

Biofarmaceutska karakterizacija karbopolskog gela za dermalnu primjenu melatonina

Fajtović, Asja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:668095>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Asja Fajtović

**Biofarmaceutska karakterizacija karbopolskog
gela za dermalnu primjenu melatonina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom više asistentice dr. sc. Laure Nižić Nodilo.

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj dragoj mentorici dr. sc. Lauri Nižić Nodilo na podršci, strpljenju, iznimnoj pristupačnosti te velikoj količini prenesenog znanja u svakom koraku izrade ovog diplomskog rada.

Prekratka je ova stranica i potrebno je previše riječi da bih iskazala zahvalnost svima koji su me nesebično podržavali kroz cijelo akademsko obrazovanje. Unatoč brojnim usponima i padovima, svoje studentske dane ću pamtiti po prekrasnim prijateljstvima koja su obogatila moj život.

Posebnu zahvalu upućujem svojoj obitelji i Swanu koji su s ljubavlju i strpljenjem prolazili kroz svaku moju fakultetsku dramu, a bilo ih je napretek.

„In omnia paratus“

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Melatonin u dermalnoj primjeni	2
1.2. Gelovi za dermalnu primjenu	4
1.2.1. Karbopol	6
1.2.2. Polietilenglikol u gelovima	6
1.3. Metode ispitivanja oslobađanja polučvrstih oblika <i>in vitro</i>	7
1.3.1. Franzova difuzijska ćelija	7
1.3.2. Imerzijska ćelija	8
1.3.3. Odabir medija za ispitivanje oslobađanja <i>in vitro</i>	9
1.4. Ispitivanje biokompatibilnosti na HaCaT staničnom modelu	10
1.4.1. MTT test.....	11
1.4.2. 3D modeli HaCaT staničnih linija	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Materijali	17
3.2. Metode.....	19
3.2.1. Izrada kalibracijskog pravca ovisnosti površine ispod krivulje o koncentraciji melatonina	19
3.2.2. Ispitivanje termodinamičke topljivosti melatonina u medijima za ispitivanje <i>in vitro</i> oslobađanja	20
3.2.3. Priprava gela	20
3.2.4. Određivanje pH.....	20
3.2.5. Ispitivanje oslobađanja lijeka <i>in vitro</i>	21
3.2.5.1. Kvantitativno određivanje sadržaja melatonina u uzetim uzorcima tijekom ispitivanja oslobađanja <i>in vitro</i>	23
3.2.6. Određivanje biokompatibilnosti <i>in vitro</i>	23
3.2.6.1. Protokol odmrzavanja stanica HaCaT	23
3.2.6.2. Uvjeti uzgoja stanica.....	24
3.2.6.3. MTT test.....	24
3.2.7. Statistička analiza	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Kalibracijski pravac ovisnosti površine ispod krivulje o koncentraciji melatonina ..	27
4.2. Gel s uklopljenim melatoninom i pH formulacije	28
4.3. Termodinamička topljivost melatonina	28

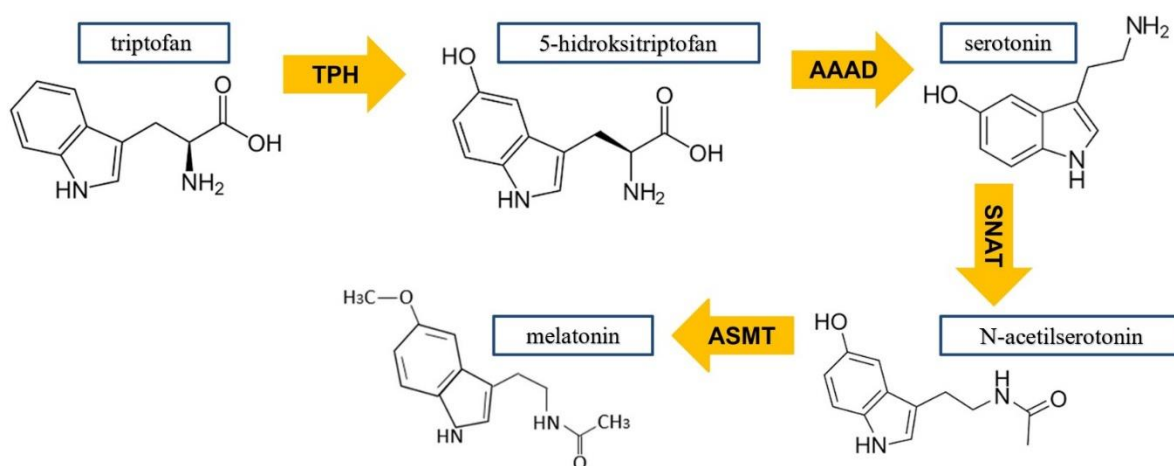
4.4. Profili oslobađanja <i>in vitro</i>	30
4.5. Biokompatibilnost formulacija <i>in vitro</i>	33
5. ZAKLJUČCI.....	36
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	38
7. LITERATURA	41
8. SAŽETAK / SUMMARY.....	52
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Melatonin u dermalnoj primjeni

Melatonin je neurohormon koji se prvenstveno sintetizira u epifizi, a ključan je u regulaciji cirkadijanog ritma (Ahmad i sur., 2023). Melatonin je snažan antioksidans zbog čega mu se pripisuju brojni pozitivni učinci u organizmu kao što su antiapoptotičko, citoprotektivno i imunomodulacijsko djelovanje (Carrillo-Vico i sur., 2005; Munoz-Jurado i sur., 2022). Osim u epifizi, melatonin se sintetizira i u drugim dijelovima tijela uključujući retinu, koštanu srž, spolne žlijezde, stanice gastrointestinalnog trakta te kožu. Uloga sintetiziranog melatonina u tim dijelovima tijela još nije potpuno poznata (Tordjman i sur., 2017).

Sinteza melatonina započinje aminokiselinom triptofanom koji djelovanjem nekoliko različitih enzima, preko serotonina prelazi u melatonin (Slika 1.). Cijeli proces je reguliran svjetlosnim podražajima (Amaral i Cipolla-Neto, 2018). Sinteza melatonina većinom se odvija tijekom razdoblja tame, što potiče san, a suprimirana je tijekom razdoblja svjetlosti, što potiče budnost. San je neophodan fiziološki proces čija poremećenost može izazvati mnoge zdravstvene probleme (Vasey i sur., 2021). Mogućnost oralne primjene melatonina dovela je do njegove česte upotrebe za pomoć kod nesanicе, otežanog usnivanja, poremećenog cirkadijanog ritma (primjerice kod slijepih osoba) ili nepravilnog ritma spavanja (primjerice kod osoba koje rade u noćnim smjenama) (Poza i sur., 2022).



