke pripravke uključuju: (i) povećanje permeabilnosti uklopljenog lijeka, (ii) smanjenje razgradnje nestabilnog lijeka, (iii) produljeno zadržavanje lijeka na površini oka, (iv) poboljšanje interakcije s rožnicom/bioraspoloživosti i (v) mogućnost ciljane dostave lijeka (Reimondez-Troitiño i sur., 2015).



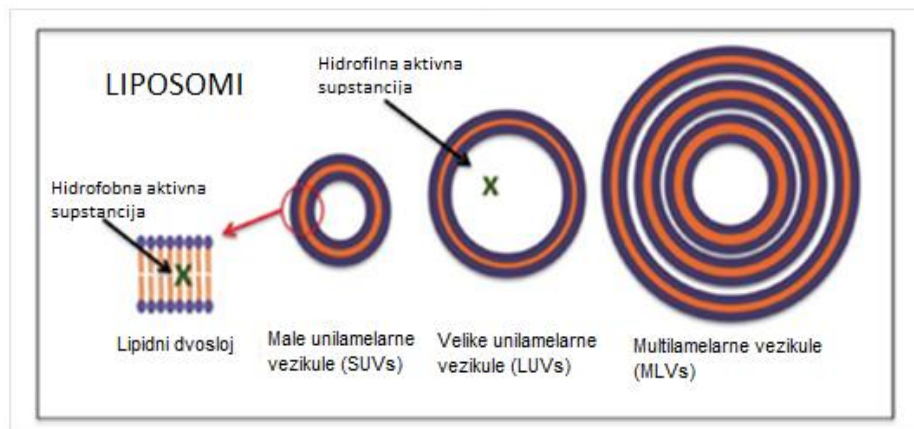
**Slika 5.** Shematski prikaz strukture različitih tipova nanosustava (A) i broj objavljenih radova koji opisuju njihovo korištenje za topikalnu oftalmičku primjenu lijekova od 1980. do danas (B). Podaci dobiveni iz Thomson Reuters Web of Science. (preuzeto iz Reimondez-Troitiño i sur., 2015)

### 1.2.1. Liposomi

Liposomi su sferične vezikule koje se sastoje od vodene jezgre okružene koncentričnim dvoslojem fosfolipida. Nastaju spontano kada se fosfolipidi amfibilne prirode dispergiraju u vodenom mediju. Veličina liposoma je u rasponu od 10 nm do 10  $\mu\text{m}$  (Tablica 1).

S obzirom na veličinu i broj lipidnih dvosloja liposomi se mogu podijeliti na male unilamelarne vezikule (*small unilamellar vesicles*, SUVs), velike unilamelarne vezikule (*large unilamellar vesicles*, LUVs) i multilamelarne vezikule (*multilamellar vesicles* MLVs) (Slika 6) (Herrero-Vanrell i sur., 2013).

Liposomi su prvi puta razvijani u svrhu poboljšanja dostave lijeka u rožnicu 80-tih godina prošlog stoljeća. Veliki broj istraživanja koja su uključivala oftalmičku primjenu liposoma bio je usmjeren na ispitivanje prijenosa lijeka kroz rožnicu (Reimondez-Troitiño i sur., 2015).



**Slika 6.** Struktura liposoma (preuzeto iz Herrero-Vanrell i sur., 2013)

**Tablica 1.** Klasifikacija liposoma prema njihovoj strukturi (preuzeto iz Herrero-Vanrell i sur., 2013)

Tip liposoma	Veličina
SUVs	~ 10 nm do 200 nm
LUVs	~ 200 nm do 1 $\mu\text{m}$
MLVs	>0,5 $\mu\text{m}$

Obećavajući su terapijski sustav za oftalmičku primjenu lijeka zbog svoje veličine, biokompatibilnosti, biorazgradljivosti i netoksičnosti. U liposome je moguće uklopiti i hidrofилne i lipofilne lijekove. Hidrofilni lijekovi se uklapaju/ugrađuju u vodenu jezgru, a lipofilni u lipidne dvosloje (Herrero-Vanrell i sur., 2013; Sahoo i sur., 2008).

Svojstva liposoma poput veličine i naboja ovise o lipidnom sastavu. Pozitivno nabijeni liposomi stupaju u elektrostatsku interakciju s negativno nabijenom površinom rožnice, te u odnosu na neutralne i /ili negativno nabijene liposome produljuju vrijeme zadržavanja lijeka u prekornealnom području te povećavaju bioraspoloživost lijeka u oku.

Osim površinskog naboja za oftalmičku primjenu je bitna i veličina liposoma, koja utječe na transport kroz rožnicu. Liposomi veličine 105-125 nm pronađeni su u mrežnici dok liposomi mikrometarske veličine nisu detektirani u stražnjem dijelu oka (Reimondez-Troitiño i sur., 2015).

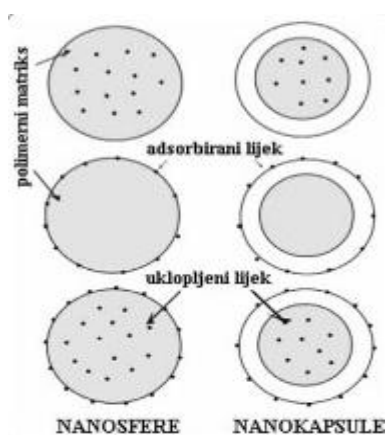
Uz navedene prednosti liposoma za oftalmičku primjenu lijeka, postoje i ograničenja poput kratkog roka trajanja, ograničenog kapaciteta uklapanja lijeka, korištenja agresivnih uvjeta pripreme i problema u sterilizaciji koji smanjuju mogućnost njihove primjene (Reimondez-Troitiño i sur., 2015).

### **1.2.2. Polimerne nanočestice**

Polimerne nanočestice definiraju se kao čvrsti nosači lijeka submikronske veličine (1 do 1000 nm). Pod pojmom nanočestica podrazumijevaju se nanosfere i nanokapsule (Slika 7). Nanosfere se sastoje od čvrste polimerne mreže matriksnog tipa, u kojoj lijek može biti homogeno raspodijeljen (čvrste otopine ili disperzije) ili može biti adsorbiran na površinu čestica. Nanokapsule su vezikularni sustavi kod kojih je lijek smješten u središtu čestice koja je okružena polimernom ovojnicom (Herrero-Vanrell i sur., 2013).

Polimerne nanočestice prvi put su predložene kao nosači za oftalmičku primjenu lijekova sredinom 80-tih godina prošlog stoljeća. Prototip polimernih nanočestica korišten za oftalmičku primjenu lijeka bile su poli-akril cijanoakrilatne nanočestice. Od tada je veliki broj polimera (primjerice kitozan, hijaluronska kiselina, karbopol, želatina) istraživani u svrhu razvoja nanočestica prikladnih za oftalmičku primjenu. Utvrđeno je da nanočestice izrađene od kationskih bioadhezivnih polimera osiguravaju najdulje zadržavanje lijeka na površini oka nakon primjene, te povećavaju bioraspoloživost lijeka u oku (Herrero-Vanrell i sur., 2013; Reimondez-Troitiño i sur., 2015).

Nanočestice male veličine pokazale su se prikladnim nosačima lijekova za liječenje bolesti stražnjeg dijela oka, mrežnice (Herrero-Vanrell i sur., 2013).



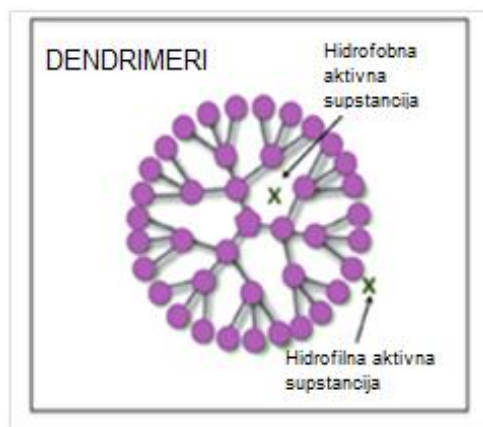
**Slika 7.** Različiti tipovi nanočestica sa uklopljenim lijekom (preuzeto iz Pepić i sur., 2011)

### 1.2.3. Dendrimeri

Dendrimeri su novi polimeri s velikim potencijalom u oftalmičkoj primjeni lijekova. Pojam dendrimer potječe od grčke riječi dendron što znači „drvo“ i meros što znači „dio“. Naziv zorno opisuje strukturu trodimenzionalne makromolekule, koja nalikuje strukturi drveta (Slika 8). Usprkos njihovoj velikoj molekularnoj masi (5000-500 000 g/mol) dendrimeri su dobro strukturalno definirani i male su polidisperznosti. Tipičan dendrimer sastoji se od tri glavne komponente: višefunkcionalne središnje jezgre, razgranate jedinice i površinskih skupina (Herrero-Vanrell i sur., 2013).

Primjena dendrimera kao nosača oftalmičkih lijekova tek je nedavno predložena. Do sada je najviše istraživana oftalmička primjena dendrimera kao nosača nukleinskih kiselina, iako postoje i istraživanja koja se odnose na primjenu hidrofilnih (antibiotici) ili lipofilnih (lijekovi za liječenje glaukoma) lijekova male molekulske mase. Najčešće korišteni dendrimeri u oftalmičkoj primjeni lijekova su: poliamidoamin (PAMAM), polipropilenimini (PPI) i fosforni dendrimeri. Općenito, topikalna oftalmička primjena dendrimera rezultira produljenjem vremena zadržavanja lijeka u prekornealnom području, te posljedičnim poboljšanjem bioraspodivnosti lijeka u oku i produljenjem terapijskog učinka.

Također je utvrđeno da se izvedba dendrimernih nosača može poboljšati modificiranjem njihove površine (primjerice pegiliranjem ili acetiliranjem) što istodobno rezultira i smanjenjem njihove toksičnosti (Reimondez-Troitiño i sur., 2015).



**Slika 8.** Struktura dendrimera (preuzeto iz Herrero-Vanrell i sur., 2013).

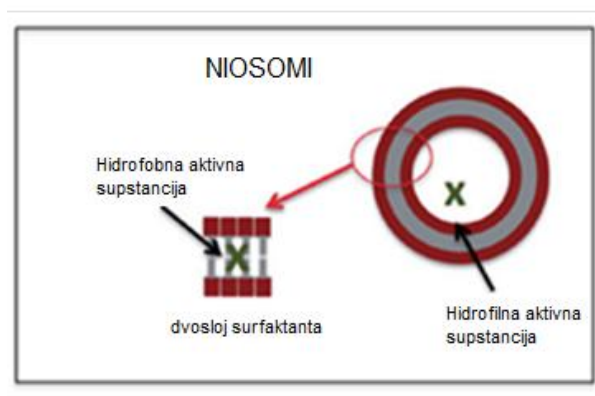
#### 1.2.4. Nanokristali

Nanokristali djelatne tvari pripadaju skupini suvremenih terapijskih nanosustava kojima se nastoje poboljšati farmaceutsko-tehnološka (primjerice topljivost, fizička i kemijska stabilnost) i/ili biofarmaceutska (primjerice permeabilnost i bioraspoloživost) svojstva djelatne tvari (Lovrić i sur., 2015). Odobreni lijekovi primjenjuju se isključivo oralnim i parenteralnim putovima, iako najnovija ispitivanja daju naznake da se u sljedećem periodu mogu očekivati i lijekovi u obliku nanokristala namijenjeni neparenteralnim putovima primjene među kojima je i oftalmička primjena.

