

# Mukopenetrativne nanočestice cefiksima

---

Jajčević, Severina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:711855>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

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



**Severina Jajčević**

# **Mukopenetrativne nanočestice cefiksima**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

*Sve, baš sve što razumijem, razumijem zato što volim.*

L.N.Tolstoj

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. SLUZ KAO BARIJERA ZA DOSTAVU NANOČESTICA .....	1
1.1.1. Kemizam i fiziološka uloga .....	1
1.1.2. Lučenje.....	8
1.1.3. Reologija sluzi .....	11
1.1.4. Debljina i fiziološka obnova sluzi.....	12
1.2. MUKOPENETRATIVNE NANOČESTICE .....	15
1.2.1. Sudbina konvencionalnih nanočestica .....	15
1.2.2. Tehnologije izrade mukopenetrativnih nanočestica.....	21
1.3. GANTREZ.....	29
1.4. CEFIKSIM.....	30
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	33
3. MATERIJALI I METODE .....	34
3.1. KEMIKALIJE .....	34
3.2. INSTRUMENTI I PRIBOR .....	34
3.3. METODE.....	35
3.3.1. Razvoj i validacija analitičke metode za određivanje sadržaja cefiksima .....	35
3.3.2. Priprava nanočestica.....	35
3.3.3. Određivanje veličine nanočestica.....	36
3.3.4. Određivanje zeta potencijala nanočestica .....	36
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	38
4.1. IZRADA KALIBRACIJSKOG PRAVCA.....	38
4.2. UTJECAJ MOLEKULSKE MASE PEG-a NA TEHNOLOŠKA SVOJSTVA I UKLAPANJE CEFIKSIMA U NANOČESTICE .....	43
4.3. UTJECAJ POSTUPKA SUŠENJA SMRZAVANJEM TE UPORABE KRIO- I LIOPROTEKTANATA NA TEHNOLOŠKA SVOJSTVA NANOČESTICA.....	46
5. ZAKLJUČCI.....	50
6. LITERATURA .....	51
7. SAŽETAK / SUMMARY.....	57
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1.UVOD

### 1.1. SLUZ KAO BARIJERA ZA DOSTAVU NANOČESTICA

#### 1.1.1. Kemizam i fiziološka uloga

Sluz je viskoznoelastičan i adhezivan gel koji štiti mukozna tkiva od štetnog djelovanja vanjskog okoliša. Uloga sluzi je mnogobrojna i raznolika; predstavlja poveznicu između vanjskoga i unutarnjeg okoliša, podmazuje epitel probavnog sustava te tako olakšava prolazak hrane, bolusa i fecesa probavnim traktom. Nadalje, sluz štiti epitel, kako od toksina i patogena na način da uništava viruse i bakterije, tako i od endogenih spojeva poput kloridne kiseline, pepsina i drugih probavnih enzima zadržavajući i dalje sposobnost izmjene tvari (Cone, 2009).

Uloga sluzi je također hvatanje i zadržavanje stranih čestica, sprječavanje gubitka vode i dehidracije te dostava vode ključne za normalno odvijanje metaboličkih procesa u tijelu.

U normalnim uvjetima sluz predstavlja pasivnu epitelnu barijeru kao dio imunskog sustava, ali i važnu barijeru za penetraciju/permeaciju nanočestica. Budući da je prisutna na anatomski raznolikim područjima u organizmu, njezino lučenje, struktura mukoznog pokrova kao i reološka svojstva ovise upravo o različitim zahtjevima pojedinog područja.

**Tablica 1.** *Pretpostavljene uloge sluzi u ljudskom tijelu*

Site of secretion	Functions
Respiratory (upper and tracheobronchial)	Clearance of mucosal insults, water balance, ion transport and regulation
Middle ear	Clearance of cellular debris, water balance
Salivary	Lubrication, water balance, anti-microbial
Gastrointestinal	Cytoprotection, lubrication, diffusion barrier, water balance
Cervical	Regulation of sperm transport, sperm reservoir, sperm energy source, water balance, anti-microbial

Iz opisa sluzi vidljivo je da sluz posjeduje višestruka barijerna svojstva. Hidrofilnost i viskoznost sluzi zajedno ne dopuštaju difuziju hidrofobnih tvari (Sigurdsson i sur., 2013), stoga, na temelju međudjelovanja i ulaska tvari u sluz, djelovanje sluz kao barijere može se podijeliti u tri kategorije.

### *Dinamička barijera*

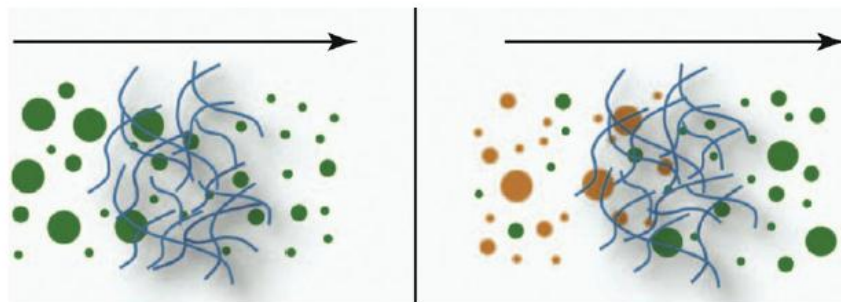
Sluz se neprestano luči i uklanja te zbog toga lijek ili terapijski sustav moraju uzdužno difundirati kako bi dosegli epitel i prošli kroz njega, a pritom peristaltika pridonosi svojim horizontalnim tokom duž mukoznih površina. Na taj način, prianjajući na vanjski sloj sluzi, lijek može postići lokalni učinak na mukoznoj površini, ali bezuspješan je ukoliko je namjera prodrijeti kroz epitel i apsorbirati se u sistemsku cirkulaciju.

### *Sterička barijera*

Mucinska mreža može tvoriti filter koji isključuje veće čestice temeljem veličine (slika 1, lijevo). Viskoznost sluzi kao i nepokretan vodeni sloj također pridonose svojstvima sluzi kao steričke barijere.

### *Interaktivna barijera*

Sluz posjeduje sposobnost stvaranja različitih niskoenergetskih interakcija s lijekovima, toksinima i drugim tvarima prisutnima na mukoznoj površini (slika 1, desno). Hidrofobna međudjelovanja nastaju između gole proteinske srži mucina ili lipidne komponente sluzi i difundirajuće tvari. Vodikove veze tvore ugljikohidratni dijelovi mucina, a isti imaju i mogućnost tvorbe ionskih međudjelovanja.

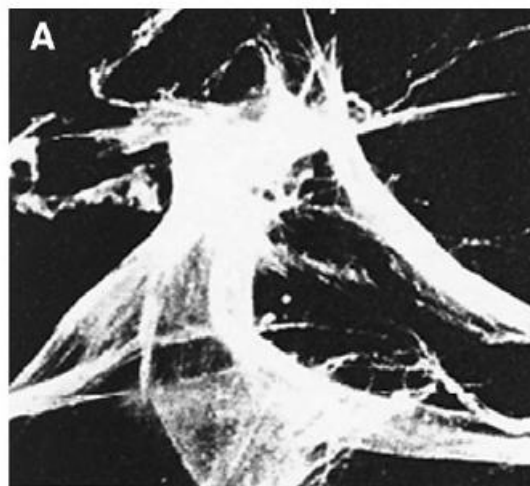


**Slika 1.** Sterička (lijevo) i interaktivna (desno) barijerna svojstva sluzi. Mukus tvori filter koji sprječava difuziju kroz gel temeljem veličine (lijevo) ili svojstva površine (desno) čestica (Lieleg i sur., 2011).

### *Sluz kao ljepljiva mreža*

Čestice iz zraka obično prianjaju na sluznicu dišnog sustava prije nego što stignu do alveola.

Filtrirane čestice uklanjaju se iz dišnih puteva mukocilijarnim klirensom prema probavilu i steriliziraju se želučanom kiselinom. Slično, probavna sluz sprječava prijenos toksičnog sadržaja iz lumena probavnog trakta do temeljne intersticijske i vaskularne tekućine. Osnovni mehanizam kojim mukozni gel učinkovito hvata strane čestice uključuje različite niskoenergetske interakcije. Uz negativan naboj mucina koji je posljedica prisustva karboksilnih ili sulfatnih skupina na mukoznim proteoglikanima, prisutne su i periodične hidrofobne gole globularne regije duž molekule mucina, stabilizirane mnogostrukim unutarnjim disulfidnim vezama. Velika gustoća hidrofobnih domena, uz fleksibilnu prirodu mucinskih vlakana, omogućava tvorbu brojnih interakcija s hidrofobnim regijama na površini stranih čestica. Unatoč tome što svaka nastala interakcija može biti trenutno razorena termičkom energijom, veliki broj takvih interakcija s mucinom učinkovito imobilizira strane čestice. Tvorba različitih niskoenergetskih interakcija kritična je za uklanjanje stranih čestica manjih od prosječne veličine pora u umreženoj strukturi molekule mucina. Izvrstan primjer toga fenomena jest snažna imobilizacija karboksil-modificiranih polistirenskih nanočestica veličine virusa, uključujući one od 59 nm u humanoj cervikalnoj sluzi (Braeckmans i sur., 2003; Olmsted i sur., 2001). Unatoč zastupljenom negativnom površinskom naboju za koji se pretpostavlja da odbija negativno nabijene mucine, polistirenske nanočestice tvore hidrofobna interakcije s mucinskim vlaknima dovoljno snažna da grupiraju mucine u debele snopove (fotografija 1).



**Fotografija 1.** *Fluorescentno označena 59 -nanometarska polistirenska čestica formirala je debele snopove s mucinskim vlaknima u ljudskoj cervikovaginalnoj sluzi. (A) Fluorescentni prikaz. Rezolucija= 500 nm.*

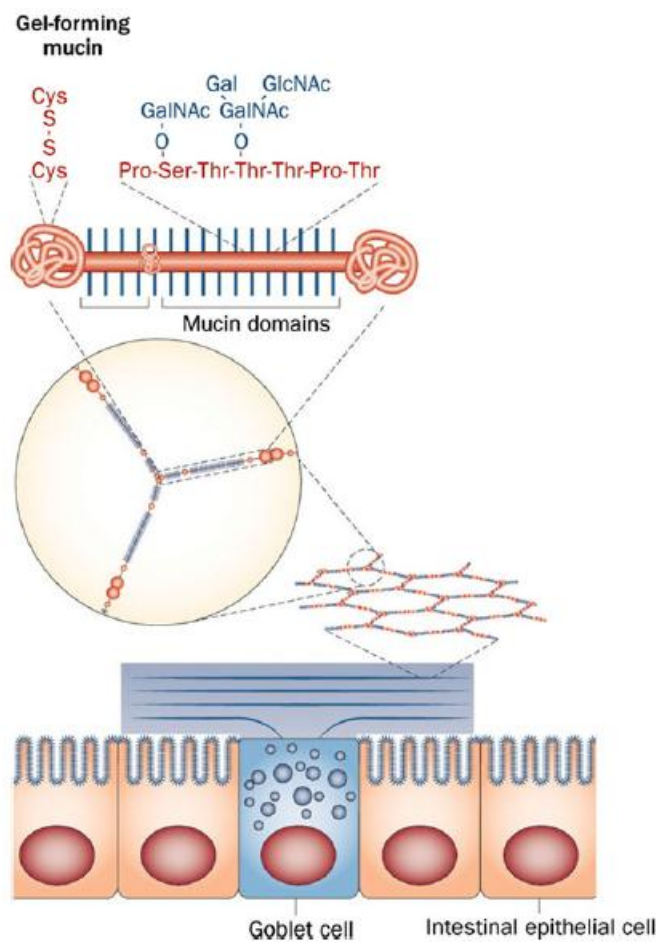
Hidrofobne interakcije također predstavljaju važan mehanizam pomoću kojega sluz ograničava prijenos velikih entiteta poput bakterija. Potencijalno štetni patogeni kao što su *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* te *Yersinia enterocolitica* imobilizirani su upravo putem hidrofobnih međudjelovanja. Niskoenergetske interakcije sa sluzi također mogu biti ostvarena putem elektrostatskih interakcija. Budući da su glikozilirane regije mucinskih vlakana gusto prekrivene negativnim nabojem, sluz može vezati pozitivno nabijene čestice visokim aviditetom. Dvojna sposobnost torbe polivalentnih adhezivnih međudjelovanja putem hidrofobnih ili anionskih sila predstavlja problem i izazov za razvoj polimernih nanočestica koje bi dostavljale lijekove ili gene budući da su najčešće korišteni biomaterijali ili hidrofobni poput laktid-ko-glikolida i polianhidridni ili kationski poput polietilenamina, kitozana i polilizina. Unatoč visokom aviditetu niskoenergetskih interakcija, sposobnost sluzi za imobilizaciju ipak se zasićuje.

Sveprisutne hidrofobne domene u mukoznim porama također pomažu objasniti zašto mnoge terapijski značajne molekule kroz sluz difundiraju sporije u odnosu na druge molekule sličnih ili većih dimenzija. Difuzija hidrofobnih molekula kroz sluz često je u velikoj mjeri sporija u odnosu na difuziju u vodi (Khanvilkar i sur., 2001). Difuzivnost se obično smanjuje s povećanjem koeficijenta raspodjele nepolarno/polarno, što je ujedno i očekivana posljedica adhezivnih međudjelovanja između hidrofobnih molekula i hidrofobnih domena sluzi. Nekoliko je istraživača također pokazalo da sluz značajno smanjuje difuziju brojnih, kako malih, tako i velikih molekula, uključujući tercijarne amine, goveđi serumski albumin, lizozim i dr., vjerojatno zbog hidrofobnih međudjelovanja. Neke hidrofobne molekule ipak su sposobne difundirati kroz mukozni gel, možda iz razloga što male molekule ne mogu tvoriti polivalentne adhezivne veze s mukoznim gelom.

Sluz je primarno građena od križno povezanih i isprepletenih mucinskih vlakana koje luče vrčaste stanice i submukozne stanice (Thornton i Sheehan, 2004). Unatoč različitim staničnim izvorima i različitom rasporedu u slojevima, osnovna građa mucina u načelu je slična. Mucini su glikoproteini velike molekulske mase veličine 0,5-40 MDa sastavljene od niza mucinskih monomera veličine 0,3-0,5 MDa te su presvučeni širokim spektrom proteoglikana. Sadrže dvije domene; proteinske okosnice mucina s regijama bogatim ponavljajućim aminokiselinama prolinom, treoninom i serinom (PTS domene) koje su izrazito glikozilirane fukozom, galaktozom, sijalinskom kiselinom, N-acetilglukozaminom (GlcNac) i N-acetilgalaktozaminom (GalNac) i golih hidrofobnih regija (slika 2 i 3). Lipidi prisutni u sluzi



u količini od 1-2% vezani su za hidrofobne regije vlakana, dok su šećerni lanci vezani preko svojih OH- skupina tzv. O- glikozilacijom za PTS domene ( Fahy i Dickey., 2010). Zbog visokog postotka glikozilacije, ugljikohidrati čine 80% sadržaja suhe tvari sluzi, a za njih se vjeruje da štite proteinsku osnovu od razgradnje. Dvije su PTS domene vezane preko malih domena bogatih cisteinom, dok su N-krajevi odgovorni za di- i trimerizaciju molekula. Mucinska vlakna obično su promjera 3-10 nm s pokrovom od 20-30 ugljikohidrata na 100 aminokiselina. Visok udio sijalinske kiseline i sulfata stvara snažan negativan naboj te pruža polimeru rigidnost uslijed odbijanja naboja. Naboj se mijenja s rasporedom vezanih oligosaharida te je uočeno da crijevni mukus nosi više negativnog naboja nego želučani. Umreženi mucini i drugi sastavni dijelovi sluzi s reverzibilnom povezanosti na polimer poput lipida i udruženih proteina (npr. IgA) primarno tvore mukozne pore veličine oko 500 nm i određuju viskoznost sluzi. Nadalje, nekovalentno umrežavanje ovisno o kalciju dovodi do nastanka mreže veličine pora 30-100 nm (Knowles i Boucher, 2002). Mucini su kodirani s više od dvadeset MUC gena, a mogu biti sekretorni ili vezani za membranu, dok ekspresijski obrazac ovisi o fiziološkom položaju. Do sada je identificirano 10 za membranu vezanih i 7 sekretornih mucina. Dok mucini vezani za membranu omogućavaju stanično prianjanje, vezanje patogena i prijenos signala, sekretorni mucini doprinose viskoznosti sluzi. U gastriontestinalnom traktu, za membranu vezani MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC16 i MUC17 ekspimirani su uz sekretorne MUC2, MUC5AC, MUC5AB, MUC6 i MUC7 (Johansson i sur. 2013). MUC2 i MUC5 predstavljaju glavne mucine koji se luče u želudac i tanko crijevo. Patofiziološki uvjeti poput tumora ili upalne bolesti crijeva mogu dovesti do promjena u rasporedu i/ili u razini mucinske sekrecije. Sluz, stoga, predstavlja hidrofilan gel s mucinima kao glavnim suhim sastavnicama , obično 2-5% (w/v), te manjim količinama lipida i proteina.

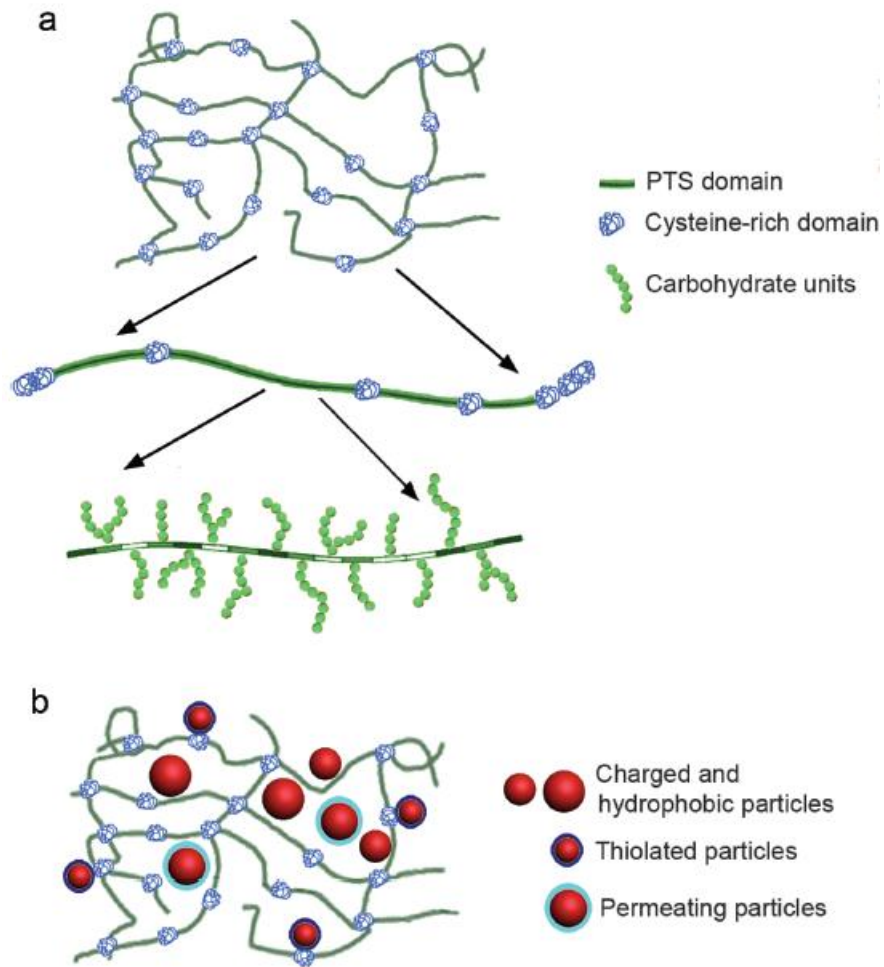


**Slika 2.** Pojednostavljeni prikaz sekretornih mucina koji tvore mukozni gel koji pokriva intestinalni epitel. Cisteinom bogate neglikozilirane domene i ponavljajuće aminokiseline serin, treonin i prolin *O*- glikozidnom vezom vezane su na *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) i s *N*-acetil galaktozaminom (GalNAc) grade mucinski monomer koji se disulfidnim vezama veže s istovrsnim monomerima (Johansson i sur., 2013).

