

# Ciklodekstrinsko-polianhidridne nanočestice s melatoninom

---

Jurinić, Hrvoje

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:131376>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



**Hrvoje Jurinić**

**Ciklodekstrinsko-polianhidridne nanočestice s  
melatoninom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

*Zahvaljujem mentoru izv.prof.dr.sc. Mariju Jugu na savjetovanju, uloženom vremenu, trudu, razumijevanju i iznimnom strpljenju prilikom izrade ovoga rada. Srdačno zahvaljujem i asistentici Sabini Keser na pomoći kod eksperimentalnog dijela rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom studiranja.*

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Uloga, sastav i građa sluzi .....	1
1.2. Barijerna uloga sluzi.....	3
1.2.1. Fizička barijera.....	3
1.2.2. Fizičko-kemijska ili interakcijska barijera.....	5
1.2.3. Dinamička barijera .....	7
1.3. Nanočestični terapijski sustavi za primjenu na sluznicu .....	8
1.4. Ciklodekstrini.....	11
1.4.1. Građa ciklodekstrina.....	11
1.4.2. Farmakokinetika i toksičnost .....	12
1.4.3. Regulatorni status ciklodekstrina .....	13
1.4.4. Inkluzijski kompleksi .....	14
1.5. Terapijski potencijal primjene melatonina u liječenju bolesti usne šupljine .....	18
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	25
3. MATERIJALI I METODE .....	27
3.1. Kemikalije.....	27
3.2. Instrumenti .....	27
3.3. Metode.....	27
3.3.1. Priprema i karakterizacija kompleksa melatonina s HP- $\beta$ -ciklodestrinom .....	27
3.3.2. Priprava nanočestica .....	28
3.3.3. Mjerenje veličine i zeta potencijala nanočestica.....	30
3.3.4. Određivanje postotka uklapanja melatonina.....	31
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	32
4.1. Razvoj metode za određivanje sadržaja melatonina.....	32
4.2. Karakterizacija inkluzijskog kompleksa melatonina s HP- $\beta$ -ciklodekstrinom u krutom stanju.....	32
4.3. Osobine pripremljenih nanočestica .....	35

4.3.1. Osobine ne-PEGiliranih nanočestica.....	35
4.3.2. Osobine PEGiliranih nanočestica.....	41
5. ZAKLJUČCI .....	44
6. LITERATURA .....	45
7. SAŽETAK.....	48
7. SUMMARY .....	49

## 1. UVOD

### 1.1. Uloga, sastav i građa sluzi

Sluz je viskoelastični hidrogel kompleksnog sastava koji oblaže sluznice probavnog sustava, cervikovaginalno područje, oko te dišni sustav. Najvažnija uloga sluzi je zaštita velikih površina epitelnog tkiva koje se nalaze na sučelju između ljudskog organizma i okoliša, istovremeno omogućujući epitelu obavljanje svoje zadaće, primjerice probave i apsorpcije u gastrointestinalnom traktu, disanja u dišnom sustavu itd. Osim toga, sluz predstavlja dodatnu prepreku djelovanju lijeka, bilo kod sistemske, kao i topičke primjene.

Uloge sluzi su raznolike i brojne (Tablica 1). Kao što je već ranije istaknuto, sluz štiti epitel kojeg prekriva, a uz to olakšava prolazak hrane, bolusa i fecesa probavnim traktom, smanjuje trenje pri treptanju, vlaži udahnuti zrak, ima antimikrobnu ulogu te zadržava strane čestice. (Murgia i ostali, 2017)

Tablica 1 *Uloge sluzi u ljudskom tijelu* (Murgia i ostali, 2017)

	Gastrointestinalni trakt	Dišni putovi	Ženski genitourinarni trakt	Oko
Važne funkcije	-zaštitni sloj -podmazivanje -apsorpcija nutrijenata	-zaštitni sloj -vlaženje udahnutog zraka	-zaštitni sloj -prilagodba permeabilnosti menstrualnog ciklusa	-zaštitni sloj -podmazivanje: smanjenje tijekom treptanja

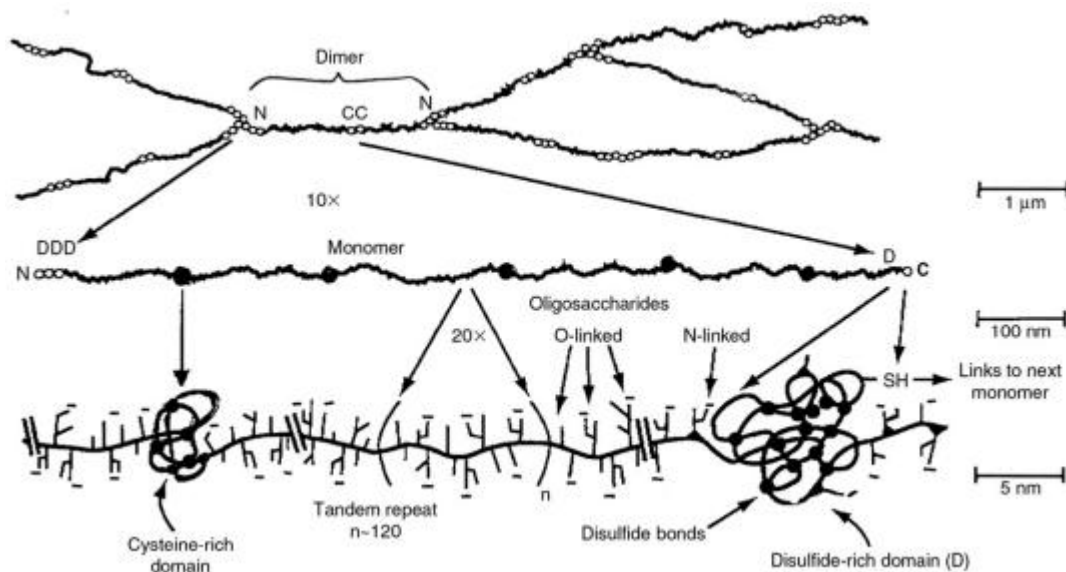
Po sastavu je sluz građena od 95% vode te 2-5% mucina. U puno manjim količinama su prisutni i lipidi, DNA, aktin i drugi sastojci koji nastaju raspadanjem epitelnih stanica.

Mucini su glikoproteini velike molekularne mase (200 000 do 3 000 000 Da). Osnova mucina je polipeptidni lanac koji ima dvije vrste regija (Slika 1). Prva regija je područje varijabilnog broja tandemskih ponavljanja u kojem se određeni broj puta, koji se razlikuje od osobe do osobe, ponavlja serinom, treoninom i prolinom (STP) bogat niz aminokiselina koji je specifičan za pojedinu vrstu mucina. Ovakve su regije iznimno glikozilirane. Ugljikohidratni lanci građeni od 1 do 20 molekula fukoze, galaktoze, N-acetilgalaktozamina, N-acetilglukozamina i sijalinske kiseline se vežu na hidroksilne skupine serina ili treonina preko

N-acetilgalaktozamina (O-glikozilacija). Čak 50-90% molekulske mase mucina otpada upravo na ove polisaharidne lance, a oni su uz to odgovorni i za negativni naboj mucina budući da su pri fiziološkom pH sijalinska kiselina te sulfonirani ugljikohidrati negativno nabijeni. Druga vrsta regije su hidrofobne globularne regije ili tzv. „gole“ regije. One su neglikozilirane, sadrže puno cisteina, stabilizirane su intramolekulskim disulfidnim vezama (Cone, 2009) te pomoću njih mucini ostvaruju hidrofobne interakcije. Gole domene na sebe vežu i lipide koji stvaraju brojne intermolekulske veze niskog afiniteta s mucinima i na taj način povećavaju viskoelastičnost sluzi.

Osim gore navedenih regija, mucini koji stvaraju gel sadrže cisteinom bogate N i C terminalne krajeve čija je glavna zadaća povezivanje (polimerizacija) mucina pomoću kovalentnih disulfidnih veza pri čemu nastaje umrežena struktura.

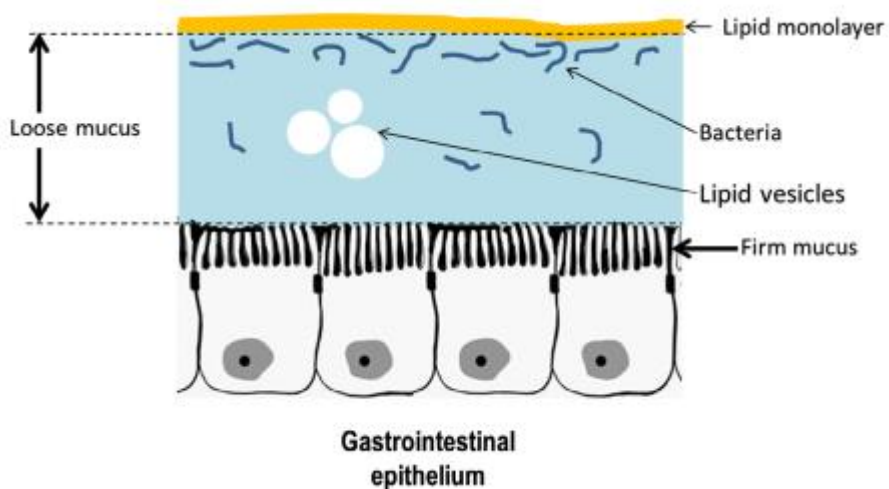
S druge strane, mucini koji su vezani za membranu sadrže transmembransku regiju, ali i tzv. SEA domenu koja je podložna autoproteolizi. SEA domene imaju zaštitnu ulogu jer se one kidaju pri mehaničkom stresu te se mucini odvoje od membrane i na taj način se izbjegava oštećenje membrane.



Slika 1 Shematski prikaz građe mucina (Cone, 2009)

Mucini se dijele u dvije glavne skupine; mucini koji su vezani za membranu (MUC 1, 3, 4, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22) te izlučeni mucini koji tvore gel (MUC 2, 5AC, 5B, 6, 19). MUC7 je iznimka jer je to mucin koji se izlučuje, a ne tvori gel, već je topljiv.

Sluz je građena od dva sloja (Slika 2). Prvi tanji sloj se nalazi direktno iznad epitelnih stanica, te je otporan na mehanički stres, a građen je od mucina koji su vezani za membranu. Osim što sudjeluje u unutarstaničnom signaliziranju, predstavlja učinkovitu barijeru protiv bakterija, enzima i toksina, a naziva se glikokaliks ili čvrsti sloj. Drugi ili labavi sloj je značajno deblji, a nalazi se iznad glikokaliksa. Građen je od mucina koji tvore gel te je osjetljiv na mehanički stres. (Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016; Pearson, Chater i Wilcox, 2016)



Slika 2 Prikaz dva sloja od kojih je građena sluz; gel ili labavi sloj (*loose mucus*) i glikokaliks ili čvrsti sloj (*firm mucus*) (Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016)

## 1.2. Barijerna uloga sluzi

Tri su načina kojima sluz djeluje kao barijera; prvo, onemogućava prolaz česticama koje su većih dimenzija od veličine pora u sluzi; drugo, kemijskim interakcijama usporava prolazak čestica koje su manje u odnosu na pore; i treće, sluz se stalno stvara i ljušti te je time prodiranje tvari kroz sluz do epitela i vremenski ograničeno. (Murgia i ostali, 2017)

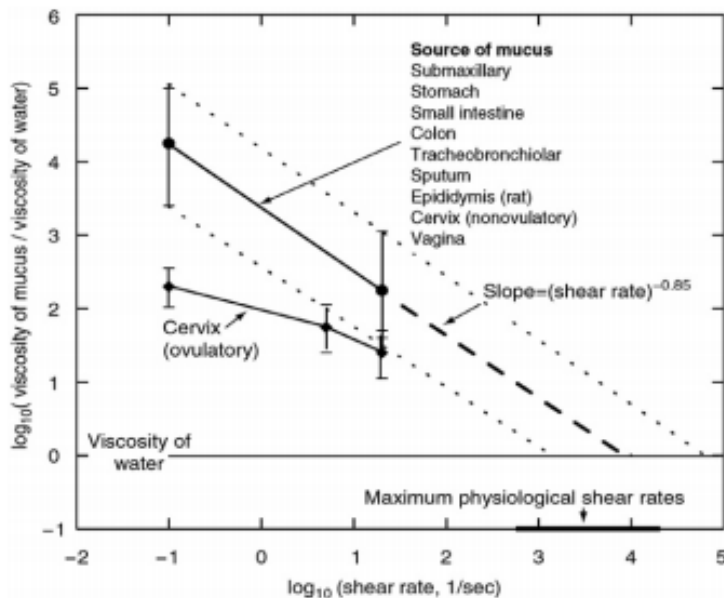
### 1.2.1. Fizička barijera

#### 1.2.1.1. Reologija sluzi

Iako je sluz po sastavu građena od 95% vode, ona se ponaša kao ne-Newtonovska tekućina (Slika 3). Sluz je viskoelastična, dakle pri niskim smičnim brzinama je viskoznost sluzi 100-10 000 puta veća od viskoznosti vode i u ovom slučaju prevladavaju elastična svojstva. Nasuprot tome, pri visokim smičnim brzinama, tj. visokom smičnom naprežanju, njena se



viskoznost smanjuje i približava se viskoznosti vode, tako da sluz teče. (Leal, Smyth i Ghosh, 2017)



Slika 3 Ovisnosti viskoznosti sluzi o gradijentu brzine smicanja. Rezultati su dobiveni raznim metodama provedenim na raznim vrstama sluzi (Cone, 2009)

Viskoelastičnost sluzi se može mijenjati te je precizno regulirana u zdravom organizmu kako bi sluz mogla ostvariti svoju fiziološku ulogu. U pojedinim patološkim stanjima je viskoelastičnost značajno promijenjena što dovodi do određenih posljedica. Viskoelastičnost neovulatorne cervikalne sluzi je takva da spermiji praktični ne mogu penetrirati kroz nju te je oplodnja nemoguća. Ali u vrijeme ovulacije dolazi do smanjenja viskoelastičnosti cervikalne sluzi pa spermiji tada lako penetriraju kroz nju i oplodnja je moguća. Normalna reologija sluzi u dišnom sustavu osigurava mukocilijarni klirens. Ako se viskoelastičnost sluzi smanji, ona će se lakše gibati te će pod utjecajem sile teže padati i nakupljati se u plućima. Obratno, ako se poveća kao što je slučaj kod cistične fibroze, sluz zaostaje u dišnim putovima, onemogućen je mukocilijarni klirens te dolazi do nakupljanja čestica i bakterija.

Normalna viskoelastičnost sluzi onemogućava komensalnim i patogenim bakterijama prodiranje do epitelnih stanica, te se bakterije zadržavaju na površini sluzi. Izuzeci su primjerice *Vibrio cholerae* i *Helicobacter pylori*, odnosno bakterije koje su razvile posebne prilagodbe kako bi mogle penetrirati kroz sluz. S druge strane naše imunosne stanice, leukociti i neutrofilni normalno mogu prolaziti kroz sluz, ali ukoliko se poveća udio mucina u sastavu sluzi, bilo zbog povećane proizvodnje ili smanjene hidratacije sluzi, neutrofilni više neće moći prodrijeti kroz sluz i zbog toga dolazi do infekcija, kao kod cistične fibroze.

Brojni čimbenici utječu na viskoelastičnost sluzi poput lipida, proteina, pH i koncentracije iona kalcija. Najznačajniji je utjecaj koncentracije mucina i to približno po relaciji viskoelastičnost $\sim$ [mucin]<sup>2-3</sup>. Koncentracija mucina ovisi o stupnju hidratacije sluzi koji se jednostavno i brzo može prilagoditi pa se time jednostavno i brzo prilagođavaju i reološka i barijerna svojstva sluzi.(Cone, 2009)

#### 1.2.1.2. Veličina pora

Zbog umreženosti mucina sluz djeluje poput sita te u pravilu onemogućuje difuziju velikih čestica, dok manje čestice relativno slobodno prolaze kroz sluz. Eksperimentalno dobivene vrijednosti veličine pora u strukturi sluzi su unutar širokog raspona od 20-1800 nm, a rezultati ovise o korištenoj metodi.

Danas se najčešće utvrđuje tzv. efektivna veličina pora i to na način da se korištenjem video mikroskopije promatra difuzija fluorescentno obilježenih nemukoadhezivnih čestica u nativnoj sluzi. Uočeno je da čestice veće od 500 nm ne mogu difundirati kroz sluz, dok kod manjih čestica sposobnost difuzija uvelike ovisi o interakcijama čestica sa sluzi.

Osim toga, dodatni je nedostatak provedenih pokusa činjenica da su ispitivanja vršena na statičkoj, izoliranoj sluzi, dok je *in vivo* sluz vrlo dinamična struktura, tako da i veličina pora fluktuiraju. K tome, sluz je heterogena i veličina pora nije nužno jednaka u svim dijelovima sluzi, tako da je bolje opisati sluz pomoću raspona veličina, umjesto prosječne veličine pora. (Murgia *i ostali*, 2017)

#### 1.2.2. Fizičko-kemijska ili interakcijska barijera

##### 1.2.2.1. Direktno vezanje na mucine

Zbog kompleksne građe mucini mogu stvarati široki spektar interakcija s drugim molekulama i česticama. Primjerice, negativno nabijene glikozilirane regije elektrostatskim (ionskim) silama privlače katione, a istovremeno odbijaju anione. Cisteinom bogate regije mogu tvoriti kovalentne (disulfidne) veze s tiolnim skupinama stranih molekula. Brojne funkcionalne skupine koje se mogu naći u sastavu mucina poput hidroksilnih, sulfatnih, karboksilnih, amidnih i dr. grupa omogućuju stvaranje vodikovih veza te dipol-dipol interakcija (van der Waalsove veze), dok hidrofobne regije ostvaruju hidrofobne interakcije.

