

Fosfolipidne formulacije s timolom - ispitivanje biokompatibilnosti na humanim keratinocitima

Kranjčec, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:832860>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-25**



Repository / Repozitorij:

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



Kristina Kranjčec

**Fosfolipidne formulacije s timolom – ispitivanje
biokompatibilnosti na humanim keratinocitima**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, kolegiju Oblikovanje lijekova pod stručnim vodstvom dr. sc. Zore Rukavine.

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Zori Rukavini na stručnim savjetima, strpljivosti i uloženom trudu prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na pomoći i ugodnoj atmosferi u laboratoriju.

Posebnu zahvalu šaljem svojoj obitelji, mami, tati i dvjema sestrama te dečku koji su mi bili najveća podrška tijekom studiranja, ali i pisanja ovog rada.

Hvala mojim prijateljicama i kolegicama na najljepšim uspomnama.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Građa i funkcija kože	1
1.2. Primjena i transport lijekova kroz kožu	3
1.3. Lipidni nosači lijekova za dermalnu primjenu	5
1.3.1. Liposomi	6
1.3.2. Vezikularni fosfolipidni gelovi	8
1.4. Ispitivanja biokompatibilnosti <i>in vitro</i> na staničnoj kulturi HaCaT	10
1.4.1. Biokompatibilnost	10
1.4.2. HaCaT stanična linija	11
1.4.3. Test redukcije tetrazolijeve soli (MTT test)	11
1.5. Timol	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Materijali	16
3.2. Metode	17
3.2.1. Priprema vezikularnih fosfolipidnih gelova	17
3.2.2. Priprema liposoma	18
3.2.3. Priprema otopine timola u propilenglikolu	19
3.2.4. Određivanje veličine liposoma i indeksa polidisperznosti	19
3.2.5. Određivanje zeta potencijala liposoma	19
3.2.6. Ispitivanje citotoksičnosti uklopljenog timola <i>in vitro</i>	19
3.2.7. Statistička obrada podataka	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Fizikalno-kemijska svojstva fosfolipidnih formulacija	22
4.2. Biokompatibilnost fosfolipidnih formulacija s HaCaT staničnom linijom <i>in vitro</i>	24
5. ZAKLJUČCI	26
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	27
7. LITERATURA	28
8. SAŽETAK	33
SUMMARY	34
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Građa i funkcija kože

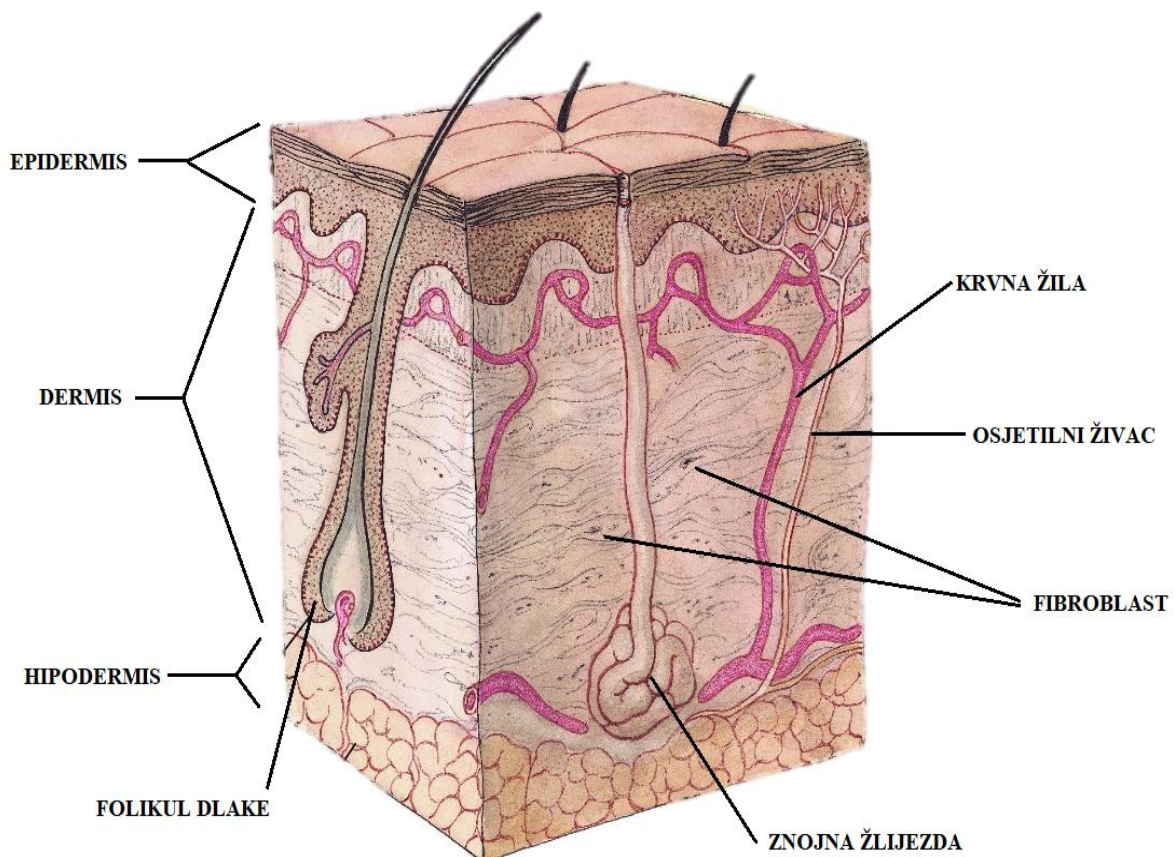
Koža (lat. *cutis*) je najveći ljudski organ koji zauzima oko 15 % od ukupne tjelesne težine (Richardson, 2003). Građena je od anatomski i funkcionalno tri različita sloja: epidermisa, dermisa i potkožnog masnog tkiva hipodermisa u koje su uklopljeni kožni privjesci - dlake, nokti te žlijezde lojnice i znojnice, koji doprinose funkciji kože (Yousef i sur., 2022). Kao prva linija obrane organizma, koža ima protektivnu ulogu, pruža mehaničku zaštitu, štiti od ultrazvučnog zračenja i sprječava gubitak tjelesnih tekućina. Ima ulogu u termoregulaciji i najvažniji je osjetilni organ. Koža je i sastavni je dio imunološkog i endokrinog sustava, sudjeluje u sintetizi vitamina D i drugih biološki relevantnih molekula poput strukturnih lipida i proteina kože (Lawton, 2019).

Vanjski, najgornji sloj kože naziva se epidermis. Epidermis je građen od slojevitog pločastog epitela debljine 0,1 mm, odnosno na dijelovima tijela sklonima trenju (dlanovi i tabani), debljina sloja iznosi oko 0,8 do 1,4 mm. Epidermis čine stanice keratinociti, melanociti, Lagerhansove stanice te osjetilna tjelešca poput Merkelovih stanica (Gawkrodger, 2002). Slojevi keratinocita poredani su jedan iznad drugog, pri čemu se u najdubljem sloju koji se naziva *stratum basale* (temljeni sloj) odvija mitozna matičnih stanica kože. Nastali keratinociti dalje sazrijevaju i diferenciraju čineći redom slojeve *stratum spinosum* (trnasti sloj), *stratum granulosum* (zrnati sloj) te *stratum lucidum* (svijetli sloj) koji se nalazi samo u debeloj koži. Potpuno diferencirani mrtvi keratinociti bez jezgre u najvišem rožnatom sloju (*stratum corneum*) nazivaju se korneociti (Fore, 2006). U rožnatom su sloju korneociti povezani korneodezmosomima i uklopljeni u visokoorganizirani međustanični lipidni matriks koji se sastoji od ceramida, slobodnih masnih kiselina, kolesterola, kolesterol-sulfata, triglicerida, sterolnih estera i voskova (Escobar-Chávez, 2012). Upravo zbog specifične lamelarne građe, barijerna uloga epidermisa može se pripisati upravo rožnatom sloju. Naime, korneociti i okolni matriks čine nepropusnu lipidnu barijeru za alergene i iritanse, ali i sprječavaju gubitak vode iz kože (Lawton, 2019). Proces diferencijacije keratinocita (keratinizacija) od diobe u bazalnom sloju, proliferacije pa do nastanka mrtvih stanica u rožnatom sloju u prosjeku traje 28 dana. Nakon tog perioda, korneociti se ljušte s površine kože procesom koji se naziva deskvamacija (Fore, 2006).

Dermis je građen od vezivnog tkiva te se nalazi između epidermisa i hipodermisa. Primarno sadrži strukturne proteine kolagen i elastin, stanice, krvne žile, živce i žlijezde znojnice. Glavne

stanice dermisa nazivaju se fibroblasti koji proizvode spomenuti kolagen, elastin i druge vlaknaste proteine. Dermis se sastoji od dva sloja: papilarnog i retikularnog. Papilarni sloj je gornji i tanji sloj, građen od rahlog vezivnog tkiva s puno stanica fibroblasta, a manje vlakana. Dobro je prokrvljen pa opskrbljuje hranjivim tvarima epidermis koji ne sadrži krve žile. Retikularni sloj je gusto vezivno tkivo s većom količinom kolagena, a sadrži manje fibroblasta (Losquadro, 2017). Zbog kolagenih i elastičnih vlakana te drugih proteina, dermis je glavna potpora epidermisu, dajući koži čvrstoću, elastičnost i otpornost prema deformacijama (Daly, 1982).

Hipodermis ili potkoža (lat. *hipodermis, subcutis*) je najdublji sloj koji povezuje kožu s unutrašnjim organima, ali i s pokretnim strukturama poput mišića i kosti. Rahlo je vezivno tkivo koje se sastoji od masnih stanica adipocita i krvnih žila (Woo, 2020). Debljina ovog sloja iznosi u prosjeku od 4 do 9 mm, ali se razlikuje ovisno o dobi, spolu, smještaju na tijelu te nutritivnom i hormonalnom statusu pojedinca (Igarashi i sur., 2005).



Slika 1. Struktura kože. Preuzeto i prilagođeno iz <https://images.nigms.nih.gov/>.

1.2. Primjena i transport lijekova kroz kožu

Ljudska koža ima mnogo funkcija, a najvažnija je barijerna tj. obrambena uloga. Rožnati sloj i njegova specifična anatomija i fiziologija u načelu sprječavaju prodor različitih agensa kroz kožu ili omogućavaju njihovu eliminaciju. Međutim, neke tvari u određenim okolnostima mogu penetrirati kroz rožnati sloj, zbog čega koža predstavlja jedan od mogućih puteva primjene lijekova.

Proces razvoja terapijskih sustava za (trans)dermalnu primjenu lijekova zahtijeva ulaganje velike količine novca, resursa i vremena. Proizvođači se suočavaju s izazovima poput etičkih ograničenja u testiranju lijekova na ljudima i životinjama, odabiru lijeka prikladnih svojstava koji će u željenom opsegu proći u/kroz kožnu barijeru, potencijalnih alergijskih reakcija i iritacija kože itd. Unatoč navedenim izazovima, (trans)dermalna primjena lijekova osigurava veliku suradljivost pacijenata zbog jednostavnosti primjene i neinvazivnosti. Razvojem znanosti i tehnologije, količina lijekova primjenjivih na kožu kontinuirano raste, a novi terapijski sustavi omogućavaju učinkovitiju i sigurniju dostavu lijeka na ciljano mjesto. U posljednjih četrdesetak godina broj topikalno primjenjivih lijekova, prema Food and Drug Administration (FDA), povećao se za oko 70 % (Cheruvu i sur., 2020).