Pretpostavlja se da u glikoziliranoj regiji svake dvije do tri aminokiseline nose oligosaharidni lanac sa devetnaest molekula šećera. Više od jednog mucinskog gena može biti eksprimirano u epitelnoj stanici, a kasnije je dokazano da mucinski produkt istoga gena može biti prisutan u različitim formama zbog raznolikosti u glikozilaciji (Round i sur., 2007). Takve različite glikoforme mogu biti rezultat ekspresije i aktivacije specifičnih glikoziltransferaza u sekretornim stanicama. Također, tome mogu doprinijeti i nepotpuna sinteza mucina unutar stanice ili razgradnja bakterijskim glikozidazama u lumenu crijeva.

Glikozilirane regije mucina su hidrofilne, dok su neglikozilirane proteinske domene hidrofobne. Te gole domene bogate su cisteinom koji je disulfidno vezan s drugim mucinskim monomerima

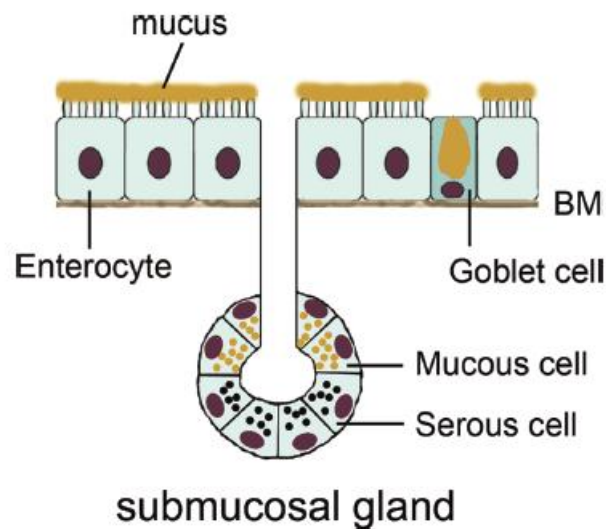
(slika 2). Neki od mucinskih lipida kovalentno su vezani za neglikozilirane domene, dok se najviše fosfolipida adsorbira i formira hidrofobnu luminalnu mukoznu oblogu.



**Slika 3.** Arhitektura mukozne mreže (a) i međudjelovanje čestica s mrežom (b)

### 1.1.2. Lučenje

Sluz stvaraju unutarepitelne mukozne stanice i/ili izvanepitelne stanice smještene u žlijezdama u submukozi (slika 4).

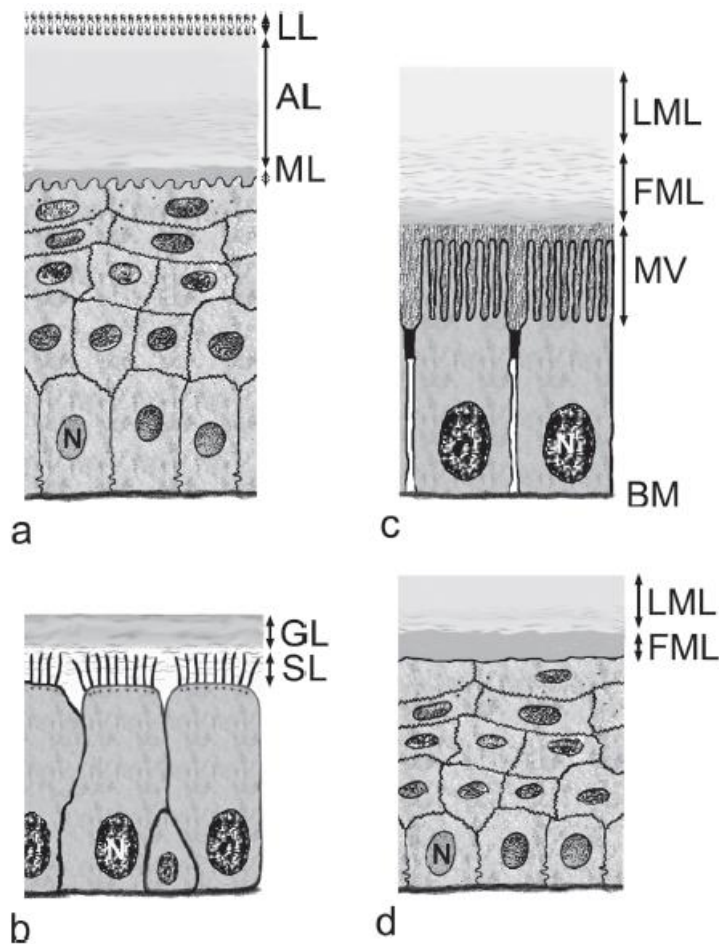


**Slika 4.** Načini proizvodnje sluzi u probavnom traktu. Sluz proizvode unutarepitelne stanice (npr. goblet stanice) smještene između enterocita i izvanepitelne stanice smještene u submukozi. Submukozne žlijezde često su sastavljene od dva tipa stanica; mukoznih stanica koje proizvode više mukozan sekret i seroznih stanica sa sekretom manje viskoznosti.

Najviše unutarepitelnih stanica čine vrčaste stanice zastupljene u konjunktivi, nazalnoj šupljini dišnog sustava i probavnom sustavu. Druge stanice koje proizvode sluz, a koje se oblikom neznatno razlikuju od vrčastih stanica, jesu foveolarne stanice želuca i mukozne stanice endocerviksa.

U oku, mukozni sloj proizvode unutarepitelne vrčaste stanice smještene u bulbarnoj konjunktivi s najvećom gustoćom u infranazalnom kvadrantu. Zajedno sa sekretom Meibomovih žlijezda očnoga kapka (uljni dio filma) i suznim žlijezdama konjunktivalne tvorbe (vodeni srednji sloj), stvaraju suzni sloj u oku. Sluz vodenome sloju dopušta ravnomjerno proširenje preko površine oka i vezanje suznog filma na oko. Vrčaste stanice se, zbog konjunktivalnog epitelnog prodora, mogu naći i u rožnici (Sejpal i sur., 2013). U dišnom sustavu, sluz proizvode vrčaste stanice i submukozne žlijezde. Submukozne žlijezde nalazimo u dušniku i bronhima, ali nisu prisutne u bronhiolama. Za razliku od njih, unutarepitelne

vrčaste stanice i dalje su prisutne u bronhiolama, a jedino ih nema u zadnjem dijelu vodećih dišnih puteva, tj. u terminalnim bronhiolama.



**Slika 5.** Raspored barijera oka (a), bronhalnog trakta (b), probavnog trakta (c) i vagine (d). (a) Konjunktivalna barijera sastoji se od slojevitog epitela i suznog filma sastavljenog od lipidnog sloja (LL), vodenoga mucinskog sloja s proteinima (AL) i mucinskoga sloja vezanog za glikokaliks epitelnih stanica rožnice (ML). (b) Sličan cilindrični epitel prisutan je u gornjem dijelu dišnog sustava sa sluzi sastavljene od pericilijarnog sol sloja (SL) niske viskoznosti i gel sloja (GL) visoke viskoznosti. (c) Probavna barijera također se sastoji od cilindričnog epitela i sluzi sa dva sloja. Mikrovili (MV) na apikalnoj strani enterocita prekriveni su glikoproteinskim slojem. Taj sloj nastavlja se na čvrsto vezani mucinskog sloj (FML) i labavo vezani mucinski sloj (LML). (d) U vagini, pločasti nekeratinizirani epitel prekriven je slojem mucina organiziranim u dva reda; čvrsto vezni (FML) i labavo vezani (LML). Svi epiteli počivaju na bazalnoj membrani (BM).

U usnoj šupljini ne nalazimo vrčaste stanice, međutim, tvorbu sline omogućuju podčeljusna i podjezična te zaušna žlijezda slinovnica koje povećavaju debljinu mukoznoga sloja.

U probavnom traktu submukozne žlijezde smještene su u jednjaku i dvanaesniku (Brunnerove žlijezde). Unutarepitelne stanice koje proizvode sluz postoje u želučanoj mukozi (foveolarne stanice) te kao vrčaste stanice koje se prostiru od dvanaesnika do rektuma. Cervikovaginalu sluz luče mukozne stanice smještene u brojnim kriptama endocerviksa.

Osim različitih prisutnih stanica, arhitektura mukoznoga sloja varira među položajima na kojima se te stanice nalaze (slika 5). Sluz koja pokriva dišne puteve slična je sluzi koja pokriva okularnu površinu po tome što obje imaju samo jedan sloj preko epitelnog glikokaliksa (mucinski sloj povezan s apikalnom plazmatskom membranom epitelnih stanica) (slika 5 a i 5 b). Mukozni sloj u izravnom je kontaktu s glikokaliksom, dok je lipidni sloj suznog filma u kontaktu sa zrakom (slika 5 a). Pericilijarni (sol) sloj dušnika i bronha sadrži kako velike za membranu vezane glikoproteine, tako i privezane mucine koji su također dio glikokaliksa (slika 5 b). Gel koji pokriva taj sloj mnogo je viskozniji kako bi zadržao prašinu i strane čestice te ih uklonio iz dišnog puta. U želucu i debelom crijevu nalazimo dva sloja; adherentni sloj kojega otpuštaju mukozne stanice, a koji je nepermeabilan za bakterije te drugi neadherentni mucinski sloj okrenut više ka luminalnoj strani koji nastaje enzimskim procesima mucina (slika 5 c). Jednak dvoslojni raspored pronalazi se i u cervikovaginalnom traktu te dopušta tvorbu skliskog sloja niske viskoznosti između nepokretnog sloja koji je vezan za stanice i neprijanjajućeg mukoznog sloja u kojemu se sluz brzo smiče. Neprijanjajuća sluz se prenosi. (slika 5 d).

Sekrecija sluzi u dišnom i probavnom sustavu regulirana je acetilkolinom, neuropeptidima poput vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP) i neurotenzina te citokina (Rogers, 2002; Laboisse i sur., 1996). Histamin, prostaglandini i gastrin u želucu također povećavaju lučenje sluzi. Bazalno lučenje ovisi o kretanju citoskeleta i sekretornim žlijezdama, dok egzocitoza započinje stimulirano lučenje. Sluz je kondenzirana u unutarstaničnim zrnima i širi se trenutno i brzo težeći egzocitozi. Unutar zrnaca kalcijevi ioni neutraliziraju negativan naboj zastupljen na mucinima. Tijekom egzocitoze kalcijevi ioni prolaze kroz membranske pore i naboji više nisu neutralizirani. Odbijanje polianionskih naboja i posljedična hidracija dovode do širenja gela.

### 1.1.3. Reologija sluzi

Odgovor tekućine na silu smicanja definiran je viskoznošću (otpornošću na tok) i elastičnošću (krutošću). Sluz se ponaša različito pod visokim i niskim smicanjem: pod niskim smicanjem ponaša se poput elastične krutine i vraća oblik nakon izvjesnog vremena dok pod visokim smicanjem djeluje kao viskozna tekućina koja se na kraju ireverzibilno deformira. Nakon stresa, viskoznost i elastičnost obnavljaju se unutar par sekundi. Viskoznost, elastičnost i konzistenciju sluzi određuje stupanj hidracije te je normalna sluz u dišnom sustavu nalik na bjelanjak jajeta. Isto tako, stupanj hidracije je određen tipom bočnih lanaca glikana na mucinu kojemu povećava težinu i do sto puta. Mukus će u vodi nabubriti i u potpunosti se otopiti. Soli u postotku manjem od 1% smanjuju viskoznost, dok multivalentni kationi, poput kalcija i magnezija, mogu poremetiti mukozni gel i uzrokovati umrežavanje mucinskih monomera. Viskoelastičnost sluzi također određuje i pH; pH dišne sluzi (nosne, pluća) nalazi se unutar neutralnog raspona (7,0-7,4 (Jayaraman i sur., 2001; Hehar i sur., 1999)), sluz oka je blago bazična (7,8 (Greaves i sur., 1993)), dok je vaginalna sluz u rasponu 3,5-4,5 (Cone, 2009). Najviše promjena u pH uočljivo je duž probavnog sustava gdje pH varira 2,0-8,0 (Lambert, 1994). Pri niskom pH, proizvodnja mucinskih vlakana opada i ona se udružuju tvoreći gušću mucinsku mrežu u želucu nego u dvanaesniku. Nadalje, viskoelastičnost povećavaju proteini poput IaA i IgM te lizozima. Najveće odstupanje u reološkim svojstvima vidljivo je kod cervikalne sluzi koju čine različiti tipovi sluzi; uglavnom *G*-, *L*-, *S*-, *P*- i *F*-mukus (Sharif i Olufowobi, 2006). *G*-mukus nastaje pod utjecajem progesterona, a sadrži epitelne stanice i leukocite 5% od svakih i tvori mukozni čep. *L*- mukus suh pokazuje granajući obrazac, a nastaje u odgovoru na rastuće razine estrogena te gradi skelu za tekući *S*-mukus. *S*-mukus tvori igličaste kristale, vrlo je tekuć i blago alkalni. Visoke razine estrogena stimuliraju njegovo stvaranje, a noradrenalin mu održava tok. *P*-mukus također pokazuje granajuće sklonosti nalik na *L*-mukus, no za razliku od njega sadrži i mukolitičke enzime. Stvaranje mu potiče pad razine estrogena u prisustvu visoke razine noradrenalina, a najveće stvaranje moguće je zamijetiti u ovulaciji. Sastav različitih tipova sluzi omogućava velike promjene u konzistenciji cervikalne sluzi u različitim fazama menstrualnog ciklusa.

U tkivima su eksprimirane različite grupe mucinskih gena koje dovode do velike raznolikosti u sastavu sluzi na različitim dijelovima tijela. Nadalje, na svojstva sluzi utječu pH, količina ne-mucinskih sastavnica i duljina mucina te tako stvaraju izražene razlike unutar pripadnika iste vrste. Unatoč raznolikosti utjecajnih faktora, reološko ponašanje ljudske sluzi približno je jednako. To pravilo vrijedi za neovulacijsku cervikovaginalnu sluz, dok ovulacijska sluz ima



sto puta manju viskoznost. Za procjenu sličnosti u reološkim svojstvima sluzi drugih vrsta, veličina organa pokazala se kao dobar pokazatelj. Životinjska sluz često se koristi kao zamjena za ljudsku sluz. Za probavni sustav preporuča se uporaba svinjske sluzi koja je po svojim svojstvima slična sluzi debeloga crijeva čovjeka. Za dišni sustav, reološki najbližnja čovjeku jest sluz dušnika psa. S druge strane, unatoč širokoj primjeni, sluz štakora nije najreprezentativnija u usporedbi s čovjekovom sluzi. Na primjer, viskoznost nazalne sluz štakora je deset puta manje viskoelastična od ljudske. Dinamička viskoznost zdrave ljudske sluzi obično je 1000-10 000 puta veća nego viskoznost vode. Stokes-Einsteinova jednadžba za difuziju u homogenim tekućinama predviđa da ni virusi niti mnoge hidrofilne makromolekule nisu sposobne prodrijeti u tekući sloj te viskoznosti. Jednako tako, dugo se smatralo da je difuzija brojnih makromolekula kroz veće udaljenosti ili brzinom većom od mukocilijarnog klirensa jednostavno nemoguća. To se mišljenje počelo mijenjati s rastućim brojem dokaza o velikom broju makromolekula koje brzo difundiraju kroz sluz. Općenito, ukoliko je viskoznost tekućine koja ispunjava pore sluzi jednaka viskoznosti vode, čestice znatno manje od prosjeka veličine mukoznih pora imat će postotak difuzije jednak onome vode uz pretpostavku da ne prijanjaju na sluz.

#### 1.1.4. Debljina i fiziološka obnova sluzi

Pored biokemijskih razlika, parametar koji je također promjenjiv ovisno o mukoznoj površini jest debljina mukoznog pokrova (tablica 2). Dok su reološki parametri različitih dijelova ljudskog tijela pretežito slični, debljina sluzi značajno se razlikuje. U oku, za prekornealni suzni film koji pokriva konjunktivu nekoć se smatralo da je ~5  $\mu\text{m}$  debljine (King-Smith i sur., 2004), ali novije studije su pokazale da je njegova debljina bliža broju 30-40  $\mu\text{m}$ . Nazalna sluznica bilježi vrlo tanak sloj sluzi (5,5-15  $\mu\text{m}$ ). U dišnim putevima postoji regiospecifične razlike u debljini u rasponu od 7-70  $\mu\text{m}$ . Uzimajući to u obzir, prosječna debljina mukoznoga sloja u usnoj šupljini, izračunata na temelju ostatnog volumena sline nakon gutanja (0,77 ml), volumena prije gutanja (1,07 ml), kao i ukupne površine usta odrasloga čovjeka (214,7  $\pm$ 12,7), varira između 70 i 100  $\mu\text{m}$ . Sloj sluzi u probavnom traktu mnogo je deblji pri čemu može doseći debljinu i do 1 mm u debelom crijevu. Debljina probavne sluzi može se mijenjati i pod utjecajem probavne aktivnosti. Primjerice, nedostatak dijetnih vlakana dovodi do značajnoga smanjenja debljine sluzi kod štakora (Brownlee i sur., 2003). Debljina cervikovaginalnog sloja sluzi prosječno iznosi 200  $\mu\text{m}$ .



Mukozni klirens također pokazuje izvjesne razlike. Tok suza vrlo je brz s klirensom u rasponu od nekoliko sekundi, dok fiziološka izmjena mukoznog sloja u oku traje 15-20 sati (Ludwig, 2005). Nazalna sluz zamijeni se novom kroz 20 minuta, a klirens sluzi u dišnim putevima iznosi 1 mm/min te raste s većom hidratacijom. Fiziološka obnova cervikovaginalne sluzi traje satima, a probavna sluz u potpunosti se obnovi nakon 20 sati. Uzimajući u obzir koeficijent difuzije nepresvučenih čestica lateksa veličine 59-1000 nm koji iznosi  $0 \mu\text{m}^2/\text{s}$  u neovulacijskom cervikovaginalnoj sluzi i slična reološka svojstva ljudske sluzi, može se zaključiti da se te čestice uklanjaju unutar par minuta do nekoliko sati ovisno o anatomskom položaju unutar tijela.

