

# In vitro ispitivanje transkornealne permeabilnosti melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica

---

Štefek, Martin

Master's thesis / Diplomski rad

2019

*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:163:979804>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Martin Štefek**

***In vitro* ispitivanje transkornealne permeabilnosti  
melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutika 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasmine Lovrić.

*Od srca se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr.sc. Jasmini Lovrić na uloženom vremenu, razumijevanju, strpljenju, trudu i stručnom savjetovanju pri izradi ovog Diplomskog rada.*

*Nadalje se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na savjetovanju, strpljenju i pruženoj pomoći pri tehničkom izvođenju eksperimentalnog dijela rada, također asistentici mag.pharm. Marini Juretić na pomoći, podršci i savjetima.*

*Hvala kolegici mag.pharm. Jeleni Belanović na pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela rada  
Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima na velikoj podršci i ogromnom strpljenju kroz sve godine studija.*

*Konačno bi se htio zahvaliti svojim kolegama na pomoći, prijateljima i dragim osobama bez kojih bi mi studiranje i završetak studija bio teško zamisliv.*

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Barijere prednjeg dijela oka .....	1
1.2 Kitozanski nanosustavi za oftalmičku primjenu .....	3
1.2.1. Nanoemulzije obložene kitozanom.....	4
1.2.2. Nanokapsule i nanočestice obložene kitozanom.....	5
1.2.2.1. Lecitinsko-kitozanske nanočestice.....	6
1.3. Glaukom.....	7
1.4. Melatonin .....	7
1.5. <i>In vitro</i> ispitivanja permeabilnosti lijeka kroz rožnicu .....	9
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	10
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	11
3.1. MATERIJALI.....	11
3.2. METODE.....	11
3.2.1. Priprava nanočestica .....	11
3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja melatonina .....	12
3.2.3. Određivanje veličine nanočestica.....	13
3.2.4. Određivanje zeta-potencijala nanočestica .....	13
3.2.5. <i>In vitro</i> oslobađanje melatonina iz nanočestica .....	14
3.2.6. Uvjeti uzgoja HCE-T stanične linije .....	14
3.2.7. <i>In vitro</i> model epitela rožnice .....	15
3.2.8. Određivanje transepitelnog električnog otpora .....	16
3.2.9. Ispitivanje permeabilnosti <i>in vitro</i> .....	16
3.2.10. Analiza HPLC metodom.....	17
3.2.11. Izračunavanje prividnog koeficijenta permabilnosti .....	17
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	19
4.1. Fizičko-kemijska karakterizacija lecitinsko-kitozanskih nanočestica s uklopljenim melatoninom. 19	
4.3. Uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice .....	20
4.4. <i>In vitro</i> oslobađanje melatonina iz nanočestica .....	21
4.5. Ispitivanje permeabilnosti melatonina na <i>in vitro</i> modelu epitela rožnice.....	22
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	31
<b>6. LITERATURA</b> .....	32
<b>7. SAŽETAK</b> .....	36
<b>8. SUMMARY</b> .....	37

# 1. UVOD

Oko je jedno od najvažnijih osjetnih organa. Veliki dio onoga što percipiramo oko sebe dolazi upravo putem osjeta vida. Bolesti oka mogu uzrokovati slabljenje vida, a u nekim slučajevima i sljepoću. Oko je lako dostupan organ za topikalnu primjenu lijeka, međutim bioraspoloživost topikalno primijenjenih konvencionalnih oftalmičkih lijekova je vrlo mala, što predstavlja veliki izazov u liječenju bolesti oka.

Pod pojmom konvencionalnih oftalmičkih lijekova podrazumijevamo otopine i suspenzije lijeka koje se primjenjuju na površinu oka u obliku kapi za oko. Takovi farmaceutski oblici lijeka relativno brzo se uklanjaju s površine oka zbog učinkovitih obrambenih mehanizama oka. Stoga je najveći problem postizanje učinkovite koncentracije lijeka na mjestu njegovog djelovanja (de la Fuente i sur., 2009). Kod konvencionalnih kapi za oko učinkovita koncentracija postiže se učestalim doziranjem lijeka, a što ima negativan učinak na adherenciju pacijeta te u konačnici na učinkovitost liječenja. Primjena nanotehnologije u razvoju inovativnih terapijskih nanosustavi za oftalmičku primjenu pruža različite mogućnosti poboljšanja bioraspoloživosti lijeka u oku (de la Fuente i sur., 2009). Uklapanjem djelatne tvari u nanosustav može se produljiti zadržavanje na površini oka te poboljšati prijelaz preko apsorpcijskih barijera oka (de la Fuente i sur., 2009).

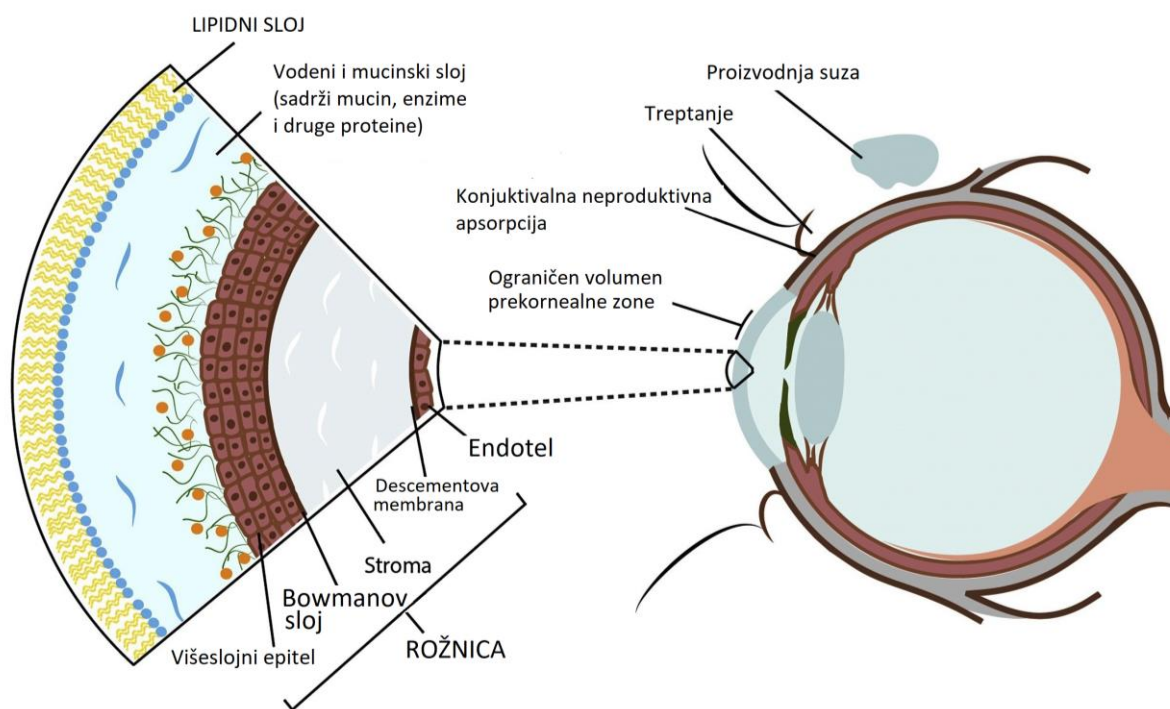
## 1.1. Barijere prednjeg dijela oka

Oko je podijeljeno na dvije glavne anatomske regije, prednji dio (spojnica, rožnica, očna vodica, šarenica, zrakasto tijelo) i stražnji dio (bjeloočnica, žilnica, mrežnica, staklasto tijelo). Oba su dijela oka zaštićena specifičnim barijerama koje sprječavaju apsorpciju lijeka u oko. Barijere u prednjem dijelu oka obuhvaćaju navedene anatomske (statične) barijere, ali i vrlo važne fiziološke (dinamičke) barijere.

Osnovne statičke barijere su rožnica i spojnica. Rožnica je složena avaskularna epitelna barijera male površine, koja se sastoji od višeslojnog epitela (pet do sedam slojeva epitelnih stanica), Bowmanovog sloja, strome, Descemetove mebrane i endotela (slika 1). Istodobno je glavni put intraokularne apsorpcije lijeka. Spojnica je prokrvljena, ima propusniji epitel i pokriva značajno veću površinu (de la Fuente i sur., 2009). Kao posljedica toga, apsorpcija preko

spojnice može biti značajan čimbenik gubitka lijeka iz prekornealnog područja u sustavnu cirkulaciju (neproduktivna apsorpcija preko spojnice).

Fiziološke (dinamične) barijere apsorpciji lijeka u oku uključuju izmjenu suzne tekućine, refleksno treptanje, refleksno suzenje te nazolakrimalnu drenažu. Nazivamo ih prekornealnim čimbenicima (slika 1). Površinu oka pokriva suzni film koji se sastoji od dva sloja: lipidnog sloja i vodenomukoznog sloja, koji sadrži enzime, mucine i ostale proteine. Volumen suzne tekućine je vrlo malen, samo 7  $\mu\text{L}$ . Nakon topikalne primjene oftalmičkog lijeka dolazi do njegovog miješanja sa suznom tekućinom. Na površinu oka može se primijeniti maksimalni volumen od 30  $\mu\text{L}$ . Veći volumeni dodatno će aktivirati refleks suzenja i treptanja koji dalje potiče nazolakrimalnu drenažu odnosno gubitak lijeka s površine oka kroz suzonosni kanal.



**Slika 1.** Prikaz fizioloških i anatomskih barijera apsorpciji lijeka nakon topikalne oftalmičke primjene

#### *Apsorpcija lipofilnih i hidrofилnih lijekova u oko*

Rožnica je glavni put apsorpcije lipofilnih lijekova u oko. Predstavlja heterogenu barijeru zbog različitih slojeva: rožničnog epitela (predstavlja barijeru hidrofилnim lijekovima) i strome

(predstavlja barijeru jako lipofilnim lijekovima). Najbolje prelaze barijeru rožnice umjereno lipofilni lijekovi pasivnom difuzijom transcelularnim putem (de la Fuente i sur., 2009). Hidrofilni lijekovi manje molekulske mase mogu se apsorbirati preko rožnice paracelularnim putem.

Za razliku od rožnice spojnica ima propusniji epitel (veće su pore paracelularnog puta), predstavlja glavni put apsorpcije hidrofilnih lijekova veće molekulske mase.

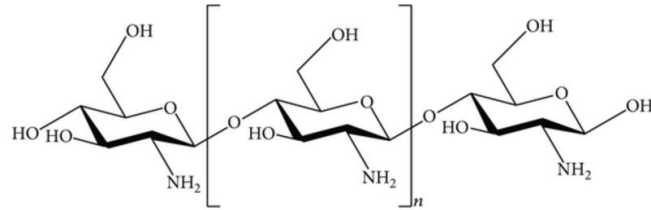
Nadalje, lipofilne lijekove, posebno one teško topljive, nemoguće je oblikovati u farmaceutski oblik otopine već se najčešće primjenjuju kao suspenzije. Hidrofilni lijekovi mogu se oblikovati kao otopine, ali kako je uglavnom riječ o nestabilnim molekulama potrebna su inovativna farmaceutsko-tehnološka rješenja za njihovo uspješno oblikovanje.

#### *Terapijski nanosustavi kao inovativna rješenja za poboljšanje bioraspoloživosti lijeka u oku*

Terapijski nanosustavi, koji obuhvaćaju nekoliko različitih vrsta sustava, predstavljaju jedno od inovativnih rješenja koja mogu dovesti do povećanja bioraspoloživosti topikalno primijenjenog oftalmičkog lijeka (de la Fuente i sur., 2009). Takovi sustavi mogu stupiti u interakciju s suznim filmom (lipidnim ili vodenomukoznim slojem) i na taj način osigurati produljeno zadržavanje lijeka na oku. Nadalje, nanosustavi mogu poboljšati prijenos lijeka preko rožnice ili spojnice. Također, mogu poboljšati topljivost lipofilnih lijekova, odnosno poboljšati stabilnost hidrofilnih lijekova. Ovisno o sastavu i strukturi nanosustava može se kontrolirati i brzinu oslobađanja lijeka na površini oka (de la Fuente i sur., 2009).

