

Mukopenetrativne nanočestice s melatoninom

Jozić, Marica

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:860500>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**



Repository / Repozitorij:

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



Marica Jozić

Mukopenetrativne nanočestice s melatoninom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2018.

Ovaj rad prijavljen je na kolegiju Oblikovanje lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv.prof.dr.sc. Marija Juga.

Najtoplije zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Mariju Jugu na pruženoj pomoći, savjetima i iznimnom strpljenju tijekom izrade ovog rada. Također, zahvaljujem asistentici Sabini Keser na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Posebnu zahvalu upućujem obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju koju su mi pružali tijekom studiranja.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Sluz kao barijera prolazu nanočestica	1
1.1.1. Struktura i uloga sluzi	1
1.1.2. Reološka svojstva sluzi	6
1.1.3. Sluz kao barijera	7
1.2. Mukopenetrativne nanočestice	12
1.2.1. Mukopenetrativne nanočestice.....	14
1.2.2. PEGilacija mukopenetrativnih nanočestica	17
1.2.3. Gantrez TM	23
1.3. Melatonin.....	25
1.3.1. Terapijske mogućnosti melatonina	29
1.3.2. Fiziološka uloga i terapijski učinci melatonina u usnoj šupljini.....	34
2. OBRAZLOŽENJE TEME	39
3. MATERIJALI I METODE	41
3.1. Kemikalije	41
3.2. Instrumenti i pribor	41
3.3. Metode.....	42
3.3.1. Priprema PEGiliranih nanočestica	42
3.3.2. Određivanje postotka PEGilacije.....	43
3.3.3. Određivanje veličine i zeta potencijala nanočestica	44
3.3.4. Određivanja postotka uklapanja melatonina	44
4. REZULTATI I RASPRAVA	46
4.1. Utjecaj PEGilacije na karakteristike pripremljenih nanočestica	46
4.2. Odabir prikladnog krio/lioprotektanta u procesu sušenja smrzavanjem	49
4.3. Mukopenetrativne polianhidridne nanočestice s melatoninom	54
4.3.1. Razvoj metode za određivanje sadržaja melatonina	54

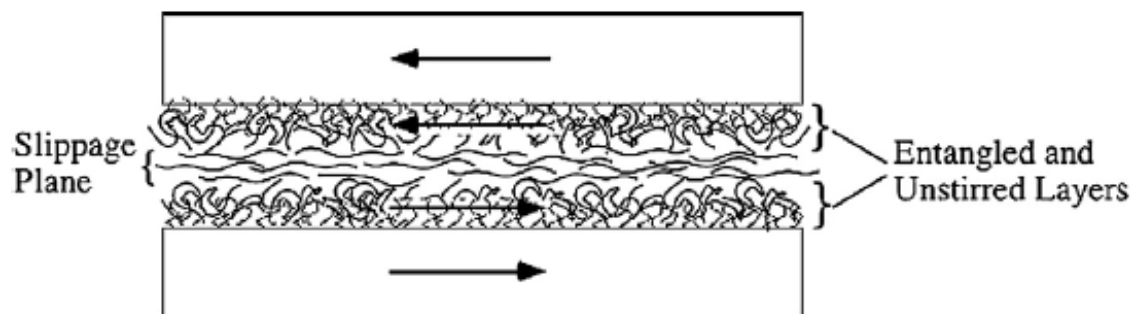
4.3.2. Sastav i tehnološke karakteristike PEGiliranih nanočestica s melatoninom.....	58
5. ZAKLJUČCI.....	60
6. LITERATURA.....	61
7. SAŽETAK.....	67
7. SUMMARY	68

1. UVOD

1.1. Sluz kao barijera prolazu nanočestica

1.1.1. Struktura i uloga sluzi

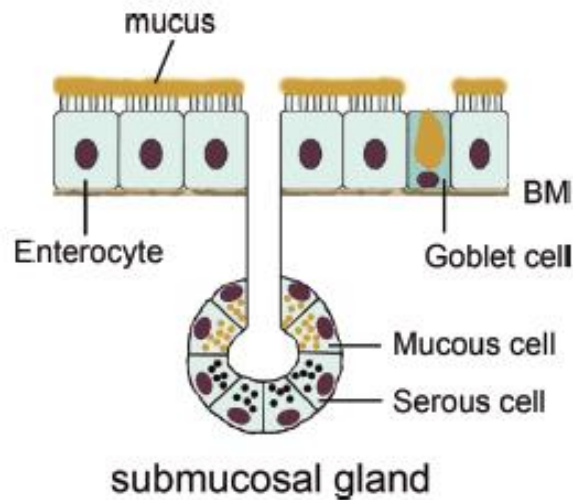
Sluz je viskoelastični adhezivni gel koji prekriva epitelne površine probavnog, dišnog i ženskog reproduktivnog trakta, a prisutan je i na površini oka te u usnoj šupljini. Uloge sluzi su mnogobrojne, no primarno ima zaštitnu ulogu kao dio imunskog sustava - pasivna je barijera prolazu patogena i stranih čestica, pa tako i različitim lijekovima i terapijskim sustavima. Nadalje, djeluje kao lubrikant (*Slika 1.*) i olakšava prolaz tvari kroz probavni sustav, sprječava gubitak vode i dehidraciju tkiva (Fröhlich i Roblegg, 2014).



Slika 1. Sluz kao lubrikant. Smicanje između dviju površina stvara kliznu ravninu prema ne-Newtonovskim, smičnim svojstvima sluzi. Površine ostaju prekrivene adherentnim slojem sluzi koja se ne pomiče. (Cone, 2009)

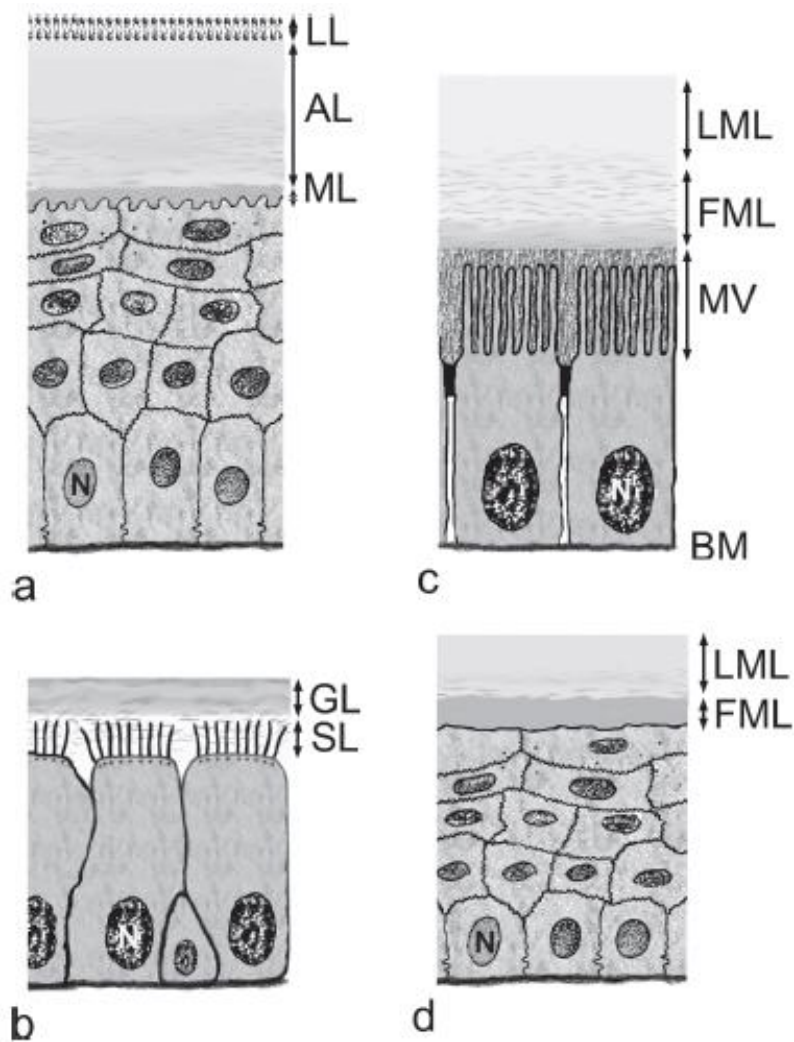
S obzirom na prisutnost sluzi na različitim područjima organizma, njezino lučenje i svojstva ovise o potrebama određenog područja. Sluz luče intraepitelne mukozne stanice i ekstraepitelne submukozne stanice (*Slika 2.*). Većina intraepitelnih mukoznih stanica su vrčaste stanice, koje su prisutne u nosnoj šupljini, probavnom traktu i u oku, a manjim su dijelom zastupljene foveolarne stanice, prisutne u želudcu, i mukozne stanice u endocerviksu. Sluz u oku je produkt vrčastih stanica, smještenih u bulbularnoj konjuktivi, a omogućava jednolično rasprostiranje vodenog sloja i prijanjanje suznog filma na površinu oka. U dišnom sustavu, vrčaste stanice luče sluz u dušniku, dušnicama i bronhiolima, osim u terminalnim bronhiolama, a submukozne stanice samo u dušniku i dušnicama. U usnoj šupljini vrčaste stanice nisu prisutne, a debljinu sluzi povećava slina koju luče žlijezde slinovnice. Sluz u

probavnom traktu produkt je submukoznih stanica u jednjaku i dvanaesniku, a intraepitelnih mukoznih stanica u dvanaesniku, želudcu i rektumu.



Slika 2. Mjesta lučenja sluzi u probavnom traktu. Sluz luče intraepitelne stanice smještene između enterocita i ekstraepitelne žlijezde u submukozi. Submukozne su žlijezde uglavnom građene od dva tipa stanica; mukozne stanice luče viskozniju sluz, a sluz seroznih stanica je manje viskozna. (Fröhlich i Roblegg, 2014)

Struktura sluzi razlikuje se ovisno o smještaju stanica koje je luče (Slika 3.). Sluz dišnog sustava slična je sluzi koja pokriva površinu oka po tome što obje čine jednosloj smješten preko epitelnog glikokaliksa. Dok je mukozni sloj u izravnom kontaktu s glikokaliksom, lipidni sloj suznog filma ostvaruje kontakt sa zrakom. Pericilijarni sloj dušnika i dušnica sadrži velike membranski vezane glikoproteine i privezane mucine koji su dio glikokaliksa. Ovaj sloj prekriven je viskoznijim slojem gela koji veže strane čestice i omogućava njihovo uklanjanje iz dišnih puteva. U želudcu i debelom crijevu sluz je prisutna u dva sloja, od kojih je jedan nepropustan za bakterije, a drugi sloj nastaje enzimskim djelovanjem na mucine. Jednaka se dvoslojna struktura sluzi nalazi i u cervikovaginalnom traktu žena. Sluz se luči pod djelovanjem različitih tvari u pojedinim dijelovima organizma; primjerice, u dišnom i probavnom se traktu lučenje se sluzi odvija pod utjecajem acetilkolina, neurotenzina i različitih citokina, a histamin, prostaglandini i gastrin povećavaju lučenje sluzi u želudcu.



Slika 3. *Struktura barijera oka (a), trakta dušnika (b), gastrointestinalnog trakta (c) i vagine (d). (a) Konjunktivalna je barijera sačinjena od slojevitog epitela i suznog filma sastavljenog od lipidnog sloja (LL), vodenog mucinskog sloja s proteinima (AL) i mucinskog sloja vezanog za glikokaliks epitelnih stanica rožnice (ML). (b) Sličan cilindričan epitel nalazi se i u gornjem dijelu dišnog sustava sa sluzi koju čine pericilijarni sol sloj (SL) niske viskoznosti i gel sloj (GL) visoke viskoznosti. (c) Cilindrični epitel i sluz građena od dva sloja čine barijeri u gastrointestinalnom traktu. Mikrovili (MV) na apikalnoj strani enterocita prekriveni su glikoproteinskim slojem koji se nastavlja na čvrsto vezani mucinski sloj (FLM) i labavo vezani mucinski sloj (LML). (d) Vaginalna barijera građena je od pločastog nekeratiniziranog epitela prekrivenog slojem mucina podijeljenim u dva reda – čvrsto (FLM) i labavo vezani (LML). Svi epiteli nalaze se na bazalnoj membrani (BM). (Fröhlich i Roblegg, 2014)*

Fiziološke se karakteristike sluzi razlikuju ovisno o području tijela koje pokriva (*Tablica 1.*). Debljina sluzi nije jednaka na svim dijelovima organizma, nego se mijenja ovisno o određenom području, a kontrolirana je ravnotežom između brzine lučenja i uklanjanja sluzi. Debljina sloja sluzi u gastrointestinalnom traktu doseže 1 mm u kolonu, dok su prosječne debljine cervikovaginalne (50 μm) i sluzi u usnoj šupljini (70 - 100 μm) znatno manje. Značajna je varijabilnost prisutna i kod vremena potrebnog za obnovu sluzi, koje označava vrijeme od trenutka kada sluz bude izlučena do trenutka njezina uklanjanja i zamjene novim slojem sluzi, a mijenja se ovisno o fiziološkom području te kreće u rasponu od svega nekoliko minuta do nekoliko sati. Vrijeme obnove sluzi u gastrointestinalnom traktu znatno je dulje nego za druge sluznice, a prema podacima dobivenim na štakoru, iznosi 4 - 6 h (Lai i sur., 2009). Općenito se može kazati kako mukozni klirens korelira s debljinom sluzi; tanji sloj sluzi ima veći mukozni klirens (Liu i sur., 2014).

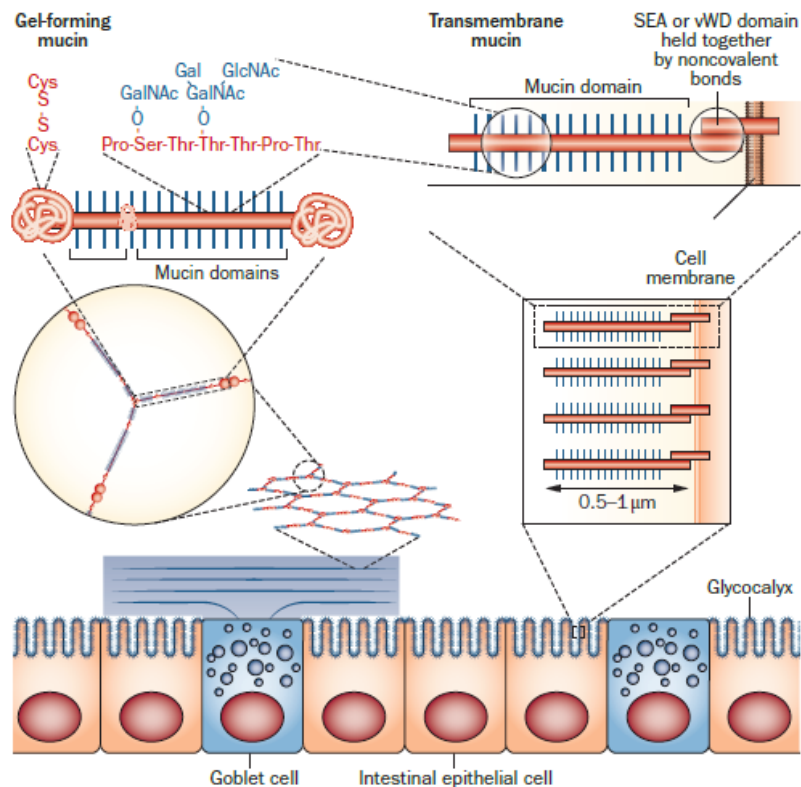
Tablica 1. Fiziološke karakteristike sluzi na različitim sluznicama u tijelu (prilagođeno prema Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016).

Mukozna membrana	Temperatura (°C)	Debljina sluzi (μm)			pH vrijednost sloja sluzi	Klirens sluzi
		Ukupno	Čvrsti sloj	Labavi sloj		
Bukalna	36.2 - 36.7	70 - 100	70 - 100	28	6.5 - 7.5	12 - 24 h
Nazalna	30.2 - 34.4	10 - 15	6	4 - 9	5.5 - 6.5	6 mm/min
Pulmonarna	32.5 - 35.5	5 - 55	5 - 10	5 - 10	7.0	10 - 20 min
Okularna	34.0	0.02 - 0.05	n/a	n/a	7.8	5.5 - 7.7 min
Želučana	37.0	30 - 300	110.5 \pm 37	n/a	6.40 \pm 0.24	24 - 48 h
Vaginalna	37.0	50	n/a	n/a	3.5 - 4.0	1.5 ml/dan

Razmatrajući debljinu i klirens sluzi, moguće je razlikovati čvrstu i labavu sluz. Labava sluz prekriva površine želudca, tankog i debelog crijeva te dišnog trakta, a karakterizira je lako uklanjanje smicanjem. Čvrsta, ili membranski vezana sluz, preko transmembranskih domena se sidri ili prijanja čvrsto na epitelnu površinu tvoreći zaštitni sloj koji predstavlja učinkovitu barijeru prolazu baterija i toksina, a za razliku od labave sluzi, ne može se ukloniti smicanjem. Da bi terapijski sustavi usmjereni prolazu kroz sluz bili uspješni, nužno je dobro poznavanje debljine sluzi i mukoznog klirensa, jer prodiranje čestica u sluz mora biti brže od uklanjanja i obnove sloja sluzi.

Sluz se sastoji od 95% vode, a ostatak čine mucini, IgA, ostaci staničnog debrisa, aktin, DNA i lipidi. Mucini su visokomolekularni glikoproteini mase između 200 000 i 3 000 000 Da. Kodirani su s više od 20 različitih MUC gena, a patofiziološka stanja poput tumora i upalne bolesti crijeva mijenjaju sastav mucina i brzinu lučenja sluzi. Mucini se mogu podijeliti na transmembranske mucine, koji su bitni za adhezivna svojstva, i izlučene, gel-formirajuće, mucine koji pridonose visokoznosti sluzi (*Slika 4.*) (Johansson i sur., 2013). Za mucine je karakteristična prisutnost dviju domena; jedna je bogata prolinom, serinom i treoninom (PTS domena), a druga je gola hidrofobna regija, na kojoj se nalaze pridruženi lipidi. Dvije su PTS domene razdvojene golom regijom približne duljine 110 aminokiselina, bogatom cisteinskim ostacima. Preko tih se cisteinskih ostataka stvaranjem disulfidnih veza ostvaruje umrežavanje mucina što dovodi do nastanka trodimenzionalne strukture nalik na mrežu, s porama veličine između 350 i 500 nm. Osim toga, mucin je podložan i nekovalentnom, o Ca^{2+} ovisno, umrežavanju koje rezultira dodatnim smanjenjem veličine pora mrežne strukture na 30 do 100 nm (Fröhlich i Roblegg, 2014; Boegh i Nielsen, 2015). Kod membranski vezanih mucina, golaj regiji odgovara SEA domena (protein sperme morskog ježinca, enterokinaza, agrin – engl. *sea urchin sperm protein, enterokinase, agrin*) koja je jednake duljine kao gola hidrofobna regija bogata cisteinima (110 aminokiselina) te jednakog prosječnog promjera (5 nm). SEA domene su potencijalna mjesta kidanja djelovanjem proteolitičkih čimbenika, što dovodi do otpuštanja mucina s površine stanice. Nadalje, membranski vezani mucini sadrže i transmembransku domenu i citoplazmatski rep na kojem se nalaze treonin, serin i tirozin, a čija fosforilacija može imati ulogu u signalizaciji. PTS domena je mjesto vezanja šećernih lanaca, odnosno, područje u kojem se odvija glikozilacija, a vezani šećeri su fukoza, galaktoza, sijalinska kiselina, N-acetilglukozamin i N-acetilgalaktozamin. Kod nekih je membranski vezanih mucina PTS domena duga i 5 000 aminokiselina te se proteže i do 100 nm od stanične površine. PTS domene su kod izlučenih mucina duge 25 – 200 nm, a glikanski

dio čini do 20 šećernih jedinica te je ukupni promjer PTS domene 3 – 10 nm. Oligosaharidi čine 70 do 80 % mase mucina, a preko N-acetilglukoamina vezani su na serin ili treonin na proteinskoj srži te istu štite od razgradnje. Zbog velike zastupljenosti karboksilne skupine sijalinske kiseline i sulfatnih skupina, mucini su negativno nabijeni, a naboj se mijenja s rasporedom vezanih oligosaharida (Cone, 2009).



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz sloja sluzi koje izlučuju vrčaste stanice i transmembranskih mucina vezanih na apikalnu membranu enterocita. Glikokaliks sačinjen od mucina usidrenih u membranu prekriva apikalnu stranu intestinalnih enterocita (desno). MUC2 mucinski polimer je pakiran u granule u goblet stanicama; u procesu lučenja, polimer se šiti tvoreći ravne prstenu slične strukture koje se slažu jedne na druge; N- i C-terminalni krajevi su povezani disulfidnim vezama (lijevo). (Johansson i sur., 2013)

1.1.2. Reološka svojstva sluzi

Viskoznost i elastičnost predstavljaju odgovor tekućine na djelovanje sile smicanja. Za sluz je karakteristično različito ponašanje pod niskim i visokim smicanjem; ako je sila smicanja mala, sluz se ponaša kao elastična tvar koja s vremenom poprima izravni oblik, dok se pod djelovanjem velike sile smicanja ponaša kao viskozna tekućina te je tada riječ o ireverzibilnoj

deformaciji. Viskoznost, elastičnost i postojanost sluzi ovise o stupnju hidratacije, koja je određena vrstom glikanskog postraničnog lanca mucina, a povećava masu mucina za sto puta. U vodi sluz bubri i na koncu se u njoj otapa, a prisutnost soli, pri zastupljenosti većoj od 1%, smanjuje viskoznost sluzi. Nadalje, viskoelastičnost sluzi ovisi i o pH vrijednosti, a najviše varijacija zabilježeno je u probavnom sustavu, gdje se pH vrijednosti kreću od 2,0 do 8,0. Zbog manje pH vrijednosti u želudcu, nego u dvanaesniku, mucinska je mreža u želudcu gušća jer je povećano stvaranje mucinskih vlakana koja zatim stvaraju agregate. Značajna je i razlika reoloških svojstava cervikovaginalne sluzi; ne-ovulatorna sluz ima 100 puta veću viskoznost nego sluz za vrijeme ovulacije (Cone, 2009). Općenito, viskoznost sluzi se optimizira kako bi se osiguralo hvatanje patogena, a istovremeno omogućilo kretanje površinom sluzi i njezino neprestano smicanje.

1.1.3. Sluz kao barijera

Barijerna svojstva sluzi mogu se podijeliti u tri skupine.

Dinamička barijera

Da bi lijek mogao dosegnuti epitel i biti apsorbiran, mora difundirati uzdužno kroz sluz jer se ona neprekidno luči i uklanja. Lijek koji se veže na vanjski sloj sluzi može postići lokalni učinak na mukoznoj površini, no takav pristup nije pogodan ukoliko se želi postići sistemsko djelovanje lijeka.