Nanokristali djelatne tvari građeni su gotovo u potpunosti od djelatne tvari, dok samo mali dio takvih nanosustava čine pomoćne tvari (stabilizatori - površinski aktivne tvari). Osim povećanja topljivosti lijeka i brzine otapanja, nanokristali imaju veliki kapacitet prijanjanja koji može osigurati dulje zadržavanje lijeka u prekornealnom području i posljedično veću bioraspoloživost. Prijanjanje i internalizacija također ovise o površinski aktivnim tvarima u formulaciji, od kojih se najčešće koriste poloksameri i polisorbati (Reimondez-Troitiño i sur., 2015).

### 1.2.6. Niosomi

Niosomi nastaju samoorganiziranjem neionskih amfifilnih spojeva u vodenom mediju, formirajući dvoslojne vezikule veličine 0,5-10  $\mu\text{m}$  (Slika 9). Ti relativno novi terapijski sustavi zanimljivi su kao nosači u oftalmičkoj primjeni lijekova. Biorazgradljivi su, biokompatibilni i neimunogeni. Netoksični su, što proizlazi iz njihove neionske prirode. Slično liposomima, imaju sposobnost uklapanja hidrofilnih i lipofilnih lijekova, ali se odlikuju boljom kemijskom stabilnošću. Niosomi također pokazuju sličnosti i s mikroemulzijama, jer u svom sastavu imaju površinske aktivne tvari, što im omogućava povećanje permeabilnosti lijeka kroz rožnicu. Ostale prednosti niosoma su dobro širenje na površini oka i povećanje viskoznosti u odnosu na otopine lijekova (Herrero-Vanrell i sur., 2013; Sahoo i sur., 2008).



**Slika 9.** Struktura niosoma (preuzeto iz Herrero-Vanrell i sur., 2013).

### 1.3. Kitozan

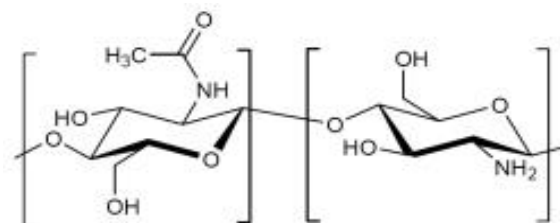
Kitozan je poliaminosaharid (2-amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glukan), velike molekulske mase. Nastaje deacetilacijom hitina koji je prisutan u skeletu rakova, kutikulama insekata i staničnoj stijenci većine gljivica. Primjena hitina ograničena je u usporedbi s primjenom kitozana, s obzirom da je hitin strukturno sličan celulozi i kemijski inertan. Acetamidna skupina hitina može se u alkalnom mediju deacetilirati, odnosno prevesti u amino skupinu koja je prisutna u strukturi kitozana (Slika 10). Slobodne amino skupine kitozana mogu se protonirati pri čemu kitozan postaje topljiv u vodenom mediju pri  $\text{pH} < 6,5$  (Herrero-Vanrell i sur., 2013; Basaran i Yazan, 2012).



Kitozan je prepoznat kao polimer izbora za izradu terapijskih sustava za oftalmičku primjenu zbog povoljnih bioloških svojstava kao što su biorazgradljivost (posredovana hidrolitičkim djelovanjem lizozima prisutnog u mucinu), biokompatibilnost, mukoadhezivnost, dobra stabilnost i niska toksičnost (Herrero-Vanrell i sur., 2013; Basaran i Yazan, 2012; Paolicelli i sur., 2009). Mukoadhezivnost kitozana uglavnom je posljedica elektrostatske interakcije između pozitivno nabijenih amino skupina kitozana i negativno nabijenih skupina mucina i bioloških struktura (ovisno o pH okoline), ali i formiranja vodikovih veza te hidrofobnih interakcija (Basaran i Yazan, 2012). Usto, kitozan djeluje i kao pospješivač apsorpcije preko epitela sluznice. Takav učinak pripisuje se reverzibilnom otvaranju međustaničnih čvrstih veza čime kitozan pospješuje paracelularni transport hidrofilnih djelatnih tvari (De la Fuente i sur., 2010).

Zahvaljujući navedenim svojstvima, kitozan poboljšava permeabilnost i povećava bioraspoloživost određenih topikalno primijenjenih oftalmičkih lijekova, duljim zadržavanjem u prekornealnom području i interakcijom s biološkom barijerom oka.

U izradi terapijskih (nano)sustava za oftalmičku primjenu kitozan se koristi sam ili u kombinaciji s drugim tvarima (alginat, lecitin...). Na taj način moguće je pripremiti terapijske sustave s duljim zadržavanjem na mjestu primjene i kontroliranim oslobađanjem djelatne tvari (Herrero-Vanrell i sur., 2013).



**Slika 10.** Stuktura kitozana (preuzeto iz Blažević i Milekić, 2015)

### 1.3.1. Topikalna oftalmička primjena otopina i nanočestica kitozana

#### *Otopine*

Najprihvatljiviji ljekoviti oblici za lokalnu oftalmičku primjenu su tekući oblici (vodene ili uljne otopine i vodene ili uljne suspenzije). Otopina kitozana, kao najjednostavniji tekući oblik kitozana, može se pripremiti pri različitim koncentracijama i upotrebom različitih vrsta kitozana (različite molekulske mase, različitih oblika soli i stupnja deacetilacije).

Obično se koriste kitozani velikog stupnja deacetilacije (> 60%), s obzirom da se topljivost kitozana povećava s povećanjem stupnja deacetilacije.

Otopina kitozana često se naziva i hidrogel. Hidrogelovi, po definiciji, lako prelaze iz tekućeg u gel stanje i obratno. Međutim, u oftalmologiji, nije jasno postavljena razlika između hidrogelova i vrlo viskoznih otopina. Otopine kitozana detaljno su okarakterizirane s obzirom na pseudoplastična i viskoelastična svojstva (Wang i Xu 1994; Mucha 1997).

Također je utvrđen sinergizam između reoloških svojstava i mukoadhezivnosti (Caramella i sur., 1999). Ista su istraživanja pokazala da se viskoznost i mukoadhezivnost mogu prilagođavati odabirom kitozana odgovarajuće molekulske mase i koncentracije kitozana. U većini istraživanja korištena je otopina kitozana molekulske mase veće od 70-100 kDa, u rasponu koncentracija od  $0,5 \pm 5\%$  (Felt i sur., 1999a, b; Alonso i Sánchez, 2003).

Prilagođavanje viskoznosti i viskoelastičnih svojstava otopine kitozana može se postići i dodatkom nekog drugog hidrofilnog polimera koji stupa u interakciju s kitozansom (npr. hijaluronska kiselina) (Alonso i Sánchez, 2003).

### *Nanočestice*

Kitozan je polimer izbora u pripravi biokompatibilnih i biorazgradljivih nanočestica kao terapijskog sustava za oftalmičku primjenu. Kitozanske nanočestice mogu se pripremiti primjenom nekoliko metoda. Metoda umrežavanja emulzija temelji se na kovalentnom umrežavanju reaktivnih funkcionalnih amino skupina kitozana s funkcionalnim skupinama umrežavajućeg sredstva. Metoda ionotropnog geliranja temelji se na nastajanju ionskih interakcija između polikationa kitozana i polianiona. Kitozanske vezikule i nanočestice mogu nastati i samoorganiziranjem kemijski modificiranog kitozana. Ostale metode pripreme kitozanskih nanočestica uključuju sušenje raspršivanjem, metodu koacervacije/precipitacije koja se temelji na netopljivosti kitozana u alkalnom mediju, emulzijsku metodu koalescencije kapljica koja se temelji na principima umrežavanja emulzija i precipitacije te metodu s inverznim micelama (Agnihotri i sur., 2004).

Velika prednost kitozanskih nanočestica je mogućnost pripreme pri blagim uvjetima. Optimiranjem procesnih parametara moguće je pripremiti čestice željene veličine i površinskog naboja te male polidisperznosti. U kitozanske nanočestice mogu se uklopiti različite djelatne tvari poput peptida, proteina i nukleinskih kiselina. Fizičko-kemijska svojstva kitozanskih nanočestica često se optimiraju ugradnjom drugih polimera kao što su poloksameri, ciklodekstrini, hijaluronska kiselina i alginat (Paolicelli i sur., 2009).

Potencijal kitozanskih nanočestica pri oftalmičkoj primjeni lijekova u više je istraživanja uspoređivan s otopinom kitozana, te je utvrđen snažniji afinitet kitozana za površinu oka kada je u obliku nanočestica nego u obliku otopine.

Primjerice, De Campos i suradnici (2002) pripravili su otopinu kitozana i kitozanske nanočestice s fluorescentno obilježenim kitozanom. Nakon topikalne oftalmičke primjene u zečeva intenzitet fluorescencije mjeren je u rožnici i spojnici. Utvrđeno je da kitozanske nanočestice stupaju u jaču interakciju s epitelom rožnice i spojnice u usporedbi s otopinom kitozana, osiguravajući dulje zadržavanje nanočestica na mjestu primjene (De Campos i sur., 2002).

### **1.3.2. Tolerancija i toksičnost kitozana *in vitro* i *in vivo***

Pri razvoju oftalmičkog terapijskog nanosustava vrlo je važno od samog početka razmatrati biokompatibilnost i toksičnost predloženog sustava, posebice ako je namijenjen kroničnoj primjeni. Biorazgradljivost nanosustava jedan je od glavnih uvjeta, s obzirom da se zahvaljujući biorazgradljivosti izbjegava nakupljanje nanočestica/polimera u tkivima oka.

Kitozan je poznat kao biorazgradljivi i biokompatibilni polimer, prikladan za razvoj terapijskih sustava namijenjenih za primjenu na različite sluznice. Kitozan se razgrađuje pomoću lizozima, koji je u velikoj koncentraciji prisutan u sluznici oka (Alonso i Sanchez, 2003). Felt i suradnici pokazali su da je kitozan prikladan polimer za razvoj topikalnih oftalmičkih pripravaka (Felt i sur., 1999a). Ispitivanjem biokompatibilnosti terapijskih nanosustava, utvrđeno je da sustavi odgovarajuće veličine čestica i male polidisperznosti ne izazivaju iritaciju te da su kompatibilni s tkivima oka (Bucolo i sur., 2008; Sahoo i sur., 2008). Brojna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja su i danas usmjerena na utvrđivanje biokompatibilnosti i sigurnosti primjene kitozanskih nanočestica.

Do sada su provedena *in vitro* ispitivanja toksikološkog profila kitozanskih nanočestica na imortaliziranim staničnim linijama epitela rožnice i spojnice (De Campos i sur., 2004; Rabea i sur., 2003).