## **1.2 Kitozanski nanosustavi za oftalmičku primjenu**

Veliki potencijal za topikalnu oftalmičku primjenu pokazuju kitozanski nanosustavi. Kitozan je prirodni polisaharid koji je građen od podjedinica glukozamina i *N*-acetilglukozamina. Dobiva se djelomičnom deacetilacijom hitina, dugolančanog polimera *N*-acetilglukozamina. Zahvaljujući amino skupinama glukozamina, kitozan je moguće protonirati pri čemu nastaje polikation velike gustoće naboja. To svojstvo omogućuje mu topljivost u vodi, interakciju s mucinima u vodenomukoznom sloju (mukoadhezivnost), otvaranje čvrstih veza između epitelne stanice te antibakterijski učinak što ga čini polimerom izbora u razvoju inovativnih oftalmičkih nanosustava. Kitozan je također biorazgrađiv i biokompatibilan (Tamara. i sur. 2018).



**Slika 3.** Struktura kitozana

Mukoadezivnost kitozana posredovana je ponajviše elektrostatskim silama između pozitivno nabijenih amino skupina glukozamina i negativno nabijenih kiselinskih ostataka (sijalinska kiselina ili N-acetilneuraminska kiselina,  $pK_a = 2,6$ ) na molekulama mucina koje se nalaze u vodenomukoznom sloju, ali i površini epitelnih stanica. Međutim, mukoadezivnost kitozana posredovana je i vodikovim vezama i hidrofobnim interakcijama s mucinima. Zbog mukoadesivnosti kitozana, kitozanski nanosustavi mogu se dulje zadržati na površini oka. Naime, vrijeme potrebno za izmjenu vodenomukoznog sloja je približno 15 do 20 sati, što je znatno sporije u odnosu na vrijeme potrebno za izmjenu suza (nekoliko minuta) (de la Fuente i sur., 2009).

Kitozan povećava transepitelnu permeabilnost zbog reverzibilne interakcije s čvrstim vezama između epitelnih stanica (Basaran i Yazan, 2012). Time dolazi do otvaranja čvrstih veza te povećanja volumena paracelularnih pora što može rezultirati povećanjem apsorpcije lijeka posebice hidrofilnih lijekova.

Prije gotovo 20 godina, provedenim *in vivo* istraživanjem na pokusnim kunićima pokazana je dobra oftalmička podnošljivost kitozana. Biorazgradivost kitozana posredovana je enzimom lizozimom koji se nalazi u suznoj tekućini (de la Fuente i sur., 2009).

### 1.2.1. Nanoemulzije obložene kitozanom

U/V nanoemulzije intenzivno se istražuju kao sustavi za poboljšanje bioraspoloživosti lipofilnih lijekova za topikalnu oftalmičku primjenu (de la Fuente i sur., 2009). Ovisno o naboju kojeg nose na svojoj površini, mogu se podijeliti na anionske, kationske nanoemulzije te nanoemulzije bez naboja. Anionske nanoemulzije se pripremaju korištenjem anionskih lipida, surfaktanata i polimera, dok se kationske nanoemulzije pripremaju korištenjem kationskih lipida, surfaktanata i polimera (de la Fuente i sur., 2009). Kitozan se intenzivno istražuje kao



jedan od kationskih polimera koji mogu formirati omotač oko uljnih kapljica ili integrirati se na međupovršini ulje/voda te stvarati oko kapljica ulja pozitivan naboj. Kitozan također stabilizira nanoemulzije jer sprječava koalescenciju emulzija steričkim i elektrostatskim učincima.

Na tržištu danas postoje oftalmički lijekovi koji se temelje na tehnologiji nanoemulzija, a koriste se u liječenju bolesti suhoga oka (Restasis® (Allergan) i Ikervis® (Santen)). Kationska nanoemulzija (Ikervis®), za razliku od anionske (Restasis®), omogućuje elektrostatsku interakciju s negativno nabijenim mucinima površine oka, poboljšavajući tako zadržavanje lijeka u prekornealnom području (P. Daull, i sur., 2014). Stoga se lijek Ikervisa® primjenjuje jedanput dnevno nasuprot lijeku Restasisa® koji se primjenjuje dva puta na dan (Lallemand i sur., 2018).

### **1.2.2. Nanokapsule i nanočestice obložene kitozanom**

Nanokapsule su vrsta nanosustava definiranih unutrašnjom jezgrom, koja je obložena sa polimerom. Jezgra može biti uljne ili vodene faze, a vanjski polimer može nositi određeni naboj.

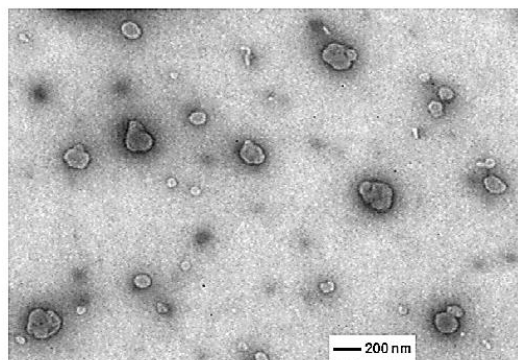
Prvi dokazi potencijala nanokapsula za topikalnu oftamičku primjenu dolaze iz 1992. godine kada su Losa i suradnici (de la Fuente i sur., 2009) usporedili poli- $\epsilon$ -kaprolaktonske (PECL) nanokapsule s uklopljenim metipranololom sa konvencionalnim kapima za oko s metipranololom. Primjena PECL nanokapsula s metipranololom učinkovito je smanjila povišeni očni tlak, a pri tome je minimalizirala kardiovaskularne nuspojave koje su se pojavljivale pri primjeni konvencionalnih kapi za oko. U još jednom istraživanju pokazana je poboljšanja permeacija kroz rožnicu indometacina koji je primijenjen uklopljen u PECL nanokapsule u usporedbi s konvencionalnim kapima za oko s indometacinom (de la Fuente i sur., 2009). Istraživanja su se dalje nastavila te su 1997. isti autori obložili PECL nanokapsule kitozanom s ciljem povećanja mokoadezivnosti sustava te mogućnosti povećanja prijenosa lijeka preko rožnice (de la Fuente i sur., 2009). Očekivanja su potvrđena čime kitozan postaje polimer izbora za pripremu kationskih nanosustava za oftalmičku primjenu. Nadalje, utvrđeno je kako se povećanje apsorpcije lijeka u oko ne može pridodati samo pozitivnom naboju kitozana već prirodi tog polisaharidnog polimera. Usporedile su se dvije vrste PECL nanočestice: obložene kationskim polimerom kitozanom i one obložene kationskim polimerom poli-L-lizinom. Pokazalo se da čestice obložene kitozanom omogućavaju puno bolju permaciju indometacina, od čestica obloženih poli-L-lizinom (de la Fuente i sur., 2009).

### 1.2.2.1. Lecitinsko-kitozanske nanočestice

Jedan od zanimljiv nanosustava koji se temelje na kitozanu su lecitinsko-kitozanske nanočestice. Lecitin je prirodna mješavina fosfolipida, uglavnom fosfatidilkolina i fosfatidiletanolamina (Hafner i sur. 2011). Budući da je prirodan, biokompatibilan i biorazgradljiv lecitin je prikladan za razvijanje terapijskih nanosustava za oftalmičku primjenu lijekova (Bhatta i sur., 2012.). Često se koristi u primjeni različitih terapijskih nanosustava, kao što su mikro i nanoemulzije (Kelman i sur., 2007), liposomi (Pavelić i sur., 2005) i micelarni sustavi (Ceraulo i sur., 2008). Lecitin se najčešće koristi kao emulgator (Lixin et al., 2006; Williams et al., 1984).

Lecitinsko-kitozanske nanočestica nastaju samoorganiziranjem negativno nabijenih lipida lecitina i pozitivno nabijenog kitozana (Hafner i sur. 2009). Nanočestice se jednostavno pripravlja, a korištenjem različite vrste lecitina i kitozana te različitim omjerima komponenti može se utjecati na njihovu veličinu i zeta-potencijal. Kitozan se otapa u vodi, a lecitin sa hidrofobnim lijekom se otapa u etanolu. Optimalni omjer lecitina i kitozana pri pripravi lecitinsko-kitozanskih nanočestica je 20:1, pri čemu se dobiju nanočestice veličine 200-250 nm. Površina sustava obložena je pozitivno nabijenim kitozonom, a unutrašnjost čini lecitinski matriks koji omogućuje uklapanje lipofilnih lijekova.

Dosad su se lecitinsko-kitozanske nanočestice istraživale za oralnu primjenu progesterona i tamoksifencitrata (Sonvico i sur., 2006; Barbieri, 2013), za dermalnu primjenu kortikosteroida (Senyigit, 2010; Ozcan, 2013) te nazalnu i transdermalnu primjenu melatonina (Hafner i sur., 2009.; Hafner i sur., 2011).



**Slika 4.** Mikrografija lecitinsko-kitozanskih nanočestica s uklopljenim melatoninom dobivena transmisijskom elektronskom mikroskopijom (Hafner i sur. 2009).

### 1.3. Glaukom

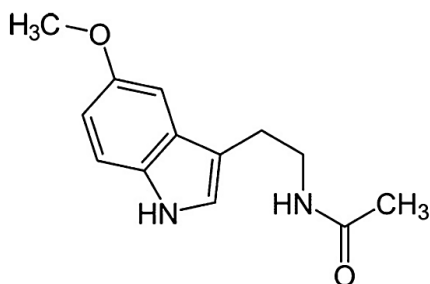
Glaukom je optička neuropatija koju karakteriziraju progresivna degeneracija ganglijskih stanica mrežnice (RGC). Glaukom zahvaća više od 70 milijuna ljudi širom svijeta, pri čemu je otprilike 10% slijepo na oba oka što ga čini vodećim uzrokom trajne sljepoće u svijetu. Glaukom može biti prisutan u bolesnika sve dok se postane ozbiljan problem, što govori da je broj oboljelih puno veći od broja za koji se zna da ga ima. Ankete pokazuju da su samo 10% do 50% ljudi s glaukomom svjesni su da ga imaju i da su oboljeli. Glaukom možemo podijeliti u dvije skupine: glaukom otvorenog kuta i glaukom zatvorenog kuta (N. Robert i sur., 2014).

Faktori rizika za razvoj glaukoma: starija životna dob, obiteljska povijest bolesti, crna rasa, sustavni ili topikalni kortikosteroidi te visok očni tlak.

Sve više dokaza u istraživanjima govori o oksidativnom stresu kao važnom uzročniku gubitka RGC-a. Nekoliko studija je pokazalo da slobodni radikali uzrokuju smrt stanica neurona inhibicijom ključnih enzima Krebsovog ciklusa i oksidativnog ciklusa što oštećuje metabolizam oka. Također je dokazano u mnogim *in vitro* i *in vivo* uvjetima da je oksidativni stres, iduciran glutamatom, glavni mehanizam ekscitotoksičnosti RGC. Koenzim Q10 (CoQ10) je bitna komponenta oksidativnog ciklusa sa jakim antioksidativnim svojstvima za koja je dokazano da posreduju u neuroprotekciji (Nucci i sur., 2007).

### 1.4. Melatonin

Melatonin (*N*-acetil-5-metoksitriptamin) je neurohormon kojeg izlučuje epifiza. Ima ključnu ulogu u održavanju dnevnog ritma organizma, regulira ciklus spavanja i budnosti (Hafner i sur., 2009). Poznat je po imunostimulativnom i citoprotektivnom učinku (Mao i sur., 2004). Melatonin je po strukturi derivat indola.



Slika 5. Struktura melatonina (Musumecia i sur., 2013).

Melatonin se koristi u liječenju cirkadijanih poremećaja poput nesаницe i *jet lag* koji se javlja pri promjeni vremenskih zona. Zbog svojih antioksidativnih svojstava razmatra se njegov potencijal u liječenju karcinoma i neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerera i Parkinsonove bolesti (Schaffazick i sur., 2008.).

Melatonin se u manjim količinama sintetizira i u mrežnici oka. Kao jaki antioksidans sudjeluje u hvatanju slobodnih radikala stvorenih u tkiva oka. Tim mehanizmom melatonin štiti tkiva oka od poremećaja kao što su glaukom, degeneracija makule, retinopatija i katarakta.

Sintetiziran lokalno u oku, melatonin sudjeluje u regulaciji intraokularnog tlaka (Wiechmann i Wirsig-Wiechmann, 2001). Obje vrste melatoninskih receptora, MT1 i MT2, pronađene su u raznim dijelovima oka poput rožnice, bjeloočnice, krvnih žila mrežnice (Fujieda i sur., 1999; Scher i sur, 2002, 2003; Savaskan i sur., 2002; Wiechmann i Rada, 2003; Rada i Wiechmann, 2006). Prisustvo melatoninskih receptora u šarenici i unutarnjem epitelu cilijarnog tijela sugerira povezanost između cirkadijalnog povećanja i smanjena intraokularnog tlaka.