Veličina i fleksibilnost omogućuju mucinima stvaranje velikog broja interakcija, a one su uglavnom niskoenergetske poput vodikove veze (1,5-2,6 kcal/mol) i van der Waalsovih sila (0,5-1 kcal/mol). Takve su veze niskog afiniteta te konstantno pucaju i opet nastaju, ali sve

dok se više veza stvara nego puca, strana molekula/ čestica bit će zadržana u sluzi. (Murgia *i ostali*, 2017)

Osim velikog broja niskoafinitetnih veza, elastičnost sluzi je važan uvjet da strana molekula/ čestica ostane zadržana. Elastičnost sluzi je djelomično posljedica velikog broja istih takvih niskoafinitetnih veza, ali između samih lanaca mucina. Razrjeđivanjem sluzi ili kidanjem disulfidnih veza uništava se umreženost mucina, gubi se elastičnost, a sluz postaje viskozna tekućina u kojoj mucini slobodno difundiraju. Tada je barijera uništena, a iste one molekule/ čestice koje bi inače bile zadržane slobodno prolaze kroz sluz. (Cone, 2009)

Male nenabijene molekule difundiraju slobodno kroz sluz, iako sporije nego kroz vodu, iz razloga što se zbog svoje veličine vežu monovalentno na sluz, a ne polivalentno, a ujedno se ta niskoafinitetna veza konstantno kida i ponovo stvara. Brzina difuzije takvih molekula kroz sluz obrnuto je proporcionalna hidrofobnosti (lipofilnosti) molekule; što je hidrofobnija, sporije putuje. Kationske se čestice bez obzira na veličinu imobiliziraju u sluzi. Kod anionskih čestica mobilnost ovisi o više čimbenika, odnosno sam naboj ne jamči mogućnost difuzije kroz sluz. Primjerice, negativno nabijene čestice veličine 100-200 nm koje imaju hidrofobnu jezgru su imobilizirane u sluzi. Razlog je stvaranje veza između hidrofobne jezgre i sluzi koje nadjačavaju odbojne sile između negativnog naboja čestice i glikoziliranih regija mucina. Ukoliko se takve čestice PEGiliraju, njihova površina će postati neutralna i, još važnije, hidrofilna te će moći difundirati kroz sluz.

Dodatni primjer su virusi, kod kojih se na površini kapside nalazi jednaka količina negativnog i pozitivnog naboja, a posloženi su tako da u potpunosti prekriju hidrofobnu jezgru. Zbog resultantnog neutralnog naboja i velike hidrofilnosti, virusi slobodno prolaze kroz sluz. (Cone, 2009; Murgia *i ostali*, 2017)

#### 1.2.2.2. Vežanje na ne-mucinske komponente sluzi

Osim mucina, i druge sastavnice sluzi, poput lipida, proteina te nukleinskih kiselina, dolaze u interakciju sa stranim molekulama i česticama. To je razlog zbog kojeg hidrofobnost istih toliko utječe na brzinu difuzije kroz sluz.

Ujedno, sluz djeluje kao svojevrsni spremnik raznih proteina koji su, primjerice, važni za homeostazu sluzi i imunitet. Otprilike 50% identificiranih proteina u nazalnoj sluzi je vezano za imunitet. Slabe interakcije između mucina i tih proteina produljuju njihovo vrijeme zadržavanja bez da im se smanji biološki učinak. Upravo ti proteini doprinose barijernoj ulozi

sluznice. Primjerice neki defenzini su baktericidi pa ubijaju bakterije, dok drugi, bez baktericidne uloge poput defenzina 6, stvaraju vlakna i nano-mrežu kojima imobiliziraju patogene bakterije, a surfaktantni proteini A i C se vežu na ugljikohidrate bakterija ili na površinu polimernih čestica i olakšavaju fagocitozu. Isto tako proteini sluzi mogu vezati i ljevkovite oblike primijenjene na sluznicu te utjecati na njihovu bioraspoloživost.

### 1.2.3. Dinamička barijera

Sluz se konstantno stvara i razgrađuje što predstavlja vrlo učinkovit način uklanjanja u sluzi zaostalih tvari, ali to ujedno znači da tvari primijenjene na sluznicu imaju ograničeno vrijeme za difuziju kroz sluz do epitela.

Sluz proizvode vrčaste stanice, koje su interkalirane među epitelnim stanicama, te submukozne žlijezde. S druge strane sluz se odbacuje, razgrađuje i reciklira i to pomoću mehaničkih procesa i enzima. Mehanički procesi su primjerice peristaltika u probavnom sustavu, treptanje (oči), mukocilijarni klirens i kašljanje u dišnom sustavu te abdominalni pokreti u slučaju vaginalnocervikalne sluzi. Od enzima su u razgradnju sluzi uključene razne proteaze, peptidaze, sulfataze, glikozidaze, esteraze i dr. Mogu biti endogenog (luče ih epitelne stanice) ili egzogenog podrijetla (luče ih primjerice komenzalne bakterije u probavnom traktu).

Debljina sluzi je određena ravnotežom između lučenja sluzi i njene razgradnje. Ona se može mijenjati, pa tako prisutnost toksina i iritansa značajno povećava izlučivanje sluzi, što posljedično dovodi do povećanja debljine sluzi. Na taj način organizam sprječava prodiranje toksina/iritansa do epitela te olakšava njegovo uklanjanje. Pojačano lučenje sluzi je bolja reakcija na toksin od samog mehaničkog uklanjanja sluzi jer mehanički procesi samo uklanjaju površinski gel sloj, dok glikokaliks do kojeg je eventualno toksin došao ostaje netaknut. Pojačanim lučenjem se zamjenjuju oba sloja sluzi, što osigurava uklanjanje toksina/iritansa. Kao što je vidljivo u tablici (Tablica 2), debljina sluzi ovisi o dijelu tijela. Najdeblja je u želucu (300  $\mu\text{m}$ ) i kolonu (280  $\mu\text{m}$ ) kako bi zaštitila epitel od kiseline, odnosno bakterija, a najtanja je u oku (0,02  $\mu\text{m}$ ). (Cone, 2009)

Fiziološka obnova sluzi označava zamjenu stare sluzi novom, a to se ostvaruje lučenjem nove sluzi te razgradnjom i uklanjanjem stare. U pravilu što je sloj sluzi tanji, to je klirens (brzina obnove) brža. Iz podataka u tablici (Tablica 2) možemo vidjeti da je obnova najbrža u oku, gdje se u vremenu od 5,5-7,7 min zamijeni kompletan sloj sluzi.

Tablica 2 Fiziološka svojstva sluzi na različitim sluznicama u ljudskom tijelu (Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016)

Sluznica	Temperatura (°C)	Ukupna debljina sluzi (µm)	Debljina čvrstog sloja sluzi (µm)	Debljina labavog sloja sluzi (µm)	pH vrijednost sluzi	Obnova/klirens sluzi
Bukalna	36,2-36,7	70-100	70-100	28	6,5-7,5	12-24 h
Nazalna	30,2-34,4	10-15	6	4-9	5,5-6,5	6 mm/min
Pulmonarna	32,5-35,5	5-55	5-10	5-10	7,0	10-20 min
Okularna -samo sluz -suzni film	34,0			Np	7,8	Np
		0,02-0,05	Np			
		3,6-7	Np			
Želučana	37,0	30-300	110,5±37	Np	6,40±0,24	24-48 h
Sluznica tankog crijeva	37,0	150-400	15,5±4,5	Np	5,5-7,5	
Sluznica kolona	37,0	30-700	5-13	Np	7,0	
Vaginalna	37,0	50	Np	Np	3,5-4,0	1,5 mL/dan

Np- nema podataka

### 1.3. Nanočestični terapijski sustavi za primjenu na sluznicu

Prednost primjene terapijskih sustava na sluznicu je mogućnost direktnog liječenja lokalnih oboljenja bez potrebe sistemskog uzimanja lijeka čime se fokusira djelovanje lijeka na oboljelo područje te se smanjuje rizik od sistemskih nuspojava lijeka. Nadalje, primjenom lijeka na sluznice može se ostvariti i njegov sistemski učinak, pri čemu se zaobilazi metabolička razgradnja lijeka tijekom prvog prolaska kroz jetru. Na taj način se može postići veća bioraspoloživost lijeka te posljedično smanjiti potrebna doza, što je i od ekonomskog značaja. Međutim, kao što je već opisano u prethodnom poglavlju, sluz predstavlja znatnu prepreku terapijskim sustavima pri dostavi ljekovite tvari do epitelnih stanica. (Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016)

Bioraspoloživost malih, nenabijenih, hidrofilnih molekula pri primjeni na sluznicu je obično dobra za razliku od bioraspoloživosti lipofilnih, pozitivno nabijenih, velikih te slabo topljivih molekula. Razvojem inovativnih terapijskih sustava nastoji se povećati bioraspoloživost upravo takvih tvari. Oni se temelje na raznim načelima, a dva najčešće korištena su mukoadhezija i mukopenetracija.

Mukoadhezivni terapijski sustavi produljuju vrijeme zadržavanja čestica na sluznici što za posljedicu ima povećanje lokalne koncentracije aktivne tvari, bolju difuziju i u konačnici povećanu bioraspoloživost lijeka (Boegh i Nielsen, 2015). U tu svrhu mogu se koristiti brojni polimeri, primjerice poliakrilati (PAA) koji adheziju ostvaruju ispreplitanjem s mucinima te posljedičnim stvaranjem vodikovih i ionskih veza. Mogu se koristiti i sintetski derivati celuloze (metilceluloza, etilceluloza), alginati i pektini. Često se koristi kitozan, biokompatibilan, biorazgradljiv i netoksičan kationski polimer koji ostvaruje privlačne elektrostatske veze s negativno nabijenim komponentama sluzi. Kitozan se često koristi za oblaganje nanočestičnih terapijskih sustava kao što su liposomi, jer se na taj način izbjegava korištenje polivalentnih aniona koji su potrebni za agregaciju kitozana u nanočestice. Svi gore nabrojani polimeri se mogu dodatno i modificirati uvođenjem tiolnih skupina (tiolirani polimeri) koje imaju sposobnost stvaranja disulfidnih veza s cisteinom bogatim domenama mucina, čime se povećavaju mukoadhezivna svojstva te vrijeme zadržavanja na mjestu primjene (Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016).

Nedostatak mukoadhezivnih sustava je ograničeno vrijeme zadržavanja na mjestu primjene zbog obnove sluzi, uslijed čega se oni uklanjaju. Dodatno, mukoadhezivne čestice samo prijanjaju na sluz tj. zadržavaju se samo u površinskim dijelovima sluzi pa nisu pogodne za one lijekove koji zahtijevaju unutarstaničnu dostavu. Iz tog su razloga istraživanja usmjerena na razvoj mukopenetrativnih čestica, koje pokazuju svojstva brzog prodiranja u sloj sluzi (Slika 4).

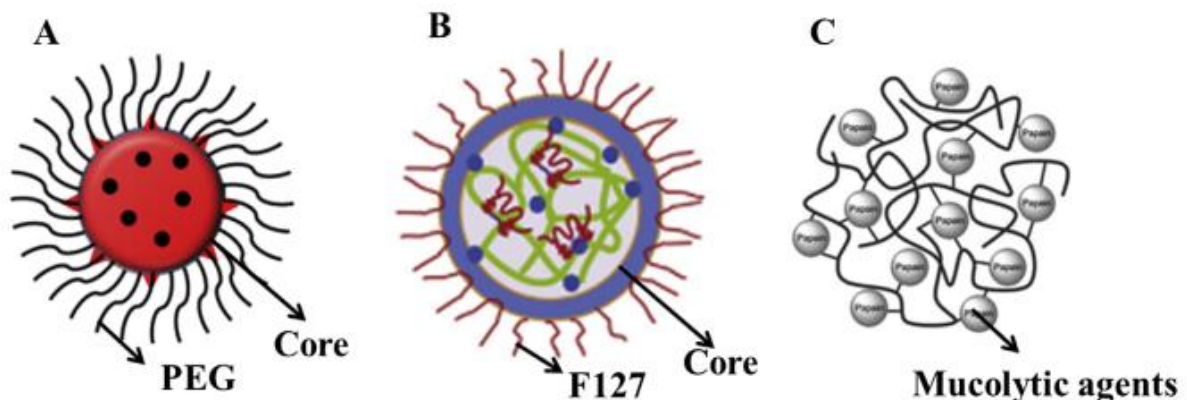
Mukopenetrativni terapijski sustavi se mogu podijeliti u dvije osnovne kategorije: aktivni i pasivni sustavi.

Aktivni ili mukolitički sustavi razgrađuju sluz prolazeći kroz nju. Barijerna funkcija sluzi ostaje očuvana zbog male veličine takvih sustava i zbog činjenice da se sluz razgrađuje samo duž puta njihovog kretanja. U razvoju mukolitičkih terapijskih sustava koriste se reducirajući agensi, poput N-acetilcisteina ili N-dodecil-4-merkaptobutanimidamida, koji kidaju disulfidne veze, a oslobađaju se kontinuirano iz mikro- ili nanonosaa prilikom prolaska kroz

sluz. Osim njih, mogu se koristiti i mukolitički enzimi, primjerice papain, bromelain ili tripsin, koji se imobiliziraju na površini mikro- i nanonosaa. Pokazalo se da je pokretljivost takvih modificiranih nosaa dvostruko veaa od pokretljivosti nemodificiranih.

Za razliku od aktivnih sustava koji razgrađuju sluz i mijenjaju njenu strukturu, pasivni sustavi ne ulaze u takve direktne interakcije sa sluzi. Jedan pristup u razvoju ovakvih sustava je oponašanje građe virusa koji lako prolaze kroz sluz. Njihova važna osobina je vanjska površina koja je gusto prekrivena nabijenim česticama, no budući da je broj pozitivno i negativno nabijenih čestica otprilike isti, resultantni naboj površine je približno jednak nuli. Gustim oblaganjem nanočestica kitozanom (pozitivno nabijenim polimerom) i hondroitin sulfatom (negativno nabijenim polimerom) nastoji se postići isti učinak.

Drugi pristup je oblaganje nanočestica neionskim hidrofilnim polimerima poput poloksamera ili polietilenglikola (PEG) pri čemu učinak oblaganja na povećanje difuzije kroz sluz ovisi o duljini upotrijebljenih polimernih lanaca (njihovoj molarnoj masi,  $M$ ) te o postotku površine čestice koji je obložen. Pokazalo se da kod čestica kod kojih je 40 % površine bilo obloženo lancima polietilenglikola molarne mase 2-kDa difuzija nije bila poboljšana dok je kod čestica s 65% obložene površine difuzija bila 700 puta bolja u odnosu na neobložene čestice. Isto tako, uočeno je da je bolje koristiti kraće nego duge lance (2-kDa ili 5-kDa, u odnosu na 10-kDa) jer prisutnost duljih lanaca dovodi do mukoadhezije, odnosno smanjenja difuzije (Boegh i Nielsen, 2015).

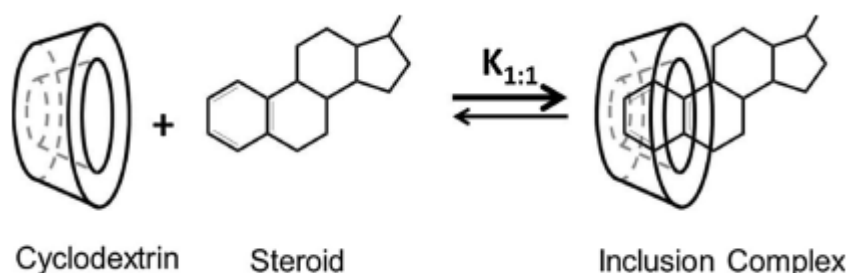


Slika 4 Shematski prikaz mukopenetrativnih čestica A) PEGilirane nanočestice B) nanočestice obložene polimerom Pluronic F-127 C) nanočestice s vezanim mukolitičkim agensima (Liu i ostali, 2014)

## 1.4. Ciklodekstrini

### 1.4.1. Građa ciklodekstrina

Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi koji nastaju enzimskom razgradnjom škroba. Tehnološki najznačajniji ciklodekstrini prirodnog podrijetla su  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD i  $\gamma$ -CD, građeni od 6, 7, odnosno 8 glukopiranoznih jedinica koje su povezane  $\alpha$ -(1,4) glikozidnim vezama. Zbog nemogućnosti slobodne rotacije oko  $\alpha$ -(1,4) glikozidne veze, molekule ciklodekstrina su oblika šupljeg krnjeg stošca. Vanjska površina im je zbog prisutnosti hidroksilnih skupina hidrofilna, a unutrašnja šupljina je relativno nepolarna te svojom polarnošću odgovara polarnosti 40% etanola. Zbog ovakve građe moguće je uklapanje lipofilne molekule ili barem dijela lipofilne molekule u unutrašnju šupljinu ciklodekstrina pri čemu nastaju u vodi topljivi inkluzijski kompleksi (Slika 5). Na ovaj način se povećava prividna topljivost u vodi takvih lipofilnih molekula, a obično i njihova bioraspoloživost.