Slika 1. Sintetski put melatonina. TPH - triptofan hidroksilaza (engl. *tryptophan hydroxylase*); AAAD - dekarboksilaza aromatskih aminokiselina (engl. *aromatic L-amino acid decarboxylase*); SNAT - serotonin N-acetiltransferaza (engl. *serotonin N-acetyltransferase*); ASMT - N-acetilserotonin O-metiltransferaza (engl. *N-acetyl-serotonin O-methyltransferase*) (preuzeto i prilagođeno prema Fernandez-Lazaro i sur., (2024) uz dopuštenje izdavača)

Sve se više istražuju i drugi potencijalni terapijski učinci i formulacije melatonina, uključujući dermalnu primjenu melatonina. Antioksidacijska svojstva melatonina pomažu u neutralizaciji slobodnih radikala, što može smanjiti štetu izazvanu ultraljubičastim (UV) zračenjem i drugim štetnim čimbenicima iz okoliša (Scheuer i sur., 2014). Trenutno dostupni proizvodi uključuju kreme, serume i drugo (Rusanova i sur., 2019; Greco i sur., 2024). Proizvodi su namijenjeni protiv starenja, za zaštitu kože od UV zračenja ili zacjeljivanje rana (Slominski i sur., 2018). Nova istraživanja fokusirana su na potencijal melatonina u liječenju upalnih bolesti kože poput psorijaze i atopijskog dermatitisa (Tohid i sur., 2016; Jaworek i sur., 2021).

Topikalna primjena melatonina omogućava izravnu dostavu na kožu, što kod nekih indikacija može rezultirati bržim i učinkovitijim rezultatima u usporedbi s oralnom primjenom. Također, melatonin ima lipofilnu molekulsku strukturu koja olakšava prodiranje u kožu, što ga čini dobrim kandidatom za dermalnu primjenu (Flo i sur., 2017). Međutim, formuliranje melatonina za dermalnu primjenu izazovno je zbog njegove niske topljivosti i nestabilnosti na svjetlu i zraku (Andrisano i sur., 2000). Iz tog razloga razvijaju se različite formulacije melatonina, od klasičnih krema i emulzija do inovativnih nanosustava s uklopljenim melatoninom. U Tablici 1. prikazane su neke od dermalnih formulacija melatonina koje su trenutno u fazi kliničkih istraživanja (Greco i sur., 2024).

Tablica 1. Pregled dermalnih formulacija melatonina u fazi kliničkih ispitivanja

Preparat	Indikacija	Učinak	Literatura
Emulzija koja sadrži melatonin u nepoznatoj koncentraciji	Akutni radijacijski dermatitis kod pacijenata s ranim rakom dojke	Smanjena je pojavnost dermatitisa nakon radijacije	Ben-David i sur., 2016
Nanostrukturirani lipidni nosači s 2,5 % (m/m) melatonina	Muška androgena alopecija	Smanjen je stupanj ćelavosti, gubitak kose i pojavnost žutih ljuskica na vlasištu, a povećana je debljina vlasi kose i gustoća kose	Hatem i sur., 2018a
Nanovezikule askorbilpalmitata s 10,6 % (m/m) melatonina			Hatem i sur., 2018b
Serum koji sadrži melatonin, bakuchiol i askorbiltetraizopalmitat	Klinički znakovi starenja kože	Smanjen je broj bora i crvenilo kože, a povećana čvrstoća kože	Goldberg i sur., 2019
Krema koja sadrži melatonin, karnozin i <i>Helichrysum italicum</i> ekstrakt s nepoznatom koncentracijom sastavnica	Klinički znakovi starenja i fotooštećenja kože	Povećana je hidratacija kože, a smanjen broj komedona, prosječan broj bora i grubost kože	Granger i sur., 2020
Krema koja sadrži melatonin (25 mg/g) i dimetilsulfoksid (150 mg/g)	Akutni radijacijski dermatitis kod pacijenata s ranim rakom dojke	Smanjena je pojavnost dermatitisa nakon radijacije	Zetner i sur., 2023

1.2. Gelovi za dermalnu primjenu

Dermalna primjena lijekova odnosi se na primjenu formulacija na kožu radi ciljanog liječenja kožnih poremećaja i postizanja farmakološkog učinka na površini ili unutar kože. Ove formulacije djeluju lokalno na mjestu primjene, omogućujući penetraciju lijeka u dublje slojeve kože ili sluznice. Transdermalna primjena lijeka podrazumijeva da lijek prodire kroz slojeve

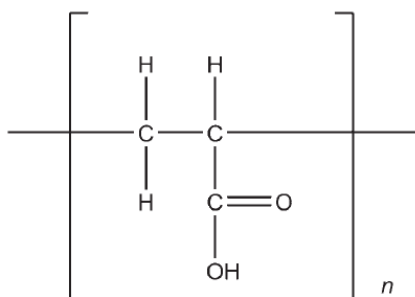
kože i sistemski se apsorbira kako bi postigao svoj terapijski učinak. Dermalna primjena podrazumijeva samo zadržavanje lijeka unutar slojeva kože, čime lijek minimalno ulazi u sistemsku cirkulaciju (Brown i sur., 2006). Prednosti dermalnih formulacija nad oralnim farmaceutskim oblicima u liječenju lokalnih oboljenja kože uključuju (u nekim slučajevima) bolju učinkovitost, smanjenu toksičnost, izbjegavanje gastrointestinalnih nuspojava i povećanu raspoloživost lijeka na mjestu primjene (Bisht i Badola, 2019). Također, pacijentima su jednostavni i praktični za primjenu (Patil i sur., 2019). Uz navedene prednosti, dermalni sustavi za dostavu lijeka imaju i neka ograničenja koja ovise o sastavu same formulacije. Postoji mogućnost izazivanja iritacije kože ili dermatitisa zbog prisutnosti lijeka ili pomoćne tvari te razvoja lokalne alergijske reakcije. Stoga ovaj način primjene nije prikladan za lijekove koji iritiraju ili senzibiliziraju kožu. Neki od lijekova karakterizirani su slabom permeacijom kroz kožu, a lijekovi velike molekulske mase loše se apsorbiraju (Patil i sur., 2019).

Gelovi su polučvrsti farmaceutski oblici koji se sastoje od jedne ili više gelirajućih tvari i gelirajućeg sredstva. Gelirajuća tvar u gelu najčešće je polimer koji umrežava disperzno sredstvo stvarajući trodimenzionalnu strukturu gela (Valenta i Auner, 2004; Patil i sur., 2019). Mogu se klasificirati s obzirom na izvor, polimerni sastav, vrstu umrežavanja, fizičko-kemijska svojstva te naboj trodimenzionalne mreže (Chelu i Musuc, 2023). Gelovi pokazuju dobra svojstva prijanjanja čime omogućuju dulje zadržavanje lijeka na mjestu primjene. Nadalje, zbog svoje strukture omogućuju i produljeno oslobađanje uklopljene djelatne tvari. Razvoj farmaceutskih oblika produljenog oslobađanja lijeka sprječava fluktuacije koncentracije lijeka na mjestu djelovanja te inter- i intraindividualne varijacije. Također, gel kao farmaceutski oblik produljenog oslobađanja omogućava smanjenje učestalosti primjene lijeka, što poboljšava suradljivost pacijenta (Omidian i Wilson, 2024). U farmaceutici se većinom koriste i istražuju hidrogelovi, odnosno gelovi kojima je, uz polimer(e), glavna sastavnica voda (Ho i sur., 2022). Neki od nedostataka gelova za dermalnu primjenu uključuju neprikladnost za uklapanje lijekova koji iritiraju kožu, relativno skuplja priprava u odnosu na konvencionalne farmaceutske oblike te sporije djelovanje. Također, veliki udio vode u gelovima može povećati rizik od mikrobne kontaminacije, a temperatura, vlažnost i drugi okolišni čimbenici mogu utjecati na fizičko-kemijska (prvenstveno reološka) svojstva gela (Patil i sur., 2019). S ciljem nadilaženja navedenih nedostataka, prilikom razvoja gela za dermalnu primjenu važan je pomni odabir prikladnih pomoćnih tvari s obzirom na svojstva i željeni učinak lijeka.