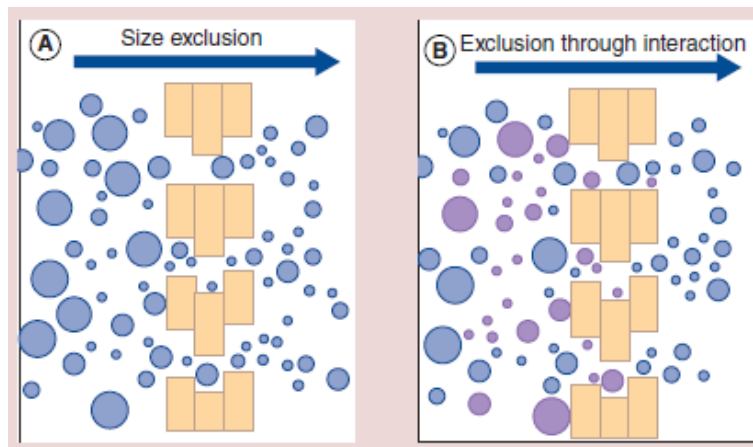
Sterička barijera

Mreža mucina može tvoriti filter koji će na temelju veličine isključiti veće čestice, a viskoznost sluzi, jednako kao i statički vodeni sloj, pridonosi barijernoj funkciji sluzi (*Slika 5a.*).

Interaktivna barijera

Sluz može ostvariti mnogo nisko-afinitetnih interakcija s lijekovima i toksinima (*Slika 5b.*). Hidrofobne se interakcije mogu ostvariti između proteinske srži koja nije glikozilirana ili lipida mucina te difundirajuće tvari, a prisutnost ugljikohidratnih jedinica pruža mogućnost stvaranja vodikovih i ionskih veza. Male hidrofobne molekule difundiraju kroz sluz sporije nego kroz vodu, a stvaraju niskoafinitetne veze s mucinskim vlaknima pri čemu su te veze isključivo monovalentne. Suprotno se događa s malim pozitivno nabijenim molekulama i

kationima koji ostvaruju polivalentne veze s negativno nabijenim glikanskim domenama, a posebno čvrsto vezivanje opaženo je kod velikih pozitivno nabijenih nanočestica.



Slika 5. (A) Sterička barijerna svojstva sluzi. Čestice koje su manje od veličine pora filtera sluzi će proći, dok su veće čestice zadržane. (B) Interaktivna barijerna svojstva sluzi. Ako čestice stupaju u interakciju sa sluzi, veličina postaje irelevantan parametar. Ljubičasto su označene čestice koje reagiraju sa sluzi, dok su plave one koje ne ostvaruju interakcije.

(Pearson i sur., 2016)

Uzimajući u obzir navedena barijerna, ali i ostala svojstva sluzi, razvijeno je nekoliko pristupa kako nadići sluz kao barijeru prolazu čestica. *Tablica 2.* daje prikaz terapijskih sustava razvijenih korištenjem nanočestica mukoadhezivnih, mukopenetrativnih i mukolitičkih svojstava. Mukoadhezivne nanočestice su razvijene kako bi se osiguralo dulje zadržavanje na sluznici i poboljšana apsorpcija lijekova uslijed lokalnog povećanja koncentracije lijeka. Prisutnost iritansa, fiziološko stanje organizma te uklanjanje i obnavljanje sluzi mogu rezultirati neučinkovitom dostavom lijeka mukoadhezivnim česticama. *Tablica 3.* prikazuje usporedbu mukopenetrativnih i mukoadhezivnih nanočestica. Iako oba tipa nanočestice pokazuju potencijal u razvoju terapijskih sustava, koji će se sustav koristiti ovisi o nekoliko čimbenika; u obzir treba uzeti svojstva samoga lijeka, kao što su topljivost, permeabilnost kroz membranu i način djelovanja, ali i opće karakteristike dostave lijeka, pri čemu je bitno želi li se postići brzo ili odgođeno djelovanje lijeka te preko koje se sluzne barijere želi ostvariti djelovanje. Naime, mukoadhezivne nanočestice bile bi prikladne za postizanje djelovanja na mjestima prekrivenim sluzi koja se sporo uklanja, dok mukopenetrativne nanočestice imaju prednost ako se djelovanje želi ostvariti preko sluzi s brzim uklanjanjem i obnavljanjem.

Tablica 2. *Primjeri uspješne dostave lijeka korištenjem nanočestica mukoadhezivnih, mukopenetrativnih i mukolitičkih svojstava. (prilagođeno prema Fröhlich i Roblegg, 2014)*

Mehanizam dostave	Lijek	Materijal/sastav	Model korišten u ispitivanju	Put primjene lijeka
mukoadhezija	inzulin	alginat/kitozan	štakor	oralni
mukoadhezija	niskomolekulski heparin	N-trimetil kitozan	tanko crijevo štakora	oralni
mukoadhezija	brimonidin tartarat	natrij alginat	kunić	okularni
mukoadhezija	pilokarpin nitrat i tropikamid	poli(amidoamin) dendrimer	kunić	okularni
mukoadhezija	olanzapin	Poloxamer 188 ili 407	štakor	nazalni
mukoadhezija	inzulin	kitozan	štakor	nazalni
mukoadhezija	niskomolekulski heparin	kitozan/hijaluronska kiselina	mast stanice štakora	bronhalni
mukopenetracija	tenofovir	kitozan	svinjska vaginalna sluznica	vaginalni
mukopenetracija	kumarin-6	PLGA obložen PEG-om ili avidinom	miš	vaginalni
mukopenetracija	DNA	PLGA + dimetildioktadecilamonij bromid	sluznica svinjskog tankog crijeva	oralni
mukoliza	fluorescein izotiocijanat dekstran	polielektrolitni kompleks spermidina i poliakrilne kiseline	monosloj Caco-2, tanko crijevo štakora	oralni

Tablica 3. SWOT analiza mukoadhezivnih i mukopenetrativnih nanočestica u terapijskim sustavima. (prilagođeno prema Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016)

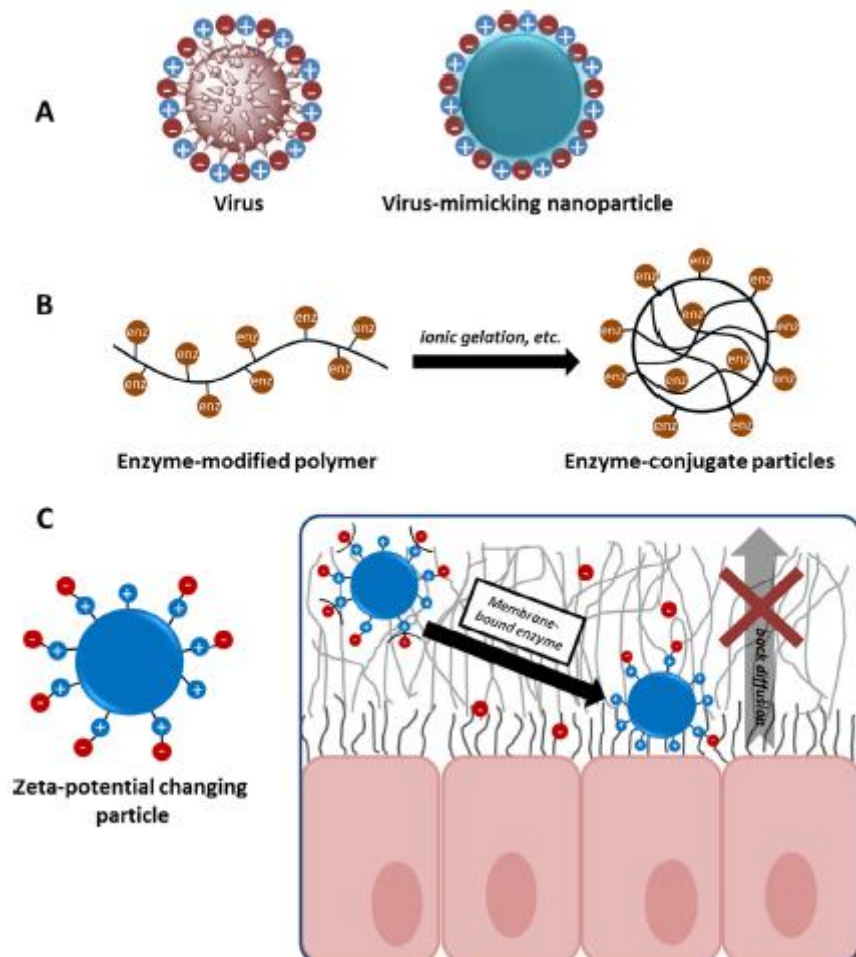
Mukoadhezivne nanočestice	Mukopenetrativne nanočestice
<p>Snaga (<i>engl. Strength</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> ne narušavaju strukturu sluzi 	<p>Snaga (<i>engl. Strength</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> olakšana difuzija do mjesta apsorpcije na epitelu
<p>Slabost (<i>engl. Weakness</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> ne stupaju u interakcije sa sluzi i ne mogu doseći dublje slojeve epitela 	<p>Slabosti (<i>engl. Weaknesses</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> mogućnost uzrokovanja privremenih ili trajnih oštećenja sloja sluzi
<p>Mogućnosti (<i>engl. Opportunities</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> produljeno vrijeme zadržavanja poboljšana suradljivost pacijenata uslijed rjeđeg uzimanja lijeka povećanje postotka apsorbiranog lijeka što omogućava smanjenje ukupne količine primjenjene doze 	<p>Mogućnosti (<i>engl. Opportunities</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> produljeno vrijeme zadržavanja poboljšana suradljivost pacijenata uslijed rjeđeg uzimanja lijeka povećanje postotka apsorbiranog lijeka što omogućava smanjenje ukupne količine primjenjene doze
<p>Opasnost (<i>engl. Threat</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> uklanjaju se obnavljanjem sluzi 	<p>Opasnost (<i>engl. Threat</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> mogu biti uklonjene prije nego dosegnu mjesto apsorpcije na epitelu

Idealne čestice trebale bi istovremeno posjedovati svojstva mukoadhezije i mukopenetracije čime bi se ostvarile lokalno visoke koncentracije te bi se uslijed značajnog koncentracijskog gradijenta odvijala pasivna difuzija lijeka kroz sluz.

Takve svojstva mogu se postići razvojem sustava s promjenom zeta potencijala (*Slika 6c.*). U početku bi čestice trebale imati negativni zeta potencijal, koji im omogućava prolaz kroz sluz. Nakon što čestice prođu kroz taj sloj, na mukoznoj površini djelovanjem enzima uklanja se dio čestica koji nosi negativni naboj, ostavljajući sloj pozitivnog zeta potencijala koje endocitozom mogu ući u stanicu. Ovakvi terapijski sustavi mogu biti sačinjeni od polimera koji nosi fosfatne skupine koje, kada se nađu na mukoznoj površini, uklanjaju se djelovanjem alkalne fosfataze (Boegh i Nielsen, 2015).

Druga mogućnost uključuje kombinaciju mukopermeativnih svojstva enzima koji kidaju mucine i mukoadhezivna svojstva tiolnih sustava koji mogu stvarati disulfidne veze s tiolnim

skupinama cisteina u sluzi (Slika 6b.). Nedostatak ovakvog pristupa je reaktivnost nanočestica sa slobodnim tiolnim skupinama koja može dovesti do nastanka disulfidnih mostova tijekom njihove pripreme. Ukoliko bi se prehodno načinile slabe disulfidne veze između tiolnih skupina nanočestica i merkaptotičke kiseline, ovaj bi se problem izbjegao. Moguća je primjena tioliranog polimera koji pokazuje o pH-ovisnu reaktivnost; konjugati poliakrilne kiseline i cisteina stabilni su kod pH 5 – 6 i neće reagirati s tiolnim skupinama u sluzi nego kroz nju prolaze. Dolaskom do epitelne površine, gdje je pH vrijednost veća, konjugati će postati reaktivniji i doći će do nastanka disulfidnih veza sa sluzi. Na taj način produljuje se vrijeme otpuštanja lijeka, stvara se veliki koncentracijski gradijent što će poboljšati apsorpciju lijeka (Abdulkarim i sur., 2015).



Slika 6. Shematski prikaz nanočestica koje oponašaju virus (A), čestica konjugiranih s enzimom (B) i čestica čije se djelovanje temelji na promjeni zeta potencijala (C).

(Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016)

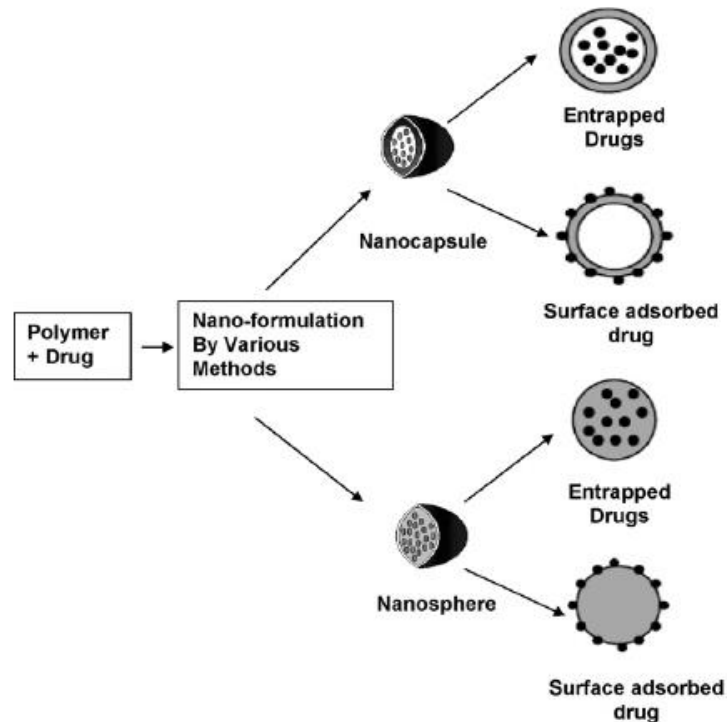
1.2. Mukopenetrativne nanočestice

Oralna primjena lijekova je najčešći način primjene lijeka zbog takve jednostavne primjene za pacijenta te time bolje adherencije u provođenju terapije. Istovremeno, probavni trakt predstavlja značajnu prepreku apsorpciji lijekova i terapijski sustavi moraju tu barijeru nadići, pri čemu se ne smije smetnuti važnost sluzi kao barijere. Sudbina nanočestica koje oralnim putem dođu u probavni trakt može biti: (i) povezivanje s himusom, izravan prolaz kroz GI trakt i eliminacija putem fecesa; (ii) vezanje na mucinska vlakna, podlijevanje mucinskom klirensu i eliminacija fecesom; (iii) prolaz kroz mukoznu mrežu i mogući ulazak u epitel ili produljeno vrijeme zadržavanja u nepokretnom sloju sluzi.

Kod oralne primjene lijeka u obzir treba uzeti promjene svojstava sluzi u patofiziološki promijenjenim stanjima. Histokemijske se promjene mucina događaju kod mnogih bolesti probavnog trakta; kod upalnih stanja, gastritisa i ulkusa, mijenja se obrazac glikozilacije mucina, dok se kod sindroma iritabilnog crijeva mijenja zastupljenost sulfatnih ostataka i sijalinske kiseline te duljina oligosaharidnih lanaca što mijenja viskoelastična i adhezivna svojstva sluzi, otpornost na razgradnju djelovanjem bakterija i ostvarivanje interakcija s okolinom sluzi. Jednako tako, barijerna svojstva sluzi probavnog trakta smanjena su i kod ulcerativnog kolitisa; zbog smanjenog broja goblet stanica i smanjene ekspresije proteina koji imaju zaštitnu ulogu, smanjena je debljina sloja sluzi u kolorektumu. Nadalje, smanjenje površinske napetosti i hidrofobnih svojstava sluzi potencijalno je uzrokovano promijenjenim sastavom lipidne frakcije. Neke upalne bolesti crijeva mijenjaju permeabilnost epitelne barijere omogućavajući nanočesticama lakši prolaz. Budući da bi se nanočestice mogle oralno primjenjivati u dijagnostici i terapiji tumorskih bolesti, nužno je poznavati učinke tumora na svojstva i strukturu sluzi. Mucini imaju veliku i složenu ulogu u razvoju tumora, a tumori sluznice su često povezani s promjenama u glikozilaciji i ekspresiji mucina, koje ovise o vrsti tumora i njegovom smještaju. Pretpostavlja se da rezistenciji tumora na lijek zbog smanjenog ulaska lijeka u stanicu, doprinosi povećana ekspresija mucina na tumorskim stanicama i nepravilna glikozilacija. Nađeno je mnogo dokaza da mucini vezani za stanicu imaju važnu ulogu u širenju epitelnih tumora jer tumorske stanice imaju iznimno veliku ekspresiju mucina koji potiču rast i preživljavanje stanica, u ovom slučaju tumorskih (Ensign i sur., 2012).

Da bi primjena lijeka nanočesticama bila uspješna, lijek mora imati visoki kapacitet uklapanja kako bi količina potrebnog nosača bila manja te se tako izbjegao eventualno nepovoljni učinak nosača na tkiva. Dva su načina na koja se postiže uklapanje lijeka u nanočestice;

moгуće je istovremeno stvaranje čestica i uklapanje lijeka ili uklapanje lijeka u prethodno formirane nanočestice (Soppimath i sur., 2001). Količina uklopljenog lijeka i vrsta interakcija lijeka i nanočestica ovisi o kemijskoj strukturi kako lijeka, tako i polimera, ali i o uvjetima kojima je se provodi uklapanje lijeka (Slika 7.).



Slika 7. Tipovi nanočestica: Prema građi, nanočestice dijele se na nanokapsule i nanosfere.

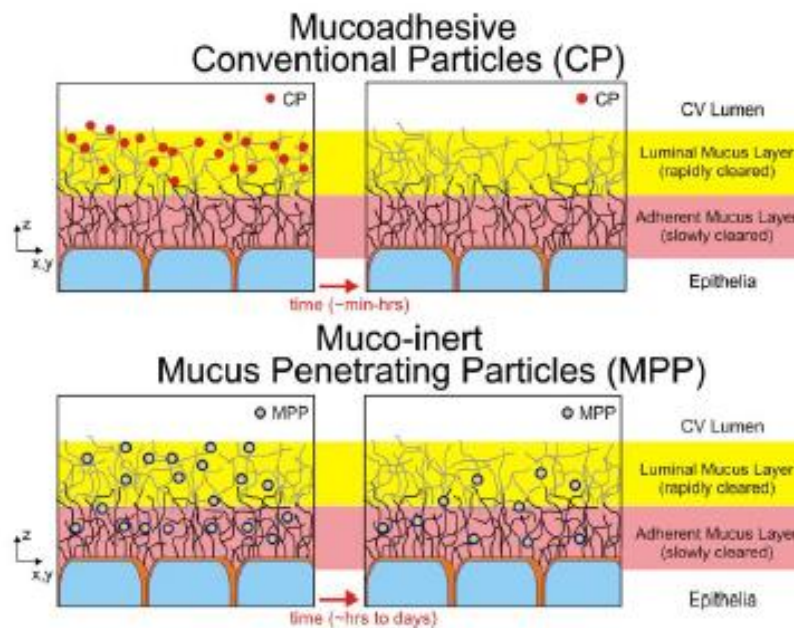
Molekule lijeka se nalaze ili unutar nanočestice ili su adsorbirane na njenoj površini.

(Kumari i sur., 2010)

Jednako je važan i mehanizam oslobađanja lijeka, posebno ako se želi primjenjivati kao oblik promijenjenog (produljenog/odgođenog) oslobađanja. Pet je načina na koje se lijek može oslobađati iz nanočestica: (i) desorpcija lijeka vezanog na površinu, (ii) difuzija kroz matriks nanočestica, (iii) erozija matriksa nanočestica, (iv) difuzija kroz polimernu ovojnica nanokapsula, (v) kombinirani proces erozije i difuzije. Općenito, oslobađanje lijeka ovisi o topljivosti i razgradivosti materijala koji čini česticu, učinkovitosti uklapanja lijeka i veličini nanočestica; manje čestice imaju veće inicijalno otpuštanje lijeka nego veće čestice (Kumari i sur., 2010).

1.2.1. Mukopenetrativne nanočestice

Mukopenetrativne nanočestice mogu lako proći kroz sluz te doseći epitel u usporedbi s mukoadhezivnim nanočesticama (Slika 8.), a načini prolaska kroz sluz mogu se podijeliti u dvije skupine: aktivni i pasivni mukopenetrirajući sustavi. Mehanizam aktivnih sustava temelji se na kemijskoj reakciji koja dovodi do promjena svojstava sluzi ili njihovih vlastitih svojstava. Pasivni pak sustavi ne ostvaruju aktivne interakcije sa sluzi ili epitelom ispod nje, odnosno, interakcije takvih nanočestica sa sluzi trebaju biti svedene na minimalnu razinu.

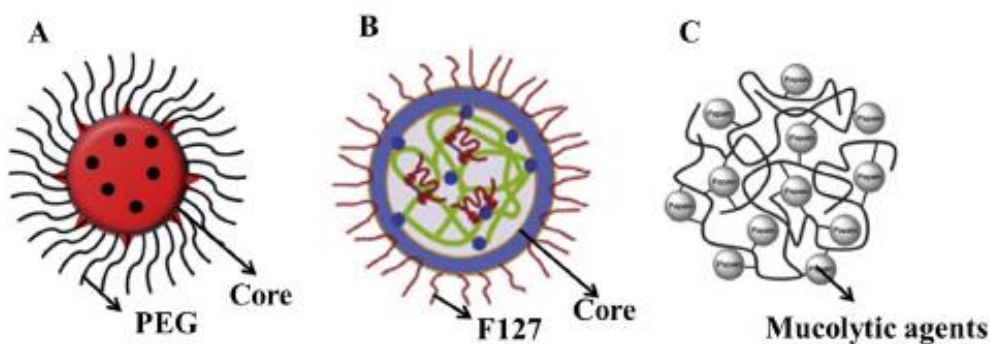


Slika 8. Sumarni shematski prikaz sudbine mukopenetrativnih (MPP) i konvencionalnih mukoadhezivnih čestica (CP) primijenjenih na mukoznu površinu. Shematski prikaz odražava fiziologiju sluzi probavnog i cervikovaginalnog trakta, no isto se očekuje i respiratornom traktu. (Lai i sur., 2009)

Pasivni mukopenetrirajući sustavi

Površina nanočestica može se modificirati oblaganjem s određenim polimerima, od kojih se najčešće koriste poloksameri i polietilenglikoli (Slika 9 a i b.). Poloksameri su triblok kopolimeri polioksietilena i polioksipropilena (PEG-PPO-PEG), zbog čega posjeduju i hidrofilni (PEG) i hidrofobni (PPO) dio u strukturi, a to ih svojstvo čini pogodnima za oblaganje čestica ili ugradnju u fosfolipidni dvosloj liposoma. Usporedbom brzine difuzije čestica PLGA obloženih Pluronic® F-127 i neobloženih PLGA čestica, uočena je značajno bolja difuzija obloženih čestica kroz visoko viskoelastičnu ljudsku sluz u sinusima – difuzija

PLGA/F127 nanočestica bila je samo dvadeset puta manja od njihove teoretske brzine difuzije u vodi, dok je za neobložene PLGA nanočestice brzina difuzije kroz sluz bila za više od tisuću puta manja (Lai i sur., 2011). Kod korištenja polietilenglikola za poboljšavanje mukopenetrativnih svojstava nanočestica, iznimno je bitno odabrati PEG odgovarajuće molekulske mase i strukture. Nanočestice PLGA čija je površina bila gusto obložena lancima PEG-a pokazale su znatno bolja mukopenetrativna svojstva kroz svježu svinjsku crijevnu sluz od onih čestica koje su na površini nosile manje gusto raspoređene lance PEG-a (Bourganis i sur., 2015). Porast molekulske mase rezultira porastom duljine lanaca PEG-a, što dovodi do zapetljanja lanaca s mucinskim lancima sluzi i posljedično smanjenih mukopenetrirajućih svojstava.