Slika 5 Stvaranje inkluzijskog kompleksa u vodenoj otopini (Jansook, Ogawa i Loftsson, 2018)

Nedostatak prirodnih ciklodekstrina je relativno slaba topljivost u vodi (Tablica 3), posebno u slučaju  $\beta$ -CD (18,5 mg/mL), koji je veličinom centralne šupljine najpogodniji za interakciju s lijekovima. Iz tog je razloga sintetiziran niz kemijskih derivata ciklodekstrina. Oni se dobivaju tretiranjem prirodnih ciklodekstrina s različitim reagensima pri čemu dolazi do reakcije između hidroksilnih skupina ciklodekstrina i reagensa. Korištenjem propilenoksida nastaju hidroksipropil derivati (npr. HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD), korištenjem 2-kloroctene kiseline nastaju karboksimetil derivati (npr. CM- $\beta$ -CD), korištenjem metil jodida nastaju nasumično metilirani derivati (npr. RM- $\beta$ -CD) itd. Budući da je supstitucija nasumična, nastali derivati su stabilna amorfna smjesa izomera, za razliku od prirodnih ciklodekstrina koji su kristalinične krutine. Topljivost u vodi ovako dobivenih derivata je obično veća od 500 mg/mL što predstavlja značajno povećanje topljivosti u odnosu na topljivost prirodnog  $\beta$ -ciklodekstrina (18,5 mg/mL). (Jansook, Ogawa i Loftsson, 2018)



Tablica 3 Prikaz određenih fizikalno-kemijskih i farmakokinetičkih svojstava ciklodekstrina (Jansook, Ogawa i Loftsson, 2018)

Ciklodekstrin	M (g/mol)	LogP <sub>okt/voda</sub>	S <sub>voda</sub> (mg/mL)	F <sub>oral</sub>	t <sub>1/2</sub> (h)	f <sub>neprom. s urin</sub>
α-ciklodekstrin	972,8	-13	130	0,02	Np	Np
β-ciklodekstrin	1135	-14	18,5	0,006	Np	Np
2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin	1400	-11	>600	≤0,03	1,9	0,95
Sulfobutileter-β-ciklodekstrin	2163	<-10	>500	0,02	1,6	0,95
Nasumično metilirani β-ciklodekstrin	1312	-6	>600	≤0,1	Np	Np
γ-ciklodekstrin	1297	-17	249	<0,001	Np	Np
2-hidroksipropil-γ-ciklodekstrin	1576	-13	>500	<0,001	Np	Np
Na- sugamadeks	2178	-16	Jako topljiv u vodi	np	1,7	1,0

M- molarna  
LogP<sub>okt/voda</sub>- logaritam koeficijenta razdjeljenja između oktanola i vode  
S<sub>voda</sub> (mg/mL)- topljivost ciklodekstrina u vodi pri 25°C  
F<sub>oral</sub>- dio ukupne doze CD koji se apsorbira nakon peroralne primjene kod štakora  
t<sub>1/2</sub> (h)- poluvrijeme eliminacije CD-a nakon parenteralne primjene kod ljudi  
f<sub>neprom. s urin</sub>- dio CD-a koji se izlučuje nepromijenjen urinom nakon parenteralne primjene kod ljudi  
np-nema podataka

#### 1.4.2. Farmakokinetika i toksičnost

Ciklodekstrini su rezistentni na razgradnju β-amilazom (egzoglikozidazom), a podložni su razgradnji α-amilazom (endoglikozidazom) koja je prisutna ne samo u slini i žuči, nego i u drugim tjelesnim tekućinama poput suza. Zbog cikličke strukture i supstituenata ciklodekstrini se znatno sporije razgrađuju α-amilazom od linearnih dekstrina. Iznimka je γ-ciklodekstrin koji se brzo razgrađuje pod utjecajem α-amilaze i koji se po oralnoj primjeni u potpunosti razgradi humanim enzimima, dok ostale ciklodekstrine uglavnom razgrađuju bakterije kolona. Nakon parenteralne primjene ciklodekstrini se najvećim dijelom (>90%) izlučuju

nepromijenjeni glomerularnom filtracijom, a tek se manjim dijelom metaboliziraju u jetri i izlučuju putem žuči. Kod intravenske primjene uočen je hemolitički učinak nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina te nefrotoksičnost kod  $\beta$ -ciklodekstrina. Ovi ciklodeksrini pokazuju izraženi afinitet prema interakciji s kolesterolom, pa zbog toga dolazi do hemolize eritrocita, dok u slučaju  $\beta$ -ciklodekstrina dolazi do taloženja teško topljivog kompleksa s kolesterolom u tubulima bubrega i posljedične nefrotoksičnosti (Jansook, Ogawa i Loftsson, 2018).

#### 1.4.3. Regulatorni status ciklodekstrina

Regulatorni status pomoćnih tvari je od velikog značaja u razvoju novih formulacija. S obzirom na njihovu ulogu, ciklodeksrini se smatraju pomoćnim, a ne aktivnim tvarima. Možemo ih pronaći u bazi podataka pomoćnih tvari koje se nalaze u sastavu gotovih lijekova na tržištu, a tu bazu objavljuje američka agencija za hranu i lijekove (FDA) (Tablica 4).

Tablica 4 Izvadak iz baze neaktivnih farmaceutskih sastojaka (FDA) koji se koriste u ljekovitim pripravcima registriranim u SAD-u

Ciklodekstrin	Put unosa	Oblik	Maksimalna konc. CD-a
$\alpha$ -CD	Intrakavitalno	Prašak za injekciju	0,13%
$\beta$ -CD	Oralno	Tableta	133 mg
	Topikalno	Gel	1%
	HP- $\beta$ -CD	Intramuskularno	Injekcija
Intravenozno		Injekcija	20%
Intravenozna infuzija		Injekcija	33%
Oralno		Otopina	400 mg/mL
Oralno		Tableta	15 mg
SBE- $\beta$ -CD	Intramuskularno	Prašak za injekciju	44%
	Intravenozno	Injekcija	25%
	Intravenozno	Prašak za injekciju	96%
	Intravenozna infuzija	Prašak za injekciju	16%
$\gamma$ -CD	Intravenozno	Injekcija	5%
HP- $\gamma$ -CD	Topikalno	Otopina	1,5%

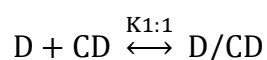
Prašak za injekciju- prašak se koristi za pripremu otopine koja se injektira

Monografije pojedinih ciklodekstrina se mogu pronaći u raznim farmakopejama, primjerice u američkoj USP/NF postoje monografije za  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, HP- $\beta$ -CD i SBE- $\beta$ -CD, u

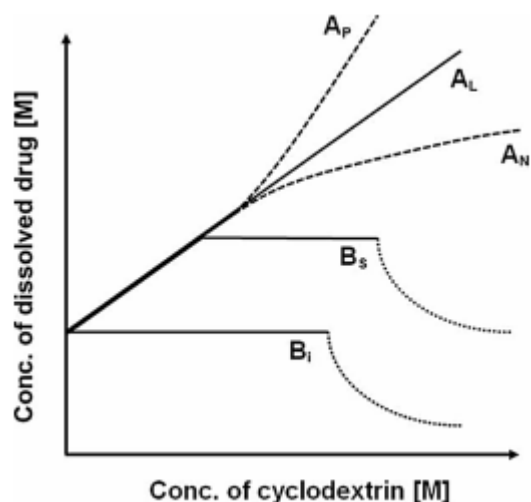
europskoj farmakopeji za  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD i HP- $\beta$ -CD te u japanskoj za  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD. (Jansook, Ogawa i Loftsson, 2018)

#### 1.4.4. Inkluzijski kompleksi

U vodenim otopinama ciklodekstrina lipofilne molekule ili dijelovi takvih molekula ulaze u njihovu unutrašnju nepolarnu šupljinu pri čemu nastaju u vodi topljivi inkluzijski kompleksi, a lipofilne su molekule na taj način solubilizirane (Slika 5). Najčešće kompleks nastaje interakcijom jedne molekule lijeka (D) i jedne molekule ciklodekstrina (CD) te dolazi do uspostave dinamičke ravnoteže između stvaranja i disocijacije kompleksa. To se može prikazati sljedećom jednadžbom:



Iz grafa ovisnosti topljivosti tvari o ukupnoj koncentraciji ciklodekstrina vidljivo je da postoje dva osnovna tipa kompleksa (Slika 6). Kod prve vrste ili tipa A topljivost tvari se povećava povećanjem koncentracije ciklodekstrina. Ovaj tip obično tvore topljivi derivati prirodnih ciklodekstrina. Kod druge vrste ili tipa B nastali kompleks ima ograničenu topljivost (pojava platoa). Ovaj tip kompleksa obično tvore prirodni ciklodekstrini (npr.  $\beta$ -CD).



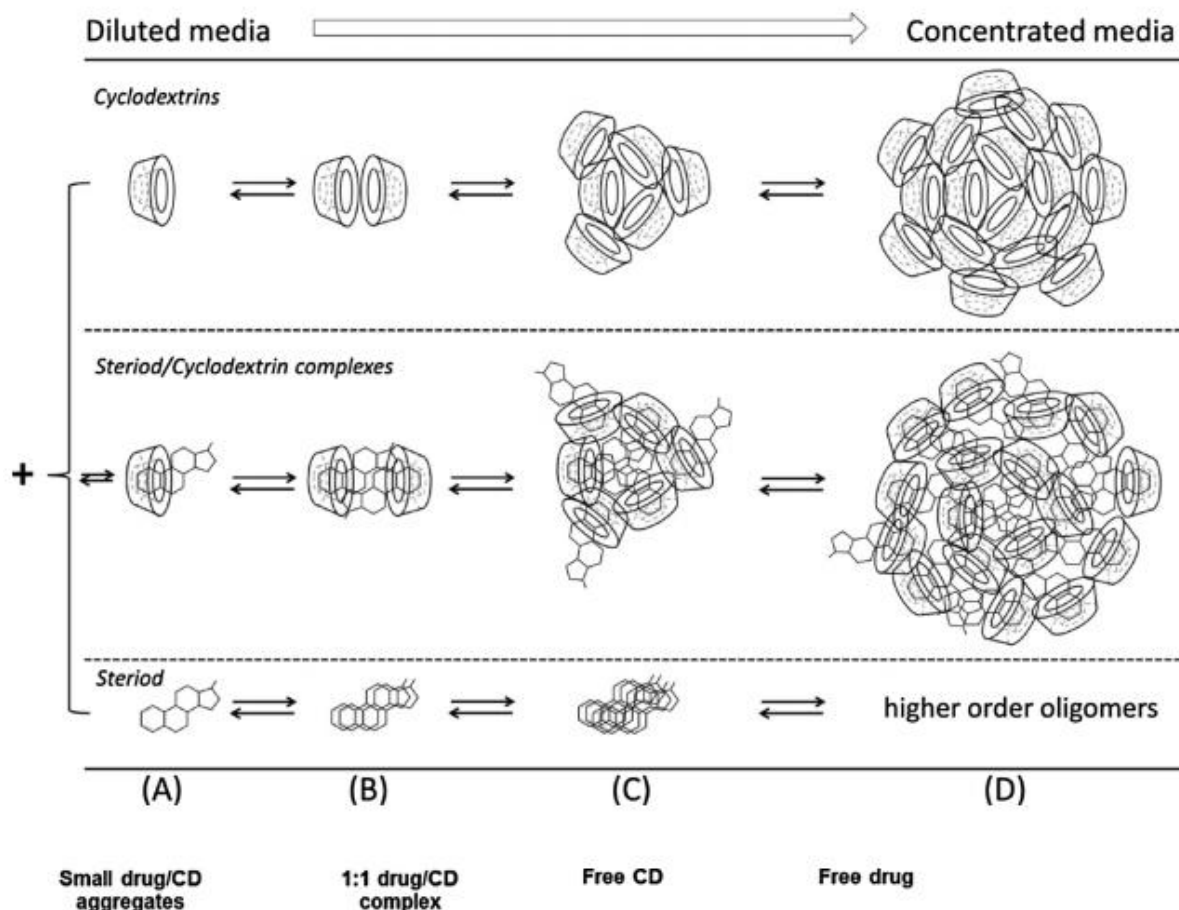
Slika 6 Graf ovisnosti topljivosti lijeka o koncentraciji ciklodekstrina i klasifikacija inkluzijskih kompleksa prema Higuchiju i Connorsu (Jansook, Ogawa i Loftsson, 2018)

Kompleksi se iz vodene otopine mogu izolirati na nekoliko načina. Kompleksi tipa B zbog slabe topljivosti spontano precipitiraju, no ovaj proces je spor (traje nekoliko dana) i ne može se koristiti u industrijske svrhe. Kompleksi tipa A se izoliraju iz vodenih otopina različitim postupcima sušenja poput isparavanja u vakuumu, liofilizacije ili sušenja raspršivanjem.

Kompleksi se mogu pripremiti i bez korištenja vode postupcima mljevenja ili miješanjem uz dodatak minimalne količine vode, nakon čega se nastali pastozni produkt suši i usitnjava.

Pripravljene proizvode se zatim analiziraju kako bi se dokazalo da uistinu sadrže inkluzijske komplekse. U slučaju kristaliničnih produkata dobivenih metodom precipitacije pomoću difrakcije rendgenskih zraka na monokristalu moguće je odrediti preciznu geometriju nastalog kompleksa. U slučaju amorfni produkata dobivenih drugim metodama, koriste se pretražna diferencijalna kalorimetrija (DSC), infracrvena spektrofotometrija (IR) ili rentgenska difrakcija na praškastom uzorku. Kod pretražne diferencijalne kalorimetrije pomak temperature taljenja ili izostanak taljenja ukazuju na stvaranje amornog kompleksa. Kod infracrvene spektrofotometrije te rentgenske difrakcije na prašku izostanak ili smanjenje vrpci/ pikova u odnosu na spektrogram/ difraktogram fizičke smjese ciklodekstrina i lijeka ukazuje na snažne interakcije među komponentama smjese, odnosno na moguću prisutnost kompleksa.

U vodenim otopinama ciklodekstrini ne ulaze samo u interakcije s ljekovitim tvarima, nego dolazi do interakcija između samih ciklodekstrina, ali i samih inkluzijskih kompleksa pri čemu nastaju njihovi agregati (Slika 7). Sklonost stvaranju agregata je veća kod prirodnih ciklodekstrina koji su manje topljivosti, nego kod njihovih derivata koji imaju značajno veću topljivost u vodi. Inkluzijski kompleksi imaju najveću sklonost stvaranju agregata i njihova je veličina između 380 nm i 750 nm. Veličina agregata prirodnih ciklodekstrina je između 200 nm i 300 nm, a njihov udio u ukupnoj količini ciklodekstrina je relativno mal ( $\approx 1\%$ ), no raste porastom koncentracije ciklodekstrina. Nastali agregati služe kao spremnik ljekovite tvari i tako povećavaju topljivost lipofilnih tvari u vodi. Ioni metala, u vodi topljivi polimeri te razne karboksilne kiseline ulaze u interakciju s agregatima povećavajući solubilizacijski učinak ciklodekstrina, dok tvari poput ureje, natrijevog klorida te porast temperature i promjene pH vrijednosti značajno smanjuju udruživanje molekula ciklodekstrina.

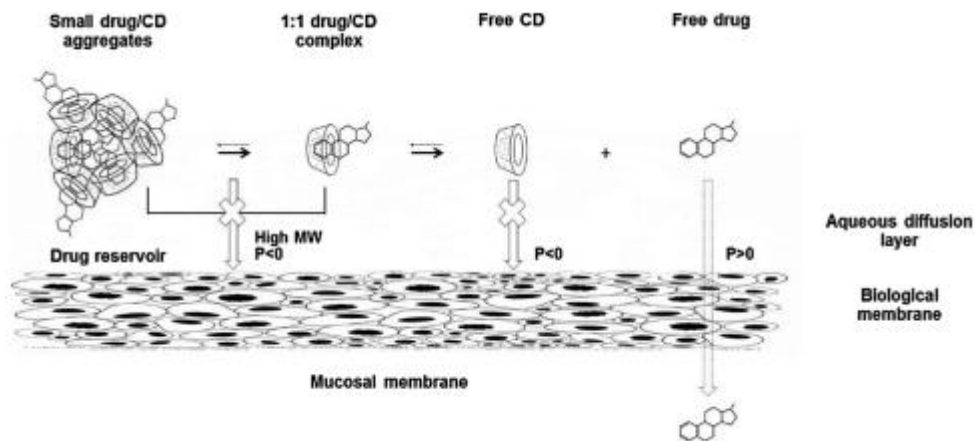


Slika 7 Shematski prikaz stvaranja agregata steroidnih molekula, ciklodekstrina i inkluzijskih kompleksa steroid/CD povećanjem njihove koncentracije u otopini (Jansook, Ogawa i Loftsson, 2018)

Nakon oralne i parenteralne primjene dolazi do disocijacije kompleksa tj. pomaka ravnoteže u lijevo, uslijed smanjenja koncentracije slobodnog lijeka zbog razrjeđenja medija i vezanja lijeka na druge tvari (npr. proteine).