**Tablica 2.** *Probavna sluz općenito se sastoji od dva sloja: temeljnog, "stacionarnog" ili „čvrsto vezanog,, sloja te luminalnog, "pokretnog" ili „neurednog" sloja, no najveći broj citiranih referenci navodi samo jednu vrijednost debljine mukoznog sloja. Matsuo i sur. navode debljine kako vanjskog, tako i unutarnjeg mukoznog sloja; u slijepom crijevu unutarnji sloj je izmjeren na  $5,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ; u debelom crijevu  $4,7 \pm 1,4 \mu\text{m}$  za uzlazno crijevo,  $7,0 \pm 3,7 \mu\text{m}$  za poprečno crijevo i  $7,6 \pm 3,4 \mu\text{m}$  za silazno crijevo; te u rektumu  $12,7 \pm 6,0 \mu\text{m}$ .*

<sup>b</sup> A= uzlazno debelo crijevo, B=poprečno debelo crijevo, C=silazno debelo crijevo

Type of mucus	Average thickness ( $\mu\text{m}$ )	Reported thicknesses ( $\mu\text{m}$ )
<b>Respiratory</b>		
Airway	15	7 [64,66]; 30 [65]
Bronchial	55	$55 \pm 5$ [67]
<b>Gastrointestinal<sup>a</sup></b>		
Gastric	170	$144 \pm 52$ [208]; $192 \pm 7$ [209]
Ileal	10	10 [74]
Cecal	37	$36,7 \pm 7,2$ [72]
Colonic <sup>b</sup>	100	$39,1 \pm 9,9$ (A), $57,5 \pm 14,5$ (T), and $69,6 \pm 32,1$ (D) [72]; $79 \pm 40$ [74]; 100–150 [68]; $107 \pm 48$ (A–T) and $134 \pm 68$ (T–D) [73]; 110–160 [69]
Rectal	125	$101,5 \pm 80,3$ [72]; $155 \pm 54$ [73]
<b>Ocular</b>		
Mucus layer (only)	0.035	0.02–0.05 [77]
Tear film	5	3 [77]; 6–7 [76]
	40	34–45 [78]

Sluz se neprestano izlučuje, potom se širi, odbacuje, razgrađuje i reciklira. Njen životni vijek je kratak; svega nekoliko minuta do nekoliko sati (tablica 3). Najbrža fiziološka obnova uočena je na površinama s najtanjim slojem sluzi, što se pripisuje mogućem evolucijskom

odgovoru s ciljem poboljšanja zaštitnog svojstva sluzi. U nosnom traktu, cilijarno kretanje prenosi sluz od prednje prema stražnjoj regiji nosne šupljine, pomičući uhvaćene čestice i potencijalno toksične materijale k nazofarinksu. Tok sluzi iznosi oko 5 mm/min, a mukozni sloj se obnavlja približno svakih 20 minuta. Luminalni gel sloj dišnog sustava na isti način se zamjenjuje svakih 10 do 20 minuta te tako osigurava učinkovito odstranjivanje čestica udahnutog zraka. S druge strane, smatra se da se sol sloj dišne sluzi uklanja brže nego kruti luminalni gel sloj. Neprestano lučenje i uklanjanje peristaltičkim silama dovodi do brže metaboličke izmjene, u rasponu od 4 do 6 sati u probavnom traktu štakora (Galindo-Rodriguez i sur., 2005) što je vrlo slično brzini kod ljudi. Sluz se u vagini odstranjuje unutarabdominalnim tlakom kao i abdominalnim pokretima koji priljubljuju vaginalne stijenke. Fiziološka obnova suza u oku u normalnim fiziološkim uvjetima iznosi 13- 20% po minuti dovodeći tako do gotovo potpunog odstranjivanja molekula i čestica unutar oka. Razumijevanje debljine i klirensa mukoznog sloja na različitim mukoznim površinama neophodno je za razvoj čestica koje će prevladati mehanizme odstranjivanja budući da moraju prodrijeti u sluz znatno brže od procesa uklanjanja i obnavljanja.

**Tablica 3.** Vrijeme i brzina klirensa sluzi u organizmu.

<sup>a</sup> Nije dostupno.

<sup>b</sup> Klirens je mjerjen uporabom bronhoskopske ili roentgenografske metode koja općenito dovodi do visokih vrijednosti klirensa, vjerojatno zbog invazivnosti postupka (Wanner i sur, 1996; Yeates i sur., 1981).

<sup>c</sup> Vrijeme klirensa procijenjeno je temeljem uklanjanja različitih molekula s površine oka.

Type of mucus	Clearance time (min)	Clearance rate (mm/min)	Ref.
Respiratory			
General	10–20	<sup>a</sup>	[32]
Maxillary sinus	20–30	<sup>a</sup>	[32]
Nasal	8.8	<sup>a</sup>	[213]
	<sup>a</sup>	5–11	[80]
	20	5	[79,214,215]
Tracheal	<sup>a</sup>	4.1 ± 1.9	[216]
	<sup>a</sup>	4.7 (range: 3.5–6)	[216–222]
	<sup>a</sup>	15.5 (range: 4.5–30) <sup>b</sup>	[223–230]
Bronchial	<sup>a</sup>	2.4 ± 0.5	[217]
Small airways	<sup>a</sup>	1	[231]
Ocular	5–7.7 <sup>c</sup>	<sup>a</sup>	[56]

## 1.2. MUKOPENETRATIVNE NANOČESTICE

### 1.2.1. Sudbina konvencionalnih nanočestica

Nakon primjene na različita mukozna tkiva, konvencionalne nanočestice obično bivaju zarobljene u sluzi putem steričkih ili adhezivnih sila te se brzo eliminiraju mukocilijarnim klirensom. U probavnom sustavu, primjerice, nanočestice dostavljene oralno mogu: (1) biti udružene s himusom i tako se izravno transportirati kroz probavni trakt te se eliminirati fecesom; (2) prijanjati na mucinska vlakna, podleći mukoznom klirensu i eliminirati se fecesom ili (3) se transportirati kroz mukozne pore kako bi im se osigurao mogući ulazak u temeljni epitel ili produljeno vrijeme boravka u nepokretnom sloju sluzi. U pravilu, većina primijenjenih čestica ne prijanja niti prolazi kroz mukozni sloj probavnog trakta, već se zajedno sa sadržajem transportira kroz probavni trakt. Posljedično kratko vrijeme prolaska kroz probavni trakt može se negativno odraziti na oslobađanje značajnije frakcije uklopljenoga lijeka iz čestica, stoga je u brojnim slučajevima onemogućeno postizanje visoke lokalne koncentracije lijeka u duljem vremenskom periodu, a to dovodi do smanjene bioraspoloživosti i loše učinkovitosti lijeka.

Kako bi se nadvladalo kratko vrijeme prolaska, istraživanja su se usmjerila na smanjenje frakcije lijeka je podložna uklanjanju sa sluzi. Bioadhezija opisuje stanje u kojemu se dva materijala, od kojih je barem jedan po prirodi biološki, drže zajedno putem međupovršinskih sila produljeni vremenski period. Ukoliko je supstrat sluz, a ne biološka membrana, koristi se termin mukoadhezija. Mukoadhezija usporava prolazak čestica kroz probavni trakt ovisno o brzini obnove sluzi te na taj način poboljšava apsorpciju lijeka. Razvoj mukoadhezivnih terapijskih sustava trenutno je najistaknutiji pristup povećanju mukozne dostave lijeka. Materijali koji omogućavaju mukoadhezivna svojstva su sintetski ili prirodni polimeri. Ti se polimeri koriste u različitim vrstama sustava dostave poput tableta, prašaka, filmova, masti, gelova i flastera. Lijekovi uklopljeni u te nosače oslobađaju se na mjestu djelovanja. I dok je lokalna primjena takvih nosača moguća za oko, bukalnu šupljinu, vaginu i rektum, mukoadhezivne nanočestice mogu također poboljšati dostavu putem probavnog trakta, gdje nije moguća lokalna primjena mukoadhezivnih nosača.

Mukoadhezija se sastoji od dvije faze: kontakta i sjedinjenja. U prvoj fazi, na čestice djeluju odbojne sile (osmotski tlak, elektrostatsko odbijanje) i privlačne sile (van der Waalsove sile, elektrostatska privlačenja). Kad čestice nadvladaju odbijanje, prva faza završava i mukoadhezivnim molekulama vlažnost omogućava tvornu slabih van der Waalsovih i

vodikovih veza sa sluzi. To se može postići interpenetracijom lanaca i tvorbom sekundarnih veza. Alternativno, čestice mogu dehidrirati sluz dok se ne postigne osmotska ravnoteža i sjedini adhezivnu vezu.

Veliki utjecaj na jačinu mukoadhezije ima molekulska masa polimera. Za polietilen glikol molekulske mase 20 000 mukoadhezija je zanemariva, molekulske mase 200 000 poboljšana, a izvrsna pri molekulskoj masi 400 000 (Roy i sur., 2009). Zbog bolje penetracije/permeacije u sloj sluzi, dugi lanci omogućavaju bolju adheziju od kratkih polimernih lanaca. Smanjena elastičnost lanaca dopušta bolju difuziju vode, poboljšava hidraciju i ulazak čestica. Prostorni raspored polimernih lanaca dodatni je čimbenik pri mukoadheziji. Koncentracija polimera posjeduje optimum specifičan za primjenu jer niske koncentracije umanjuju mukoadhezivnu snagu, dok visoke koncentracije ometaju difuziju otapala. Biološki čimbenici poput pH i ionske jakosti, određuju vodikove veze i elektrostatske interakcije polimera i sluzi. Kationski polimeri (kitozan) reagiraju s glikoproteinima sluzi samo u neutralnom i alkalnom pH. Anionski polimeri (karbomeri, karboksimetilceluloza i alginat) tvore hidrofobna međudjelovanja, vodikove i van der Waalove veze. Neionski polimeri (hidroksipropilmetilceluloza, hidroksimetilceluloza i metilceluloza) općenito pokazuju slaba mukoadhezivna svojstva. Tiolirani polimeri tvore disulfidne veze s domenama mucina bogatim cisteinom. Lektini se reverzibilno vežu na šećerne/ugljikohidratne ostatke. Mukoadhezivne nanočestice razvijene su s namjerom da produlje zadržavanje i poboljšaju apsorpciju lijeka. U okularnoj dostavi, nanočestice se mogu smjestiti u suzni film i prijanjati na sloj sluzi blizu epitela rožnice te tako izbjeći odstranjivanje putem suza (Sahoo i sur., 2010). Uloga mukoadhezivnih polimera u prekidu tijesnih veza, ipak nije u potpunosti jasna. Dok neke studije pokazuju da i otopine kitozana i oblaganje kitozanom uzrokuje kratkotrajno otvaranje čvrstih međustaničnih veza (Rodrigues i sur., 2012), druge smatraju da samo protonirani topljivi kitozan pokazuje to svojstvo (Issa i sur., 2005).

### *Oralna primjena*

Primjena mukoadhezivnih nanočestica oralnim putem uključuje sistemsko liječenje cijelog niza bolesti. Lokalna primjena također je moguća, primjerice, kao primjena tioliranih nanočestica s kitozan polimetakrilnom kiselinom ispunjenih metronidazol benzoatom u periodontalnoj bolesti (Saboktakin i sur., 2011). *In vitro* i *ex vivo* studije pokazuju bolje prijanjanje i prijenos lijeka za kitozan, tiolirani kitozan, kitozan 4- tiobutinamidinske konjugate, čestice tiolirane hidroksietil celuloze te bolju učinkovitost *in vivo* N- metil

kitozana, poloksamera 188 s kitozanom, kitozan/dekstran sulfatnih čestica (tablica 4). Nekoliko vrsta mukoadhezivnih nanočestica poboljšavaju dostavu inzulina. Ipak, nije potpuno jasno može li inzulin prijeći intestinalne barijere kao netaknuta funkcionalna molekula jer se intestinalna sluz, uz svoja mehanička svojstva, ponaša i kao enzimski barijera (Aoki i sur., 2005). I druge molekule koriste se za dobivanje mukoadhezivnih nanočestica za oralnu dostavu. Takvi pristupi podrazumijevaju, primjerice, pektinske liposomalne nanokomplekse (Thirawong i sur., 2008).

### *Okularna primjena*

Dostava lijeka u oko isključivo je lokalna. Na taj se način primjenjuju protuupalni, antiviralni, antibakterijski, antifungalni, antialergijski lijekovi, kemostatski lijekovi te male molekule koje snižavaju intraokularni tlak. Dodatno, inzulin se koristi kako bi liječio dijabetičku retinopatiju. Različite nemukoadhezivne nanočestice s poli(butil)cijanoakrilatom ili polilaktidom pokazuju poboljšanu dostavu i produljenu učinkovitost kod lokalne okularne primjene (Jain, 2008). Penetracija/permeacija kroz cijeli suzni film pozitivno nabijenih nanočestica bolja je nego negativno nabijenih. *Ex vivo* studije pokazuju produljeno zadržavanje i dostavu s kitozan/dekstran sulfatom, tioliranim kitozanskim nanočesticama i poliamidoaminskim dendrimerom G3.0 vezanog s PEG-om (tablica 4). Poboljšana dostava *in vivo* postignuta je s lecitinom/kitozanom, poli(amidoamiskim) dendrimerom, sulfobutileter-B-ciklodekstrin kitozanom, nanočesticama s natrijevim alginatom, Eudragitom RS100 i RL 100 obloženim hijaluronskom kiselinom i kitozan/hijaluronska kiselina nanočesticama.

### *Primjena u dišni sustav*

Intranazalna dostava pogodan je put dostave peptida u mozak. Njušni živac izravno je povezan s mozgom i omogućuje zaobilazanje krvno- moždane barijere. Prašci, gelovi, tekućine, sprejevi i mikročestice koriste se kako bi dostavili peptide poput dezmpresina za liječenje bolesti poput dijabetesa insipidusa i noćne enureze, oksitocina za poticanje dojenja i apomorfina kod Parkinsonove bolesti. Ne-peptidni lijekovi, poput sumatriptana i zolmitriptana nazalnom primjenom koriste se u liječenju migrena (Singh i Sateesh Madhav, 2012). Nanočestice s tioliranim kitozanom i aglutininom iz pšeničnih klica modificirane PEGiliranom polimlijčnom kiselinom koriste se u dostavi malih peptida (tablica 4). Veći peptidi poput inzulina uspješno se dostavljaju u štakorima s dijabetesom putem nanočestica s kitozanom, PEGiliranim- graft- trimetil kitozanom, amino modificiranim poli(vinil alkoholom)

umreženog s poli(L- laktatom). Još jedno važno područje je i mukozno cijepljenje gdje se kao obećavajući kandidat ističu nanočestice s kitozonom križno vezane s polianionskim ciklodekstrinom (sulfobutil- $\beta$ -ciklodestrin ili karbometil- $\beta$ -ciklodekstrin) (Csaba i sur., 2009). Oblaganje s kitozonom povećalo je učinkovitost cijepljenja na primjeru razine izlučenog IgA. Unatoč snažnim mukoadhezivnim svojstvima, primjena uobičajenih lektina ograničena je zbog toksičnosti i imunogeničnosti. Općenito, dostava nanočestica bez uklapanja u bronhe ili duboko u pluća nije praktična zbog smanjene dimenzije, a, stoga, i malog trenja.

### *Vaginalna primjena*

Glavna indikacija za vaginalnu primjenu jest lokalna zaštita od bakterijskih, gljivičnih i virusnih infekcija. Postojeća dostava temelji se na primjeni mukoadhezivnih filmova i flastera, dok se nanočestice rijetko koriste. Ipak, PGLA čestice obložene avidinom ili PEG-om poboljšavaju dostavu (Cu i sur., 2011) . Nanočestice temeljene na kitozanu veličine između 180-190 nm omogućavaju bolju dostavu tenofovira kroz svinjsku vaginalnu sluznicu (Meng i sur., 2011).

**Tablica 4.** *Primjeri za uspješnu dostavu lijeka nanočesticama s mukoadhezivnim, mukopenetrativnim i mukolitičkim svojstvima.*

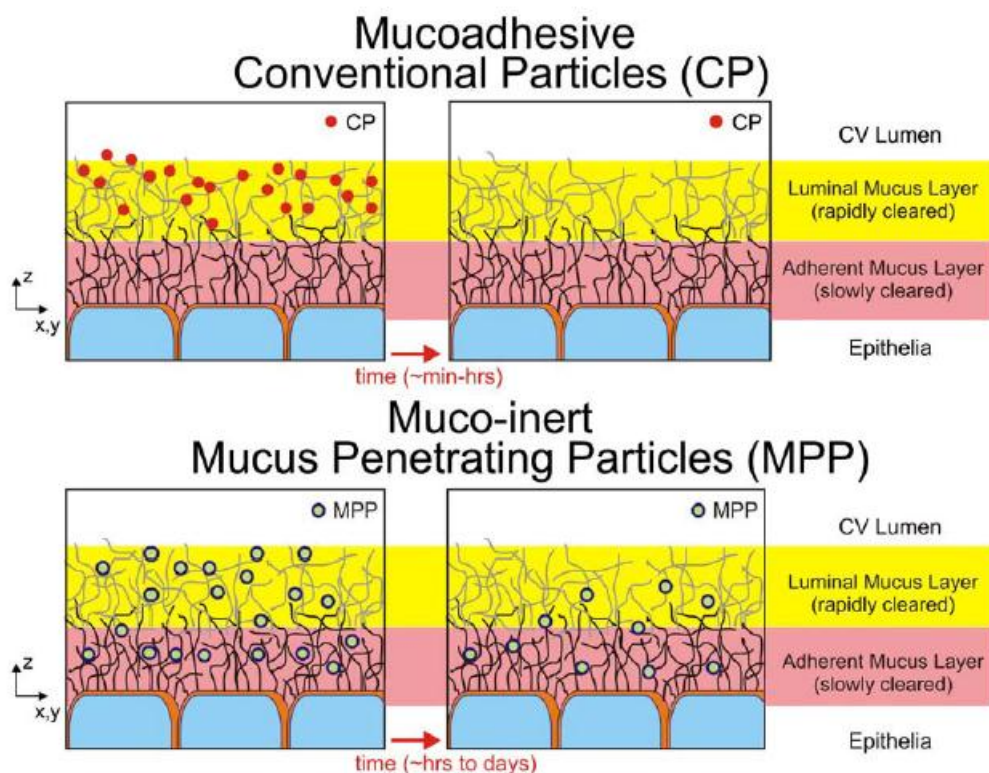
Mechanism	Drug compound	Material/composition	Model	Route	Ref.
Adhesive	Low molecular weight heparin	<i>N</i> -trimethyl chitosan	Rat intestine	Oral	[80]
Adhesive	Alendronate	Chitosan-coated liposomes	Caco-2 monolayer	Oral	[81]
Adhesive	Docetaxel	Chitosan-coated methyl- <i>b</i> -cyclodextrin (polyisobutylcyanoacrylate)	Rat intestine	Oral	[82]
Adhesive	Docetaxol	Thiolated chitosan coated methyl methacrylate	Rat intestine	Oral	[83]
Adhesive	None	Chitosan-4-thiobutylamidine conjugates	Porcine small intestine	Oral	[84]
Adhesive	Fluorescein isothiocyanate dextran	Thiolated hydroxyethyl cellulose	Porcine small intestine, Caco-2 cells	Oral	[85]
Adhesive	Insulin	Carboxylated chitosan and poly(methyl methacrylate)	Rat	Oral	[86]
Adhesive	Insulin	Chitosan-insulin polyelectrolyte complexes suspended in oily phase	Rat	Oral	[87]
Adhesive	Insulin	Chitosan-based poloxamer 188	Rat	Oral	[88]
Adhesive	Insulin	Chitosan/dextran sulfate NPs	Rat intestine	Oral	[89]
Adhesive	Insulin	Alginate/chitosan	Rat	Oral	[90]
Adhesive	Fluorescein	Chitosan	Rabbit cornea	Ocular	[91]
Adhesive	Cyclosporin	Chitosan	Rabbit	Ocular	[92]
Adhesive	Insulin	Chitosan and carbopol-coated multivesicular liposomes	Rat	Ocular	[93]
Adhesive	Betaxolol hydrochloride	Chitosan	Rabbit	Ocular	[94]
Adhesive	Fluorescein isothiocyanate	Chitosan-dextran sulfate	Rabbit cornea	Ocular	[95]
Adhesive	Fluorescein isothiocyanate	Thiolated chitosan sodium alginate	Rat cornea	Ocular	[96]
Adhesive	Natamycin	Lecithin/chitosan NPs	Rabbit	Ocular	[97]
Adhesive	Pilocarpine nitrate and tropicamide	Poly(amidoamine) dendrimer	Rabbit	Ocular	[98]
Adhesive	Brimonidine and timolol maleate	Dendrimer G3.0 tethered with PEG	Bovine cornea	Ocular	[99]
Adhesive	Econazole	Sulfobutylether- <i>b</i> -cyclodextrin chitosan	Rabbit	Ocular	[100]
Adhesive	Brimonidine tartrate	Sodium alginate	Rabbit	Ocular	[101]
Adhesive	Dorzolamide hydrochloride and timolol maleate	Chitosan/hyaluronic acid	Rabbit	Ocular	[102]
Adhesive	Diclofenac	Chitosan-coated liposomes	Rabbit	Ocular	[103]
Adhesive	Gatifloxacin/prednisolone	Hyaluronic acid-coated Eudragit RS100 and RL100	Rabbit	Ocular	[104]
Adhesive	Plasmid DNA	Hyaluronic acid/chitosan	Rabbit cornea	Ocular	[105]
Adhesive	Fexofenadine	Chitosan-coated liposomes	Rat	Nasal	[106]
Adhesive	Plasmid DNA	PLGA: poloxamer and PLGA: poloxamine blend nanostructures	Rat	Nasal	[107]
Adhesive	Olanzapine	Poloxamer 188 or 407 nanocubic vesicles	Rat	Nasal	[108]
Adhesive	Coumarin-6	Wheat germ agglutinin modified PEG-PLA	Rat	Nasal	[109]
Adhesive	Coumarin-6	Solanun tuberosum lectin-conjugated PLGA	Rat	Nasal	[110]
Adhesive	Insulin	PEG-grafted chitosan	Rabbit	Nasal	[111]
Adhesive	Insulin	Chitosan	Rat	Nasal	[112]
Adhesive	Insulin	Amine-modified poly(vinyl alcohol)-graft-poly(L-lactide)	Rat	Nasal	[113]
Adhesive	Insulin	3-arylamidophenylboronic acid- <i>N</i> -acetylglucosamine-copolymer	Rat	Nasal	[114]
Adhesive	Leuprolide	Thiolated chitosan	Porcine nasal mucosa	Nasal	[115]
Adhesive	Vasointestinal active peptide	Wheat germ agglutinin modified PEG-PLA	Rat	Nasal	[116]
Adhesive	Vaccination	Chitosan phosphatidylcholine-cholesterol-stearyl-amine liposomes	Mouse	Nasal	[117]
Adhesive	Theophylline	Thiolated chitosan	OVA-challenged mice	Nasal	[118]
Adhesive	Low molecular weight heparin	Chitosan/hyaluronic acid	Rat mast cells	Bronchial	[71]
Penetrating	Coumarin-6	PLGA with PEG or avidin-coating	Mouse	Vaginal	[72]
Penetrating	Tenofovir	Chitosan	Porcine vaginal mucosa	Vaginal	[73]
Penetrating	DNA	Poly(d,l-lactic-co-glycolic) acid (PLGA) + dimethyldioctadecylammonium bromide	Porcine intestinal mucus	Oral	[43]
Penetrating	None	PEGylated solid lipid	Caco-2/HT29, rat intestine	Oral	[44]
Penetrating	Coumarin 6	PF127-inlaid liposomes	Caco-2 monolayer	Oral	[45]
Lytic	Fluorescein isothiocyanate dextran	Polyelectrolyte complex of spermidine with polyacrylic acid	Caco-2 monolayer, rat intestine	Oral	[76]