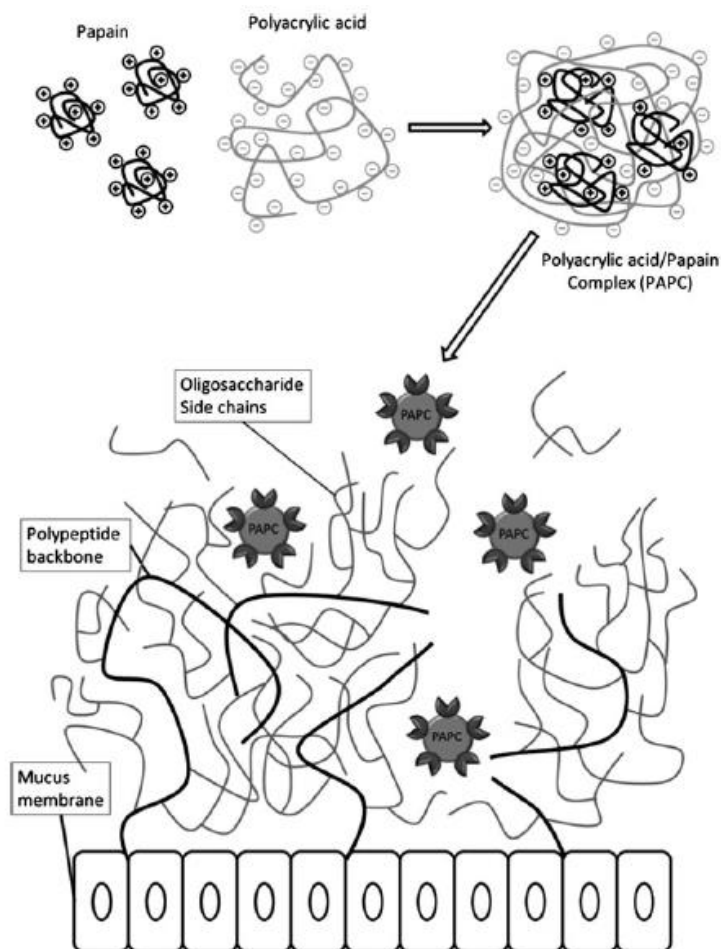


Slika 9. Shematski prikaz mukopenetrativnih nanočestica, (A) PEGilirane nanočestice, (B) nanočestice modificirane Pluronic® F-127, (C) mukopenetrativne nanočestice koje narušavaju barijeru sluzi pomoću mukolitičkih agenasa. (Liu i sur., 2014)

Drugi primjer pasivnog mukopenetrirajućeg sustava su čestice koje oponašaju viruse (Slika 6a.). Naime, virusi poput polio virusa, HPV-a, HBV-a, adenovirusa, rotavirusa i Norwalk virusa, mogu lako proći barijeru sluzi zahvaljujući površinskim karakteristikama; njihova je površina prekrivena i pozitivno i negativno nabijenim ostacima koji zbog međusobnih interakcija ne teže ostvariti interakcije sa sluzi. Čestice koje oponašaju viruse pripremljene su korištenjem kitozana i kondroitin sulfata, čime je postignuta jednaka gustoća pozitivnog i negativnog naboja na površini čestice, a pokazale su bolja penetrativna svojstva od referentnih nanočestica PDLG-a (Pereira De Sousa i sur., 2015a).

Aktivni mukopenetrirajući sustavi

Aktivni mukopenetrirajući sustavi temelje se na mukolitičkoj sposobnosti modificiranih nanočestica (*Slika 9c.*), koja im omogućava razaranje dijelova strukture trodimenzionalne mreže sluzi. Mukolitičke čestice kidaju sluz samo na onim mjestima kroz koja prolaze ne narušavajući tako zaštitnu barijernu ulogu sluzi. Jedan se mukolitički sustav temelji na postupnom otpuštanju reducirajućeg agensa, poput N-acetilcisteina, iz nanočestica, a koji će redukcijom disulfidnih mostova narušiti polimerizaciju mucina što dovodi do smanjene viskoznosti i elastičnosti sluzi. Drugi pristup podrazumijeva imobilizaciju mukolitičkih enzima, bromelaina, papaina, tripsina, koji kidanjem amidnih veza glikoproteina mucina olakšavaju česticama prolaz kroz sluz, na površinu nanočestica (*Slika 10.*). Provedena su ispitivanja mukopenetracije čestica koje su imale vezan bromelain i papain, a bolja je permeacija ostvarena korištenjem bromelaina, nego papaina (Pereira De Sousa i sur., 2015b).



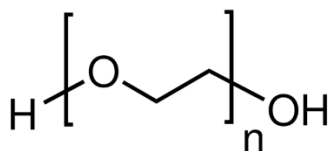
Slika 10. Shematski prikaz kompleksacije papain/poliakrilna kiselina u vodenom mediju i slijedeća mukopenetrativnost takvih nanočestica. (Müller i sur., 2013)

Da bi se mukopenetrativne nanočestice koristile za dostavu lijekova, nužno je da su načinjene od materijala koji će se razgraditi u organizmu. Generalno se može reći kako polimerne nanočestice pružaju zaštitu lijeku od razgradnje, a istovremeno omogućavaju prilagodbu kontrole otpuštanja lijeka iz nanočestice. Širok je spektar takvih materijala što pruža mogućnost za krojenje željenih karakteristika punjenja i otpuštanja lijeka iz čestica.

Topikalna dostava genetskog materijala nanočesticama zanimljiv je pristup u liječenju niza bolesti koje zahvaćaju epitelne površine, kao što su genetski poremećaji, infektivne bolesti i karcinomi. Predmet interesa mnogih istraživanja je genska terapija cistične fibroze (CF). U plućima CF pacijenata prisutan je hiperviskoelastični sputum zbog dehidracije sluzi i posljedičnih kroničnih infekcija i upala. Prosječna veličina pora CF sputuma je 145 ± 50 nm i da bi sputum-penetrirajući genski nosači bili uspješni, nužno je da budu prikladne veličine i velike gustoće lanaca PEG-a vezanog na površinu čestice kako bi se izbjegla adhezija na sputum. Opaženo je da kada se CF sputum prije primjene nanočestica tretira N-acetilcisteinom, difuzija nanočestica je značajno brža nego u netretiranom sputumu, a zabilježen je i veći prijedni put kroz sluz (Ensign i sur., 2012).

1.2.2. PEGilacija mukopenetrativnih nanočestica

PEGilacija nanočestica štiti njenu površinu od agregacije, opsonizacije i fagocitoze te produljuje vrijeme zadržavanja u cirkulaciji jer smanjuje interakcije sa sluzi. Polietilenglikol je nenabijeni hidrofilni polimer (*Slika 11.*), koji se isprva koristio za povećavanje mukoadhezivnih svojstava, dok je kasnije pokazano da se gustim oblaganjem nanočestica PEG-ovima niske molekulske mase smanjuju interakcije čestica i sluzi, a u literaturi su opisane različite PEGilirane mukopenetrativne nanočestice (*Tablica 4.*).

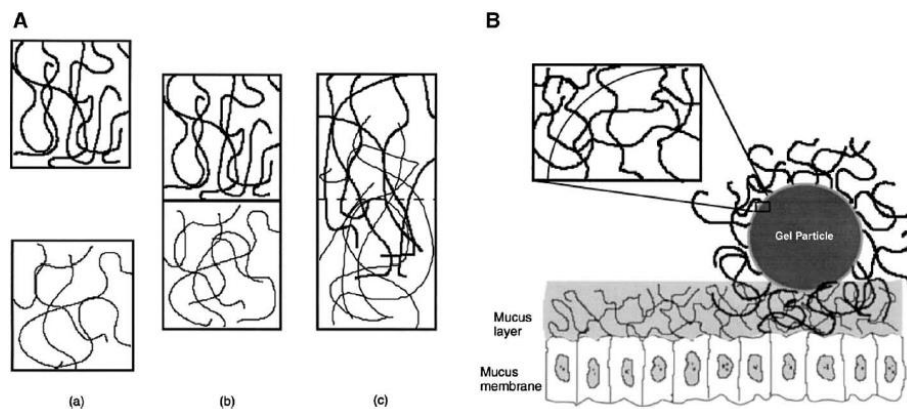


Slika 11. *Struktura polietilenglikola.*

Tablica 4. Pregled različitih PEGiliranih mukopenetrativnih nanočestica. (prilagođeno prema Liu i sur., 2014)

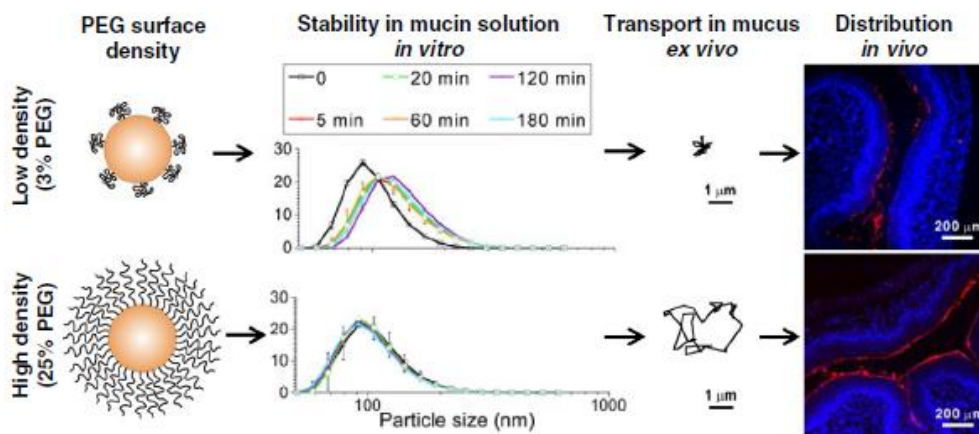
	<i>Srž</i>	<i>Lijek</i>	<i>Model sluzi</i>
<i>Kovalentno vezanje</i>	polistiren (PS)	DNA	goveđe staklasto tijelo
	PS	doksorubicin	cervikovaginalna sluz (CVM)
	PS	-	sluz dišnog sustava osoba bez plućnih bolesti
	poliamidoamin (PAMAM)	-	sputum cistične fibroze (CF)
	polisebacična kiselina (PSA)	-	CVM i CF sputum
	PLGA	-	sluz kroničnog rinosinitisa
	poli-L-lizin (PLL)	DNA	CF sputum
	polietilen tereftalat (PET)	DNA	CF sputum
<i>Fizička apsorpcija</i>			
<i>PEG – Vitamin E</i>	PLGA	doksorubicin	CVM
<i>PEG – APC</i>	rekombinirana adenoviralna	cjepiva	CVM

Mogući uzrok smanjenja interakcija čestica i sluzi mogla bi biti nesposobnost niskomolekularnog PEG-a da interpenetracijom lanaca polimera podupire adheziju (*Slika 12.*), a gustoća PEG-a nije dovoljna da bi učinkovito štitila hidrofobnu srž čestice (Wang i sur., 2008). PEG čini površinu nanočestice hidrofilnijom stvarajući klizavu površinu koja olakšava prolaz čestice kroz sluz. Zbog sterički stabilizirajućeg učinka PEG-a, smanjuje se stupanj interakcija čestica s crijevnim strukturama, a ovaj zaštitni učinak PEG-a može se pripisati stvaranju gustog hidrofilnog oblaka dugih fleksibilnih lanaca na površini nanočestica.

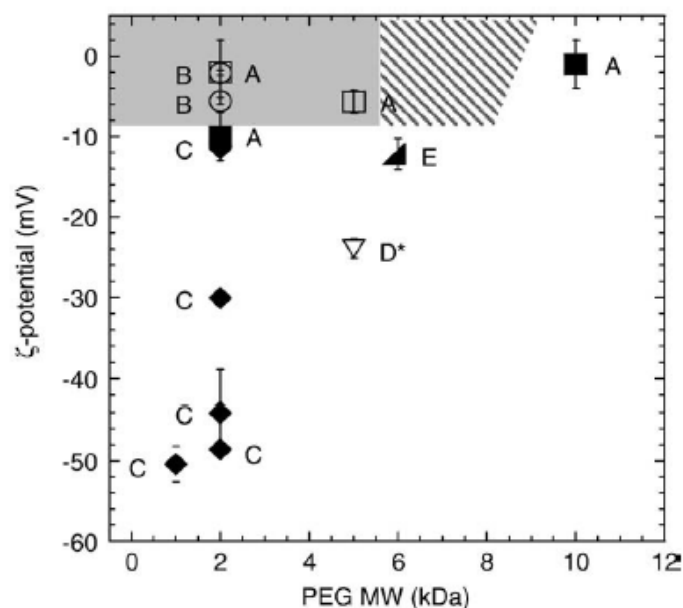


Slika 12. Shematski prikaz interdifuzije polimera uslijed kontakta (a) i intrepentracije između privezanih lanaca na površini čestice i mucinskih vlakana sluzi. (Lai i sur., 2009)

Nekoliko je čimbenika koji utječu na interakcije i cirkulaciju PEGiliranih nanočestica u krvi. Najprije je to molekulska masa PEG-a; pokazano je da za uspješnu zaštitu nanočestica od adsorpcije na proteine i prepoznavanja od strane mononuklearno-fagocitnog sustava nužna je upotreba PEG-a molekulske mase veće od 2 kDa. Nadalje, gustoća lanaca PEG-a na površini nanočestice utječe na svojstva istih (Slika 13.); da bi se poboljšala mukopenetrirajuća svojstva nanočestica nužna je velika gustoća lanaca na površini, no preveliki suvišak istih ipak ima suprotan učinak (Inchaurraga i sur., 2015). Usporedbom rezultata dobivenih u brojnim istraživanjima o interakcijama sluzi i PEGiliranih čestica, predviđen je raspon molekulske mase PEG-a i površinski naboj čestice koji bi trebali omogućiti nastanak obloženih mukoinertnih čestica (Slika 14.).



Slika 13. Utjecaj gustoće PEG lanaca na površini nanočestice na interakcije sa sluzi in vitro, ex vivo i in vivo. Kombinacija polimera je korištena za proizvodnju biodegradabilnih PLGA nanočestica slične veličine, a uz porast površinske gustoće PEG-a. (Suk i sur., 2016)



Slika 14. Fazni dijagram korelacije ponašanja mukoinertnih i mukoadhezivni čestica s obzirom na površinski naboj i molekulsku masu PEG-a različitih PEGiliranih čestica (~ 200 – 500 nm). PEGilirane nanočestice koje su ne-mukoadhezivne u usporedbi s kontrolom naznačene su praznim znakovima, a mukoadhezivne ispunjenim znakovima. Zasjenjeno područje predstavlja potvrđeni raspon molekulske mase PEG-a i ζ potencijala nanočestica, dok isprekidanom linijom prikazano područje predstavlja dodatni predviđeni raspon koji omogućava mukoinertno oblaganje nanočestica. (Lai i sur., 2009)

PEGilacijom nanočestica može se smanjiti njihova sistemska toksičnost. Nanočestice mogu dovesti do agregacije eritrocita i hemolize ako dođe do interakcije s cirkulirajućim eritrocitima, a otpušteni hemoglobin i stanični otpad može se adsorbirati na površinu nanočestica olakšavajući time makrofagima njihovo fagocitiranje (Dobrovolskaia i sur., 2009).

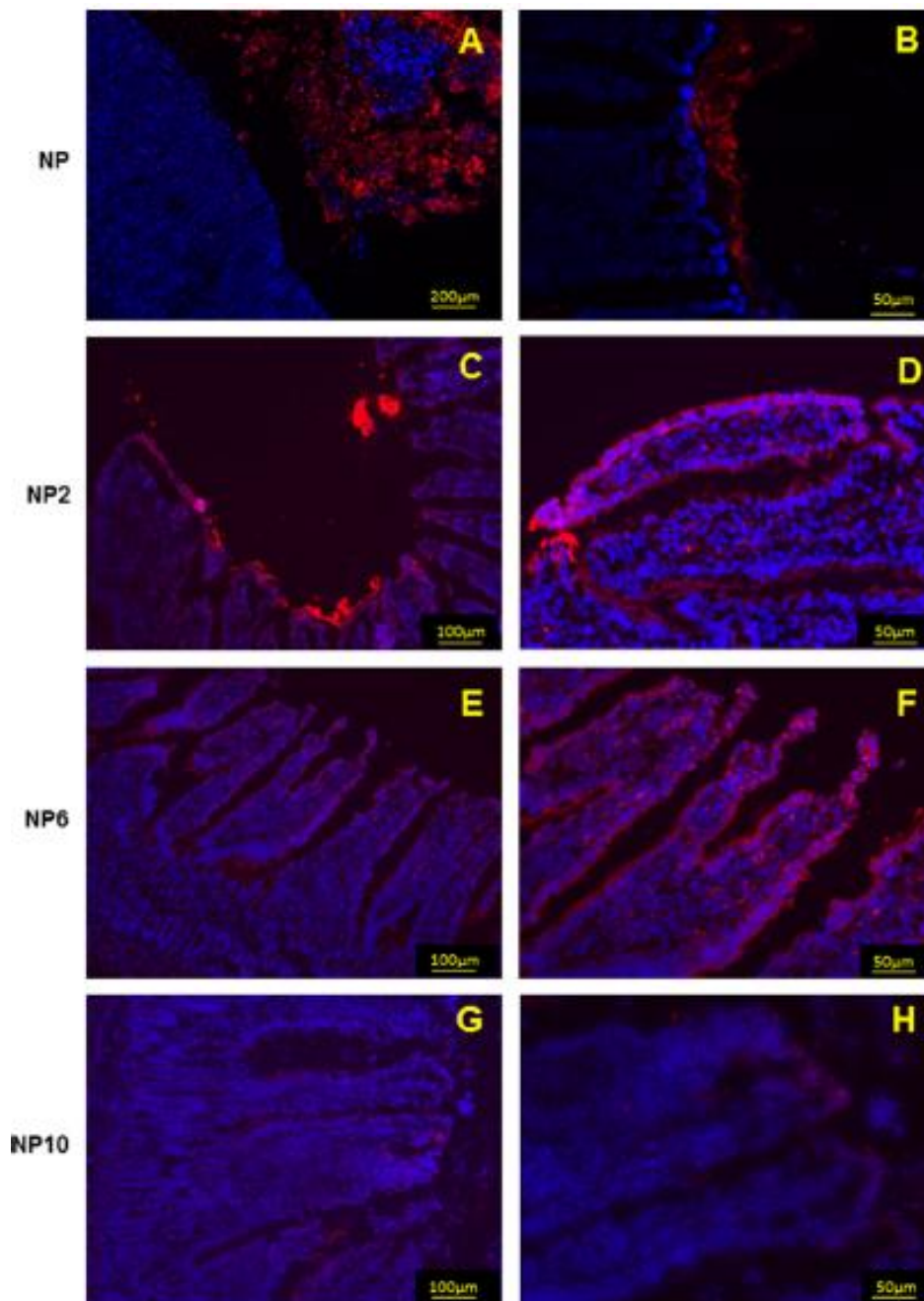
Osim poboljšavanje sistemske dostave lijeka, PEGilacija nanočestica pruža mogućnost bolje dostave lijeka i kod ne-sistemske primjene lijeka, kada se nastoji poboljšati dostava lijeka u vaginalnu i okularnu sluznicu, dišne puteve, probavni trakt te u mozak.

Kada je riječ o vaginalnoj dostavi lijeka nanočesticama, nađeno je da nanočestice koje nisu PEGilirane bivaju adhezijom zarobljene u sluzi, a kroz cervikovaginalnu sluz mogu difundirati nanočestice veličine do 500 nm. Opisano je mnogo metoda kojima se mogu dobiti PEGilirane nanočestice koje brzo penetriraju kroz cervikovaginalnu sluz čime je pružen širok

spektar mogućnosti za razvoj učinkovitijih terapijskih nanosustava za vaginalnu dostavu lijeka (Suk i sur., 2016).

Dostava lijeka nanočesticama u dišni sustav predstavlja mogućnost za razvoj učinkovite lokalne terapije bolesti koje taj sustav zahvaćaju. Sluz dišnog sustava je učinkovita barijera kod zdravih osoba, no u mnogim se upalnim i opstruktivnim bolestima, poput cistične fibroze i kronične opstruktivne plućne bolesti, viskoelastičnost sluzi povećava i ona postaje slabo permeabilna. PEGilacija 100 i 200 nm velikih polistirenskih nanočestica povećala je njihovu penetrabilnost kroz CF sputum. Nanosustav za uspješnu dostavu lijeka kod cistične fibroze s PEG ovojnicom koja je odbaciva mogao bi biti uspješan za penetraciju kroz CF sputum, a onda izravnu interakciju s biofilmom koji se ispod sputuma nalazi, jer PEGilirane nanočestice ne stupaju u interakciju s biofilmom, dok nabijene nanočestice ne mogu penetrirati kroz sputum i dosegnuti biofilm (Forier i sur., 2013).

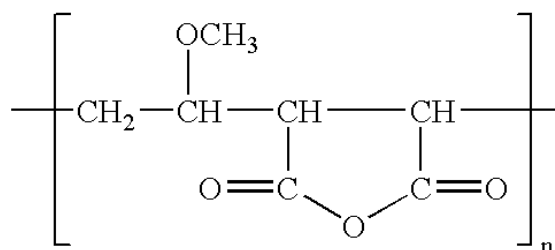
Tim znanstvenika na čelu s Laurom Inchaurrega, ispitivao je utjecaj molekulske mase PEG-a na svojstva oralno primijenjenih nanočestica pripremljenih od kopolimera metil vinil etera i anhidrida maleinske kiseline. Pokazali su da PEGilirane nanočestice putuju puno dublje kroz sluz probavnog trakta, a taj je učinak bio izraženiji kada su se koristili PEG 2 000 i 6 000, nego PEG 10 000 (*Slika 15.*) (Inchaurrega i sur., 2015).