Intraokularna hipertenzija i vaskularna insuficijencija optičkog živca se smatraju glavnim uzročnicima razvoja glaukoma (Ritch, 2000). Glaukom se primarno liječio kontrolom intraokularnoga tlaka. Zatim su se terapije počele temeljiti na neuroprotektivnim agensima (Chew and Ritch, 1997; Osborne et al., 1999; Weinreb and Levin, 1999), a melatonin se pokazao jako dobrim kandidatom.

#### *Izazovi pri primjeni melatonina*

Zbog svojih povoljnih fizičko-kemijskih svojstava, melatonin se lako apsorbira preko različitih sluznica, međutim njegova osjetljivost na oksidaciju predstavlja značajan problem za postizanje terapijskih doza. Melatonin se metabolizira pri prvom prolasku kroz jetru, pa je poželjnija njegova lokalna primjena. Melatonin je također fotoosjetljiv što otežava razvoj zadovoljavajućeg farmaceutskog oblika. Učinkovita strategija za razvoj zadovoljavajućeg farmaceutskog oblika je uklapanje melatonina u terapijske nanosustave (Dreher i Maibach, 2010).

## 1.5. *In vitro* ispitivanja permeabilnosti lijeka kroz rožnicu

Ispitivanje permeabilnosti lijeka preko barijera oka kritičan korak za predviđanje njegove bioraspoloživosti. Neklinički modeli predviđanja bioraspoloživosti lijeka u oku uključuju *in vitro* i *ex vivo* ispitivanja permeabilnosti lijeka te *in vivo* ispitivanja farmakokinetike na animalnom modelu. Ispitivanja na animalnom modelu predmet su čestih kritika javnosti i znanstvene zajednice zbog etičkih i ekonomskih razloga. Stoga je nužno potrebno razvijati *in vitro* i *ex vivo* modele za ispitivanje permeabilnosti s ciljem predviđanja bioraspoloživosti lijeka u oku (Pepić i sur., 2014). U središtu istraživanja su *in vitro* i *ex vivo* modeli rožnice. *In vitro* modeli podrazumijevaju stanične modele različite složenosti s obzirom na strukture rožnice koje se model oponaša *in vitro*. *In vitro* modeli su velikog kapaciteta s obzirom na broj ispitivanih uzoraka u jedinici vremena (high-throughput models), a manje sigurnost predviđanja bioraspoloživosti lijeka. Kao *ex vivo* model rožnice koriste se rožnice animalnog porijekla. *Ex vivo* modeli relativno su malog kapaciteta s obzirom na broj uzoraka koje je moguće ispitati u određenom vremenu, ali omogućuju dobro predviđanje intraokularne apsorpcije i bioraspoloživosti lijeka (Pepić i sur., 2014).

Za uspotavu *in vitro* modela koriste se različite stanične linije. Najopsežnije karakterizirana stanična linija, koja je ljudskog porijekla, u istraživanjima pasivnog transcelularnog i paracelularnog transporta, ekspresije transportera i metaboličkim enzimima je immortalizirana stanična linija epitela rožnice (HCE-T), koju su razvili Araki-Sasaki i sur. (1995.) (Juretić i sur., 2017). Modeli zasnovani na HCE-T su dobro definirani i optimizirani za studije ispitivanja permeabilnosti. Unatoč tome objavljeno je u studijama da HCE-T modeli imaju određene prepreke koje ograničavaju njihovu rutinsku upotrebu u istraživačkim laboratorijima i farmaceutskoj industriji kao što su varijabilnost fenotipa stanične barijere i nedostatak standardnog protokola kontrole kvalitete, a što otežava interpretaciju i međusobno uspoređivanje rezultata permeabilnosti iz različitih laboratorija (Juretić i sur., 2017). Iako postoje standardizirani uvjeti uzgoja (npr. hranidbeni medij, uvjeti rasta, vrijeme nakon kojeg se stanice izlažu zraku) kako bi se *in vitro* održao fenotip HCE-T stanica, zabilježene su velike varijabilnosti i nestabilna svojstva barijere ovisno o uvjetima uzgoja kulture (Juretić i sur., 2017). Stoga su potrebna daljnja istraživanja te unaprijeđenja *in vitro* modela kako bi se razjasnili koji su ključni faktori odgovorni za inter- i intralaboratorijske varijabilnosti *in vitro* fenotipskih karakteristika HCE-T staničnih modela.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Glaukom je bolest karakterizirana oštećenjem vidnog živca i jedan od vodećih uzroka sljepoće. Povišeni očni tlak nastaje kao posljedica smanjenog oticanja očne vodice i smatra se jednim od glavnih čimbenika rizika u razvoju glaukoma. Iako postoje različiti lijekovi koji se koriste u liječenju glaukoma, predviđa se da će broj oboljelih od glaukoma značajno porasti te stoga se intenzivno istražuju potentniji i selektivniji lijekovi. Melatonin se istaknuo kao jedan od potencijalnih lijekova kandidata. Dobro se apsorbira preko rožnice, međutim zbog brze i opsežne prekornealne eliminacije te posljedičnog kratkog farmakološkog učinka razmatra se njegovo uklapanje u različite terapijske nanosustave. Terapijski nanosustav bi trebao (i) pokazati zadovoljavajuće uklapanje melatonina, (ii) imati mukoadhezivna svojstva zbog čega će se produljeno zadržavati na površini oka te (iii) osigurati produljeno oslobađanje melatonina. Time bi se postiglo očuvanje terapijske koncentracije melatonina odnosno njegovog farmakološkog učinka kroz dulje vremensko razdoblje.

Cilj ovog diplomskog rada je uklopiti melatonin u lecitinsko-kitozanske nanočestice te ispitati utjecaj uklapanja na permeabilnost melatonina korištenjem *in vitro* modela epitela rožnice.

Specifični ciljevi rada su:

- Pripraviti lecitinsko-kitozanske nanočestice s uklopljenim melatoninom.
- Odrediti fizičko- kemijska svojstva pripremljenih nanočestica (veličinu i raspodjelu veličina te zeta potencijal nanočestica, sadržaj uklopljenog lijeka)
- Odrediti *in vitro* profil oslobađanja uklopljenog melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica.
- Uzgojiti *in vitro* model epitela rožnice koji se temelji na HCE-T staničnoj liniji.
- Ispitati permeabilnost melatonina uklopljenog u lecitinsko-kitozanske nanočestice korištenjem *in vitro* modela epitela rožnice.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

U izradi ovog diplomskog rada korišten je kitozan klorid (Protasan UP Cl 113, stupanj deacetilacije 86 %, viskoznost 1 %-tne otopine 13 mPa $\times$ s, NovaMatrix, Norveška), lecitin S45 (Lipoid GmbH, Njemačka), melatonin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka). Ostale kemikalije su nabavljene od proizvođača Kemig (Hrvatska). Etanol (96 %) je korišten za pripremu otopina lecitina. Otopina NaCl (10 mM) korištena je za razrjeđenje suspenzija nanočestica pri mjerenju zeta potencijala. Acetatni pufer (pH 5.8) je pripremljen miješanjem natrijeva acetata (0,2M) i octene kiseline (0,2M) u volumnom omjeru 86:14. HBSS pufer (pufer balansirani Hankovim solima, engl. *Hank's balanced salt solution*) pH 6, pripremljen je otapanjem bezvodnog kalcijevog klorida ( $\text{CaCl}_2$  bezvodni; 140  $\text{mgL}^{-1}$ ), magnezijevog klorida ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ; 100  $\text{mgL}^{-1}$ ), magnezijevog sulfata ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 100  $\text{mgL}^{-1}$ ), kalijevog klorida (KCl; 400  $\text{mgL}^{-1}$ ), kalijevog dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 60  $\text{mgL}^{-1}$ ), natrijevog bikarbonata ( $\text{NaHCO}_3$ ; 350  $\text{mgL}^{-1}$ ), natrijevog klorida (NaCl; 8000  $\text{mgL}^{-1}$ ); dinatrijevog hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  bezvodni; 48  $\text{mgL}^{-1}$ ), D-glukoze (1000  $\text{mgL}^{-1}$ ) i 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonske kiseline (HEPES; 30 mM) u pročišćenoj vodi.

#### 3.2. METODE

##### 3.2.1. Priprava nanočestica

U diplomskom radu pripravljene su lecitinsko-kitozanske (MCL) s uklopljenim melatoninom, a kako bi se mogle detaljno okarakterizirati pripravljene su i lecitinsko-kitozanske bez melatonina (CL) te lecitinske nanočestice s uklopljenim melatoninom (ML) i lecitinske čestice bez melatonina (L). U tu svrhu, prvo se pripravi 1 %-tna otopina kitozana otapanjem 200 mg kitozana u 2 mL pročišćene vode. 0,25 mL 1 %-tne otopine zatim razrijedimo do 23 ml sa pročišćenom vodom. Otopina lecitina se pripravi otapanjem i kratkim soniciranjem 500 mg lecitina u 2 mL etanola (koncentracija lecitina 250  $\text{mg/mL}$ ). 10 mg melatonina se otapi u 2 mL etanolne otopine lecitina te tako dobijemo maseni omjer melatonina prema lecitinu 1:5. Lecitinsko-kitozanske nanočestice se pripravljaju injektiranjem 2 mL etanolne otopine lecitina i melatonina iglom Hamilton® (unutarnji promjer 0,75 mm) u 23 ml razrijeđene otopine kitozana

pri intenzivnom miješanju na magnetskoj miješalici (900 okretaj/min). Neuklopljeni melatonin se izdvaja iz suspenzije MCL i ML nanočestica metodom dijalize koja je opisana u poglavlju 3.2.2.

U pripremljenim nanočesticama koncentracija kitozana iznosi  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a maseni omjer lecitin:kitozan iznosi 20:1. Za pripravu lecitinsko-kitozanskih nanočestica bez melatonina postupak je jednak osim što se ne dodaje melatonin u etanolnu otopinu lecitina, a za pripravu lecitinskih nanočestica izostavlja se kitozan iz formulacije.

### 3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja melatonina

Uspješnost uklapanja podrazumijeva postotak uklopljenog melatonina u pripremljenim nanočesticama u odnosu na ukupni lijek korišten u pripravi. Određuje se metodom dijalize koja ujedno i odvaja neuklopljeni melatonin iz suspenzije nanočestica. 4 mL suspenzije nanočestica je stavljeno u dijalizacijsku vrećicu od celuloze acetata (Spectra/Por®, MW cut-off 12000-14000 Da, Medicell International Ltd, UK). Dijalizacijska vrećica sa suspenzijom se prenese u čašu napunjenu sa 100 mL pročišćene vode (receptorski medij). Za vrijeme neprekidnog miješanja (30 okretaja/min) uzima se po 2 mL uzorka iz receptorske faze u intervalnim vremenskim razmacima, i razrijede se sa dodatnim 1 mL pročišćene vode. Receptorsku fazu nakon svakog uzorkovanja nadoknađujemo sa 2 mL pročišćene vode.

Koncentracija melatonina je određena UV-Vis spektrofotometrijom pri maksimumu od  $\lambda=278$  nm (Cary 50, Varian Inc., SAD). Dijalizacija se prekida kada se u uzastopnim uzorcima receptorske faze izmjere jednake apsorbancije, odnosno jednake koncentracije lijeka (nakon otprilike 120 minuta).

Uspješnost uklapanja (*UU*) melatonina se računa prema sljedećoj jednadžbi:

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

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

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



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

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

Dijalizirani uzorci nanočestica su korišteni u svim daljnjim ispitivanjima.

### 3.2.3. Određivanje veličine nanočestica

Veličina nanočestica određena je metodom fotonske korelacijske spektroskopije (engl. *photon correlation spectroscopy*, PCS) korištenjem uređaja Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Metoda je prikladna za određivanje veličine čestica u rasponu od 2 nm do 3  $\mu\text{m}$ . Izvor zračenja je monokromatska koherentna laserska zraka (10mW He-Ne;  $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) koja obasjava uzorak i bilježi se intenzitet svjetlosti raspršene na česticama pod određenim kutom. Kut detekcije je  $90^\circ$ , a temperatura  $25^\circ\text{C}$ . Dispergirane čestice su u stalnom pokretu (Brownovo gibanje) zbog čega dolazi do fluktuiranja raspršene svjetlosti u vremenu. Valjanost rezultata ovisi o pokretljivosti nanočestica pa tako i o njihovoj koncentraciji u suspenziji. Uzorak suspenzije nanočestica prije mjerenja razrijeđen je sa pročišćenom vodom 10 puta kako bi se izbjegnulo višestruko raspršivanje svjetlosti uzrokovano previsokom koncentracijom nanočestica.