1.2.1. Karbopol

Pojam Carbopol (ili Carbomer) obuhvaća skupinu sintetskih polimera akrilne kiseline (Slika 2.) koji se razlikuju prema molekularnoj masi i vrsti polimerizacijskog otapala (Rowe i sur., 2009). S obzirom na njegovu široku zastupljenost u farmaceutskim proizvodima, ovaj rad usmjerit će se na Carbopol 940 (980; dalje u tekstu karbopol). Karbopol u značajnoj mjeri bubri u vodi. Povišenjem pH otopine formira se gel (Brady i sur., 2017). Široko je korišten kao gelirajuća tvar u polučvrstim farmaceutskim oblicima poput krema, gelova, losiona i masti za oftalmičku, rektalnu, topikalnu i vaginalnu primjenu (Rowe i sur., 2009). Svojstva karbopolskih vodenih otopina ovise o temperaturi, pH vrijednosti te stupnju umreženosti polimernih lanaca (Suhail i sur., 2020).

Karbopol u farmaceutskim oblicima služi za povećanje viskoznosti te za prilagodbu razmazivosti, organoleptičkih svojstava i stabilnosti polučvrstih farmaceutskih oblika. Veća viskoznost formulacije rezultira sporijim oslobađanjem djelatne tvari, što čini karbopol prikladnim za pripravu oblika s kontroliranim oslobađanjem. Zbog dobrog sigurnosnog profila naveliko je korišten u farmaciji. Najčešći raspon udjela karbopola u odobrenim gelovima je 0,5 – 2 % (Safitri i sur., 2020).

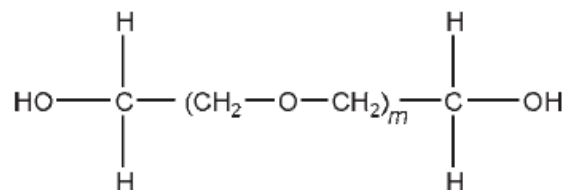


Slika 2. Strukturna formula monomerne jedinice akrilne kiseline koja gradi karbopol (preuzeto iz Rowe i sur., (2009) uz dopuštenje izdavača)

1.2.2. Polietilenglikol u gelovima

Polietilenglikol (PEG) je neionski polimer etilenoksida (Slika 3.) (Brady i sur., 2017). Često je korišten kao pomoćna tvar u farmaceutskim oblicima za različite putove primjene, uključujući oralni, parenteralni, oftalmički, rektalni i dermalni. Vodene otopine PEG-a koriste se kao sredstva za suspendiranje, za prilagodbu viskoznosti ili kao stabilizatori emulzije u kombinaciji s drugim emulgatorima (Rowe i sur., 2009). PEG se također može koristiti kao

solubilizator, odnosno za povećanje topljivosti lijekova slabo topljivih u vodi (Brady i sur., 2017).



Slika 3. Strukturna formula polietilenglikola (preuzeto iz Rowe i sur., (2009) uz dopuštenje izdavača)

PEG-ovi su stabilne pomoćne tvari koje ne iritiraju kožu. Ne prodiru u kožu, iako su topljivi u vodi, te se pranjem lako uklanjaju s kože (Rowe i sur., 2009). Zbog svoje biokompatibilnosti nalaze se u brojnim formulacijama, uključujući i oblike s kontroliranim oslobađanjem lijeka (Lin i Anseth, 2009).

1.3. Metode ispitivanja oslobađanja polučvrstih oblika *in vitro*

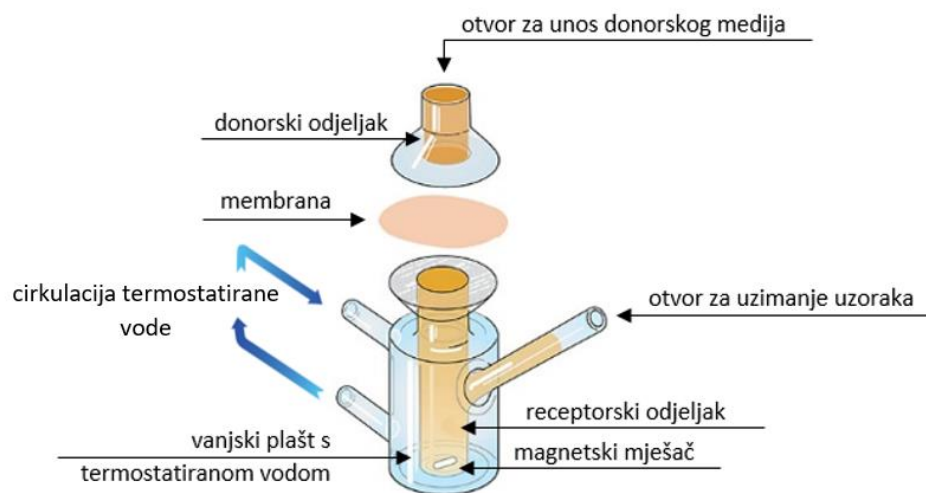
Bitna karakteristika farmaceutskog oblika je oslobađanje djelatne tvari iz nosača. Oslobađanje lijeka je proces u kojem molekule lijeka migriraju iz nosača u medij za oslobađanje gdje postaju raspoložive za apsorpciju/učinak. Oslobađanje lijeka ovisi o mnogim čimbenicima, kao što su fizičko-kemijska svojstva lijeka i medija za oslobađanje, zatim strukturne karakteristike nosača te kompatibilnost između svih sastavnica formulacije (Fu i Kao, 2010). Određivanje profila oslobađanja omogućuje dizajniranje sustava s kontroliranim oslobađanjem prema ciljnom mjestu dostave i željenom učinku lijeka (Bruschi, 2015).

U polučvrste farmaceutske oblike ubrajaju se kreme, gelovi, masti i paste (Buhse i sur., 2005). Ispitivanje oslobađanja lijeka *in vitro* bitno je provoditi radi određivanja mehanizma i kinetike oslobađanja lijeka, za predviđanje ponašanja lijeka *in vivo* te za osiguravanje reproducibilnosti proizvodnih serija (Gupta i Trivedi, 2018). Najčešće korištena metoda za ispitivanje oslobađanja polučvrstih oblika *in vitro* je metoda s Franzovom difuzijskom ćelijom. Nadalje, u primjeni je i metoda s imerzijskim ćelijama.