Slika 15. Vizualizacija PEGiliranih nanočestica (NP2, NP6 i NP10) i kontrolnih nanočestica (NP) u ileumu štakora fluorescentnom mikroskopijom. (A) голе nanočestoce u želučanoj sluzi; (B) nanočestice u sluzi ileuma; (C i D) polianhidridne nanočestice PEGilirane s PEG 2 000 u sluzi ileuma; (E i F) polianhidridne nanočestice PEGilirane s PEG 6 000 u sluzi ileuma; (G i H) polianhidridne nanočestice PEGilirane s PEG 10 000 u sluzi ileuma.

1.2.3. Gantrez™

Gantrez™ polimeri su sintetski kopolimeri metil vinil etera i anhidrida maleinske kiseline (*Slika 16.*), koji reagiraju s različitim esterskim skupinama dajući tvrdi, sjajni film koji pokazuje svojstva izvrsne otpornosti na vlagu. Topljivi su u organskim otapalima kao što su različiti aldehidi, alkoholi, ketoni, esteri i glikolni eteri, a karakterizira ih i dobra kompatibilnost s aerosolnim propelentima (www.chempoint.com).

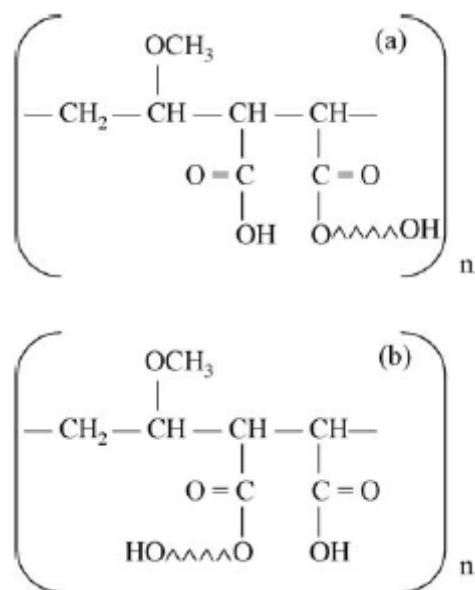


Slika 16. *Struktura Gantrez™ AN-169 polimera.*

Gantrez™ AN polimeri na tržištu su prisutni u velikom rasponu molekularnih masa (*Tablica 5.*), a koriste se za izradu nanočestica zbog niske toksičnosti i izvrsne biokompatibilnosti, a prikladni su i ako se novosintetizirane čestice žele PEGilirati. Zbog dostupnosti slobodnih funkcionalnih skupina kako u molekulama PVM/MA, tako i u molekulama PEG-a, vezanje PEG-a na površinu nanočestice može se odvijati pod blagim uvjetima; mehanizam reakcije bio bi nukleofilni napad anhidridne skupine kopolimera na hidroksilnu skupinu (*Slika 17.*) (Yoncheva i sur., 2005).

Tablica 5. *Prikaz dostupnih Gantrez polimera i vrijednosti njihovih približnih molekularnih masa i specifičnih viskoznosti (prilagođeno prema www.ashland.com)*

Oznaka	Aproksimativna molekulska masa	Specifična viskoznost
AN-119	130 000	0.1 – 0.5
AN-139	690 000	1.0 – 1.5
AN-149	1 250 000	1.5 – 2.5
AN-169	2 000 000	2.6 – 3.5

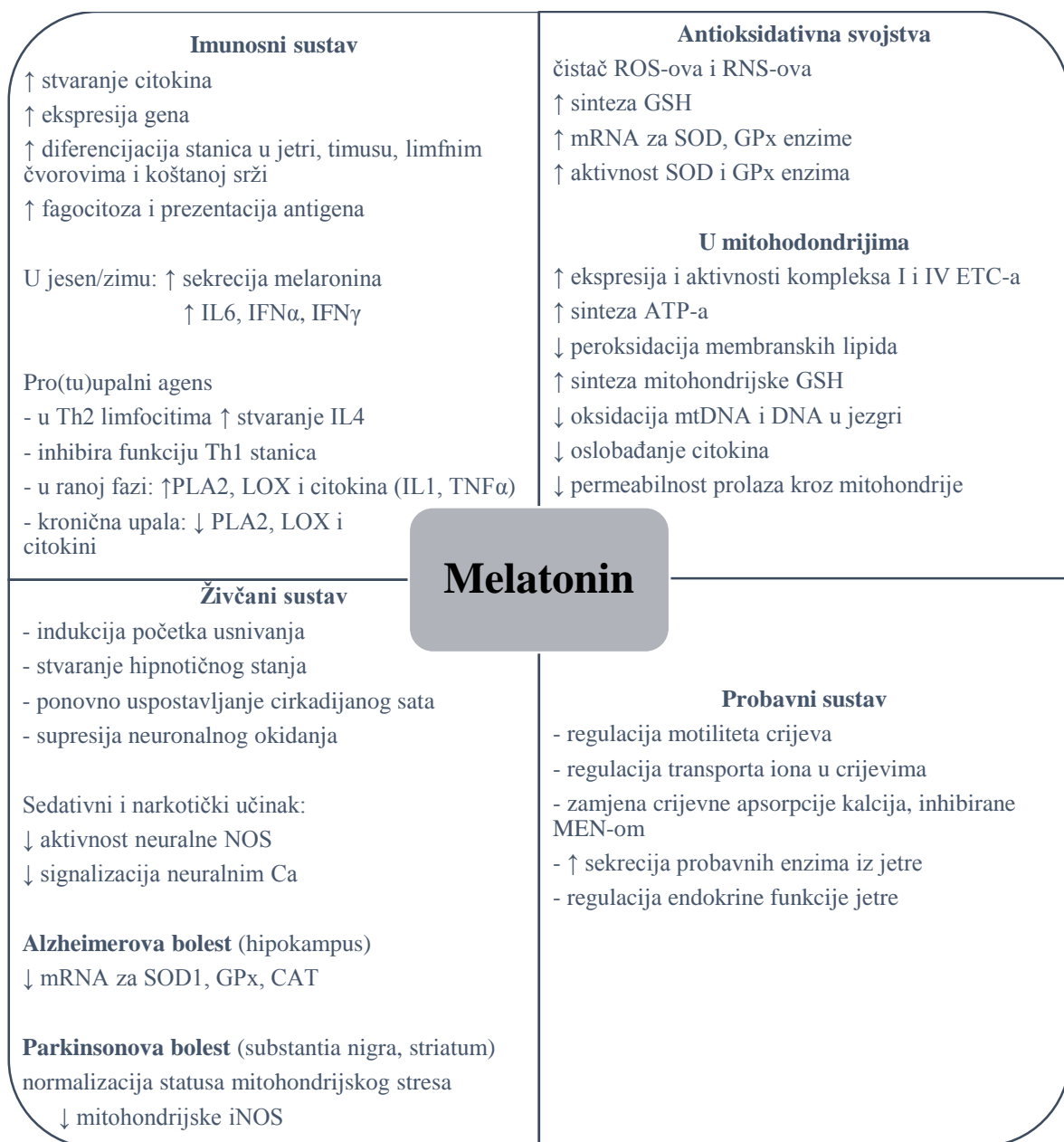


Slika 17. Shematski prikaz vjerojatne esterske veze koja nastaje između lanaca PEG-a i anhidridnih ostataka PVM/MA ovisno o pK_a vrijednosti: reakcija s ostacima s $pK_a = 3.5$ (a) ili $pK_a = 7.5$ (b).

Gantrez™ AN-169 je bijela praškasta tvari netopljiva u vodi, koja se lako dispergira u vodenom mediju pri čemu dolazi hidrolize postraničnih anhidridnih lanaca te se stvara providna otopina dikiseline, a koristi se kao osnovni polimer za postizanje bioadhezivnosti u proizvodima za učvršćivanje zubnih proteza. Dikiselinski oblik ovoga polimera je komercijalno dostupan kao Gantrez™ S-97 koji se koristi u izradi preparata za njegu usne šupljine poput vodica za ispiranje usne šupljine i zubnih pasta te preparata za njegu kose (www.ashland.com).

1.3. Melatonin

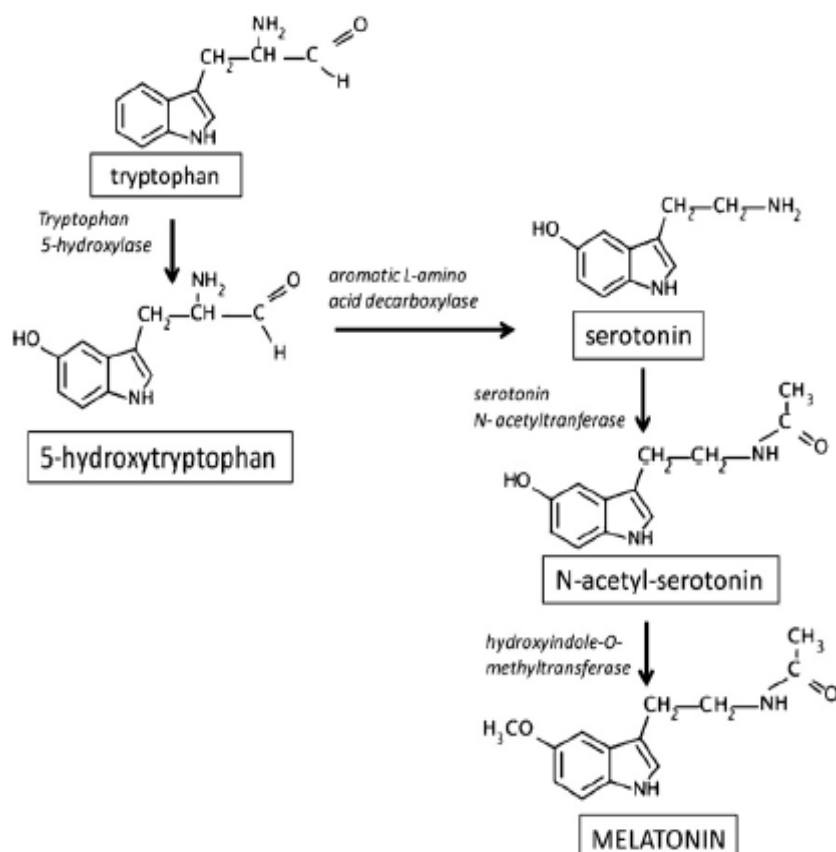
Melatonin je glavni hormon kojeg luči epifiza ili pinealna žlijezda, a naprije je izoliran iz goveđe epifize. Osim kod ljudi i životinja, može ga se naći i kod jednostaničnih eukariota, alga, gljiva te u različitim dijelovima viših biljaka. U neznatnim ga količinama luče i crijeva, mrežnica oka, koža, trombociti i koštana srž. Smatra se da je sveprisutni melatonin jedan od prvih spojeva koji se pojavio na zemlji zbog činjenice da se sintetizira izravno iz aminokiseline (Bénès i sur., 1997), a ostvaruje djelovanja na različita tkiva i organske sustave (Slika 18.).



Melatonin

Slika 18. *Učinci melatonina na različita tkiva i sustave. CAT: katalaza; ETC: lanac prijenosa elektrona; GPx: glutation peroksidaza; GSH: glutation; IFN α : interferon alfa; IFN γ : interferon gama; IL: interleukin; iNOS: inducibilna sintaza dušikova oksida; LOX: lipoksigenaza; MEN: menadion; mtDNA: mitohondrijska DNA; NOS: sintaza dušikova oksida; PLA2: fosfolipaza A2; RNS: reaktivne dušikove specije; ROS: reaktivne dušikove specije; SOD1: superoksid dismutaza jedan; Th1: tip 1 pomoćničkih T limfocita; Th2: tip 2 pomoćničkih T limfocita. (prilagođeno prema Carpentieri i sur., 2012)*

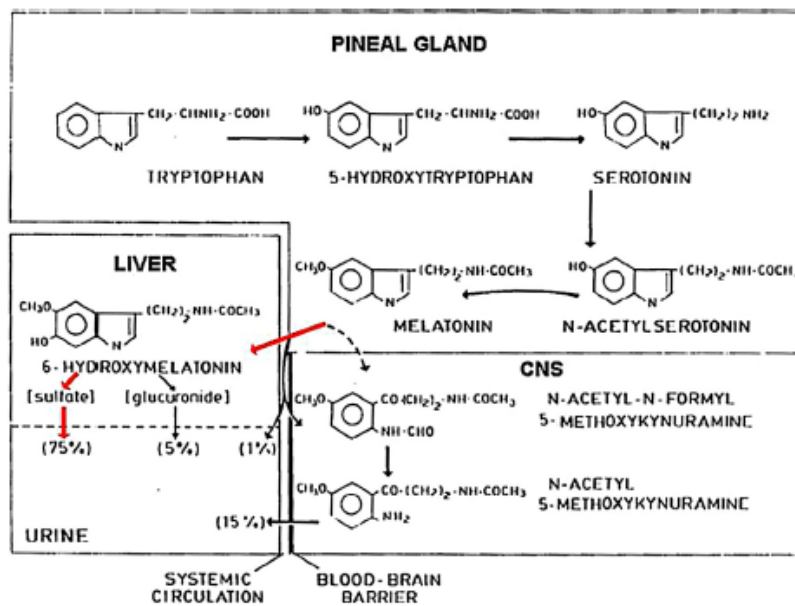
Melatonin, N-acetil-5-metoksitriptamin, sintetizira se iz triptofana preko serotonina (*Slika 19.*). Inicijalni korak sinteze predstavlja vezanje noradrenalina na β_1 adrenergičke receptore, posljedično se aktivira epifizna adenilat-ciklaza i dolazi do porasta razine cikličkog AMP-a i de novo sinteze N-acetil transferaze. Glavni neurotransmitor koji djeluje na epifizu je noradrenalin, koji se otpušta noću kao odgovor na stimulatorne signale iz suprahijazmatične jezgre, a blokatori α_2 i β_1 -adrenoreceptora suprimiraju noćno lučenje melatonina. Reguliranjem učinaka noradrenalina, različiti su neurotransmitori uključeni u kontrolu aktivnosti epifize; kod životinja, vazoaktivni intestinalni peptid, peptid koji aktivira hipofiznu adenilat ciklazu i opiodi stimuliraju sekreciju melatonina djelovanjem na σ receptore, dok je gama aminomaslačna kiselina, neuropeptid Y, dopamin i glutamat, inhibiraju. Sinteza melatonina ovisi o dostupnosti triptofana, ali i o statusu folata i vitamina B6 koji može potaknuti sintezu melatonina u djece prije puberteta. Najveća produkcija melatonina se odvija u dobi 3 – 6 godina, a zatim se smanjuje za osamdeset posto dok ne dosegne razinu kod odraslih osoba.



Slika 19. Prekursori melatonina su triptofan i serotonin. *N*-acetiltransferaza (AANAT) katalizira pretvorbu serotoninina u *N*-acetilserin, a hidroksiindol-*O*-metiltransferaza (HIOMT) prevodi *N*-acetilserin u melatonin. (Carpentieri i sur., 2012)

Lučenje melatonina iz epifize odvija se noću, pri čemu se maksimalne koncentracije u plazmi dosežu između 03:00 i 04:00 h poslije ponoći. Melatonin se nakon sinteze ne pohranjuje u pinealocitima, nego difuzijom prelazi u cirkulaciju. Kada dospije u cirkulaciju, budući da zbog topljivosti i u lipidima i u vodi dobro prolazi kroz stanične membrane, dospijeva do različitih tekućina, tkiva i stanica; prolazi i krvno-moždanu barijeru te može utjecati na aktivnost mozga. Koncentracija melatonina u cerebrospinalnoj tekućini je 20 – 30 puta veća nego u krvi, a s udaljenošću od epifize se snižava, što je znak da ga mozak koristi. Melatonin prolazi fetoplacentarnu barijeru te je jedan od načina na koji se regulira fetalni biološki sat, a može prijeći i u majčino mlijeko i tako dospjeti u cirkulaciju novorođenčeta. Profil koncentracije melatonina u plazmi je iznimno reproducibilan kod jedne osobe, dok su unutar populacije prisutne značajne razlike.

Metabolizam melatonina primarno se odvija u jetri, gdje se biotransformira više od devedeset posto cirkulirajućeg melatonina (Slika 20.). Prva reakcija je reakcija hidroksilacije katalizirana CYP1A2. Zbog interindividualnih razlika u aktivnosti tog enzima, treba uzeti u obzir promjene bioraspoloživosti melatonina uslijed interakcija s drugim tvarima koje se preko istog enzima metaboliziraju; primjerice, kofein značajno povećava biodostupnost melatonina, a policiklički aromatski spojevi je smanjuju uslijed indukcije CYP1A2. U mozgu se melatonin oksidira u N1-acetil-N2-formil-5-metoksikinuramin (AFMK), koji ima antioksidativna svojstva jednako kao i melatonin.



Slika 20. Metabolizam melatonina. (Claustrat i Leston, 2015)

Ritam lučenja melatonina regulira endogeni sat smješten u suprahijazmatskoj jezgri hipotalamusa, a glavni sinkronizator regulatornog sustava lučenja melatonina je ciklus svjetlo/tama. Melatonin se sintetizira tijekom perioda tame; naime, u prisutnosti svjetla, signali iz retinohipotalamičkog trakta inhibiraju njegovu sintezu. Stvaranje melatonina inhibirano je i djelovanjem umjetnog svjetla tijekom noći; svjetlo intenziteta 2 000 – 2 500 luksa pri izloženosti od dva sata (02:00 – 04:00 h) u potpunosti inhibira sintezu melatonina, dok skromno inhibitorno djelovanje ima svjetlost 50 – 300 luksa (Bojkowski i sur., 1987). Kada se izloženost svjetlosti ponavlja tijekom nekoliko noći, lučenje melatonina nadilazi inhibiciju te se odvija s odgodom – u jutro.

Promjena lučenja melatonina u odgovoru na sezonske promjene danas se ne odvija zahvaljujući modernom umjetnom osvjetljenju; promatranjem muškaraca izloženih prirodnom i umjetnom svjetlu u gradskim sredinama, primjećeno je da nema razlika u profilima koncentracija melatonina i tiotropina te rektalne temperature tijekom ljeta i zime.

Budući da lako prolazi membrane i ima široko rasprostranjene receptore, melatonin ima mnoge uloge. Putem specifičnih membranskih receptora ostvaruje biološku aktivnost, stupa u interakcije s nuklearnim receptorima i unutarstaničnim proteinima, poput proteina povezanih s tubulinom ili kalmodulina, a pokazuje i izravni ili pak posredni antioksidativni učinak. Dva su podtipa melatoninskih receptora, MT1 i MT2, a oba su povezana s G proteinom i imaju sedam transmembranskih domena. Aktivacijom ovih receptora moduliraju se unutarstanični putevi prijenosa signala, adenilat ciklaza, gvanilat ciklaza, fosfolipaza A2 i C te se mijenja aktivnost kalijevih i kalcijevih kanala. Melatonin je ligand i *orphan* nuklearnih receptora RZR/ROR, a djelovanjem preko ovih receptora melatonin ostvaruje imunomodulatorni učinak (Claustrat i Leston, 2015).

1.3.1. Terapijske mogućnosti melatonina

Najbolje objašnjeni učinci melatonina povezani su s njegovim utjecajem na cirkadijani ritam, no on utječe na različita fiziološka i patofiziološka stanja; djeluje na imunosti i kardiovaskularni sustav, reproduktivne organe, osteogenezu te percepciju boli, a ispituje se njegov utjecaj na neurodegenerativne i maligne bolesti (Rivara i sur., 2015). Melatonin smanjuje ukupni kolesterol i oksidaciju LDL-a, povećava razinu HDL-a, sprječava lipidnu peroksidaciju i stvaranje aterosklerotskog plaka te smanjuje krvni tlak.

Melatonin je učinkovitiji hvatač slobodnih radikala nego vitamin E, a izravno hvata hidroksilni radikal te kisikove reaktivne spojeve. Naziva se krajnji ili suicidalni antioksidans jer se jednom oksidirani melatonin ne može više reducirati budući da su produkti sa slobodnim radikalima stabilni. Nadalje, melatonin povećava razine nekoliko antioksidativnih enzima, kao što su superoksid dismutaza, glutation reduktaza i glutation peroksidaza, a inhibira sintazu dušikova oksida koja je prooksidativni enzim. Čini se kako je povećanje razine glutation peroksidaze najdosljedniji mehanizam djelovanja melatonina, dok je djelovanje na druge enzime tkivo-specifično ili uvjetovano nekim čimbenicima. Zbog postojanja dokaza o prisutnosti oksidativnog stresa u patogenezi nekih bolesti središnjeg živčanog sustava, ispitan je utjecaj melatonina u prevenciji neurodegenerativnih bolesti.

Trenutno dostupni podaci ukazuju da je količina endogeno stvorenog melatonina dostatna da bi se ostvario antioksidativni učinak (Manev i sur., 1996). Korist antioksidativnih svojstava melatonina utvrđena je kod pacijenata s reumatoidnim artritismom (RA), žena koje imaju probleme s neplodnošću i kod starijih pacijenata s primarnom esencijalnom hipertenzijom. Studije o učinku melatonina na reumatoidni artritis nisu pokazale isključivo njegovu korist, nego je zabilježeno da djeluje kao promotor RA zbog sposobnosti da se ponaša kao stimulator otpuštanja proupalnih citokina i pojačivač imunskog odgovora organizma (Cutolo i Maestroni, 2005).

Zbog lipofilne prirode, melatonin lako prolazi membrane i ulazi u stanične organele poput mitohondrija. Stabilizira unutarnju mitohondrijsku membranu i poboljšava aktivnost lanca prijenosa elektrona. Naime, melatonin ima visoki redukcijski potencijal, zbog čega može reagirati sa sastavnicama lanca prijenosa elektrona i povećati tok elektrona te nastanak ATP-a. Reaktivne kisikove specije (ROS) i reaktivne dušikove specije (RNS) nastaju kao nusprodukti mitohondrijskog lanca prijenosa elektrona, a melatonin štiti proteine lanca prijenosa elektrona i mitohondrijsku DNA od oksidativnih oštećenja koja bi ROS i RNS mogli uzrokovati. Melatonin povećava i razinu glutationa (GSH) u mitohondrijima, a smanjuje razinu njegova oksidiranog oblika glutation disulfida (GSSG) (Leon i sur., 2004).

Utvrđena je povezanost melatonina i imunskog sustava; različiti vanjski čimbenici moduliraju aktivnost imunskog sustava, a jedan od njih je i svjetlost. Budući da se melatonin sintetizira i u mrežnici i drugim organima, imunski sustav može biti pod utjecajem melatonina sintetiziranog na tim mjestima. Mononuklearne stanice u krvi sintetiziraju melatonin koji onda potiče stvaranje citokina u njima preko nuklearnih receptora. Melatonin inducira diferencijaciju T stanica u pomoćničke T stanice (Th1), povećava aktivnost i stvaranje stanica prirodnih ubojica. Pokazano je da melatonin može djelovati ne samo kao aktivator imunskog sustava, nego i kao njegov inhibitor jer djeluje kao protuupalni čimbenik. Protuupalna aktivnost se postiže aktivacijom tipa 2 pomoćničkih T stanica (Th2) koje stvaraju interleukin 4 i inhibicijom aktivnosti Th1 stanica. Djelovanje melatonina očituje se u nekoliko koraka razvoja upale; u ranoj fazi upale ima proupalno djelovanje jer aktivira proupalne medijatore poput fosfolipaze A2, lipooksigenaze, interleukina 1 i faktora tumorske nekroze α , dok napredovanjem upale u kroničnu fazu, melatonin inhibira oksidaciju u leukocitima i dovodi do njihovog preživljavanja (Radogna i sur., 2010).