Zbog velike molekulske mase i visokog stupnja hidrofilitnosti, inkluzijski kompleksi se u pravilu ne apsorbiraju u nativnom obliku. Na Slika 8 je prikazan mehanizam disocijacije lijeka i njegove apsorpcije na biološkim membranama. Disocijaciji kompleksa pridonose razrjeđenje otopine kompleksa prilikom primjene, kao i prisutnost endogenih kompetirajućih molekula, kao što su primjerice žučne soli. Ciklodekstrini povećavaju topljivost teško topljivih lijekova i dopremaju ih do lipofilnih membrana gdje dolazi do disocijacije kompleksa. Na ovaj se način povećava koncentracija lijeka, odnosno njegov koncentracijski gradijent čime se značajno ubrzava pasivna difuzija lijeka preko membrane što često rezultira značajnim povećanjem bioraspodivnosti lijeka. Ovaj učinak je najizraženiji kod lijekova koji se klasificiraju u drugu skupinu prema BSC klasifikaciji (lipofilni lijekovi niske topljivosti i

vodi koji posjeduju izraženu permeabilnost kroz biološke membrane). Međutim, ukoliko ciklodekstrini s lijekovima stvaraju izrazito stabilne komplekse, tada je moguće i smanjenje biorasploživosti lijeka. U takvom sustavu, ravnoteža je pomaknuta u lijevo te je dostupna izrazito niska koncentracija slobodnih molekula lijeka koje su raspoložive za difuziju. Isti učinak je opažen kod lijekova koji su klasificirani kao lijekovi 1. skupine prema BSC (topljive tvari velike permeabilnosti). (Jansook, Ogawa i Loftsson, 2018)



Slika 8 Shematski prikaz mehanizma apsorpcije lijeka iz inkluzijskog kompleksa (Jansook, Ogawa i Loftsson, 2018)

Ciklodekstrini nalaze primjenu u razvoju novih terapijskih sustava jer mogu povećati ili smanjiti topljivost djelatne tvari sukladno potrebama, povećati biorasploživost te utjecati na stabilnost lijekova i smanjiti iritaciju i njihove druge neželjene učinke. Istraživanja su primjerice pokazala da gel s tretinoinom u obliku inkluzijskog kompleksa sa  $\beta$ -ciklodekstrinom ima 85% manji iritacijski učinak na kožu od gela sa slobodnim tretinoinom, a peroralno primijenjen indometacin u obliku inkluzijskog kompleksa je uzrokovao značajno manje gastrointestinalnih oštećenja od gela sa slobodnim indometacinom. (Duchêne i Bochot, 2016)

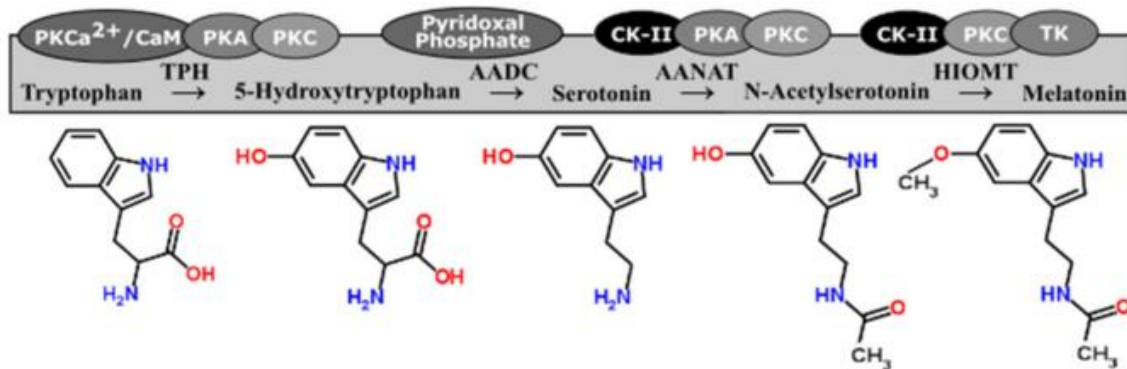
Stvaranjem kompleksa ciklodekstrini utječu na stabilnost raznih ljekovitih tvari. Pri pH vrijednosti nižoj od  $pK_a$  vrijednosti  $\beta$ -laktama, ciklodekstrini povećavaju njihovu stabilnost u vodenim otopinama jer su tada  $\beta$ -laktami u neioniziranom stanju, lako tvore inkluzijske komplekse te su zaštićeni od hidrolize. Pri pH većem od  $pK_a$   $\beta$ -laktami su ionizirani, a time i manje lipofilni te tvore manje stabilne inkluzijske komplekse s ciklodekstrinima zbog čega su podložniji hidrolizi, odnosno nestabilniji su. Ciklodekstrini mogu mijenjati profil razgradnje ljekovite tvari. Ciklopentolat koji se koristi kao midrijatik se razgrađuje na dva načina; glavni

put razgradnje je hidroliza esterske veze uz nastajanje tetraedrnog međuprodukta, a sporedni put je razgradnja preko cikličnog međuprodukta. Tvorbom kompleksa, ciklodekstrini inhibiraju obje reakcije, ali zbog steričkog onemogućavanja tvorbe tetraedrnog međuprodukta jače inhibiraju prethodno dominantan put razgradnje mijenjajući na taj način profil razgradnje. Kompleksacijom je moguće smanjiti i oksidativnu razgradnju (ziprasidon) te spriječiti fotodegradaciju lijekova kao što su tretinoin i doksiciklin. S druge strane, u čvrstim dozirnim oblicima ciklodekstrini mogu smanjiti stabilnost ljekovitih tvari jer povećavaju njihovu topljivost u vodi i zadržavaju tvari u amorfnom obliku što olakšava njihovu razgradnju. (Popielec i Loftsson, 2017)

Ciklodekstrini se koriste i za poboljšavanje svojstava nanočestica kao nosača lijekova. Jako dobar primjer su nanočestice od bioadhezivnog polianhidrida Gantreza<sup>®</sup> AN, kopolimera metil-vinil-etera i anhidrida maleinske kiseline, u koje se teško uklapaju lipofilni lijekovi poput paklitaksela, citostatika male topljivosti i oralne bioraspoloživosti. Korištenjem HP- $\beta$ -CD povećao se sadržaj paklitaksela sa  $\approx 0,30 \mu\text{g}/\text{mg}$  nanočestica na čak  $\approx 170 \mu\text{g}/\text{mg}$  nanočestica, a istovremeno se značajno smanjio efluks paklitaksela posredovan P-glikoproteinom. (Duchêne i Bochot, 2016; Jansook, Ogawa i Loftsson, 2018)

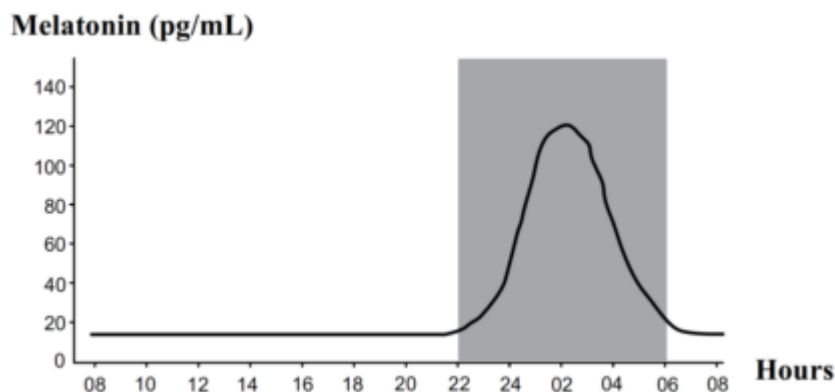
#### 1.5. Terapijski potencijal primjene melatonina u liječenju bolesti usne šupljine

Melatonin ili N-acetil-5-metoksitriptamin je biološki amin prisutan u životinjama, biljkama i mikroorganizmima. Najvećim ga dijelom sintetizira i luči epifiza, a u manjim se količinama proizvodi i u drugim dijelovima ljudskog organizma, primjerice u mrežnici oka, crijevima i koštanoj srži. Proces sinteze u epifizi (Slika 9) započinje pretvorbom triptofana u serotonin uzastopnim reakcijama hidrosilacije i dekarboksilacije koje kataliziraju redom triptofan-5-hidrosilaza i 5-hidroksitriptofan dekarboskilaza. Nastali serotonin se djelovanjem N-acetiltransferaze pretvara u N-acetilserotonin koji se pomoću hidroksiindol-O-metiltransferaze metilira do melatonina.



Slika 9 *Sinteza melatonina* (Vivid i Bentley, 2018)

Koncentracija melatonina u krvi nije stalna (Slika 10) već varira tijekom dana u skladu sa cirkadijanim ritmom. Sinteza melatonina je potaknuta tamom, a inhibirana svjetlošću pa je zato koncentracija melatonina tijekom dana minimalna (10-20 pg/mL), a tijekom noći maksimalna (do 120 pg/mL).



Slika 10 *Ovisnosti koncentracije melatonina u plazmi o vremenu. Osjencani dio predstavlja noć (razdoblje tame)* (Tordjman i ostali, 2017)

Otprilike 70% melatonina u krvi je vezano za albumine, a preostalih 30% je nevezano i može prelaziti iz krvi u okolna tkiva. Među ostalim, nevezani melatonin dospjeva i u slinu gdje njegova koncentracija varira između 24% i 34 % koncentracije u krvi. Upravo je zbog toga, mjerenje koncentracije melatonina u slini neinvazivna i pouzdana metoda kojom se može indirektno pratiti promjena koncentracije melatonina u krvi. Nadalje, postoje pokazatelji da se melatonin sintetizira i u žlijezdama slinovnicama. Imunohistokemijskim metodama je dokazana ekspresija alkilarilamin-N-acetiltransferaze i hidroksiindol-O-metiltransferaze, enzima koji kataliziraju konverziju serotonina u melatonin. Na razinu melatonina u slini može



utjecati i hrana, naročito namirnice kao što su višnje, riža, rajčica, orasi, krastavci te napitci poput kave, čaja, piva i vina (Reiter *i ostali*, 2015).

Kod osoba s bolestima parodonta izmjerene su značajno niže koncentracije melatonina u slini u odnosu na zdravu populaciju, a uočeno je da se koncentracija normalizira nakon izlječenja bolesti. Smatra se da kod osoba s bolestima parodonta snižena razina melatonina u slini može pripisati njegovom djelovanju kao hvatača slobodnih radikala koji se generiraju uslijed upalne reakcije tkiva. Nadalje, osobe kod kojih je zabilježeno brže lučenje sluzi imale su veće količine melatonina u slini od onih kod kojih je lučenje sline smanjeno.

U organizmu melatonin svoje djelovanje ostvaruje putem membranskih receptora MT1 i MT2, koji se ubrajaju u skupinu receptora vezanih s G-proteinima koji su građeni od 7 karakterističnih transmembranskih domena. Aktivacijom navedenih receptora dolazi do modulacije niza intracelularnih signalnih putova. U usnoj šupljini dokazana je prisutnost MT1 receptora te se smatra se da melatonin u usnoj šupljini djelovanje ostvaruje putem ovih receptora, ali i neovisno o njima. Nadalje, lamina propria gingive i parodonta često sadrži mnogo imunokompetentnih stanica koje također mogu lučiti melatonin koji tada pokazuje autokrino, parakrino i intrakrino djelovanje. Melatonin zajedno sa svojim metabolitima N-acetil-N-formil-5-metoksikinuraminom te N-acetil-5-metiluraminom pokazuje značajnu protuupalnu aktivnost te se čini da melatonin u usnoj šupljini ima važnu ulogu u sprječavanju upalnih reakcija zubnog mesa. Nadalje, melatonin zajedno s metabolitima koji nastaju u reakciji sa slobodnim radikalima učinkovito sprječava oksidativno oštećenje tkiva u reakciji poznatoj kao melatoninska antioksidativna kaskada. Iz navedenog je vidljivo da melatonin ima važnu ulogu u održavanju zdravlja usne šupljine te da bi njegova primjena u obliku sublingvalnih tableta, sprejeva ili gelova mogla značajno pridonijeti liječenju bolesti usne šupljine.

Melatonin ima brojne funkcije u organizmu (Tablica 5). Antioksidativni učinak ostvaruje hvatajući slobodne radikale, stimulacijom antioksidativnih enzima i povećanjem sinteze glutationa. Djeluje protuupalno i imunomodulacijski reguliranjem izlučivanja interleukina 2 i interferona  $\alpha$ , a time i posljedične aktivacije CD4<sup>+</sup> limfocita. Istraživanja su također pokazala da potiče sintezu kolagena tipa 1, inhibira meleloproteinaze te da ima pozitivan učinak na obnovu kosti jer ubrzava diferencijaciju i povećava aktivnost osteoblasta, a smanjuje aktivnost osteoklasta. Ujedno melatonin sudjeluje u regulaciji tjelesne temperature i cirkadijanog ritma.

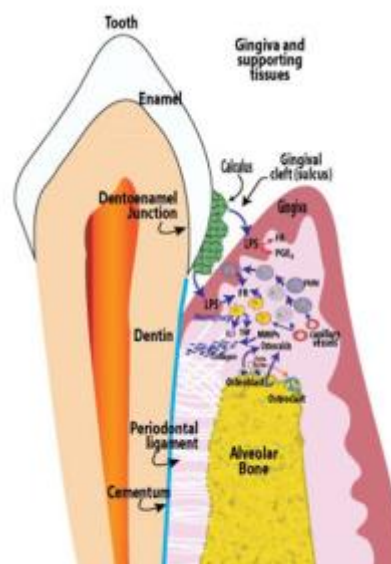
Tablica 5 *Funkcije melatonina u ljudskom organizmu* (Chava i Sirisha, 2012)

FUNKCIJA	MEHANIZAM DJELOVANJA
Antioksidativno djelovanje	Direktno djelovanje: neutralizira brojne kisikove reaktivne specije (OH, ROO, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> ). Ulazi u interakciju s lipidnim dvoslojem i stabilizira mitohondrijske membrane poboljšavajući lanac prijenosa elektrona. Indirektno djelovanje: i) Regulira stvaranje dušikovog oksida ii) Povećava ekspresiju i enzimsku aktivnost superoksid dismutaze
Protuupalno djelovanje	Inhibira pro-upalni enzim COX-2
Imunomodulatorno djelovanje	Potiče endogeno stvaranje IL-2 u skladu sa serumskom koncentracijom melatonina.
Antitumorsko djelovanje	Stimulira proizvodnju IL-2 i tako povećava aktivnost NK stanica. Povećava protutumorsko djelovanje IL-2. Neutralizira reaktivne kisikove specije (ROS).
Antivirusno djelovanje	Potiče proizvodnju IL-1 $\beta$ koji je koristan u liječenju virusnih infekcija.
Antimikotsko djelovanje	Potiče fagocitozu i smanjuje oksidativni stres tijekom kandidijaze.
Remodeliranje kosti	Potiče diferencijaciju osteoblasta i stvaranje kosti. Stimulira sintezu kolagena tipa I u humanim osteoblastima <i>in vitro</i> . Inhibira resorpciju kosti interferirajući s aktivnosti osteoklasta pomoću indirektnog i direktnog antioksidativnog djelovanja. Ubrzava diferencijaciju osteoblasta povećavajući ekspresiju koštanog sijaloproteina i drugih proteinskih markera. Smanjuje stvaranje i aktivaciju osteoklasta.

Naročito je zanimljiva mogućnost primjene melatonina u liječenju virusnih bolesti usne šupljine. Virus herpesa simplex tip 1 (HSV-1) uzrokuje infekcije usnica, usta i lica te se taj oblik bolesti naziva oralni herpes. HSV-1 se prenosi slinom te se primarna HSV-1-infekcija obično događa tijekom djetinjstva. Virus ostaje uspavan u tijelu nakon aktivne infekcije i simptomi se mogu bilo kada ponoviti, a obično se javljaju na istom mjestu. Ne zna se što točno otpočinje ponovnu infekciju, no čimbenici koji se povezuju s tim procesom su izlaganje suncu i vjetru, vrućica, ozljede, menstruacija, oslabljen imunološki sustav, emocionalni stres i određene vrste hrane i lijekova (<https://www.plivazdravlje.hr/bolest->

clanak/bolest/405/Herpes.html, datum posjeta 6.4.2018). Melatonin stimulira odgovor urođene i stečene imunosti te moduliranjem aktivnosti enzima koji reguliraju lučenje medijatora upale reducira lučenje citokina i leukotrijena. Ti mehanizmi, zajedno sa antioksidativnim djelovanjem melatonina i njegovih metabolita pridonose otpornosti organizma na virusne infekcije, iako nisu u stanju uništiti virus. Do sada dostupni podaci upućuju da bi melatonin mogao biti indiciran u liječenju oralnog herpesa, naročito u kombinaciji s aciklovirom.