1.3.1. Franzova difuzijska ćelija

Franzova difuzijska ćelija sastoji se od dva odjeljka, donorskog i receptorskog, odvojenih polupropusnom membranom (Slika 4.). Ukupni volumen receptorskog odjeljka obično je između 5 i 15 ml. Promjer otvora donorskog i receptorskog odjeljka može varirati

ovisno o modelu difuzijske ćelije, no promjeri otvora oba odjeljka trebaju biti jednaki. Membrana se postavlja u vodoravnoj ravnini između donorskog i receptorskog odjeljka. Tijekom provođenja ispitivanja, u receptorskom odjeljku (ispod membrane) ne smiju biti prisutni mjehurići zraka. Kao unutarnji mehanizam za miješanje koristi se magnetski mješač. Uloga miješanja je osigurati dovoljnu cirkulaciju otopine kako bi sadržaj receptorskog odjeljka bio jednolik. Ekvivalentni volumen otopine receptorskog medija zamjenjuje se pri svakom uzorkovanju određenog volumena iz receptorskog odjeljka. Duljina trajanja ispitivanja, vremenski intervali i volumeni uzorkovanja variraju ovisno o ispitivanju koje se provodi (USP, 2023).



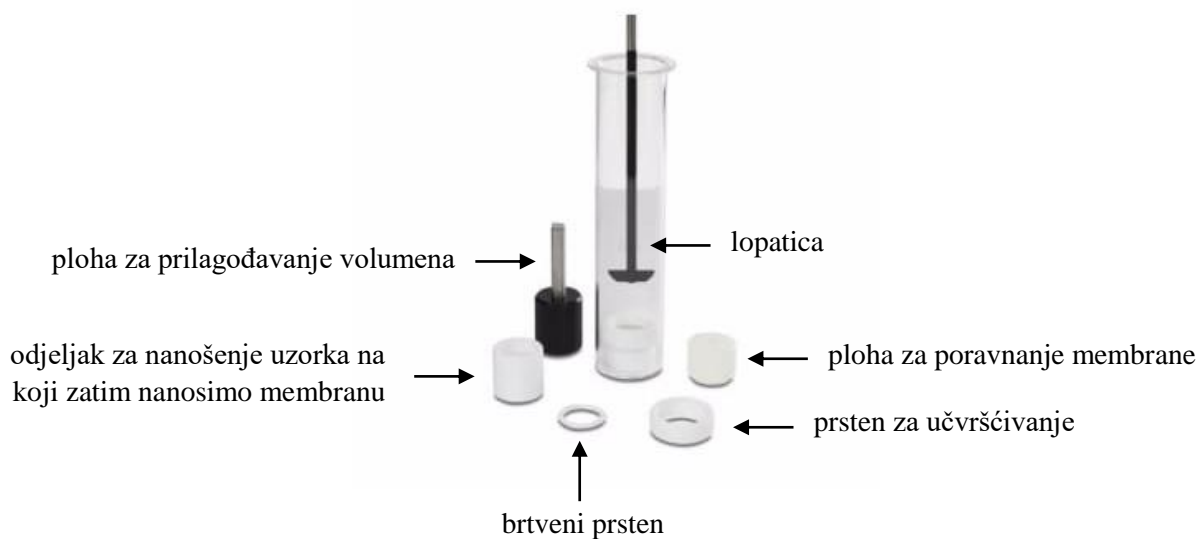
Slika 4. Shematski prikaz Franzove difuzijske ćelije (preuzeto i prilagođeno prema www.nawah-scientific.com)

1.3.2. Imerzijska ćelija

Imerzijska ćelija se koristi u kombinaciji s uređajem s lopaticom (Slika 5.) i postavlja se u posudu čiji je volumen obično između 50 ml i 200 ml. Ispitivani uzorak stavi se u imerzijsku ćeliju i odjeljuje od okoline polupropusnom membranom. Donorski odjeljci mogu zaprimiti od 300 mg do 4 g polučvrstog uzorka, a površina za dostavu doze za ispitivanje određena je promjerom otvora donorskog odjeljka. Dijelovi imerzijske ćelije su tijelo ćelije, ploha za podešavanje volumena, ploha za poravnanje membrane, odjeljak za nanošenje uzorka, membrana, brtveni prsten i prsten za učvršćivanje (Slika 5.). Membrana, koja je prethodno namočena receptorskim medijem, postavi se u vodoravnoj ravnini tako da je svojim gornjim dijelom okrenuta prema lopatici. Brtveni prsten i prsten za učvršćivanje pričvršćuju membranu za tijelo ćelije te osiguravaju njen potpuni kontakt s uzorkom. Membrana treba biti postavljena

ravno kako se ne bi naborala uslijed zatezanja prstena za učvršćivanje. Nakon nanošenja uzorka, ćelija se stavlja u cilindar napunjen receptorskim medijem. Rotacijom lopatice postiže se miješanje medija u receptorskom odjeljku i njegova homogenost (USP, 2023).

Imerzijske ćelije su izdržljive i jednostavne za upotrebu (Kulkarni i sur., 2021). Prednost metode s imerzijskom ćelijom je što ne zahtijeva puno pomoćnih instrumenata u odnosu na druge difuzijske ćelije, što čini metodu jeftinijom. Zbog mogućnosti korištenja većih raspona volumena receptorskog medija, lakše je postići uvjete osigurane topljivosti (Lusina Kregar i sur., 2015).



Slika 5. Dijelovi imerzijske ćelije (preuzeto i prilagođeno prema www.agilent.com)

Koristeći metodu s Franzovim difuzijskim ćelijama, lijek u receptorskom odjeljku manje se razrjeđuje, čime se smanjuju potencijalni analitički izazovi kvantifikacije lijeka. Stoga se metoda s Franzovim difuzijskim ćelijama preferira u odnosu na metodu s imerzijskim ćelijama kod ispitivanja oblika koji sadrže malu dozu lijeka te kod oblika kod kojih se oslobađa mala količina lijeka (USP, 2023).

1.3.3. Odabir medija za ispitivanje oslobađanja *in vitro*

Odabir medija za ispitivanje oslobađanja *in vitro* provodi se ovisno o svojstvima djelatne tvari čije oslobađanje je potrebno ispitati. Prije eksperimenta oslobađanja, nužno je odrediti topljivost lijeka u mediju kako bi se postigli uvjeti osigurane topljivosti i spriječilo eventualno taloženje lijeka. Prema Europskoj farmakopeji, uvjeti osigurane topljivosti vrijede ako je volumen medija u kojem se neka tvar otapa barem 3 puta veći od volumena potrebnog

za pripremu zasićene otopine. Receptorski medij prvog izbora za hidrofilne lijekove je fosfatni pufer, dok je prvi izbor za lipofilne lijekove mješavina fosfatnog pufera i alkohola (npr. etanola) (FDA, 1997). Kao receptorski mediji koriste se i razne vodene otopine soli koje simuliraju fiziološke uvjete na mjestu primjene, primjerice umjetni nosni ili suzni fluid. Takvim medijima mogu se dodati i površinski aktivne tvari s ciljem postizanja uvjeta osigurane topljivosti lijekova slabo topljivih u vodenom mediju (Jug i sur., 2017). Receptorski medij potrebno je primjereno homogenizirati, obično miješanjem konstantnom i dobro kontroliranom brzinom tijekom provođenja ispitivanja. Time se sprječava stvaranje koncentracijskog gradijenta prilikom ispitivanja. U obzir treba uzeti stabilnost djelatne tvari u mediju te stabilnost medija pri uvjetima provođenja ispitivanja, kao što su temperatura i izloženost svjetlu (Kim i sur., 2021; Kulkarni i sur., 2021). Vrijednost pH receptorskog medija uglavnom odgovara fiziološkom. Potrebno je održavati i prikladnu temperaturu tijekom cijelog eksperimenta. Ovisno o ciljanom putu primjene, temperatura receptorskog medija mora biti prilagođena fiziološkoj kako bi se osigurali uvjeti što sličniji onima *in vivo* (Bartosova i Bajgar, 2012).