### 3.2.4. Određivanje zeta-potencijala nanočestica

Fotonskom korelacijskom spektroskopijom određen je i zeta-potencijal nanočestica (Zetasizer 3000 HS). Na svojoj površini koloidne čestice nose određeni naboj, tako privlače suprotne naboje iz otopine stvarajući oko sebe sloj slabo pokretnih iona (Sternov sloj) i sloj pokretnih iona iz otapala (difuzijski sloj). Takav električni dvosloj odvojen je od ostatka molekula otapala tzv. plohom smicanja. Potencijal na udaljenosti plohe smicanja je elektrokinetički zeta-potencijal ( $\zeta$ ).

Mjerenja su provođena na  $25^\circ\text{C}$ , a uzorak se prije mjerenja razrijedi sa 10 mM otopinom NaCl. Vrijednost zeta potencijala određuje se indirektno mjerenjem elektroforetske pokretljivosti nanočestica u otopini NaCl. U sustavu mjerenja upotrebljen je 10 mW He-Ne laser. Nabijene

čestice se gibaju u promjenjivom električnom polju i raspršuju laserske zrake. Intenzitet raspršenog zračenja se mijenja sa frekvencijom koju uvjetuje brzina gibanja čestica. Detekcijom fotona zračenja dobiva se spektar frekvencija iz kojeg se računa elektroforetska pokretljivost odnosno zeta-potencijal.

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

*In vitro* oslobađanje melatonina iz pripremljenih lecitinsko-kitozanskih (MCL) i lecitinskih (ML) nanočestica provedeno je metodom dijalize u acetatnom puferu (pH 5,8). Volumen suspenzije nanočestica koji sadrži 250 µg melatonina stavljen je u dijalizacijsku vrećicu od celuloze acetata (Spectra/Por® ,MW cut-off 12000 - 14000 Da, Medicell International Ltd, UK). Vrećica se zatim prenese u 30 mL acetatnog pufera (receptorski medij). Uz neprekidno miješanje na magnetnoj mješalici (30 okretaja/min) iz receptorskog odjeljka se uzimaju uzorci od 1 mL (prva 2 sata uzorak je uziman svakih 15 minuta, sljedeća tri sata svakih 30 minuta). Uzeti volumen uzorka iz receptorskog odjeljka se nadoknadi sa acetatnim puferom, a sam uzorak (1 mL) razrijedi se s 2 mL acetatnog pufera. Koncentracija melatonina u uzorcima određena je UV-Vis spektrofotometrijom ( $\lambda=278$  nm; Cary 50, Varian Inc., SAD).

### **3.2.6. Uvjeti uzgoja HCE-T stanične linije**

Za ugoj *in vitro* modela epitela rožnice korištena je HCE-T stanična linija (RIKEN Cell bank, Japan). Radi se o imortaliziranim stanicama ljudskog epitela rožnice. Stanice je izolirao i karakterizirao Araki-Sasaki 1995. godine (Araki-Sasaki i sur., 1995).

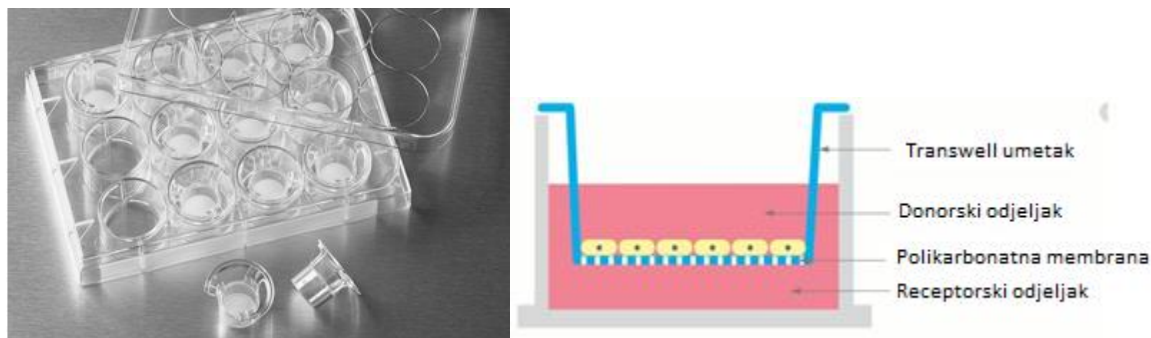
Stanice su uzgajane u tikvicama za stanični uzgoj (Falcon, SAD) u inkubatoru na 37°C, relativnoj vlažnosti zraka od 90 % i sa 5 % CO<sub>2</sub>. Kao hranidbeni medij korišten je DMEM/F12 (Lonza, Švicarska) koji je sadržavao 5 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS, Biosera, Francuska), humani inzulin (µg mL<sup>-1</sup>, Applichem, Njemačka), dimetilsulfoksid (0,5 %, Applichem), epidermalni faktor rasta (EGF, 10 ng mL<sup>-1</sup>, AppliChem), i antibiotike penicilin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) te amfotericin B (0,25 µg/mL) (Lonza).

Pri uzgoju, hranidbeni medij mijenjan je svaki drugi dan. Nakon postizanja konfluentnosti od 80-90 %, stanice su se odvajale od podloge kratkim inkubiranjem sa 0,25 % (m/V) otopinom enzima tripsina (Lonza).

### 3.2.7. *In vitro* model epitela rožnice

Za uzgoj *in vitro* modela epitela rožnice korišten je Transwell® sustav s 12 umetaka s polikarbonatnom membranom sa porama veličine 3,0  $\mu\text{m}$  (Corning, SAD). Prije nasađivanja stanica membrana se oblaže kolagenom tipa I repa štakora i fibronektinom (Sigma). Prvo se dodaje 150  $\mu\text{L}$  otopine kolagena koncentracije 1,5  $\text{mgmL}^{-1}$ , inkubira se 5 sati pri 37°C, uklanja višak otopine i preko noći ostavi sušiti u kabinetu za rad sa staničnim kulturama. Nakon tog se dodaje fibronektin koncentracije 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , inkubira 20 minuta pri 37°C, otklanja se suvišak otopine i suši 20 minuta.

Suspendirane HCE-T stanice nasađuju se na polikarbonatnu membranu (500  $\mu\text{L}$  odnosno 100000 stanica, donorski odjeljak). U receptorski odjeljak Transwell sustava dodaje se 1,5 mL hranidbenog medija te se stanice uzgajaju se 7 dana uz mijenjanje medija svaki drugi dan. Tijekom 7 dana mjeri se transepitelni električni otpor (TEER) te nakon naglog porasta TEER vrijednosti, a što je indikator postizanja konfluentnosti, stanice se izlažu zraku. Ispod Transwell umetaka stavlja se metalna ploča te se time volumen donorskog odjeljka povećava sa 1,5 na 2 mL. Izlaganjem stanica zraku potiče se stanična diferencijacija i omogućava stvaranje modela višeslojnog epitela. U naredna tri dana stanicama se svaki dan mijenja hranidbeni medij u receptorskom odjeljku. Nakon tog *in vitro* model spreman je za ispitivanje permeabilnosti.



Slika 7. A) Transwell® sustav s 12 umetaka; B) Shematski prikaz Transwell® umetka sa monoslojem stanica (preuzeto <https://www.corning.com>).

### 3.2.8. Određivanje transepitelnog električnog otpora

Transepitelni električni otpor (engl. *transepithelial electric resistance*; TEER) nam služi kao procjena barijerne funkcije tijekom uzgoja epitelnog modela stanica. Procjenjujemo da li uzgojen model epitela zadovoljava kriterije integriteta za ispitivanje permeabilnosti, a također se mjeri i tijekom samog ispitivanja permeabilnosti pri čemu ukazuje na otvaranje paracelularnih pora i/ili na oštećenja epitela tijekom ispitivanja. Mjerenje se provodi elektrodom (STX, World Precision Instruments, SAD), a vrijednost otpora se očita na voltmetru (EVOM, WPI, SAD).

Otpor se voltmetrom na svakom Transwell® umetku mjeri tri puta i računa se srednja vrijednost koja se množi sa površinom same barijere ( $A = 1,12 \text{ cm}^2$ ) kako bi se dobio TEER ( $\Omega\text{cm}^2$ ).

### 3.2.9. Ispitivanje permeabilnosti *in vitro*

Utjecaj uklanjanja melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice (MCL) ispitan je korištenjem *in vitro* modela epitela rožnice. U eksperimentu korištene su lecitinske nanočestice s melatoninom te otopina melatonina. Kao pufer tijekom ispitivanja korišten je HBSS pufer pH 6,0 kako bi se osigurao pozitivan zeta-potencijal lecitinsko-kitozanskih nanočestica.

Prije provođenja eksperimenta, stanični model se ispiru PBS-om te se dodaje 500  $\mu\text{L}$  HBSS-a u donorski odjeljak i 1,5 mL u receptorski odjeljak. Nakon inkubiranja od 30 minuta pri 37°C izmjeren je TEER te je model spreman za ispitivanje permeabilnosti. Zatim se iz donorskog odjeljka uklanja HBSS pufer i nanosi se 400  $\mu\text{L}$  uzorka suspenzije nanočestica odnosno otopine melatonina u HBSS-u. Koncentracija melatonina u suspenziji nanočestica i otopini melatonina pri ispitivanju je iznosila 50  $\mu\text{molL}^{-1}$ . Ispitivanje je provedeno u trajanju od 120 minuta

Uzorci (400  $\mu\text{L}$ ) su se uzimali iz receptorskog odjeljaka svakih 15 minuta prvih sat vremena i svakih 20 minuta drugih sat vremena, uz nadomještanje sa 400  $\mu\text{L}$  HBSS pufera. Također je određivan i TEER za vrijeme uzimanja uzoraka, 2 sata nakon zadnjeg uzorkovanja i sljedeći dan. Uzorci su analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

### 3.2.10. Analiza HPLC metodom

Za kvantitativno određivanje melatonina korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC). Korišten je sustav Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) s DAD detektorom (224 nm). Korištena je kolona Kinetex C18, dimenzija  $50 \times 4,6$  mm, veličina čestice  $5 \mu\text{m}$  (Phenomenex, SAD) s filterom (KrudKatcher Ultra HPLC,  $0,5 \mu\text{m}$ , 0,004 in, Phenomenex) pri  $30^\circ\text{C}$ . Kao mobilna faza korištena je mješavina pročišćene vode i acetonitrila u volumnom omjeru 52:48. Brzina protoka mobilne faze iznosila je  $1 \text{ mLmin}^{-1}$ . Volumen injektiranja iznosio je  $10 \mu\text{l}$ . Primijenjena je izokratna elucija, a vrijeme analize pojedinog uzorka iznosilo je oko 2 minute. Retencijsko vrijeme melatonina iznosilo je 0,6 minuta.

### 3.2.11. Izračunavanje prividnog koeficijenta permabilnosti

Koristeći rezultate HPLC analize, izračunata je koncentracija melatonina u donorskom i receptorskom odjeljku te ukupna masa permeiranog lijeka u receptorskom odjeljku. Masa permeiranog melatonina dobivena je množenjem koncentracije permeiranog melatonina sa volumenom receptorskog odjeljka ( $1,5 \text{ mL}$ ). Masa uzorkovanog melatonina dobivena je množenjem koncentracije permeiranog melatonina sa uzorkovanim volumenom ( $0,4 \text{ mL}$ ). Ukupna masa melatonina u određenom vremenu, odnosno korigirana masa ( $Q$ ), dobivena je zbrajanjem mase u receptorskom odjeljku u tom vremenu i svih ostalih, do tada uzorkovanih, masa melatonina. Napravljen je graf ovisnosti omjera mase permeiranog melatonina i difuzijske površine ( $A$ ) o vremenu. Fluks ( $J$ ,  $\mu\text{g/cm}^2\text{s}$ ) je nagib linearnog dijela krivulje:

$$J = \frac{dQ}{dt \times A}$$

Fluks je definiran kao masa melatonina koji permeira preko određene površine u danom vremenu.

Prema sljedećoj jednadžbi izračunat je prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) ( $\text{cm/s}$ ):

$$P_{app} = \frac{J}{C_0 \times 60}$$

pri čemu je  $J$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{min}$ ) fluks u ravnotežnom stanju,  $C_0$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) je početna koncentracija melatonina u donorskom odjeljku, a 60 je faktor konverzije minuta u sekunde (Hahne i sur., 2012).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Fizičko-kemijska karakterizacija lecitinsko-kitozanskih nanočestica s uklopljenim melatoninom

Lecitinsko-kitozanske nanočestice s uklopljenim melatoninom pripravljene su injektiranjem etanolne otopine lecitina i melatonina u vodenu otopinu kitozana (Hafner i sur., 2009). Nanočestice formiraju se uslijed ionske interakcije između negativno nabijenog lecitina i pozitivno nabijenog kitozana. Ta metoda pripreme nanočestica jednostavna je i reproducibilna. Sirovine korištene za pripremu lecitinsko-kitozanskih nanočestica prirodne su, biokompatibilne i biorazgradljive. Maseni omjer lecitina i kitozana iznosio je 20:1, a maseni omjer melatonina i lecitina 1:5. Radi usporedbe pripravljene su i lecitinske nanočestice s uklopljenim melatoninom, te također prazne lecitinsko-kitozanske i lecitinske nanočestice.