Utvrđen je zadovoljavajući toksikološki profil kitozanskih nanočestica *in vitro*. Naime, vijabilnost stanica iznosila je više od 95% nakon izlaganja nanočesticama pri koncentraciji kitozana od 2 mg/ml. Slični rezultati dobiveni su u slučaju kompleksa kitozanskih nanočestica s liposomima (LCS-nanočestica) (Diebold i sur., 2007).

Vijabilnost stanica nakon izlaganja LCS-nanočesticama bila je veća u usporedbi s vijabilnosti stanica izloženih kitozanskim nanočesticama. Toksičnost kitozanskih i LCS-nanočestica ovisila je o njihovoj koncentraciji. Citotoksičnost kompleksa također je ispitana i na primarnoj staničnoj kulturi epitela spojnice. Nije utvrđena promjena morfologije stanica nakon 30-minutnog izlaganja LCS-nanočesticama.

Biokompatibilnost kitozanskih nanočestica može se poboljšati dodatkom drugih tvari u njihovoj pripravi. Primjerice, utvrđeno je značajno povećanje biokompatibilnosti nanočestica pripremljenih iz kitozana i hijaluronske kiseline u usporedbi s kitozanskim nanočesticama (De La Fuente i sur., 2008). Hijaluronska kiselina potiče proliferaciju i migraciju stanica, te se primjenjuje u oftalmologiji kao tvar koja potiče cijeljenje rane rožnice, te u pripravi umjetnih suza (Genasetti i sur., 2008; Camillieri i sur., 2004; Gomes i sur., 2004; Balazs i sur., 1972).

Ispitivanjima *in vivo* potvrđena je biokompatibilnost nanočestica na bazi kitozana s tkivima oka. Primjerice, ispitivanjem provedenim u kunića, utvrđena je dobra podnošljivost kitozanskih nanočestica nakon topikalne oftalmičke primjene u intervalima od 30 minuta kroz 6 sati, pri koncentraciji od  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  (De Salamanca i sur., 2006). Kao još jedan primjer mogu se navesti miješani micelarni nanosustavi kitozana i poloksamera s uklopljenim deksametazonom koji su se pokazali prikladnim za terapijsku primjenu u oftalmologiji. Ispitivani nanosustav nije izazvao oštećenja niti iritaciju oka pri kliničkom ispitivanju akutne iritacije oka u kunića (Pepić i sur., 2010).

#### **1.4. Melatonin**

Glaukom je jedan od vodećih uzroka sljepoće u svijetu. Bolest je karakterizirana oštećenjem vidnog živca. To patološko stanje u početku se javlja kao posljedica smanjenog protoka krvi u mrežnici, te postupno oštećuje mrežnicu počevši od periferije prema središtu mrežnice (Nucci i sur., 2007). Postoji nekoliko uzroka glaukoma, a to su povišeni očni tlak, ishemija očnog živca i oksidativni stres. Povišeni očni tlak (IOP) nastaje kao posljedica smanjenog oticanja očne vodice i smatra se jednim od glavnih faktora rizika u razvoju glaukoma. Epidemiološke studije pokazale su da se rizik od glaukoma povećava za 12% sa svakim povećanjem IOP-a za 1mmHg (Nemesure i sur., 2007). Iz tog razloga je liječenje glaukoma usmjereno na liječenje povišenog intraokularnog tlaka. Lijekovi koji se primjenjuju topikalno pri liječenju glaukoma mogu se svrstati u 5 glavnih skupina: to su derivati prostaglandina, beta-blokatori, inhibitori karboanhidraze, simpatomimetici i miotici.

Utvrđena je važnost kolinergičkog sustava u kontroli dinamike očne vodice, odnosno uloga aktivacije kolinergičkih komponenti ili blokade  $\beta$ -adrenoreceptora u održavanju normalnog toka očne vodice.

Usprkos relativno velikom izboru lijekova, još uvijek postoji potreba za potentnijim i selektivnijim lijekovima u liječenju glaukoma. Naime, procijenjeno je da će do 2020. godine broj oboljelih od glaukoma porasti na 80 milijuna ljudi (Leonardi i sur., 2015; Reimondez-Troitiño i sur., 2015; Mediero i sur., 2009; Lundmark i sur., 2007).

U posljednje vrijeme velika je pozornost usmjerena na melatonin (Slika 11) kao novi potencijalni lijek u liječenju glaukoma (Alcantara-Contreras i sur., 2011). Melatonin je neurohormon prisutan u bakterija, jednostaničnih eukariota, algi, gljiva, biljaka, životinja i ljudi. Vjerojatno je jedan od prvih regulatornih spojeva koji su se pojavili u živim organizmima (Pandi-Perumal i sur., 2006; Claustrat i sur., 2005).

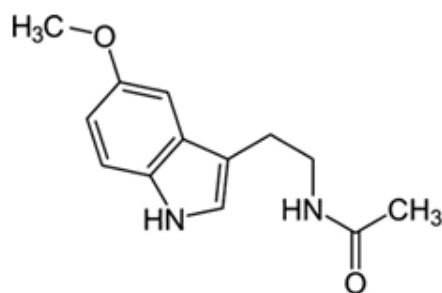
U ljudi se melatonin uglavnom sintetizira u epifizi. Lokalna sinteza melatonina događa se u nekoliko perifernih organa kao što su koštana srž, crijeva, probavni trakt, limfociti i različiti dijelovi oka, uključujući mrežnicu (Tosini i Menaker, 1998; Cardinali i Rosner, 1971a, b). U oku melatonin može regulirati pokrete rožnice (Pierce i Besharse, 1985), sintezu i oslobađanje dopamina (Doyle i sur., 2002) te očni tlak (Wiechmann i Wirsig-Wiechmann, 2001).

Melatonin se u oku sintetizira na isti način kao i u epifizi. Triptofan se prenese iz krvi te se prevodi u serotonin. Serotonin se zatim prevodi u N-acetil serotonin enzimom arilamin N-acetil transferaza (AA-NAT). N-acetil serotonin prevodi se u melatonin enzimom HIOMT (hidroksiindol-O metil transferaza). Otkriće aktivnosti HIOMT-e u mrežnici se povezuje sa sintezom melatonina u sisavaca te pretvorbom melatonina u serotonin (Cardinali i Rosner, 1971b).

U oku postoje receptori za melatonin, MT1 i MT2, preko kojih melatonin ostvaruje svoje djelovanje. To su receptori vezani na G proteine, kodirani MTNR1A i MTNR1B genima. Melatonin se može vezati i na MT3 receptor koji se identificira kao enzim kinon reduktaza II. Razina melatonina mijenja se tijekom 24-satnog ciklusa, uz vršnu koncentraciju noću (Wiechmann i Summers, 2008). Intraokularni tlak najviši je danju, a najniži noću kada je povećana razina melatonina. Iz tog razloga pretpostavljeno je da melatonin utječe na očni tlak (Leonardi i sur., 2015). Melatonin i njegovi analozi moduliraju očni tlak smanjenjem produkcije očne vodice (Bucolo i sur., 2013).

Kako je bioraspoloživost lijeka u oku ograničena uslijed specifične anatomske građe oka i zaštitnih fizioloških mehanizama, razvijaju se brojni terapijski sustavi s ciljem unaprjeđenja farmakokinetičkih svojstava oftalmičkih lijekova (Bucolo i sur., 2013, 2012; Pignatello i Puglisi, 2011). Tako je već ispitan potencijal nekih terapijskih nanosustava s melatoninom u liječenju povišenog očnog tlaka. Pripravljene su PLGA i PLGA-PEG nanočestice s melatoninom koje su osigurale produljeno oslobađanje i dulje zadržavanje melatonina u prekornealnom području (Musumeci i sur., 2013).

PLGA-PEG nanočestice pokazale su najbolji učinak na očni tlak u periodu od 8 h, u usporedbi s PLGA nanočesticama s melatoninom i otopinom melatonina. Uklapanje melatonina u kationske čvrste lipidne nanočestice osiguralo je učinak melatonina na povišeni očni tlak u periodu od 24 h (Leonardi i sur., 2015).



**Slika 11.** Struktura melatonina (preuzeto iz Musumeci i sur., 2013)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Oftalmička primjena lijeka jedan je od najvećih farmaceutsko-tehnoloških izazova. Naime, specifična anatomija i fiziologija oka ograničava dostavu molekule lijeka na ciljno mjesto djelovanja u potrebnoj količini i trajanju. Stoga se razvijaju inovativni terapijski sustavi koji mogu osigurati dulje vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu primjene, te veću bioraspoloživost lijeka u oku, odnosno prevladati tkivne (biološke) i dinamičke barijere oka (Herrero-Vanrell i sur., 2013; Basaran i Yazan, 2012).

Općenito je prihvaćeno da nanotehnologija nudi mogućnost razvoja terapijskih sustava koji osiguravaju uspješno prevladavanje prepreka oftalmičke primjene lijeka (Reimondez-Troitiño i sur., 2015). No, pri razvoju oftalmičkog terapijskog nanosustava vrlo je važno od samog početka razmatrati biokompatibilnost i toksičnost predloženog sustava te provoditi *in vitro* i *in vivo* ispitivanja s ciljem utvrđivanja sigurnosti njegove primjene.

Kitozan je polimer izbora za izradu oftalmičkih terapijskih sustava zbog povoljnih bioloških svojstava kao što su biorazgradljivost, biokompatibilnost, mukoadhezivnost, dobra stabilnost i niska toksičnost. Usto, kitozan djeluje i kao pospješivač apsorpcije preko epitela sluznice. Zahvaljujući navedenim svojstvima, kitozan poboljšava permeabilnost i povećava bioraspoloživost određenih topikalno primijenjenih oftalmičkih lijekova, duljim zadržavanjem u prekornealnom području i interakcijom s biološkom barijerom oka (Herrero-Vanrell i sur., 2013; Basaran i Yazan, 2012; Paolicelli i sur., 2009).

U novije vrijeme razvijaju se terapijski nanosustavi za oftalmičku primjenu neurohormona melatonina kao novog potencijalnog lijeka u liječenju povišenog očnog tlaka (Musumeci i sur., 2013; Leonardi i sur., 2015). U oku postoje receptori za melatonin, MT1 i MT2, preko kojih ostvaruje svoje djelovanje. Razina melatonina mijenja se tijekom 24-satnog ciklusa, uz vršnu koncentraciju noću (Wiechmann i Summers, 2008). Očni tlak najviši je danju, a najniži noću kada je povećana razina melatonina. Iz tog razloga pretpostavljeno je da melatonin utječe na očni tlak (Leonardi i sur., 2015).

Cilj ovog rada je ispitati biokompatibilnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom *in vitro*, koristeći immortalizirane stanice humanog epitela rožnice (HCE-T), kako bi se procijenila sigurnost njihove oftalmičke primjene u svrhu liječenja povišenog očnog tlaka.