1.4. Ispitivanje biokompatibilnosti na HaCaT staničnom modelu

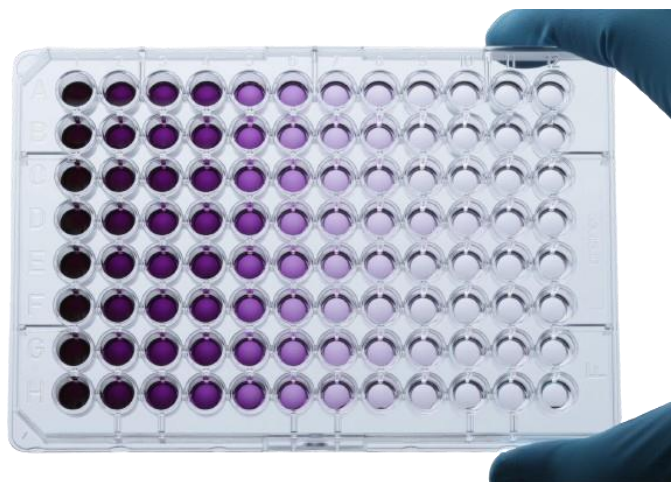
Ispitivanje biokompatibilnosti bitno je za predviđanje sigurnosti primjene dermalnih pripravaka. Biokompatibilnost predstavlja svojstvo tvari da ne izaziva štetne učinke prilikom kontakta s organizmom. Kod dermalnih pripravaka, formulacija ne smije izazvati iritaciju, upalu, alergijske reakcije ili bilo kakve druge neželjene učinke na koži. Ispitivanja biokompatibilnosti dijele se na testove citotoksičnosti, iritabilnosti i senzibilizacije (Kandarova i Pobiš, 2024). Rezultati ispitivanja biokompatibilnosti mogu u ranoj fazi razvoja formulacije predvidjeti štetne učinke koje bi formulacija mogla imati *in vivo* te tako smanjiti troškove razvoja formulacije i skratiti vrijeme trajanja istraživanja. Ipak, rezultati biokompatibilnosti formulacije *in vitro* ne mogu se tumačiti izravno kao *in vivo* podaci. Kako bi *in vitro* sustavi mogli točnije predvidjeti što će se dogoditi u životinjskim ili ljudskim modelima, moraju se razmotriti i drugi parametri, kao što su vezanje za proteine, metabolička stabilnost, metabolička aktivacija i prisutnost raznih metabolita (McKim, 2010).

Dostupni su mnogi modeli stanica i tkiva za ispitivanja biokompatibilnosti *in vitro*. To uključuje HaCaT, MDCK, Caco-2, V79, HUH7, HepG2, NRK-52E, 3T3, HEK293 i mnoge druge imortalizirane stanične linije. Kako bi bile prikladne za *in vitro* ispitivanja, stanične linije trebaju biti genski stabilne i davati reproducibilne rezultate. Osim toga, vrijeme potrebno za

dijeljenje stanica te optimalni uvjeti njihovog rasta trebaju biti dobro poznati (McKim, 2010). Stanična linija HaCaT je spontano nastala linija besmrtnih ljudskih keratinocita koja se razvila iz kulture keratinocita uz uvjete povišene temperature i niske koncentracije kalcija (Blanchard i sur., 2022). U imenu stanične linije HaCaT, Ha ukazuje na podrijetlo linije te označava da se radi o odraslim ljudskim stanicama (engl. *human adult*). Ostatak naziva ukazuje na uvjete nastanka stanične linije, gdje Ca označava kalcij (engl. *calcium*), a T temperaturu (engl. *temperature*) (Boukamp i sur., 1988). HaCaT stanična linija je prikladan model za proučavanje epidermalne homeostaze i patofiziologije. Prednost stanične linije je visoka sposobnost diferencijacije i proliferacije u *in vitro* uvjetima, uz dobro odražavanje svojstava ljudskih keratinocita (Blanchard i sur., 2022).

1.4.1. MTT test

Najčešće korišten test za određivanje biokompatibilnosti *in vitro* je test redukcije tetrazolijeve soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, MTT). MTT test je kolorimetrijska metoda koja se temelji na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija (Radojčić Redovniković i sur., 2016). Žive stanice sadrže NAD(P)H-ovisne oksidoreduktazne enzime koji topljivi žuti MTT reduciraju u ljubičasti formazan (Slika 6.). Netopljivi kristali formazana otapaju se u izopropilnom alkoholu te se kvantificira sadržaj formazana u otopini mjerenjem apsorbancije spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 570 nm ili 630 nm koristeći ploču s 96 jažica (USP, 2016). Očitana apsorbancija proporcionalna je broju živih stanica u uzorku, pri čemu se preživljenje stanica izražava kao omjer apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica. U primjeni su i brojni drugi testovi kao što su metoda bojanja s Kenacid plavom bojom, metoda bojenja tripanskim modrilom, metoda bojenja neutralnim crvenilom, bojanje bojom kristal-ljubičasto, test prisutnosti laktat dehidrogenaze, test proliferacije stanica i smanjenje razine adenozin trifosfata (ATP-a). Primjenom više različitih testova možemo pretpostaviti mogući mehanizam toksičnosti budući da se metode temelje na različitim načelima (Radojčić Redovniković i sur., 2016).



Slika 6. Ploča s 96 jažica nakon provođenja MTT testa (preuzeto i prilagođeno prema www.integra-biosciences.com)

MTT test se često koristi za određivanje stanične metaboličke aktivnosti, no potreban je oprez prilikom interpretacije rezultata budući da ima nekoliko ograničenja koja mogu utjecati na pouzdanost rezultata testa. Test je osjetljiv na različite uvjete provođenja ispitivanja kao što su gustoća stanica, koncentracija MTT reagensa, vrijeme inkubacije s reagensom te sastav medija za uzgoj stanica. Također, tijekom ispitivanja može se osloboditi razni unutarstanični sadržaj, kao što su lizati, što može utjecati na interpretaciju rezultata. Osim toga, nastali formazan može se izlučiti u izvanstanični prostor. MTT test je osjetljiv na biotičku i abiotičku redukciju koju mogu izazvati komponente medija ili uzorka koji se ispituje. Kako bi MTT test pružao što pouzdanije i primjenjivije rezultate, preporučuje se provesti dodatna ispitivanja kako bi se optimirali svi prethodno navedeni uvjeti provođenja testa. Iako taj proces može biti dugotrajan, vrlo je bitan za točniju interpretaciju rezultata ispitivanja (Ghasemi i sur., 2021.).