U ovom radu korišten je lecitin Lipoid S45 koji sadrži fosfatidilkolin (54,9 %), fosfatidiletanolamin (16,9 %), lizofosfatidilkolin (1,0 %) te masne kiseline (čiji je sadržaj izražen u postotku u odnosu na ukupnu količinu masnih kiselina: palmitinska (18 %), stearinska (3 %), oleinska (10 %), linoleinska (60 %), linolenska (5 %)) te manji sadržaj triglicerida i DL-R-tokoferola (0,8 %). Korišten je kitozan klorid stupnja deacetilacije 86 %. Sve suspenzije nanočestica podvrgnute su dijalizi s ciljem uklanjanja neuklopljenog melatonina.

Rezultati određivanja veličine, indeksa polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI) i zeta-potencijala pripremljenih nanočestica prikazani su u tablici 1. Lecitinsko-kitozanske nanočestice karakterizira značajno veći srednji promjer u usporedbi s lecitinskim nanočesticama. Takav rezultat je i očekivan zbog uvođenja kitozana u sustav te ionske interakcije između negativno nabijenog lecitina i pozitivno nabijenih amino skupina kitozana (Hafner i sur., 2009). Uklapanje melatonina nije uzrokovalo značajniju promjenu veličine nanočestica što je također u skladu sa literaturnim podacima (Hafner i sur., 2009, 2011). Indeks polidisperznosti je vrijednost koja opisuje raspodjelu veličina nanočestica u suspenziji. Kreće se od 0 za monodisperzni sustav (čestice podjednake veličine) do 1 za potpuno heterodisperzni sustav (sustav sa česticama različitih veličina). Pripravljene suspenzije nanočestica karakterizirane su relativno širokom raspodjelom veličina čestica. Vrijednosti indeks polidisperznosti kreću od 0,210 do 0,453 (Tablica 1.) Posebno visok PDI imaju lecitinske nanočestice bez melatonina, a lecitinsko-kitozanske s uklopljenim melatoninom imaju najniži PDI. To dovodi do zaključka da

elektrostatska interakcija lecitina i kitozana pogoduje nastanku nanočestice uže raspodjele veličina. Međutim, i lecitinsko-kitozanske nanočestice karakterizira poprilično visok PDI. Taj rezultat također je očekivan zbog velike polidisperznosti (molekulskih masa) prirodnog polimera kitozana (Hafner i sur., 2009).

Dodatak kitozana u formulaciju doveo je do očekivane promjene zeta-potencijala od izrazito negativnih vrijednosti za lecitinske nanočestice do pozitivnih vrijednosti za lecitinsko-kitozanske nanočestice. Uklapanje melatonina u sustav nije imalo utjecaja na zeta-potencijal nanočestica.

**Tablica 1.** Veličina, indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal lecitinsko-kitozanskih nanočestica s uklopljenim melatoninom te kontrolnih nanočestica.

Uzorak	Veličina (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)
ML	68,6 ± 0,2	0,397 ± 0,002	- 42 ± 4,2
L	69,9 ± 0,4	0,453 ± 0,009	- 43,0 ± 7,4
MCL	250,4 ± 4,8	0,210 ± 0,009	21,1 ± 0,4
CL	241,8 ± 0,8	0,260 ± 0,015	20,9 ± 1,8

Prikazane su srednje vrijednosti ± SD; MCL – lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom; CL – lecitinsko-kitozanske nanočestice; ML - lecitinske nanočestice s melatoninom; L - lecitinske nanočestice.

### 4.3. Uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice

Uspješnost uklapanja melatonina se određivala metodom dijalize, metodom kojom se ujedno i slobodni (neuklopljeni) melatonin izdvajao iz suspenzije nanočestica. Uspješnost uklapanja odnosi se na sadržaj melatonina koji se uspio uklopiti u nanočestice, a izražava se kao postotak spram ukupne količine melatonina korištene u pripravi nanočestica. Sadržaj uklopljenog lijeka je maseni udio uklopljenog melatonina spram mase nanočestica. Koncentracija melatonina je izražena kao količina (masa) uklopljenog melatonina u određenom volumenu suspenzije nanočestica.



**Tablica 2.** Uspješnost uklapanja i sadržaj melatonina u pripremljenim nanočesticama

	UU (%)	DL (%)	C <sub>M</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )
MCL	27,5 ± 0,4	5,5 ± 0,07	121,9 ± 1,7
ML	22,6 ± 0,8	4,1 ± 0,01	86,5 ± 1,4

UU, uspješnost uklapanja; DL, sadržaj lijeka u nanočesticama; C<sub>M</sub>, sadržaj lijeka u volumenu suspenzije nanočestica. Pri izradi nanočestica postignuta je zadovoljavajuća uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice. Uspješnost uklapanja bila je veća za lecitinsko-kitozanske nanočestice, a što je u skladu sa literaturnim navodima (Hafner i sur., 2009). Postignut je i relativno velik sadržaj lijeka te time i koncentracija melatonina u suspenziji nanočestica.

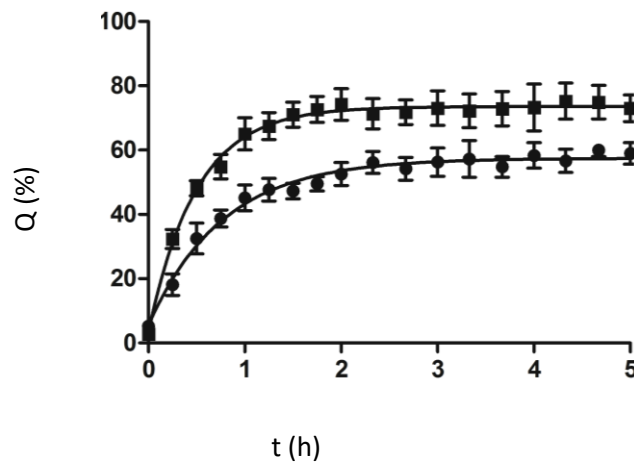
#### 4.4. *In vitro* oslobađanje melatonina iz nanočestica

*In vitro* oslobađanje melatonina iz nanočestica ispitivano je metodom dijalize u acetatnom puferu (pH 5,8) u uvjetima osigurane topljivosti. Acetatni pufer je prikladan medij za melatonin budući da mu osigurava dobru topljivost i stabilnost. Metoda dijalize se smatra jednom od najprikladnijih metoda za ispitivanje profila oslobađanja lijeka iz nanosustava (Modi i Anderson, 2013; Zambito i sur., 2012). Cilj ovog ispitivanja bio je utvrditi kako dodatak kitozana u sustav utječe na brzinu oslobađanja melatonina iz nanosustava. Ovim ispitivanjem, međutim, ne možemo predvidjeti ponašanje nanosustava *in vivo*. Za postizanje tog cilja potrebno je koristiti biorelevantnu metodu kojom se oponašaju uvjeti na površini oka *in vivo*.

Pri ispitivanim uvjetima, lecitinsko-kitozanske i lecitinske nanočestice karakterizira produljeno oslobađanje melatonina. Profil oslobađanja melatonina iz lecitinsko-kitozanskih i lecitinskih nanočestica prikazani su na Slici 5. Dodatak kitozana u sustav dovodi do smanjenja brzina oslobađanja melatonina iz nanosustava ( $t_{50\%}$  vrijednosti za lecitinsko-kitozanske nanočestice iznosi 1,75 h, a za lecitinske nanočestice 0,75 h), što je u skladu sa zapažanjima u literaturi (Hafner i sur., 2009).

Nedostatak dijalize kao metode za ispitivanje *in vitro* oslobađanja jest što lijek mora nakon oslobađanja iz nanočestica difundirati kroz dijalizacijsku vrećicu u receptorsku fazu. Stoga je porast koncentracije lijeka u receptorskoj fazi posljedica dvaju procesa: oslobađanja lijeka iz samih nanočestica unutar dijalizacijske vrećice te difuzije lijeka kroz membranu dijalizacijske vrećice. Iz tog razloga potrebno je ispitati difuziju lijeka iz otopine kroz membranu dijalizacijske

vrećice. Difuzija melatonina kroz dijalizacijsku membranu u slučaju vodene otopine melatonina je značajno brža ( $t_{50\%}$  0,25 h; Blažević i Milekić, 2015) nego u slučaju ispitivanih nanočestica, te se može zaključiti da je profil oslobađanja melatonina, u slučaju nanočestica, određen oslobađanjem melatonina iz nanočestica, a ne difuzijom kroz dijalizacijsku membranu.



**Slika 7.** Profil oslobađanja melatonina iz lecitinsko-kitozanskih (●) i lecitinskih nanočestica (■). Ispitivanje je provedeno metodom dijalize uz acetatni pufer (pH 5,8) kao receptorski medij. Prikazane su srednje vrijednosti kumulativnog udjela oslobođenog melatonina ( $Q$ )  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

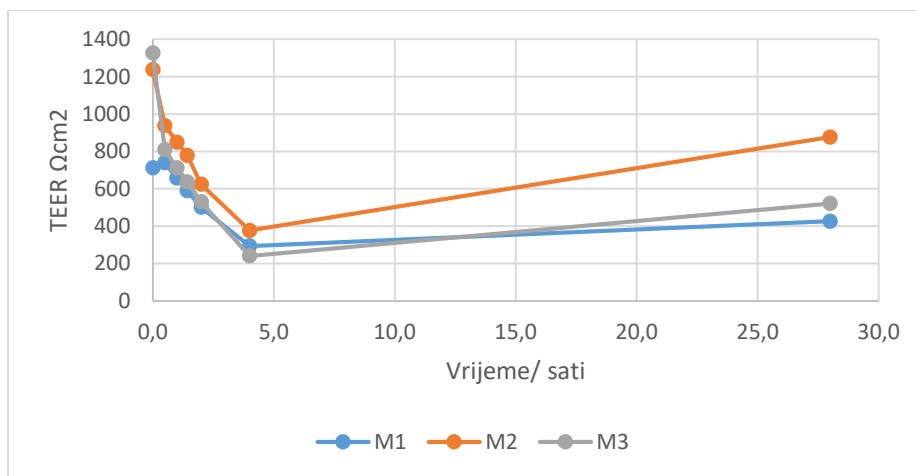
#### 4.5. Ispitivanje permeabilnosti melatonina na *in vitro* modelu epitela rožnice

Osnovni cilj ovog rada bio je utvrditi kako uklapanje melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice utječe na permeaciju melatonina preko rožnice. Slobodan melatonin dobro permeira preko rožnice. U slučaju uklapanja lijeka u nanosustav koji sam ne prelazi barijeru rožnice, lijek se prvo mora osloboditi iz nanosustava te tek slobodan lijek može permeirati kroz rožnice.

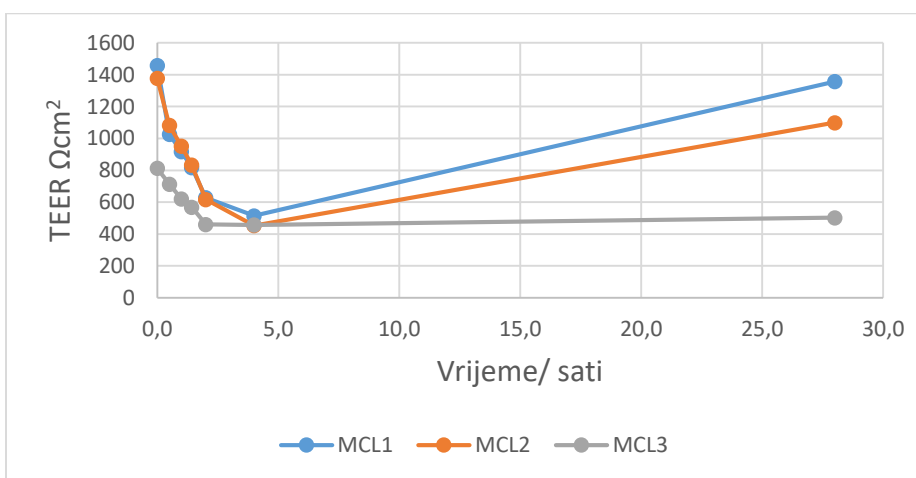
TEER je indikator integriteta epitela te njegova promjena tijekom ispitivanja permeabilnosti može ukazivati na toksični učinak nanosustava. Međutim, promjena vrijednosti TEER-a tijekom ispitivanja može biti i posljedica otvaranja čvrstih veza među epitelnim stanicama. Kitozan ulazi u interakciju sa čvrstim vezama i uzrokuje njihovo otvaranje. Taj učinak je reverzibilan te uklanjanjem kitozana dolazi do porasta vrijednosti TEER-a (Hafner i sur., 2009). Stoga je TEER mjeran tijekom ispitivanja permeabilnosti, ali i sljedeći dan kako bi se utvrdilo jesu li uočene

promjene reverzibilne. Na slikama 8, 9 i 10 prikazan je TEER u ovisnosti o vremenu pri ispitivanju permeabilnosti melatonina iz otopine melatonina, lecitinsko-kitozanskih te lecitinskih nanočestica tijekom 2 sata ispitivanje permeabilnosti te sljedeći dan.