Mnogi su istraživači pokušali povećati mukoadheziju čestica s namjerom da povećaju njihovo odlaganje na površini sluzi. Kako bi se povećao kontakt sa sluzi, razvijaju se različiti sustavi dostave lijeka koji pritom obuhvaćaju različite sile između sluzi i nanočestica, uključujući vodikove veze, van der Waalsove sile, interpenetraciju polimernih lanaca, hidrofobne sile i elektrostatska/ionska međudjelovanja.

Elektrostatsko međudjelovanje jedno je od najkorištenijih oblika mukoadhezije, dokazanom na kitozanu, kationskom polimeru dobivenom deacetilacijom hitina za primjenu na usta ili u nos. Čestice sintetizirane iz uobičajenih materijala poput poli(etilenglikola), polikarbofila ili karbopola (derivata poli(akrilne kiseline)), polimetakrilata i poli(sebične kiseline) mogu postići mukoadheziju stvaranjem vodikovih veza, interpenetracijom s mucinima, hidrofobnih međudjelovanja ili kombinacije navedenoga. Vežanje navedenih biomaterijala sa sluzi obično se smatra nespecifičnim zbog nedostatka bioloških molekula koje omogućavaju prepoznavanje i vežanje specifičnih meta na sluz ili površinu sluzavog epitela. Alternativno, mukoadheziju je moguće postići i putem liganada koji prepoznaju pojedine mucinske glikoproteine. Primjerice, lecitini rajčice, koji specifično prepoznaju i vežu se na komplekse koji sadrže N-acetil glukozamin na staničnoj površini, prvi su testirani u specifičnim međudjelovanjima s probavnim tkivima (Woodley, 2001). Ipak, uočen je vrlo mali napredak u probavnom vremenu prijenosa lecitina rajčice u usporedbi s drugim mukoadhezivnim sustavima, što se opravdava činjenicom da postoji snažna povezanost lecitina na gel sluzi umjesto na epitel (Montisci i sur., 2001).

Iako je mukoadhezija obećavajući pristup kojim bi se osigurao porast bioraspoloživosti dostave lijeka putem mukoznih tkiva, uočena su različita ograničenja. Budući da su mukoadhezivni sustavi vezani za sloj sluzi preko međudjelovanja s mucinskim vlaknima, vrijeme zadržavanja ovih sustava određeno je fiziološkom obnovom sloja sluzi. Za oralnu dostavu, uzimajući u obzir da je vrijeme fiziološke obnove probavnih mucina između 50 i 270 minuta, od mukoadhezivnih čestica se ne očekuje da budu vezane na sluz dulje od 4 do 5 sati. Nadalje, kako se mukoadhezivni sustavi u velikoj mjeri vežu na sluz, nesposobni su prodrijeti kroz sloj sluzi i ući u epitel. Stoga su mukoadhezivni sustavi posebno neprikladni za dostavu lijeka ili gena koji zahtijevaju unutarstaničnu isporuku. Kako bi se nadvladali navedeni problemi, pokušalo se na različite načine razviti čestice koje će specifično prijanjati na probavne stanice, kao što je dokazano konjugacijom lecitina rajčice s nanočesticama. Ipak, takve ligand-vezane čestice imaju ograničenu sposobnost difundirati kroz sloj sluzi i, umjesto toga, podliježu preranoj adsorpciji na sluz (Montisci i sur. 2001). Stoga, takvi sustavi neučinkovito dopiru do površine enterocita, te se, umjesto da se vežu na sluz, prenose kroz probavni trakt i eliminiraju fecesom. S ciljem rješavanja takvog problema i postizanja duljeg vremena zadržavanja čestica na mukoznoj površini, glavni zahtjev jest razvoj čestica koje će učinkovito prodirati kroz mukoznu barijeru (slika 6).





**Slika 6.** Sažeti shematski prikaz sudbine mukopenetrativnih (MPP) i konvencionalnih mukoadhezivnih čestica (CP) primijenjenih na mukoznu površinu.

### 1.2.2. Tehnologije izrade mukopenetrativnih nanočestica

Unatoč širokoj uporabi, mukoadhezivni sustavi imaju svoja ograničenja. Fiziološka obnova mucina, fiziološki uvjeti i iritativni učinak mogu dovesti do neučinkovite dostave. Mukoadhezija uzrokuje značajan poremećaj mukozne barijere (Wang i sur., 2011; Mc Gill i Smyth, 2010). Važnost razaranja mukozne barijere koja dopušta invaziju patogena, do sada nije dovoljno razjašnjena. Zbog mogućih problema s poremećajem barijere, rijetko se koriste mukolitičke čestice. Velike kationske nanočestice pri visokim koncentracijama mogu stvoriti velike kanale pomoću snažnih elektrostatskih međudjelovanja. Lokalni poremećaj mukozne barijere uzrokuju nanočestice < 200 nm s poli(akrilnom kiselinom) i mukolitičkim enzimom papainom. U novije vrijeme, razvijena je nova strategija u kojoj je integritet sluzi u potpunosti očuvan, a nanočestice, zahvaljujući gustom PEGiliranju, prolaze sloj sluzi. PGLA nanočestice obložene s konjugatima vitamina E i PEG-a prolaze ljudsku sluznicu i sposobni su kontrolirano otpuštati paklitaksel u trajanju preko 5 dana. Takav se pristup pokazao

učinkovitim kod dostave PGLA- nanonosača ispunjenih aciklovirom u mišju vaginu. Mukopenetrativne čestice također su učinkovitije od otopina za dostavu gena (Yu i sur., 2012). Na temelju dugog iskustva s mukoadhezivnim sustavima i podataka o mukoadhezivnim nanočesticama razumno je zaključiti da takva strategija poboljšava dostavu lijeka kroz/u epitel prekriven sluzi. S druge strane, razlike u strukturi sluznice i metaboličkoj izmjeni na anatomske različitim položajima u ljudskom tijelu ukazuju da različiti tipovi nanočestica mogu biti prikladni sustavi za dostavu lijeka. Dok mukoadhezivne nanočestice mogu biti prikladne za područja s nižom metaboličkom izmjenom sluzi, kao u probavnom sustavu, mukopenetrativne nanočestice prikladnije su za sluznice s višom metaboličkom izmjenom, poput cerviksa. Patološka stanja popraćena hipersekrecijom sluzi mogu biti indikacija za mukolitičke nanočestice. U zdravom stanju takve nanočestice, ipak, nisu toliko prikladne jer mogu uzrokovati neočekivani slom mukozne barijere te tako pogodovati invaziji patogena.

Trenutno, čini se da se mukopenetrativne čestice kao formulacijska strategija razvijaju znatno brže nego mukoadhezivne čestice. Idealna kombinacija mukoadhezivnih i mukopenetrativnih svojstava omogućila bi visoku lokalnu koncentraciju u lumenu tankoga crijeva i posljedično visoki koncentracijski gradijent za pasivnu difuziju kroz sluz.

Inspirirana studijom koja pokazuje da je difuzija virusa u vodi usporediva s onom u cervikovaginalnoj sluzi, grupa znanstvenika predvođena Justinom Hanesom započela je rad na mukopenetrativnim nanočesticama. Površine mnogih virusa gusto su prekrivene pozitivnim i negativnim nabojima, dok je ukupan naboj neutralan, što zajedno s manjkom hidrofobnih regija vjerojatno smanjuje međudjelovanje sa sluzi (Olmsted i sur., 2001). Kao strategija za postizanje takvih mukopenetrativnih površinskih svojstava koristi se PEGiliranje čestica, budući da je polietilenglikol hidrofilan, nenabijen i biokompatibilan polimer. Dokazalo se da mukozna penetracija PEGiliranih čestica ovisi o stupnju oblaganja površine i duljini PEG polimera. PEGiliranje do razine od 40% s 2 000 PEG nije poboljšalo difuziju čestica u ljudskoj cervikovaginalnoj sluzi u usporedbi s kontrolnim česticama, dok čestice obložene sa 65% PEG-a difundiraju gotovo 700 puta bolje nego manje obložene čestice (Wang i sur., 2008). Nadalje, pokazano je da PEGiliranje s PEG 2000 i 5000 rezultira bržom difuzijom u ljudskoj cervikovaginalnoj sluzi u usporedbi s neobloženim česticama, dok PEG 10 000 rezultira mukoadhezijom budući da dugi PEG lanac vjerojatno stupa u interakciju sa sluzi preko vodikovih veza. Osim toga, dokazano je da oblaganje PEG-om dovodi do

poboljšane difuzije čestica u mukoznim sekretima izoliranim iz drugih fizioloških područja. Primjerice, nađeno je da PEGiliranje polistirenskih čestica promjera 100 i 200 nm dovodi do 15-35 puta većeg porasta u brzini difuzije u ljudskim dišnim putevima (Schuster i sur., 2013). U sputumu kod cistične fibroze, brzina difuzije 200 nanometarskih PEGiliranih čestica bila je pet puta sporija u usporedbi s difuzijom u vodi, dok su nemođificirane čestice u sluzi difundirale 24 puta sporije. Obećavajuća *in vivo* istraživanja također su objavila da oralna primjena tri tipa PEGiliranih nanočestica kod štakora vodi do porasta plazmatskih koncentracija primijenjenog lijeka (Zabaleta i sur., 2012). Korištenjem PEG-a 2000, 5000 i 10000 pokazalo se da porast plazmatske koncentracije obloženog paklitaksela obrnuto proporcionalne molekulskoj masi polietilenglikola.

#### *Uloga površinskog kemizma*

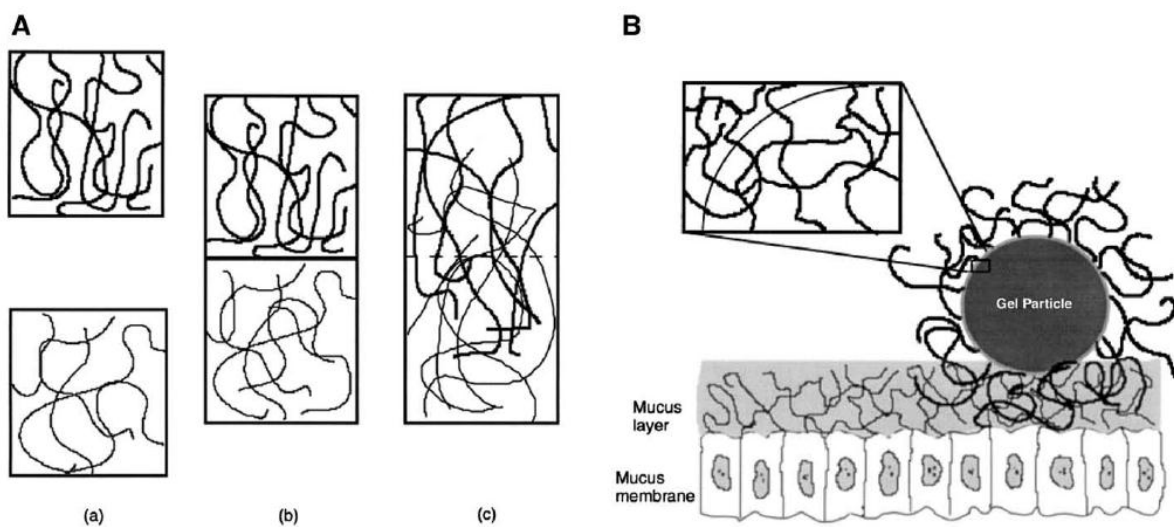
Polistirenske nanočestice veličine 59 nm, kovalentno modificirane karboksilnim skupinama na površini potpuno su imobilizirane u ljudskoj cervikalnoj sluzi (Olmsted i sur., 2001). Međutim, uočeno je da su neke čestice, čija je površina modificirana ili s karboksilnim ili s amino skupinama, bile pokretne u sputumu oboljelih od cistične fibroze, ali je dalje skupni prosjek brzine prijenosa ostao sporiji za barem 300 puta u usporedbi s istim česticama u vodi (Dawson i sur., 2003). Također, uočen je i spori prijenos nanočestica kojima je površina bila modificirana karboksilnim, sulfatnim ili amidnim skupinama, iako je najbrži prijenos između te tri skupine zabilježen s najhidrofilnijom (amidnom) površinom (Norris i sur., 1997). S druge strane, proučavanjem *in vivo* ponašanja nanočestica s površinom načinjenom od lanaca poli(N-izopropil akrilamida), poli(N-vinil acetamida), poli(vinil amina) ili poli(metakrilne kiseline), uočen je porast mukoadhezije kod svih lanaca izuzev poli(N- vinil acetamida) (Sakuma i sur., 2002). Porast mukoadhezije s različitim hidrofilnim lancima pripisuje se prisustvu tercijarnih amina koji su sposobni reagirati s anionskim komponentama sluzi. Iz toga proizlazi da ne postoji jasan međuodnos između kemizma površine sintetičkih nanočestica i njihove brzine prijenosa u sluzi.

#### *Oblaganje čestica s poli(etilen glikolom) niske molekulske mase*

Vjerodostojno oponašanje mukoinertnih virusa podrazumijevalo bi razvoj sintetičkih čestica sa slično visokom gustoćom i kationskih i anionskih površinskih nabijenih skupina. Unatoč napretku tehnologije, modifikacija površine sintetičkih čestica u tom smislu je i dalje izuzetno zahtjevna. Štoviše, čak i da je takav postupak ostvariv, gusto nabijene sintetičke čestice mogle

bi proizvesti imunogeničnost nalik onoj kod virusa. Kako bi se nadvladao složeni kemizam i imunologija, izdvojene su značajke visoko nabijenih neto neutralnih površina virusa kako bi objedinile visoku hidrofilitnost i neutralni naboj. Umjesto visoke gustoće nabijenih skupina, pretpostavljeno je da nenabijena površina može biti jednako mukoinertna kao i virusne kapside tako osiguravajući površini dovoljno hidrofilitnosti i nisko vezanje vodikovim vezama. Stoga je načinjen probir kroz GRASS (generally regarded as safe) polimere koji bi zadovoljili dvojne zahtjeve: (i) snažna hidrofilitnost i (ii) neutralan naboj.

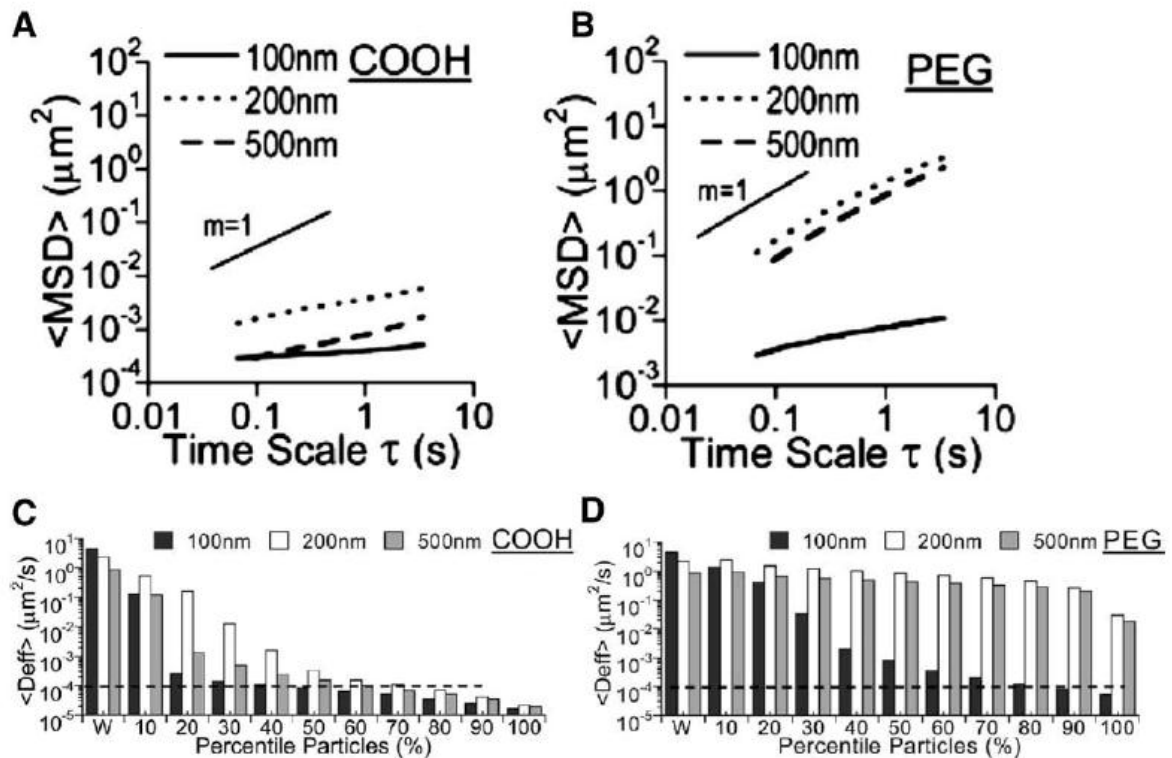
Poli(etilen glikol) (PEG) nenabijeni je hidrofilitni polimer rutinski korišten u farmaceutici kako bi poboljšao sistemsku cirkulaciju i smanjio opsonizaciju (Allen i sur., 2004; Harris i Chess, 2003). Ipak, a priori nije bilo odmah uočljivo da PEG može smanjiti vezu između čestica i sluzi, pa je stoga PEG široko upotrebljavan kao mukoadhezivni posrednik. Brojne su studije desetljećima ukazivale na to da PEG poboljšava mukoadhezivna svojstva nanočestica, unatoč tome što je gustoća oblaganja s PEG-om nedovoljno istražena. U svjetlu prethodnih otkrića, pretpostavlja se da oblaganje čestica s PEG-om visoke gustoće može smanjiti adhezivna međudjelovanja čestice-sluz na način da je: (i) molekulska masa PEG-a dovoljno niska da podrži adheziju putem unutarnjeg prodiranja polimera (slika 7) i (ii) gustoća PEG-a dovoljna da učinkovito prekrije hidrofobnu srž slično brojnim biorazgradivim polimerima.