Specifični ciljevi:

- Pripraviti lecitinske i lecitinsko-kitozanske nanočestice s uklopljenim melatoninom u masenom omjeru lecitina i melatonina 1:5.
- Odrediti fizičko- kemijska svojstva pripremljenih nanočestica:
  - veličinu i zeta potencijal nanočestica
  - sadržaj uklopljenog lijeka
- *In vitro* oslobađanje uklopljenog melatonina iz lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica.
- Ispitati biokompatibilnost lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom praćenjem metaboličke aktivnosti stanica epitela rožnice *in vitro* nakon izlaganja suspenzijama nanočestica.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

U izradi ovog diplomskog rada korišteni su melatonin (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Njemačka), kitozan klorid (Protasan UP CL 113, stupanj deacetilacije 86%, viskoznost 1% otopine 13 mPa s, Novamatrix, Norveška) i lecitin S45 (Lipoid GmbH, Njemačka). Ostale korištene kemikalije bile su od proizvođača Kemig (Hrvatska). Etanol (96%) je korišten za pripravu otopina lecitina. Otopina NaCl (10mM) korištena je za razjeđivanje suspenzija nanočestica prije mjerenja zeta potencijala. Acetatni pufer (pH 5,8), korišten kao receptorski medij pri ispitivanju oslobađanja melatonina *in vitro*, pripremljen je miješanjem 0,2 M natrijevog acetata i 0,2 M octene kiseline u volumnom omjeru 86:14. Pufer balansiran Hankovim solima (engl. *Hank's balanced salt solution*) pH 6,0, pripremljen je otapanjem bezvodnog kalcijevog klorida ( $\text{CaCl}_2$  bezvodni; 140 mg  $\text{l}^{-1}$ ), magnezijevog klorida ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ; 100 mg  $\text{l}^{-1}$ ), magnezijevog sulfata ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 100 mg  $\text{l}^{-1}$ ), kalijevog klorida (KCl; 400 mg  $\text{l}^{-1}$ ), kalijevog dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 60 mg  $\text{l}^{-1}$ ), natrijevog bikarbonata ( $\text{NaHCO}_3$ ; 350 mg  $\text{l}^{-1}$ ), natrijevog klorida (NaCl; 8000 mg  $\text{l}^{-1}$ ), dinatrijevog hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  bezvodni; 48 mg  $\text{l}^{-1}$ ), D-glukoze (1000 mg  $\text{l}^{-1}$ ) i 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonske kiseline (HEPES; 30 mM) u pročišćenoj vodi.

## **3.2. METODE**

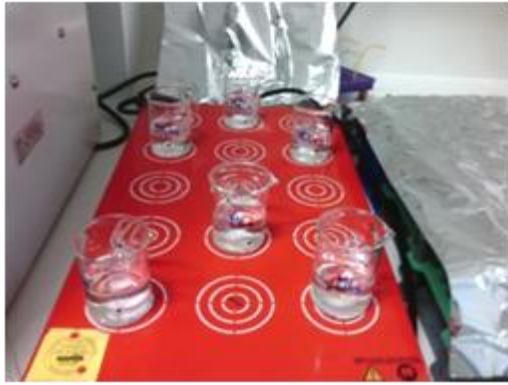
### **3.2.1. Priprava nanočestica**

Otopina kitozan klorida koncentracije  $10 \text{ mg l}^{-1}$  pripravljena je u pročišćenoj vodi. Otopina lecitina koncentracije  $25 \text{ mg ml}^{-1}$  pripravljena je u 96 % etanolu. Melatonin je otopljen u etanolnoj otopini lecitina u koncentraciji od  $5 \text{ mg ml}^{-1}$ , odnosno u masenom omjeru prema lecitinu od 1:5.

Otopina kitozana (0,25 ml) razrijeđena je pročišćenom vodom do volumena od 23 ml. Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom pripravljene su injektiranjem 2 ml etanolne otopine lecitina i melatonina kroz iglu unutarnjeg promjera 0,75 mm, u 23 ml razrijeđene otopine kitozana uz miješanje na magnetskoj miješalici (900 okr/min). Koncentracija kitozana u suspenziji nanočestica iznosila je  $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ , a maseni omjer lecitina i kitozana 20:1. Lecitinske nanočestice s melatoninom pripravljene su injektiranjem 2 ml etanolne otopine lecitina i melatonina u 23 ml pročišćene vode. Lecitinsko-kitozanske i lecitinske nanočestice bez melatonina (prazne nanočestice) pripravljene su opisanim postupcima uz izostavljanje melatonina.

### **3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja melatonina**

Uspješnost uklapanja melatonina određena je metodom dijalize (Slika 12) kojom se odvaja neuklopljeni lijek od nanočestica s uklopljenim lijekom. Odgovarajući volumen (4 ml) suspenzije nanočestica s melatoninom stavljen je u dijalizacijsku vrećicu od celuloza acetata (Spectra/Por®, MW cut-off 12000-14000 Da, Medicell International Ltd, UK). Napunjena dijalizacijska vrećica prenesena je u čašu napunjenu sa 100 ml pročišćene vode (receptorski medij). Uz stalno miješanje na magnetskoj miješalici brzinom od 30 okr/min, u određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci (2 ml) receptorskog medija. Uzeti volumen nadoknađivan je svježom pročišćenom vodom. Nakon razrjeđivanja uzoraka s 1 ml pročišćene vode, određena koncentracija je melatonina UV-Vis spektrofotometrom ( $\lambda=278 \text{ nm}$ ; Cary 50, Varian Inc., SAD). Dijaliza suspenzije nanočestica je prekinuta kada su u uzastopnim uzorcima receptorske faze izmjerene jednake koncentracije lijeka (nakon 120 min).



**Slika 12.** Metoda dijalize

Uspješnost uklapanja lijeka izračunata je prema jednadžbi:

$$UU = \frac{[\text{ukupni lijek}] - [\text{neuklopljeni lijek}]}{[\text{ukupni lijek}]} \times 100$$

Sadržaj melatonina u nanočesticama (engl. *drug loading*, DL(%)) izračunat je prema jednadžbi:

$$DL (\%) = \frac{[\text{ukupni lijek}] - [\text{neuklopljeni lijek}]}{[\text{masa nanočestica}]} \times 100.$$

Sadržaj melatonina ( $C_M$ ) u suspenziji nanočestica izračunat je prema jednadžbi:

$$C_M (\mu\text{gml}^{-1}) = \frac{[\text{ukupni lijek}] - [\text{neuklopljeni lijek}]}{[\text{volumen suspenzije nanočestica}]}$$

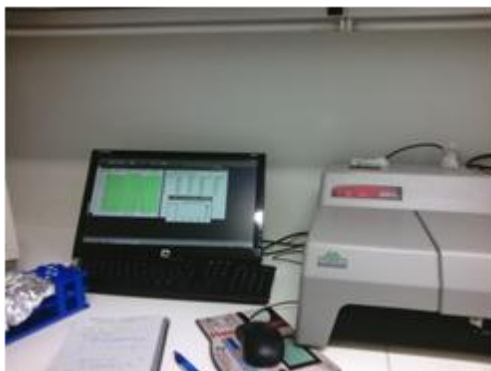
Dijalizirani uzorci suspenzija nanočestica korišteni su u svim daljnjim ispitivanjima.

### 3.2.3. Određivanje veličine nanočestica

Veličina lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica određena je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*; PCS) (Zetasizer 3000 HS, Malvern Instruments, Malvern, UK) (Slika 13) nakon razređivanja suspenzija nanočestica pročišćenom vodom. PCS metodom se određuje veličina dispergiranih čestica u području od 2 nm do 3  $\mu\text{m}$ . Uzorak se obasjava monokromatskom koherentnom 10 mW He-Ne laserskom zrakom ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) te se bilježi intenzitet svjetlosti raspršene na česticama pod kutom od  $90^\circ$ . Stalno gibanje dispergiranih čestica (Brownovo gibanje) rezultira fluktuiranjem intenziteta raspršene svjetlosti tijekom vremena. Promjer čestica dobiven PCS metodom naziva se i hidrodinamički promjer ( $R_H$ ). Mjerenja su provedena pri  $25^\circ\text{C}$ .

### 3.2.4. Određivanje zeta-potencijala nanočestica

Zeta-potencijal lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica određen je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (PCS) (Zetasizer 3000 HS) (Slika 13) nakon razrjeđivanja suspenzije nanočestica s 10 mM otopinom NaCl. Vrijednost zeta-potencijala određuje se indirektnim mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica upotrebom 10 mW He-Ne lasera. U promjenjivom električnom polju nabijene se čestice gibaju i raspršuju laserske zrake. Intenzitet raspršene svjetlosti mijenja se frekvencijom koja ovisi o brzini gibanja čestica. S obzirom na detektirane fotone svjetlosti, proizlazi spektar frekvencija iz kojeg se računa elektroforetska pokretljivost, odnosno zeta-potencijal. Mjerenja su provedena pri 25°C.



**Slika 13.** Zetasizer 3000 HS, Malvern Instruments, Malvern, UK

### 3.2.5. *In vitro* oslobađanje melatonina iz nanočestica

Ispitivanje oslobađanja melatonina iz lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica provedeno je metodom dijalize. Odgovarajući volumen suspenzije nanočestica s uklopljenim melatoninom (250 µg) stavljen je u dijalizacijsku vrećicu od celuloza acetata (Spectra/Por® , MW cut-off 12 000 - 14 000 Da, Medicell International Ltd, UK). Zatim je dijalizacijska vrećica prenesena u 30 ml acetatnog pufera pH 5,8 (receptorski medij), čime su osigurani uvjeti topljivosti za melatonin. Uz neprekidno miješanje na magnetskoj miješalici (30 okr/min), iz receptorskog medija uzimani su uzorci (1 ml) u određenim vremenskim intervalima (svakih 15 minuta kroz prva 2 sata i svakih 20 minuta kroz naredna 3 sata). Uzeti volumen nadoknađivan je svježim acetatnim puferom. Uzorci su zatim razrijeđeni s 2 ml acetatnog pufera. Koncentracija oslobođenog melatonina mjerena je UV-Vis spektrofotometrom ( $\lambda=278$  nm) (Cary 50, Varian Inc., SAD).

### 3.2.6. Stanična linija i uvjeti uzgoja

U ovom radu korištene su imortalizirane stanice humanog epitela rožnice (HCE-T; RIKEN Cell Bank, Japan). Stanice su uzgajane u sterilnim uvjetima u tikvicama za uzgoj stanica površine 25, 75 i 150 cm<sup>2</sup> ili na pločama sa 24 jažice (TPP, Švicarska) pri 37°C, 5% CO<sub>2</sub> i 95% relativne vlažnosti. Konfluentnost je kontrolirana invertnim mikroskopom (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka). Za uzgoj HCE-T stanica kao hranidbeni medij korišten je DMEM/F12 (Lonza, Švicarska) koji je sadržavao fetalni goveđi serum (5%, Biosera, Francuska), inzulin (5 µgml<sup>-1</sup>, Applichem, Njemačka), dimetil sulfoksid (0,5%, Applichem), epidermalni faktor rasta (10 ngml<sup>-1</sup>, Applichem), i Penicilin/Streptomycin/Amfotericin B (Lonza).