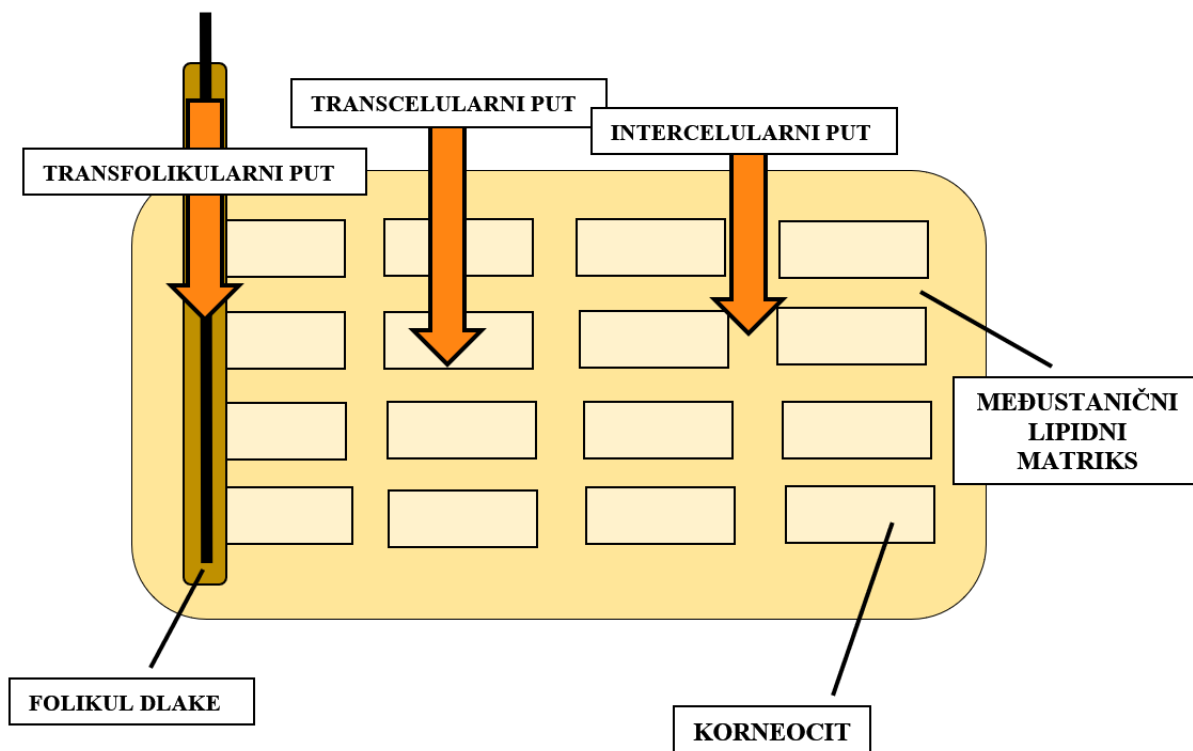
Primjena lijekova na kožu omogućava lokalno ili sistemsko djelovanje primijenjenog lijeka. Terapijski sustavi za dermalnu isporuku lijekova koriste se za ciljanu dostavu lijekova u blizinu površine kože ili u dublje slojeve kože, a najčešće uključuju polučvrste formulacije u obliku gelova, krema ili masti. Takvi sustavi djeluju lokalno na mjestu primjene, a uklopljeni lijek ne prolazi značajno u sistemsku cirkulaciju, čime se izbjegavaju štetni učinci lijeka. S druge strane, transdermalni terapijski sustavi dizajnirani su tako da uklopljene aktivne tvari prođu kroz kožu, u dermisu se apsorbiraju u krvotok te ostvaruju sistemski učinak. Prednosti takvih transdermalnih sustava su brojne u odnosu na oralnu primjenu: izbjegava se utjecaj pH želuca i prisutnosti hrane u crijevima na apsorpciju te se zaobilazi metabolizam prvog prolaska kroz jetru, čime se postiže ujednačenija koncentracija lijeka u krvi. Primjer takvih formulacija su flasteri s nikotinom ili hormonski flasteri (Okyar i sur., 2012).

Lijekovi primijenjeni na kožu moraju proći *stratum corneum* da bi došli do stanica u nižim slojevima kože, do vijabilnih stanica epidermisa i dermisa. Prvi korak u dermalnoj apsorpciji uključuje raspodjelu aktivne tvari iz formulacije u *stratum corneum*, pasivnu difuziju lijeka kroz rožnati sloj (penetracija), nakon čega slijedi permeacija kroz dublje slojeve kože te konačno apsorpcija u sistemsku cirkulaciju (Cheruvu i sur., 2020).

Postoje tri glavna puta prijenosa lijeka kroz rožnati sloj: intercelularni, transcelularni te transfolikularni/transglandularni (Slika 2). Intercelularni put prijenosa je dominantni način prolaska lipofilnih molekula gdje lijek pasivno difundira kroz međustanični lipidni matriks *stratum corneum*. Kroz korneocite, transcelularno, prolaze hidrofilnije molekule vođene koeficijentom raspodjele (logP) između lipidnog matriksa i polarnijeg medija stanice. Moguć je i transfolikularni tj. transglandularni put prijenosa, kroz žlijezde znojnice i duž folikula dlake. Ovim putem mogu se prenositi velike polarne molekule i ioni koji inače ne mogu proći kroz rožnati sloj. Budući da folikuli dlaka i žlijezde znojnice predstavljaju samo 0,1 % površine kože, transfolikularni i transglandularni put smatraju se manje značajnima (Serrano-Castañeda i sur., 2018).

Postoje različiti čimbenici koji utječu na to hoće li lijek postići lokalni učinak na koži ili sistemski. Stanje fizičke barijere, tj. kože, uvelike određuje stupanj perkutane apsorpcije lijeka. Kod ozljeda kože ili kožnih bolesti, propusnost kože je veća te lijekovi koji imaju lokalno djelovanje, mogu dospjeti i u sistemsku cirkulaciju. Nadalje, penetracija lijeka ovisi i o fizičko-kemijskim svojstvima lijeka: veličini molekule, polarnosti i naboju. Transdermalna isporuka lijeka moguća je za lipofilne i neutralne molekule manje od 500 Da, stoga se proteini kao molekule velike molekulske mase, velike hidrofilnosti i nabijenosti, ne uklapaju u formulacije za transdermalnu primjenu.

Budući da struktura rožnatog sloja ograničava pasivni prolaz izrazito hidrofilnih molekula (Bos i Meinardi, 2000), razvijeni su kemijski i fizički pristupi koji pospješuju dostavu takvih lijekova. Primjerice, radi postizanja prikladnog omjera lipofilnosti/hidrofilnosti za penetraciju, mijenja se kemijska struktura lijeka te se priređuju prolijekovi. Također, u svrhu degradacije korneodezmosoma te posljedičnog povećanja penetracije uklopljenog lijeka u (trans)dermalne formulacije dodaju se kemijski pojačivači penetracije (npr. alkoholi, esteri masnih kislina,...) ili se koristi električna, toplinska i mehanička energija primjenom sustava mikroigala, injektora bez igle ili elektroporacije (Woo, 2020; Zhu i sur., 2020). Isto tako, mogu se prirediti različiti nanosustavi s uklopljenim molekulama za primjenu na kožu koji zbog specifičnih svojstava povećavaju penetraciju hidrofilnih tvari, dok lipofilnim lijekovima omogućavaju nakupljanje na mjestu djelovanja (Vanić, 2015).



Slika 2. Procesi penetracije lijeka kroz rožnati sloj.
Izrađeno pomoću programa BIOVIA Draw 2017.

1.3. Lipidni nosači lijekova za dermalnu primjenu

Zbog izrazite biokompatibilnosti, sposobnosti poboljšavanja topljivosti i bioraspoloživosti aktivnih tvari, lipidni nosači koriste se u svrhu isporuke lijekova, cjepiva i dijagnostičkih sredstava. Lipidni nosači lijekova omogućuju ciljanu dostavu lijeka te vremenski kontrolirano otpuštanje velikih i malih molekula. Lipidi korišteni u takvim nosačima mogu se modificirati na razne načine u svrhu dobivanja širokog raspona formulacija različite učinkovitosti, sigurnosti, biokompatibilnosti/toksičnosti i troškova proizvodnje. Mogu se koristiti za liječenje raznih bolesti i za različite puteve primjene - za oralnu, pulmonalnu, parenteralnu, ali i dermalnu primjenu (Shrestha i sur., 2014).

Terapijski sustavi za (trans)dermalnu dostavu lijekova temeljeni na lipidima uglavnom sadrže fiziološki prisutne lipide kao što su fosfolipidi, trigliceridi te kolesterol. Fosfolipidi su glavna komponenta staničnih membrana, stoga se bolje podnose na koži u odnosu na sintetski dobivene polimere. Proces proizvodnje takvih formulacija jednostavniji je i jeftiniji, a moguće je prilagođavati kinetiku otpuštanja lijeka odabirom točno određene vrste lipida i njihovih kombinacija (Breitsamer i Winter, 2019). Lipidi koji se odabiru za razvoj topikalnih formulacija za primjenu na kožu idealno bi trebali biti biokompatibilni, biorazgradivi, netoksični te

posjedovati sposobnost integracije/stapanja s kožom te stvaranja depoa iz kojeg se lijek može produljeno oslobađati.

Korištenjem lipidnih nosača nanometarske veličine poput lipidnih nanočestica, mikroemulzija, nanoemulzija te vezikularnih sustava, pospješuje se penetracija lijeka kroz *stratum corneum*. U lipidne nanočestice ubrajaju se čvrste lipidne nanočestice (eng. *solid lipid nanoparticles*, SLN) i nanostrukturirani lipidni nosači (eng. *nanostructured lipid carriers*, NLC). SLN su disperzije krutih lipida u vodi stabilizirane površinski aktivnim tvarima, a NLC predstavljaju smjesu čvrstih i tekućih lipida zbog čega imaju manje rigidnu strukturu i veći kapacitet uklapanja lijeka od SLN. Mehanizam pojačanog prodiranja lipidnih nanočestica kroz kožu temelji se na hidrataciji *stratum corneuma* radi okluzivnog učinka lipida. Lipidi na površini kože pritom stvaraju vodonepropusan sloj, voda ne isparava u okoliš te se produljeno zadržava u koži. Također, SLN i NLC se putem dlačnih folikula mogu prenijeti u dublje dijelove kože.

Mikro i nanoemulzije su dvofazni sustavi ulja i vode koji sadrže kapljice unutarnje faze nanometarske veličine stabilizirane surfaktantima i kosurfaktantima. Zbog male veličine čestica i visokog udjela površinski aktivnih tvari (PAT), takve formulacije pokazuju dobro prijanjanje, produljen kontakt s kožom te poboljšavaju prijenos lijeka u kožu do mjesta djelovanja (Patel i sur., 2021).

Osim lipidnih nanočestica te mikro- i nanoemulzija, u dermalnoj primjeni lijekova vrlo često se istražuju vezikularni nanosustavi građeni od fosfolipida koji stvaraju koncentrične dvosloje pritom zatvarajući unutarnje vodene odjeljke - liposomi. Uz liposome, za dermalnu isporuku lijekova se istražuju i srodni inovativni vezikularni fosfolipidni sustavi. Primjer takvih formulacija su vezikularni fosfolipidni gelovi (VFG-ovi). Disperzijom velike količine fosfolipida u vodenom mediju lijeka nastaju gusto pakirani lamelarni slojevi i vezikule fosfolipida s vodenom jezgrom što se naziva VFG. VFG-ovi su formulacije s većim kapacitetom uklapanja lijeka u odnosu na liposome, stoga predstavljaju velik potencijal u daljnjem istraživanju primjene lijekova na kožu (Breitsamer i Winter, 2019).