**Slika 7.** Shematski prikaz (A) interdifuzije polimera uslijed kontakta i (B) interpenetracija između lanaca vezanih na površinu čestice i mucinskih vlakana mukoznog gel sloja.

Suprotno izvještajima da je PEG mukoadhezivan, gusto oblaganje PEG-om, poboljšava prijenos nanočestica za do 3 reda veličine za čestice u rasponu 100-500 nm (grafički prikaz

1).



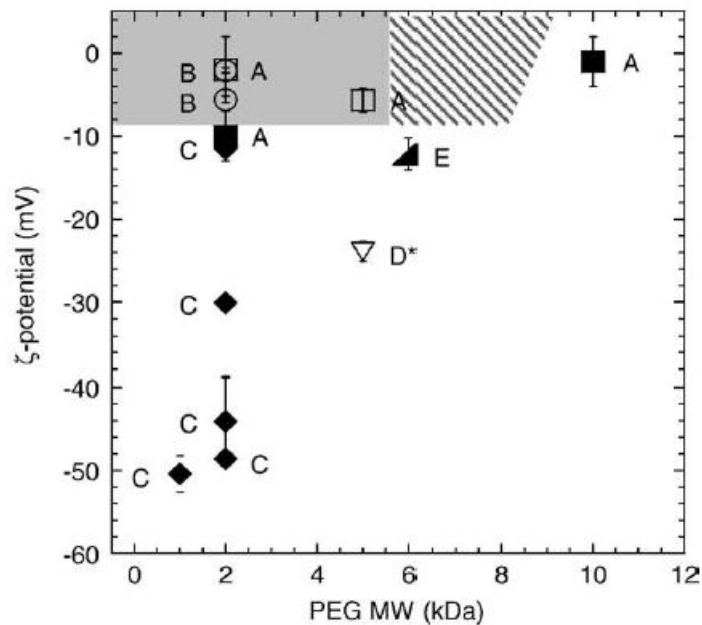
**Grafički prikaz 1.** Prijenos COOH- i PEG- modificiranih polistirenskih čestica u svjezoj ljudskoj cervikovaginalnoj sluzi (CVM). Ukupna prosječna geometrijska standardna devijacija (MSD) kao funkcija vremena za (A) COOH- i (B) PEG- modificirane polistirenske čestice u ljudskoj cervikovaginalnoj sluzi.

Velike nanočestice (promjera 200 i 500 nm) gusto obložene PEG-om difundiraju kroz sluz s efektivnim koeficijentom difuzije ( $D_{\text{eff}}$ ) samo 6 i 4 puta sporije nego iste čestice u vodi. Veliki napredak u brzini prijenosa nanočestica uslijed PEGiliranja korelira s ostrim padom u frakciji nepokretnih čestica za sve testirane veličine; sluz je imobilizirala manje od 0.5% PEGiliranih čestica dimenzija 200 i 500 nm u usporedbi s 32 i 45% neobloženih čestica istih dimenzija.

Unatoč značajnom napretku u prijenosu nanočestica uslijed njihove modifikacije PEG-om, značajna frakcija PEG-modificiranih čestica dimenzije 100 nm i dalje je nepokretna ili snažno zadržana u sluzi (Lai i sur., 2007). Neodgovarajuće PEGiliranje može biti moguće objašnjenje tog fenomena.

Kako bi se bolje shvatilo kako gustoća površinskog oblaganja PEG-om utječe na prijenos čestica te kako bi se razriješio paradoks između prethodno opisanih mukoadhezivnih

svojtava PEG-a i njegovih novijih mukopenetrativnih svojstava , ispitan je učinak gustoće oblaganja i molekulske mase PEG-a na prijenos PEGiliranih čestica u sluzi ( Wang i sur. , 2008). Uočeno je 40% manje površinsko prekrivanje s PEG-om 2000, u usporedbi s odgovarajuće obloženim česticama PEG-om iste gustoće, dovodi do smanjenja u brzini prijenosa za 700 puta. Čestice odgovarajuće prekrivene s PEG-om 5000 difundiraju jednako brzo kao i one obložene PEG-om 2000, ali daljnji porast molekulske mase PEG-a do 10 000 dovodi do sporijeg prijenosa za 1000 puta. Ti rezultati ukazuju na to da su i gustoća površinskog oblaganja i niska molekulska masa PEG-a jednako važni za brže prodiranje PEGiliranih čestica kroz sluz. Usporedbom brojnih studija o međudjelovanju PEGiliranih čestica sa sluzi, predviđen je raspon molekulske mase PEG-a, kao i površinski naboj čestica koji vjerojatno omogućava mukoinertno oblaganje (grafički prikaz 2).



**Grafički prikaz 2.** Fazni dijagram međuodnosa između ponašanja između mukoinertnih i mukoadhezivnih čestica s obzirom na površinski naboj i molekulsku masu PEG-a različitih PEGiliranih čestica (~200-500 nm veličine). Nemukoadhezivne PEGilirane nanočestice u usporedbi s kontrolom (neobloženi česticama) prikazane su praznim simbolima, dok su mukoadhezivne u usporedbi s kontrolom prikazane ispunjenim simbolima. Zasjenjeno područje predstavlja potvrđeni raspon molekulske mase PEG-a i zeta potencijala nanočestica, dok iscrtkano područje predstavlja dodatni predviđeni raspon koji omogućava mukoinertno oblaganje.

Uz poboljšani prijenos, PEGiliranje može povećati stabilnost čestica u sluzi. Ona je posebno bitna kada čestice trebaju difundirati kroz debeli sloj sluzi kako bi doprle do temeljnih stanica.

### *Implikacije na velike mukopenetrativne čestice*

Iznenadujuća je činjenica da je moguće načiniti čestice veličine 200 i 500 nm koje brzo prelaze svježu ljudsku cervikovaginalnu sluz. To izravno upućuje da prosječna veličina pora u ljudskim cervikovaginalnim sekretima mora biti znatno veća no što se to prije pretpostavljalo i mora uključivati veliki broj pora s učinkovitim proredom značajno većim od 500 nm. Vrlo je malo vjerojatno da se brzi transport PEGiliranih čestica zbiva zbog promjena strukture sluzi jer je njihovo međudjelovanje sa sluzi od maloga značaja. Umjesto toga, čestice se vjerojatno kreću u kanalima niske viskoznosti ili porama unutar sluzi (Dawson i sur., 2003). Nadalje, budući da su prethodno navedene činjenice ispitane na svježoj, nerazrijeđenoj cervikovaginalnoj sluzi koja je reološki i rasporedom usporediva sa sluzi u dišnim putevima i probavnom traktu (Lai i sur., 2007), moguće je da velike PEGilirane nanočestice brzo prolaze i u drugim mjestima ulaska u tijelo, a koja su prekrivena sa sluzi. Male promjene u hidraciji sluzi mogu neznajčajno promijeniti brzine difuzije nanočestica u odnosu na one u svježoj cervikovaginalnoj sluzi budući da prostor između vlakana ne mora snažno ovisiti o hidraciji. Brz mukozni prijenos velikih (200 i 500 nm) PEGiliranih čestica bitan je za razvoj terapijskih i dijagnostičkih primjena *in vivo*. Veće nanočestice dopuštaju znatno veće uklapanje lijeka, kao i manju agregaciju uslijed sušenja smrzanjem. Uz to, kako veličina čestica napunjenih lijekom raste, kinetika oslobađanja lijeka također se poboljšava, osiguravajući ravnomjerno otpuštanje lijeka danima pa čak i mjesecima zajedno s povećanom učinkovitošću lijeka (Kim i sur. 2006). S druge strane, manje čestice podliježu naglom oslobađanju uglavnom unutar par sati nakon *in vitro* i *in vivo* primjene (Olmsted i sur., 2001). Ova bi otkrića mogla snažno potaknuti komercijalni razvoj novih sustava dostave lijeka utemeljenog na nanočesticama za primjenu na mukozne površine.

Iako se velike nanočestice radije koriste za poboljšavanje unosa lijeka i postizanje produljenog oslobađanja, ipak postoji optimalna veličina nanočestica za primjenu na sluznice. Prevelike nanočestice, unatoč dobrom oblaganju kako bi izbjegle mukoadheziju, ne moraju difundirati dovoljnom brzinom da nadvladaju mukocilijarni klirens zbog povišenih sila trenja opisanih Stokes-Einsteinovom jednadžbom. Budući da se debljina mukoznog sloja i vrijeme mukoznog klirensa razlikuju u mukoznim tkivima, zahtijevaju se različite brzine difuzije nanočestica s namjerom da se nadvladaju različite mukozne barijere. Nadalje, očekuje se da

porast u promjeru nanočestica smanji brzinu endocitoze za stanični unos u temeljnom epitelu (Lai i sur., 2007; Rejman i sur., 2004). Veličina mukopenetrativnih nanočestica, stoga, mora biti optimirana uzimajući u obzir sve navedene parametre te će vjerojatno varirati na temelju zahtjeva različitih mukoznih tkiva.

Smatra se da će mogućnost uporabe polimernih nanočestica za kontroliranu dostavu lijeka ili gena satima ili danima na sluznice dovesti do novih učinkovitih lijekova. Trenutno, ipak, takav proizvod ne postoji iz razloga što konvencionalne ljekovite čestice ne mogu prodrijeti kroz ljudsku mukoznu barijeru koja brz odstranjuje uhvaćene patogene i čestice. Razvoj mukopenetrativnih čestica (MPP) s nemukoadhezivnom površinom koristeći lekcije naučene na primjerima virusa, predstavlja moćnu strategiju za prevladavanje mukozne barijere. Snažnom poticaju za komercijalni razvoj novih sustava dostave lijeka utemeljenima na nanočesticama za primjenu na različita mukozna tkiva posebice pridonosi učinkovit transport velikih MPP budući da se kinetika dostave i učinkovitost punjenja neizmjenno poboljšava kako raste promjer čestica. Na temelju toga, MPP nude perspektivu za kontinuiranu dostavu različitih potencijalno važnih lijekova u liječenju bolesti mukoznoga tkiva.



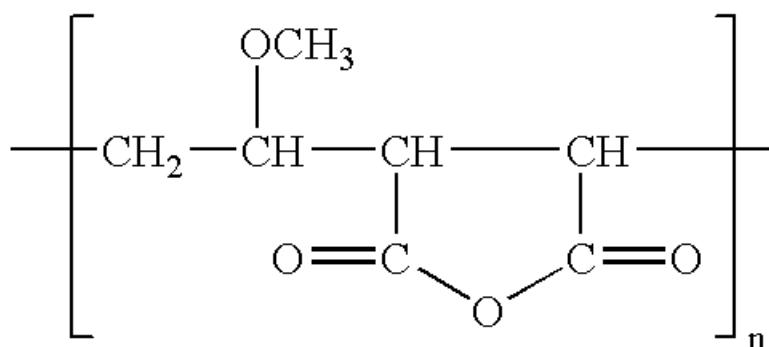
### 1.3.GANTREZ

Gantrez polimeri skupina su sintetičkih kopolimera metil vinil etera (MVE) i anhidrida jabučne kiseline (MA) koje odlikuje netoksičnost, biokompatibilnost te izvrsna bioadhezivnost u vlažnom okolišu. Topljivi su u organskim otapalima poput alkohola, aldehida, ketona, laktama i niskoalifatskih estera, a netopljivi su u alifatskim, aromatskim i halogeniranim otopinama. Dolaze u širokome rasponu molekulskih masa, što je vidljivo u tablici 5. Unatoč činjenici da se njihova primjena najviše očituje u proizvodima za oralnu njegu, anhidridni prašci polimera nisu direktno pogodni za takve proizvode, nego se koriste kao osnovni polimeri za izradu polimernih soli.

**Tablica 5.** *Stupnjevi Gantrez polimera s pripadajućim aproksimativnim molekulskim masama i specifičnom viskoznošću.*

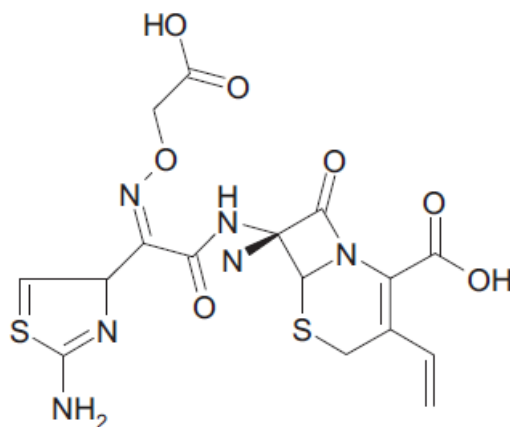
Grades	Approximate Molecular Weight <sup>1</sup>	Specific Viscosity <sup>2</sup>
AN-119	130,000	0.1-0.5
AN-139	690,000	1.0-1.5
AN-149	1,250,000	1.5-2.5
<b>AN-169</b>	2,000,000	2.6-3.5

Gantrez™ AN-169 u vodi je netopljivi bijeli prašak koji se lako dispergira u vodenome mediju u kojemu postranični anhidridni lanci hidroliziraju kako bi stvorili transparentnu otopinu dikiseline. Gantrez polimeri u obliku dikiselina dostupni su kao Gantrez S polimeri i imaju široku primjenu u proizvodima za njegu usne šupljine. Primarno se koriste kako bi osigurali produženo zadržavanje različitih antimikrobnih tvari i aroma iz zubnih pasta te za fiksiranje zubnih proteza ([www.ashland.com](http://www.ashland.com)).



**Slika 8.** *Struktura Gantrez™ AN-169 polimera.*

#### 1.4. CEFIKSIM



**Slika 9.** *Struktura cefiksima.*

Kemijsko ime cefiksima je (Z)-7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(karboksimetoksiimino)acetamido]-3-vinil-3-cefem-4-karboksilna kiselina trihidrat.

Prema Europskoj farmakopeji cefiksim je bijeli ili skoro bijeli, blago higroskopni prah koji je neznatno topljiv u vodi, teško topljiv u dehidriranom alkoholu, gotovo netopljiv u etil acetatu i slobodno topljiv u metilnom alkoholu. pH vrijednost 5%-tne suspenzije u vodi iznosi 2,6-4,1. Cefiksim se čuva u hermetičkim spremnicima zaštićen od svjetla.

Svrstava se u treću generaciju cefalosporina, polusintetskih antibiotika nastalih iz cefalosporina C, prirodnog antibiotika kojeg stvara plijesan *Cephalosporium acremonium*. Aktivna jezgra cefalosporina, 7-aminocefalosporanska kiselina vrlo je nalik na penicilinsku jezgru, 6-aminopenicilansku kiselinu, a koja se sastoji od beta- laktamskog prstena spojenog

sa šesteročlanim dihidrotiazinskim prstenom i ima acetoksimetilnu skupinu na položaju 3. Intrizična antimikrobna aktivnost cefalosporina je mala, ali se dodavanjem različitih R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> grupa dobivaju stotine potentnih spojeva niske toksičnosti. Supstitucija amino grupe na položaju 7 prvenstveno je odgovorna za antibakterijsko djelovanje dok supstitucija na položaju 3 više utječe na farmakokinetička svojstva. Indiciran je za oralno liječenje osjetljivih infekcija uključujući gonoreju, upalu srednjeg uha, faringitis, infekcije donjeg dijela dišnog sustava poput bronhitisa i infekcija urinarnog trakta. Njegov mehanizam djelovanja temelji se na inhibiciji sinteze staničnoga zida bakterija.

Cefiksim ima baktericidno djelovanje svojstveno svim cefalosporinima te je stabilan na hidrolizu uzrokovanu brojnim beta- laktamazama. Mehanizam i spektar djelovanja nalik su cefalosporinu treće generacije –cefotaksimu, no neke su Enterobacteriaceae manje osjetljive na cefiksim. *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* i *Neisseria gonorrhoeae* osjetljive su na cefiksim, kao i streptokoki, ali najviše tipova stafilokoka, enterokoka i *Listeria spp.* nisu. *Enterobacter spp.*, *P. aeruginosae* i *Bacterioides spp.* rezistentni su na cefiksim.

Svega 40-50% oralne doze cefiksima apsorbira se iz probavnog trakta, bez obzira je li primijenjen prije ili nakon obroka, iako se brzina apsorpcije može smanjiti u prisustvu hrane. Cefiksim se bolje apsorbira iz oralne suspenzije nego iz tableta. Sama apsorpcija vrlo je spora; vršna plazmatska koncentracija od 2-3 µg/ml i 3,7-4,6 µg/ml zabilježena je između 2 i 6 sati nakon pojedinačne doze od 200 i 400 mg. Plazmatsko vrijeme poluživota obično iznosi 3-4 sata, dok kod bubreznog oštećenja može biti produljeno. Na proteine plazme veže se oko 65% lijeka. Informacije o raspodjeli cefiksima u tkivima i tjelesnim tekućinama su ograničene. Zna se da prolazi placentarnu barijeru. Relativno visoke koncentracije mogu se postići u žuči i urinu. Oko 20% oralne doze (ili 50% apsorbirane oralne doze) izlučuje se nepromijenjeno putem urina unutar 24 sata, dok se više od 60% eliminira nerenalnim mehanizmima. Ne postoje podaci o metabolizmu cefiksima, ali jedan dio izlučuje se fecesom preko žuči.

Cefiksim je dostupan kao trihidrat, a izražene doze odnose se na cefiksim u anhidridnom obliku; 1,12 grama cefiksim trihidrata ekvivalentno je oko 1 grama anhidridnog cefiksima. Pojedinačna dnevna doza za odrasle iznosi 200 do 400 mg. Djeci iznad 6 mjeseci i mase manje od 50 kilograma može se dati 8 mg/kg cefiksima u obliku oralne suspenzije, kao pojedinačna doza ili dvije podijeljene doze. Doza cefiksima reducira se kod pacijenata s umjerenim do teškim oštećenjem bubrega. Kod pacijenata s klirensom kreatinina manjim od 20 ml/min ne smije se prekoračiti doza od 200 mg.