1.4.2. 3D modeli HaCaT staničnih linija

Budući da dvodimenzionalne (2D) stanične linije ne prikazuju vjerodostojno složenost ljudske kože, razvijaju se trodimenzionalni (3D) modeli koji bolje oponašaju strukturu i funkciju kože (Klicks i sur., 2017). Iako se jednoslojne 2D HaCaT stanične linije mogu koristiti za ispitivanje biokompatibilnosti, rezultati dobiveni korištenjem 3D modela HaCaT staničnih linija prikazuju rezultate sličnije onima koje možemo očekivati *in vivo* (Senkal i sur., 2022).

Sferoidi i mikrofluidni čipovi su neki od mogućih 3D modela HaCaT stanične linije. Sferoidi su jedan od najčešće korištenih 3D modela za istraživanje stanica. Uzgajanje HaCaT

stanica u obliku sferoida omogućuje bolje razumijevanje ponašanja stanica u trodimenzionalnom prostoru. Mikrofluidni čipovi omogućuju složeniju analizu diferencijacije HaCaT stanica te mogu dovesti do specifičnih reakcija poput slojevitog rasta stanica. Ovi modeli omogućuju bolje razumijevanje međustaničnih interakcija i odgovora na vanjske podražaje. Mogu se koristiti prilikom testiranja novih farmaceutskih oblika, ali i u istraživanjima patogeneze kožnih bolesti poput psorijaze i atopijskog dermatitisa (Klicks i sur., 2017).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Melatonin je neurohormon koji regulira cirkadijani ritam i sintetizira se u epifizi (Ahmad i sur., 2023). Osim uloge u regulaciji cirkadijanog ritma, pripisuje mu se antiapoptotičko, citoprotektivno i imunomodulacijsko djelovanje zbog čega se istražuje i za liječenje mnogih drugih stanja (Carrillo-Vico i sur., 2005; Munoz-Jurado i sur., 2022). Uz istraživanja novih indikacija, istražuju se i različiti putovi primjene melatonina. Sve je veći broj istraživanja dermalnih formulacija melatonina, s naglaskom na potencijal u liječenju upalnih bolesti kože kao što su atopijski dermatitis i psorijaza (Tohid i sur., 2016; Jaworek i sur., 2021). Lokalnom primjenom melatonina na kožu omogućeno je postizanje visoke koncentracije lijeka izravno na mjestu primjene te samim time učinkovitije liječenje (Flo i sur., 2017). Dermalna primjena omogućuje jednostavnu primjenu lijeka, ciljano djelovanje te izbjegavanje sistemskih nuspojava. Prilikom razvoja farmaceutskog oblika za dermalnu primjenu važan je pomni odabir prikladnih pomoćnih tvari s obzirom na svojstva i željeni učinak lijeka (Patil i sur., 2019).

Ispitivanje *in vitro* oslobađanja lijeka iz farmaceutskog oblika bitno je za određivanje kinetike oslobađanja lijeka. Određivanjem mehanizma i kinetike oslobađanja lijeka može se preciznije dizajnirati sustav s kontroliranim oslobađanjem lijeka i postići veća kontrola nad trajanjem i brzinom kojom se lijek oslobađa (Bruschi, 2015). Također, ispitivanje *in vitro* oslobađanja pomaže predvidjeti ponašanje lijeka *in vivo* i određuje daljnji tijek istraživanja (Gupta i Trivedi, 2018). Određivanje *in vitro* biokompatibilnosti može u ranoj fazi istraživanja ukazati na smjer daljnjeg razvoja formulacije.

Cilj ovog rada bio je pripremiti gel za dermalnu primjenu melatonina koristeći karbopol kao gelirajuću tvar i PEG kao solubilizator te odrediti biofarmaceutska svojstva gela.

Specifični ciljevi:

- Odrediti topljivost melatonina u mediju za ispitivanje oslobađanja *in vitro* različitih vrijednosti pH (5,5 i 7,4)
- Ispitati profil oslobađanja melatonina iz karbopolskog gela korištenjem Franzove difuzijske ćelije i fosfatnog pufera pH 5,5 i 7,4 kao receptorskog medija
- Usporediti profile oslobađanja melatonina iz karbopolskog gela u medijima različite vrijednosti pH
- Ispitati biokompatibilnost karbopolskog gela s melatoninom na HaCaT staničnom modelu

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Korištene su sljedeće kemijske tvari i biološki materijali:

- Melatonin (Biosynth, Slovačka)
- Carbopol 940 (karbopol; Kemig, Hrvatska)
- Polietilenglikol 3350 (PEG; Biosynth, Slovačka)
- Kalijev dihidrogenfosfat (Gram-Mol, Hrvatska)
- Dinatrijev hidrogenfosfat (Fluka Chemie AG, Švicarska)
- Natrijev klorid (Gram-Mol, Hrvatska)
- Acetonitril (Supelco, Njemačka)
- Stanična linija HaCaT (CLS Cell Line Services, Njemačka)
- Hanksova uravnotežena otopina soli (engl. *Hanks' balanced salt solution*, HBSS; pH 6,0) (Capricorn Scientific, Njemačka)
- Dupleccov modificirani Eaglov medij (engl. *Dublecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) (Sigma-Aldrich, Sjedinjene Američke Države)
- Fetalni goveđi serum (Biosera, Francuska)
- Otopina penicilina, streptomicina i amfotericina B (Lonza, Švicarska)
- Tripsin (Capricorn Scientific GmbH, Njemačka)
- Otopina etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA; Sigma Aldrich, Sjedinjene Američke Države)

Korišteni su sljedeći instrumenti i pribor:

- Ultrazvučna kupelj SONOREX Digital 10 P DK 156 BP (Bandelin, Njemačka)
- Poliamidne membrane veličine pora 0,45 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka)
- Pipeta za viskozne uzorke Multipette E3 (Eppendorf, Njemačka)
- Propipeta ViscoTip (Eppendorf, Njemačka)
- Automatizirani sustav Franzovih difuzijskih ćelija za ispitivanje oslobađanja *in vitro* Phoenix RDS (Teledyne Hanson, Sjedinjene Američke Države)
- pH metar S47 SevenMulti (Mettler-Toledo, Švicarska)
- Filter od regenerirane celuloze, promjer pora 0,2 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka)
- Polietersulfonski filter veličine pora 0,2 μm (Chromafil, Macherey-Nagel, Njemačka)

- Kromatograf 1260 Infinity II LC System (Agilent Technologies, Sjedinjene Američke Države) za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC)
- Kolona za HPLC Kinetex C18 (250 x 4,6 mm, veličina čestica 5,0 μm; Phenomenex, Sjedinjene Američke Države)
- Inkubator za uzgoj stanica (Sanyo CO₂, Japan)
- Invertni mikroskop Primovert (Carl Zeiss AG, Njemačka)
- Centrifuga (Eppendorf, Njemačka)
- Čitač mikrotitarskih pločica Victor3 (PerkinElmer, Sjedinjene Američke Države)

3.2. Metode

3.2.1. Izrada kalibracijskog pravca ovisnosti površine ispod krivulje o koncentraciji melatonina

Koristeći radnu otopinu melatonina koncentracije 150 µg/ml, izrađena su dva koncentracijska niza standardnih otopina prema Tablici 2. Dva niza standardnih otopina razlikovala su se samo u korištenom puferu (pH 5,5 ili 7,4). Svaki uzorak izrađen je u duplikatu.