1.3.1. Liposomi

Liposomi su biokompatibilni i biorazgradivi vezikularni sustavi nanometarske veličine građeni od jednog ili više koncentričnih fosfolipidnih dvoslojeva koji okružuju vodene odjeljke. Hidrofilni dijelovi fosfolipida orijentirani su prema unutrašnjosti vezikule i vanjskoj vodenoj fazi, dok su nepolarni repovi lanaca masnih kiselina okrenuti jedan prema drugome. Svojom

građom vrlo su slični međustaničnom lipidnom matriksu i stanicama korneocita pa se često nalaze u formulacijama namijenjenima lokalnoj primjeni na kožu. Zbog hidrofilne jezgre i lipofilne ovojnice, liposomi mogu uklopiti lijekove različite veličine i polarnosti. Lipofilni lijekovi ugrađuju se u fosfolipidni dvosloj, hidrofilni u vodeni odjeljak, dok amfifilni dijelom u vodeni, dijelom u fosfolipidni sloj. Fosfolipidi djeluju kao pojačivači penetracije uklopljenih aktivnih tvari, a posljedično uzrokuju naknadnu promjenu lipidnog sastava međustaničnog matriksa rožnatog sloja. Liposomi mogu penetrirati i preko kožnih privjesaka (apendiksa), čime se stvara lokalizirani depo lipofilnog lijeka, postižući kontinuirano otpuštanje i smanjeno sistemsko djelovanje, dok se hidrofilnim lijekovima uklapanjem olakšava penetracija kroz rožnati sloj (Vanić, 2015).

Stabilnost i sposobnost isporuke uklopljenih lijekova određeni su veličinom vezikula, lipidnim sastavom, rigidnošću/fluidnošću membrane, površinskim nabojem te brojem dvoslojeva (Vanić, 2015). Uzimajući u obzir veličinu i broj fosfolipidnih dvosloja, postoje unilamelarni, oligolamelarni, multilamelarni i multivezikularni liposomi. Lamelarnost ima direktan utjecaj na sposobnost uklapanja i penetracije lijeka, kinetiku oslobađanja te interakciju i spajanje liposoma sa stanicom (Kotla i sur., 2017).

Ovisno o građi dvoslojne vezikularne ovojnice, tj. prisutnosti surfaktanata ili suotapala, liposomi se dijele na konvencionalne, kationske, deformabilne, etosome, invasive te liposome s propilenglikolom (Vanić, 2015). Niosomi su sferične vezikule nalik liposomima građene od sintetskih neionskih PAT, stoga imaju veću sposobnost prijenosa lijeka od liposoma, ali istodobno i veći rizik od iritacije kože zbog prisutnosti velike količine surfaktanata. Prva generacija liposoma ispitivana za topikalnu primjenu bili su konvencionalni ili klasični liposomi. To su unilamelarni ili oligo-/multilamelarni liposomi građeni od neutralnih ili kombinacije neutralnih i negativno nabijenih fosfolipida. Kako bi se povećala stabilnost i rigidnost liposoma te posljedično smanjio gubitak hidrofilnih tvari iz liposomske jezgre, u liposomske formulacije se često dodaje kolesterol koji se ugradi u dvosloj te tako povećava mikroviskoznost, rigidnost i stabilnost vezikula (Kotla i sur., 2017). Etosome čini fosfolipidni dvosloj koji okružuje hidroetanolnu jezgru. Deformabilni liposomi u svojoj strukturi uz fosfolipide dodatno imaju i PAT s jednostrukim lancem koji povećava fluidnost i elastičnost fosfolipidne ovojnice, stoga takvi sustavi mogu postići i transdermalni terapijski učinak (Patel i sur., 2021). Osim spomenutih deformabilnih liposoma, poboljšana svojstva u dermalnoj primjeni lijekova pokazuju i propilenglikol liposomi (PG-liposomi). Propilenglikol djeluje kao promotor penetracije i humektans pa se povećava penetracija lijeka kroz kožu. Ugrađuje se u fosfolipidni dvosloj te u unutarnju i vanjsku vodenu fazu. U unutarnjoj vodenoj fazi povećava

topljivost lijeka pa je i uspješnost uklapanja veća, u vanjskoj fazi ima ulogu promotora penetracije, a povećana elastičnost membrane posljedica je ugradnje propilenglikola u fosfolipidni dvosloj (Vanić, 2015).

Postoje brojne metode za pripravu liposoma koje omogućavaju dobivanje vezikula različitih veličina, lamelnosti i stupnja uklopljenosti lijeka. Idealna metoda pripreme bila bi ona kojom je uspješnost uklapanja lijeka maksimalna, minimalno je korištenje štetnih organskih otapala, a postupak da je jednostavan i reproducibilan. Gotovo svi postupci pripreme liposoma sadrže nekoliko osnovnih koraka: uklanjanje organskog otapala u kojem su otopljeni fosfolipidi, dodatak vodenog medija s ciljem dispergiranja fosfolipida, homogenizacija suspenzije liposoma te karakterizacija nastalih liposomskih formulacija. Uvijek vrijedi pravilo da se hidrofilni lijekovi dodaju u vodeni medij, dok lipofilni u smjesu fosfolipida i organskog otapala. Postoje 3 velike skupine u koje se mogu podijeliti metode pripreme liposoma: fizičko dispergiranje, dvofazno dispergiranje i solubilizacija pomoću detergensa. Priprema liposoma fizičkim dispergiranjem uključuje metodu hidratacije suhog fosfolipidnog filma, dehidratacije-rehidratacije, smrzavanja-taljenja te metodu pripreme liposoma visokotlačnom homogenizacijom. Najčešće primijenjena metoda izrade liposomskih formulacija je upravo metoda hidratacije suhog fosfolipidnog filma, takozvanom film metodom. Uzorak s fosfolipidima i lipofilnim lijekom otopi se u organskom otapalu u velikoj okrugloj tikvici. Nakon otparavanja otapala, na stijenkama zaostaje tanak suhi fosfolipidni film velike površine. Dodatkom vodenog medija, dolazi do hidratacije fosfolipida i spontanog nastanka disperzije liposoma. Postupak se provodi pri temperaturama višim od temperature faznog prijelaza (T_c) korištenih fosfolipida. Liposomi dobiveni ovom metodom su multilamelarni i pogodni za uklapanje lipofilnih lijekova.

Zbog heterogenosti u veličini dobivenih liposoma (do 10 μm) te visokog indeksa polidisperznosti, nužna je daljnja obrada dobivenih formulacija. Homogenizacija se provodi soniciranjem ili procesom ekstruzije koristeći polikarbonatne membrane definirane veličine pora, čime se dobivaju unilamelarni ili oligolamelarni liposomi homogenijeg sastava (Vanić, 2012).

1.3.2. Vezikularni fosfolipidni gelovi

Vezikularni fosfolipidni gelovi su viskozne disperzije velike količine fosfolipida u vodenom mediju kao što je pufer ili otopina lijeka. Priređuju se jednostavnim postupkom bez korištenja organskih otapala, biokompatibilni su, mogu se primijeniti različitim putevima te zapravo predstavljaju skladišni oblik liposoma. Kao depo pripravci, omogućavaju produljeno

oslobađanje uklopljenog lijeka te provedena istraživanja pokazuju velik potencijal dermalne primjene lijekova uklopljenih u VFG-ove (Breitsamer i Winter, 2019).

VFG-ovi su polučvrste konzistencije te se sastoje od fosfolipidnih vezikula i lamelarnih struktura. Utvrđeno je da VFG-ovi građeni od 35 do 40 % fosfolipida imaju manje i homogenije vezikule, dok oni s većim postotkom, imaju veće, heterogenije vezikule i ravne lamelarno poredane fosfolipide. Vezikule unutar VFG-a su gusto zbijene, a vodeni medij ispunjava jezgru i male odjeljke između vezikula. Vodeni prostor između vezikula sveden je na minimum te postoje značajne steričke interakcije između hidrofilnih skupina fosfolipida koji grade vezikule. Spomenute interakcije doprinose posebnim reološkim svojstvima VFG-ova, usporedivim s hidrogelovima u koje su uklopljeni pojačivači viskoznosti. Takva struktura i svojstva formulacija VFG-ova omogućavaju ne samo uklapanje lijeka u jezgru vezikule, već i u vanjsku lamelarnu strukturu gela. Izvan i unutar vezikula unutar VFG-a ne postoji koncentracijski gradijent lijeka, stoga je učinkovitost uklapanja lijeka značajno veća u odnosu na liposome u disperziji (Breitsamer i Winter, 2019).

Massing i suradnici su prvi 2008. godine opisali VFG-ove kao spremišni oblik malih, unilamelarnih liposoma. Razrjeđivanjem VFG-ova s vodenim medijem uz miješanje, polučvrsti VFG prelazi u disperziju liposoma (Massing i sur., 2008). Nastale liposome moguće je odijeliti od okolnog medija i neuklopljenog lijeka određenim metodama odjeljivanja, poput primjerice metode centrifugiranja minikolone (Vanić i sur., 2013).

Postoje tri glavne metode pripreme vezikularnih fosfolipidnih gelova: miješanjem pomoću magnetskih mješača, visokotlačnom homogenizacijom te dualnim centrifugiranjem. Visokotlačna homogenizacija je prva opisana metoda pri kojoj se fosfolipidi dispergirani u otopini lijeka prenose u visokotlačni homogenizator te se homogenizacija najčešće provodi pri tlaku od 70 MPa u više ciklusa. Dobivaju se manje, po veličini homogenije vezikule. Ova metoda prikladna je za pripremu velikih količina VFG-ova, ali zbog primjene velike sile, metoda može uzrokovati razgradnju osjetljivih molekula ukoliko se uklapaju u takve formulacije. S ciljem sprječavanja degradacije lijeka, homogenizacija se provodi u kratkim vremenskim intervalima. S druge strane, miješanjem fosfolipida i vodenog medija na magnetskom mješaču, bez primjene homogenizatora, dobivaju se veće i heterogenije vezikule zbog primjene manje sile. Dualno centrifugiranje omogućuje aseptičku izradu te se primjenjuje veća energija u svrhu boljeg miješanja i homogenizacije formulacije (Breitsamer i Winter, 2019).

1.4. Ispitivanja biokompatibilnosti *in vitro* na staničnoj kulturi HaCaT

1.4.1. Biokompatibilnost

Kontakt stranog tvari s ljudskim tijelom uzrokuje kaskadu reakcija koja rezultira prepoznavanjem materijala kao strane tvari. Odgovor tijela na stranu tvar ovisi o različitim čimbenicima kao što su mjesto interakcije te svojstva stranog materijala poput građe i mehaničkih karakteristika. Odsutnost citotoksičnog učinka uz zadržanu funkcionalnost stanica ili tkiva naziva se biokompatibilnost. U procjeni biokompatibilnosti provode se različiti testovi poput citotoksičnosti, senzibilizacije, iritacije, akutne i kronične toksičnosti, genotoksičnosti, mutagenosti itd. Međunarodna organizacija za standardizaciju (ISO) određuje standarde u ispitivanjima biokompatibilnosti *in vitro* te je trenutno na snazi standard ISO 10993 (Peters i sur., 2021).