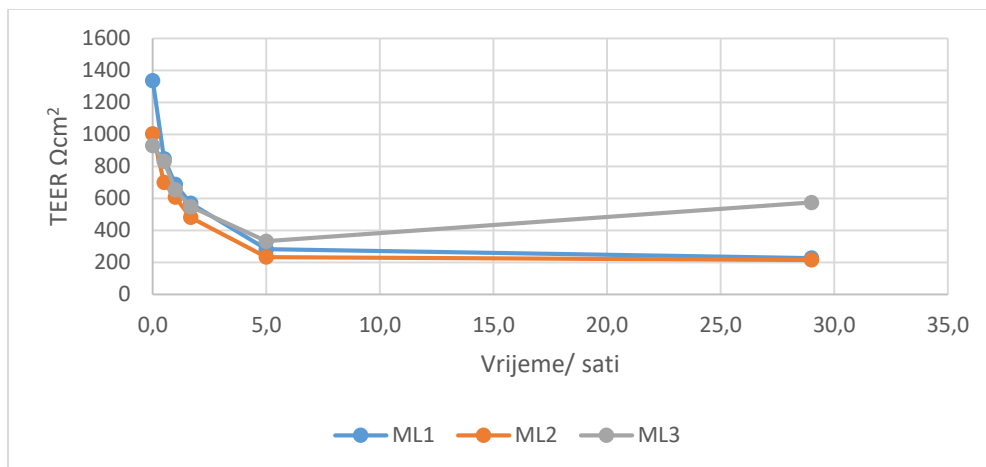
Opažen je nagli pad TEER vrijednosti tijekom dvosatnog ispitivanja permeabilnosti bez obzira na uzorak kojem je bio izložen *in vitro* model epitela rožnice. To upućuje na osjetljivost ovog modela izlaganju tekućini nakon što je bio izložen zraku. Međutim, uklanjanjem uzoraka s površine modela te ponovnim izlaganjem zraku dolazi do porasta TEER vrijednosti.



**Slika 8.** Ovisnost TEER vrijednosti *in vitro* modela epitela rožnice o vremenu pri ispitivanju permeabilnosti melatonina iz otopine.

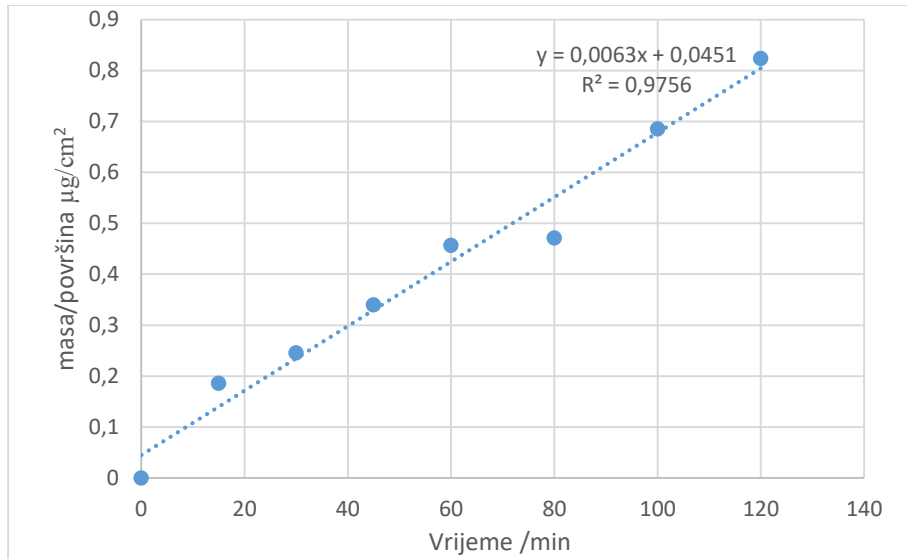


**Slika 9.** Ovisnost TEER vrijednosti *in vitro* modela epitela rožnice o vremenu pri ispitivanju permeabilnosti melatonina uklopljenog u lecitinsko-kitozanske nanočestice.

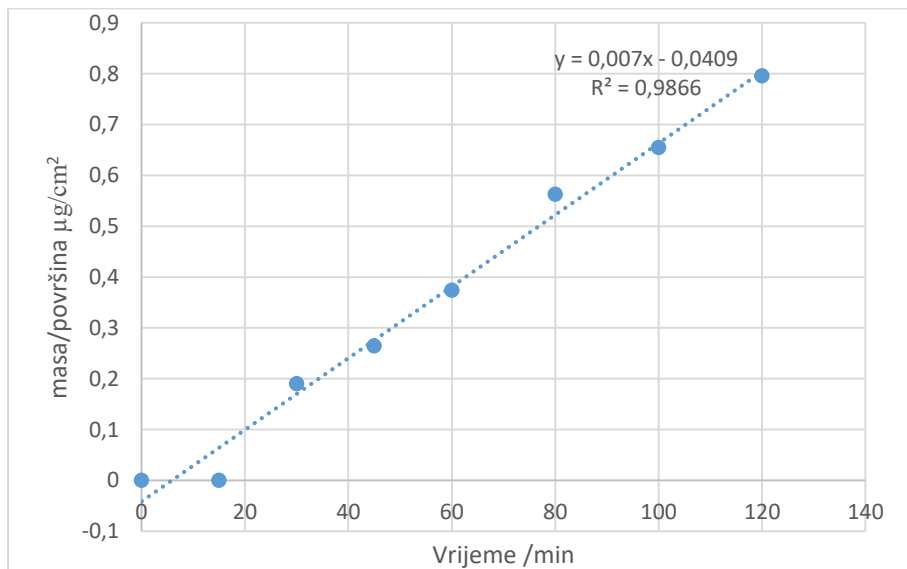


**Slika 10.** Ovisnost TEER vrijednosti *in vitro* modela epitela rožnice o vremenu pri ispitivanju permeabilnosti melatonina uklopljenog u lecitinske nanočestice.

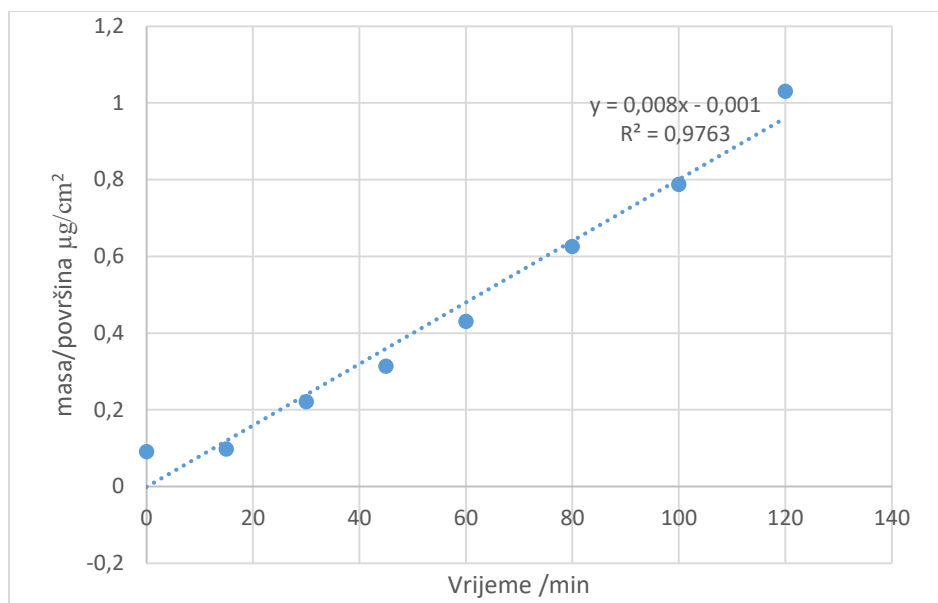
S ciljem određivanja prividnog koeficijenta permeacije ( $P_{app}$ ) melatonina *in vitro* model epitela rožnice izložen je lecitinsko-kitozanskim i lecitinskim nanočesticama s uklopljenim melatoninom te otopini melatonina. U svim uzorcima koncentracija melatonina iznosila je  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Svaki uzorak ispitan je u triplicatu, a koncentracija melatonina u receptorskom odjeljku tijekom vremena određena je HPLC metodom. Nakon tog izračunata je masa permeiranog melatonina u određenom vremenu te je grafički prikazana ovisnost omjera mase permeiranog lijeka i difuzijske površine o vremenu (slike 11-19). Iz jednadžbe pravca određen je fluks ( $J$ ) u ravnotežnom stanju (jednak nagibu pravca). Iz fluksa je zatim izračunat prividni koeficijent permeabilnosti melatonina ( $P_{app}$ ).



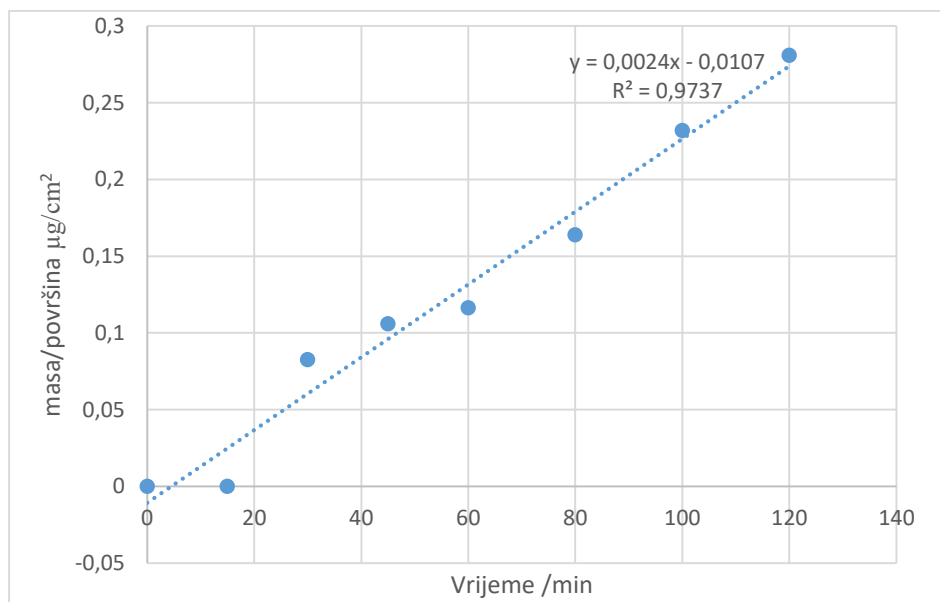
**Slika 11.** Ovisnost omjera mase permeiranog melatonina i difuzijske površine o vremenu za prvi uzorak otopine melatonina (koncentracija  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) melatonina iznosi  $1,16 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ .



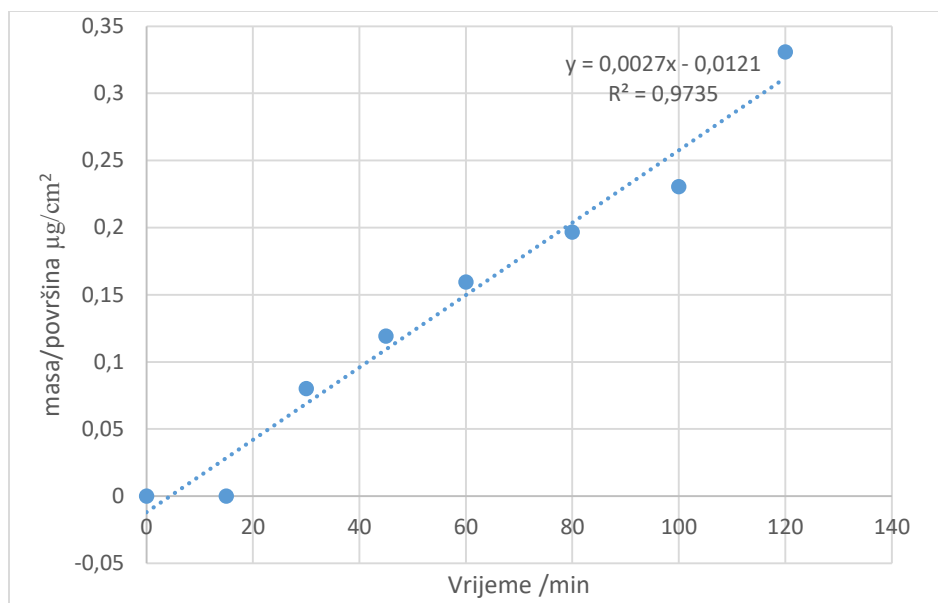
**Slika 12.** Ovisnost omjera mase permeiranog melatonina i difuzijske površine o vremenu za drugi uzorak otopine melatonina (koncentracija  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) melatonina iznosi  $1,28 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ .



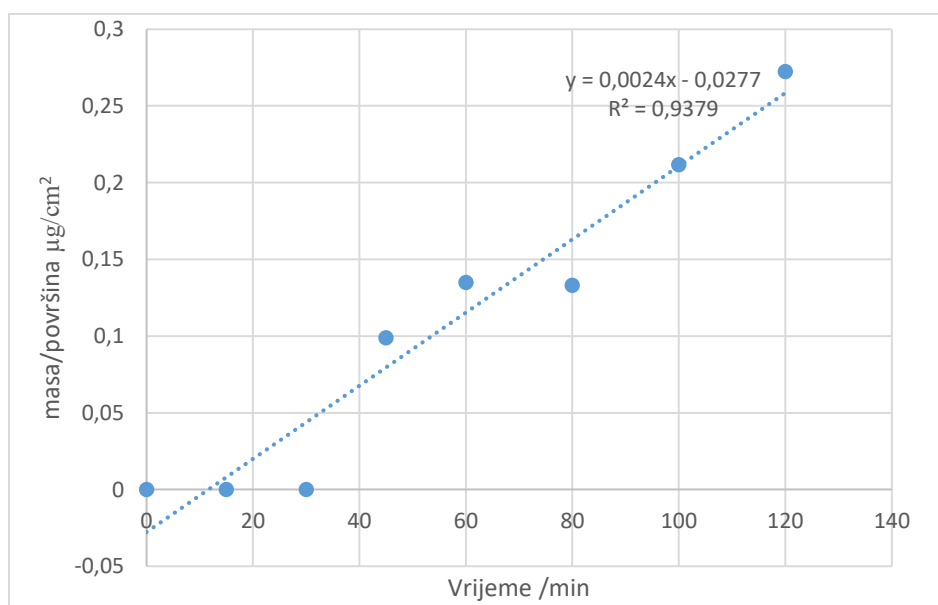
**Slika 13.** Ovisnost omjera mase permeiranog melatonina i difuzijske površine o vremenu za treći uzorak otopine melatonina (koncentracija  $50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ). Prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) melatonina iznosi  $1,47 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ .



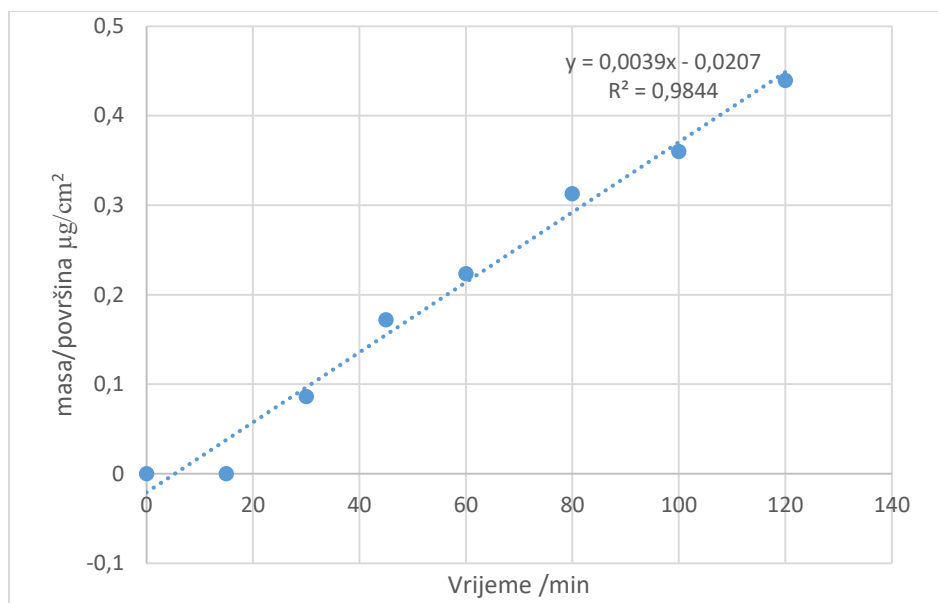
**Slika 14.** Ovisnost omjera mase permeiranog melatonina i difuzijske površine o vremenu za prvi uzorak suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica (koncentracija melatonina  $50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ). Prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) melatonina iznosi  $5,7 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ .



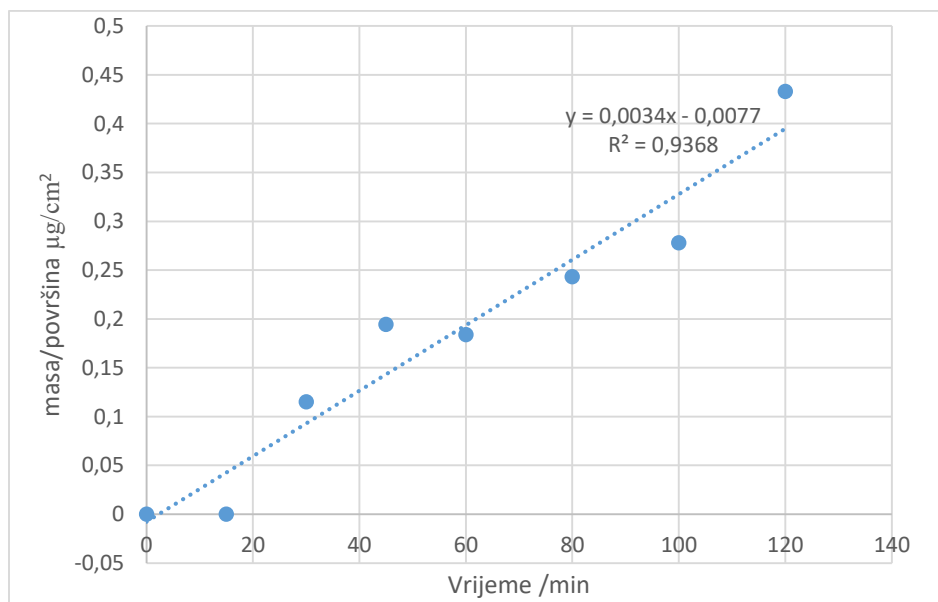
**Slika 15.** Ovisnost omjera mase permeiranog melatonina i difuzijske površine o vremenu za drugi uzorak suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica (koncentracija melatonina  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Pravidni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) melatonina iznosi  $6,36 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ .



**Slika 16.** Ovisnost omjera mase permeiranog melatonina i difuzijske površine o vremenu za treći uzorak suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica (koncentracija melatonina  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Pravidni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) melatonina iznosi  $5,66 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ .

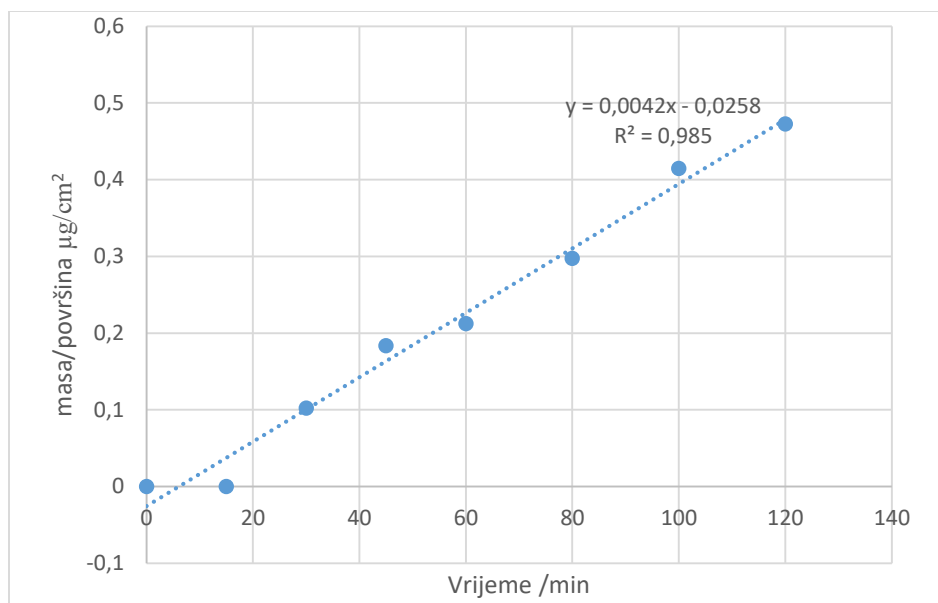


**Slika 17.** Ovisnost omjera mase permeiranog melatonina i difuzijske površine o vremenu za prvi uzorak suspenzije lecitinskih nanočestica (koncentracija melatonina  $50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ). Prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) melatonina iznosi  $8,56 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ .



**Slika 18.** Ovisnost omjera mase permeiranog melatonina i difuzijske površine o vremenu za drugi uzorak suspenzije lecitinskih nanočestica (koncentracija melatonina  $50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ). Prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) melatonina iznosi  $7,47 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ .





**Slika 19.** Ovisnost omjera mase permeiranog melatonina i difuzijske površine o vremenu za treći uzorak suspenzije lecitinskih nanočestica (koncentracija melatonina  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Pravidni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) melatonina iznosi  $9,22 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ .

UZORAK	$\overline{P_{app}}$ ( $\times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) $\pm$ SD
M1	$13.02 \pm 0.08$
MCL	$5.91 \pm 0.19$
ML	$8.42 \pm 0.42$

**Tablica 3**  $P_{app}$  – pravidni koeficijent permeabilnosti; SD – standardna devijacija

U tablici 3. prikazani su pravidni koeficijenti permeabilnosti i standardna devijacija za lecitinsko-kitozanske i lecitinske nanočestice i melatonin. Rezultati pokazuju da se uklapanjem melatonina u lecitinske i lecitinsko-kitozanske nanočestice značajno smanjuje pravidni koeficijent permeabilnosti u usporedbi sa otopinom melatonina. Prisutstvo kitozana je također utjecalo na smanjenje  $P_{app}$ . Prema tome lecitinsko-kitozanske nanočestice imaju manju permeabilnost melatonina od lecitinskih nanočestica, što je u skladu sa literaturnim podacima (A. Hafner i sur., 2009.). Treba imati na umu da lecitinsko-kitozanske nanočestice su dizajnirane na način da se prijanjaju na mucinski sloj na površini rožnice omogućavajući tako produljeno

oslobađanje melatonina, što bi u konačnom farmakoterapijskom učinku nadoknadilo smanjenu permeabilnost i smanjeno *in vitro* oslobađanje melatonina iz nanočestica.

## 5. ZAKLJUČCI

- Uspješno su pripravljene lecitinsko-kitozanske nanočestice s uklopljenim melatoninom te kontrolne lecitinske nanočestice s uklopljenim melatoninom. Fizičko-kemijska svojstva pripremljenih nanočestica (veličina, polidisperznost i zeta-potencijala nanočestica) odgovarali su podacima u literaturi.
- Uklapanje melatonina nije utjecao na veličinu niti zeta potencijal nanočestica.
- Uspješnost uklapanja bila je veća za lecitinsko-kitozanske nanočestice, a što je u skladu sa literaturnim navodima.
- Određen je *in vitro* profil oslobađanja uklopljenog melatonina za lecitinsko-kitozanske i lecitinske nanočestice. Primjećeno je da se melatonin sporije oslobađa iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica.
- Uspješno je uzgojen *in vitro* model epitela rožnice (stanična linija HCE-T) za ispitivanje permeabilnosti.
- Određeni su prividni koeficijenti permeabilnosti melatonina za lecitinsko-kitozanske nanočestice, lecitinske nanočestice i otopinu melatonina.
- Brzina oslobađanja melatonina korelira sa brzinom permeacije melatonina preko *in vitro* model epitela rožnice.