Enteroendokrine stanice u sluzi probavnog trakta proizvode zamjetnu količinu melatonina; količina melatonina u crijevima je četiri stotine puta veća od one u epifizi, a njegova sinteza

tu ne ovisi o cirkadijanom ritmu. U probavnom traktu melatonin iskazuje antioksidativna svojstva; njegova koncentracija u jetri dostatna je za prevenciju oksidativnih oštećenja. Melatoninski se receptori nalaze i u gušterači gdje stimulira lučenje pankreasnih enzima, a pokazano je da endogeno sintetizirani melatonin štiti gušteraču od razvoja pankreatitisa.

Melatonin djeluje hipnotički preko MT1 i MT2 receptora; preko MT2 receptora resetira cirkadijani sat, a putem MT1 suprimira okidanje neurona. Kod pacijenata s teškim disfunkcijama središnjeg živčanog sustava i nedostatkom melatonina njegovom se suplementacijom neće ublažiti poteškoće snivanja. Melatonin djeluje na proces usnivanja, a tek neznatno poboljšava održavanje sna zbog kratkog vremena poluživota koje iznosi 20 – 30 minuta. Alzheimerova i Parkinsonova bolest primjeri su neurodegenerativnih bolesti koje su karakterizirane disfunkcijom mitohondrija, oksidativnim i nitrozativnim stresom te apoptozom. Pacijenti s Alzheimerovom bolesti imaju sniženu razinu melatonina u krvi i cerebrospinalnoj tekućini te se njegovom primjenom ostvaruje korist u kognitivnom statusu. Na miševima s Parkinsonovom bolesti pokazano je da melatonin normalizira aktivnost lanca prijenosa elektrona i oksidativni stres u mitohondrijima na području *substantia nigra* i *striatum*, a njegova administracija kod pacijenata s ovom bolesti poboljšava kvalitetu sna (Dowling i sur., 2005).

Značajni su učinci melatonina na djelovanje kardiovaskularnog sustava. Vazoregulatorno djelovanje melatonina iznimno je složeno te uključuje središnje i periferne mehanizme. Preko MT1 receptora dovodi do vazokonstrikcije, dok je vazodilatacija izazvana djelovanjem preko MT2 receptora, a oba su odgovora na melatonin ovisna o cirkadijanom ritmu, trajanju i načinu izloženosti melatoninu te osjetljivosti receptora. Usporedbom s placebo, melatonin smanjuje krvni tlak, reaktivnost krvni žila, razinu cirkulirajućih kateholamina i indeks pulsatilnosti, mjere varijabilnost brzine krvi u krvnim žilama (Pandi-Perumal i sur., 2017).

Mnogo je dokaza o uključenosti melatonina u prevenciju inicijacije, promocije i progresije tumora, a pokazano je da je povećana učestalost karcinoma dojke i endometrija te kolorektalnog karcinoma kod osoba koje rade noćne smjene, što je moguća veza sa smanjenim lučenjem melatonina i povećanom izloženosti svjetlu tijekom noći. Ovi rezultati, zajedno s antioksidativnim i pro(tu)upalnim djelovanjem melatonina upućuju na važnost ispitivanja utjecaja melatonina na tumorske stanice. Tome pridonose i onkostatska svojstva melatonina, odnosno, promjena ekspresije antitumorskih citokina, interleukina 2 i 12. Antiproliferativni učinci melatonina na karcinom dojke kod ljudi posredovani su MT1

receptorima, što predstavlja potencijalnu upotrebu melatonina ili njegovih analoga kao antitumorskih lijekova (Ram i sur., 2002).

Ispitivani su učinci melatonina u kombinaciji s drugim lijekovima (*Tablica 6.*). Upotreba melatonina kao pomoćne terapije u liječenju karcinoma imala bi smisla zbog njegovog protektivnog utjecaja na organe kao što su bubrezi, srce i koštana srž tijekom radio- i kemoterapije. Na taj bi se način pacijentima mogla dati veća doza citostatika ili povećati izloženost zračenju u svrhu poboljšavanja učinkovitosti terapije, a da se štetni učinci na pacijenta ne povećaju. Nadalje, melatonin prevenira ili smanjuje oštećenja želučane mukoze uzrokovana acetilsalicilnom kiselinom i indometacinom, a kada se kombinira s antiulkusnim lijekovima potrebne su njihove manje doze te se smanjuje rizik nuspojava. Zbog sedativnog, antikonvulzivnog, antihipertenzivnog i anksiolitičkog djelovanja, melatonin ima potencijalnu primjenu u liječenju depresije u kombinaciji s inhibitorima monoaminooksidaze, dok se učinak terapije bipolarnog poremećaja povećava kada se litiju ili valproičnoj kiselini pridoda melatonin kao suportivna terapija.

Tradicionalno se melatonin primjenjuje oralno, no zbog ekstenzivnog metabolizma tijekom prvog prolaska kroz jetru takvom se primjenom ostvaruje slaba i varijabilna bioraspodjelivost. Pokazano je da se intranazalnom primjenom melatonina postiže veća bioraspodjelivost i T_{max} nego kod oralne primjene. Transdermalnom primjenom melatonina ostvaruju se zadovoljavajući lokalni učinci, ali ne i sistemski zbog spore apsorpcije melatonina i njegova odlaganja u kožu. Primjena melatonina transmukozno u usnoj šupljini pokazala je veće C_{max} , ali slične T_{max} vrijednosti kao i oralna primjena. Takva transmukozna primjena ima potencijalnu korist ako se želi ostvariti sistemski učinak melatonina, ali i prednost pred oralnom primjenom melatonina za poboljšanje kvalitete sna, jer se uslijed pouzdane vrijednosti T_{max} može znati za koliko će se vremena ostvariti njegovo djelovanje (Zetner i sur., 2016). Transmukozna se primjena intenzivno istražuje zbog visoke prokrvljenosti usne šupljine venskom krvlju, koja dolazi iz srca unutarnjom jugularnom venom, ali i mogućnosti razvoja novih terapijskih sustava koji će sadržavati i enzime, pufere ili pojačivače permeabilnosti. Ipak, postoje i ograničenja ovog puta primjene; relativno je mala površina usne šupljine, a zbog gutanja i salivacije dolazi do gubitka lijeka (Flo i sur., 2016).

Tablica 6. Rezultati *in vivo* i *in vitro* studija o učinkovitosti melatonina u kombinaciji s drugim lijekovima u terapiji različitih bolesti. (prilagođeno prema Carpentieri i sur., 2012)

Kliničko stanje	Melatonin u kombinaciji s drugim lijekovima u terapiji	Učinak	Doza melatonina
epilepsija	fenobarbital	supresija napadaja kod djece s refraktornom epilepsijom	3 mg/dan
	valproat		
	vigabatrin	poboljšanje poremećaja spavanja	
	karbamazepin		
	haloperidol		
staračka demencija	jaka svjetlost	slabljenje agresivnog ponašanja	2.5 mg/dan
depresija	fluoksetin	subjektivno poboljšanje kvalitete sna	2 mg/dan, prije spavanja
Parkinsonova bolest	antiparkinsonici: levodopa, amantadin, selegilin, pramipeksol	subjektivno poboljšanje kvalitete sna	5 mg/dan
Alzheimerova bolest	tioridazin	povećanje dnevne aktivnosti	3 – 6
	jaka svjetlost	poboljšanje ritma odmornosti	mg/dan, prije spavanja
hepatocelularni karcinom	doksorubicin	povećanje stupnja apoptoze i inhibicija rasta tumorskih stanica	$10^{-5} - 10^{-8}$ mol/L
želučani ulkus	omeprazol ranitidin	zaštita gastrične mukoze smanjenjem potrebne doze ovih lijekova	20 mg/kg
Chagasova bolest	meloksikam dehidroepiandrosteron cink	pojačanje imunskog odgovora uzrokovanog <i>Trypanosoma cruzi</i> smanjenje kod parazitemije	5 – 10 mg/kg
tuberkuloza	izoniazid	pojačanje inhibicije mikobakterijskog rasta	1.6 – 10 mM
infekcije Gram(-) bakterijama	gentamicin	smanjenje oto- i nefrotoksičnosti	250 µg do 10 mg/kg
	tobramicin	izazvanih aminoglikozidima	

1.3.2. Fiziološka uloga i terapijski učinci melatonina u usnoj šupljini

Uloge melatonina u usnoj šupljini primarno su povezane s njegovim antioksidativnim i protuupalnim djelovanjem, a može suprimirati upalu parodonta i zubnog mesa, smanjiti gubitak alveolarne kosti, pridonijeti cijeljenju herpesnih lezija, poboljšati integraciju zubnih implantata, ograničiti razvoj karcinoma usne šupljine i svih stanja koja su karakterizirana nastankom slobodnih radikala (Reiter i sur., 2015). Razina melatonina u slini slijedi cirkadijani ritam i najviše koncentracije ostvaruju se tijekom noći, a ta je razina niža nego u krvi te iznosi 1 – 5 pg/ml po danu, odnosno, do 50 pg/ml tijekom noći. Smatra se da melatonin u slini potječe iz sistemske cirkulacije tako što pasivno prelazi u mukozne stanice velikih žlijezda slinovnica i individualne acinusne stanice žlijezda slinovnica ga otpuštaju uslijed kontrakcije mioepitela, no i same žlijezde slinovnice mogu sintetizirati melatonin iz serotonina. Razina melatonina u slini ovisi o vrsti hrane koja je konzumirana netom prije uzimanja uzorka sline, budući da voće, povrće, žitarice, orašasti plodovi, kava, čaj, vino i pivo također sadrže melatonin. Istraživana je povezanost razine melatonina u slini i jačine upale kod periodontalne bolesti te je pokazano da je jačina periodontitisa veća što je niža razina melatonina u slini (Cutando i sur., 2006). Razina melatonina u slini korelira s količinom sline koja se luči te je kserostomija, suhoća usne šupljine, povezana s lošijim periodontalnim statusom.

Melatonin u usnoj šupljini djelovanje ostvaruje putem receptora, ali i neovisno o njima. Na mukoznim stanicama oralne šupljine identificirani su MT1 receptori (Shimozuma i sur., 2011), a pretpostavlja se da pločaste epitelne stanice u usnoj šupljini sadrže sve receptore karakteristične za druge slojevite pločaste epitelne stanice. Lamina propria gingive i parodonta često sadrži mnogo imunokompetentnih stanica koje same sintetiziraju melatonin koji tada pokazuje autokrino, parakrino i intrakrino djelovanje. Budući da je upala važna odrednica zdravlja usne šupljine, oralno raspoloživ melatonin ima ulogu u smanjivanju upale zubnog mesa. Melatonin, zajedno s nekim svojim metabolitima koji nastaju reakcijom sa slobodnim radikalima, visoko je učinkovit u smanjenju oksidativnih oštećenja putem neovisnim o receptorima, nizom reakcija koje se nazivaju melatoninskom antioksidativnom kaskadom. Zahvaljujući antioksidativnim svojstvima, melatonin može biti koristan u liječenju lokalnih upalnih lezija usne šupljine te rana nakon vađenja zuba i kirurških intervencija. Dokazano je da se melatonin veže na aktivno mjesto enzima ciklooksigenaze 2 (COX-2) čime je inhibira. Nadalje, na animalnim modelima je dokazano da melatonin smanjuje incidenciju karijesa, iako nema izravnih dokaza o njegovom antimikrobnom učinku na *Staphylococcus mutans* i *Lactobacillus* vrste, koje su glavne kariogene bakterije u usnoj šupljini (Najeeb i sur.,

2016). S obzirom na navedene činjenice, moguće je očekivati značajniju primjenu melatonina u suvremenoj stomatologiji, tim više što je dokazano da melatonin smanjuje citotoksičnost i genotoksičnost metakrilatnih monomera koji se danas koriste u izradi kompozitnih ispuna za rekonstrukciju kaviteta koji zaostane nakon uklanjanja karijesa. Naime, iako se metakrilatni monomeri polimeriziraju svjetlom *in situ*, tijekom izrade ispune, dio materijala ostaje nepolimeriziran te se s vremenom oslobađa iz zuba uslijed mehaničkog stresa uzrokovanog žvakanjem ili djelovanjem enzima prisutnih u slini. Također, nepolimerizirani monomeri penetriraju u pulpu zuba te dalje u sistemsku cirkulaciju, gdje mogu djelovati toksično. U tom smislu, naročito je zanimljivo svojstvo melatonina da poveća biokompatibilnost materijala koji se primjenjuju u izradi kompozitnih ispuna u suvremenoj stomatologiji (Najeeb i sur., 2016).

Gingivitis i periodontitis su česta upalna stanja mekih tkiva usne šupljine. Lokalnom primjenom melatonina na zahvaćena tkiva, a zahvaljujući njegovom protuupalnom i antioksidativnom djelovanju, moguće je usporiti progresiju bolesti. Progresija peridontalne bolesti karakterizirana je pojačanom razgradnjom kolagena, rezultirajući gubitkom vezivnog tkiva. Istraživanjima na ljudskim gingivalnim fibroblastima dokazano je da melatonin utječe na porast razine COL3A1 gena koji kodira sintezu kolagena tipa III i razine DCN mRNA. Dekortin, proteoglikan bogat leucinom je naročito eksprimiran u gingivi te regulira organizaciju kolagenskih vlakana koji čine osnovu ekstracelularnog matriksa zubnog tkiva. Osim toga, razina COL3A1 raste za vrijeme diferencijacije gingivalnih fibroblasta te je povezana s procesom zarastanja rana i nastajanja ožiljka. Kod gingivitisa i peridontitisa, dolazi do povećanja aktivnosti matriksnih metaloproteinaza (MMP) koje razgrađuju kolagenska vlakana, a u isto vrijeme smanjena je razina dekortina, što rezultira ubrzanom propadanjem ekstracelularnog matriksa. Aktivnost MMP regulirana je tkivnim inhibitorima metaloproteinaza (TIMP), a neravnoteža u razinama MMP i TIMP rezultira fibrinolizom. Dokazano je da melatonin smanjuje omjer MMP1 i TIMP1 mRNA, te tako smanjuje MMP-posredovanu razgradnju ekstracelularnog matriksa. Neki podaci ukazuju da melatonin djeluje na aktivnost MMP izravno, vezanjem na aktivno mjesto enzima te putem MT1 signalnog puta (Gómez-Florit i sur., 2013).

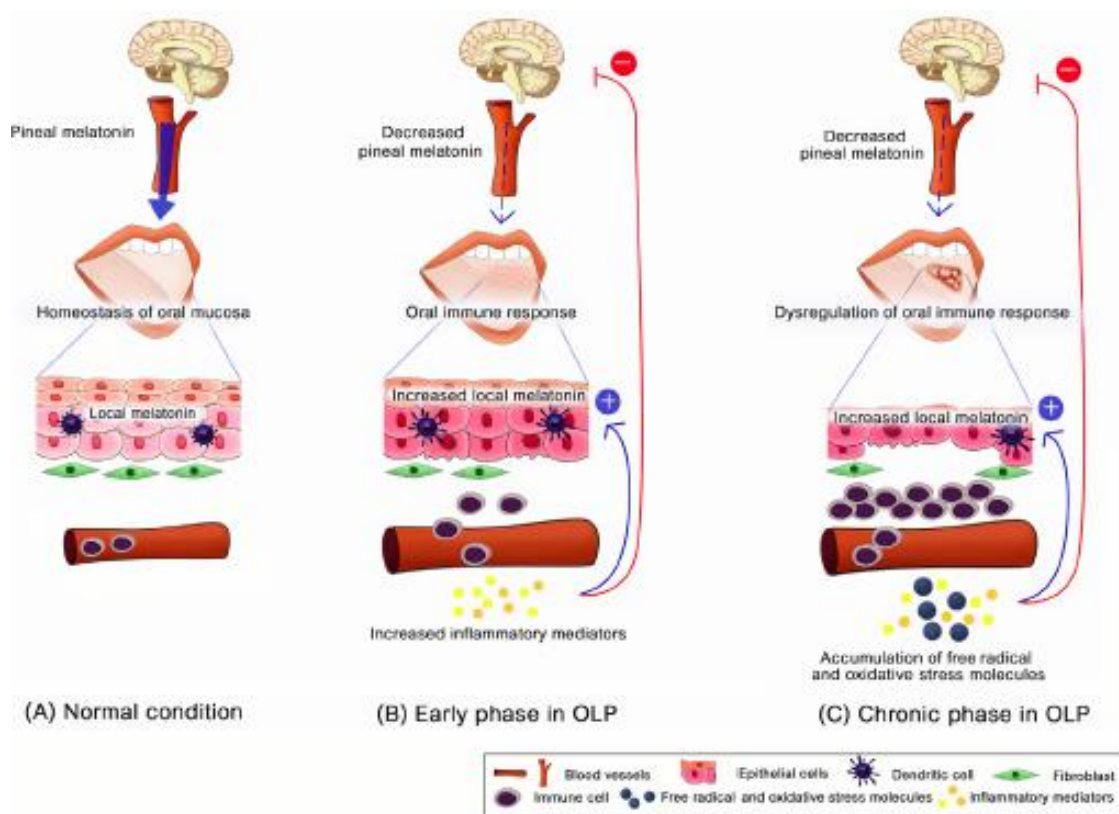
Proces cijeljenja rana ovisi o sposobnosti fibrinoblasta da stvore i organiziraju nova kolagenska vlakna i ostale komponente ekstracelularnog matriksa na isti način kao i u zdravom tkivu. TGFB, transformirajući čimbenik rasta β , glavni je regulator sinteze komponenata ekstracelularnog matriksa, koji ima odlučujuću ulogu u procesu cijeljenja rana,

aktivirajući ekspresiju gena koji kodiraju sintezu kolagena i ostalih komponenata ekstracelularnog matriksa, koji obnavljaju tkivo. Međutim, akumulacija TGFB i endotelina-1 uzrokuje diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste, koji ekspimiraju visoku aktivnost ACTA2 gena, koji kodira glatkomišićni aktin. Taj proces može rezultirati nastankom ožiljnog (vezivnog) tkiva ili regeneracijom funkcionalnog tkiva. Melatonin u tretiranim humanim gingivalnim fibroblastima smanjuje razine ACTA2, END1 i TGBF mRNA, što upućuje na proces koji je usmjeren na regeneraciju, a ne na nastanak ožiljnog tkiva. Nadalje, melatonin pojačava ekspresiju interleukina 10 (IL-10), protuupalnog i antifibrotičkog citokina, pridonoseći smanjenju upalne reakcije. Time dodatno pridonosi regeneraciji tkiva, jer do zarastanja rana bez nastanka ožiljnog tkiva dolazi kada je upalni proces minimalan (Gómez-Florit i sur., 2013). Značajna karakteristika periodontitisa je i visoka razina slobodnih radikala koje produciraju u ustima prisutne bakterije te imunosti sustav, a u isto vrijeme se smanjuje antioksidativni kapacitet tkiva. Pokusima na modelu štakora je dokazano da se topikalnom primjenom melatonina značajno smanjuje razina oksidativnog stresa, upala reakcija te stupanj oštećenja tkiva.

Na pacijentima sa šećernom bolesti ispitivan je utjecaj melatonina na supresiju periodontalne bolesti. Prije primjene melatonina, dijabetičari su imali značajno povećane razine alkalne i kisele fosfataze u slini, kao i osteopontina i osteokalcina, u usporedbi s osobama koje nisu imale šećernu bolest. Topikalnom primjenom gela s melatoninom (1%) postignuto je smanjenje dubine parodontnog džepa i gingivalnog indeksa, a u isto vrijeme postignuto je smanjenje koncentracija alkalne i kisele fosfataze te osteopontina i osteokalcina u slini. Melatonin smanjuje aktivnost osteoklasta i promovira zdravlje alveolarne kosti te bi mogao biti sredstvo za očuvanje zdravlja parodonta (Cutando i sur., 2013, 2014).

Melatonin bi mogao ublažiti simptome nekih virusnih infekcija, koje se često pogoršavaju uslijed oslabljenog imunostnog sustava i molekularnih oštećenja koja nastaju kao posljedica djelovanja slobodnih radikala. Melatonin stimulira odgovor kako urođene, tako i stečene imunosti, i uz hvatanje radikala, pridonosi suzbijanju virusne infekcije, bez izravnog antivirusnog učinka. Smatra se da je protektivni učinak melatonina povezan s njegovom sposobnošću da poveća produkciju interleukina 1β , koji je važan u funkciji imunostnog sustava, jer pojačava aktivnost makrofaga/monocita, limfocita T i B, NK stanica i limfocitima aktiviranih stanica ubojica. Za sada mogućnost primjene melatonina u liječenju virusnih bolesti, samog ili u kombinaciji s drugim lijekovima intenzivno se proučava (Cengiz i sur., 2012).

Oralni lichen planus (OLP) kronična je upalna bolest sluzi usne šupljine koja uzrokuje oštećenja i ulceracije usne šupljine, a karakterizira je degeneracija bazalnih keratinocita, narušavanje epitelne bazalne membrane i subepitelna infiltracija T-limfocita. Kod pacijenata s OLP-om u oralnoj su mukozi utvrđene povećane razine melatonina, arilalkilamin N-acetiltransferaze (AANAT) i MT1, što može odražavati citoprotektivnu ulogu melatonina uslijed njegova antioksidativnog i protuupalnog djelovanja te zaštite epitelnih stanica od apoptoze (Slika 21.). Stvaranje melatonina u infiltriranim imunskim stanicama u oralnoj mukozi može djelovati imunomodulatorno pojačavanjem fagocitoze i smanjenjem upalnog odgovora. Kronična upala može inducirati sintezu melatonina preko AANAT i pojačati njegovo djelovanje putem MT1 receptora u upalom zahvaćenoj oralnoj mukozi OLP pacijenata, a te promjene mogu utjecati na permeabilnost oralnih epitelnih stanica i stanični integritet, što će rezultirati različitim manifestacijama OLP-a (Chaiyarit i sur., 2017; Luengtrakoon i sur., 2017).



Slika 21. Nova hipoteza povezanosti melatonina i patogeneze oralnog lichen planusa (OLP).