Odsutnost citotoksičnosti određene *in vitro* ključan je preduvjet za postizanje biokompatibilnosti tvari, pa tako i lijekova. Glavni koraci u određivanju citotoksičnosti propisani su standardom ISO 10993-5 (*Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods*). U procjeni citotoksičnosti koriste se kvalitativne ili kvantitativne metode. Kvalitativne metode uključuju vizulani pregled morfološke građe stanica pomoću mikroskopa, dok kvantitativne mjerenjem vrijednosti određenih parametara otkrivaju promjene u proliferaciji ili metabolizmu stanica. U mjerenjima se upotrebljavaju pozitivne i negativne kontrole s ciljem dokazivanja ponovljivosti testa. Pozitivna kontrola je materijal ponovljivog citotoksičnog učinka i važna je za osjetljivost metode, dok negativna kontrola uključuje stanice netretirane ispitivanom tvari te predstavlja 100%-tnu vijabilnost stanica. Postoji niz komercijalno dostupnih testova koji mogu detektirati narušeni integritet stanične membrane (detekcija laktat dehidrogenaze), promjene u metabolizmu (test redukcije tetrazolijeve soli (MTT test), proliferaciji (brojanje stanica) ili apoptozu (detekcija kaspaze) te tako dokazati toksično djelovanje agensa na stanicu (Peters i sur., 2021; <https://www.iso.org/home.html>).

Prednosti *in vitro* ispitivanja naspram *in vivo* su brojne. Etički gledano, prednost pokazuju *in vitro* testovi jer zaobilaze korištenje životinja u istraživanjima. Nadalje, *in vitro* ispitivanja su jeftinija, brže se izvode, reproducibilna su i visokog stupnja standardiziranosti. S druge strane, postoje i nedostaci u odnosu na *in vivo* istraživanja. Testovi *in vivo* odgovaraju na tkivno-specifičnu toksičnost, detektiraju adaptivni odgovor te metaboličke promjene unutar

živog organizma što se *in vitro* istraživanjima ne može doznati (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

1.4.2. HaCaT stanična linija

HaCaT stanična linija predstavlja spontano nastale žive humane keratinocite koji imaju karakteristike keratinocita bazalnog sloja. Razvijeni su diferencijacijom iz izoliranih keratinocita odraslog čovjeka pri niskoj koncentraciji kalcija i visokoj temperaturi, što je sadržano i u nazivu - „Ha“ označava odrasle ljudske keratinocite, „Ca“ kalcij, a „T“ temperaturu. Kao i bazalni keratinociti u epidermisu, HaCaT stanice imaju sposobnost proliferacije i diferencijacije, stoga se često koriste u *in vitro* testovima za dokazivanje citotoksičnosti različitih kemikalija na koži, pa tako i lijekova (Lehmann, 1997).

1.4.3. Test redukcije tetrazolijeve soli (MTT test)

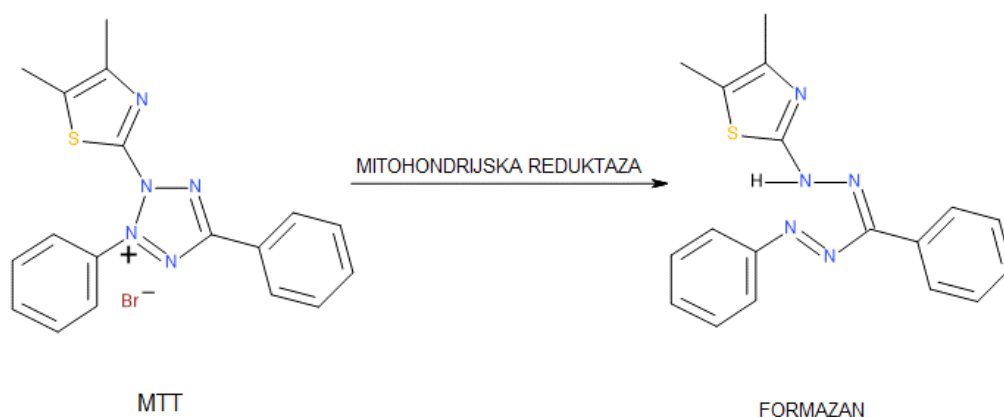
Test redukcije tetrazolijeve soli (MTT test) je najčešće korišten kvantitativni *in vitro* test za dokazivanje citotoksičnosti. Temelj ispitivanja je da žive, metabolički aktivne stanice uzrokuju redukciju molekule MTT reagensa te dolazi do nastanka formazana, produkta ljubičasto-plave boje. Nastali formazan mjeri se kolorimetrijski te se ovisno o rezultatima zaključuje o vijabilnosti stanica, njihovoj metaboličkoj aktivnosti, odnosno citotoksičnosti lijekova (Ghasemi i sur., 2021).

MTT reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolijev bromid) mutagena je tetrazolijeva sol žute boje u čvrstom agregatnom stanju. Zbog karakteristične strukture i lipofilnih značajki, prolazi kroz staničnu, ali i mitohondrijsku membranu. U mitohondrijima i drugim staničnim organelima živih stanica prisutne su aktivne oksidoreduktaze, dehidrogenaze i donori elektrona koji uzrokuju redukciju N-N veze tetrazolskog prstena MTT-a te posljedično nastaje obojeni formazan. Što su stanice metabolički aktivnije, intenzitet ljubičasto-plavog obojenja bit će veći. U mrtvim stanicama, koje nastaju kao posljedica djelovanja citotoksičnog agensa, reduktaze nisu aktivne te formazan i ljubičasto-plavo obojenje neće nastati (Ghasemi i sur., 2021).

MTT reagens najčešće se priprema u koncentraciji između 0,2 i 0,5 mg/mL, dispergiranjem reagensa u fosfatnom puferu. Pripremljeni MTT dodaje se u staničnu kulturu nakon tretiranja stanica sa citotoksičnim agensom te inkubira 0,5 do 4 sata na 37 °C. Nakon inkubacije, odsiše se tekućina iznad stanica nakon čega se netopljivi formazan istaložen u stanicama solubilizira

otapalom poput izopropanola ili dimetil sulfoksida, a zakiseljavanjem tog otapala smanjuje se mogućnost interferencija pri mjerenju. Količina nastalog formazana proporcionalna je broju živih stanica te se određuje mjerenjem promjena u apsorpciji stanica tretiranih uzorkom u odnosu na netretiranu negativnu kontrolu (100 %-tna vijabilnost stanica). Mjerenje se provodi pomoću spektrofotometra za očitavanje ploča na valnoj duljini maksimuma apsorpcije formazana od 570 nm. Rezultat se izražava u postotku, kao omjer apsorpcije tretiranih i netretiranih stanica (negativne kontrole) (Riss i sur., 2013). Smanjenje vijabilnosti za više od 30 %, odnosno vijabilnost manja od 70%, prema standardu ISO 10993-5, interpretira se tako da agens djeluje citotoksično na stanice (<https://www.iso.org/home.html>).

Različiti čimbenici mogu utjecati na intenzitet izmjerenog signala, odnosno na apsorpciju. Koncentracija MTT-a, vrijeme inkubacije, broj vijabilnih stanica i metabolička aktivnost važni su parametri koje treba uzeti u obzir prilikom optimizacije metode s ciljem da se dobije adekvatna količina produkta formazana koji se može detektirati. Uvjeti uzgoja stanične kulture mogu promijeniti metabolizam stanica te tako utjecati na prevođenje MTT-a u formazan. Primjerice, potpuno konfluentnim stanicama se smanjuje metabolička aktivnost zbog inhibicije rasta uzrokovane kontaktom stanica. Kontaktnom inhibicijom smanjuje se koncentracija nastalog formazana te posljedično neće postojati linearan odnos između koncentracije produkta i broja živih stanica. Isto tako, do gubitka linearosti može dovesti i promjena pH ili nedostatak esencijalnih tvari poput glukoze (Riss i sur., 2013).



Slika 4. Mehanizam redukcije MTT reagensa.
Izrađeno pomoću programa BIOVIA Draw 2017.

1.5. Timol

Timol, odnosno 2-izopropil-5-metilfenol, jedan je od monoterpenskih fenola zaslužnih za miris eteričnih ulja biljaka poput majčine dušice (*Thymus vulgaris*) i mravinca (*Origanum vulgare*) iz porodice *Labiatae*. Pokazuje niz klinički dokazanih farmakoloških svojstava kao što su antimikrobna, antiseptička, fungicidna, spazmolitička te antiparazitska svojstva (Mujezinović i sur., 2018). U novije vrijeme govori se o protuupalnim i antioksidativnim učincima te primjeni timola kao konzervansa u hrani s GRAS certifikatom zbog spomenutog antimikrobnog i antioksidativnog djelovanja (Escobar i sur., 2020). Danas se primjenjuje kod ljudi i životinja peroralno, za lokalnu terapiju infekcija kože, za njegovu usne šupljine te inhalaciju kod respiratornih problema. Komercijalno su dostupni različiti farmaceutski oblici poput eteričnih ulja te tekućih i suhih ekstrakata koji se nerijetko uklapaju u kapsule, masti ili sirupe (Mujezinović i sur., 2018).

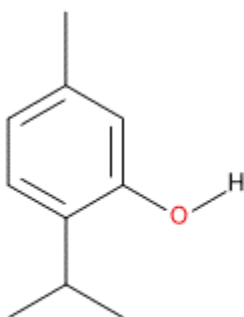
Timol ima širok antimikrobni spektar te inhibira rast Gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus cereus*,...) i Gram-negativnih bakterija (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimuium Ty2*, *Pseudomonas aeruginosa*,...). Mehanizam antibakterijskog učinka temelji se na promjeni sastava lipida stanične membrane bakterija te interakciji sa molekulom DNA. Te interakcije dovode do promjene u fluidnosti membrane i izlaska staničnog materijala, inhibira se agregacija DNA te dolazi do lize bakterijske stanice (Escobar i sur., 2020). Zabilježena minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) slobodnog timola naspram *Salmonella spp.* iznosila je 331 µg/mL (Heckler i sur., 2020). Također je primijećeno da primjenom timola dolazi do smanjenja postojećega edema i nakupljanja upalnih stanica na ozlijeđenom tkivu, stoga se potencijalno govori o njegovom protuupalnom učinku. Antiinflamatorni učinak pripisuje se inhibiciji aktivacije proupalnog nuklearnog faktora NF-κB (Escobar i sur., 2020).

Farmakokinetika timola proučavana je kod pasa i ljudi nakon peroralne primjene. Brzo se apsorbira iz crijeva i maksimalnu koncentraciju u krvi postiže nakon 2 sata. Metabolizira se u jetri oksidacijom i glukuronidacijom uz poluvrijeme eliminacije od 10,2 sata. Već nakon 24 sata od primjene, timol se izlučuje urinom najvećim dijelom u obliku metabolita glukuronske i sulfatne kiseline, a manje u nepromijenjenom obliku (Mujezinović i sur., 2018).

Uglavnom se navodi da sistemskom primjenom timol ne pokazuje svojstva teratogenosti, kancerogenosti i mutagenosti. Unatoč spomenutom, provedena *in vitro* istraživanja na embrionalnim stanicama hrčka otkrila su da je timol uzrokovao blagu transformaciju stanica te citotoksičnost u koncentraciji od 10 do 30 µg/mL. Kancerogenost je ispitivana na miševima

intraperitonealnom aplikacijom timola te nije dokazana povećana incidencija tumora pluća. Mutagenost nije dokazana niti jednim provedenim testom (Mujezinović i sur., 2018).