Gingivitis i periodontitis su upalne bolesti usne šupljine u kojima dolazi do uništenja mekog tkiva oko zuba, dok uznapredovali parodontitis rezultira uništenjem potpornih struktura zuba, kao što su periodontalni ligament i alveolarna kost, što u konačnici rezultira ispadanjem zuba. Bolest započinje stvaranjem biofilma bakterija u prostoru između desni i zuba. Kolonizaciju započinje bakterija *Streptococcus mutans* koji stvara biofilm na koji se kasnije naseljava veliki broj bakterija. Plak s vremenom raste i kalcificira te se pretvara se u kamenac. Bakterije prisutne u plaku i kamencu luče endotoksine (lipopolisaharide, LPS) koji potiču proizvodnju proupalnih citokina, kao što su interleukin-1 i faktor tumorske nekroze – alfa (TNF- $\alpha$ ) te oslobađanje slobodnih radikala. Nastali oksidativni stres stimulira aktivnost melaloproteinaza koje razgrađuju potporna tkiva zuba. Osim toga, djelovanjem slobodnih radikala dolazi i do aktivacije osteoklasta koji razgrađuju alveolarnu kost (Slika 11). U konačnici je moguće ispadanje zuba.



Slika 11 Mehanizam nastanka gingivitisa i periodontitisa (Reiter i ostali, 2015)

Melatonin hvata slobodne radikale i sprječava lipidnu peroksidaciju i tako zaustavlja dodatno uništenje tkiva. Osim toga, inhibira metaloproteinaze te potiče fibroblaste na lučenje kolagena tipa I čime se obnavlja međustanični matriks. Ujedno djeluje i na obnovu kosti poticanjem diferencijacije proosteoblasta u osteoblaste, povećanjem aktivnosti osteoblasta te povećanjem količine osteoprotegrina, a smanjenjem količine RANKL-a. Dodatno, melatonin smanjuje proizvodnju IL-6 i NO u makrofagima kao odgovora na LPS bakterija i na taj način smanjuje upalu. Lokalna, ali i sistemska primjena melatonina bi se mogla koristiti ne samo za liječenje nego i prevenciju ovih upalnih bolesti, ali dodatna istraživanja su potrebna.

Kod osoba oboljelih od šećerne bolesti (DM) dodatno dolazi do neenzimske glikozilacije lipida, proteina i DNA zbog hiperglikemije što dovodi do smanjenja fagocitne i kemotaktične sposobnosti neutrofila, povećanja koncentracije proupalnih citokina i posljedične ubrzane razgradnje izvanstaničnog matriksa. Ujedno je smanjena aktivnost osteoblasta zbog poticanja njihove apoptoze signalnim putem MAP-kinaze. Iz tog su razloga oboljeli od šećerne bolesti pod povećanim rizikom razvoja periodontalnih upalnih bolesti, a melatonin bi se i kod njih mogao koristiti u liječenju zbog gore objašnjelog djelovanja. Uz to, uočena je povezanost ciklusa lučenja melatonina i inzulina u ljudskom organizmu, no dodatna istraživanja su potrebna u ovom području.

Protuupalno i regenerativno djelovanje melatonina se može iskoristiti nakon oralno-kirurških zahvata. Lokalnom primjenom melatonina na ranu ubrzava se proces cijeljenja i smanjuje se pojavnost komplikacija. Ako se nakon vađenja zuba na isto mjesto ugrađuje implantat, obrada nastale rane melatoninom, a još bolje, kombinacijom melatonina i hormona rasta, dovodi do bržeg i boljeg urastanja implantata u kost u odnosu na kontrolu.

Nekad često korištene amalgamske plombe danas su zamijenjene novim, estetski prihvatljivijim, materijalima koji sadrže polimere metakrilata. Veliki nedostatak takvih materijala je otpuštanje metakrilatnih monomera koji su zaostali u materijalu zbog nepotpunog procesa polimerizacije, a dodatno nastaju zbog mehaničkog trošenja (potaknuto žvakanjem) i enzimatske razgradnje istih pomoću enzima iz sline. Osim što djeluju lokalno, u usnoj šupljini, preko pukotina i tubula u dentinu mogu prodrijeti u pulpu zuba i tako dospjeti u sistemska cirkulaciju. Monomeri metakrilata djeluju citotoksično i genotoksično jer uzrokuju stvaranje reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva koje oštećuju molekule DNA. Melatonin bi zbog svog antioksidativnog učinka mogao smanjiti pojavu lezija u usnoj šupljini pri korištenju materijala na bazi metakrilata. Istraživanja pokazuju da je oštećenje DNA u

fibroblastima nakon izlaganja derivatima metakrilata bio značajno manje uz primjenu melatonina u odnosu na kontrolu (bez melatonina). (Cengiz, Cengiz i Wang, 2012; Reiter *i ostali*, 2015)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Sluznice su velike površine na sučelju organizma i okoliša i kao takve predstavljaju pogodno ciljno mjesto primjene lijeka. Prednost primjene terapijskih sustava na sluznicu je mogućnost direktnog liječenja lokalnih oboljenja bez potrebe sistemskog uzimanja lijeka čime se fokusira djelovanje lijeka na oboljelo područje te se smanjuje rizik od sistemskih nuspojava lijeka. Nadalje, primjenom lijeka na sluznice može se ostvariti i njegov sistemski učinak, pri čemu se zaobilazi metabolička razgradnja lijeka tijekom prvog prolaska kroz jetru. Na taj se način može postići veća bioraspoloživost lijeka te posljedično smanjiti potrebna doza, što je i od ekonomskog značaja. Međutim, sluz, koja prekriva sluznice, predstavlja znatnu prepreku terapijskim sustavima pri dostavi ljekovite tvari do epitelih stanica.

To je dovelo do razvoja brojnih terapijskih sustava, a jedan od njih su nanočestice koje zbog svoje male veličine mogu učinkovito prodrijeti u sluz, a ujedno štite uklopljenu ljekovitu tvar od razgradnje na mjestu primjene. S ciljem povećanja bioraspoloživosti razvijeni su mukoadhezivni sustavi koji produljuju vrijeme zadržavanja na sluznici te mukopenetrativni sustavi koji imaju sposobnost prolaska kroz sluz do epitelih stanica (Liu *i ostali*, 2014; Netsomboon i Bernkop-Schnürch, 2016).

Korištenjem polianhidridnih polimera dobivene su čestice izuzetno izraženih mukoadhezivnih svojstava, a dodatna prednost je što se lako mogu modificirati inkubacijom s molekulama koje u strukturi imaju hidroksilne ili amino skupine čime se mijenjaju svojstva dobivenih čestica i utječe na dostavu lijeka.

Jedan od izazova u razvoju nanočestica je nisko uklapanje lijeka. Pokazano je da ciklodekstrini, osim što stvaranjem inkluzijskih povećavaju topljivost, stabilnost i bioraspoloživost tih lijekova, mogu značajno pridonijeti uspješnijem uklapanju ljekovite tvari u nanočestice (Maite Agüeros *i ostali*, 2009).

Stoga je cilj ovog rada bio prirediti ne-PEGilirane (mukoadhezivne) i PEGilirane (mukopenetrativne) nanočestice s melatoninom metodom nanoprecipitacije. Korišten je sintetski kopolimer metil-vinil-etera i anhidrida maleinske kiseline trgovačkog imena Gantrez<sup>TM</sup> AN-169, koji se upravo zbog prisutnosti polianhidridnih veza lako funkcionalizira, primjerice polietilenglikolom kako bi se dobile mukopenetrativne čestice. Melatonin je endogeni indolamin koji bi zbog svog dokazanog imunomodulirajućeg, antioksidativnog i protuupalnog djelovanja mogao ostvariti korisne terapijske učinke u liječenju bolesti usne

šupljine, poput gingivitisa i parodontitisa (Permuy *i ostali*, 2017), a budući da je mala lipofilna molekula trebao bi stvarati komplekse s HP- $\beta$ -ciklodekstrinom. Svrha ovoga rada je bilo variranjem sastava organske i vodene faze ispitati utjecaj navedenih parametara na osobine pripremljenih čestica te vrednovati utjecaj HP- $\beta$ -ciklodekstrina na uklapanje melatonina. Pripremljene su nanočestice podvrgnute procesu sušenja smrzavanjem kako bi se povećala njihova stabilnost.

### 3. MATERIJALI I METODE

Pri izvođenju pokusa korištene su sljedeće kemikalije, instrumenti i metode.

#### 3.1. Kemikalije

- Aceton (Honeywell, Francuska)
- Etanol (Carlo Erba Reagents SAS, Francuska)
- Gantrez<sup>TM</sup> AN-169 polimer molekulske mase 2000 kDa (Ashland, SAD)
- Hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin (Wacker-Chemie GmbH, Njemačka)
- Melatonin (Sigma-Aldrich, SAD)
- Natrij klorid (Kemig d.o.o., Hrvatska)
- Polietilenglikol Mr 6 000 (Sigma-Aldrich, SAD)
- D (+)-saharoza (VWR BDH Chemicals, Belgija)
- Visokopročišćena voda

#### 3.2. Instrumenti

- Biofuge stratus centrifuga (Heraeus, Njemačka)
- Martin Christ  $\alpha$ -1,4 liofilizator (Martin Christ Gefriertrocknungsanlage GmbH, Njemačka)
- Perkin-Elmer DSC 7 (PerkinElmer, Inc., SAD)
- Precizna analitička vaga (XS105 DualRange, Mettler Toledo, Švicarska)
- Rotavapor R-200 (Büchi, Njemačka)
- Varian Cary 50 UV-Vis spektrofotometar (Varian Inc., SAD)
- Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, UK)

#### 3.3. Metode

##### 3.3.1. Priprema i karakterizacija kompleksa melatonina s HP- $\beta$ -ciklodestrinom

30 mg melatonina otopljeno je u 1 mL 96% etanola te je nastala otopina dodana u 100 ml vode u kojoj je otopljeno 200 mg HP- $\beta$ -ciklodekstrina uz miješanje na magnetskoj miješalici. Nastala je otopina inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje nakon čega je smrznuta i osušena postupkom liofilizacije tijekom 18 sati.



Uspješnost stvaranja kompleksa provjerena je diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) korištenjem Perkin-Elmer DSC 7 instrumenta (PerkinElmer, Inc., SAD). Prije izvršenih mjerenja, uređaj je kalibriran korištenjem indija (čistoće 99,98%; temperature taljenja 156,61°C i entalpije fuzije 28,71 Jg<sup>-1</sup>). Precizno izvagani uzorci (2-5 mg, Mettler XS105 DualRange) su stavljeni u zapečaćene aluminijske posudice s probušenim poklopcem i analizirani uz brzinu zagrijavanja od 10°C min<sup>-1</sup> u rasponu temperatura od 25°C do 200°C. Na taj način provedena je DSC analiza melatonina, HP-β-ciklodekstrina, njihove fizičke smjese te liofiliziranog kompleksa melatonina s HP-β-ciklodekstrinom. Relativan stupanj kristaliničnosti lijeka u uzorku izračunat je korištenjem sljedeće jednadžbe:

$$RDC = \frac{\Delta H_{uzorak}}{\Delta H_{melatonin}} \times 100\% \quad (1)$$

### 3.3.2. Priprava nanočestica

Nanočestice su pripravljene metodom nanoprecipitacije koja se još naziva metodom izmjene otapala (engl. *solvent displacement method*). Pripravljene su ne-PEGilirane i PEGilirane nanočestice. Prvi korak u oba slučaja je priprema organske i vodene faze što se može vidjeti u tablicama 6 i 7.

Prilikom pripreme ne-PEGiliranih čestica (Tablica 6), organska faza pripravljena je otapanjem 100 mg kopolimera PVMA/MA u 5 mL acetona (F1). Kod pripreme ne-PEGiliranih nanočestica s ciklodekstrinom, u otopinu PVMA/MA u acetonu dodano je 20 mg HP-β-CD (F2), 3 mg melatonina (F3) ili 23 mg liofiliziranog kompleksa melatonina s HP-β-CD (F4). Tako pripremljeni uzorci inkubirani su 30 min na sobnoj temperaturi. Vodena je faza pripravljena otapanjem 3 mg melatonina i 20 mg HP-β-CD (F1), odnosno 3 mg melatonina (F2) u 10 mL vode, dok je u uzorcima F3 i F4 kao vodena faza korišteno 10 mL čiste vode.

Tablica 6 *Prikaz sastava organske i vodene faze za pripremu ne-PEGiliranih nanočestica*

Oznaka uzorka	Organska faza	Vodena faza
F1	100 mg kopolimera PVMA/MA otopljenog u 5 ml acetona	3 mg melatonina i 20 mg HP-β-CD otopljenih u 10 mL vode

F2	100 mg kopolimera PVMA/MA i 20 mg HP- $\beta$ -CD	3 mg melatonina otopljenog u 10 ml vode
F3	100 mg kopolimera PVMA/MA i 3 mg melatonina	10 ml vode
F4	100 mg kopolimera PVMA/MA i 23 mg liofiliziranog kompleksa HP- $\beta$ -CD/melatonin	10 ml vode

U slučaju PEGiliranih čestica (Tablica 7) kopolimer PVMA/MA i PEG 6000 su otopljeni u 5 mL acetona bez inkubacije u uzorku F1<sub>PEG</sub>, dok je u ostalim uzorcima prvo 15 mg PEG 6000 otopljeno u 2 mL acetona uz blago zagrijavanje na vodenoj kupelji i miješanje na magnetskoj miješalici čime se značajno ubrzalo otapanje PEGa, a zatim je ta otopina dodana otopini 100 mg kopolimera PVMA/MA u 3 ml acetona. Nastala otopina je inkubirana 1 sat u uzorku F1A<sub>PEG</sub>. U ostalim uzorcima je inkubirana 30 min nakon čega je dodano 20 mg HP- $\beta$ -CD (F2<sub>PEG</sub>), 3 mg melatonina (F3<sub>PEG</sub>) ili 23 mg liofiliziranog kompleksa HP- $\beta$ -CD/melatonin (F4<sub>PEG</sub>), a zatim je sustav inkubiran još 30 min. Vodene su faze jednake odgovarajućim vodenim fazama kod pripreme ne-PEGiliranih čestica.

Tablica 7 *Prikaz sastava i pripreme organske i vodene faze za pripravu PEGiliranih nanočestica*

Oznaka uzorka	Organska faza	Vodena faza
F1 <sub>PEG</sub>	100 mg kopolimera PVMA/MA i 15 mg PEG 6000 otopljenih u 5 mL acetona bez inkubacije	3 mg melatonina i 20 mg HP- $\beta$ -CD otopljenih u 10 mL vode
F1A <sub>PEG</sub>	100 mg kopolimera PVMA/MA otopljenog u 3 mL acetona; 15 mg PEG 6000 otopljenog u 2 mL acetona uz zagrijavanje na vodenoj kupelji; ove dvije otopine su pomiješane i inkubirane 1 h	3 mg melatonina i 20 mg HP- $\beta$ -CD otopljenih u 10 mL vode
F2 <sub>PEG</sub>	100 mg kopolimera PVMA/MA otopljenog u 3 mL acetona; 15 mg PEG 6000 otopljenog u 2 mL acetona uz zagrijavanje na vodenoj kupelji; ove dvije otopine su pomiješane i inkubirane 30 min; dodano 20 mg HP- $\beta$ -CD i dodatno inkubirano 30 min	3 mg melatonina otopljenog u 10 ml vode
F3 <sub>PEG</sub>	100 mg kopolimera PVMA/MA otopljenog u 3 mL acetona;	10 ml vode

	15 mg PEG 6000 otopljenog u 2 mL acetona uz zagrijavanje na vodenoj kupelji; ove dvije otopine su pomiješane i inkubirane 30 min; dodano 3 mg melatonina i dodatno inkubirano 30 min
F4 <sub>PEG</sub>	100 mg kopolimera PVMA/MA otopljenog u 3 mL acetona; 10 ml vode 15 mg PEG 6000 otopljenog u 2 mL acetona uz zagrijavanje na vodenoj kupelji; ove dvije otopine su pomiješane i inkubirane 30 min; dodano 23 mg liofiliziranog kompleksa HP-β-CD/melatonin i dodatno inkubirano 30 min

Nakon pripreme obiju faza, nanočestice su formirane polaganim dokapavanjem vodene faze organskoj fazi. Zatim je aceton uklonjen uparavanjem na rotauparivaču pri sniženom tlaku, a volumen pripravka je nadopunjen do 10 mL dodatkom visokopročišćene vode. Pripravak je zatim podvrgnut centrifugiranju pri 20 000 g tijekom 20 min pri 20°C. Supernatant je odvojen od taloga koji je resuspendiran s 3 mL 5% otopine saharoze. I supernatant i resuspendirani talog su zatim osušeni postupkom liofilizacije tijekom 18 sati. Nakon sušenja uzorci s nanočesticama su izvagani kako bi se odredio prinos po sljedećoj jednadžbi:

$$\begin{aligned}
 & \text{prinos (\%)} \\
 & = \frac{m_{\text{epruvete nakon liofilizacije}} - m_{\text{prazne epruvete}}}{m_{\text{PVMA/MA}} + m_{\text{mel.}} + m_{\text{HP}\beta\text{CD}} + m_{\text{PEG}} + m_{\text{lio.komp.HP}\beta\text{CD/mel.}} + m_{\text{saharozu}}} \quad (2) \\
 & * 100\%
 \end{aligned}$$

### 3.3.3. Mjerenje veličine i zeta potencijala nanočestica

Uređajem Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, UK) izmjerena je prosječna veličina pripremljenih nanočestica, njihov indeks polidisperznosti te zeta potencijal korištenjem dinamičke foton-korelacijske spektroskopije (engl. *dynamic light scattering*; DLS). Mjerenja su provedena pri 25°C, korištenjem monokromatskog koherentnog 10 mW He-Ne lasera ( $\lambda=633$  nm) i kutom detekcije raspršene svjetlosti od 90°, a provedena su za svaki uzorak u dva navrata. Prvi put odmah po pripremi suspenzije nanočestica, nakon otparavanja acetona i prilagodbe volumena suspenzije te drugi put nakon resuspendiranja liofiliziranih nanočestica u 3 ml ultračiste vode. U oba slučaja uzorak za mjerenje je pripremljen uzimanjem alikvota od

300  $\mu\text{L}$  suspenzije nanočestica i dodatkom 5 mL ili 10 mL, odnosno 20 mL filtriranog 10 mM NaCl-a.