(A) U normalnim fiziološkim uvjetima, melatonin se iz epifize otpušta u cirkulaciju, ulazi u sluz usne šupljine i pomaže u održavanju homeostaze kontrolom migracije leukocita iz krvotoka, s ciljem izbjegavanja neželjenog oralnog upalnog odgovora. Melatonin stvoren lokalno, u epitelu i vezivnom tkivu u usnoj šupljini, eliminira neželjene slobodne radikale i

molekule koje uzrokuju oksidativni stres i tako pridonosi održavanju homeostaze. (B) U ranoj fazi OLP-a, upozoravajući signali iz egzogenih i endogenih izvora smanjuju sintezu melatonina u epifizi, potičući migraciju imunskih stanica iz krvotoka u oralni mukus. Aktivirane epitelne stanice usne šupljine i infiltrirane imunske stanice lokalno stvaraju melatonin kako bi se modulirao imunski odgovor u sluzi usne šupljine. (C) U kroničnoj fazi OLP-a, disregulacija oralnog imunskog odgovora, uzrokovana neprekidnošću upozoravajućih signala u oralnoj mukozi, povećava nakupljanje slobodnih radikala i tako doprinosi oštećenju oralne mukoze. Oštećene epitelne stanice usne šupljine i aktivirane imunske stanice povećavaju lokalno stvaranje melatonina kako bi se sanirala oksidativna i upalna oštećenja. (Chaiyarit i sur., 2017)

Posebno je zanimljiva uloga melatonina u prevenciji karcinoma usne šupljine. Iako točan mehanizam djelovanja nije još u potpunosti razjašnjen, smatra se da je taj učinak prvenstveno povezan sa sposobnosti melatonina da neutralizira slobodne radikale te da potakne sintezu reduciranog oblika glutationa koji je glavni stanični antioksidans. Na taj način melatonin sprečava oštećenje genetskog materijala i nastanak karcinoma. Također, melatonin blokira nastajanje endotelina-1, glavnog čimbenika koji stimulira angiogenezu u primarnim tumorima (Goradel i sur., 2017). U isto vrijeme, opaženo je da melatonin inducira apoptozu tumorskih stanica te stimulira imunski sustav na njihovo učinkovitije uklanjanje. Navedeni mehanizmi su dokazani *in vitro*, na staničnim modelima, dok su podaci antitumorskog djelovanja melatonina iz kliničkih studija kontradiktorni. U nekim slučajevima je pokazano da melatonin nema učinka, dok drugi rezultati pokazuju da se istovremenom primjenom citostatika i melatonina postiže smanjenje intenziteta nuspojava te poboljšanja kvaliteta života uz duže preživljavanje (Mehta i Kaur, 2014). Navedeni podaci nedvojbeno ukazuju na potencijal primjene melatonina u prevenciji i uspješnijem liječenju karcinoma usne šupljine, no on se još mora detaljnije istražiti i potvrditi u kliničkim ispitivanjima.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U posljednjim desetljećima neprestano raste zanimanje za razvoj novih terapijskih sustava nanometarskih veličina koji će unaprijediti terapijsku učinkovitost dostupnih lijekova. Uklapanjem lijeka u različite terapijske nanosustave mogu se prevladati problemi povezani s njihovim nepovoljnim biofarmaceutskim svojstvima, kao što su loša topljivost i slaba permeabilnost kroz biološke membrane, a lijek se može zaštititi od kemijske razgradnje. Istovremeno, moguće je spriječiti nepovoljan utjecaj lijeka na sluznice organizma. U konačnici, može se postići kontrolirano oslobađanje lijeka iz nanočestica pri čemu se mjesto i brzina oslobađanja mogu prilagoditi terapijskim potrebama. Primjena lijeka putem mukoznih sluznica tijela u prvom redu omogućuje učinkovitiju lokalnu terapiju različitih bolesti sluznice, pri čemu se terapijski učinak ostvaruje primjenom manjih doza lijeka nego kod sistemske primjene, što rezultira manjom učestalosti nuspojava. Osim toga, primjenom lijeka na sluznice moguće je postići i sistemsku apsorpciju lijeka pri čemu se zaobilazi metabolička razgradnja lijeka tijekom prvog prolaska kroz jetru (Bernkop-Schnürch, 2013).

Mukopenetrativne nanočestice pokazuju svojstvo neometanog transporta kroz sluz, pri čemu je brzina njihove difuzije jednaka onoj u vodi. Kako bi se osigurala mukopenetrativnost te izbjeglo zadržavanje nanočestica u sloju sluzi, potrebno je pripremiti nanočestice odgovarajućeg raspona veličina čestica (< 200 nm) te odgovarajuće modificirati njihovu površinu. Jedan od mogućih pristupa u tom smislu je i PEGilacija nanočestica, odnosno vezanje PEG-a niskih molekulskih masa (2 - 10 kDa). Na taj način se dodatno stabiliziraju i same nanočestice uslijed zaštitnog djelovanja PEG omotača (Yoncheva i sur., 2005).

Svrha ovog diplomskog rada je razvoj i karakterizacija mukopenetrativnih polianhidridnih nanočestica s melatoninom. Melatonin je endogeni indolamin sa širokim spektrom djelovanja, a od posebnog su interesa njegovi potencijalno korisni terapijski učinci u usnoj šupljini, ponajprije učinak na patološke promjene parodonta, kao što su gingivitis i paradontitis (Najeeb i sur., 2016). Kao osnova nanočestica koristit će se Gantrez™ AN-169, kopolimer metil vinil etera i anhidrida jabučne kiseline, koji spontano formira nanočestice tijekom procesa desolvacije (Inchaurraga i sur., 2015). Prisustvo polianhidridnih veza u tom polimeru omogućava njegovu jednostavnu funkcionalizaciju u nevodenom mediju. Kako bi se osigurala mukopenetrativnost nanočestica, tehnološki proces njihove pripreme će se modificirati na način da se osigurava priprema nanočestica ciljanog raspona veličina. Njihova površina će se dodatno modificirati vezanjem PEG-a molekulskih masa od 4 - 10 kDa, a pritom će se pratiti

utjecaj PEGiliranja na ključna svojstva nanočestica. Mukopenetrativne polianhidridne nanočestice u čvrstom stanju pripremit će se postupkom sušenja smrzavanjem, pri čemu će se taj proces dodatno optimirati s obzirom na tip i koncentraciju korištenog lioprotektora, kako bi se osigurala stabilnost nanočestica tijekom procesa sušenja te očuvanje karakteristika ključnih za mukopenetrativnost.

3. MATERIJALI I METODE

Pri izvođenju pokusa upotrebljavani su iduće kemikalije, instrumenti i pribor.

3.1. Kemikalije

- Aceton (Sigma-Aldrich, SAD)
- Acetonitril (Sigma-Aldrich, SAD)
- Etanol (CARLO ERBA Reagents SAS, Francuska)
- Gantrez AN-169 polimer molekulske mase 2000 kDa (Ashland, SAD)
- Glicin (Sigma-Aldrich, SAD)
- Melatonin (Sigma-Aldrich, SAD)
- Natrij klorid (Kemig d.o.o., Hrvatska)
- Polietilenglikol Mr 2 000 (Sigma-Aldrich, SAD)
- Polietilenglikol Mr 6 000 (Sigma-Aldrich, SAD)
- Polietilenglikol Mr 10 000 (Sigma-Aldrich, SAD)
- Saharoza (VWR Chemicals, Belgium)
- Trehaloza (VWR Chemicals, Belgium)
- Visokopročišćena voda

3.2. Instrumenti i pribor

- Agilent HPLC uređaj (SAD)
- Biofuge stratus centrifuga (Heraeus, Njemačka)
- Eppendorf centrifuga 5804 (Eppendorf AG, Njemačka)
- Filteri veličine pora 0,45 μ m (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Njemačka)
- Martin Christ α -1,4 liofilizator (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka)
- Magnetska mješalica (Fisher Scientific, SAD)
- Pall AcroPrep Advance filter ploča (Pall Filtersystems GmbH, Njemačka)
- Precizna analitička vaga Mettler Toledo XS105 (Mettler Toledo, Španjolska)
- Rotavapor R-200 (Büchi, Njemačka)

- Vakuumski centrifugalni koncentrator SPD2010 Integrated SpeedVac™ System (Thermo scientific, Velika Britanija)
- Varian Cary 50 UV/Vis spektrofotometar (Varian Inc., SAD)
- Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Velika Britanija)

3.3. Metode

3.3.1. Priprema PEGiliranih nanočestica

PEGilirane su nanočestice pripravljene metodom jednostavne desolvacije koja je djelomično modificirana (Inchaurraga i sur., 2015). 200 mg kopolimera PVM/PA otopljeno je u 4 ml acetona uz miješanje na magnetskoj mješalici. Posebno je otopljeno 30 mg PEG-a u 2 mL acetona, pri čemu je otapanje polimera poboljšano blagim zagrijavanjem korištenjem vodene kupelji uz miješanje na magnetskoj mješalici. U istraživanju su korišteni PEG polimeri molekulskih masa od 4, 6 i 10 kDa. Nakon potpunog otapanja oba polimera, otopina PEG-a je dodana u otopinu PVM/PA kopolimera te je smjesa inkubirana na sobnoj temperaturi 1, odnosno, 1.5h, uz miješanje magnetskom mješalicom brzinom od 800 okretaja u minuti. Nakon procesa PEGiliranja, nanočestice su formirane dodatkom 30 ml visokopročišćene vode. Organsko otapalo uklonjeno je upravljanjem na rotauparivaču pri sniženom tlaku, a pripravak je nadopunjen do 30 mL dodatkom pročišćene vode. 300 µl uzorka je odvojeno za analizu veličina čestica i mjerenje zeta potencijala, a ostatak je podvrgnut centrifugiranju pri 20 000 g u trajanju od 20 min uz temperaturu od 20 °C. Supernatant je odvojen te je korišten za određivanje sadržaja nevezanog PEG-a, a talog s nanočesticama je resuspendiran u 3 mL otopine saharoze, trehaloze i glicina u rasponu masenih koncentracija od 1 do 5 % te podvrgnut sušenju smrzavanjem tijekom 18 sati. Nakon završetka postupka sušenja, uzorci su izvagani kako bi se odredio prinos te ponovno resuspendirani u ultračistoj vodi te analizirani s obzirom na veličinu, polidisperznost i zeta potencijal.

3.3.1.1. Priprema PEGiliranih nanočestica s melatoninom

Za pripremu PEGiliranih nanočestica s melatoninom, najprije je provedena PEGilacija PVM/MA kopolimera na ranije opisani način. Pri tome je korišten PEG molekulske mase od 6 kDa, a vrijeme inkubacije je iznosilo 1 sat. U međuvremenu je priređena otopina melatonina, otapanjem 20, odnosno 40 mg melatonina u 2 mL acetona. Otopina melatonina dodana je u

otopinu PEGiliranog PVM/MA kopolimera te je sustav zatim inkubiran dodatnih 5 minuta uz miješanje na magnetskoj mješalici, a potom je provedena desolvatacija polimera dodatkom ultračiste vode na ranije opisani način. Odvajanje nanočestica provedeno je ultracentrifugiranjem na ranije opisani način, a nanočestice u čvrstom stanju pripremljene su procesom liofilizacije uz 5 %-tnu otopinu saharoze.

3.3.2. Određivanje postotka PEGilacije

Sadržaj polietilenglikola u supernatantima izdvojenim nakon ultracentrifugiranja disperzija formiranih polianhidridnih nanočestica određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Prije analize, alikvoti supernatanta su pročišćeni na način da je 300 μL uzoraka nanoseno na filter ploču od 96 jažica te podvrgnuti centrifugi na 1 500 x g tijekom 15 minuta. Potom su jažice tri puta isprane acetonitriлом, a između svakog ispiranja su centrifugirani na 1 500 x g tijekom 15 min. Nakon toga su osušeni uporabom vaakumskog centrifugalnog koncentratora te su resuspendirani u 220 μL ultračiste vode.

HPLC analiza uzoraka provedena je koristeći Waters xBridge C18 kolonu, dimenzija 150 x 4.6 mm, s česticama promjera 3.5 μm , na temperaturi od 35 $^{\circ}\text{C}$ i mobilnom fazom koja se sastojala od 39% acetonitrila i 61% vode za analizu sadržaja PEG 4 000, odnosno, 40% acetonitrila i 60% vode za analizu uzoraka s PEG 6 000. U oba slučaja, brzina protoka mobilne faze je bila 2 mL/min uz vrijeme analize od 5 minuta. HPLC uređaj je opremljen refrakcijskim detektorom, koji je bio namješten na 35 $^{\circ}\text{C}$ i 2.31 Hz.

Sustav je kalibriran koristeći standardne otopine PEG 4 000 i 6 000 u ultračistoj vodi u koncentraciji od 1 mg/mL i 6 mg/mL. Preliminarna istraživanja su pokazala da postupak pročišćavanja uzorka te prisustvo PVMA/MA kopolimera u uzorcima prije pročišćavanje ne utječe nepovoljno na točnost i preciznost metode. Sadržaj ispitivanog PEG-a u uzorcima određen je primjenom eksternog standarda, prema formuli:

$$C_{PEG} = \frac{P_{uzorka}}{P_{standarda}} \times C_{standarda} \quad (1)$$

Pri tome je C_{PEG} = koncentracija PEG u analiziranom uzorku, $C_{standarda}$ = koncentracija standarda, P_{uzorka} = površina pika analita u uzorku i $P_{standarda}$ = površina pika standarda.

Postotak vezanja PEG-a na nano čestice određen je prema slijedećem izrazu:

$$Postotak\ vezanja\ PEGa = \left[1 - \frac{masa\ PEG\ u\ supernatantu}{ukupna\ masa\ PEG\ uzeta\ u\ preparaciji} \right] \times 100\% \quad (2)$$

3.3.3. Određivanje veličine i zeta potencijala nanočestica

Fotonskom korelacijskom sprektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*; PCS) određeni su srednji promjer nanočestica i indeks polidisperznosti. PCS se naziva i dinamičko raspršenje svjetla (engl. *dynamic light scattering*; DLS), a omogućava neinvazivno i nedestruktivno određivanje veličine čestica u nanometarskom do mikrometarskom rasponu. Mjere se o vremenu ovisne promjene raspršenja svjetlosti do kojih dovode dispergirane čestice u Brownovom gibanju, a dobivaju se podaci o hidrodinamičkoj veličini čestica (Karow i sur., 2015). Mjerenja su provođena pri 25 °C, korišten je monokromatski koherentni 10 mW He-Ne laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$), dok je kut detekcije raspršene svjetlosti bio 90°.

Zeta potencijal je potencijal na udaljenosti od plohe smicanja, a bitan je parametar u procjeni stabilnosti koloidnih disperzija. Naime, koloidni sustavi s velikom apsolutnom vrijednosti zeta potencijala su stabilni, a sustavi kod kojih je vrijednost zeta potencijala manja su nestabilni i teže flokulaciji. Na površini koloidne čestice nalazi se električni dvostruki sloj, sačinjen od sloja slabo pokretnih iona (Sternov sloj) te sloj suprotno nabijenih pokretnih iona iz otapala. Zajedno sa česticom se giba Sternov sloj, ali i dio vezanih molekula otapala, koji je od ostalih molekula otapala odijeljen plohom smicanja. Zeta potencijal određen je fotonskom korelacijskom sprektroskopijom, korištenjem 10mW He-Ne lasera i pri 25 °C. Intenzitet raspršene svjetlosti mijenja se frekvencijom ovisnom o brzini gibanja čestica, a zeta potencijal se izračunava iz spektra frekvencija koje proizlaze iz detektiranih fotona svjetlosti.

3.3.4. Određivanja postotka uklapanja melatonina

Najprije je proveden razvoj i validacija analitičke metode za određivanje sadržaja melatonina. Matična otopina melatonina pripravljena je otapanjem 10 mg melatonina u 25 mL koncentriranog etanola te nadopunjena do 100 mL pročišćenom vodom. Daljnjim razrjeđivanjem sa smjesom vode i etanola u volumnom omjeru 1:4 priređen je niz otopina u rasponu koncentracija od 5 do 30 $\mu\text{g/mL}$. Apsorbancija pripremljenih uzoraka izmjerena je pri 278 nm pomoću Varian Cary 50 UV/VIS spektrofotometra (Varian Inc., SAD) uz smjesu etanola i vode u volumnom omjeru 1:4 kao slijepu probu.

Postotak uklapanja melatonina u PEGilirane nanočestice određen je indirektnom metodom, određivanjem sadržaja lijeka u supernatantu koji zaostaje nakon odvajanja nanočestica centrifugiranjem. Kako bi se izbjegle analitičke interferencije ostataka acetona tijekom određivanja sadržaja melatonina, alikvoti supernatanta su osušeni smrzavanjem i

rekonstituirani najprije u manjoj količini etanola uz zagrijavanje na vodenoj kupelji, a zatim nadopunjeni pročišćenom vodom, tako da je konačni udio etanola iznosio 25 %, kao što je bio slučaj u uzorcima korištenim za izradu baždarnog pravca. Sadržaj lijeka u tako priređenim uzorcima određen je spektrofotometrijski, kao što je opisano u prethodnom odjeljku. Postotak uklopljenog lijeka izračunat je prema izrazu:

$$\text{Postotak uklopljenog lijeka} = \left[1 - \frac{\text{masa melatonina u supernatantu}}{\text{ukupna masa melatonina uzeta u preparaciju}} \right] \times 100\% \quad (3)$$

Sadržaj melatonina u nanočesticama izračunat je prema izrazu:

$$\text{Sadržaj melatonina} = \frac{\% \text{ uklapanja} \times m_{\text{melatonina}}}{\text{prinos} \times (m_{\text{melatonina}} + m_{\text{PVMA/MA}} + m_{\text{PEG}} + m_{\text{saharoza}})} \times 100\% \quad (4)$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Utjecaj PEGilacije na karakteristike pripremljenih nanočestica

Ispitivane su nanočestice pripremljene metodom jednostavne desolvatacije polimera nakon inkubacije anhidridnog kopolimera s PEG-om. U postupku pripreme nanočestica, mijenjani su vrijeme inkubacije (60 i 90 minuta) te duljina lanaca korištenog PEG-a; naime, korišteni su polimeri molekulskih masa 4 000, 6 000 i 10 000 jer su ranija istraživanja pokazala da je za učinkovitu PEGilaciju nužna molekulska masa PEG-a veća od 2000 Da. Ostali parametri, odnosno omjer volumena organske i vodene faze te omjer masa korištenog kopolimera i PEGa (100:15), bili su konstantni. U prijašnjim je istraživanjima pokazano da je količina vezanog PEG-a ovisna o omjeru kopolimera i PEG-a ; za omjere veće od 0.15 porast količine vezanog PEG-a je minimalan, dok omjeri veći od 0.25 samo narušavaju stvaranje nanočestica (Inchaurraga i sur., 2015). Zbog toga je u ovom radu PEGilacija provedena upravo pri omjeru polianhidridnog kopolimera i PEG-a od 0.15. Priprema nanočestica te PEGilacije provedeni su u bezvodnom mediju jer je ranijim istraživanjima pokazano da u vodenom mediju kopolimer hidrolizira u dikiselinski oblik, koji je topljiv u vodi (Ladaviere i sur., 1998), dok je u bezvodnom mediju, kao što je aceton, preferirana reakcija nastanka esterskih derivata (Yoncheva i sur., 2005). Nužno je reakcije provesti u nevodenom mediju jer je u vodenom mediju hidroliza anhidrida proces koji dominira nad vezanjem PEG-a.

U *Tablici 7.* prikazana je utjecaj PEGilacije na tehnološka svojstva pripremljenih nanočestica, i to na srednji promjer (d), indeks polidisperznosti (PDI), zeta potencijal (ζ). Također, prikazan je podatak o ostvarenom postotku vezanja PEG-a kao i prinos preparacije. Pripremljene nanočestice pokazuju veličinu od 183,8 do 219,3 nm, s indeksom polidisperznosti od 0,136 do 0,207. Zeta potencijal nanočestica je negativan, u rasponu od (-37,92) do (-44,3 mV). Navedene nanočestice su nešto veće od onih koje su priredili Inchaurraga i sur. (2015), čija se veličina kretala u rasponu od 151 do 157 nm, ovisno o korištenom PEG derivatu. Taj rezultat se može pripisati činjenici da su autori koristili PVM/MA kopolimer molekulske mase 200 kDa, a u ovom istraživanju upotrebljen je kopolimer molekulske mase 2 000 kDa.

Tablica 7. Sastav i tehnološke karakteristike pripremljenih nanočestica PEGiliranih nanočestica: % vezanja PEG, veličina (d), polidisperznosti (PDi), zeta potencijal (ζ) i prinos.

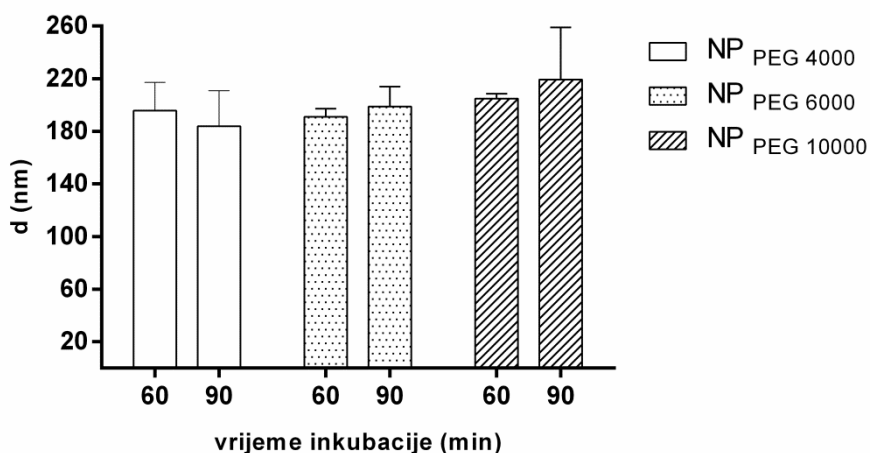
Uzorak	PEG	vrijeme PEGilacije (min)	% vezanja PEG	d/nm	PDi	ζ (mV)	prinos(%)
1.	4000	60	57,2	195,8±21,5	0,136	-40,2±2,1	51,9±0,1
2.		90	59,2	183,8±27,1	0,197	-37,5±4,4	56,5±0,7
3.	6000	60	93,0	190,9±6,4	0,174	-41,3±1,7	54,5±2,1
4.		90	89,6	198,7±15,2	0,193	- 37,92±2,9	56,5±5,0
5.	10 000	60	*	204,8±3,7	0,272	-44,3±1,2	54,0±2,8
6.		90	*	219,3±3,9	0,207	-39,9±4,4	54,5±2,1

* - korištenom HPLC metodom nije bilo moguće odrediti sadržaj PEG10 000

Na postotak vezanja PEG-a značajno je utjecala molekulska masa PEG-a, pri čemu je najučinkovitije vezanje ostvareno korištenjem PEG-a molekulske mase 6 kDa. Vrijeme PEGilacije nije značajno utjecalo na uspješnost vezanja PEG-a (Tablica 7.). Takav je ishod u skladu s ranijim istraživanjima, gdje je dokazano da se učinkovitost PEGilacije povećava porastom molekulske mase korištenog PEG-a (Yoncheva i sur., 2005). Postotak vezanja PEG-a molekulske mase 10 kDa nije bilo moguće odrediti korištenom HPLC metodom. Reakcijski prinos određen je na temelju mase liofiliziranog produkta te zbroja masa korištenih komponenata, a iznosi od 51.9 do 56.5 %. U literaturi su opisani značajno viši prinosi za slične sustave, u rasponu od 88.8 do 91.3 %, što ukazuje na potrebu daljnjeg optimiranja postupka pripreme nanočestica kako bi se povećao prinos.