Najčešće neželjene reakcije cefiksima javljaju se u probavnom sustavu, a to se posebice odnosi na diareju. Ukoliko postane ozbiljna, preporuča se prestanak primjene cefiksima. Iako cefiksim ne posjeduje N-metiltiotetrazolski bočni lanac za kojega se smatra da dovodi do hipoprotrombinemije, postoje izvještaji da ipak povišuje protrombinsko vrijeme. Stoga, se posebna pozornost treba obratiti na pacijente koji istovremeno primjenjuju atikoagulansnu terapiju i cefiksim.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nanočestice nude jedinstvene terapijske prednosti u odnosu na svoje tradicionalne pandane jer pokazuju jedinstvena svojstva:

- zaštita uklopljene djelatne tvari od *in vivo* razgradnje
- sposobnost prolaska kroz određene biološke barijere i membrane
- mogućnost kontroliranja brzine oslobađanja lijeka
- prilagodba brzine oslobađanja lijeka terapijskim potrebama
- pasivna ciljana dostava lijeka u tumorska tkiva

Sve navedene prednosti čine nanočestice obećavajućom platformom za razvoj novih formulacija. Trenutno, komercijalno dostupni farmaceutski oblici s nanočesticama uključuju nanokristale, emulzije i liposome, no tehnologija njihove izrade izrazito je kompleksa i tehnolozima predstavlja veliki izazov.

Glavni nedostatak konvencionalnih nanočestica jest zadržavanje u sloju sluzi pri čemu se smanjuje njihova učinkovitost, stoga je nužna modifikacija površine uporabom PEG-ova niskih molekulskih masa koja predstavlja moćnu strategiju u povećanju permeabilnosti nanočestica i prevladavanju mukozne barijere. Snažnom poticaju za razvoj novih formulacija s nanočesticama posebice pridonosi učinkovit transport velikih mukopenetrativnih nanočestica (200 i 500 nm), budući da se kontrola brzine oslobađanja lijeka i učinkovitost punjenja izrazito poboljšavaju kako raste promjer čestica.

Na temelju toga, mukopenetrativne nanočestice nude perspektivu za kontinuiranu dostavu različitih potencijalno važnih lijekova u liječenju bolesti mukoznog tkiva. Cilj ovog diplomskog rada uključuje uklapanje cefiksima, antibiotika širokog spektra, u mukopenetrativne nanočestice bazirane na kopolimeru metil viniletera i anhidrida jabučne kiseline (Gantrez AN-169) koje su obložene PEG-ovima različitih molekulskih masa. Pri tome će se pratiti kako korištena vrsta PEG utječe na uklapanje lijeka i svojstva površine nanočestica. Nanočestice u čvrstom obliku pripremit će se postupkom liofilizacije te će se ispitati utjecaj korištenih krio-/lioprotektanata na svojstva oblikovanih nanočestica.

### 3. MATERIJALI I METODE

Pri izvođenju pokusa upotrijebljene su sljedeće kemikalije, instrumenti i pribor:

#### 3.1. KEMIKALIJE

- Aceton (Sigma)
- Acetonitril (Chromasolv®, Sigma)
- Cefiksim trihidrat (Berlin-Chemie Menarini d.o.o.)
- GANTREZ AN-169 polimer (Ashland Industries Europe GMBH)
- Glukoza monohidrat (Kemig d.o.o.)
- Kalijev dihidrogenfosfat (Sigma)
- Laktoza monohidrat (Kemig d.o.o.)
- NaCl, otopina, 10 mM
- Visokopročišćena voda

#### 3.2. INSTRUMENTI I PRIBOR

- HPLC instrument (Shimadzu LC-10AD, Kyoto, Japan)
- HPLC kolona capcell pack C-18, dimenzija 250x 4.6 mm, veličina zrnaca 5µm (Kinetex, Phenomenex, SAD)
- Precizna analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska)
- Vortex mješalica (Fisher Scientific, SAD)
- Zetasizer (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija)
- Rotavapor (Büchi, Njemačka)
- Biofuge centrifuga (Heraus, Njemačka)
- filteri veličine pora 0,22µm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Njemačka)

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Razvoj i validacija analitičke metode za određivanje sadržaja cefiksima

##### 3.3.1.1. Izrada matične otopine

Matična otopina pripravljena je otapanjem 5,55 mg cefiksima u 50 ml mobilne faze (ACN: 0,05 M  $K_2HPO_4$ , 60:40). Daljnjim razrjeđivanjem s mobilnom fazom načinjen je niz otopina u rasponu koncentracija od 5,55  $\mu$ m do 111, 00  $\mu$ m.

##### 3.3.1.2. Kromatografski uvjeti

Određivanje sadržaja cefiksima provedeno je modifikacijom postupka opisanom od strane Prabhudneva i sur., 2013. tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti koja je prethodno prošla kroz proces validacije. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl. high performance liquid chromatography*, HPLC) je analitička tehnika u kojoj tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu ispunjenu česticama stacionarne faze (veličine 3-10  $\mu$ m) noseći sastavnice uzorka za analizu. U analizi je korištena capcell pack C-18 kolona obrnutih faza, dimenzija 250 x 4.6 mm i veličina zrnaca 5  $\mu$ m s pretkolonom. Mobilna faza sastojala se od smjese acetonitril: 0,05 M kalijev dihidrogenfosfat (60:40 V/V). Takvim odabirom mobilne faze postignut je pH od 4,5, što je rezultiralo pikovima zadovoljavajuće oštine. Prije samoga određivanja sadržaja cefiksima provelo se degasiranje mobilne faze ultrasonikacijom u trajanju od 20 minuta kako bi se izbjegle smetnje izazvane otopljenim plinovima. Brzina protoka mobilne faze iznosila je 1 ml/min. Vrijeme trajanja analize iznosilo je 10 minuta. Volumen injektiranja iznosio je 5  $\mu$ L. Temperatura kolone iznosila je 40°C. Detekcija se provodila primjenom DAD detektora pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije cefiksima od 289 nm. Dnevna i međudnevna preciznost određena je uzastopnim injiciranjem odabranih otopina uzoraka prethodno filtriranih kroz filtre veličine pora 0,22  $\mu$ m. Prethodna ispitivanja potvrdila su kemijsku stabilnost lijeka u mobilnoj fazi.

##### 3.3.2. Priprava nanočestica

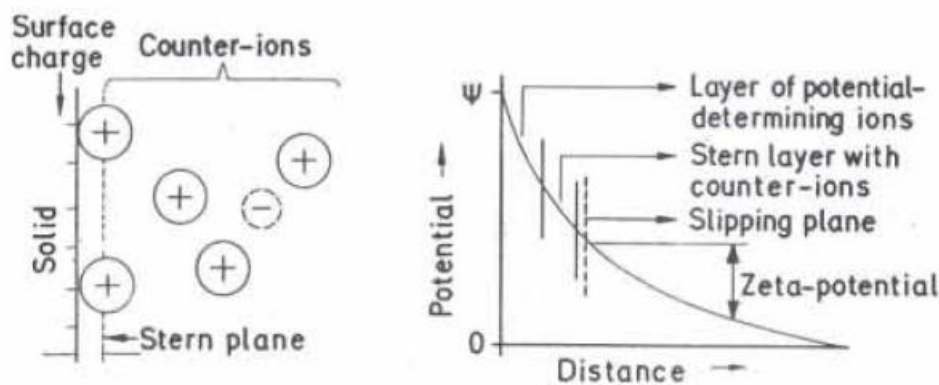
PEGilirane nanočestice priređene su postupkom jednostavne desolvacije prema modificiranom postupku opisanom ranije (Inchaurraga i sur., 2015). 200 mg kopolimera je otopljeno u acetonu. Nakon potpunog otapanja polimera, dodano je 30 mg PEG različite molekulske mase otopljenog u 2

mL acetona te je smjesa inkubirana 1 sat uz miješanje magnetskim mješačem pri 600 okretaja u minuti kako bi se postiglo vezanje PEG lanaca na polianhidridni polimer. Nakon toga dodano je 20 mg cefiksima otopljenog u 4 mL acetona. Nakon homogenizacije u trajanju od 1 minute proveden je postupak desolvacije dodatkom 30 mL pročišćene vode. Organsko otapalo uklonjeno je uparavanjem pri sniženom tlaku, a nanočestice su pročišćene postupkom ultracentrifugiranja pri 20 000 g u trajanju od 20 minuta. Supernatant je sakupljen te je u njemu HPLC analizom određen sadržaj lijeka, a talog je resuspendiran i osušen smrzavanjem uz glukozu monohidrat ili laktozu monohidrat kao krioprotektante. U oba slučaja, masena koncentracija krioprotektanta je iznosila 5 %.

### 3.3.3. Određivanje veličine nanočestica

Srednji promjer i indeks polidisperznosti nanočestica određeni su fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*; PCS; Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, UK), poznatom i pod nazivom dinamičko raspršenje svjetla, nakon odgovarajućeg razrjeđenja suspenzija nanočestica pročišćenom vodom. U mjernim sustavima korišten je monokromatski koherentni 10 mW He-Ne laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ), a kut detekcije raspršene svjetlosti je bio  $90^\circ$ . Mjerenja su provedena pri  $25^\circ \text{C}$ . PCS metoda jedna je od rijetkih metoda koje se mogu rabiti za čestice u rasponu veličine od 0.005 do  $1 \mu\text{m}$ . Mjerenje se provodi obasjavanjem uzorka monokromatskom koherentnom laserskom zrakom, te se bilježi intenzitet svjetlosti raspršene na česticama pod određenim kutom. Dispergirane čestice u neprestanom gibanju (Brownovo gibanje) dovode do stalnog fluktuiranja intenziteta raspršene svjetlosti tijekom vremena. Uzorak nasumične promjene difrakcije konvertira se u histogram ovisnosti intenziteta o veličini. Promjer čestica dobiven PCS metodom naziva se i hidrodinamički promjer (*RH*).

### 3.3.4. Određivanje zeta potencijala nanočestica



**Slika 10.** Shematski prikaz električnog dvosloja.

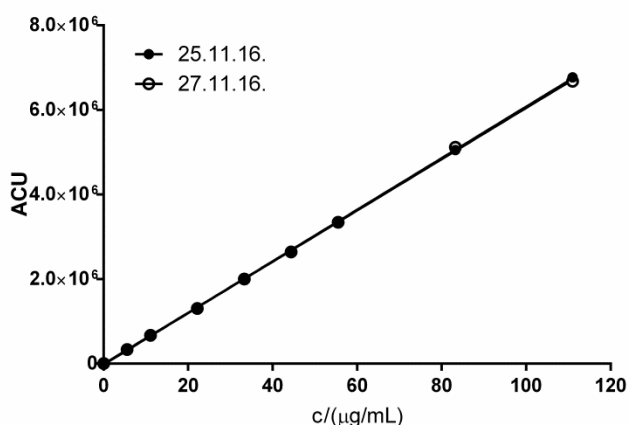


Zeta-potencijal određen je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (PCS) (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, UK). Na površini koloidne čestice razlikuje se sloj slabo pokretnih iona uz površinu (Sternov sloj) i sloj pokretnih iona suprotnog naboja iz otapala (difuzijski sloj). Nabijene dispergirane čestice putuju u električnom polju prema suprotno nabijenoj elektrodi (elektroforetska pokretljivost). Zajedno s česticom giba se Sternov sloj i dio vezanih molekula otapala, odijeljen od ostalih molekula otapala plohom smicanja. Potencijal na udaljenosti od plohe smicanja je mjereni elektrokinetički zeta-potencijal ( $\zeta$ ) koloidnih disperzija te jedan od temeljnih pokazatelja njihove stabilnosti. Vrijednost zeta-potencijala određuje se indirektno mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica čija veličina mora biti unutar raspona od 10 nm do 10  $\mu$ m. Koloidni sustavi sa visokim zeta potencijalom (pozitivnim ili negativnim) su stabilni, dok oni sustavi kod kojih je zeta potencijal niži, teže flokulaciji, što je odlika nestabilnih sustava. U sustavu za mjerenje elektroforetske pokretljivosti čestica korišten je 10 mW He-Ne laser. Intenzitet raspršene svjetlosti mijenja se frekvencijom koja ovisi o brzini gibanja čestica. Elektroforetska pokretljivost, odnosno zeta potencijal, izračunava se iz spektra frekvencija koje proizlaze iz detektiranih fotona svjetlosti. Mjerenja su provođena pri 25 °C. Zeta-potencijal nanočestica mjeren je nakon odgovarajućeg razrjeđivanja suspenzija nanočestica 10 mM otopinom NaCl.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. IZRADA KALIBRACIJSKOG PRAVCA

Za izradu kalibracijskog pravca koristila se srednja vrijednost izmjerenih površina ispod pika. Iz dobivenih ovisnosti površine ispod pika (y) o koncentraciji cefiksima (x) izrađen je kalibracijski pravac koji je prikazan na grafičkom prikazu 3. Nepoznate koncentracije cefiksima izračunavaju se iz jednadžbe kalibracijskog pravca:  $y = 60948x - 21809$ .



**Grafički prikaz 3.** Kalibracijski pravac cefiksima u sustavu acetonitril i 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> u omjeru 60:40 izmjeren na 287 nm u dva uzastopna dana.

Validacija analitičkih metoda jest postupak kojim dokazujemo svrsishodnost određene analitičke metode kako bismo osigurali točne, precizne i reproducibilne rezultate tijekom dugoročnog korištenja metode. Validacijom analitičke metode također će se dobiti obavijest i o odnosu između koncentracije uzorka i odziva metode, o mogućim interferencijama iz matrice uzorka te o najmanjim koncentracijama koje će se moći utvrditi ili kvantificirati određenom metodom. Validacija analitičkih metoda regulatorni je zahtjev Dobre proizvođačke prakse (*Good manufacturing practice*, GMP) i Dobre laboratorijske prakse (*Good laboratory practice*, GLP), ali i profesionalna odgovornost analitičara i struke. Postupci provođenja validacije analitičkih metoda propisani su ICH smjernicom Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 2006. Pristup validaciji sastoji se od tri koraka koji uključuju definiciju problema i plan rada, mjerenje i obradu podataka te izradu dokumentacije koja uključuje standardne operativne postupke i pisanje izvješća s jasno naznačenim zaključkom o potvrdi da metoda odgovara namijenjenoj svrsi.

S obzirom na svrhu primjene analitičkih metoda koje je potrebno validirati, a s ciljem validiranja analitičkih parametara koji će se primjenjivati tijekom validacije, analitičke metode mogu se podijeliti u četiri osnovne skupine:

1. Identifikacijski testovi
2. Kvantitativni testovi određivanja sadržaja onečišćenja
3. Limit testovi za kontrolu onečišćenja
4. Kvantitativni testovi određivanja sadržaja analita u uzorku

I struka i regulativa kao i zakonodavstvo prihvatili su osam osnovnih parametara, tj. izvedbenih značajki validacije:

1. Specifičnost/selektivnost
2. Linearnost
3. Preciznost
4. Točnost
5. Granica dokazivanja
6. Granica određivanja
7. Radno područje
8. Izdržljivost

**Specifičnost/selektivnost** svojstvo je metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenti u matrici uzorka pod određenim uvjetima ispitivanja. Iako se u praksi često poistovjećuju, specifičnost i selektivnost dva su različita svojstva metode. Specifičnom metodom može se odrediti jedan specifičan analit, dok se selektivnom metodom istodobno može određivati više komponenata, ali pod uvjetom da te komponente pri određivanju jedna drugoj ne smetaju. Specifičnost određivanja lijeka osigurana je odabirom valne duljine (289 nm) pri kojoj se provodila detekcija analita, a koja odgovara apsorpcijskom maksimumu cefiksima.

**Linearnost** (*engl. linearity*) je određena kao mogućnost metode da unutar određenog područja daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Određuje se na način da se načini serija uzoraka s različitim koncentracijama analita. Obično se provodi 3-6 određivanja na najmanje 5 koncentracija u očekivanom rasponu analita. Grafički prikaz ovisnosti signala i koncentracije analita predstavlja kalibracijsku krivulju, a koeficijent

korelacije regresijskog pravca (k) treba biti veći 0,999. Linearnost metode za određivanje sadržaja cefiksima izražena je koeficijentom korelacije regresijskog pravca (R=0,9997). Razvijena metoda pokazuje linearni odziv u rasponu koncentracija od 0 do 110 µg/ml (vidi tablicu 5).

**Tablica 6. Podaci dobiveni analizom kalibracijskog pravca CFX.**

koeficijent baždarnog pravca	odsječak na ordinati	Linearnost	granica dokazivanja (µg/mL)	granica određivanja (µg/mL)	radno područje (µg/mL)
60948±226,6	-21809±12194	0.9997	0.60	2.00	5.00-110.00

**Preciznost** (*engl. precision*) se određuje kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Izražava se kao standardna devijacija (SD), relativna standardna devijacija (RSD) ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Ovisno o uvjetima pod kojima se određuje, razlikujemo: ponovljivost (*engl. repeatability, intra-day, međudnevna preciznost*) obnovljivost (*eng. reproducibility*) i srednju preciznost (*engl. intermediate precision, inter-day, dnevna preciznost*). Ponovljivost je podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom pod istim uvjetima koji uključuju jedan laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu i kratko razdoblje analize. Obnovljivost je podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem nekoliko istih uzoraka istom metodom u različitim laboratorijima te se najčešće koristi u svrhu normiranja metode a rijetko kao sastavni dio validacije. Srednja preciznost je odstupanje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka istom metodom pod različitim uvjetima (različiti instrumenti, analitičari, kolone, reagensi iz različitih boca i od različitih dobavljača) u istom laboratoriju kroz duže vremensko razdoblje. Ovim parametrom se ispituje hoće li metoda nakon razvoja davati iste rezultate tijekom uporabe u laboratoriju. Podaci o dnevnoj i međudnevnoj preciznosti za razvijenu metodu prikazani su u tablicama 6 i 7 te dobivene vrijednosti zadovoljavaju postavljene kriterije.

**Tablica 7.** Dnevna preciznost HPLC metode za određivanje sadržaja CFX u ispitivanim uzorcima. AUC je površina ispod pika na kromatogramu, SD standardna devijacija mjerenja, a RDS relativna standardna devijacija kao pokazatelj preciznosti metode

c(CFX)/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	AUC <sub>1</sub>	AUC <sub>2</sub>	AUC <sub>3</sub>	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
5,55	337479,8	336029,6	320739,4	331416,3	9274,8	2,80
11,10	651331,5	672957,5	661849,7	662046,2	10814,3	1,63
22,20	1341166,9	1349074,9	1300985,3	1330409,0	25786,6	1,94
33,30	2011931,0	1961861,4	2011986,5	1995259,6	28923,7	1,45
44,40	2625513,7	2637090,1	2623844,8	2628816,2	7213,8	0,27
55,50	3362178,5	3384653,5	3332982,5	3359938,2	25908,2	0,77
83,25	5155512,8	5016973,2	4983014,8	5051833,6	91380,1	1,81
111,00	6832361,5	6711045,2	6762865,5	6768757,4	60872,4	0,90

**Tablica 8.** Međudnevna preciznost HPLC metode za određivanje sadržaja CFX u ispitivanim uzorcima. AUC je površina ispod pika na kromatogramu, SD standardna devijacija mjerenja, a RDS relativna standardna devijacija kao pokazatelj preciznosti metode

c(CFX)/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	AUC		Srednja vrijednost	SD	RSD(%)
	Dan 1	Dan 2			
5,55	331416,3	332909,8	332163,1	1056,1	0,3
55,50	3359938,2	3341923,4	3350930,8	12738,3	0,4
111,00	6768757,4	6677573,4	6723165,4	64476,8	1,0

**Točnost** (engl. accuracy) podrazumijeva stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referencijske vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene ponavljanjem postupka određeni broj puta.