Nakon postizanja 80-90% konfluentnosti, stanice su presađivane u novu tikvicu. Prilikom presađivanja medij je uklonjen te su stanice isprane fosfatnim puferom (PBS, Lonza). Stanice su potom isprane 0,02 % (*m/V*) otopinom EDTA (Lonza) te inkubirane s 0,25 % (*m/V*) otopinom tripsina (Lonza) pri 37°C. Nakon odvajanja stanica od podloge učinak tripsina je inhibiran dodatkom DMEM/F12 medija u volumnom omjeru prema tripsinu 3:2. Stanični medij je mijenjan svaka dva dana.

### 3.2.7. Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica *in vitro*

U svrhu određivanja potencijalne citotoksičnosti ispitivanih nanočestica, HCE-T stanice nasadene su na ploče s 24 jažice (TPP, Švicarska) pri gustoći od 2×10<sup>4</sup> stanica/jažici nakon čega im je bilo potrebno 2 dana do postizanja odgovarajuće konfluentnosti. Suspenzije nanočestica razrijeđene su HBSS puferom (pH 6,0) kako bi se dobio raspon (relevantnih) koncentracija kitozana od 2,5, 10 ili 20 µg ml<sup>-1</sup>. Prije tretiranja stanica, stanični medij je uklonjen i stanice isprane HBSS puferom (pH 6,0). Stanice su zatim izložene suspenzijama nanočestica u trajanju od 30 minuta. Stanice inkubirane u HBSS-u predstavljale su negativnu kontrolu. Kao kontrole korištene su i otopina kitozana (u koncentraciji od 2,5, 10 ili 20 µg ml<sup>-1</sup>) i otopina melatonina (u koncentraciji od 2,5, 10 ili 20 µg ml<sup>-1</sup>).

Nakon 30 minutnog tretiranja, stanice su dvaput isprane HBSS-om i inkubirane u svježem staničnom mediju (500 µl/jažici) kroz 24 h. Vijabilnost stanica određena je MTT testom. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid] (Sigma, Njemačka) test je kolorimetrijski test za ispitivanje metaboličke aktivnosti stanica.

Otopina MTT je žute boje, a stanice pomoću NAD(P)H – ovisne oksidoreduktaze imaju sposobnost prevoditi MTT u vodi netopljivi formazan koji je ljubičaste boje. Nastali ljubičasti kristali formazana topljivi su u organskim otapalima. Intenzitet boje mjeri se spektrofotometrijski, a izmjerena apsorbancija izravno je proporcionalna koncentraciji formazana, odnosno metaboličkoj aktivnosti stanica. Otopina MTT-a ( $5 \text{ mg ml}^{-1}$ ), priređena u fosfatnom puferu (pH 6,0), dodana je u medij u volumnom omjeru 1:10. Tako tretirane stanice inkubirane su 2 sata pri  $37^\circ\text{C}$ . Nakon toga im je uklonjen medij, stanice lizirane i formazan otopljen dodatkom kiselog izopropanola koji je pripremljen dodatkom  $100 \mu\text{l}$  koncentrirane klorovodične kiseline na  $30 \text{ mL}$  izopropanola. Količina formazana određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od  $570 \text{ nm}$  (Victor3, PerkinElmer, SAD). Metabolička aktivnost izražena je kao relativna u odnosu na kontrolne, netretirane stanice inkubirane u HBSS puferu. Sva mjerenja rađena su u triplikatu.

### **3.2.8. Statistička analiza**

Za statističku analizu podataka korišten je 1-way ANOVA test nadopunjen multiparametarskim Tukey's post-hoc testom (granica značajnosti  $P < 0,05$ ). Računanje je provedeno pomoću GraphPad Prism programa (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA; [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1. Priprava lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom**

Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom (MLC) pripravljene su injektiranjem etanolne otopine lecitina i melatonina u otopinu kitozana uz miješanje, pri čemu nastaju nanočestice uslijed ionske interakcije između negativno nabijenog lecitina i pozitivno nabijenog kitozana. Korištena metoda priprave odabrana je zbog jednostavnosti i reproducibilnosti (Hafner i sur., 2011; Hafner i sur., 2009). Maseni omjer lecitina i kitozana iznosio je 20:1, a maseni omjer između melatonina i lecitina 1:5. Usporedbe radi, pripravljene su i lecitinske nanočestice s melatoninom (ML), te nanočestice bez melatonina (prazne nanočestice). Prazne lecitinsko-kitozanske nanočestice označene su kao LC, dok su prazne lecitinske nanočestice označene oznakom L.

Lecitin je smjesa prirodnih fosfolipida koja se smatra sigurnim i biokompatibilnim ekscipijensom. Omogućuje dobro uklapanje lipofilnih lijekova i njihovo produljeno oslobađanje te se često koristi u pripravi različitih terapijskih nanosustava (Hafner i sur. 2009; Bhatta i sur., 2012). U ovom radu korišten je lecitin Lipoid S45 koji sadrži fosfatidilkolin (54,9%), fosfatidiletanolamin (16,9%), lizofosfatidilkolin (1,0%) te masne kiseline čiji je sadržaj izražen u postotku u odnosu na ukupnu količinu masnih kiselina: palmitinsku (18%), stearinsku (3%), oleinsku (10%), linoleinsku (60%), linolensku (5%); te manji sadržaj triglicerida i DL-R-tokoferola (0,8%).

U izradi lecitinsko-kitozanskih nanočestica korišten je kitozan klorid stupnja deacetilacije 86%, viskoznosti 1% otopine 13 mPas.

Djelatna tvar uklopljena u nanočestice je melatonin koji modulira očni tlak smanjenjem produkcije očne vodice (Bucolo i sur., 2013).

### **4.2. Uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice**

Uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice određena je metodom dijalize kojom je odijeljen neuklopljeni lijek od nanočestica s uklopljenim lijekom (Slika 12). Uspješnost uklapanja lijeka (UU) odnosi se na sadržaj lijeka uklopljenog u nanočestice, izražen u postotku prema ukupnoj količini lijeka u pripravku.

Iz uspješnosti uklapanja lijeka izračunat je sadržaj uklopljenog lijeka, tj. postotni udio uklopljenog lijeka u odnosu na ispitivanu količinu nanočestica (DL; Tablica 2), odnosno količina uklopljenog lijeka sadržana u jediničnom volumenu suspenzije nanočestica (koncentracija melatonina u suspenziji nanočestica,  $C_M$ ; Tablica 2). Navedeni parametri pripremljenih (suspenzija) lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica prikazani su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Uspješnost uklapanja i sadržaj melatonina u lecitinskim i lecitinsko-kitozanskim nanočesticama

	UU (%)	DL (%)	$C_M$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
ML	$28,0 \pm 5,2$	$6,0 \pm 1,2$	$126,4 \pm 29,0$
MLC	$32,8 \pm 4,8$	$6,6 \pm 1,0$	$147,6 \pm 25,9$

UU (%), uspješnost uklapanja: sadržaj lijeka/teorijski sadržaj lijeka  $\times 100$

DL (%), sadržaj lijeka/ispitivana količina nanočestica  $\times 100$

$C_M$  ( $\mu\text{gml}^{-1}$ ), sadržaj lijeka/volumen suspenzije nanočestica

Postignuta je zadovoljavajuća uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice ( $28,0 \pm 5,2$  % za ML te  $32,8 \pm 4,8$  % za MLC nanočestice), što odgovara koncentraciji melatonina u suspenziji nanočestica od  $126,4 \pm 29,0 \mu\text{g ml}^{-1}$  za ML te  $147,6 \pm 25,9 \mu\text{g ml}^{-1}$  za MLC nanočestice. Sadržaj uklopljenog melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice (MLC) bio je veći od sadržaja uklopljenog melatonina u odgovarajuće lecitinske nanočestice (ML), što je u skladu s literaturnim navodima (Hafner i sur., 2009).

Dijalizirane suspenzije nanočestica korištene su u svim daljnjim ispitivanjima.

### 4.3. Veličina i zeta potencijal nanočestica

Veličina nanočestica određena je u dijaliziranim suspenzijama nakon odgovarajućeg razrjeđanja pročišćenom vodom. Uz srednji promjer nanočestica određen je i indeks polidisperznosti koji predstavlja mjeru širine raspodjele veličina čestica. Vrijednosti indeksa polidisperznosti kreću se od 0 za monodisperzni sustav do 1 za potpuno heterodisperzni sustav. Zeta potencijal nanočestica određen je u dijaliziranim suspenzijama nakon odgovarajućeg razrjeđanja 10 mM otopinom NaCl. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 3.



**Tablica 3.** Veličina i zeta potencijal dijaliziranih uzoraka lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica s uklopljenim melatoninom

	Veličina (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)
ML	76,5 ± 5,1	0,520 ± 0,114	-46,5 ± 4,0
L	66,3 ± 1,8	0,467 ± 0,027	-44,5 ± 5,5
MLC	222,8 ± 1,0	0,317 ± 0,083	21,4 ± 0,4
LC	231,1 ± 9,3	0,334 ± 0,086	22,1 ± 0,8

Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n = 3).

PDI, indeks polidisperznosti

Srednji promjer lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom (MLC) iznosio je 222,8 ± 1,0 nm, dok su lecitinske nanočestice s melatoninom (ML) bile srednjeg promjera od 76,5 ± 5,1 nm. Jednako tako odnosili su se i srednji promjeri praznih lecitinsko-kitozanskih (LC) i lecitinskih (L) nanočestica. Iz navedenih rezultata proizlazi da je uvođenje kitozana u sustav rezultiralo povećanjem srednjeg promjera nanočestica uslijed ionske interakcije između negativno nabijenog lecitina i pozitivno nabijenih amino skupina kitozana (Hafner i sur., 2009). Uklapanje melatonina nije značajnije utjecalo na veličinu nanočestica, što je u skladu s literaturnim navodima (Hafner i sur., 2009).

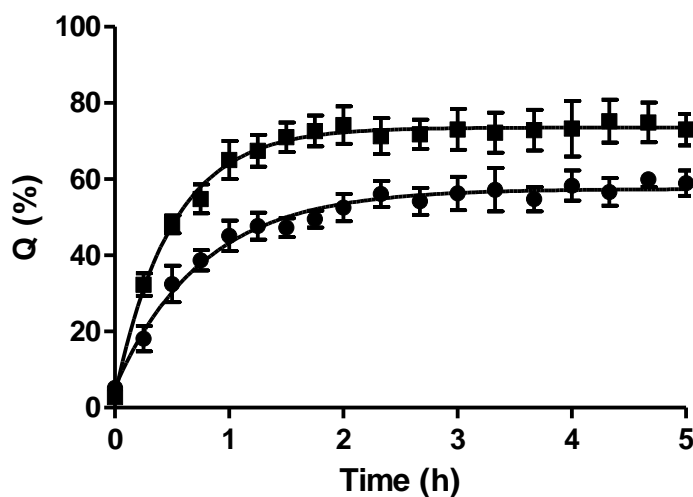
Pripravljene suspenzije nanočestica karakterizirane su relativno širokom raspodjelom veličina čestica na što ukazuju vrijednosti indeksa polidisperznosti prikazane u Tablici 3. Slična polidisperznost nanočestica pripremljenih s kitozonom ili derivatima kitozana često se navodi u literaturi. Uzrok tome može biti velika polidisperznost (molekulskih masa) prirodnog polimera kitozana (Hafner, 2008).