### 3.3.4. Određivanje postotka uklapanja melatonina

Količina melatonina koji je uklopljen u nanočestice je određena indirektno, temeljem UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja sadržaja neuklopljene frakcije lijeka u supernatantu koji zaostaje nakon sedimentacije nanočestica ultracentrifugom. Supernatant je zatim osušen liofilizacijom tijekom 18 sati kako bi se uklonili tragovi acetona koji interferira pri određivanju sadržaja melatonina. Osušeni je supernatant rekonstituiran dodatkom 20 mL smjese vode i etanola u volumnom omjeru 4:1 uz blago zagrijavanje na vodenoj kupelji do potpunog otapanja liofiliziranog produkta. Od tako pripremljenog uzorka uzet je alikvot od 1 mL koji je razrijeđen do 10 mL smjesom vode i etanola te je izmjerena apsorbancija uzoraka na 278 nm pomoću UV-Vis spektrofotometra (Cary 50 Probe, Varian Inc. SAD) uz smjesu etanola i vode kao slijepu probu. Iz izmjerene je apsorbancije pomoću jednadžbe kalibracijskog pravca izračunata stvarna koncentracija melatonina u rekonstituiranom supernatantu te po sljedećim formulama postotak uklopljenog melatonina i sadržaj melatonina u dobivenim nanočesticama:

$$C_{\text{melatonina izmjerena}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{apsorbancija} + 0,0067}{0,02606} \quad (3)$$

$$C_{\text{melatonina teorijska}} = \frac{m_{\text{melatonin}} [\mu\text{g}]}{200 \text{ mL}} \quad (4)$$

$$\text{postotak uklopljenog melatonina} = \left[ 1 - \frac{C_{\text{melatonina izmjerena}}}{C_{\text{melatonina teorijska}}} \right] * 100\% \quad (5)$$

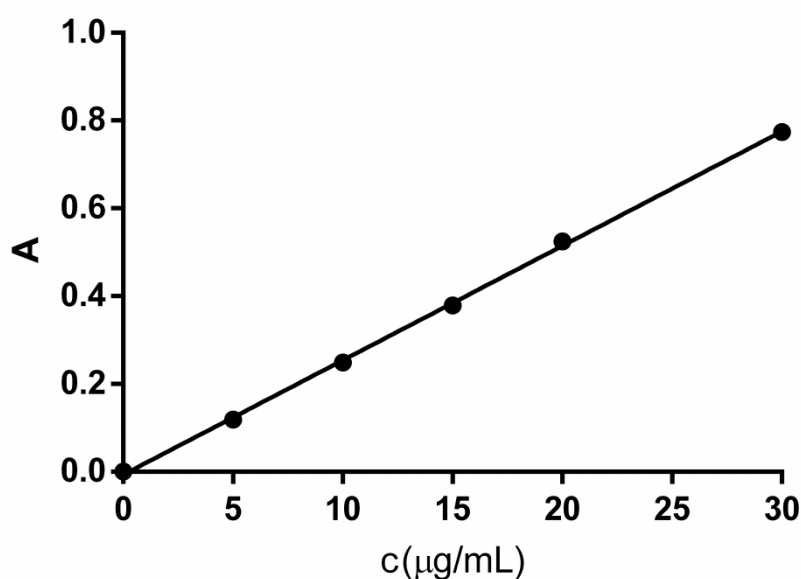
sadržaj melatonina u nanočesticama (%)

$$= \frac{\text{postotak uklopljenog melatonina} * m_{\text{melatonin}}}{\text{prinos} (\%) * (m_{\text{melatonin}} + m_{\text{PVMA/MA}} + m_{\text{PEG}} + m_{\text{HP}\beta\text{CD}} + m_{\text{lio.komp.HP}\beta\text{CD/mel.}})} * 100\% \quad (6)$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Razvoj metode za određivanje sadržaja melatonina

Koncentracija melatonina u ispitivanim uzorcima određena je UV/Vis spektrofotometrijskom metodom pri valnoj duljini od 278 pri kojoj melatonin pokazuje apsorpcijski maksimum (Zafra-Roldán *i ostali*, 2018). Kalibracijski pravac (Slika 12) razvijene metode dobiven je mjerenjem apsorbancije niza standardnih otopina melatonina u smjesi etanola i vode u volumnom omjeru 1:4. Koncentracije melatonina bile su u rasponu od 5 do 30  $\mu\text{g/mL}$ , a karakteristike metode prikazane su u tablici (Tablica 8).



Slika 12 Kalibracijski pravac melatonina izmjeren pri 278 nm

Tablica 8 Podaci dobiveni analizom kalibracijskog pravca melatonina

Koeficijent baždarnog pravca	Odsječak na ordinati	Linearnost	Granica dokazivanja ( $\mu\text{g/mL}$ )	Granica određivanja ( $\mu\text{g/mL}$ )	Radno područje ( $\mu\text{g/mL}$ )
$0,02606 \pm 0,0002$	$-0,0067 \pm 0,0036$	0.9993	0.03	0.08	1.00-40.00

### 4.2. Karakterizacija inkluzijskog kompleksa melatonina s HP- $\beta$ -ciklodekstrinom u krutom stanju

Inkluzijski kompleks melatonina s HP- $\beta$ -ciklodekstrinom pripremljen je dodatkom etanolne otopine melatonina vodenoj otopini HP- $\beta$ -ciklodekstrina. Molarni omjer melatonina i HP- $\beta$ -

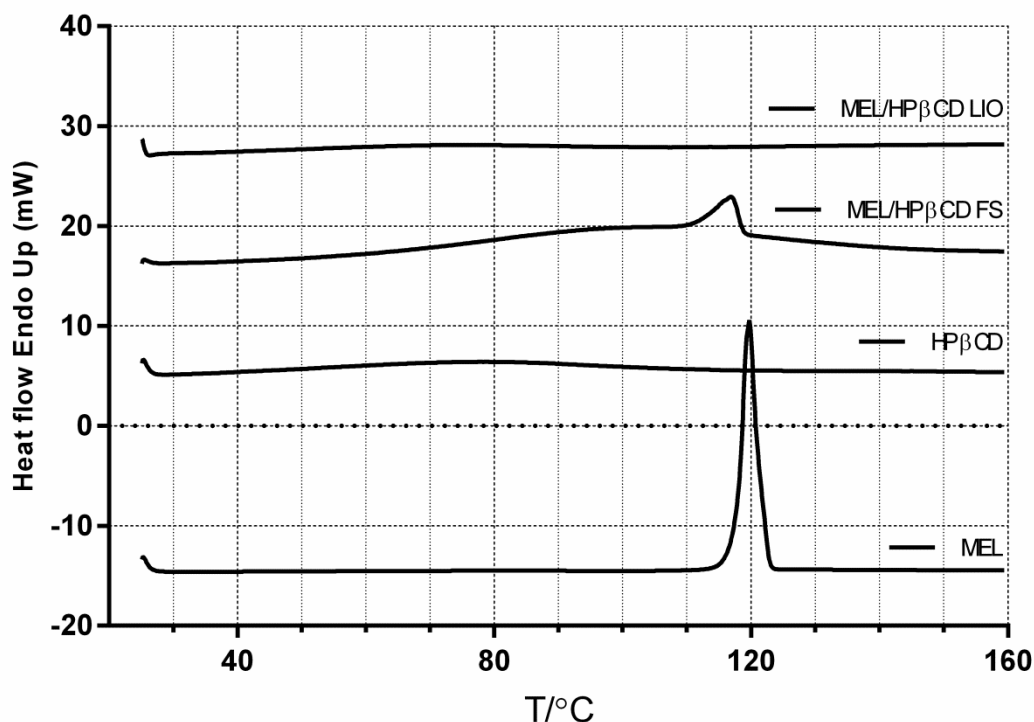
CD iznosio je 1:1. Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, dobivena je otopina smrznuta i podvrgnuta procesu liofilizacije te je tako priređen inkluzijski kompleks u krutom stanju.

Uspješnost stvaranja kompleksa provjerena je diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC), najčešće korištenom termoanalitičkom metodom za analizu interakcija između ljekovite tvari i ciklodekstrina u krutom stanju. DSC je termoanalitička metoda u kojoj se uzorak i poredbena tvar zagrijavaju određenom brzinom u kontroliranim uvjetima te se prati razlika u njihovim temperaturama pri primitku iste količine topline (engl. *heat flux DSC*), odnosno prati se razlika u toplini koja je potrebna da se obje tvari zagriju na istu temperaturu (engl. *power compensated DSC*). Iz dobivenih termograma određuje se, primjerice, sastav uzorka te interakcije među sastavnicama u uzorku, toplinski kapacitet analita, promjene entalpije te karakteristične temperaturne vrijednosti ispitivane tvari poput temperature stakljenja ( $T_g$ ), temperature kristalizacije ( $T_c$ ) ili temperature taljenja ( $T_m$ ). (Humboldt University of Berlin, 2009)

Provedena je analiza pojedinačnih sastavnica, odnosno melatonina i HP- $\beta$ -ciklodekstrina, njihove fizičke smjese te pripravljenog liofiliziranog kompleksa. Rezultati provedene analize prikazani su u tablici 9 (Tablica 9), a dobiveni termogrami na slici 13 (Slika 13).

Tablica 9 Rezultati termičke analize melatonina, fizičke smjese i liofiliziranog kompleksa melatonina s hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom: temperatura tališta ( $T_{onset}$   $T_{peak}$ ), entalpija taljenja ( $\Delta H_{fus}$ ) i relativna kristaliničnost lijeka u uzorku (RDC)

Uzorak	$T_{onset}/^{\circ}C$	$T_{peak}/^{\circ}C$	$\Delta H_{fus}$ (J/g)	RDC (%)
melatonin	117,79	119,72	131,53	100,00
fizička smjesa	111,63	116,93	99,66	75,77
liofilizirani kompleks	-	-	-	0



Slika 13 DSC termogrami melatonina (MEL), hidropsipropil- $\beta$ -ciklodekstrina, njihove ekvimolarne fizičke smjese (MEL/HP $\beta$ CD FS) i liofiliziranog kompleksa (MEL/HP $\beta$ CD LIO).

Termogram melatonina pokazuje karakterističan oštar endotermni pik s početkom na 117,79°C koji odgovara talištu melatonina s izmjerenom entalpijom taljenja ( $\Delta H_{\text{fus}}$ ) od 131,53 Jg<sup>-1</sup>. Termogram HP- $\beta$ -ciklodekstrina ne pokazuje karakteristične pikove, nego je vidljiv endotermni proces niskog intenziteta između 40°C i 110°C koji odgovara gubitku vode. Oba termograma su u skladu s podacima iz literature (Topal, Çetin Altındal i Gümüşderelioğlu, 2015). Termogram fizičke smjese melatonina i HP- $\beta$ -ciklodekstrina bi trebao biti jednak zbroju termograma pojedinačnih sastavnica no vidljivo je da je došlo do smanjenja pika melatonina i pomaka prema manjim temperaturama (111,63°C). Površina ispod pika je proporcionalna količini kristaliničnog melatonina, a opaženo smanjenje površine kod fizičke smjese se u literaturi tumači kao termički inducirana interakcija između komponenata tijekom termičke analize (Mura, 2015). Usporedbom s termogramom samog melatonina, odnosno računanjem relativne kristaliničnosti (RDC) vidljivo je da u fizičkoj smjesi dolazi do određenog smanjenja kristalinične frakcije melatonina, vjerojatno uslijed ranije navedene termički inducirane interakcije. Termogram liofiliziranog kompleksa ne pokazuje pikove, a potpuna odsutnost karakterističnog pika tanjenja melatonina se prema literarnim podacima smatra dokazom uspješno pripremljenog amorfnog inkluzijskog kompleksa melatonina s HP- $\beta$ -ciklodekstrinom u krutom stanju (Mura, 2015).

#### 4.3. Osobine pripremljenih nanočestica

Nanočestice su uspješno pripravljene metodom nanoprecipitacije koja se još naziva metodom izmjene otapala (engl. *solvent displacement method*). Ova se metoda temelji na polaganom dokapavanju vodene faze u otopinu polimera u organskom otapalu koje se miješa s vodom (acetom). Pri dodatku u organsku fazu, voda brzo difundira pri čemu se molekule polimera, kako bi izbjegle kontakt s njom, udružuju tvoreći nanočestice. (Crucho i Barros, 2017)

Pripravljene su ne-PEGilirane (mukoadhezivne) i PEGilirane (mukopenetrativne) nanočestice. Variranjem sastava organske i vodene faze istražen je utjecaj različitih načina stvaranja inkluzijskog kompleksa melatonina s HP- $\beta$ -ciklodekstrinom na osobine nanočestica. U uzorku F1 inkluzijski kompleks nastaje *in situ* u vodenoj fazi, u uzorku F4 je korišten prethodno pripremljen liofilizirani kompleks, dok su se u uzorku F2, u kojem je ispitano uklapanje melatonina u nanočestice HP- $\beta$ -ciklodekstrinom modificiranog kopolimera PVMA/MA, procesi kompleksacije i formiranja nanočestica odvijali istovremeno. Uzorak F3 služio je kao kontrola tj. korišten je za ispitivanje uklapanja melatonina bez utjecaja ciklodekstrina. Ostali parametri, poput vrste i količine tvari, omjera volumena organske i vodene faze (1:2), omjera mase kopolimera PVMA/MA i PEG-a (100:15) te omjera mase kopolimera i melatonina (100:3) su bili nepromijenjeni.

Kao polimer za pripremu nanočestica korišten je Gantrez<sup>TM</sup> AN-169, sintetski kopolimer metil-vinil-etera i anhidrida maleinske kiseline (PVMA/MA) koji je topljiv u organskim otapalima, a zbog prisutnosti anhidridne skupine lako se funkcionalizira molekulama koje u svojoj strukturi sadrže hidroksilne skupine, kao što je to PEG. Dodatne prednosti su njegova biokompatibilnost i niska toksičnost. ([www.chempopint.com](http://www.chempopint.com) ; [www.ashland.com](http://www.ashland.com) pristupljeno 12.05.2018.)

##### 4.3.1. Osobine ne-PEGiliranih nanočestica

U tablicama (Tablica 10, Tablica 11) su prikazane fizikalno-kemijske karakteristike ne-PEGiliranih nanočestica. Promjera su od 83,2 do 96,9 nm s indeksom polidisperznosti od 0,085 do 0,096 i zeta potencijalom u rasponu od (-42,3) do (-38,8) mV. Dobivene nanočestice su značajno manje od onih koje su priredili Agüeros *et al.* (2009) čija je veličina bila 179 nm u slučaju praznih čestica kopolimera PVMA/MA te 302 nm u slučaju nanočestica s uklopljenim inkluzijskim kompleksom paklitaksela s HP- $\beta$ -ciklodekstrinom. Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da je u ovom istraživanju korišten melatonin, a ne paklitaksel te da je molekulska masa kopolimera PVMA/MA korištenog u ovom istraživanju 2 000 kDa, za



razliku od 200 kDa kolika je molekulska masa kopolimera kojeg su koristili Agüeros *et al.* (2009).