## 6. LITERATURA

Agarwal P, Rupenthal ID. In vitro and ex vivo corneal penetration and absorption models. *Drug Deliv Transl Res*, 2016, 6(6):634-647.

Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36(3):614-621.

Barbieri S, Buttini F, Rossi A, Bettini R, Colombo P, Ponchel G, Sonvico F, Colombo G. Ex vivo permeation of tamoxifen and its 4-OH metabolite through rat intestine from lecithin/chitosan nanoparticles. *Int J Pharm*, 2015, 491(1-2):99-104.

Basaran E, Yazan Y. Ocular application of chitosan. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9(6):701-712.

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

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

Ceraulo L, Fanara S, Turco Liveri V, Ruggirello A, Panzeri W, Mele A. Orientation and molecular contacts of melatonin confined into AOT and lecithin reversed micellar systems. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 2008, 316(1-3):307-312.

Chew SJ, Ritch R. Neuroprotection: the next breakthrough in glaucoma? Proceedings of the Third Annual Optic Nerve Rescue and Restoration Think Tank. *J Glaucoma*, 1997, 6(4):263-266.

Dauil P, Lallemand F, Garrigue JS. Benefits of cetalkonium chloride cationic oil-in-water nanoemulsions for topical ophthalmic drug delivery. *J Pharm Pharmacol*, 2014, 66(4):531-541.

De La Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, Sanchez A, Seijo B, Alonso MJ. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 31;62(1):100-117.

Fujieda H, Hamadanizadeh SA, Wankiewicz E, Pang SF, Brown GM. Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience* 93: 793–799.

Hafner A, Lovrić J, Pepić I, Filipović-Grčić J. Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. *J Microencapsul*, 2011, 28(8):807-815.

Hafner A, Lovrić J, Romić MD, Juretić M, Pepić I, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Evaluation of cationic nanosystems with melatonin using an eye-related bioavailability prediction model. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 75:142-150.

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

Hahne M, Zorn-Kruppa M, Guzman G, Brandner JM, Haltner-Ukomado E, Wätzig H, Reichl S. Prevalidation of a human cornea construct as an alternative to animal corneas for in vitro drug absorption studies. *J Pharm Sci*, 2012, 101(8):2976-2988.

Kelmann RG, Kuminek G, Teixeira HF, Koester LS, Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. *Int. J Pharm*, 2007, 342, 231–239.

Lallemand F, Schmitt M, Bourges JL, Gurny R, Benita S, Garrigue JS. Cyclosporine A delivery to the eye: A comprehensive review of academic and industrial efforts. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 117:14-28.

Lixin W, Haibing H, Xing T, Ruiying S, Dawei C. A less irritant norcantharidin lipid microspheres: formulation and drug distribution. *Int. J Pharm*, 2006, 323(1-2):161-167.

Mao S, Chen J, Wei Z, Liu H, Bi D. Intranasal administration of melatonin starch microspheres. *Int J Pharm*, 2004, 272(1-2):37-43.

- Modi S, Anderson BD. Determination of drug release kinetics from nanoparticles: overcoming pitfalls of the dynamic dialysis method. *Mol Pharm*, 2013, 10, 3076–3089.
- Osborne NN, Chidlow G, Nash MS, Wood JP. The potential of neuroprotection in glaucoma treatment. *Curr Opin Ophthalmol*, 1999, 10(2):82-92.
- Pavelić Z, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Martinac A, Jalšenjak I. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *J Control Release*, 2005, 106, 34–43.
- Pepić I, Lovrić J, Cetina-Čizmek B, Reichl S, Filipović-Grčić J. Toward the practical implementation of eye-related bioavailability prediction models. *Drug Discov Today*, 2014, 19, 31-44.
- Rada JA, Wiechmann AF. Melatonin receptors in chick ocular tissues: implications for a role of melatonin in ocular growth regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(1):25-33.
- Ritch R. Neuroprotection: is it already applicable to glaucoma therapy? *Curr Opin Ophthalmol*, 2000, 11, 78-84.
- Savaskan E, Wirz-Justice A, Olivieri G, Pache M, Kräuchi K, Brydon L, Jockers R, Müller-Spahn F, Meyer P. Distribution of melatonin MT1 receptor immunoreactivity in human retina. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50(4):519-526.
- Schaffazick SR, Siqueira IR, Badejo AS, Jornada DS, Pohlmann AR, Netto CA, Guterres SS. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 69(1):64-71.
- Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. AII amacrine cells express the MT1 melatonin receptor in human and macaque retina. *Exp Eye Res*, 2003, 77:375–382.
- Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(3):889-897.

Sonvico F, Cagnani A, Rossi A, Motta S, Di Bari MT, Cavatorta F, Alonso MJ, Deriu A, Colombo P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *Int J Pharm*, 2006, 324(1):67-73.

Tamara FR, Lin C, Mi FL, Ho YC. Antibacterial Effects of Chitosan/Cationic Peptide Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*, 2018, 8(2), 88.

Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma. *JAMA*. 2014, 311(18): 1901–1911.

Weinreb RN, Levin LA. Is neuroprotection a viable therapy for glaucoma?. *Arch Ophthalmol*, 1999, 117(11):1540-1544.

Wiechmann AF, Rada JA. Melatonin receptor expression in the cornea and sclera. *Exp Eye Res*, 2003, 77(2):219-225.

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

Williams KJ, Werth VP, Wolff JA. Intravenously administered lecithin liposomes: a synthetic anti-atherogenic lipid particle. *Perspect Biol Med*, 1984, 27:417–431.

Zambito Y, Pedreschi E, Di Colo G. Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems? – A case study. *Int J Pharm*, 2012, 434(1-2):28-34

## 7. SAŽETAK

Topikalna primjena lijekova na oko je preferirani put primjene lijekova pri liječenju bolesti oka. Pod pojmom konvencionalnih oftalmičkih lijekova podrazumijevamo otopine i suspenzije lijeka koje se primjenjuju na površinu oka u obliku kapi za oko. Takovi farmaceutski oblici lijeka relativno brzo se uklanjaju s površine oka te je potrebno njihovo učestalo doziranje za postizanje farmakološkog učinka. To ima negativan učinak na adherenciju pacijenta. Terapijski nanosustavi predstavljaju jedno od inovativnih rješenja koja mogu dovesti do povećanja biorasploživosti topikalno primijenjenog oftalmičkog lijeka.

Glaukom je bolest karakterizirana oštećenjem vidnog živca i jedan od vodećih uzroka sljepoće. Povišeni očni tlak smatra se jednim od glavnih čimbenika rizika u razvoju glaukoma. Melatonin se istaknuo kao jedan od potencijalnih lijekova za uspješno liječenje povećanog očnog tlaka i sprječavanja razvoja glaukoma .

U ovom radu pripravljene su lecitinsko-kitozanske nanočestice s uklopljenim melatoninom, zadovoljavajućih fizičko-kemijskih svojstava. Kationski polimer kitozan osigurava pozitivni površinski naboj nanočestica čime se potencijalno omogućava njihova interakcija s vodenomucinskim slojem suznog filma te produljuje vrijeme zadržavanja oftalmičke formulacije na površini oka. Pri ispitivanim uvjetima, lecitinsko-kitozanske nanočestice karakterizira produljeno oslobađanje melatonina. Permeabilnost melatonina određena je korištenjem *in vitro* modela epitela rožnice temeljenog na HCE-T staničnoj liniji. Brzina oslobađanja melatonina korelira sa brzinom permeacije melatonina preko *in vitro* model epitela rožnice.



## 8. SUMMARY

Topical administration of ophthalmic drugs is the preferred route of administration of drugs in the treatment of ocular diseases. The term conventional ophthalmic drugs is referred to drug solutions and suspensions that are applied to the eye surface in the form of eye drops. Such pharmaceutical dosage forms are removed relatively quickly from the eye surface, and their frequent dosing is required to achieve a pharmacological effect. This has a negative effect on patient adherence. Drug delivery nanosystems represent one of the innovative solutions that can increase the bioavailability of a topically applied ophthalmic drug.

Glaucoma is a disease characterized by damage to the optic nerve and one of the leading causes of blindness. Elevated eye pressure is considered one of the major risk factors for glaucoma development. Melatonin has emerged as one of the potential drugs for successfully treating increased eye pressure and preventing glaucoma development.

In this work, melatonin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles were prepared with satisfactory physicochemical properties. Incorporation of chitosan in the system provides nanoparticles with positive charged surface. This enables potential interaction of nanoparticles with the mucoaqueous layer of the tear film and increase of retention time of the ophthalmic formulation on eye surface.

Nanoparticles were characterised by prolonged melatonin release. Melatonin permeability was investigated using *in vitro* HCE-T corneal epithelial model. A correlation between melatonin *in vitro* release from nanoparticles and permeation rate was observed.

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## In vitro ispitivanje transkornealne permeabilnosti melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica

Martin Štefek

### SAŽETAK

Topikalna primjena lijekova na oko je preferirani put primjene lijekova pri liječenju bolesti oka. Pod pojmom konvencionalnih oftalmičkih lijekova podrazumijevamo otopine i suspenzije lijeka koje se primjenjuju na površinu oka u obliku kapi za oko. Takovi farmaceutski oblici lijeka relativno brzo se uklanjaju s površine oka te je potrebno njihovo učestalo doziranje za postizanje farmakološkog učinka. To ima negativan učinak na adherenciju pacijenta. Terapijski nanosustavi predstavljaju jedno od inovativnih rješenja koja mogu dovesti do povećanja bioraspoloživosti topikalno primijenjenog oftalmičkog lijeka.

Glaukom je bolest karakterizirana oštećenjem vidnog živca i jedan od vodećih uzroka sljepoće. Povišeni očni tlak smatra se jednim od glavnih čimbenika rizika u razvoju glaukoma. Melatonin se istaknuo kao jedan od potencijalnih lijekova za uspješno liječenje povećanog očnog tlaka i sprječavanja razvoja glaukoma.

U ovom radu pripravljene su lecitinsko-kitozanske nanočestice s uklopljenim melatoninom, zadovoljavajućih fizičko-kemijskih svojstava. Kationski polimer kitozan osigurava pozitivni površinski naboj nanočestica čime se potencijalno omogućava njihova interakcija s vodenomucinskim slojem suznog filma te produljuje vrijeme zadržavanja oftalmičke formulacije na površini oka. Pri ispitivanim uvjetima, lecitinsko-kitozanske nanočestice karakterizira produljeno oslobađanje melatonina. Permeabilnost melatonina određena je korištenjem in vitro modela epitela rožnice temeljenog na HCE-T staničnoj liniji. Brzina oslobađanja melatonina korelira sa brzinom permeacije melatonina preko in vitro model epitela rožnice.

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

Rad sadrži 39 stranica, 19 grafičkih prikaza, 3 tablice i 37 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi Kitozan; Melatonin; Lecitin; Nanočestice; Glaukom; Permeabilnost

Mentor **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

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

Rad prihvaćen: rujan 2019.

## Basic documentation card

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

Diplomski rad

### *In vitro* transcorneal permeability of melatonin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles

**Martin Štefek**

#### SUMMARY

Topical administration of ophthalmic drugs is the preferred route of administration of drugs in the treatment of ocular diseases. The term conventional ophthalmic drugs is referred to drug solutions and suspensions that are applied to the eye surface in the form of eye drops. Such pharmaceutical dosage forms are removed relatively quickly from the eye surface, and their frequent dosing is required to achieve a pharmacological effect. This has a negative effect on patient adherence. Drug delivery nanosystems represent one of the innovative solutions that can increase the bioavailability of a topically applied ophthalmic drug.

Glaucoma is a disease characterized by damage to the optic nerve and one of the leading causes of blindness. Elevated eye pressure is considered one of the major risk factors for glaucoma development. Melatonin has emerged as one of the potential drugs for successfully treating increased eye pressure and preventing glaucoma development.

In this work, melatonin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles were prepared with satisfactory physicochemical properties. Incorporation of chitosan in the system provides nanoparticles with positive charged surface. This enables potential interaction of nanoparticles with the mucoaqueous layer of the tear film and increase of retention time of the ophthalmic formulation on eye surface.

Nanoparticles were characterised by prolonged melatonin release. Melatonin permeability was investigated using in vitro HCE-T corneal epithelial model. A correlation between melatonin in vitro release from nanoparticles and permeation rate was observed.

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

Thesis includes 39 pages, 19 pictures, 3 charts and 37 references. Original is in Croatian language

Keywords Chitosan; Melatonin; Lecithin; Nanoparticles; Glaucoma; Permeability

Mentor **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Dr. sc. Anita Hafner**, Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019.