Sadržaj melatonina u standardnim otopinama analiziran je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Uzorci su pripremljeni za analizu filtracijom kroz polietersulfonski filter veličine pora 0,2 µm direktno u vijale. HPLC analiza sadržaja melatonina provedena je na kromatografskom sustavu za analizu 1260 Infinity II LC System. Kromatografsko odvajanje provedeno je na Kinetex C18 koloni (250 × 4,6 mm, veličina čestica 5 µm, Phenomenex, Sjedinjene Američke Države). Mobilna faza sastojala se od acetonitrila i pročišćene vode u omjeru 48:52 (V/V). Prije analize, mobilna faza je profiltrirana kroz filter veličine pora 0,2 µm pomoću uređaja za ultrafiltraciju pri uvjetima sniženog tlaka. Analiza je provedena pri protoku mobilne faze od 1 ml/min, volumen injektiranja iznosio je 10 µl, a vrijeme analize 5 min. Radna temperatura kolone tijekom analize bila je 30 °C. Melatonin je detektiran pri valnoj duljini od 220 nm, pri vremenu zadržavanja od 2,7 min.

Nakon provedene analize, napravljeni su kalibracijski pravci ovisnosti površine ispod krivulja (engl. *area under curve*, AUC) o koncentracijama melatonina u ispitivanim standardnim otopinama.

Tablica 2. Sastav pripremljenih otopina melatonina za izradu koncentracijskog niza

Broj standarda	c (µg/ml)	V _{radna otopina} (ml)	V _{pufer} (ml)
1	20	0,67	4,33
2	30	1,00	4,00
3	50	1,67	3,33
4	75	2,50	2,50
5	100	3,33	1,67
6	125	4,17	0,83
7	150	5,00	0,00

3.2.2. Ispitivanje termodinamičke topljivosti melatonina u medijima za ispitivanje *in vitro* oslobađanja

Kao mediji za ispitivanje termodinamičke topljivosti melatonina, pripremljeni su fosfatni pufer pH 5,5 i fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffer saline*, PBS, pH 7,4). Otopina fosfatnog pufera pH vrijednosti 5,5 pripremljena je otapanjem kalijevog dihidrogenfosfata i dinatrijevog hidrogenfosfata u pročišćenoj vodi. Za pripremu PBS-a pH vrijednosti 7,4 korišten je, uz sve navedeno za prethodnu otopinu, natrijev klorid.

Uzorci dva medija su pripremljeni u triplicatu te je u uzorke dodan melatonin u suvišku. Zatim je 6 pripremljenih uzorka postavljeno na magnetsku miješalicu tijekom 24 sata. Nakon 24 sata, uzorci su centrifugirani pri 300 g tijekom 5 minuta kako bi se odvojio supernatant iz kojeg se, nakon filtracije, određuje koncentracija otopljenog melatonina HPLC metodom opisanom u odjeljku 3.2.1. Pomoću jednadžbe kalibracijskog pravca izračunata je topljivost melatonina.

3.2.3. Priprava gela

Za pripravu karbopolskog gela, koncentrirane otopine karbopola 940 i PEG-a 3350 su pomiješane s pročišćenom vodom u odgovarajućem omjeru kako bi se postigle konačne koncentracije karbopola (0,1 %, *m/m*) i PEG-a (5 %, *m/m*). Tako pripremljenom gelu dodan je melatonin pri koncentraciji od 0,1 % (*m/m*, formulacija dalje označena kao CPM).

3.2.4. Određivanje pH

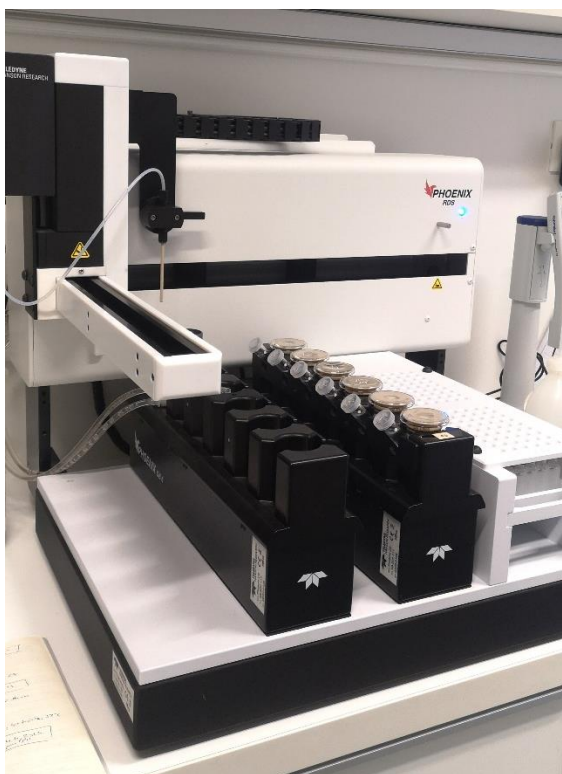
Vrijednost pH pripremljenog gela određena je korištenjem pH metra S47 SevenMulti (Slika 7.) s elektrodom za polučvrste pripravke. Prije mjerenja, pH metar je kalibriran pri 25 °C korištenjem standardnih puferkih otopina (pH 4,01, pH 7,0 i pH 9,21). Ciljana pH vrijednost gela postignuta je dodatkom trietanolamina (50 %, *V/V*) koji je dodavan mikropipetom u malim obrocima. Nakon svakog dodatka trietanolamina, gel je dobro izmiješan i izmjerena je njegova pH vrijednost sve do postizanja ciljne vrijednosti. Tri uzastopna mjerenja su provedena pri temperaturi od 25 °C.



Slika 7. pH metar S47 SevenMulti (Mettler-Toledo, Švicarska)

3.2.5. Ispitivanje oslobađanja lijeka *in vitro*

Ispitano je oslobađanje melatonina *in vitro* iz CPM formulacije korištenjem automatiziranog sustava za ispitivanje oslobađanja *in vitro* s Franzovim difuzijskim ćelijama (Phoenix RDS; Slika 8.), s fosfatnim puferom pH 5,5 i PBS-om pH 7,4 kao medijima za oslobađanje. Uređaj za *in vitro* ispitivanje oslobađanja sadrži Peltierov termoblok u kojem se nalazi šest Franzovih difuzijskih ćelija s nominalnim volumenom receptorskog odjeljka od 15 ml. Uzorak je nanesen na poliamidnu membranu veličine pora 0,45 μm pomoću pipete za viskozne uzorke Multipette E3 s propipetom ViscoTip (Slika 9.). Membrana s uzorkom umetnuta je između donorskog i receptorskog odjeljka. Donorski odjeljak je tijekom provođenja ispitivanja bio zaštićen staklenim poklopcem kako bi se spriječilo isparavanje. Ispitivanje je trajalo 24 sata tijekom kojih su prikupljeni uzorci u 10 vremenskih točki. Otopina PEG-a i melatonina pri jednakim koncentracijama kao i u CPM-u korištena je kao kontrola. Oslobađanje lijeka iz svih ispitanih uzoraka provedeno je u triplikatu. Provedena su dva zasebna ispitivanja *in vitro* oslobađanja melatonina iz CPM formulacije – pri pH 5,5 te pri pH 7,4.