Dermalna primjena timola pokazala je povoljan učinak kod infektivnih bolesti kože te cijeljenja opekline i rana zbog antimikrobnih, protuupalnih i antioksidativnih svojstava. Unatoč povoljnim učincima, ispitivanja biokompatibilnosti timola na HaCaT staničnim linijama kože pokazala su iritacijski i citotoksični učinak već pri koncentraciji 0,08 $\mu\text{L/mL}$ (Rodrigues i sur., 2019), dok su Singhal i suradnici (2021) pokazali da timol posjeduje citotoksični efekt na HaCaT staničnoj liniji pri koncentraciji većoj od 120 $\mu\text{g/mL}$. Nadalje, sastavnice eteričnih ulja, pa tako i timol, lako su hlapljive komponente koje se zbog topline, svjetla, vlage ili kisika vrlo lako razgrade. S ciljem smanjenja toksičnosti i povećanja stabilnosti, inovativni načini dermalne primjene timola uključuju uklapanje bioaktivne komponente u lipidne formulacije nanometarske veličine čestica. Takvim pristupom povećava se stabilnost uklopljenog timola, a moguće je i postizanje produljenog oslobađanja i dostava timola u dublje slojeve kože (Pivetta i sur., 2018). Zanimljivo, prema istraživanju Hecklera i suradnika (2020), uklapanjem u liposomske čestice smanjio se antimikrobni učinak timola (zabilježene su veće MIK vrijednosti u odnosu na čisti timol) pa se sukladno tome smatra da bi se uklapanjem u takve i slične formulacije potencijalno smanjila i njegova citotoksičnost. Naime, uklapanje u nanočestice može bitno mijenjati interakciju timola i stanica kože. Uklapanje timola u liposome, vezikularne fosfolipidne gelove i druge oblike fosfolipidnih formulacija predstavlja iskorak u iskorištavanju višestrukih bioloških djelovanja timola uz optimizaciju sigurnosnih aspekata primjene (Pivetta i sur., 2018).



TIMOL

Slika 5. Kemijska struktura timola.
Izrađeno pomoću programa BIOVIA Draw 2017.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Timol je jedna od glavnih sastavnica eteričnih ulja iz porodice *Labiatae* koji pokazuje antimikrobna, antiseptička, fungicidna te potencijalno protuupalna i antioksidativna svojstva. Zahvaljujući opisanim svojstvima, danas se sve više istražuje korist primjene timola kod kožnih bolesti, infekcija, rana i opekline. U odnosu na sistemsku primjenu timola, koja podrazumijeva veći rizik od eventualnih nuspojava, uključujući moguću citotoksičnost i neželjene transformacije stanica, lokalna dermalna primjena omogućuje ciljano lokalno djelovanje timola čime bi se potencijalno unaprijedila terapija kožnih oboljenja. Međutim, i lokalna topikalna primjena na kožu nosi određeni rizik od nuspojava, budući da su neka istraživanja pokazala citotoksičnost i iritabilna svojstva timola nakon primjene na kožu.

Uklapanjem timola u terapijske sustave temeljene na fosfolipidima, moguće je povećati topljivost, postići kontrolirano i/ili produljeno oslobađanje te lokalizirano djelovanje lijeka u koži, bez sistemske apsorpcije. Također, takvi terapijski sustavi modificiraju kontakt timola s tretiranim tkivom, čime se smanjuje rizik lokalnih reakcija na koži. Štoviše, zahvaljujući svom fosfolipidnom sastavu, takve formulacije u pravilu pokazuju povećanu biokompatibilnost u odnosu na slobodni lijek (Pivetta i sur., 2018).

Osnovna hipoteza ovog rada bila je da se uklapanjem timola u fosfolipidne formulacije-vezikularne fosfolipidne gelove i liposome analognog sastava, može unaprijediti biokompatibilnost timola u odnosu na stanice kože, čime bi se omogućila sigurnija primjena timola lokalno na kožu. Cilj ovog istraživanja stoga je bio potvrditi navedenu hipotezu, odnosno ispitati biokompatibilnost priređenih vezikularnih fosfolipidnih gelova i liposoma s uklopljenim timolom na keratinocitima HaCaT stanične linije *in vitro*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Instrumenti i pribor korišten u ispitivanju:

- analitička vaga (Analytical Balance ML204T/00, Mettler-Toledo, Švicarska)
- magnetska mješalica (FagronLab PRO-DMS, Fagron, Nizozemska)
- visokotlačni homogenizator (LM20 Microfluidizer, Microfluidics, Sjedinjene Američke Države)
- ultrazvučna kupelj (Sonorex Digiplus DL 510 H, Bandelin Electronic GmbH & Co, Njemačka)
- rotirajući vakuum uparivač (Büchi Rotavapor R-200, Büchi, Labortechnik AG, Švicarska)
- zetasizer (Zetasizer Ultra ZSU3305, Malvern Instruments, Velika Britanija)
- ručni mini-ekstruder (LiposoFast Basic, Avestin, Kanada)
- polikarbonatni membranski filteri, 400 i 100 nm (Liposofast, Avestin, Kanada)
- UV/Vis spektrofotometar (Cary 60 UV-Vis, Agilent, Nizozemska)
- centrifuga (Centrifuge 5702 R, Eppendorf AG, Njemačka)
- inkubator (HERAcell vios 160i CO₂ Incubator, Thermo Scientific, Njemačka)
- sterilne mikrotitarske pločice s 96 jažica (Nunclon Surface, Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države)
- sterilne posude za uzgoj stanica (Techno Plastic Products AG, Švicarska)
- svjetlosni mikroskop (Primovert microscope, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Njemačka)
- multifunkcionalni čitač ploča (SpectraMax i3x, Molecular Devices, Sjedinjene Američke Države)

Kemikalije korištene u ispitivanju:

- sojin fosfatidilkolin (SPC), S100 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- kolesterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- timol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- propilenglikol (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- etanol 96 % (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

- keratinociti stanične linije HaCaT (Cell Line Services, Njemačka)
- fosfatni pufer (PBS 0,01 M, pH = 7,4) (Santa Cruz Technology, Texas, Sjedinjene Američke Države)
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- tripsin 0,125 %-tni (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- Dulbekov hranidbeni medij s visokom dozom glukoze (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- 10 %-tni fetalni teleći serum (FBS) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- 1 %-tna smjesa antibiotika penicilina, streptomocina i amfotericina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- izopropanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Fosfatni pufer (PBS 0,01 M, pH= 7,4) priređen je razrjeđivanjem 10x koncentriranog PBS-a vodom za injekcije (HZTM, Zagreb, Hrvatska) u omjeru 1:10.

Kemikalije upotrijebljene u ispitivanjima bile su u skladu s farmaceutskim zahtjevima čistoće. Voda korištena u ispitivanjima bila je pročišćena voda.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema vezikularnih fosfolipidnih gelova

Vezikularni fosfolipidni gelovi (VFG-ovi) izrađeni su metodom hidratizacije lipidnih sirovina u otopini lijeka. Za izradu formulacije T3 u smjesu sojinog fosfatidilkolina i kolesterola, dodano je 1,2 g štok otopine timola u propilenglikolu. Korištena štok otopina timola u propilenglikolu pripremljena je otapanjem 0,75 g timola u 1 g propilenglikola. Na magnetski mješač u čašicu je stavljena smjesa sojinog fosfatidilkolina, kolesterola i otopine timola te je smjesa miješana uz zagrijavanje na 50 °C. Nakon homogenizacije smjese, u obrocima po 1 mL dodana je pročišćena voda zagrijana na 50 °C, uz konstantno miješanje. Uzorci su pohranjeni u hladnjak na 24 sata, a idući dan formulacije su zagrijane na 25 °C te homogenizirane pomoću visokotlačnog homogenizatora pri tlaku od 500 bara. VFG bez uklopljenog kolesterola

(formulacija T2) izrađen je identičnim postupkom, samo bez dodatka kolesterola u lipidnu smjesu. Sastav dobivenih VFG-ova naveden je u tablici (*Tablica 1*).

Tablica 1. Sastav vezikularnih fosfolipidnih gelova

Formulacija VFG	SPC (g)	Kolesterol (g)	Timol (g)	Propilenglikol (g)	Voda (g)
T2	9,60	-	0,51	0,69	19,20
T3	8,59	0,99	0,51	0,69	19,22

T2, VFG bez kolesterola; T3, VFG s kolesterolom; VFG, vezikularni fosfolipidni gel; SPC, sojin fosfatidilkolin.

3.2.2. Priprema liposoma

Formulacije liposoma s uklopljenim timolom izrađene su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tj. film metodom (Vanić, 2012). SPC i timol (za formulaciju LT2), odnosno SPC, kolesterol i timol (za formulaciju LT3) otopljeni su u 30 mL koncentriranog etanola u tikvici okruglog dna, uz primjenu ultrazvučne kupelji. Otparavanje organskog otapala (etanol), provedeno je pomoću rotacijskog vakuumskog uparivača pri temperaturi od 40 °C za formulaciju bez kolesterola (LT2), odnosno pri 60 °C za onu s dodatkom kolesterola (LT3). Nastali suhi fosfolipidni film hidratiziran je dodatkom 10 mL 3,4 %-tne smjese propilenglikola u vodi. Pomoću ručnog mini-ekstrudera, izrađene liposomske disperzije ekstrudirane su tri puta kroz polikarbonatne membrane promjera pora 400 nm i još tri puta kroz polikarbonatne membrane promjera pora 100 nm. Sastav liposomskih formulacija s uklopljenim timolom odabran je tako da odgovara sastavu VFG-ova, te je prikazan u Tablici 2.

Tablica 2. Sastav liposoma s uklopljenim timolom

Formulacija liposoma	SPC (g)	Kolesterol (g)	Timol (g)	Propilenglikol (g)	Voda (g)
LT2	1,60	-	0,09	0,11	3,20
LT3	1,43	0,17	0,09	0,11	3,20

LT2, liposomi bez kolesterola; LT3, liposomi s kolesterolom; SPC, sojin fosfatidilkolin.

3.2.3. Priprema otopine timola u propilenglikolu

Otopina timola u propilenglikolu (T/PG) korištena je kao kontrolna otopina u ispitivanju citotoksičnosti timola. Kontrolni uzorak pripremljen je otapanjem 0,75 g timola u 1,75 g propilenglikola po uzoru na štok otopinu korištenu u pripremi formulacija VFG-ova.

3.2.4. Određivanje veličine liposoma i indeksa polidisperznosti

U mjerenju srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti liposoma korištena je metoda fotonske korelacijske spektroskopije. Uređaj na kojem su izvršena mjerenja bio je Zetasizer, a uzorci su analizirani 24 sata nakon pripreme pri temperaturi od 25 °C te kutu raspršenja od 90°. Uzorci su netom prije mjerenja razrijeđeni vodom do blago opalescente boje uz miješanje na magnetskom mješaču pri 25 °C za fosfolipidne formulacije bez kolesterola (T2 i LT2), odnosno pri 60 °C za one s kolesterolom (T3 i LT3). Za liposomske formulacije (LT2 i LT3) mjerenje je izvršeno prije i nakon ekstruzije.

3.2.5. Određivanje zeta potencijala liposoma

Zeta potencijal mjeren je pomoću uređaja Zetasizer uz korištenje protočne kivete s optičkim modulatorom u području od 1000 Hz. U svrhu kalibracije, korišten je standard (Malvern Zeta Potential Transfer Standard, Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija) s unaprijed određenom vrijednošću zeta potencijala od -50 ± 5 mV. Uzorci su pripremljeni na način da je mala količina uzorka razrijeđena do blago opalescentne boje uz miješanje na magnetskom mješaču pri 25°C za formulacije bez kolesterola (T2 i LT2), odnosno pri 60°C za one s kolesterolom (T3 i LT3). Uzorcima LT2 i LT3 zeta potencijal mjeren je nakon provedene ekstruzije.