**Granica dokazivanja** (*engl. Limit of detection, LOD*) predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzorku koja može biti dokazana, ali ne i točno određena pri zadanim uvjetima analitičke metode

Granica dokazivanja određena je iz jednadžbe:

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

$\sigma$  = standardna devijacija odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka

$a$  = nagib kalibracijskog pravca

**Granica određivanja** (*engl. Limit of quantitation, LOQ*) predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzorku koja može biti određena s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode.

Granica dokazivanja određena je iz jednadžbe:

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

$\sigma$  = standardna devijacija standardna devijacija odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka

$a$  = nagib kalibracijskog pravca

Vrijednosti granice određivanja i granice dokazivanja nalaze se u tablici 5 te odgovaraju namjeni metode.

**Radno područje** (*engl. Range*) je raspon između gornje i donje koncentracije analita unutar kojeg analitička metoda ima prihvatljivu točnost, preciznost i linearnost. Preporučeno radno područje za određivanje sadržaja aktivne tvari je 80-120%. Radno područje razvijene metode nalazi se u rasponu od 5,00 do 110,00 µg/ml ,a takva rezultat zadovoljava postavljeni kriterij.

**Izdržljivost** (*eng. robustness* )se određuje kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male ali namjerne promjene radnih uvjeta metode.

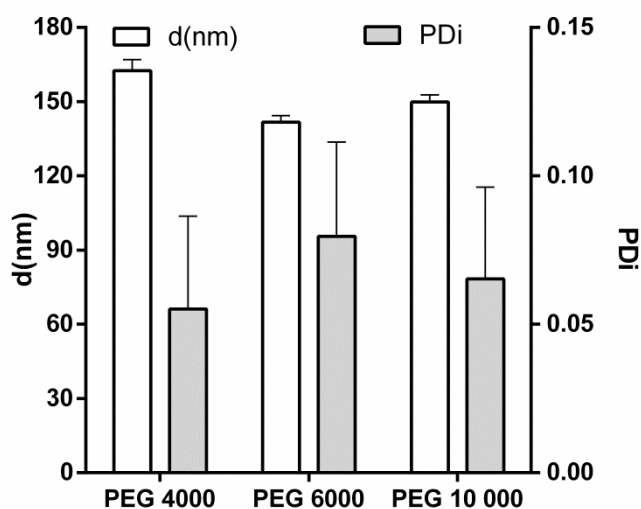
#### 4.2.UTJECAJ MOLEKULSKE MASE PEG-a NA TEHNOLOŠKA SVOJSTVA I UKLAPANJE CEFIKSIMA U NANOČESTICE

Ispitivane nanočestice pripremljene su postupkom jednostavne desolvatacije polimera nakon inkubacije anhidridnog kopolimera s PEG različitih molekulskih masa (PEG 4 000, PEG 6 000 i PEG 10 000). Tijekom izrade nanočestica, varirala se dužina lanca PEG-a, dok su omjer volumena organske i vodene faze (1:3, V/V), omjer anhidridnog kopolimera u PEGa te omjer količine polimera i lijeka (10:1) bili nepromijenjeni. Inkubiranjem anhidridnog kopolimera i PEG-a u bezvodnom mediju dolazi do interakcije između funkcionalnih skupina PEG-a i anhidridnih rezidua kopolimera te nastajanja esterske veze (Yoncheva i sur., 2005). Ranija istraživanja su pokazala da je najučinkovitije vezanje lanaca PEG-a na anhidridne kopolimerne nanočestice upravo kod masenog omjera PEG-a i kopolimera 0.15 (Inchaurraga i sur., 2015). Ranija istraživanja pokazuju da je nužno provesti reakciju u bezvodnom mediju jer je hidroliza anhidrida u vodi proces koji dominira nad vezanjem s PEG-om. Učinkovita PEGilacija nanočestica postiže se samo ukoliko PEG-ovi imaju molekulsku masu iznad 400 Da.(Ladaviere i sur., 1999). Tehnološka svojstva pripremljenih nanočestica: srednji promjer, indeks polidisperznosti (Pdi) i zeta potencijal (Z) te postotak uklapanja (%) prikazana su u Tablici 8.

**Tablica 9.** *Sastav i tehnološke karakteristike pripremljenih nanočestica: veličina (d), polidisperznosti (PDi), zeta potencijal (ζ) i postotak uklapanja lijeka.*

Uzorak	PEG	d/nm	Pdi	Z (mV)	% uklapanja
1.	4000	162,5±4,5	0,055	-41,5±0,6	7,04±0,96
2.	6000	141,8±2,6	0,080	-48,8±0,8	10,32±2,69
3.	10 000	149±2,9	0,065	-48,3±1,4	8,41±0,13

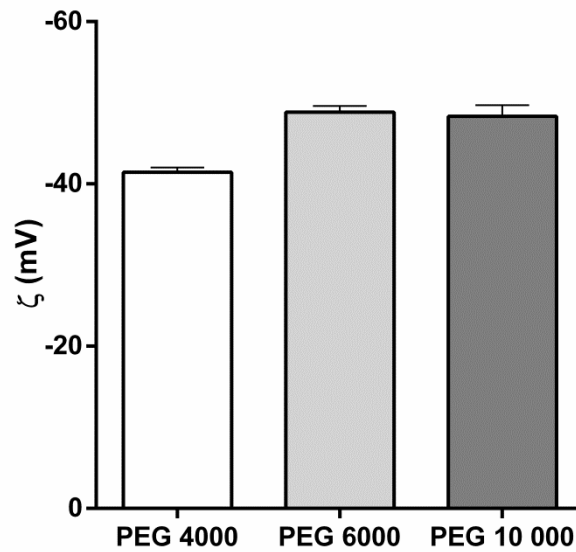
Pripremljene nanočestice pokazuju veličinu u rasponu od 141,8 do 162,5 nm vrlo niskog stupnja polidisperznosti koji varira od 0,055 do 0,080. Na grafičkom prikazu 4 uočava se lagano variranje u veličini čestica kod uzoraka pripremljenih s različitim PEG-om, no takve varijacije nisu od statističkoga značaja. Raspon veličina čestica pripremljenih uzoraka je u skladu s ranije publiciranim podacima za polianhidridne nanočestice obložene PEG različitim molekulskih masa (Inchaurraga i sur., 2015).



**Grafički prikaz 4.** Utjecaj molekulske mase PEG korištenog za oblaganje nanočestica na veličinu i polidisperznost (PDI) pripremljenih PEGiliranih nanočestica s CFX.

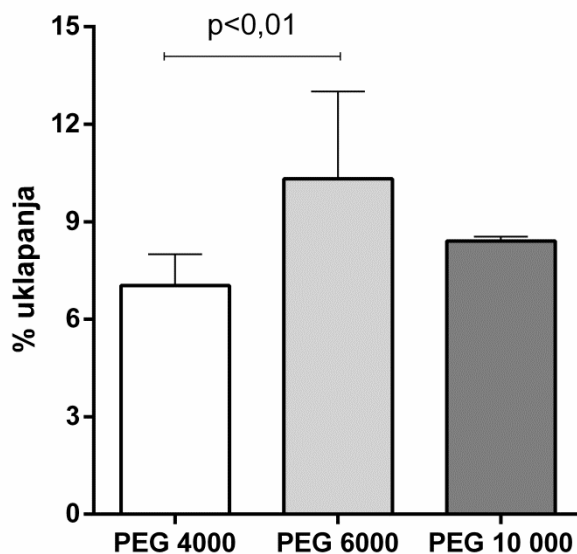
S obzirom na ranije podatke (Boegh i Nielsen, 2015; Fröhlich i Roblegg, 2014; Lai i sur., 2007), da bi se postigla mukopenetrativnost, veličina nanočestica mora biti do 200 nm. Veličina pripremljenih nanočestica nakon oblaganja zadržana je unutar kritičnog raspona, a izmjereni indeks polidisperznosti iznosi manje od 0,2, što upućuje na nastajanje monodisperznog sustava.





**Grafički prikaz 5.** Utjecaj molekulske mase PEG korištenog za oblaganje nanočestica na vrijednost zeta potencijala ( $\zeta$ ) pripremljenih PEGiliranih nanočestica s CFX.

Izmjereni zeta potencijal ispitivanih čestica iznosi više od -40 mV te, iako pokazuju malo variranje u zavisnosti od korištenog PEG-a, takva razlika nije statistički značajna. Dobivene vrijednosti u skladu su sa literaturnim podacima za slične sustave (Inchaurraga i sur., 2015). Budući da je sama sluz negativno nabijena, na temelju ovih rezultata ne očekuje se vezanje nanočestica na lance mucina prisutne u sluzi. Također, s obzirom da je vrijednost zeta potencijala veća od  $\pm 30$  mV, ne očekuju se problemi sa fizičkom stabilnošću nanosustava kao ni njegova agregacija.



**Grafički prikaz 6.** Utjecaj molekulske mase PEG korištenog za oblaganje nanočestica na učinkovitost uklapanja CFX u PEGilirane nanočestice.

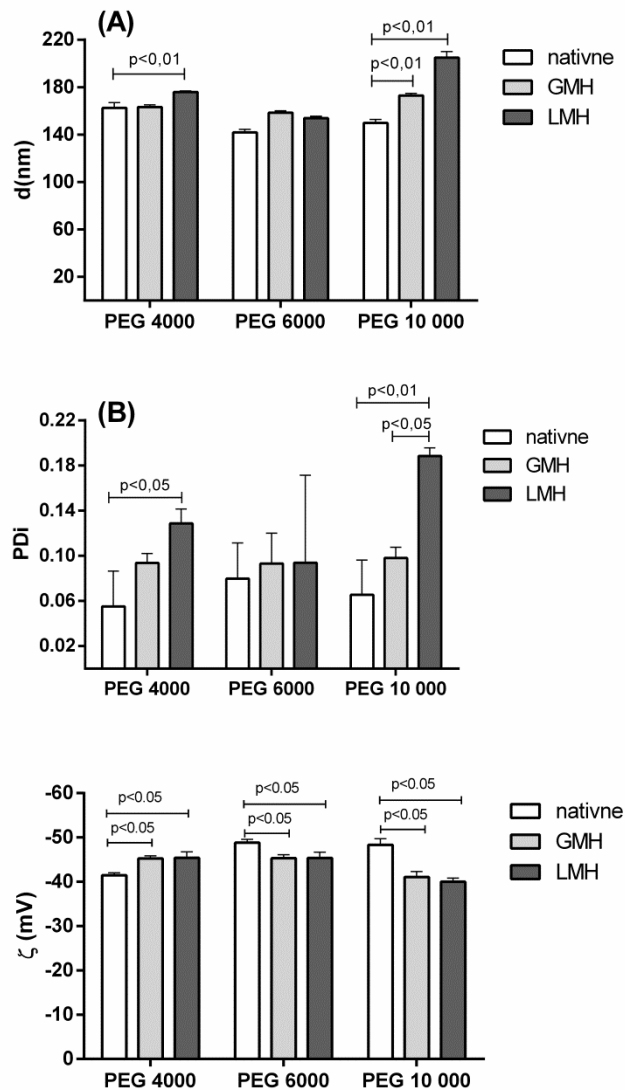
Učinkovitost uklapanja cefiksima u nanočestice je relativno niska te varira u rasponu 7- 10%, a najznačajnije uklapanje postignuto je kod nanočestica cefiksima obloženih PEG-om 6000. Prieto i sur (2012) postigli su značajnije uklapanje memantamina od 37% u nanočestice sličnog sastava, što se može objasniti različitim fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivanih lijekova i posljedično različitom uklapanju.

#### 4.3. UTJECAJ POSTUPKA SUŠENJA SMRZAVANJEM TE UPORABE KRIO- I LIOPROTEKTANATA NA TEHNOLOŠKA SVOJSTVA NANOČESTICA

Nedostatna stabilnost nanočestica u vodenom mediju predstavlja glavnu prepreku u kliničkoj primjeni nanočestica, dok se sušenje smrzavanjem smatra dobrom tehnikom za poboljšavanje dugoročne stabilnosti takvih koloidnih nanosustava. Liofilizacija ili sušenje smrzavanjem široko je korištena tehnika sušenja i poboljšavanja stabilnosti koloidnih nanočestica. Ta se tehnika uključuje tri koraka: a) smrzavanje (solidifikaciju), b) primarno sušenje (sublimaciju leda) i c) sekundarno sušenje (desorpciju nesmrznute vode). Tijekom prvoga koraka tekuća suspenzija ohlađena je te se počinju formirati kristalići leda. Kako proces smrzavanja teče, smrzava se sve više vode sadržane u tekućini te dolazi do porasta koncentracije nanočestica u preostaloj tekućini. S porastom koncentracije tekuće suspenzije također raste i viskoznost, što inhibira daljnju kristalizaciju. Mali postotak vode koja ostaje u tekućem stanju i ne podliježe

smrzavanju naziva se vezana voda. Primarno sušenje uključuje sublimaciju leda sa smrznutoga uzorka, pri čemu isparena voda tvori prolaze prema površini u suhim dijelovima uzorka. Na samome kraju sublimacije ostaju porozni čepovi koji odgovaraju mjestima koja su zauzimali kristali leda. Sekundarno sušenje uključuje uklanjanje adsorbirane vode koja se nije pretvorila u led tijekom smrzavanja, niti je sublimirala. Ipak, sušenje smrzavanjem izaziva mnogo stresa, posebice u fazi smrzavanja i dehidracije, koji može destabilizirati koloidne suspenzije nanočestica. Također je poznato da tijekom smrzavanja dolazi do nastanka dviju faza sustava; leda i zasićene suspenzije nanočestica. Visoka koncentracija suspenzije nanočestica može dovesti do superkoncentriranja, a potom do agregacije, dok je u nekim slučajevima moguća i nepovratna fuzija. Nadalje, kristalizacija leda izaziva mnogo mehaničkoga stresa koji također dovodi do destabilizacije. Iz tih razloga, kako bi se zaštitili osjetljivi sustavi, prije smrzavanja potrebno je dodati posebne ekscipijense koji se nazivaju krioprotektanti, odnosno lioprotektanti (Abdelwahed i sur., 2006).

Krioprotektant je tvar koja štiti sustav od stresa kojemu je izložen u fazi smrzavanja, dok lioprotektant osigurava zaštitu sustava tijekom liofilizacije. Najčešće jedna tvar obavlja obje navedene funkcije, a u tu svrhu najkorišteniji su šećeri poput trehaloze, glukoze, laktoze, sukroze ili manitola. Ti šećeri postaju amorfnii i pri temperaturi staklastog prijelaza (Pikal i sur., 1999) jer posjeduju slobodne hidroksilne skupine koje tvore vodikove veze te tako na sebe vežu vodu tvoreći s njom klastere u svrhu sprječavanja zadržavanja vode na površini nanočestica. Općenito, sušenje smrzavanjem potrebno je provesti na temperaturi nižoj od temperature staklastog prijelaza smrznutog amorfnog uzorka.

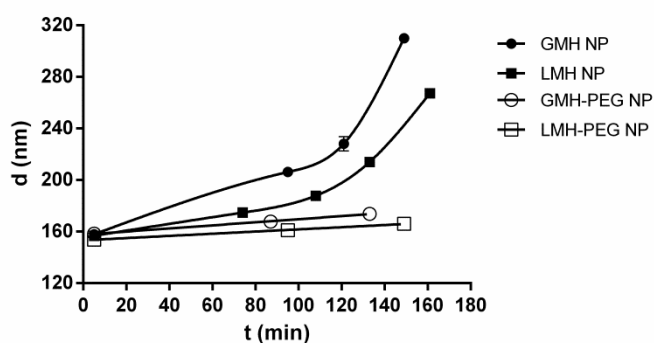


**Grafički prikaz 7.** Utjecaj postupka sušenja smrzanjem te korištenog punila glukoze (GMH) i laktoze (LMH) na veličinu, i polidisperznost (PDi) i zeta potencijal pripremljenih PEGiliranih nanočestica s CFX.

Kod nanočestica obloženim PEG-om 4 000 i PEG-om 10 000 uočena je statistički značajna promjena u srednjoj veličini nanočestica nakon liofilizacije u prisustvu ispitivanih šećera. Kod nanočestica obloženih s PEG-om 4 000 statistički značajna promjena veličine uočena je kod uzorka koji je liofiliziran uz dodatak laktoze monohidrata, dok kod čestica PEGiliranih PEG-om 10 000 dolazi do statistički značajnog porasta veličine čestica u oba slučaja. Osim veličine, liofilizacijom se mijenja i indeks polidisperznosti (PDi) u svim sustavima. Najveći porast zabilježen je kod sustava koji su sadržavali laktozu monohidrata. Također, čini se da i vrsta PEG-a kojim su obložene čestice utječe na promjenu veličine i polidisperznosti ispitivanih uzoraka, pa tako kod nanočestica PEGiliranih PEG-om 6 000 povećanje PDi nije

statistički značajno. Vezano uz zetan potencijal nanočestica, on je nakon procesa liofilizacije nanočestica obloženih s PEG 4000 povećan, a kod ostalih sustava je nešto smanjen. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se detaljno objasnio mehanizam koji uzrokuje navedenu primjenu.

S obzirom na uklapanje lijeka te veličinu čestica prije i nakon procesa liofilizacije uz ispitivana punila, čini se da je uzorak s PEG 6000 najprikladniji za nastavak ispitivanja.



**Grafički prikaz 8.** Profili bubrenja PEGiliranih i nePEGiliranih nanočestica nakon liofilizacije uz glukozumonohidrat (GMH) i laktozumonohidrat (LMH) kao punila.

Oblaganje PEG 6000 sterički je značajno stabiliziralo nanočestice. Kopolimer metilviniletera i anhidrida jabučne kiseline su netopljivi u vodi, no hidratacijom prelaze u oblik dikiseline koji je topljiv u vodi te zbog toga bure. Povećanje srednjeg promjera nanočestica uslijed tog procesa jasno je vidljivo na grafičkom prikazu 8, a na taj način se sve nanočestice u konačnici otope u vodi. Vezanjem lanaca PEG-a preko hidroksilne skupine na anhidridne skupine kopolimera nanočestice su sterički stabilizirane, te se njihov promjer u vodenom mediju ne mijenja značajno s vremenom.

## 5. ZAKLJUČCI

- Pripravljene su PEGilirane nanočestice srednjeg promjera od  $141,8 \pm 2,6$  do  $162,5 \pm 4,5$  nm te su odgovarajućih raspona veličina koja osigurava mukopenetrativnost
- NePEGilirane nanočestice pokazuju svojstvo bubrenja i otapanja dok se PEGiliranjem dugoročno postiže stabilnost nanočestica.
- Izmjereni indeks polidisperznosti PEGiliranih nanočestica varira u rasponu od 0,055 do 0,080, a taj rezultat upućuje na monodisperznost sustava.
- Unatoč činjenici da se izmjereni zeta potencijal nalazi unutar raspona od  $-41,5 \pm 0,6$  do  $-48,8 \pm 0,8$ , od sustava se ne očekuje da će pokazati nestabilnost niti vezanje na negativno nabijene lance glikoproteina prisutnih u sluzi.
- Uklapanje cefiksima u pegilirane nanočestice je relativno nisko i iznosi od 7 do 10%
- GMH se pokazala kao punilo izbora u procesu liofilizacije nanočestica, jer uzrokuje minimalnu promjenu srednje veličine i polidisperznosti ispitivanih sustava
- S obzirom na tehnološke karakteristike, nanočestice obložene PEG-om 6 000 su najpogodnije za nastavak istraživanja.