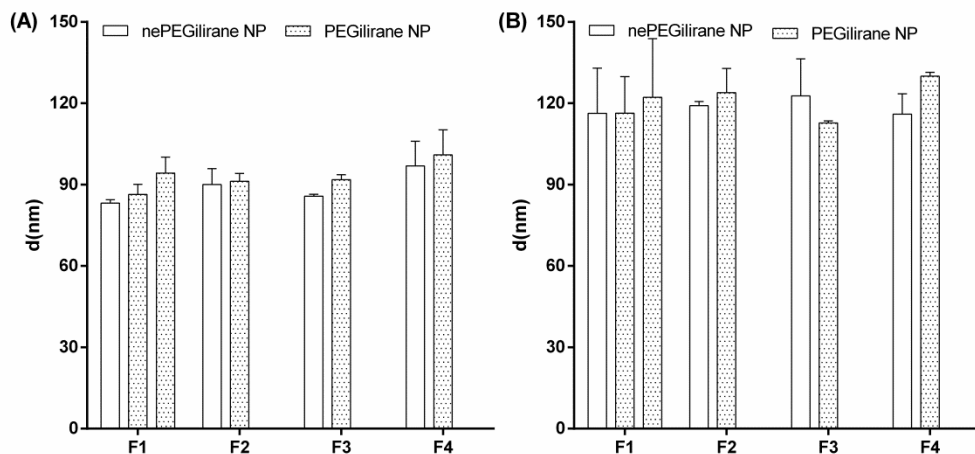
Tablica 10 *Fizikalno-kemijske karakteristike polianhidridnih nanočestica s melatoninom: srednji promjer (d), indeks polidisperznosti (PDi), zeta potencijal ( $\zeta$ )*

Uzorak	d (nm)		PDi		$\zeta$ (mV)	
	prije lio	nakon lio	prije lio	nakon lio	prije lio	nakon lio
F1	83,2±1,3	116,3±16,7	0,096±0,006	0,033±0,013	-40,8±1,1	-35,3±3,0
F2	90,5±5,9	119,1±1,6	0,093±0,006	0,038±0,004	-38,8±2,3	-37,8±0,8
F3	85,7±0,7	122,8±13,7	0,085±0,003	0,034±0,016	-42,3±0,5	-36,6±1,3
F4	96,9±9,1	116,0±7,5	0,090±0,008	0,030±0,011	-41,1±2,1	-38,4±1,3

Tablica 11 *Fizikalno-kemijske karakteristike polianhidridnih nanočestica s melatoninom: prinos te uklapanje i sadržaj melatonina*

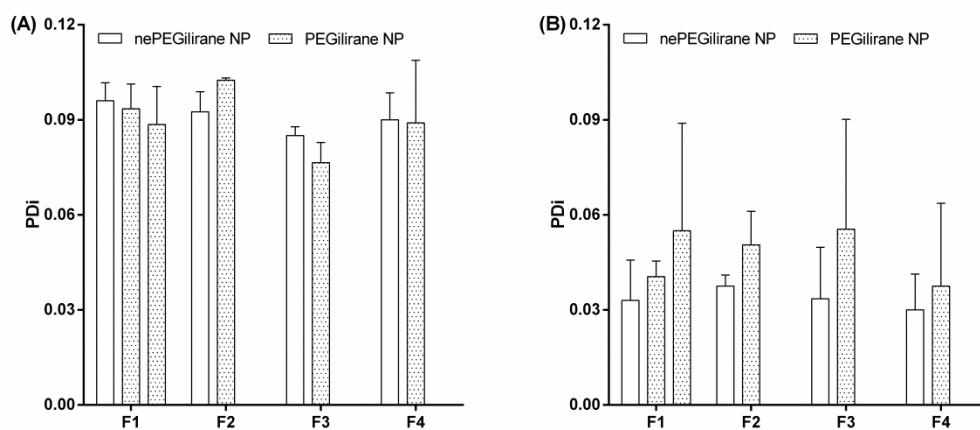
Uzorak	Uklapanje	Prinos (%)	Sadržaj
	melatonina (%)		melatonina u NP (%)
F1	28,08±1,75	65,51±0,57	1,06±0,04
F2	24,28±2,52	62,82±0,82	0,95±0,11
F3	30,00±1,55	73,09±2,78	1,23±0,10
F4	22,77±2,05	69,57±0,10	0,80±0,07

Na slici 14A (Slika 14A) vidljivo je da su ne-PEGilirane čestice dobivene korištenjem *in situ* kompleksa (F1) najmanje i gotovo su jednake onima dobivenim u kontrolnom uzorku bez ciklodekstrina (F3). Nešto veće čestice su dobivene u uzorku F2, a najveće u uzorku F4 u kojem je korišten liofilizirani kompleks. Prema dobivenim podacima, primjena ciklodekstrina uzrokuje povećanje veličine pripremljenih nanočestica.



Slika 14 Utjecaj tehnoloških parametara pripreme na srednji geometrijski promjer ( $d$ ) nativnih nanočestica s melatoninom (A) i promjena veličine nanočestica nakon postupka sušenja smrzavanjem (B).

Vrijednosti indeksa polidisperznosti (Slika 15A), kojim se opisuje raspodjela veličina dobivenih čestica, kreću se oko 0,09 za ne-PEGilirane čestice što znači da je u svim uzorcima pripređen monodisperzan sustav.

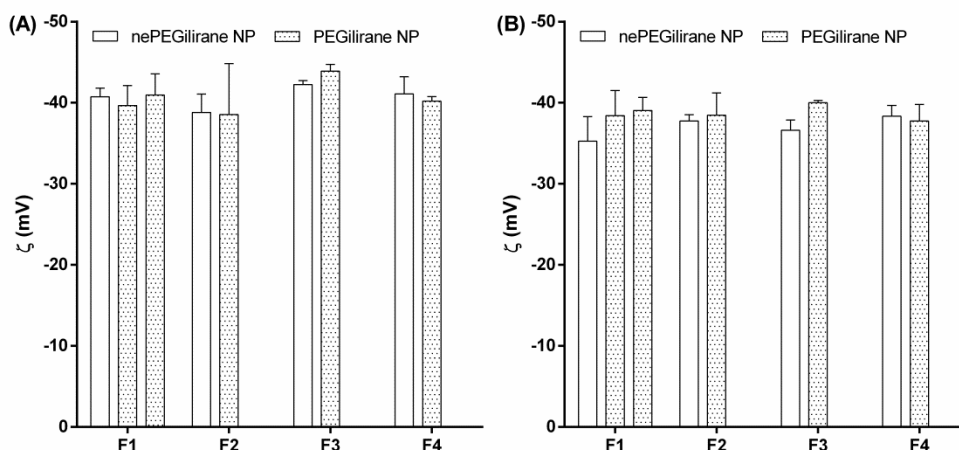


Slika 15 Utjecaj tehnoloških parametara pripreme na indeks polidisperznost (PDI) nativnih nanočestica s melatoninom (A) i promjena vrijednosti indeksa polidisperznosti nakon postupka sušenja smrzavanjem (B).

Stabilnost dobivenih koloidnih sustava je procijenjena na temelju zeta potencijala nanočestica. Oko nabijenih čestica u otopini elektrolita postoji električni dvosloj. Unutarnji ili Sternov sloj čine ioni suprotnog naboja koji su čvrsto vezani za površinu nabijene čestice i zato su nepokretni, dok vanjski ili difuzni sloj čine ioni koji ne ulaze u tako jake interakcije s

nabijenom česticom pa su pokretni. Pri kretanju nabijene čestice kroz otopinu elektrolita zajedno s njom se kreću i Sternov sloj, ali i dio difuznog sloja koji je od ostatka difuznog sloja (koji se ne kreće zajedno s česticom) odvojen plohom smicanja. Električni potencijal nabijene čestice mjereno na udaljenosti plohe smicanja se zove zeta potencijal ( $\zeta$ ). Ako je zeta potencijal čestica veći od +30 mV ili manji od -30 mV, koloidni sustav se smatra stabilnim jer će se čestice međusobno odbijati i neće flokulirati. U suprotnom dolazi do flokulacije te se koloidni sustav smatra nestabilnim. Vrijednost zeta potencijala određena je indirektno mjerenjem elektroforetske pokretljivosti na temelju Dopplerovog efekta tj. promjene frekvencije laserskog svjetla raspršenog od čestice u gibanju. (Malvern instruments, 2004)

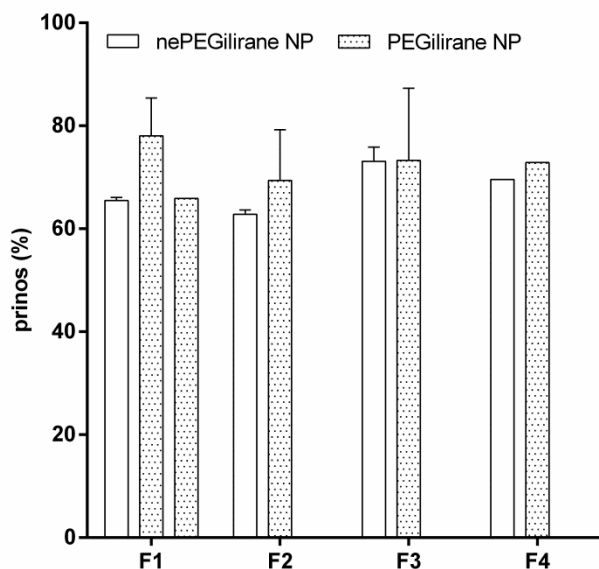
Vrijednosti zeta potencijala ne-PEGiliranih čestica (Slika 16A) kreću se oko (-40 mV) i ne razlikuju se značajno između uzoraka, a ukazuju na stabilnost dobivenih sustava te su u skladu s vrijednostima koje su dobili Agüeros *et al.* (2009). Također, temeljem tih vrijednosti zeta potencijala ne očekuje se značajnija interakcija nanočestica s negativno nabijenim lancima mucina.



Slika 16 Utjecaj tehnoloških parametara pripreme na zeta potencijal ( $\zeta$ ) nativnih nanočestica s melatoninom (A) i promjena vrijednosti zeta potencijala nakon postupka sušenja smrzavanjem (B).

Prinos je određen na temelju razlike teorijski izračunate mase nanočestica (zbroj mase komponenata) i mase liofiliziranog produkta (jednadžba 2), a dobiveni podaci su i grafički prikazani (Slika 17). Prinos kod ne-PEGiliranih čestica je bio u rasponu od 62,82% do 73,09%. Najveći je bio u kontrolnom uzorku (F3) u kojem nije korišten ciklodekstrin. U uzorcima F1 i F4 u kojima je kompleks nastao prije formiranja nanočestica prinos je nešto veći nego u uzorku F2 u kojem su ta dva procesa istovremena. Rezultati pokazuju da primjena

ciklodekstrina smanjuje prinos, a dobivene su vrijednosti prinosa nešto veće od prinosa koje su ostvarili Agüeros *et al.*, (2009) u svom istraživanju (51,2% kod čestica s paklitakselom; 59,1% kod čestica s inkluzijskim kompleksom paklitaksela i ciklodekstrina).

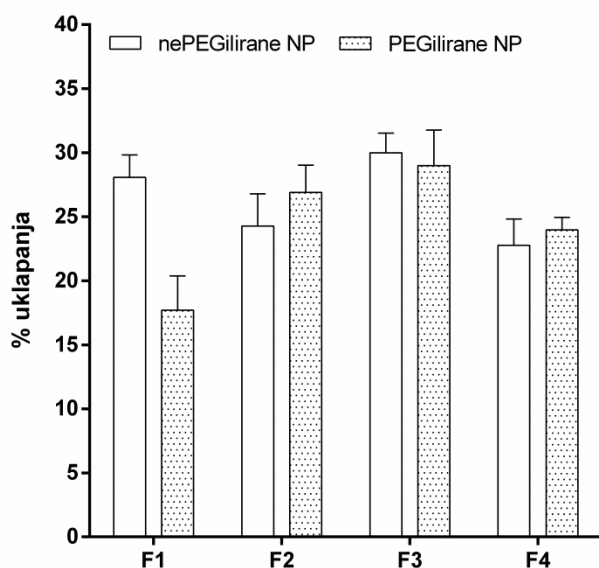


Slika 17 Utjecaj tehnoloških parametara pripreme nanočestica na prinos

Količina melatonina koja je uklopljena u nanočestice je određena indirektno, temeljem ukupne količine upotrijebljenog melatonina te određivanjem količine neuklopljenog melatonina iz njegove koncentracije u rekonstituiranom supernatantu.

Postotak uklopljenog melatonina, koji je proporcionalan sadržaju melatonina u nanočesticama (jednadžba 5), prikazan je grafički (Slika 18). Najbolje uklapanje melatonina je postignuto u kontrolnom uzorku (F3). Nešto slabije je ostvareno u uzorku F1 korištenjem *in situ* pripremljenog kompleksa, znatno lošije u uzorku F2, a najlošije u uzorku F4, odnosno korištenjem liofiliziranog kompleksa. Za razliku od Agüeros *et al.* (2009) koji su pokazali da primjena paklitaksela u obliku kompleksa s ciklodekstrinom povećava sadržaj paklitaksela u dobivenim nanočesticama više od 500 puta, u ovom istraživanju dobiveni rezultati pokazuju da se korištenjem ciklodekstrina znatno smanjuje uklapanje melatonina u nanočestice, što se može objasniti činjenicom da melatonin ima veći afinitet za kopolimer PVMA/MA nego za ciklodekstrine te da ciklodekstrini zauzimaju mjesta na kopolimeru i time smanjuju mogućnost vezanja melatonina za njega. Ipak, sadržaj melatonina u dobivenim nanočesticama

iznosi oko 1% zbog čega se, prema podacima iz literature (Cutando *i ostali*, 2013), može očekivati pozitivan terapijski učinak razvijenih nanočestica u liječenju bolesti parodonta.



Slika 18 Utjecaj tehnoloških parametara pripreme nanočestica na uspješnost uklapanja melatonina

Nedostatak nanočestica je njihova velika nestabilnost vodenim suspenzijama koja se očituje njihovom agregacijom i fuzijom. Uz to, može doći i do hidrolize polimera što rezultira promjenom profila oslobađanja ljekovite tvari i posljedičnom razgradnjom iste. Iz tog su razloga nanočestice podvrgnute procesu liofilizacije ili sušenja smrzavanjem, što je najčešće korištena metoda kojom se vodena suspenzija nanočestica pretvara u kruti dozirni oblik čime se povećava stabilnost nanočestica, produljuje njihov rok trajanja i olakšava rukovanje njima i njihovo skladištenje. Liofilizacija kao metoda sušenja uzorka, odnosno uklanjanja vode ili drugog otapala iz zamrznutog uzorka temelji se na procesima sublimacije i desorpcije. Prvi korak je smrzavanje uzorka pri atmosferskom tlaku, nakon čega se uzorak stavlja u liofilizator u uvjete niskog tlaka (vakuum) i niske temperature (uvjeti ispod trojne točke otapala). Dovođenjem topline dolazi do sublimacije krutog otapala (primarno sušenje) i desorpcije vezanih molekula otapala (sekundarno sušenje). Proces i smrzavanja i sušenja predstavljaju znatan stres za nanočestice i mogu negativno utjecati na njihovu stabilnost te se iz tog razloga koriste krioprotektanti i lioprotektanti, tvari koje štite sustav od ranije spomenutog stresa tijekom smrzavanja, odnosno liofilizacije te pomažu očuvanju fizikalno-kemijskih svojstava

nanočestica. U tu se svrhu najčešće koriste šećeri poput trehaloze ili saharoze. (Fonte, Reis i Sarmento, 2016)

Nanočestice su liofilizirane uz 5% saharozu kao krioprotektant te ponovno analizirane nakon liofilizacije i rekonstitucije u ultračistoj vodi, a dobiveni rezultati su prikazani tablično (Tablica 10). te grafički (Slika 14B, Slika 15B i Slika 16B).

Srednji promjer nanočestica nakon liofilizacije (Slika 14B) je u rasponu od 116,0 nm do 122,8 nm iz čega je jasno vidljiv značajan porast veličine čestica. Najveći porast je uočen kod prethodno gotovo najmanjih čestica tj. u kontrolnom uzorku (F3) koje su sa srednjim promjerom od 122,8 nm nakon liofilizacije najveće, a najmanji je porast uočen kod prethodno najvećih čestica tj. u uzorku F4 koje su s srednjim promjerom od 116,0 nm nakon liofilizacije najmanje.

Vrijednost indeksa polidisperznosti (Slika 15B) se značajno smanjila nakon liofilizacije te ukazuje ne samo na monodisperznost sustava nego i na još užu raspodjelu veličina čestica u sustavu.

Vrijednost zeta potencijala nakon liofilizacije (Slika 16B) je u rasponu od (-38,4 mV) do (-35,3 mV), tako da su nastali sustavi i dalje stabilni. Pozitivnije vrijednosti zeta potencijala su moguća posljedica utjecaja saharoze kao krioprotektanta, ali daljnja istraživanja su potrebna kako bi se to ispitalo.

#### 4.3.2. Osobine PEGiliranih nanočestica

PEGilacijom nanočestica povećana je hidrofilnost njihove površine i na taj su način dobivene mukopenetrativne čestice. PEGilacija Gantreza<sup>TM</sup> AN-169 provedena je uz inkubaciju u bezvodnom mediju jer su istraživanja pokazala da je u vodenom mediju dominantna reakcija hidroliza anhidrida, a ne vezanje PEGa. Fizikalno-kemijske karakteristike PEGiliranih nanočestica prikazane su u tablicama (Tablica 12 i Tablica 13).