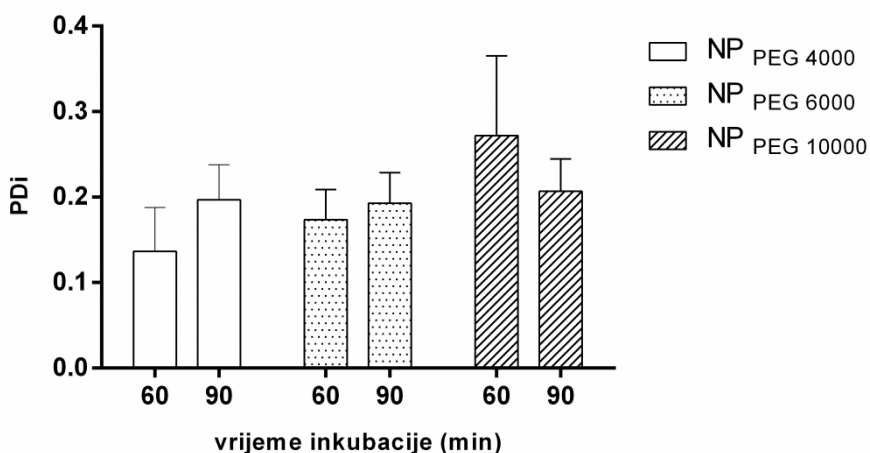
Kao što je već navedeno, veličina pripremljenih nanočestica je nešto veća nego u dosadašnjim istraživanjima (Inchaurraga i sur., 2015), no uglavnom je zadovoljen zahtjev prema kojem je za mukopenetraciju potrebno prirediti čestice manje od 200 nm. Slika 22. prikazuje utjecaj molekulske mase PEG-a i vremena inkubacije na veličinu nanočestica; vidljivo je kako kod upotrebe PEG 4 000 i PEG 6 000, nema statistički značajne razlike u veličini čestica nakon inkubacije od 60 i 90 minuta ($p > 0.05$), dok je korištenjem PEG 10 000 za PEGilaciju razlika u veličini nanočestica nakon različitih vremena inkubacije statistički značajna ($p < 0.05$). Također, može se uočiti trend prema kojemu vezanjem PEG-a veće molekulske mase dolazi

do linearnog povećanja promjera nastalih nanočestica, no taj utjecaj nije statistički značajan ($p > 0.05$).



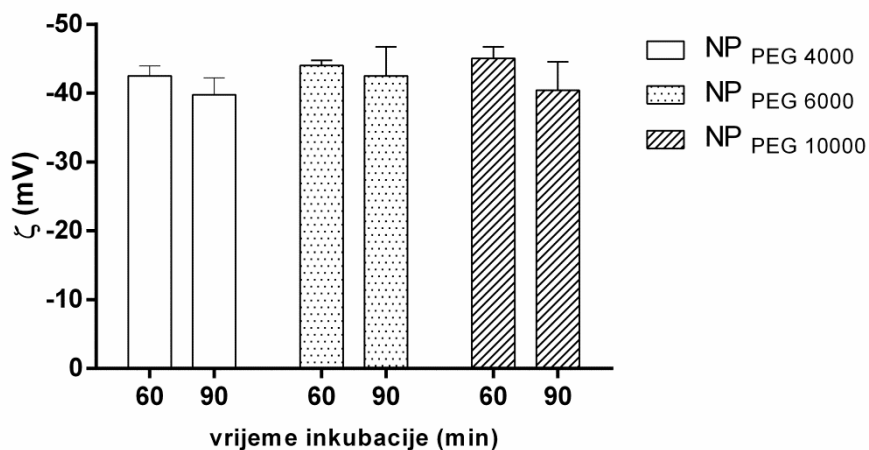
Slika 22. Utjecaj molekulske mase polimera i vremena inkubacije na veličinu (d) pripremljenih PEGiliranih polianhidridnih nanočestica.

Indeks polidisperznosti mjeri je širine raspodjele veličina čestica u nekom sustavu, a vrijednosti od 0.2 ukazuju na monodisperzan sustav. Na Slici 23. je vidljivo da je vrijednost PDi oko 0.2 za nanočestice obložene PEG-om molekulske mase 4 i 6 kDa, dok kod nanočestica PEGiliranih polimerom molekulske mase 10 kDa je ta vrijednost nešto veća, no još uvijek se može zaključiti kako su priređene nanočestice monodisperzne. Vrijeme PEGilacije ne utječe značajno na PDi ($p > 0.05$)



Slika 23. Utjecaj molekulske mase polimera i vremena inkubacije na polidisperznost (PDi) pripremljenih PEGiliranih polianhidridnih nanočestica.

Slika 24. prikazuje utjecaj PEG-a različitih molekulskih masa na vrijednosti zeta potencijala pripremljenih nanočestica. Da ne bi došlo do vezanja nanočestica na mucine sluzi i da bi mukopenetracija bila uspješna, nužno je da je zeta potencijal nanočestica negativan, dok je za fizičku stabilnost nanočestica nužno da apsolutna vrijednost zeta potencijala bude veća od 30 mV jer se tada ne očekuje agregacija čestica u sustavu. Dobivene vrijednosti zeta potencijala su u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja, gdje je on iznosio (- 44 mV) – (- 50 mV) (Yoncheva i sur., 2005), odnosno (- 44 mV) – (- 52 mV) (Inchaurraga i sur., 2015). U dobivenim rezultatima primijećeno je da se s duljim periodom inkubacije vrijednost zeta potencijala povećava, odnosno, apsolutna je vrijednost manja, no te razlike nisu statistički značajne.



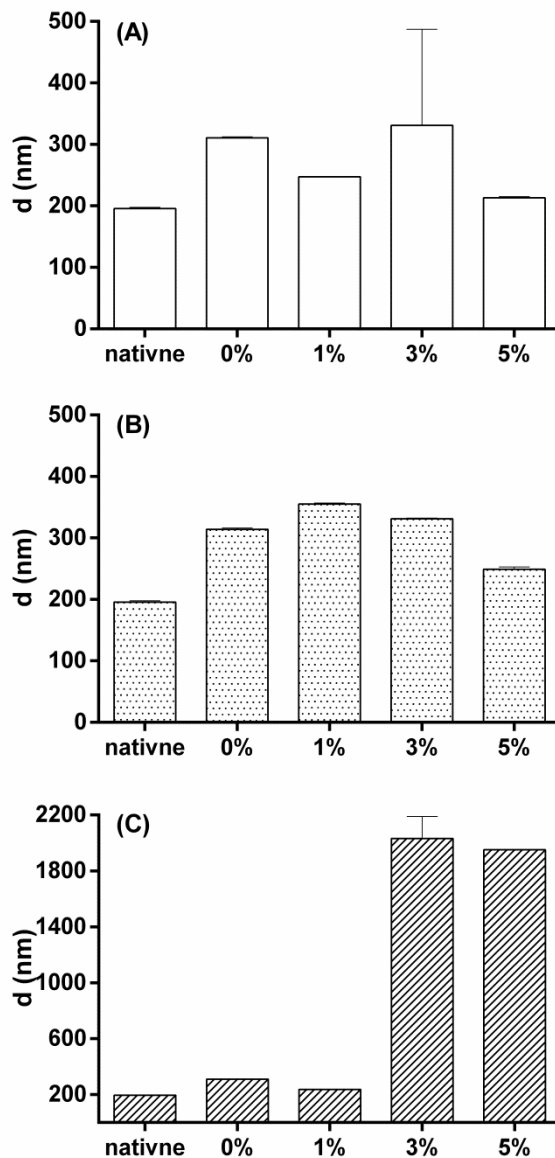
Slika 24. Utjecaj molekulske mase polimera i vremena inkubacije na zeta potencijal (ζ) pripremljenih PEGiliranih polianhidridnih nanočestica.

4.2. Odabir prikladnog krio/lioprotektanta u procesu sušenja smrzavanjem

Sušenje smrzavanjem, ili liofilizacija je proces koji uključuje uklanjanje leda iz pripravka procesima sublimacije (primarno sušenje) i desorpcije vezanih molekula vode (sekundarno sušenje). Glavni princip sušenja smrzavanjem je sublimacija, proces izravnog prijelaza vode iz čvrstog agregatnog stanja u plinovito, a odvija se u uvjetima tlaka i temperature ispod trojne točke vode (0.01 °C, 0.00603 atm). U tu svrhu, pripravak se najprije smrzava te zatim stavlja pod visoki vakuum, pri čemu dolazi do sublimacije leda, koji se hvata na kondenzor ohlađen na -50°C. Kako se cijeli proces odvija u uvjetima niskog tlaka i temperature, prikladan je i za sušenje termolabilnih tvari (Nireesha i sur., 2013). U formulaciju koja će se

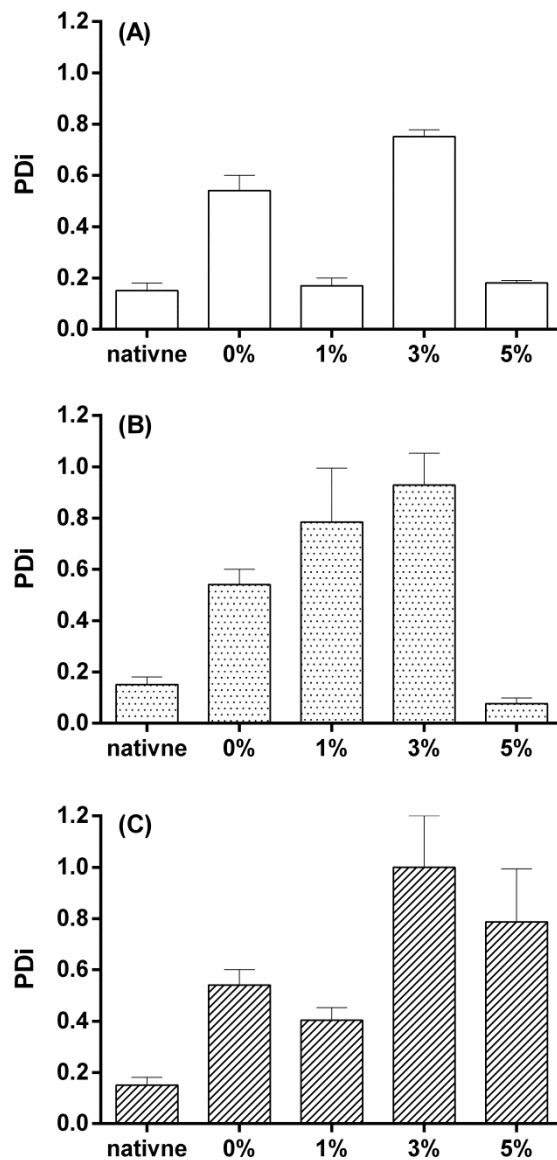
podvrgnuti sušenju smrzavanjem, mogu se dodati različite pomoćne tvari, a jedan od primjera su krioprotektanti, koji štite formulaciju tijekom koraka smrzavanja. Različite tvari mogu djelovati krioprotektivno, a neki od najčešće korištenih krioprotektanata u farmaceutskoj industriji su acetamid, dietilglikol, dimetilsulfoksit, glicerol, glukoza, prolin, serin, sorbitol, saharoza i valin (Bhattacharya i Prajapati, 2016). Mnoge od navedenih tvari djeluju i kao lioprotektanti, koji stabiliziraju formulaciju tijekom procesa sušenja, sprečavajući kolaps strukture osušenog produkta, a time nepotpuno sušenje. U ovom radu ispitan je utjecaj krio/lioprotektanta, saharoze, trehaloze i glicina u različitim koncentracijama, na tehnološka svojstva pripremljenih nanočestica.

Slika 25. daje prikaz utjecaja korištenog krio/lioprotektanta na srednji promjer nanočestica. U sva je tri slučaja veličina nativnih nanočestica manja nego nakon procesa sušenja smrzavanje uz korištene krio/lioprotektante. Primjenom saharoze dolazi do najmanje promjene u veličini čestica, te se kao optimalna koncentracija pokazala ona od 5%, pri čemu su pripremljene nanočestice imale promjer od $213,0 \pm 2.2$ nm, što ne predstavlja značajnije povećanje s obzirom na veličinu nativnih nanočestica od $195,6 \pm 2.1$ nm. Kada je saharoza korištena u nižim koncentracijama, porast veličine nanočestica nakon procesa sušenja smrzavanjem je bio značajniji. U slučaju trehaloze, dolazi do značajnijeg porasta u srednjem promjeru nanočestica nakon procesa liofilizacije, a to je posebno izraženo pri upotrebi 1 i 3 %-tne otopine trehaloze. Pri koncentraciji od 5% srednji promjer nanočestica je manji (249.0 ± 3.6 nm), no ipak značajno veći nego onaj kada je kao krio/lioprotektant upotrijebljena saharoza. Uz glicin kao krio/lioprotektant, bilježi se najznačajniji porast veličine nanočestica, koji raste s porastom koncentracije njegove glicina te je uz 3 i 5% u mikrometarskom rasponu veličina. Nepoznato je dolazi li do interakcija glicina s pripremljenim nanočesticama u fazi smrzavanja ili pak sušenja, a ovakav bi se porast veličine nanočestica mogao pripisati i nastajanju aglomerata.



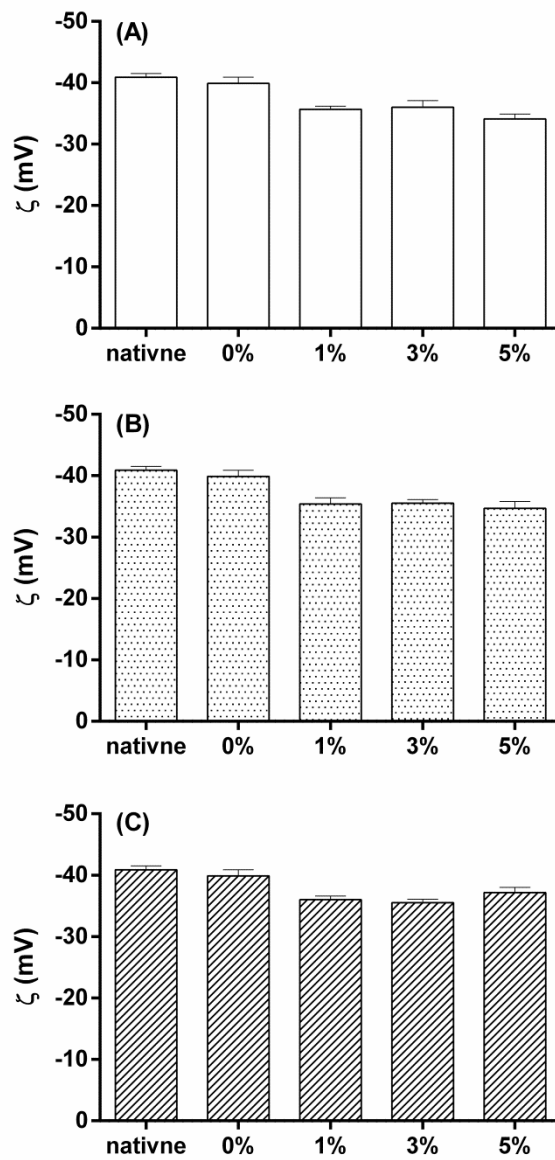
Slika 25. Utjecaj saharoze (A), trehaloze (B) i glicina (C) u rasponu koncentracija od 0 do 5% na srednji promjer (d) nanočestica nakon postupka sušenja smrzanjem.

Nadalje, razmatran je učinak korištenog krio/lioprotektanta na promjenu indeksa polidisperznosti (PDI) nanočestica nakon liofilizacije (Slika 26.). Kod primjene saharoze i trehaloze, najmanja promjena vrijednosti PDI je uočena pri koncentraciji od 5%, dok u slučaju glicina, vrijednosti PDI značajno rastu, pokazujući da glicin nije prikladan kao krio/lioprotektant u procesu sušenja pripremljenih nanočestica.



Slika 26. Utjecaj saharoze (A), trehaloze (B) i glicina (C) u rasponu koncentracija od 0 do 5% na polidisperznost (PDi) nanočestica nakon postupka sušenja smrzavanjem.

Konačno, promatrana je i promjena zeta potencijala (ζ) nanočestica nakon procesa liofilizacije, ovisno o upotrebljenom krioprotektantu (Slika 27.). U svim slučajevima dolazi do blagog sniženja vrijednosti zeta potencijala nanočestica nakon procesa liofilizacije uz navedene krio/lioprotektante. S obzirom na prikazane rezultate, kao optimalni krio/lioprotektant u nastavku istraživanja odabrana je saharoza u koncentraciji od 5%. Taj rezultat je u skladu s podacima dostupnim u literaturi (Inchaurrega i sur., 2015).

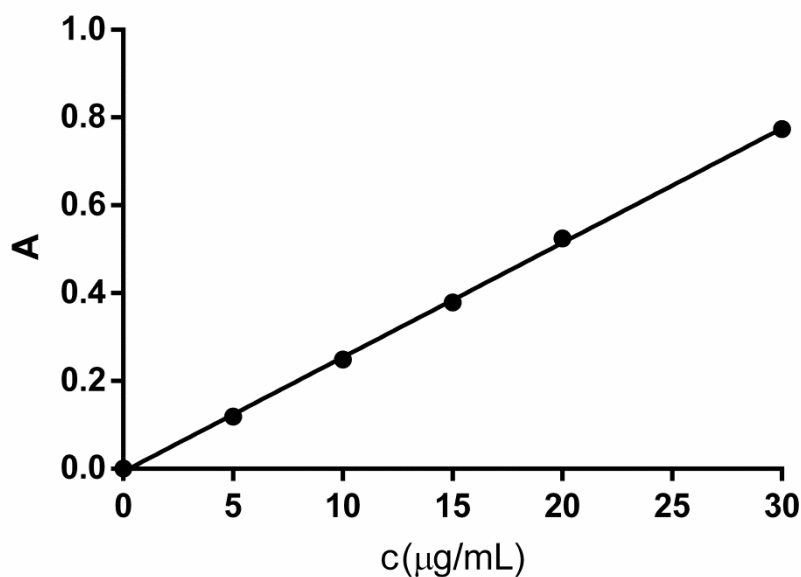


Slika 27. Utjecaj saharoze (A), trehaloze (B) i glicina (C) u rasponu koncentracija od 0 do 5% na zeta potencijal (ζ) nanočestica nakon postupka sušenja smrzavanjem.

4.3. Mukopenetrativne polianhidridne nanočestice s melatoninom

4.3.1. Razvoj metode za određivanje sadržaja melatonina

Melatonin je određivan UV/Vis spektrofotometrijom pri valnoj duljini 278 nm, na kojoj melatonin pokazuje apsorpcijski maksimum. Kalibracijski pravac izrađen je iz dobivenih ovisnosti apsorpcije standardnih otopina melatonina poznatih koncentracija nanošenjem vrijednosti apsorpcije na ordinatu, dok su odgovarajuće koncentracije nanese na apscisu. Kalibracijski pravac melatonina prikazan je na *Slici 28*.



Slika 28. Kalibracijski pravac melatonina u sustavu etanola i vode u volumnom omjeru 1:4 izmjeren pri 278 nm.

Validacija analitičkih metoda postupak je za dokazivanje i dokumentiranje prikladnosti analitičke metode za određenu primjenu, a osigurava točne, precizne i reproducibilne rezultate tijekom dugoročnog korištenja metode u propisanim uvjetima. Validacijom se analitičke metode dobiva i obavijesti o odnosu između koncentracije uzorka i odziva metode, o najmanjim koncentracijama koje će se moći odrediti ili kvantificirati metodom te o mogućim interferencijama iz matrice uzorka. Osim pri razvoju i uvođenju nove metode, (re)validaciju je potrebno provesti i pri promjenama u sintezi glavne tvari, sastavu konačnog proizvoda te analitičkog postupka. Stupanj potrebne revalidacije ovisi o prirodi promjena, a ponekad i neke druge promjene mogu zahtijevati revalidaciju. Pristup validaciji obuhvaća tri koraka: definicija

problema i plan rada, mjerenje i obrada podataka, izrada dokumentacije, uključujući standardne operativne postupke. Na kraju se postupka validacije donosi izvješće s nedvojbena zaključkom o odgovaranju metode za namijenjenu svrhu (Nigović i sur., 2014).

Validacija analitičkih postupaka obavezna je prema regulatornim zahtjevima Dobre proizvođačke prakse (engl. *Good manufacturing practice*, GMP) i Dobre laboratorijske prakse (engl. *Good laboratory practice*, GLP), a postupci provođenja validacije propisani su smjernicom *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)* koja je stupila na snagu 2006. godine, a donijelo ju je Međunarodno vijeće za harmonizaciju (engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH).

Analitičke se metode mogu podijeliti u četiri osnovne skupine, ovisno o svrhi primjene analitičke metode koja se validira, kako bi se odredili oni analitički parametri koji će se primjenjivati u postupku validacije:

- identifikacijski testovi koji su namijenjeni za osiguravanje identiteta analita u uzorku, a uglavnom uključuju uporedbu svojstava uzorka sa svojstvima referentnog standarda
- kvantitativni testovi za određivanje sadržaja onečišćenja
- limit testovi za kontrolu onečišćenja
- kvantitativni testovi za određivanje sadržaja analita u uzorku.

Analitičke značajke postupka validacije su:

- Točnost
- Preciznost
- Selektivnost/specifičnost
- Granica dokazivanja
- Granica određivanja
- Linearnost
- Radno područje
- Robusnost

Točnost (engl. *accuracy*) predstavlja stupanj podudaranja između stvarne, prihvaćene, referentne vrijednosti te srednje vrijednosti dobivene ponavljanjem postupka određeni broj puta, a točnost metode ukazuje na sustavne pogriješke.

Preciznost (engl. *precision*) analitičke metode pokazuje slaganje između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka u propisanim uvjetima, a ako nije dostupan homogeni uzorak, preciznost se može odrediti i korištenjem umjetno dobivenog uzorka ili otopine uzorka. Preciznost se može razmatrati na tri razine: ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) te obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost izražava slaganje rezultata dobivenih pod istim uvjetima analize unutar kratkog vremenskog intervala. Srednja preciznost označava slaganje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka, istom metodom, u istom laboratoriju, ali pri različitim uvjetima (različiti dani, različiti analitičari), a ukazuje na to hoće li metoda nakon razvoja davati iste rezultate tijekom upotrebe u laboratoriju. Reproducibilnost predstavlja slaganje rezultata dobivenih istom metodom u različitim laboratorijima te je mjera sposobnosti metode da daje iste rezultate u različitim laboratorijima.