3.2.6. Ispitivanje citotoksičnosti uklopljenog timola *in vitro*

i) Stanične linije i uzgoj stanica

U ispitivanjima citotoksičnosti timola uklopljenog u fosfolipidne formulacije, korišteni su keratinociti kože HaCaT stanične linije. Stanice su bile uzgajane prema protokolu koji je propisao proizvođač, čuvane u sterilnim uvjetima u inkubatoru pri 37 °C, 95 % relativne vlažnosti i 5 % CO₂. Površina posude u koju su se stanice nasađivale bila je 150 cm². Korišteni

medij za uzgoj stanica bio je Dulbekov hranidbeni medij s visokom dozom glukoze u koji je dodan 10 %-tni fetalni teleći serum te 1 %-tna smjesa antibiotika penicilina, streptomicina i amfotericina B. Hranidbeni medij se mijenjao se redovito svaka 2-3 dana, a rast stanica praćen je svjetlosnim mikroskopom. Kad bi se postiglo 80-90 % konfluentnosti, stanice su bile presađene. Prilikom presađivanja, hranidbeni medij bio je uklonjen. Stanice su se zatim ispirale PBS-om koji se potom odsisao. Dodatkom 0,02 % EDTA stanice su stavljene na inkubaciju na 37 °C/3 minute. Nakon toga, dodana je 0,125 %-tna otopina tripsina uz inkubaciju (37 °C, 5 minuta), povremeno protresivanje tikvice te praćenje odvajanja stanica od podloge mikroskopom. Tripsin je inaktiviran dodatkom hranidbenog medija (DMEM + 10%-tni FBS) u volumnom omjeru 3:2 (medij:tripsin).

ii) Nasađivanje stanica na ploče i tretiranje

Stanice su nasađene na ploče od 96 jažica s gustoćom od $2,2 \times 10^4$ stanica/jažica. Ploče su inkubirane 48 h. Nakon toga stanice su bile spremne za tretiranje.

U uzorcima sa kojima su tretirane stanice (T2, T3, LT2, LT3) je spektrofotometrijski određena koncentracija timola pomoću prethodno izrađenog kalibracijskog pravca. Liposomske formulacije su odijeljene od neuklopljenog lijeka metodom centrifugiranja minikolone (Palac i sur., 2014). Prije nanošenja na stanice, pripremljeni uzorci su razrijeđeni hranidbenim medijem DMEM bez fetalnog telećeg seruma tako da je za svaki uzorak dobiven koncentracijski niz u rasponu od 7,82 do 4000 $\mu\text{g/mL}$. Negativna kontrola bile su stanice tretirane samo s DMEM medijem.

Prije tretiranja, stanicama je odsisan medij, nakon čega je u svaku jažicu dodano po 100 μL uzorka, odnosno DMEM za negativnu kontrolu, te su ploče inkubirane 2 h. Po isteku 2 h, stanicama su uklonjeni tretirajući agensi te je svaka jažica pažljivo isprana s 100 μL PBS-a koji je zatim odsisan. U zadnjem koraku u jažice je dodan hranidbeni medij (DMEM + 10 % FBS) te su ploče inkubirane tijekom iduća 24 h.

iii) Test redukcije tetrazolijeve soli (MTT test)

MTT reagens korišten u svrhu dokazivanja citotoksičnosti pripremljenih uzoraka na staničnoj kulturi HaCaT. Priređena je otopina MTT-a u PBS-u koncentracije 5 mg/mL. MTT je odvagano u sterilnu epruvetu sa čepom uz nošenje maske i rukavica. U sterilnim uvjetima *laminar flow* sustava dodan je PBS te je otopina stavljena na ultrazvučnu kupelj do potpunog otapanja reagensa. Nakon tretiranja stanica s uzorcima, u svaku jažicu ploča dodano je po

10 μL priređene otopine MTT-a te su ploče sa stanicama stavljene na inkubaciju 30 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, medij iz jažica je uklonjen te je u svaku jažicu dodano po 100 μL kiselog izopropanola u svrhu otapanja na dnu istaloženog ljubičasto-plavog formazana. Izmjerena je apsorbancija na 570 nm pomoću multifunkcionalnog čitača ploča. Metabolička aktivnost tretiranih stanica izražena je u odnosu na aktivnost stanica koje nisu bile tretirane uzorcima, već su sadržavale samo hranidbeni medij (negativna kontrola), te su predstavljale 100 %-tnu vijabilnost. Test je proveden u kvadriplikatu.

3.2.7. Statistička obrada podataka

Rezultati dobiveni ispitivanjem pripremljenih uzoraka na HaCaT staničnoj liniji statistički su analizirani pomoću dva testa: *one-way* ANOVA test i *Tukey's multiple comparison test* (za usporedbu 3 ili više skupina podataka). Razina značajnosti (α) bila je 5 %, odnosno 0,05, u svim testovima. Obrada podataka i razine značajnosti određene su pomoću softverskog programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Sjedinjene Američke Države).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Fizikalno-kemijska svojstva fosfolipidnih formulacija

VFG-ovi su izrađeni miješanjem komponenti na magnetskom mješaču, a liposomske formulacije priređene su film metodom. U svim formulacijama udio lijeka u iznosio je 1,7 % (m/m), a lipida 32 %. S ciljem dobivanja manjih vezikula i homogene distribucije veličine čestica, uzorci su homogenizirani pomoću visokotlačnog homogenizatora (VFG-ovi), odnosno korištenjem ručnog mini-ekstrudera (liposomi). Izmjereni srednji promjeri vezikula i indeksi polidisperznosti (PDI) prikazani su u Tablici 3, a zeta potencijala u Tablici 4.

Tablica 3. Srednji promjer vezikula i indeks polidisperznosti

Fosfolipidna formulacija	Srednji promjer (nm)		Indeks polidisperznosti	
T2*	140 ± 4		0,17 ± 0,04	
T3*	151 ± 3		0,27 ± 0,01	
	prije ekstruzije	nakon ekstruzije	prije ekstruzije	nakon ekstruzije
LT2	1314 ± 181	144 ± 1	0,38 ± 0,06	0,09 ± 0,01
LT3	3496 ± 505	164 ± 2	0,65 ± 0,48	0,12 ± 0,04

*T2, VFG bez kolesterola; T3, VFG sa kolesterolom; LT2, liposomi bez kolesterola; LT3, liposomi s kolesterolom. Navedene vrijednosti prikazuju srednju vrijednost ± S.D. (n=3, srednji promjer, indeks polidisperznosti). *Srednji promjer i indeks polidisperznosti T2 i T3 formulacija mjereni su nakon homogenizacije u visokotlačnom homogenizatoru i nakon razrjeđivanja vodom.*

Veličina i indeks polidisperznosti liposoma ovise o (fosfo)lipidnom sastavu liposoma, duljini hidrofobnog lanca fosfolipida, metodi izrade i temperaturi. Dodatkom kolesterola u fosfolipidni dvosloj, srednji promjer liposoma postaje veći. Kolesterol povećava krutost membrane, stoga planarni dvosloji „narastu“ do veće veličine prije nego što postane energetski povoljnije savijati se i stvoriti sferični liposom (Zook i Vreeland, 2010).

Kao što je prikazano u Tablici 3, srednji promjer vezikula nastalih hidratacijom VFG formulacije T2 iznosi 140 nm, a za formulaciju s kolesterolom (T3) iznosi 151 nm. T2 uzorci su očekivano pokazali manji srednji promjer vezikula i indeks polidisperznosti, jer nisu sadržavali kolesterol pa je dvosloj bio elastičniji, stoga se prije postiglo energetski povoljno stanje za nastanak vezikula (Zook i Vreeland, 2010).

Liposomske formulacije LT2 i LT3 pripremljene su film metodom. Hidratacijom suhog fosfolipidnog filma izvorno nastaju veliki multilamelarni liposomi (Vanić, 2012), stoga je očekivano da su mjerene veličine liposoma u formulacijama u rasponu od 1314 do 3496 nm, odnosno veće od 1 μm . Veći indeks polidisperznosti kod ne-ekstrudiranih liposoma ukazuje na široku distribuciju u srednjem promjeru liposoma. Srednji promjer liposoma uzorka LT3 veći je u odnosu na promjer liposoma LT2 radi prisutnosti kolesterola (Zook i Vreeland, 2010). Da bi se homogenizirale liposomske disperzije i dobila veličina čestica prikladna za dermalnu primjenu (Vanić, 2012), izvorne formulacije su ekstrudirane 3x kroz membrane promjera pora 400 nm i 100 nm. Nakon ekstruzije, dobiveni su unilamelarni liposomi značajno manjeg srednjeg promjera (144 nm za LT2 i 164 nm za LT3) te značajno manjeg PDI od 0,12, odnosno 0,09 ($p < 0,05$). Također, formulacija LT3 je i nakon ekstruzije imala veći srednji promjer liposoma od LT2, što se pripisuje prisutnosti kolesterola ugrađenog u fosfolipidni dvosloj.

Tablica 4. Zeta potencijal vezikula

Fosfolipidna formulacija	Zeta potencijal (mV)*
T2	-2,08 \pm 0,36
T3	-3,82 \pm 0,85
LT2	-19,4 \pm 1,09
LT3	-21,7 \pm 1,54

*T2, VFG bez kolesterola; T3, VFG sa kolesterolom; LT2, liposomi bez kolesterola; LT3, liposomi sa kolesterolom. Navedene vrijednosti prikazuju srednju vrijednost \pm S.D. ($n=3$, zeta potencijal). *Zeta potencijal mjereno je nakon homogenizacije/ekstruzije formulacija, te nakon razrjeđivanja VFG-ova vodom.*

Interakcija između liposoma i lijeka za uklapanje, sudbina liposoma *in vivo* te njihova stabilnost, u ovisnosti su o površinskom naboju liposoma, tj. zeta potencijalu pojedine liposomske formulacije (Torchilin i Weissig, 2003). Vrijednosti zeta potencijala prvenstveno ovise o sastavu fosfolipidnih dvosloja. Liposomske disperzije s vrijednošću zeta potencijala pozitivnijim od +30 mV ili negativnijim od -30 mV smatraju se stabilnima. Liposomske formulacije s iznosom zeta potencijala koji je izvan ovih graničnih vrijednosti sklonije su agregaciji i flokulaciji, te je potrebno provesti ispitivanja stabilnosti (Samimi i sur., 2019). Nadalje, istraživanja Liu i suradnika potvrdila su da prisutnost kolesterola u fosfatidilkolinskom dvosloju zeta potencijal čini negativnijim jer njegova ugradnja smanjuje afinitet prema kationima iz otopine pa na površini vezikula postoji višak negativnog naboja. Negativni naboj

na površini uzrokuje međusobno odbijanje liposoma i posljedično stabilnost formulacije (Liu i sur., 2020). Sva mjerenja su provedena nakon ekstruzije formulacija jer zeta potencijal ne ovisi o veličini vezikula.

Izmjerene vrijednosti zeta potencijala su očekivano negativne radi prisutnosti negativno nabijenog sojinog fosfatidilkolina te su se kretale u rasponu od -2,08 mV za T2 do -21,7 mV za LT3 formulaciju. Primijećeno je da su uzorci koji sadrže kolesterol u lipidnom dvosloju negativnijeg zeta potencijala, a takvi rezultati u skladu su s prethodnim studijama (Liu i sur., 2000.). Liposomske formulacije LT2 i LT3 također su negativnijeg zeta potencijala u odnosu na formulacije VFG-ova T2 i T3, što može biti posljedica različitih metoda pripreme uzoraka.