Tablica 12 *Fizikalno-kemijske karakteristike PEGiliranih polianhidridnih nanočestica s melatoninom: srednji promjer (d), indeks polidisperznosti (PDi), zeta potencijal (ζ)*

Uzorak	d (nm)		PDi		ζ (mV)	
	prije lio	nakon lio	prije lio	nakon lio	prije lio	nakon lio
F1 <sub>PEG</sub>	86,4±3,8	116,4±13,5	0,094±0,008	0,041±0,005	-39,7±2,5	-38,4±3,1
F1A <sub>PEG</sub>	94,3±5,9	122,2±21,6	0,089±0,012	0,055±0,034	-40,9±2,6	-39,1±1,6

F2 <sub>PEG</sub>	91,3±2,9	123,9±8,8	0,103±0,001	0,051±0,011	-38,6±6,3	-38,5±2,8
F3 <sub>PEG</sub>	91,8±1,8	112,8±0,9	0,077±0,006	0,056±0,035	-43,9±0,8	-40,0±0,3
F4 <sub>PEG</sub>	101,0±9,2	130,0±1,4	0,089±0,020	0,038±0,026	-40,2±0,6	-37,8±2,1

Tablica 13 *Fizikalno-kemijske karakteristike PEGiliranih polianhidridnih nanočestica s melatoninom prinos te uklapanje i sadržaj melatonina*

Uzorak	Uklapanje	Prinos (%)	Sadržaj
	melatonina (%)		melatonina u NP (%)
F1 <sub>PEG</sub>	17,71±2,68	78,06±7,33	0,50±0,03
F1A <sub>PEG</sub>	31,81±5,95	65,92±0,01	1,09±0,23
F2 <sub>PEG</sub>	26,92±2,13	69,39±9,81	0,87±0,18
F3 <sub>PEG</sub>	29,00±2,76	73,30±1,41	1,03±0,10
F4 <sub>PEG</sub>	23,97±0,99	72,86±0,30	0,72±0,03

PEGilirane čestice su s veličinom (Slika 14A) u rasponu od 86,4 nm do 101,0 nm neznatno veće od ne-PEGiliranih nanočestica što uzrokovano vezanjem lanaca PEGa na kopolimer PVMA/MA i posljedičnim utjecajem na slaganje takvog PEGiliranog polimera u nanočestice. Kao i kod ne-PEGiliranih čestica, najmanje čestice su dobivene korištenjem *in situ* kompleksa (F1<sub>PEG</sub>), a najveće korištenjem liofiliziranog kompleksa (F4<sub>PEG</sub>). Iz razlika srednjeg promjera nanočestica uzoraka F1<sub>PEG</sub> i F1A<sub>PEG</sub> nedvojbeno je da inkubacija uzrokuje porast veličine nanočestica.

Na slikama (Slika 15 i Slika 16) je vidljivo da PEGilacija nema značajan utjecaj niti na indeks polidisperznosti niti na zeta potencijal nanočestica. PEGilirane čestice su s vrijednosti indeksa polidisperznosti od oko 0,09 monodisperzne, a zeta potencijal oko vrijednosti (-40 mV) dokazuje njihovu stabilnost.

Prinos i uklapanje melatonina su kod PEGiliranih čestica neznatno bolji nego kod ne-PEGiliranih čestica. Zanimljivo je uočiti da je najbolji prinos povezan s najlošijim uklapanjem melatonina (F1<sub>PEG</sub>), a inkubacijom od sat vremena značajno se mijenjaju oba rezultata te se dobiva najlošiji prinos i najbolje uklapanje melatonina (F1A<sub>PEG</sub>). Sadržaj melatonina u nanočesticama je nešto manji u odnosu na ne-PEGilirane nanočestice. U uzorku F1<sub>PEG</sub> iznosi 0,50% te je značajno manji nego u drugim uzorcima u kojima je oko očekivanih 1%.

I PEGilirane su nanočestice liofilizirane, rekonstituirane te analizirane, a dobiveni podaci su prikazani u tablici (Tablica 12). Očekivano, došlo je do porasta veličine nanočestica (Slika 14B) i približno su jednake veličine kao i ne-PEGilirane nanočestice nakon liofilizacije s tim da je raspon veličina značajno veći (112,8 nm i 130,0 nm). Za razliku od ne-PEGiliranih čestica, kod kontrolnog uzorka (F3<sub>PEG</sub>) je došlo do najmanjeg porasta veličine čestice te su one nakon liofilizacije zapravo najmanje, dok su čestice uzorka F4<sub>PEG</sub> koje su prije liofilizacije bile najveće i nakon liofilizacije najveće.

Indeks polidisperznosti (Slika 15B) se i kod PEGiliranih čestica znatno smanjio nakon liofilizacije, iako manje nego kod ne-PEGiliranih čestica, te su nastali sustavi i dalje monodisperzni.

Zeta potencijal (Slika 16B) je ostao gotovo nepromijenjen što znači da liofilizacija kod PEGiliranih čestica nema značajan utjecaj na zeta potencijal, odnosno na stabilnost čestica.



## 5. ZAKLJUČCI

- Procesom liofilizacije uspješno je pripremljen inkluzijski kompleks melatonina s HP- $\beta$ -ciklodekstrinom u krutom stanju.
- Uspješno su pripravljene ne-PEGilirane (mukoadhezivne) i PEGilirane (mukopenetrativne) nanočestice veličine u rasponu od  $83,2 \pm 1,3$  do  $96,9 \pm 9,1$  nm, odnosno od  $86,4 \pm 3,8$  do  $101,0 \pm 9,2$  nm. Dobiveni su sustavi stabilni ( $\zeta \approx (-40 \text{ mV})$ ) i monodisperzni ( $PDI \approx 0,09$ ).
- PEGilirane čestice su neznatno veće od ne-PEGiliranih te imaju bolji prinos, a manji sadržaj melatonina.
- Korištenjem ciklodekstrina, suprotno očekivanjima, smanjen je prinos, uklapanje melatonina i sadržaj melatonina u nanočesticama.
- Iako je sadržaj melatonina relativno nizak, prema literaturnim podacima, dovoljan je za ostvarenje pozitivnog terapijskog učinka pri liječenju bolesti parodonta.
- Liofilizacija uzrokuje porast veličine čestica te znatno smanjenje, ionako malog, indeksa polidisperznosti.
- Liofilizacijom dolazi do smanjenja apsolutne vrijednosti zeta potencijala ne-PEGiliranih čestica, a zeta potencijal PEGiliranih čestica je ostao gotovo nepromijenjen.

## 6. LITERATURA

Agüeros, M. i ostali (2009) „Bioadhesive properties and biodistribution of cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles“, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3–4), str. 231–240. doi: 10.1016/j.ejps.2009.02.010.

Agüeros, M. i ostali (2009) „Combined hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and poly(anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel“, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(4), str. 405–413. doi: 10.1016/j.ejps.2009.09.010.

Boegh, M. i Nielsen, H. M. (2015) „Mucus as a barrier to drug delivery - Understanding and mimicking the barrier properties“, *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 116(3), str. 179–186. doi: 10.1111/bcpt.12342.

Cengiz, M. I., Cengiz, S. i Wang, H. L. (2012) „Melatonin and oral cavity“, *International Journal of Dentistry*, 2012. doi: 10.1155/2012/491872.

Chava, V. K. i Sirisha, K. (2012) „Melatonin: A Novel Indolamine in Oral Health and Disease“, *International Journal of Dentistry*, 2012, str. 1–9. doi: 10.1155/2012/720185.

Chemistry: vinyl ether polymers and copolymers, 2018., <http://www.ashland.com>, pristupljeno 12.05.2018.

Cone, R. A. (2009) „Barrier properties of mucus“, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 61(2), str. 75–85. doi: 10.1016/j.addr.2008.09.008.

Crucho, C. I. C. i Barros, M. T. (2017) „Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods“, *Materials Science and Engineering C*. Elsevier B.V., 80, str. 771–784. doi: 10.1016/j.msec.2017.06.004.

Cutando, A. i ostali (2013) „Effect of gingival application of melatonin on alkaline and acid phosphatase, osteopontin and osteocalcin in patients with diabetes and periodontal disease“, *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 18(4), str. 657–663. doi: 10.4317/medoral.18832.

Duchêne, D. i Bochot, A. (2016) „Thirty years with cyclodextrins“, *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 514(1), str. 58–72. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.07.030.

Fonte, P., Reis, S. i Sarmiento, B. (2016) „Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery“, *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V.,

225, str. 75–86. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.034.

Gantrez™ Copolymers, 2018., <https://www.chempoint.com>, pristupljeno 12.05.2018.

Herpes, 2018., <https://www.plivazdravlje.hr>, pristupljeno 06.04.2018.

Humboldt University of Berlin (2009) „Investigation of Polymers with Differential Scanning Calorimetry“, *Advanced Lab: DSC Investigation of Polymers*, str. 1–17.

Jansook, P., Ogawa, N. i Loftsson, T. (2018) „Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications“, *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier, 535(1–2), str. 272–284. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.018.

Leal, J., Smyth, H. D. C. i Ghosh, D. (2017) „Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery“, *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier, 532(1), str. 555–572. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.018.

Liu, M. i ostali (2014) „Developments of mucus penetrating nanoparticles“, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Ltd, 10(4), str. 275–282. doi: 10.1016/j.ajps.2014.12.007.

Malvern instruments (2004) „Zetasizer Nano Series User Manual“, *Department of Biochemistry Biophysics Facility , University of Chambridge*, (2), str. 207. doi: 10.1016/S0294-3506(99)80105-7.

Murgia, X. i ostali (2017) „The role of mucus on drug transport and its potential to affect therapeutic outcomes“, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.addr.2017.10.009.

Netsomboon, K. i Bernkop-Schnürch, A. (2016) „Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery“, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V., 98, str. 76–89. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.11.003.

Pearson, J. P., Chater, P. I. i Wilcox, M. D. (2016) „The properties of the mucus barrier, a unique gel – how can nanoparticles cross it?“, *Therapeutic Delivery*, 7(4), str. 229–244. doi: 10.4155/tde-2015-0002.

Permuy, M. i ostali (2017) „Melatonin: A review of its potential functions and effects on dental diseases“, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), str. 1–13. doi: 10.3390/ijms18040865.

Popielec, A. i Loftsson, T. (2017) „Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs“, *International Journal of Pharmaceutics*, 531(2), str. 532–542. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.06.009.

Reiter, R. J. *i ostali* (2015) „Melatonin in the oral cavity: Physiological and pathological implications“, *Journal of Periodontal Research*, 50(1), str. 9–17. doi: 10.1111/jre.12176.

Topal, B., Çetin Altındal, D. i Gümüşderelioğlu, M. (2015) „Melatonin/HP $\beta$ CD complex: Microwave synthesis, integration with chitosan scaffolds and inhibitory effects on MG-63CELLS“, *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), str. 801–811. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.11.028.

Tordjman, S. *i ostali* (2017) „Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits“, *Current Neuropharmacology*, 15(3), str. 434–443. doi: 10.2174/1570159X14666161228122115.

Vivid, D. i Bentley, G. E. (2018) „Seasonal reproduction in vertebrates: Melatonin synthesis, binding, and functionality using Tinbergen’s four questions“, *Molecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, str. 652. doi: 10.3390/molecules23030652.

Zafra-Roldán, A. *i ostali* (2018) „New insights on the spectrophotometric determination of melatonin pKavalues and melatonin- $\beta$ CD inclusion complex formation constant“, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier B.V, 190, str. 442–449. doi: 10.1016/j.saa.2017.09.042.

## 7. SAŽETAK

Svrha ovoga rada bilo je ispitati utjecaj HP- $\beta$ -ciklodekstrina na svojstva polianhidridnih nanočestica i uklapanje melatonina u njih. Pripravljene su ne-PEGilirane (mukoadhezivne) i PEGilirane (mukopenetrativne) nanočestice sintetskog kopolimera metil-vinil-etera i anhidrida maleinske kiseline (Gantrez<sup>TM</sup> AN-169) metodom nanoprecipitacije. Melatonin je uklopljen u nanočestice u obliku krutog liofiliziranog kompleksa s HP- $\beta$ -ciklodekstrinom, *in situ* pripremljene vodene otopine kompleksa te *in situ* stvorenog kompleksa pri formiranju nanočestica HP- $\beta$ -ciklodekstrinom modificiranog kopolimera. Dobivene su nanočestice podvrgnute procesu sušenja smrzavanjem kako bi im se povećala stabilnost, nakon čega su rekonstituirane i analizirane. Rezultati pokazuju da su dobivene nanočestice prikladne veličine za primjenu na sluznicu te da su stabilne i monodisperzne, a liofilizacijom dolazi do porasta veličine, smanjenja indeksa polidisperznosti te u slučaju mukoadhezivnih čestica smanjenja zeta potencijala. Uklapanje melatonina je relativno nisko te se pokazalo da ciklodekstrini, suprotno očekivanjima, smanjuju uklapanje melatonina u nanočestice. Ipak, sadržaj melatonina je dostatan za postizanje pozitivnih terapijskih učinaka u lokalnom liječenju bolesti parodonta.

## 7. SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the effect of HP- $\beta$ -cyclodextrin on physiochemical properties of polyanhydride nanoparticles and encapsulation of melatonin. Using nanoprecipitation method, both non-PEGylated (mucoadhesive) and PEGylated (mucopenetrative) nanoparticles were formed from the copolymer of methyl vinyl ether and maleic anhydride (Gantrez<sup>TM</sup> AN-169). Different approaches were used to encapsulate melatonin into nanoparticles, such as an addition of the solid inclusion complex of melatonin and HP- $\beta$ -cyclodextrin, *in situ* prepared aqueous solution of the complex and complex formed *in situ* during the formation of nanoparticles from HP- $\beta$ -cyclodextrin-modified copolymer. In order to increase stability of nanoparticles, they were subjected to freeze-drying process. The resulting nanoparticles displayed an adequate size for mucosal drug delivery and were stable and monodisperse. Freeze-drying caused an increase in size, reduction of PDI and a reduction of zeta potential of mucoadhesive nanoparticles. Cyclodextrins caused a reduction of the encapsulation efficiency of melatonin into nanoparticles. In spite of relatively low content of melatonin, it is still sufficient to obtain positive therapeutic effects for local treatment of periodontal diseases.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### CIKLODEKSTRINSKO-POLIANHIDRIDNE NANOČESTICE S MELATONINOM

Hrvoje Jurinić

#### SAŽETAK

Svrha ovoga rada bilo je ispitivanje utjecaja HP- $\beta$ -ciklodekstrina na svojstva pripremljenih nanočestica i uklapanje melatonina u njih. Pripravljene su ne-PEGilirane (mukoadhezivne) i PEGilirane (mukopenetrativne) nanočestice sintetskog kopolimera metil-vinil-etera i anhidrida maleinske kiseline (Gantrez<sup>TM</sup> AN-169) metodom nanoprecipitacije. Melatonin je uklopljen u nanočestice u obliku krutog liofiliziranog kompleksa s HP- $\beta$ -ciklodekstrinom, *in situ* pripremljene vodene otopine kompleksa te *in situ* stvorenog kompleksa pri formiranju nanočestica HP- $\beta$ -ciklodekstrinom modificiranog kopolimera. Dobivene su nanočestice podvrgnute procesu sušenja smrzavanjem kako bi im se povećala stabilnost, nakon čega su rekonstituirane i analizirane. Rezultati pokazuju da su dobivene nanočestice prikladne veličine za primjenu na sluznicu te da su stabilne i monodisperzne, a liofilizacijom dolazi do porasta veličine, smanjenja indeksa polidisperznosti te u slučaju mukoadhezivnih čestica smanjenja zeta potencijala. Uklapanje melatonina je relativno nisko te se pokazalo da ciklodekstrini, suprotno očekivanjima, smanjuju uklapanje melatonina u nanočestice. Ipak, sadržaj melatonina je dostatan za postizanje pozitivnih terapijskih učinaka u lokalnom liječenju bolesti parodonta.

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

Rad sadrži: 49 stranica, 18 grafičkih prikaza, 13 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanočestice, sluznica, mucini, melatonin, ciklodekstrini, polietilenglikol

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

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

**Dr. sc. Ivan Pepić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

Rad prihvaćen: svibanj 2018.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### MELATONIN LOADED CYCLODEXTRIN-POLY(ANHYDRIDE) NANOPARTICLES

**Hrvoje Jurinić**

#### SUMMARY

The aim of this work was to study the effect of HP- $\beta$ -cyclodextrin on physical and chemical properties of nanoparticles and encapsulation of melatonin. Using nanoprecipitation method non-PEGylated (mucoadhesive) and PEGylated (mucopenetrative) nanoparticles were formed from the copolymer of methyl vinyl ether and maleic anhydride (Gantrez™ AN-169). Different types of inclusion complexes were used to encapsulate melatonin such as a solid inclusion complex between melatonin and HP- $\beta$ -cyclodextrin, *in situ* prepared aqueous solution of the complex and complex formed *in situ* during the formation of nanoparticles from HP- $\beta$ -cyclodextrin-modified copolymer. In order to increase stability of nanoparticles, they were subjected to freeze-drying process. The resulting nanoparticles displayed an adequate size for mucosal drug delivery and were stable and monodisperse. Freeze-drying caused an increase in size, reduction of PDI and a reduction of zeta potential of mucoadhesive nanoparticles. Cyclodextrins caused a reduction of the encapsulation efficiency of melatonin into nanoparticles. In spite of relatively low contents of melatonin, it is still sufficient to obtain positive therapeutic effects for local treatment of periodontal diseases.

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

Thesis includes: 49 pages, 18 figures, 13 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanoparticles, mucus, mucins, melatonin, cyclodextrins, polyethylene glycol, drug loading

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

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

The thesis was accepted: May 2018.