Specifičnost (engl. *specificity*) je sposobnost nedvojbenog određivanja jednog analita u prisutnosti drugih očekivanih komponenata u uzorku, kao što su nečistoće i razgradni produkti. Specifičnost metode različito je svojstvo od selektivnosti; selektivnost metode omogućava istodobno određivanje više komponenata, uz uvjet da pri određivanju nema interferencija tih komponenata, dok je specifičnosti metode osigurano određivanje isključivo jednog specifičnog analita. Specifičnost određivanja melatonina u ovome je radu osigurana provođenjem detekcije melatonina na valnoj duljini koja odgovara maksimum apsorpcije melatonina.

Granica dokazivanja (engl. *detection limit*, LOD) najniža je koncentracija analita koja se u zadanim uvjetima metode može dokazati, no ne i odrediti. Određuju se pomoću jednadžbe:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \sigma}{a}$$

gdje je σ standardna devijacija odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca.

Granica određivanja (engl. *quantification limit*, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku koju je moguće odrediti s zadovoljavajućom točnošću i preciznošću. Određuje se pomoću istih parametara kao i granica dokazivanja prema jednadžbi:

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a}$$

Vrijednosti LOD i LOQ prikazane su u *Tablici 8*.

Linearnost (engl. *linearity*) je parametar koji ukazuje na sposobnost analitičke metode da se u određenom intervalu dobivaju rezultati koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Iz ovisnosti izmjerenog signala o koncentraciji analita dobiva se kalibracijska krivulja, a linearnost se metode zatim izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca *k*, koji treba biti veći od 0,999. Linearnost metode za određivanje sadržaja melatonina iznosi 0,9993 (*Tablica 8*).

Radno područje (engl. *range*) predstavlja intervalu između najmanje i najveće koncentracije analita u uzorku (uključujući i te koncentracije) za koje je pokazano da analitički postupak ima prikladan stupanj preciznosti, točnosti i linearnosti. Radno područje razvijene metode određivanja sadržaja melatonina u PEGiliranim nanočesticama iznosi 1.00 – 40.00 µg/ml (*Tablica 8*).

Izdržljivost (engl. *robustness*) mjera je sposobnosti analitičkog postupka da ostane nenarušen ako se izvode male, ali namjerne varijacije u parametrima metode, i tako ukazuje na pouzdanost analitičke metode tijekom njezine normalne primjene. Izdržljivost se određuje mijenjanjem jednog parametra, dok su ostali parametri nepromijenjeni.

Tablica 8. Podaci dobiveni analizom kalibracijskog pravca melatonina.

Koeficijent baždarnog pravca	Odsječak na ordinati	Linearnost	Granica dokazivanja (µg/mL)	Granica određivanja (µg/mL)	Radno područje (µg/mL)
0,02606 ± 0,0002	-0,0067 ± 0,0036	0.9993	0.03	0.08	1.00-40.00

4.3.2. Sastav i tehnološke karakteristike PEGiliranih nanočestica s melatoninom

Melatonin je uklopljen u polianhidridne nanočestice PEGilirane polimerom molekulske mase 6 kDa, uz vrijeme inkubacije 60 min te korištenje 5 %-tne otopine saharoze kao krioprotektanta.

Da bi se odredio postotak uklopljenog melatonina, najprije je određen sadržaj neuklopljenog melatonina u supernatantu koji je zaostao nakon odvajanja nanočestica, iz čega je izračunata uspješnost uklapanja te posljedično i sadržaj melatonina u nanočesticama. Uspješnost uklapanja melatonina, kao i njegov sadržaj je relativno nizak (*Tablica 9.*), a može se objasniti dobrom topljivosti melatonina u vodenim kao i organskim otapalima. Povećanjem masenog omjera PVMA/MA kopolimera i melatonina s 10:1 na 5:1 postiže se dvostruko bolje uklapanje melatonina u nanočestice, dok je maksimalni sadržaj melatonina u nanočesticama oko 1.5%. S obzirom da su u literaturi opisani pozitivni terapijski učinci melatonina u koncentraciji od 1% na liječenje bolesti parodonta (Cutando i sur., 2013, 2014), može se pretpostaviti da i razvijene nanočestice mogu imati određeni terapijski potencijal, usprkos relativno niskom sadraju melatonina.

Tablica 9. Sastav i tehnološke karakteristike pripremljenih nanočestica PEGiliranih nanočestica s melatoninom: veličina (*d*), polidisperznosti (*PDi*), zeta potencijal (ζ), prinos, % uklapanja i sadržaj melatonina.

Uzorak	omjer PVM/MA i melatonina	d/nm	PDi	ζ (mV)	prinos(%)	uklapanje melatonina (%)	sadržaj melatonina (%)
M1	10:1	144,4±0,7	0,122	-41,8±0,7	58,9±3,1	5,12±3,70	0,60
M2	5:1	164,3±1,5	0,070	-37,7±0,8	59,6±2,7	11,45±2,91	1,48

Kada se promatraju tehnološke karakteristike nanočestica s melatoninom (*Tablica 9.*), vidljivo je da je srednji promjer nanočestica s melatoninom nešto manji nego onaj istovrsnih nanočestica bez melatonina (190 nm). Smanjenje veličine nanočestica uklapanjem melatonina moglo bi biti posljedica interakcija između (ko)polimera i melatonina koje dovode do boljeg slaganja polimernih lanaca te time manjeg srednjeg promjena pripremljenih nanočestica.

Sukladno tome, pripremljene nanočestice pokazuju nešto niže vrijednosti PDI. Zeta potencijal nanočestica s melatoninom negativan je te približno jednak prethodno dobivenih vrijednostima. Taj podatak upućuje na zaključak da je melatonin uklopljen u nanočestice, a ne adsorbiran na njihovu površinu. Uklapanjem melatonina ostvaren je neznatno veći prinos nego kod nanočestica bez melatonina. Nanočestice u koje je uklopljena manja količina melatonina (M1) su nešto manjeg promjera u odnosu na one kod kojih je uklopljena veća količina lijeka (M2). U oba slučaja, veličina je u prihvatljivom rasponu veličina koje osiguravaju mukopenetrativna svojstva.

5. ZAKLJUČCI

- PEGilacijom i jednostavnom desolvacijom polianhidridnog polimera uspješno su pripremljene nanočestice u rasponu veličina od $183,8 \pm 27,1$ do $219,3 \pm 3,9$ nm, što je prihvatljiv raspon veličina koji osigurava mukopenetrativna svojstva.
- S obzirom na veličinu pripremljenih nanočestica te indeks polidisperznosti, optimalan sustav je pripremljen uporabom PEG 6 000 uz vrijeme inkubacije od 60 min.
- S obzirom na vrijednosti zeta potencijala u rasponu od $-37,5 \pm 4,4$ do $-44,3 \pm 1,2$ mV, ne očekuje se agregacija kao ni vezanje PEGiliranih nanočestica na negativno nabijene lance mucina u sluzi.
- Kao prikladan kri/lioprotektant za pripremu nanočestica u čvrstom stanju, pokazala se 5 %-tna otopina saharoze.
- Uklapanje melatonina u PEGilirane nanočestice je relativno nisko, a pri tome je došlo do smanjenja njihove veličine uz održane vrijednosti zeta potencijala. Iako je sadržaj melatonina u pripremljenim nanočesticama relativno nizak, procjenjuje se da bi mogao imati pozitivne terapijske učinke u liječenju bolesti paradonta.
- Potrebna su daljnja ispitivanja kako bi se povećalo uklapanje melatonina u nanočestice, ispitala njihova mukopenetrativnost i odredila brzina oslobađanja uklopljenog lijeka, temeljem čega bi se mogla preciznije procijeniti njihov terapijski potencijal.

6. LITERATURA

Bénès L, Claustrat B, Horrière F, Geoffriau M, Konsil J, Parrot KA, Degrande G, McQuinn RL, Ares JW. Transmucosal, oral controlled-release, and transdermal drug administration in human subjects: A crossover study with melatonin. *J Pharm Sci*, 1997, 86, 1115–1119.

Bernkop-Schnürch A. Reprint of: Nanocarrier systems for oral drug delivery: Do we really need them?. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 50, 2–7.

Bhattacharya S, Prajapati BG. A Review on Cryoprotectant and its Modern Implication in Cryonics. *Asian J Pharm*, 2016, 10, 1–7.

Boegh M, Nielsen HM. Mucus as a barrier to drug delivery - Understanding and mimicking the barrier properties. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2015, 116, 179–186.

Bojkowski CJ, Aldhous ME, English J, Franey C, Poulton AL, Skene DJ, Arendt J. Suppression of nocturnal plasma melatonin and 6-sulphatoxymelatonin by bright and dim light in man. *Horm metabol Res*, 19, 437–440.

Bourganis V, Karamanidou T, Samaridou E, Karidi K, Kammona O, Kiparissides C. On the synthesis of mucus permeating nanocarriers, *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 97, 239–249.

Carpentieri A, Díaz de Barboza G, Peralta Lopez M, Tolosa de Talamoni N. New perspectives in melatonin uses. *Pharm Res*, 2012, 65, 437–444.

Cengiz MI, Cengiz S, Wang HL. Melatonin and Oral Cavity. *Int J Dent*, 2012.

Chaiyarit P, Luengtrakoon K, Wannakasemsuk W, Vichitrananda V, Klanrit P, Hormdee D, Noisombut R. Biological functions of melatonin in relation to pathogenesis of oral lichen planus. *Medical Hypotheses*, 2017, 104, 40–44.

Chemistry: vinyl ether polymers and copolymers, 2017., <http://www.ashland.com>, pristupljeno 08.12.2017.

Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, 2015, 61, 77–84.

Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009, 61, 75–85.

Cutando A, Galindo P, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D, Wang HL. Relationship Between Salivary Melatonin and Severity of Periodontal Disease. *J*

Periodont, 2006, 77, 1533–1538.

Cutando A, López-Valverde A, De Diego RG, Arias-Santiago S, De Vicente-Jiménez J. Effect of gingival application of melatonin on alkaline and acid phosphatase, osteopontin and osteocalcin in patients with diabetes and periodontal disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2013, 18, 657–663.

Cutando A, López-Valverde A, De Diego RG, De Vicente J, Reiter R, Herrero Fernández M, Ferrera MH. Effect of topical application of melatonin to the gingiva on salivary osteoprotegerin, RANKL and melatonin levels in patients with diabetes and periodontal disease. *Odontology*, 2014, 102, 290–296.

Cutolo M, Maestroni GJM. The melatonin-cytokine connection in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64, 1109–1111.

Dobrovolskaia M, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. Preclinical studies to understand NP interaction with the immune system and its potential effects on NP biodistribution. *Mol pharm*, 2009, 5, 487–495.

Dowling GA, Mastick J, Colling E, Carter JH, Singer CM, Aminof MJ. Melatonin for sleep disturbances in Parkinson's disease. *Sleep Med*, 2005, 6, 459–466.

Ensign LM, Cone R, Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64, 557–570.

Ensign LM, Schneider C, Suk JS, Cone R, Hanes J. Mucus penetrating nanoparticles: Biophysical tool and method of drug and gene delivery. *Adv Mater*, 2012, 24, 3887–3894.

Flo A, Calpena AC, Halbaut L, Araya EI, Fernández F, Clares B. Melatonin Delivery: Transdermal and Transbuccal Evaluation in Different Vehicles. *Pharm Res*, 2016, 33, 1615–1627.

Forier K, Messiaen AS, Raemdonck K, Deschout H, Rejman J, De Baets F, Nelis H. Transport of nanoparticles in cystic fibrosis sputum and bacterial biofilms by single-particle tracking microscopy. *Nanomedicine*, 2013, 8, 935–949.

Fröhlich E, Roblegg E. Mucus as Barrier for Drug Delivery by Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 2014, 14, 126–136.

Gantrez™ Copolymers, 2017., <https://www.chempoint.com>, pristupljeno 08.12.2017.

Gómez-Florit M, Ramis JM, Monjo M. Anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of melatonin on human gingival fibroblasts in vitro. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86, 1784–1790.

Goradel NH, Asghari MH, Moloudizaragari M, Negahdari B, Haghi-Aminjan H, Abdollahi M. Melatonin as an angiogenesis inhibitor to combat cancer: Mechanistic evidence. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 335, 56–63.

ICH Harmonised Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Secretariat, 2006., <http://www.ich.org>, pristupljeno 17.2.2018.

Inchaurreaga L, Martin-Arbella N, Zabaleta V, Quincoces G, Peñuelas I, Irache JM. In vivo study of the mucus-permeating properties of PEG-coated nanoparticles following oral administration. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 97, 280–289.

Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10, 352–361.

Karow AR, Götzl J, Garidel P. Resolving power of dynamic light scattering for protein and polystyrene nanoparticles. *Pharm Dev Technol*, 2015, 20, 84–89.

Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 75, 1–18.

Ladaviere C, Delair T, Domard A, Pichot C, Mandrand B. Covalent immobilization of biological molecules to maleic anhydride and methyl vinyl ether copolymers - A physico-chemical approach. *J Appl Polym Sci*, 1998, 71, 927–936.

Lai SK, Suk JS, Pace A, Wang YY, Yang M, Mert O, Chen J, Kim J, Hanes J. Drug carrier nanoparticles that penetrate human chronic rhinosinusitis mucus. *Biomaterials*, 2011, 32, 6285–6290.

Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Del Rev*, 2009, 61, 158–171.

Leon J, Acuña-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci*, 2004, 75, 765–790.

Liu M, Zhang J, Shan W, Huang Y. Developments of mucus penetrating nanoparticles. *Asian J Pharm Sci*, 2014, 10, 275–282.

Luengtrakoon K, Wannakasemsuk W, Vichitrananda V, Klanrit P, Hormdee D, Noisombut R,

Chaiyarit P. Increased melatonin in oral mucosal tissue of oral lichen planus (OLP) patients: A possible link between melatonin and its role in oral mucosal inflammation. *Arch Oral Biol*, 2017, 78, 13–19.

Manev H, Uz T, Kharlamov A, Cagnoli CM, Franceschini D, Giusti P. In vivo protection against kainate-induced apoptosis by the pineal hormone melatonin: effect of exogenous melatonin and circadian rhythm. *Restor NeurolNeurosci*, 1996, 9, 251–256.

Mehta A, Kaur G. Potential role of melatonin in prevention and treatment of oral carcinoma. *Indian J Dent*, 2014, 5, 86–91.

Müller C, Leithner K, Hauptstein S, Hintzen F, Salvenmoser W, Bernkop-Schnürch A. Preparation and characterization of mucus-penetrating papain/poly(acrylic acid) nanoparticles for oral drug delivery applications. *J Nanopart Res*, 2013, 15:1353

Muthanna A, Agulló N, Cattoz B, Griffiths P, Bernkop-Schnürch A, Gómez Borros S, Gumbleton M. Nanoparticle diffusion within intestinal mucus: Three-dimensional response analysis dissecting the impact of particle surface charge, size and heterogeneity across polyelectrolyte, pegylated and viral particles. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 97, 230–238.

Netsomboon K, Bernkop-Schnürch A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 98, 76–89.

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova - Praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014. str. 135-137.

Nireesha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, Niranjana Babu M, Lavakumar V. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 2013, 3, 87–98.

Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Ojike NI, Akinseye OA, Kendzerska T, Buttoo K, Dhandapany PS, Brown GM, Cardinali DP. Melatonin and Human Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2017, 22, 122–132.

Pearson JP, Chater PI, Wilcox MD. The properties of the mucus barrier, a unique gel – how can nanoparticles cross it?. *Ther Deliv*, 2016, 7, 229–244.

Pereira De Sousa I, Bernkop-Schnürch A, Steiner C, Schmutzler M, Wilcox MD, Veldhuis GJ, Pearson JP, Huck CW, Salvenmoser W,. Mucus permeating carriers: formulation and

characterization of highly densely charged nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 97, 273–279.

Pereira De Sousa I, Cattoz B, Wilcox MD, Griffiths PC, Dalgliesh R, Rogers S, Bernkop-Schnürch A. Nanoparticles decorated with proteolytic enzymes, a promising strategy to overcome the mucus barrier. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 97, 257–264.

Radogna F, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80, 1844–1852.

Ram PT, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L, Hill SM. Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett*, 2002, 179, 141–150.

Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Liu XY, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX. Melatonin in the oral cavity: Physiological and pathological implications. *J Periodontal Res*, 2015, 50, 9–17.

Rivara S, Pala D, Bedini A, Spadoni G. Therapeutic uses of melatonin and melatonin derivatives: a patent review (2012 – 2014). *Expert Opin Ther Pat*, 2015, 25, 425–441.

Shimozuma M, Tokuyama R, Tatehara S, Umeki Hirochika, Ide Shinji, Mishima K, Saito I, Satomura K. Expression and cellular localization of melatonin-synthesizing enzymes in rat and human salivary glands. *Histochem Cell Biol*, 2011, 135, 389–396.

Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*, 2001, 70, 1–20.

Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 99, 28–51.

Wang YY, Lai SK, Suk JS, Pace A, Cone R, Hanes J. Addressing the PEG mucoadhesivity paradox to engineer nanoparticles that “slip” through the human mucus barrier. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47, 9726–9729.

Yoncheva K, Lizarraga E, Irache JM. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): Preparation and evaluation of their bioadhesive properties. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 24, 411–419.

Zetner D, Andersen LPH, Rosenberg J. Pharmacokinetics of Alternative Administration Routes of Melatonin: A Systematic Review. *Drug Res*, 2016, 66, 169–173.

Zohaib Khurshid SN, Zohaib S, Zafar MS. Therapeutic potential of melatonin in oral medicine and periodontology. Kaohsiung J Med Sci 2016, 32, 391–396.

7. SAŽETAK

Cilj ovog rada bila je priprava mukopenetrativnih nanočestica s uklopljenim melatoninom, kao novog terapijskog sustava za lokalnu primjenu u usnoj šupljini s ciljem liječenja bolesti parodonta. Nanočestice su pripravljene postupkom jednostavne desolvacije polianhidridnog polimera, GantrezTM AN-169, koji je PEGiliran polimerima različitih molekulskih masa od 4 do 10 kDa. Time je osigurana sterička stabilizacija nanočestica te mukopenetrativna svojstva. Srednji promjer nanočestica je uglavnom manji od 200 nm, čime je zadovoljen kriterij za postizanje mukopenetrativnosti, a čestice su monodisperzne. Zeta potencijal je u svim slučajevima oko -40 mV te se ne očekuje vezanje nanočestica na sluz, kao ni njihova agregacija. Najpovoljnija svojstva pokazuju nanočestice PEGilirane s PEG-om molekulske mase 6 kDa uz vrijeme inkubacije od 60 minuta, u koje je uspješno uklopljen melatonin. Nanočestice u čvrstom stanju pripravljene su postupkom liofilizacije uz saharozu u koncentraciji od 5%. Uklapanje melatonina u polianhidridne nanočestice PEGilirane PEG-om 6 000 je relativno nisko, no sadržaj melatonina je dostatan za postizanje pozitivnih terapijskih učinaka u lokalnom liječenju bolesti parodonta.

7. SUMMARY

The aim of this study was to prepare mucopenetrating nanoparticles with melatonin, as a novel drug delivery system for local application in the oral cavity with the aim to treat diseases of paradont. Nanoparticles were prepared by simple desolvation process, after the PEGylation with PEG in molecular mass ranging from 4 to 10 kDa. This assured sterical stabilisation of the nanoparticles as well as the mucopenetrative properties. The mean spherical diameter of the nanoparticles was around 200 nm, which is in the range suitable for mucopenetration. The obtained particles were monodisperse. Zeta potential in all cases was around -40 mV, therefore nanoparticle interaction with the mucin chains and their aggregation should not be expected. The optimal characteristics were obtained in case of nanoparticles PEGylated with PEG 6000 during 60 min. Melatonin was successfully encapsulated in such nanoparticles. The melatonin loaded nanoparticles in the solid state were prepared by freeze-drying using sucrose at concentration of 5% as cryo/lioprotectant. Although the encapsulation efficiency of melatonin into PEGylated polyanhydride nanoparticles was relatively low, its content is sufficient to obtain positive therapeutical effect in local treatment of peridontal diseases.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

MUKOPENETRATIVNE NANOČESTICE S MELATONINOM

Marica Jozić

SAŽETAK

Cilj ovog rada bila je priprava mukopenetrativnih nanočestica s uklopljenim melatoninom, kao novog terapijskog sustava za lokalnu primjenu u usnoj šupljini s ciljem liječenja bolesti parodonta. Nanočestice su pripravljene postupkom jednostavne desolvacije polianhidridnog polimera, Gantrez™ AN-169, koji je PEGilirane polimerima različitih molekularnih masa od 4 do 10 kDa. Time je osigurana sterička stabilizacija nanočestica te mukopenetrativna svojstva. Srednji promjer nanočestica je uglavnom manji od 200 nm, čime je zadovoljen kriterij za postizanje mukopenetrativnosti, a čestice su monodisperzne. Zeta potencijal je u svim slučajevima oko -40 mV te se ne očekuje vezanje nanočestica na sluz, kao ni njihova agregacija. Najpovoljnija svojstva pokazuju nanočestice PEGilirane s PEGom molekularne mase 6 kDa uz vrijeme inkubacije od 60 minuta, u koje je uspješno uklopljen melatonin. Nanočestice u čvrstom stanju pripravljene su postupkom liofilizacije uz saharozu u koncentraciji od 5%. Uklapanje melatonina u polianhidridne nanočestice PEGilirane PEG-om 6 000 je relativno nisko, no sadržaj melatonina je dostatan za postizanje pozitivnih terapijskih učinaka u lokalnom liječenju bolesti parodonta.

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

Rad sadrži: 70 stranica, 28 grafičkih prikaza, 9 tablica i 59 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Mukopenetrativne nanočestice, sluznica, mucini, melatonin, uklapanje lijeka, polietilenglikol

Mentor: **Dr. sc. Mario Jug**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mario Jug**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: ožujak 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

MELATONIN LOADED MUCUS-PENETRATING NANOPARTICLES

Marica Jozić

SUMMARY

The aim of this study was to prepare mucopenetrating nanoparticles with melatonin, as a novel drug delivery system for local application in the oral cavity with the aim to treat diseases of paradont. Nanoparticles were prepared by simple desolvation process, after the PEGylation with PEG in molecular mass ranging from 4 to 10 kDa. This assured sterical stabilisation of the nanoparticles as well as the mucopenetrative properties. The mean spherical diameter of the nanoparticles was around 200 nm, which is in the range suitable for mucopenetration. The obtained particles were monodisperse. Zeta potential in all cases was around -40 mV, therefore nanoparticle interaction with the mucin chains and their aggregation should not be expected. The optimal characteristics were obtained in case of nanoparticles PEGylated with PEG 6000 during 60 min. Melatonin was successfully encapsulated in such nanoparticles. The melatonin loaded nanoparticles in the solid state were prepared by freeze-drying using sucrose at concentration of 5% as cryo/lioprotectant. Although the encapsulation efficiency of melatonin into PEGylated polyanhydride nanoparticles was relatively low, its content is sufficient to obtain positive therapeutical effect in local treatment of periodontal diseases.

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

Thesis includes: 70 pages, 28 figures, 9 tables and 59 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Mucopenetrating nanoparticles, mucus, mucins, melatonin, drug incorporation, polyethylene glycol

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

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

The thesis was accepted: March 2018