Vrijednosti zeta-potencijala promijenile su se od negativnih za lecitinske nanočestice s melatoninom (ML; -46,5 ± 4,0 mV) i prazne lecitinske nanočestice (L; -44,5 ± 5,5 mV) do pozitivnih za lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom (MLC; 21,4 ± 0,4 mV) i prazne lecitinsko-kitozanske nanočestice (LC; 22,1 ± 0,8 mV). Negativne vrijednosti zeta potencijala ML i L nanočestica posljedica su negativnog naboja lecitina, a pozitivan zeta potencijal MLC i LC nanočestica proizlazi iz pozitivno nabijenih amino skupina kitozana na površini lecitinsko-kitozanskih nanočestica. Naime, kitozan je pozitivno nabijen u otopinama pri pH vrijednostima ispod pKa kitozana (~6,5). Kako se pH sustava približava pKa vrijednosti kitozana, smanjuje se broj ioniziranih amino skupina kitozana (Sonvico i sur., 2006).

Zeta-potencijal lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom nije se značajnije razlikovao od zeta-potencijala odgovarajućih praznih nanočestica, iz čega se može zaključiti da uklapanje melatonina nije utjecalo na površinski naboj nanočestica, odnosno da je melatonin uklopljen unutar lipofilnih domena nanočestica.

#### 4.4. *In vitro* oslobađanje melatonina iz nanočestica

Ispitivanje oslobađanja melatonina iz pripremljenih nanočestica provedeno je metodom dijalize uz acetatni pufer (pH 5,8) kao receptorski medij pri čemu su osigurani uvjeti topljivosti za melatonin. Metoda dijalize smatra se najprikladnijom metodom za određivanje profila oslobađanja lijeka iz koloidnih terapijskih sustava (Modi i Anderson, 2013; Zambito i sur., 2012). S obzirom da su uvjeti pri određivanju profila oslobađanja metodom dijalize neovisni o stvarnoj primjeni sustava, na temelju dobivenih rezultata nije moguće predvidjeti profil oslobađanja lijeka *in vivo*, već je metoda prikladna za provođenje ispitivanja koje ima za cilj usporediti različite formulacije. U ovom slučaju, moguće je utvrditi ima li dodatak kitozana u sustav utjecaja na kinetiku oslobađanja melatonina iz nanočestica.



**Slika 14.** Profil oslobađanja melatonina iz lecitinskih(■) i lecitinsko-kitozanskih nanočestica (●) Ispitivanje je provedeno metodom dijalize uz acetatni pufer (pH 5,8) kao receptorski medij. Prikazane su srednje vrijednosti kumulativnog udjela oslobođenog melatonina ( $Q \pm SD$ ) ( $n = 3$ ).

Profili oslobađanja melatonina iz lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica prikazani su na Slici 14. Oba sustava karakterizirana su produljenim oslobađanjem melatonina. Brzina oslobađanja melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica bila je manja u odnosu na brzinu oslobađanja melatonina iz lecitinskih nanočestica ( $t_{50\%}$  za MLC i ML nanočestice iznosio je redom 1,75 i 0,75 h). Ta zapažanja u skladu su s literaturnim navodima (Hafner i sur., 2009).

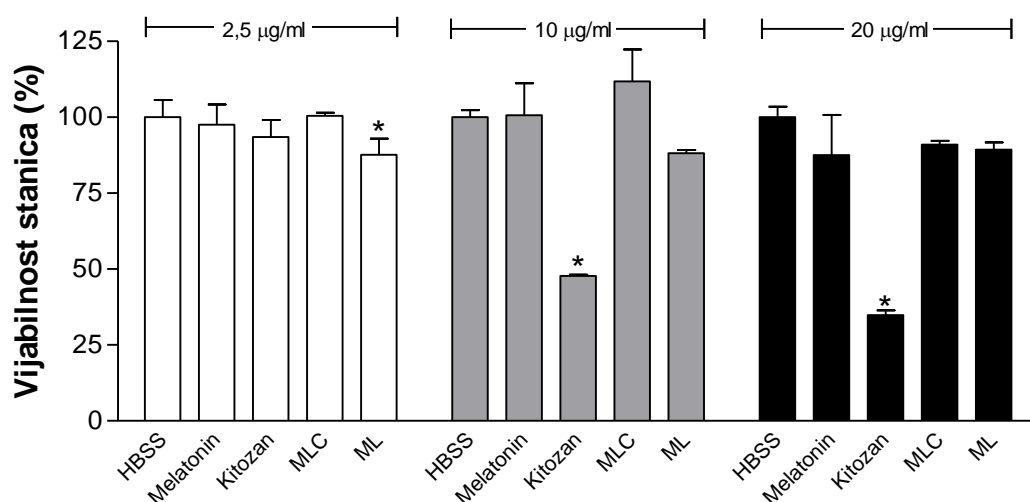
Kako je, pri postupku dijalize, pojava lijeka u receptorskom mediju posljedica dvaju procesa: (a) oslobađanja lijeka iz nosača u kontinuiranu fazu u donorskom odjeljku i (b) difuzije lijeka kroz dijalizacijsku membranu iz donorskog u receptorski odjeljak, svaki od ta dva procesa može ograničavati brzinu dijalizacijskog procesa. S obzirom da je difuzija melatonina kroz dijalizacijsku membranu u slučaju vodene otopine melatonina bila značajno brža ( $t_{50\%}$  0,25 h; Blažević i Milekić, 2015) nego u slučaju ispitivanih nanočestica, može se zaključiti da je, u slučaju nanočestica, profil oslobađanja melatonina određen oslobađanjem melatonina iz nanočestica u kontinuiranu fazu, a ne difuzijom kroz dijalizacijsku membranu.

#### **4.5. Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica *in vitro***

Razmatranje biokompatibilnosti i toksičnosti oftalmičkog terapijskog sustava već u ranoj razvojnoj fazi od posebne je važnosti, osobito ako je terapijski sustav namijenjen kroničnoj primjeni. Rezultati dobiveni u ispitivanjima provedenim u kunića, ukazuju na dobru podnošljivost otopine kitozana nakon lokalne oftalmičke primjene (Di Colo i sur., 2004; Felt i sur., 1999a). Provedena su i brojna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja biokompatibilnosti i sigurnosti primjene terapijskih nanosustava temeljenih na kitozanu (De la Fuente i sur., 2010). *In vitro* ispitivanja provedena su na imortaliziranim staničnim linijama dobivenih iz epitela rožnice (HCE) i spojnice (Chang and NHC-IOBA cells) (De la Fuente i sur., 2008; Diebold i sur., 2007), a početna izvješća upućivala su na prihvatljiv toksikološki profil kitozanskih nanočestica, s obzirom da se vijabilnost stanica nije smanjila za više od 5 % nakon izlaganja sustavima pri koncentraciji kitozana od 2 mg/ml (De Salamanca i sur., 2006; de Campos i sur., 2004). U slučaju kompleksnijih struktura, kao što su nanočestice pripravljene iz kitozana i hijaluronske kiseline i kompleksa kitozanskih nanočestica sa liposomima, uočena je manja citotoksičnost u odnosu na kitozanske nanočestice zahvaljujući smanjenju površinskog naboja (De la Fuente et al., 2008; Diebold et al., 2007).

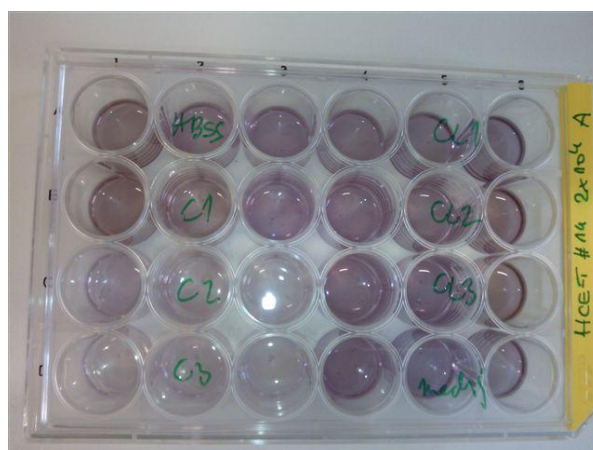
U ovom radu *in vitro* citotoksičnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica ispitivana je praćenjem metaboličke aktivnosti HCE-T stanica nakon 30-minutnog izlaganja suspenziji nanočestica. Metabolička aktivnost stanica mjerena je MTT testom i izražena je kao relativna u odnosu na netretirane stanice inkubirane u HBSS-u (pH 6,0) (Slika 15).

Pri ispitivanju citotoksičnosti lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom, HCE-T stanice izložene su suspenzijama nanočestica razrijeđenim u HBSS-u, pri koncentraciji kitozana u rasponu od 2,5 do 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , u trajanju od 30 minuta. S obzirom na maseni omjer lecitina i kitozana od 20:1, koncentracija lecitina u pripremljenim sustavima bila je u rasponu od 50 – 400  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .



**Slika 15.** Utjecaj nanočestica s melatoninom (MLC i ML) na vijabilnost HCE-T stanica (MTT test). Suspenzije nanočestica razrijeđene su HBSS-om (pH 6,0), Koncentracija kitozana u razrijeđenim suspenzijama nanočestica iznosila je 2,5, 10 ili 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . HBSS, otopina melatonina (2,5, 10 ili 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) i otopina kitozana (2,5, 10 ili 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) u HBSS-u korišteni su kao kontrole. Stanice su tretirane 30 minuta. Vijabilnost stanica izražena je u odnosu na netretirane stanice inkubirane u HBSS-u (pH 6,0). Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=3). \* Razlikuje se od netretiranih stanica inkubiranih u HBSS-u (P<0,05).

Kitozan je istaknut kao ključna sastavnica sustava, s obzirom na njegovu mukoadhezivnost i sposobnost pospješivanja transepitelne permeabilnosti, svojstava povezanih s njegovim pH-ovisnim površinskim nabojem. Stoga je važno utvrditi biokompatibilnost nanočestica pri definiranim eksperimentalnim uvjetima, s obzirom da potencijalna citotoksičnost može biti posljedica izraženog afiniteta vezanja na staničnu membranu. Usto, uzorci koji su korišteni kao kontrolni (otopina melatonina, lecitinske nanočestice, lecitinske nanočestice s melatoninom) nisu utjecali na vijabilnost stanica. Izlaganje stanica suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri ispitivanim koncentracijama kitozana nije značajnije utjecalo na vijabilnost stanica (Slika 15;  $P > 0,05$ ). Suprotno tome, uočeno je značajno smanjenje vijabilnosti stanica tretiranih otopinama kitozana pri koncentraciji kitozana od 10 i 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Slika 16).