4.2. Biokompatibilnost fosfolipidnih formulacija s HaCaT staničnom linijom *in vitro*

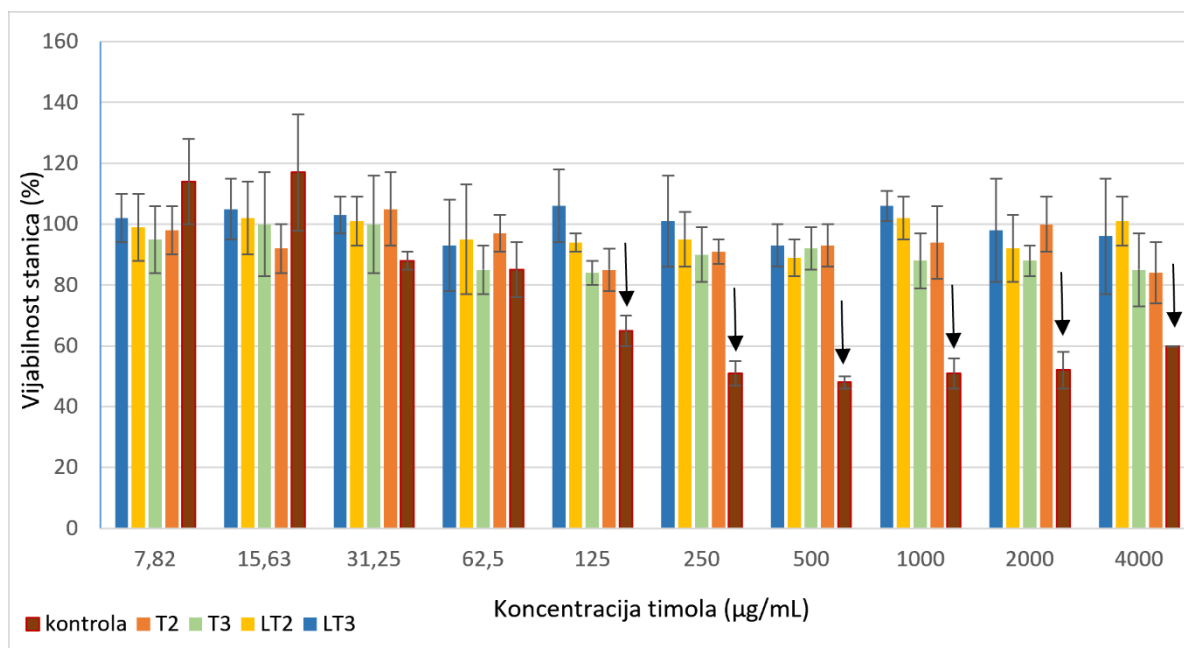
Biokompatibilnost liposomskih formulacija s uklopljenim timolom ispitana je na humanim keratinocitima HaCaT stanične linije u *in vitro* uvjetima. U svrhu određivanja metaboličke aktivnosti stanica nakon tretiranja s pripremljenim uzorcima, korišten je test redukcije tetrazolijeve soli (poglavlje 3.2.6.iii). Raspon koncentracija timola dobiven razrjeđivanjem prethodno pripremljenih uzoraka iznosio je od 7,82 do 4000 µg/mL što uvelike prelazi unaprijed određene literaturne vrijednosti MIK-ova za slobodan timol u otopini, odnosno uklopljen u liposome (poglavlje 1.5). Dobiveni rezultati prikazani su Slikom 6.

Rezultati *in vitro* testa biokompatibilnosti pokazuju da timol otopini (T/PG) u koncentracijama od 125 do 4000 µg/mL posjeduje izvjesni citotoksični učinak, budući da je vijabilnost tretiranih stanica pri navedenim koncentracijama timola < 70 % ($p < 0,05$). Dobiveni rezultat se slaže s ranije spomenutim istraživanjem Singhala i suradnika (2021), koji su pokazali da timol ima citotoksični efekt na HaCaT staničnoj liniji pri koncentraciji većoj od 120 µg/mL.

Nasuprot slobodnom timolu, sve fosfolipidne formulacije s uklopljenim timolom nisu uzrokovale citotoksične učinke na tretiranim stanicama, budući da je vijabilnost stanica u čitavom rasponu testiranih koncentracija bila > 80 %, te se smatraju biokompatibilnima s humanim keratinocitima. Dobiveni rezultat u skladu je s prethodnim istraživanjima koja pokazuju da je uklapanjem u fosfolipidne terapijske sustave moguće postići smanjenje citotoksičnosti uklopljenih molekula (Rukavina i sur., 2018).

Pri najvećoj koncentraciji timola od 4000 µg/mL, formulacije VFG-ova su u odnosu na liposomske formulacije pokazale nešto veće smanjenje vijabilnosti tretiranih stanica, ali razlika nije statistički značajna ($p > 0,05$), te je i dalje bila iznad praga za utvrđivanje citotoksičnosti (> 70 %). Ako se uspoređuju uzorci bez kolesterola u odnosu na

analogne uzorke s kolesterolom (T2 vs T3, tj. LT2 vs LT3), nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) koja bi sugerirala da prisutnost kolesterola u ovim uzorcima ima značajan pozitivan ili negativan učinak na biokompatibilnost testiranih formulacija.



Slika 6. Vijabilnost keratinocita HaCaT nakon 24 sata nakon 2-satne inkubacije s uzorcima (%). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. (n=4).

↓ Vijabilnost manja od 70 %.

5. ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem pripremljeni su inovativni fosfolipidni sustavi razvijeni za topikalnu lokalnu primjenu timola na kožu: VFG-ovi i liposomi analognog fosfolipidnog sastava. Uklapanje timola u fosfolipidne formulacije provedeno je s ciljem unaprjeđenja biokompatibilnosti sa stanicama kože (keratinocitima). Dobiveni sustavi okarakterizirani su obzirom na srednji promjer čestica, zeta potencijal i citotoksične učinke na HaCaT staničnu liniju *in vitro*.

Iz rezultata provedenih istraživanja može se zaključiti:

- VFG-ovi priređeni visokotlačnom homogenizacijom formirali su vezikule srednjeg promjera 140 – 151 nm i indeksa polidisperznosti 0,17 – 0,27.
- Ekstruzijom liposoma kroz polikarbonatne membrane dobiveni su liposomi manji od 200 nm (144 – 164 nm), prikladni za dermalnu primjenu. Ekstrudirani liposomi bili su neznatno veći od vezikula VFG-ova, uz manji indeks polidisperznosti (0,09 – 0,12).
- Prisutnost kolesterola u fosfolipidnom dvosloju liposoma i VFG-ova rezultirala je većim srednjim promjerom vezikula u odnosu na formulacije bez kolesterola.
- Vrijednosti zeta potencijala za VFG-ove bile su manje negativne u odnosu na zeta potencijal liposoma analognog fosfolipidnog sastava. Negativni zeta potencijal izmjeren za sve testirane formulacije posljedica je prisutnosti negativno nabijenog fosfatidilkolina. Dodatak kolesterola u formulacijama doprinosi još negativnijem iznosu zeta potencijala.
- Slobodni timol pokazao je značajno smanjenje vijabilnosti HaCaT stanica *in vitro* pri koncentracijama $\geq 125 \mu\text{g/mL}$ (vijabilnost $< 70 \%$), te se pri navedenim koncentracijama može smatrati citotoksičnim za HaCaT stanice.
- Ispitivanja citotoksičnosti *in vitro* na humanim keratinocitima potvrdila su povećanje biokompatibilnosti timola kada je uklopljen u sve ispitivane fosfolipidne formulacije u odnosu na slobodni timol, budući da je vijabilnost stanica tretiranih VFG-ovima i liposomima u cijelom rasponu koncentracija (7,82 – 4000 $\mu\text{g/ml}$) bila $> 80 \%$. Pritom nije uočena značajna razlika u vijabilnosti stanica tretiranih uzorcima s ili bez kolesterola pri istoj koncentraciji.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ANOVA	jednosmjerna analiza varijance
DMEM	Dulbekov hranidbeni medij s visokom dozom glukoze
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
FBS	fetalni teleći serum
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized as Safe
ISO	Međunarodna organizacija za standardizaciju
LT	liposomske formulacije
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolijev bromid
NF- κ B	nuklearni faktor κ B
NLC	nanostukturirani lipidni nosači
PAT	površinski aktivna tvar
PBS	fosfatni pufer
PDI	indeks polidisperznosti
PG-liposomi	propilenglikol liposomi
SLN	čvrste lipidne nanočestice
SPC	sojin fosfatidilkolin
T	formulacije vezikularnih fosfolipidnih gelova
T _c	temperatura faznog prijelaza
T/PG	otopina timola u propilenglikolu
VFG	vezikularni fosfolipidni gel
α	razina značajnosti

7. LITERATURA

Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol*, Denmark, Munksgaard, 2000, 9, 165–169.

Breitsamer M, Winter G. Vesicular phospholipid gels as drug delivery systems for small molecular weight drugs, peptides and proteins: State of the art review. *Int J Pharm: X*, 2019, 557, 1–8.

Cheruvu HS, Liu X, Grice JE, Roberts MS. Modeling percutaneous absorption for successful drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discovery*, 2020, 15, 1181–1198.

Daly CH. Biomechanical Properties of Dermis. *J Invest Dermatol*, 1982, 79, 17–20.

Elmoslemany RM, Abdallah OY, El-Khordagui LK, Khalafallah NM. Propylene Glycol Liposomes as a Topical Delivery System for Miconazole Nitrate: Comparison with Conventional Liposomes. *AAPS PharmSciTech*, 2012, 13(2), 723–731.

Escobar A, Pérez M, Romanelli G, Blustein G. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian J Chem*, 2020, 13, 9243–9269.

Escobar-Chávez JJ, Díaz-Torres R, Rodríguez-Cruz IM, Domínguez-Delgado CL, Morales RS, Ángeles-Anguiano E, Melgoza-Contreras LM. Nanocarriers for transdermal drug delivery, *Res Rep Transdermal Drug Delivery*, 2012, 1, 3-17.

Gawkrodger DJ. *Dermatology*, third edition. Sheffield, Churchill Livingstone, 2002.

Fore J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage*, 2006, 52(9):24-35.

Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*, 2021, 22, 12827.

Heckler C, Maders Silva CM, Cacciatore FA, Daroit DJ, da Silva Malheiros P. Thymol and carvacrol in nanoliposomes: Characterization and a comparison with free counterparts against planktonic and glass-adhered Salmonella. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 109382.

Igarashi T, Nishino K, Nayar KS. The appearance of human skin, Technical report: CUCS-024-05, Columbia University, New York, 2005, 1-18. <http://www.cs.columbia.edu>

Image and Video Gallery, National Institute of General Medical Sciences, <https://images.nigms.nih.gov/>, pristupljeno 31.03.2024.

ISO10993-5; 2009. Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for Cytotoxicity: In Vitro Methods. <https://www.iso.org/home.html>, pristupljeno 02.04.2024.

Kotla MG, Chandrasekar B, Rooney Peadar, Sivaraman G, Larranaga A, Vijaya Krishna K, Pandit A, Rochev Y. Biomimetic lipid-based nanosystems for enhanced dermal delivery of drugs and bioactive agents. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, 3(7), 1262- 1272.

Lawton S. Skin 1: the structure and functions of the skin. *Nurs Times*, 2019, 115, 12, 30-33.

Lehmann B. HaCaT Cell Line as a Model System for Vitamin D3 Metabolism in Human Skin. *J Invest Dermatol*, 1997, 108, 78–82.

Liu DZ, Chen WY, Tasi LM, Yang SP. Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. *Colloids Surf*. 2000, 172, 57–67.

Losquadro WD. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 2017, 25, 283–289.

Massing U, Cicko S, Ziroli V. Dual asymmetric centrifugation (DAC)-A new technique for liposome preparation. *J Control Release*, 2008, 125, 16–24.

Mujezinović I, Smajlović A, Zuko A, Dukić B, Čupić V. Značenje kliničke primjene timola. *Veterinarska stanica*, 2018, 49, 123-129.

Okyar A, Özsoy Y, Güngör S. Novel formulation approaches for dermal and transdermal delivery of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Rheumatoid Arthritis - Treatment*. Lemmey AB, urednik, Beyazıt- Istanbul, Intech, 2012, 2, 25-42.

Palac Z, Engesland A, Flaten GE, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Vanić Ž. Liposomes for (trans)dermal drug delivery: the skin-PVPA as a novel in vitro stratum corneum model in formulation development. *J Liposome Res*, 2014, (4):313–322.