## 6. LITERATURA

Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58, 1688–1713

Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 2004, 303, 1818–1822

Aoki Y, Morishita M, Takayama K. Role of the mucous/glycocalyx layers in insulin permeation across the rat ileal membrane. *Int J Pharm*, 2005, 297, 98-109

Banker GS, Rhodes CT, Modern Pharmaceutics IV. Drugs and Pharmaceutical Sciences, Swarbrick J, urednik, London, Marcek Dekker, 2002, str. 838

Bhinge SD, Malipatil SM. Development and validation of a stability –indicating method for the simultaneous estimation of cefixime and dicloxacillin using the PR- HPLC method. *J Taibah Univ Sci*, 2016, 10, 734-44

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

Bosquillon C, Lombry C, Preat V, Vanbever R. Comparison of particle sizing techniques in the case of inhalation dry powders. *J Pharm Sci*, 2001, 90, 2032-2041.

Braeckmans K, Peeters L, Sanders NN, De Smedt SC, Demeester J. Three-dimensional fluorescence recovery after photobleaching with the confocal scanning laser microscope. *Biophys J*, 2003, 85, 2240-2252

Brownlee IA, Havler ME, Dettmar PW, Allen A, Pearson JP. Colonic mucus: secretion and turnover in relation to dietary fibre intake. *Pro Nutr Soc*, 2003, 62, 245-249

Burgess DJ, Duffy E, Etzler F, Hickey AJ. Particle size analysis: APPS workshop report, cosponsored by the Food and Drug Administration and the United States Pharmacopoeia. *AAPS J*, 2004, 6, 1-12

Chemistry: vinyl ether polymers and copolymers, 2017,  
<http://www.ashland.com/industries/personal-and-home-care/oral-care/gantrez-an-polymers>, pristupljeno 19.4.2017.

Chew NYK, Shekunov BY, Tong HHY, Chow AHL, Savage C, Wu J, Chan HK. Effect of amino acids on the dispersion of disodium cromoglycate powders. *J Pharm Sci*, 2005, 94, 2289–2300.

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

Corcoran TE, Hitron R, Humphreys W, Chigier N. Optical measurement of nebulizer sprays: a quantitative comparison of diffraction, phase Doppler interferometry and time of flight techniques. *J Aerosol Sci*, 2000, 31, 35-50

Csaba N, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61, 140-157

Cu Y, Booth CJ, Saltzman WM. *In vivo* distribution of surface-modified PLGA nanoparticles following intravaginal delivery. *J Control Release*, 2011, 156, 258-264

Dawson M, Wirtz D, Hanes J. Enhanced viscoelasticity of human cystic fibrotic sputum correlates with increasing microheterogeneity in particle transport, *J Biol Chem*, 2003 278, 50393–50401.

Ermer J., Miller McB. J. H., Method Validation in Pharmaceutical Analysis. Weinheim, Wiley, 2006.

Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *New Engl. J Med*, 2010, 363, 2233-2247

Fröhlich E, Roblegg E. Mucus as a barrier for drug delivery by nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 2014, 14, 126-136

Galindo- Rodriguez SA, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation *in vivo* studies. *Crit Rev Ther Drug Carr. Syst*, 2005, 22, 419-464

Greaves JL, Wilson CG, Birmingham AT. Assessment of the precorneal residence of an ophthalmic ointment in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 1993, 35, 188-192

Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2, 214–221.

Hehar SS, Mason JD, Stephen AB, Washington N, Jones NS, Jackson SJ, Bush D. Twenty-four hour ambulatory nasal pH monitoring. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 1999, 24, 24-25

ICH Harmonised Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Secretariat, 2006, <http://www.ich.org>, pristupljeno 2.4.2017.

Inchaurraga I, Martin - Arabella N, Zabaleta V, Quincoces G, Penuelas 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.

Issa M, Köping-Höggård M, Artursson P. Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. *Drug Discov Today Technol*, 2005, 2, 1-6

IUPAC Technical Report: Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl Chem*, 2002, 74, 835-855

Jayaraman S, Joo NS, Reitz B, Wine JJ, Verkman AS. Submucosal gland secretions in airways from cystic fibrosis patients have normal [Na(+)] and pH but elevated viscosity. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98, 8119-8123



Johansson ME, Sjovall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10, 352-61

Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR. Drug transfer through mucus. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 48, 173-193

Kim DH, Martin DC. Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery. *Biomaterials*, 2006, 27, 3031–3037

King-Smith PE, Fink BA, Hill RM, Tiffany JM. The thickness of the tear film. *Curr Eye Res*, 2004, 29, 357-368

Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*, 2002, 109, 571

Laboisse C, Jarry A, Branka JE, Merlin D, Bou-Hanna C, Vallette G. Recent aspects of the regulation of intestinal mucus secretion. *Proc Nutr Soc*, 1996, 55, 259-264

Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, ManST, Wang YY., Cone R, Hanes J. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104, 1482-1487

Lamprecht A, Schafer U, Lehr CM. Size– dependent bioadhesion of micro-and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. *Pharm Res*, 2001, 18, 788-793

Lieleg O, Ribbeck K. Biological hydrogels as selective diffusion barriers. *Trends Cell Biol*, 2011, 21, 543-51

Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Del Rev*, 2005, 57, 1595-1639

Matsuo K, Ota H, Akamatsu T, Sugiyama A, Katsuyama T. Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut*, 1997, 40, 782-789

McGill SL, Smyth HD. Disruption of the mucus barrier by topically applied exogenous particles. *Mol Pharm*, 2010, 7, 2280-2288

Meng J, Sturgis TF, Youan BB. Engineering tenofovir loaded chitosan nanoparticles to maximize microbicide mucoadhesion. *Eur J Pharm. Sci*, 2011, 44, 57-67

Montisci MJ, DH, Duchene Dembri A, Giovannuci G, Chacun , Ponchel G. Gastrointestinal transit and mucoadhesion of colloidal suspensions of *Lycopersicon esculentum* L. and *Lotus tetragonolobus* lectin- PLA microsphere conjugates in rats. *Pharm Res*, 2001, 18, 829-837

Norris DA, Sinko PJ. Effect of size, surface charge, and hydrophobicity on translocation of polystyrene microspheres through gastrointestinal mucin. *J Appl Polym Sci*, 1997, 63,1481–1492.

- Olmsted SS, Padgett JL, Yudin AI, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Diffusion of macromolecules and virus-like particle in human cervical mucus. *Biophys J*, 2001, 81, 1930-1937
- Pikal MJ, Shah S, Roy ML, Putman R. The secondary drying stage of freeze-drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *Int J Pharm*, 1990, 60, 203-217
- Prieto E, Puente B, Uixera A, Garcia de Jalon JA, Perez S, Pablo L, Irache JM, Garcia MA, Bregante MA. Gantrez An nanoparticles for ocular delivery of memantine: *In vitro* release evaluation in albino rabbits. *Ophthalmic Res*, 2012, 48, 109–117.
- Rodrigues S, Dionísio M, López CR, Grenha A. Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *J Funct Biomater*, 2012, 3, 615-641
- Rogers DF. Pharmacological regulation of the neuronal control of airway mucus secretion. *Curr Opin Pharmacol*, 2002, 2, 259-260
- Röthele S, Naumann H, Heuer M. The application of Fraunhofer diffraction below 1 mm to particle size analysis from 0.1mm to 2000mm. Proceedings of the 7th European Symposium on Particle Characterisation, Nürnberg, 1998.
- Round AN, McMaster TJ, Miles MJ, Corfield AP, Berry M. The isolated MUC5AC gene product from human ocular mucin displays intraocular conformational heterogeneity. *Glycobiology*, 2007, 17, 578-585
- Roy S, Pal K, Anis A, Pramanik K, Prabhakar B. Designed monomers and polymers. *Des Monom Polym*, 2009, 12, 483-495
- Saboktakin MR, Tabatabaie RM, Maharramov A, Ramazanov MA. Development and in vitro evaluation of thiolated chitosan—poly (methacrylic acid) nanoparticles as a local mucoadhesive delivery system. *Int J Biol Macromol*, 2011, 48, 403-407
- Sahoo S, Sahoo R, Nanda R, Tripathy M, Nayak P. Mucoadhesive nanopolymer-A novel drug carrier for topical ocular drug delivery. *Eur J Sci Res*, 2010, 46, 401-409
- Sakuma S, Sudo R, Suzuki N, Kikuchi H, Akashi M., Ishida Y, Hayashi M. Behavior of mucoadhesive nanoparticles having hydrophilic polymeric chains in the intestine, *J Control Release*, 2002, 81, 281–290.
- Salopek B, Krsić D, Filipović S. Measurement and application of zeta potential. *Rudarsko-geološko- naftni zbornik IV*, Zagreb, 1992, 4, 147-151
- Savage C, Wu J, Chan HK. Effect of amino acids on the dispersion of disodium cromoglycate powders. *J Pharm Sci*, 2005, 94, 2289–2300.
- Schuster BS, Suk JS, Woodworth GF, Hanes J. Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease. *Biomaterials*, 2013, 34, 3439-3446

Sejpal K, Bakhtiari P, Deng SX. Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency. *Middle East Afr J Ophtalmol*, 2013, 20, 5-10

Sharif J, Olufowobi O. The structure, chemistry, and physics of human cervical mucus. The Cervix. J. Jordan, urednik, Oxford, Blackwell Publishing, 2006, str. 157-168

Shekunov BY, Feeley JC, Chow L, Tong HHY, York P. Aerosolisation behaviour of micronised and supercritically-processed powders. *J Aerosol Sci*, 2003, 34, 553-568

Sigurdsson HH, Kirch J, Lehr CM. Mucus as a barrier to lipophilic drugs. *Int J Pharm*, 2013, 453, 56-64

Singh A, Singh A, Satheesh Madhav N. Nasal cavity: a promising transmucosal platform for drug delivery and research approaches from nasal to brain targetting. *J Drug Deliv Ther*, 2012, 2, 22-33

Sweetman SC. The complete drug reference. London, Pharmaceutical Press, 2009, str. 224-225.

The European Community Guidelines: CPMP – Committee for Proprietary Medicinal Products, 2003., <http://www.eudra.org>, pristupljeno 2.4.2017.

Thirawong N, Thongborisute J, Takeuchi H, Sriamornsak P. Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin-liposome nanocomplexes. *J Control Release*, 2008, 125, 236-245

Thornton DJ, Sheehan JK. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc Am Thorac Soc*, 2004, 1, 54-61

USA Guidelines: US Food and Drug Administration, 2017, <http://www.fda.gov>, pristupljeno 2.4.2017.

Wang YY, Lai SK, So C, Schneider C, Cone R, Hanes J. Mucoadhesive nanoparticles may disrupt the protective human mucus barrier by altering its microstructure. *J PloS One*, 2011, 6, 6-13

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 Ind Ed Engl*, 2008, 47, 9726-9729

Wanner A, Salathe M, O' Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154, 1868-1902

Woodley J. Bioadhesion: new possibilities for drug administration? *Clin Pharmacokinet*, 2001, 40, 77-84

Yeates DB, Gerrity TG, Garrard CS. Particle deposition and clearance in the bronchial tree. *Ann Biomed Eng*, 1981, 9, 577–592.

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.

Yu T, Wang Y, Yang M, Schneider C, Zhong W, Pulicare S, Choi W, Mert O, Lai SK, Hanes J. Biodegradable mucus-penetrating nanoparticles composed of diblock copolymers of polyethylene glycol and poly(lactic-co-glycolic acid). *Drug Deliv Transl Res*, 2012, 2, 124-132

Zabaleta V, Ponchel G, Salman H, Agueros M, Vauthier C, Irache JM. Oral administration of paclitaxel with pegylated poly(anhydride) nanoparticles; permeability and pharmacokinetic study. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 81, 514-523

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

Svrha ovoga rada bila je priprava mukopenetrativnih nanočestica antibiotika cefiksima, njihova fizička karakterizacija nakon PEGiliranja i liofilizacije te određivanje postotka najboljega uklapanja lijeka u nanočestice. Također, budući da je u eksperimentalnom dijelu rada za određivanje sadržaja cefiksima korištena HPLC metoda, prije samoga ispitivanja proveden je njezin razvoj i validacija.

Nanočestice su načinjene uporabom Gantrez™ AN-169, anhidridnog polimera, te su PEGilirane PEG-ovima različite molekulske mase; PEG 4 000, PEG 6 000 I PEG 10 000. PEGiliranje stabilizira suspenziju nanočestica koje bi u suprotnome u vodenom mediju bubrile i otopile se. Veličina nanočestica ne prelazi 200 nm, što zadovoljava kriterij za postizanje optimalnog terapijskog učinka. Iznos zeta potencijala u sva tri uzorka PEGiliranih nanočestica veći je od -40 mV , no zbog negativnoga naboja na mucinima, ne očekuje se vezanje nanočestica na sluz. Sukladno očekivanjima, indeks polidisperznosti, izmjeren nakon oblaganja nanočestica, bio je manji od 0,2 te je time dobivena potvrda da se radi o monodisperznom sustavu. Kod nanočestica PEGiliranih PEG-om 6 000 povećanje indeksa polidisperznosti nije statistički značajno te se upravo kod tih nanočestica zamjećuje najveći postotak uklapanja cefiksima koji iznosi oko 10%. Iz navedenoga proizlazi da su nanočestice obložene PEG-om 6 000 najpogodnije za nastavak istraživanja.

The aim of this study is to prepare mucopenetrating nanoparticles of the antibiotic cefixime and perform their physical characterisation after pegylation and lyophilization, as well as to determine the percentage of drug in the most fitting nanoparticles to achieve maximum bioavailability and, according to that, a better therapeutic effect. Moreover, since in the experimental part of the work for cefixime determination was used HPLC method, prior to the tests it has been carried out its development and validation.

Nanoparticles were formed using Gantrez™ AN-169, anhydrous polymer and then. PEGylated with PEGs of different molecular weight; PEG 4000, PEG 6000 and PEG 000. PEGylation stabilizes a suspension of nanoparticles which would otherwise swell in aqueous medium and dissolve. Nanoparticle size does not exceed 200 nm, which meets the criteria for achieving optimal therapeutic effect. The amount of zeta potential in all three samples of PEGylated nanoparticles is greater than -40 mV, but due to the negative charges on the mucins, it is not expected to bind the nanoparticles in the mucus. As hypothesized, polydispersity index, measured after coating nanoparticles was less than 0,2, and it is, thereby, it is confirmed that the system is monodispersed. When nanoparticles were PEGylated with PEG 6000, the increase in polydispersity index is not statistically significant and the administration of these nanoparticles noticing the highest incorporation percentage of cefixime, of about 10%. The abovementioned facts show that the nanoparticles coated with PEG 6000 most appropriate system for the further research.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet Studij: Farmacija Zavod za Farmaceutsku tehnologiju Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska	Diplomski rad
<b>MUKOPENETRATIVNE NANOČESTICE CEFIKSIMA</b>	
<b>Severina Jajčević</b>	
<b>SAŽETAK</b>	
<p>Svrha ovoga rada bila je priprava mukopenetrativnih nanočestica antibiotika cefiksima, njihova fizička karakterizacija nakon PEGiliranja i liofilizacije te određivanje postotka najboljega uklapanja lijeka u nanočestice. Također, budući da je u eksperimentalnom dijelu rada za određivanje sadržaja cefiksima korištena HPLC metoda, prije samoga ispitivanja proveden je njezin razvoj i validacija.</p> <p>Nanočestice su načinjene uporabom Gantrez™ AN-169, anhidridnog polimera, te su PEGilirane PEG-ovima različite molekulske mase; PEG 4 000, PEG 6 000 I PEG 10 000. PEGiliranje stabilizira suspenziju nanočestica koje bi u suprotnome u vodenom mediju bubrile i otopile se. Veličina nanočestica ne prelazi 200 nm, što zadovoljava kriterij za postizanje optimalnog terapijskog učinka. Iznos zeta potencijala u sva tri uzorka PEGiliranih nanočestica veći je od -40 mV, no zbog negativnoga naboja na mucinima, ne očekuje se vezanje nanočestica na sluz. Sukladno očekivanjima, indeks polidisperznosti, izmjeren nakon oblaganja nanočestica, bio je manji od 0,2 te je time dobivena potvrda da se radi o monodisperznom sustavu. Kod nanočestica PEGiliranih PEG-om 6 000 povećanje indeksa polidisperznosti nije statistički značajno te se upravo kod tih nanočestica zamjećuje najveći postotak uklapanja cefiksima koji iznosi oko 10%. Iz navedenoga proizlazi da su nanočestice obložene PEG-om 6 000 najpogodnije za nastavak istraživanja.</p>	
Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.	
Rad sadrži:	58 stranica, 8 grafičkih prikaza, 9 tablica i 76 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	Mukopenetrativne nanočestice, sluznica, mucini, cefiksim, uklapanje lijeka, polietilenglikol
Mentor:	<b>Dr. sc. Mario Jug</b> , <i>izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.</i>
Ocjenjivači:	<b>Dr. sc. Mario Jug</b> , <i>izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.</i>
	<b>Dr. sc. Anita Hafner</b> , <i>izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.</i>
	<b>Dr. sc. Živka Juričić</b> , <i>redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.</i>
Rad prihvaćen: svibanj, 2017	

## Basic documentation card

University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry Study: Pharmacy Department of Pharmaceutical technology Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia	Diploma thesis
<b>MUCUS-PENETRATING NANOPARTICLES OF CEFIXIME</b>	
<b>Severina Jajčević</b>	
<b>SUMMARY</b>	
<p>The aim of this study is to prepare mucopenetrating nanoparticles of the antibiotic cefixime and perform their physical characterisation after pegylation and lyophilization, as well as to determine the percentage of drug in the most fitting nanoparticles to achieve maximum bioavailability and, according to that, a better therapeutic effect. Moreover, since in the experimental part of the work for cefixime determination was used HPLC method, prior to the tests it has been carried out its development and validation. Nanoparticles were formed using Gantrez™ AN-169, anhydrous polymer and then. PEGylated with PEGs of different molecular weight; PEG 4000, PEG 6000 and PEG 000. PEGylation stabilizes a suspension of nanoparticles which would otherwise swell in aqueous medium and dissolve. Nanoparticle size does not exceed 200 nm, which meets the criteria for achieving optimal therapeutic effect. The amount of zeta potential in all three samples of PEGylated nanoparticles is greater than -40 mV, but due to the negative charges on the mucins, it is not expected to bind the nanoparticles in the mucus. As hypothesized, polydispersity index, measured after coating nanoparticles was less than 0,2, and it is, thereby, it is confirmed that the system is monodispersed. When nanoparticles were PEGylated with PEG 6000, the increase in polydispersity index is not statistically significant and the administration of these nanoparticles noticing the highest incorporation percentage of cefixime, of about 10%. The abovementioned facts show that the nanoparticles coated with PEG 6000 most appropriate system for the further research.</p>	
The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.	
Thesis includes:	58 pages, 8 figures, 9 tables and 76 references. Original is in Croatian language.
Keywords:	Mucopenetrating nanoparticles, mucus, mucins, cefixime, drug incorporation, polyethylene glycol
Mentor:	<b>Mario Jug, Ph.D.</b> <i>Associate Professor</i> , University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Reviewers:	<b>Mario Jug, Ph.D.</b> <i>Associate Professor</i> , University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
	<b>Anita Hafner, Ph.D.</b> <i>Associate Professor</i> , University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
	<b>Živka Juričić, Ph.D.</b> <i>Full Professor</i> , University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
The thesis was accepted: May, 2017.	