**Slika 16.** Utjecaj otopine kitozana i lecitinsko-kitozanskih nanočestica na vijabilnost HCE-T stanica (MTT test)

Ti rezultati upućuju na veću toksičnost kitozana u otopini nego kad je inkorporiran u nanosustav. Biokompatibilnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica već je ispitivana na Caco-2, HaCaT i BJ fibroblastima (Hafner i sur., 2011, 2009). Nanočestice su se razlikovale u sadržaju kitozana i negativnom naboju lecitina korištenog u njihovoj pripravi. Razlike u citotoksičnosti nanočestica pripisane su razlikama u gustoći naboja nanočestica i sadržaju slobodnog kitozana u suspenziji nanočestica.

Međutim, u slučaju lecitinsko-kitozanskih nanočestica pripremljenih s lecitinom S45 i masenim omjerom lecitina prema kitozanu od 20:1 (MLC nanočestice u ovom radu), ni u jednom ispitivanju nije uočen utjecaj na vijabilnost stanica.

## 5. ZAKLJUČCI

- Lecitinsko-kitozanske nanočestice srednjeg promjera od  $222,8 \pm 1,0$  nm, pozitivnog zeta-potencijala ( $21,4 \pm 0,4$  mV) te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina ( $6,6 \pm 1,0$  %) uspješno su pripravljene ionskom interakcijom lecitina i kitozana.
- Srednji promjer lecitinsko-kitozanskih nanočestica veći je od srednjeg promjera odgovarajućih lecitinskih nanočestica.
- Zeta-potencijal lecitinsko-kitozanskih nanočestica je pozitivan dok su lecitinske nanočestice negativno nabijene.
- Sadržaj melatonina uklopljenog u lecitinsko-kitozanske nanočestice veći je od sadržaja melatonina uklopljenog u odgovarajuće lecitinske nanočestice.
- Uklapanje melatonina nije značajnije utjecalo na veličinu nanočestica niti na površinski naboj nanočestica, što pokazuje da je melatonin uspješno uklopljen unutar lipofilnih domena nanočestica.
- Brzina oslobađanja melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica bila je manja u odnosu na brzinu oslobađanja melatonina iz lecitinskih nanočestica.
- Vijabilnost HCE-T stanica nije se značajnije promijenila nakon izlaganja suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri ispitivanim koncentracijama kitozana ( $2,5 - 20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).
- Izlaganje HCE-T stanica otopinama kitozana pri koncentraciji od 10 i  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  rezultiralo je značajnim smanjenjem vijabilnosti stanica.

## 6. LITERATURA

Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Controlled Release*, 2004, 100, 5-28.

Alcantara-Contreras S, Baba K, Tosini G. Removal of MEL receptor type 1 increases intraocular pressure and retinal ganglion cells death in the mouse. *Neurosci Lett*, 2011, 494, 61-64.

Alonso MJ i Sánchez A. The potential of chitosan in ocular drug delivery. *JPP*, 2003, 55, 1451-1463.

Balazs EA, Freeman MI, Kloti R, Meyer-Schwickerath G, Regnault F, Sweeney DB. Hyaluronic acid and replacement of vitreous and aqueous humor. *Mod Probl Ophthalmol*, 1972, 10, 3-21.

Basaran E, Yazan Y. Ocular application of chitosan. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9, 701-712.

Bhatta RS, Chandasana H, Chhonker YS, Rathi C, Kumar D, Mitra K i sur. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: *In vitro* and pharmacokinetics studies. *Int J Pharm*, 2012, 432, 105-112.

Blažević F, Milekić T. Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na cijeljenje rane *in vitro*. Studentski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2015, 1-69.

Bucolo C, Maltese A, Drago F. When nanotechnology meets the ocular surface. *Expert Rev Ophthalmol*, 2008, 3, 325-332.

Bucolo C, Drago F, Salomone S. Ocular drug delivery: a clue from nanotechnology. *Front Pharmacol*, 2012, 3, 188.

Bucolo C, Salomone S, Drago F i sur. Pharmacological management of ocular hypertension: current approaches and future prospective. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13, 50–55.

Bunt-Milam AH, Saari JC, Klock IB, Garwin GG. Zonulae adherentes pore size in the external limiting membrane of the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1985, 26, 1377-1380.

Camillieri G, Bucolo C, Rossi S, Drago F. Hyaluronan-induced stimulation of corneal wound healing is a pure pharmacological effect. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2004, 20, 548-553.

Caramella CM, Rossi S, Bonferoni MC. Arheological approach to explain the mucoadhesive behavior of polymer hydrogels. U: Encyclopedia of controlled drug delivery. Mathiowitz E, urednik, John Wiley i Sons Inc., New York, 1999, 25-65.

Cardinali DP, Rosner JM. Metabolism of serotonin by the rat retina ‘in vitro’. *J Neurochem*, 1971a, 18, 1769-1770.

Cardinali DP, Rosner JM. Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat. *Endocrinology*, 1971b, 89, 301-303.

Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*, 2005, 9, 11-24.

Cholkar K, Reddy Dasari S, Pal D, Mitra AK. Eye: anatomy, physiology and barriers to drug delivery. U: Ocular transporters and receptors. Mitra AK, urednik, USA, Woodhead Publishing Limited, 2013, str. 1-36.

De Campos A, Diebold Y, Carvalho ELS, Sánchez A, Alonso MJ, De Campos A. urednik. Evaluación biofarmacéutica de sistemas coloidales para el transporte de medicamentos por vía ocular. *Doctoral Thesis*, 2002, 48-76.

De Campos AM, Diebold Y, Carvalho EL, Sanchez A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: *in vitro* stability, *in vivo* fate, and cellular toxicity. *Pharm Res*, 2004, 21, 803–810.



De La Fuente M, Seijo B, Alonso MJ. Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49, 2016-2024.

De La Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, Sánchez A, Seijo B, Alonso MJ. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Adv Drug Deliver Rev*, 2010, 62, 100-117.

De Salamanca EA, Diebold Y, Calonge M, Garcia-Vazquez C, Callejo S, Vila A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and *in vivo* tolerance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47, 1416–1425.

Di Colo G, Zambito Y, Burgalassi S, Nardini I, Saettone MF. Effect of chitosan and of N-carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin. *Int J Pharm*, 2004, 273, 37–44.

Diebold Y, Jarrin M, Saez V, Carvalho EL, Orea M, Calonge M, Seijo B, Alonso MJ. Ocular drug delivery by liposome–chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *Biomaterials*, 2007, 28, 1553–1564.

Doyle SE, Grace MS, McIvor W, Menaker M. Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: the role of melatonin. *Vis Neurosci*, 2002, 19, 593-601.

Felt O, Furrer P, Mayer JM, Plazonnet B, Buri P, Gurny R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. *Int J Pharm*, 1999a, 180, 185-193.

Felt O, Baeyens V, Zignani M, Buri P, Gurny R. Mucosal drug delivery, ocular. U: Encyclopedia of controlled drug delivery. Mathiowitz E, urednik, John Wiley i Sons Inc., New York, 1999b, str. 605-626.

Genasetti A, Vigetti D, Viola M, Karousou E, Moretto P, Rizzi M, Bartolini B, Clerici M, Pallotti F, De Luca G, Passi A. Hyaluronan and human endothelial cell behavior. *Connect Tissue Res*, 2008, 49, 120-123.

Gomes JA, Amankwah R, Powell-Richards A, Dua HS. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells *in vitro*. *Br J Ophthalmol*, 2004, 88, 821–825.

Hafner A. Kitozansko-lecitinske nanočestice za nazalnu i (trans)dermalnu primjenu melatonina, Doktorski rad, Zagreb, 2008.

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

Hafner A, Lovrić J, Pepić I, Filipović-Grčić J. Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. *J Microencapsul*, 2011, 28, 807-815.

Hamalainen KM, Kananen K, Auriola S, Kontturi K, Urtti A. Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38, 627-634.

Herrero-Vanrell R, Vicario de la Torre M, Andrés-Guerrero V, Barbosa-Alfaro D, Molina-Martínez IT, Bravo-Osuna I. Nano and microtechnologies for ophthalmic administration, an overview. *J Drug Del Sci Tech*, 2013, 23, 75-102.

Hornof M, Toropainen E, Urtti A. Cell culture models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 60, 207-225.

Hosoya K, Lee VH, Kim KJ. Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 60, 227-240.

Keros P, Pećina M, Ivančić-Košuta M. Temelji anatomije čovjeka. Zagreb, Naklada Ljevak, 1999, str. 146-149.

Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka, Medicinska naklada, Zagreb, 2002, str. 538.

Ledić I. Rožnica u oftalmologiji. Zagreb, Jumena, 1990a, str. 74.

Ledić I. Bjeloočnica u oftalmologiji. Zagreb, Jumena, 1990b, str. 95.

Leonardi A, Bucolo C, Drago F, Salomone S, Pignatello R. Cationic solid lipid nanoparticles enhance ocular hypotensive effect of melatonin in rabbit. *Int J Pharm*, 2015, 478, 180–186.

Lovrić J, Hafner A, Radiković M, Juretić M, Dürrigl M, Perina Lakoš G, Pepić I. Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva. *Pharm Glas*, 2015, 71, 355-384.

Lundmark PO, Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Cardinali DP, Rosenstein RE. Melatonin in the eye: Implications for glaucoma. *Exp Eye Res*, 2007, 84, 1021-1030.

Mediero A, Alarma-Estrany P, Pintor J. New treatments for ocular hypertension. *Auton NeuroSci: Basic*, 2009, 147, 14–19.

Modi S, Anderson BD. Determination of drug release kinetics from nanoparticles: overcoming pitfalls of the dynamic dialysis method. *Mol Pharm*, 2013, 10, 3076–3089.

Mucha M. Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions. *Macromol Chem Phys*, 1997, 198, 471-484.

Musumeci T, Bucolo C, Carbone C, Pignatello R, Drago F, Puglisi G. Polymeric nanoparticles augment the ocular hypotensive effect of melatonin in rabbits. *Int J Pharm*, 2013, 440, 135–140.

Nemesure B, Honkanen R, Hennis A. The Barbados Eye Studies Group. Incident open-angle glaucoma and intraocular pressure. *Ophthalmology*, 2007, 114, 1810–1815

Nucci C, Tartaglione R, Cerulli A, Mancino R, SpanŪ A, Cavaliere F, Rombol‡ L, Bagetta G, Corasaniti MT, Morrone LA. Retinal damage caused by high intraocular pressure-induced transient ischemia is prevented by coenzyme Q10 in rat. *Int Rev Neurobiol*, 2007, 82, 397–406.

Paolicelli P, De la Fuente M, Sánchez A, Seijo B, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles for drug delivery to the eye. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, 6, 239-253.

Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: nature's most versatile biological signal?. *FEBS J*, 2006, 273, 2813-2838.

Pepić I. Problemi lokalne primjene pripravka za oči. *Farm Glas*, 2004, 60, 311-328.

Pepić I, Hafner A, Lovrić J, Pirkić B, Filipović-Grčić J. A nonionic surfactant/chitosan micelle system in an innovative eye drop formulation. *J Pharm Sci*, 2010, 99, 4317-4325.

Pepić I, Kaić N, Filipović-Grčić J. Nanočestice kao terapijski sustavi za primjenu lijeka u oko. *Farm Glas*, 2011, 67, 73-86.

Pepić I, Hafner A, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Modeli za ispitivanje permeabilnosti i predviđanje biorasploživosti lijeka u oku. *Farm Glas*, 2012, 68, 177-205.