Patel D, Patel B, Thakkar H. Lipid based nanocarriers: Promising drug delivery system for topical application. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2021, 123(5), 1-12.

Peters K, Unger RE, Kirkpatrick CJ. Biocompatibility testing. *Biomedical Materials*. Narayan R, urednik, Cham, Springer, 2021, 13, 423-438.

Pivetta TP, Simões S, Araújo MM, Carvalho T, Arruda C, Marcato PD. Development of nanoparticles from natural lipids for topical delivery of thymol: Investigation of its anti-inflammatory properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, 164, 281–290.

Radojčić Redovniković I, Bubalo MC, Gaurina Srček M, Radošević K. Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 2016, 11, 169-175.

Richardson M. Understanding the structure and function of the skin. *Nurs Times*, 2003, 99, 46-48.

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, urednici, Assay Guidance Manual. Bethesda, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.

Rodrigues V, Cabral C, Évora L, Ferreira I, Cavaleiro C, Cruz MT, Salgueiro L. Chemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout. essential oil and its main compounds. *Arabian J Chem*, 2019, 12, 3236–3243.

Rukavina Z. Razvoj novih fosfolipidnih terapijskih sustava za topikalnu antimikrobnu terapiju. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko- biokemijski fakultet, 2019.

Samimi S, Maghsoudnia N, Eftekhari RB, Dorkoosh F. (2019). Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems. Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery. Mohapatra S, Ranjan S, Dasgupta N, Thomas S, Kumar Mishra R, urednici, Amsterdam, Elsevier, 2019, 3, 47–76.

Serrano-Castañeda P, Escobar-Chavez JJ, Rodriguez-Cruz IM, Melgoza LM, Martinez-Hernandez J. Microneedles as Enhancer of Drug Absorption Through the Skin and Applications in Medicine and Cosmetology. *J Pharm Pharm Sci*, 2018, 21, 73-93.

Shrestha H, Bala R, Arora, S. Lipid-Based Drug Delivery Systems. *J Pharm (Cairo)*, 2014, 801-820.

Singhal B, Pandey P, Khan F, Singh S, Upadhyay T, Upadhye V, Khan M. In vitro Elucidation of Antiproliferative and Apoptotic Effects of Thymol against Prostate Cancer LNCaP Cells. *Biointerface Res Appl Chem*, 2021, 12, 1279–1289.

Torchilin V, Weissig V. Liposomes: A Practical Approach. New York; Oxford University Press, 2003.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: metode priprave. *Farm glas*, 2012, 68, 457-466.

Vanić Ž. Phospholipid Vesicles for Enhanced Drug Delivery in Dermatology. *J Drug Discov Develop and Deliv*, 2015, 2, 1-9.

Vanić Ž, Hafner A, Bego M, Škalko-Basnet N. Characterization of various deformable liposomes with metronidazole. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39, 481-488.

Woo WM. Skin Structure and Biology. Imaging Technologies and Transdermal Delivery in Skin Disorders. Xu C, Wang X, Pramanik M, urednici, Singapore, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2020, 1-14.

Yousef H, Alhadj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. StatPearls, Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2022.

Zhu J, Tang X, Jia Y, Ho CT, Huang Q. Applications and delivery mechanisms of hyaluronic acid used for topical/transdermal delivery - A review. *Int J Pharm*, 2020, 578, 119-127.

Zook J, Vreeland WN. Effects of temperature, acyl chain length, and flow-rate ratio on liposome formation and size in a microfluidic hydrodynamic focusing device. *Soft Matter*, 2010, 6, 1352-1360.

8. SAŽETAK

Timol pokazuje niz bioloških učinaka, koji mogu biti veoma korisni u lokalnoj terapiji kožnih oboljenja. Međutim, zbog mogućih citotoksičnih učinaka timola na stanice kože, njegova topikalna dermalna primjena može biti ograničena. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati biokompatibilnost timola *in vitro* na HaCaT staničnoj liniji nakon uklapanja u fosfolipidne formulacije: vezikularne fosfolipidne gelove (VFG-ovi) i liposome analognog fosfolipidnog sastava. VFG-ovi su priređeni visokotlačnom homogenizacijom, a liposomske formulacije film metodom, nakon čega su homogenizirane ekstruzijom kroz polikarbonatne membrane. Za VFG-ove je utvrđen srednji promjer vezikula od 140 do 151 nm (indeks polidisperznosti < 0,27), dok su ekstrudirani liposomi bili neznatno veći (144 – 164 nm) uz indeks polidisperznosti < 0,12. Zeta potencijali VFG-ova (od -2,1 do -3,8 mV) bili su manje negativni u odnosu na liposome sa zeta potencijalom od -19,4 do -21,7 mV. Prisutnost kolesterola u formulacijama utjecala je na blago povećanje srednjeg promjera vezikula i indeksa polidisperznosti, te postizanje negativnijeg zeta potencijala u odnosu na formulacije bez kolesterola. Biokompatibilnost formulacija s timolom ispitana je u *in vitro* uvjetima na HaCaT staničnoj liniji pomoću MTT testa 24 h nakon tretiranja stanica. Dobiveni rezultati potvrdili su citotoksični potencijal slobodnog timola pri koncentracijama $\geq 125 \mu\text{g/ml}$. Također, rezultati potvrđuju da se citotoksični učinci timola eliminiraju uklapanjem u fosfolipidne formulacije, budući da su testirane formulacije s timolom bile biokompatibilne s HaCaT stanicama u čitavom rasponu testiranih koncentracija (7,82 – 4000 $\mu\text{g/ml}$).

SUMMARY

Thymol exhibits a range of biological effects, which can be highly beneficial in the local treatment of skin diseases. However, due to the possible cytotoxic effects of thymol on skin cells, its topical dermal application may be limited. This study aimed to examine the biocompatibility of thymol *in vitro* on the HaCaT cell line, after being incorporated into phospholipid formulations: vesicular phospholipid gels (VPGs) and liposomes of analogous phospholipid composition. VPGs were prepared by high-pressure homogenization, while liposomal formulations were produced by the film method, followed by homogenization through extrusion using polycarbonate membranes. The VPGs exhibited an average vesicle diameter ranging from 140 to 151 nm (polydispersity index < 0.27), while the extruded liposomes were slightly larger (144-164 nm) with a polydispersity index < 0.12. The zeta potential of the VPGs ranged from -2.1 to -3.8 mV, compared to the liposomes with zeta potential ranging from -19.4 to -21.7 mV. The presence of cholesterol in the formulations resulted in a modest increase in the average vesicle diameter and polydispersity index, as well as slightly more negative zeta potential compared to the formulations without cholesterol. The biocompatibility of the formulations containing thymol was tested *in vitro* on the HaCaT cell line using the MTT assay 24 hours after treating the cells. The results confirmed the cytotoxic potential of free thymol at concentrations $\geq 125 \mu\text{g/ml}$. Additionally, the results demonstrate that the cytotoxic effects of thymol are eliminated when incorporated into the phospholipid formulations, as the tested formulations containing thymol were biocompatible with HaCaT cells across the entire range of tested concentrations (7.82 – 4000 $\mu\text{g/ml}$).

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

FOSFOLIPIDNE FORMULACIJE S TIMOLOM – ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI NA HUMANIM KERATINOCITIMA

Kristina Kranjčec

SAŽETAK

Timol pokazuje niz bioloških učinaka, koji mogu biti veoma korisni u lokalnoj terapiji kožnih oboljenja. Međutim, zbog mogućih citotoksičnih učinaka timola na stanice kože, njegova topikalna dermalna primjena može biti ograničena. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati biokompatibilnost timola *in vitro* na HaCaT staničnoj liniji nakon uklapanja u fosfolipidne formulacije: vezikularne fosfolipidne gelove (VFG-ovi) i liposome analognog fosfolipidnog sastava. VFG-ovi su priređeni visokotlačnom homogenizacijom, a liposomske formulacije film metodom, nakon čega su homogenizirane ekstruzijom kroz polikarbonatne membrane. Za VFG-ove je utvrđen srednji promjer vezikula od 140 do 151 nm (indeks polidisperznosti $< 0,27$), dok su ekstrudirani liposomi bili neznatno veći (144 – 164 nm) uz indeks polidisperznosti $< 0,12$. Zeta potencijali VFG-ova (od -2,1 do -3,8 mV) bili su manje negativni u odnosu na liposome sa zeta potencijalom od -19,4 do -21,7 mV. Prisutnost kolesterola u formulacijama utjecala je na blago povećanje srednjeg promjera vezikula i indeksa polidisperznosti, te postizanje negativnijeg zeta potencijala u odnosu na formulacije bez kolesterola. Biokompatibilnost formulacija s timolom ispitana je u *in vitro* uvjetima na HaCaT staničnoj liniji pomoću MTT testa 24 h nakon tretiranja stanica. Dobiveni rezultati potvrdili su citotoksični potencijal slobodnog timola pri koncentracijama $\geq 125 \mu\text{g/ml}$. Također, rezultati potvrđuju da se citotoksični učinci timola eliminiraju uklapanjem u fosfolipidne formulacije, budući da su testirane formulacije s timolom bile biokompatibilne s HaCaT stanicama u čitavom rasponu testiranih koncentracija (7,82 – 4000 $\mu\text{g/ml}$).

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

Rad sadrži: 34 stranice, 6 grafičkih prikaza, 4 tablice i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: timol, vezikularni fosfolipidni gelovi, liposomi, biokompatibilnost, keratinociti

Mentor: **Dr. sc. Zora Rukavina**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Zora Rukavina**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Željka Vanić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Emerik Galić, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2024.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

PHOSPHOLIPID FORMULATIONS WITH THYMOL – BIOCOMPATIBILITY TESTING ON HUMAN KERATINOCYTES

Kristina Kranjčec

SUMMARY

Thymol exhibits a range of biological effects, which can be highly beneficial in the local treatment of skin diseases. However, due to the possible cytotoxic effects of thymol on skin cells, its topical dermal application may be limited. This study aimed to examine the biocompatibility of thymol *in vitro* on the HaCaT cell line, after being incorporated into phospholipid formulations: vesicular phospholipid gels (VPGs) and liposomes of analogous phospholipid composition. VPGs were prepared by high-pressure homogenization, while liposomal formulations were produced by the film method, followed by homogenization through extrusion using polycarbonate membranes. The VPGs exhibited an average vesicle diameter ranging from 140 to 151 nm (polydispersity index < 0.27), while the extruded liposomes were slightly larger (144 - 164 nm) with a polydispersity index < 0.12. The zeta potential of the VPGs ranged from -2.1 to -3.8 mV, compared to the liposomes with zeta potential ranging from -19.4 to -21.7 mV. The presence of cholesterol in the formulations resulted in a modest increase in the average vesicle diameter and polydispersity index, as well as slightly more negative zeta potential compared to the formulations without cholesterol. The biocompatibility of the formulations containing thymol was tested *in vitro* on the HaCaT cell line using the MTT assay 24 hours after treating the cells. The results confirmed the cytotoxic potential of free thymol at concentrations $\geq 125 \mu\text{g/ml}$. Additionally, the results demonstrate that the cytotoxic effects of thymol are eliminated when incorporated into the phospholipid formulations, as the tested formulations containing thymol were biocompatible with HaCaT cells across the entire range of tested concentrations (7.82 – 4000 $\mu\text{g/ml}$).

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

Thesis includes: 34 pages, 6 figures, 4 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: thymol, vesicular phospholipid gels, liposomes, biocompatibility, keratinocytes

Mentor: **Zora Rukavina, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Zora Rukavina, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vanić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Emerik Galić, Ph.D. Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2024.