Pepić I, Lovrić J, Cetina-Čizmek B, Reichl S, Filipović-Grčić J. Toward the practical implementation of eye-related bioavailability prediction models. *Drug Discov Today*, 2014, 19, 31-44.

Pierce ME, Besharse JC. Circadian regulation of retinomotor movements. I. Interaction of melatonin and dopamine in the control of cone length. *J Gen Physiol*, 1985, 86, 671-689.

Pignatello R, Puglisi G. Nanotechnology in ophthalmic drug delivery: a survey of recent developments and patenting activity. *Recent Pat Nanomed*, 2011, 1, 42-52.

Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smaghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 2003,4, 1457-1465.

Ranade VV, Hollinger MA. Drug Delivery System. CRC Press, Boca Raton, 2003, 267.

Ranta VP, Urtti A. Transscleral drug delivery to the posterior eye: prospects of pharmacokinetic modeling. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58, 1164-1181.

Reimondez-Troitiño S, Csaba N, Alonso MJ, De la Fuente M. Nanotherapies for the treatment of ocular diseases. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 1-15.

Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov Today*, 2008, 13, 144-151.

Sonvico F, Cagnani A, Rossi A, Motta S, Di Bari MT, Cavatorta F, Alonso MJ, Deriu A, Colombo P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *Int J Pharm*, 2006, 324, 67–73.

Tosini G, Menaker M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res*, 1998, 789, 221-228.

Wang W, Xu D. Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of acetylation. *Int J Biol Macromol*, 1994, 16, 149±152.

Wiechmann AF, Summers JA. Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues. *Prog Retin Eye Res*, 2008, 27, 137–160.

Wiechmann AF, Wirsig-Wiechmann CR. Multiple cell targets for melatonin action in *Xenopus laevis* retina: distribution of melatonin receptor immunoreactivity. *Vis Neurosci*, 2001, 18, 695-702.

Zambito Y, Pedreschi E, Di Colo G. Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems? – A case study. *Int J Pharm*, 2012, 434, 28–34.

## 7. SAŽETAK

Oftalmička primjena lijeka jedan je od najvećih farmaceutsko-tehnoloških izazova, s obzirom na specifičnu anatomiju i fiziologiju oka koje ograničavaju dostavu molekule lijeka na ciljno mjesto djelovanja u potrebnoj količini i trajanju. Danas se razvijaju inovativni terapijski nanosustavi koji mogu osigurati dulje vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu primjene, te veću bioraspoloživost lijeka u oku, odnosno prevladati tkivne (biološke) i dinamičke barijere oka. Pri razvoju takvih terapijskih nanosustava vrlo je važno od samog početka razmatrati njihovu biokompatibilnost i toksičnost, s ciljem utvrđivanja sigurnosti njegove oftalmičke primjene.

Cilj ovog rada bio je ispitati biokompatibilnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom *in vitro*, koristeći imortalizirane stanice humanog epitela rožnice (HCE-T), kako bi se procijenila sigurnost njihove oftalmičke primjene u svrhu liječenja povišenog očnog tlaka.

Lecitinsko-kitozanske nanočestice srednjeg promjera od  $222,8 \pm 1,0$  nm, pozitivnog zeta-potencijala ( $21,4 \pm 0,4$  mV) te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina ( $6,6 \pm 1,0$  %) uspješno su pripravljene ionskom interakcijom lecitina i kitozana. Uklapanje melatonina nije značajnije utjecalo na veličinu nanočestica niti na površinski naboj nanočestica, što pokazuje da je melatonin uspješno uklopljen unutar lipofilnih domena nanočestica. Oslobođanje melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica bilo je sporije u odnosu na oslobođanje melatonina iz lecitinskih nanočestica. Biokompatibilnost nanočestica s melatoninom ispitana je praćenjem metaboličke aktivnosti stanica epitela rožnice (HCE-T) *in vitro* nakon izlaganja suspenzijama nanočestica. Izlaganje HCE-T stanica otopinama kitozana pri koncentraciji od 10 i 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  rezultiralo je značajnim smanjenjem vijabilnosti stanica. Suprotno tome, vijabilnost HCE-T stanica nije se značajnije promijenila nakon izlaganja suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri ispitivanim koncentracijama kitozana (2,5 - 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Time je pokazan potencijal razvijenih nanočestica s melatoninom za sigurnu oftalmičku primjenu.

## 7. SUMMARY

Ophthalmic drug delivery is one of the largest pharmaceutical and technological challenges, considering specific eye anatomy and physiology that limit efficient drug delivery to the target ocular tissue at sufficient extent and duration. Currently, innovative delivery nanosystems with the potential to ensure prolonged retention time at the administration site and improved eye-related drug bioavailability, overcoming biological and dynamic ocular barriers, are being developed. Concomitantly with the development of such nanosystems it is important to consider their biocompatibility and toxicity, with the aim to determine the safety of their ocular administration.

The aim of this study was to determine the biocompatibility of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles *in vitro* using immortalised cells of human corneal epithelia (HCE-T), with the aim to assess the safety of their ocular administration in the treatment of increased intraocular pressure.

Lecithin/chitosan nanoparticles with mean diameter of  $222.8 \pm 1.0$  nm, positive zeta potential ( $21.4 \pm 0.4$  mV) and appropriate melatonin content ( $6.6 \pm 1.0$  %) were successfully prepared by ionic interaction between lecithin and chitosan. Entrapment of melatonin did not influence the size or zeta-potential of nanoparticles, indicating that melatonin was successfully entrapped into lipophilic domains of nanoparticles. Melatonin release from lecithin/chitosan nanoparticles was slower than melatonin release from lecithin nanoparticles. Biocompatibility of nanoparticles was determined by monitoring of metabolic activity of HCE-T cells treated with the suspensions of nanoparticles. Treatment of HCE-T cells with chitosan solution at the concentrations of 10 and 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  resulted in significant decrease of cell viability. On the contrary, there was no significant change in the viability of HCE-T cells treated with lecithin/chitosan nanoparticles at chitosan concentration ranging from 2.5 to 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Results obtained suggested that melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles could be safely applied to the ocular surface.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### **IN VITRO ISPITIVANJE SIGURNOSTI OFTALMIČKE PRIMJENE LECITINSKO-KITIZANSKIH NANOČESTICA S MELATONINOM**

**Jelena Belanović**

#### **SAŽETAK**

Oftalmička primjena lijeka jedan je od najvećih farmaceutsko-tehnoloških izazova, s obzirom na specifičnu anatomiju i fiziologiju oka koje ograničavaju dostavu molekule lijeka na ciljno mjesto djelovanja u potrebnoj količini i trajanju. Danas se razvijaju inovativni terapijski nanosustavi koji mogu osigurati dulje vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu primjene, te veću bioraspodjelivost lijeka u oku, odnosno prevladati tkivne (biološke) i dinamičke barijere oka. Pri razvoju takvih terapijskih nanosustava vrlo je važno od samog početka razmatrati njihovu biokompatibilnost i toksičnost, s ciljem utvrđivanja sigurnosti njegove oftalmičke primjene.

Cilj ovog rada bio je ispitati biokompatibilnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom *in vitro*, koristeći imortalizirane stanice humanog epitela rožnice (HCE-T), kako bi se procijenila sigurnost njihove oftalmičke primjene u svrhu liječenja povišenog očnog tlaka.

Lecitinsko-kitozanske nanočestice srednjeg promjera od  $222,8 \pm 1,0$  nm, pozitivnog zeta-potencijala ( $21,4 \pm 0,4$  mV) te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina ( $6,6 \pm 1,0$  %) uspješno su pripravljene ionskom interakcijom lecitina i kitozana. Uklapanje melatonina nije značajnije utjecalo na veličinu nanočestica niti na površinski naboj nanočestica, što pokazuje da je melatonin uspješno uklopljen unutar lipofilnih domena nanočestica. Oslobađanje melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica bilo je sporije u odnosu na oslobađanje melatonina iz lecitinskih nanočestica. Biokompatibilnost nanočestica s melatoninom ispitana je praćenjem metaboličke aktivnosti stanica epitela rožnice (HCE-T) *in vitro* nakon izlaganja suspenzijama nanočestica. Izlaganje HCE-T stanica otopinama kitozana pri koncentraciji od 10 i 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  rezultiralo je značajnim smanjenjem vijabilnosti stanica. Suprotno tome, vijabilnost HCE-T stanica nije se značajnije promijenila nakon izlaganja suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri ispitivanim koncentracijama kitozana (2,5 – 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Time je pokazan potencijal razvijenih nanočestica s melatoninom za sigurnu oftalmičku primjenu.

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

Rad sadrži: 44 stranica, 16 grafičkih prikaza, 3 tablica i 69 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kitozan; Melatonin; Lecitin; Nanočestice; Biokompatibilnost *in vitro*

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

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

**Dr. sc. Jasmina Lovrić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujna, 2015.



## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### **IN VITRO OCULAR SAFETY ASSESSMENT OF MELATONIN-LOADED LECITHIN/CHITOSAN NANOPARTICLES**

**Jelena Belanović**

#### **SUMMARY**

Ophthalmic drug delivery is one of the largest pharmaceutical and technological challenges, considering specific eye anatomy and physiology that limit efficient drug delivery to the target ocular tissue at sufficient extent and duration. Currently, innovative delivery nanosystems with the potential to ensure prolonged retention time at the administration site and improved eye-related drug bioavailability, overcoming biological and dynamic ocular barriers, are being developed. Concomitantly with the development of such nanosystems it is important to consider their biocompatibility and toxicity, with the aim to determine the safety of their ocular administration.

The aim of this study was to determine the biocompatibility of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles *in vitro* using immortalised cells of human corneal epithelia (HCE-T), with the aim to assess the safety of their ocular administration in the treatment of increased intraocular pressure.

Lecithin/chitosan nanoparticles with mean diameter of  $222.8 \pm 1.0$  nm, positive zeta potential ( $21.4 \pm 0.4$  mV) and appropriate melatonin content ( $6.6 \pm 1.0$  %) were successfully prepared by ionic interaction between lecithin and chitosan. Entrapment of melatonin did not influence the size or zeta-potential of nanoparticles, indicating that melatonin was successfully entrapped into lipophilic domains of nanoparticles. Melatonin release from lecithin/chitosan nanoparticles was slower than melatonin release from lecithin nanoparticles. Biocompatibility of nanoparticles was determined by monitoring of metabolic activity of HCE-T cells treated with the suspensions of nanoparticles. Treatment of HCE-T cells with chitosan solution at the concentrations of 10 and 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  resulted in significant decrease of cell viability. On the contrary, there was no significant change in the viability of HCE-T cells treated with lecithin/chitosan nanoparticles at chitosan concentration ranging from 2.5 to 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Results obtained suggested that melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles could be safely applied to the ocular surface.

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

Thesis includes: 44 pages, 16 figures, 3 tables and 69 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Chitosan; Melatonin; Lecithin; Nanoparticles; Biocompatibility *in vitro*

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

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

The thesis was accepted: September, 2015.