Slika 8. Automatizirani sustav za ispitivanje oslobađanja *in vitro* s Franzovim difuzijskim ćelijama Phoenix RDS (Teledyne Hanson, Sjedinjene Američke Države)



Slika 9. Pipeta za viskozne uzorke Multipette E3 (Eppendorf, Njemačka)

3.2.5.1. Kvantitativno određivanje sadržaja melatonina u uzetim uzorcima tijekom ispitivanja oslobađanja *in vitro*

Uzorci uzeti prilikom ispitivanja oslobađanja melatonina *in vitro* analizirani su na sadržaj lijeka metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Sadržaj lijeka u donorskom odjeljku na kraju ispitivanja također je kvantitativno određen. Uzorci su profiltrirani te je sadržaj melatonina određen HPLC metodom opisanom u odjeljku 3.2.1.

3.2.6. Određivanje biokompatibilnosti *in vitro*

3.2.6.1. Protokol odmrzavanja stanica HaCaT

Postupak uzgoja i tretiranja stanica izvodio se u aseptičkim uvjetima, korištena je sterilna aparatura te se postupak provodio unutar uređaja s laminarnim strujanjem zraka (engl. *laminar flow hood*). U ispitivanju su korištene stanice stanične linije humanih keratinocita HaCaT. HaCaT stanična linija kultivirana je koristeći DMEM medij uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (10 %, *m/m*). Kako bi se spriječila bakterijska kontaminacija uzorka, u medij je dodana otopina penicilina, streptomicina i amfotericina B (1 %, *m/m*).

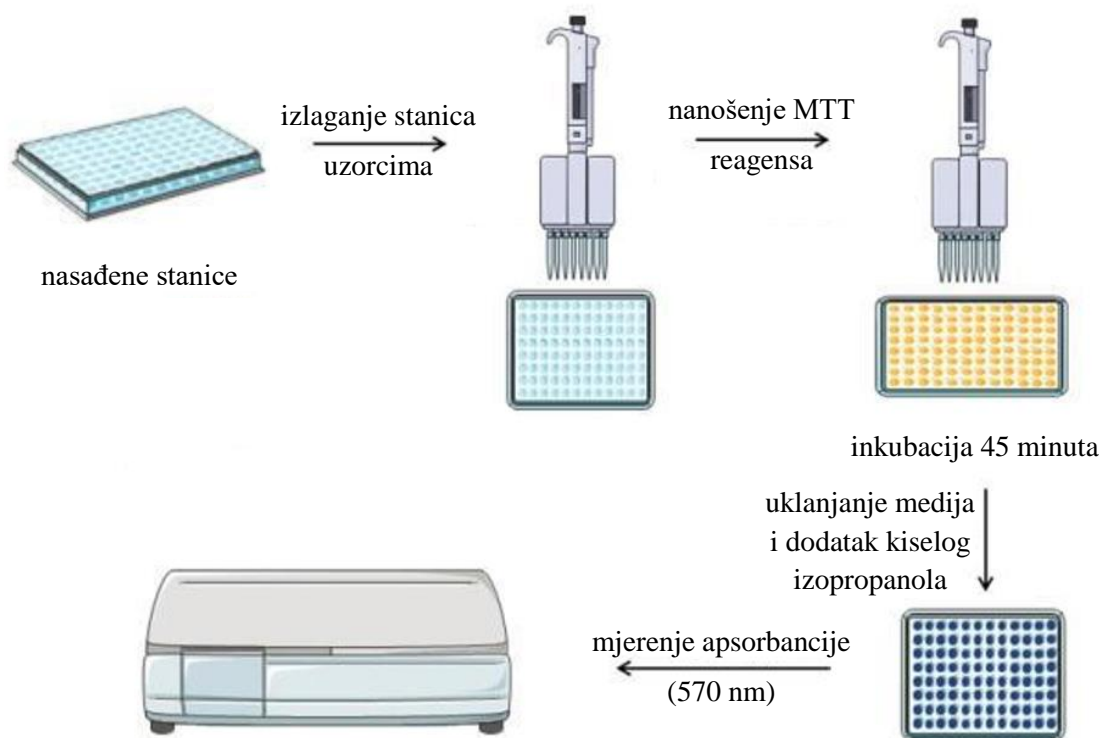
Smrznute stanice uzete su iz spremnika s tekućim dušikom. Radna površina i kabinet s laminarnim strujanjem zraka sterilizirani su UV lampom. Ampula sa smrznutim stanicama je uronjena do pola u čašu s vodom temperature 37 °C te je zatim lagano tresena dok se suspenzija stanica nije odmrznula (1 – 2 minute). Nakon potpunog uklanjanja leda, vanjska strana ampule je prebrisana 70 %-tnim etanolom te je unesena u uređaj s laminarnim strujanjem zraka. Ampula je otvorena u sterilnim uvjetima, a njen sadržaj je pažljivo pipetiran i prenesen u kompletni medij u omjeru 1:9. Suspenzija stanica centrifugirana je pri 800 g tijekom 3 min kako bi se uklonio krioprotektant dimetilsulfoksid (DMSO). Tikvice za uzgoj stanica (25 cm²) su pripremljene u laminaru, a njihove površine su prije ulaska u laminar obrisane 70 %-tnim etanolom. Nakon centrifugiranja, supernatant je odstranjen. Pelet stanica resuspendiran je u svježem kompletnom mediju. Stanice su potom prebačene u tikvicu u koju je dodana odgovarajuća količina medija. Tikvica je zatim pohranjena u inkubator pri 37 °C, 5 % CO₂ i 95 % relativne vlažnosti. Nakon jednodnevne inkubacije, promatranjem pod invertnim mikroskopom procijenjena je adhezija stanica za podlogu.

3.2.6.2. Uvjeti uzgoja stanica

Svakih 48 sati, stanicama je mijenjan medij. Promatranjem pod invertnim mikroskopom, utvrđen je trenutak postizanja 70 – 80 % konfluentnosti te su stanice tada presađivane. Prilikom presađivanja, medij s mrtvim stanicama je uklonjen, a stanice su isprane sterilnim PBS-om. Zatim su stanice tretirane otopinom EDTA te inkubirane tijekom 2 minute nakon čega je otopina EDTA uklonjena. Stanice su tripsinizirane otopinom tripsina i EDTA-e i inkubirane 5 – 10 minuta kako bi proteolitički enzim tripsin pokidao veze proteina koji sudjeluju u adheziji stanica na podlogu, što za posljedicu ima odvajanje stanica od podloge. Odvajanje stanica je praćeno promatranjem pod invertnim mikroskopom. Stanice se prilikom odvajanja od podloge zaokružuju. Kada se pod mikroskopom uočilo zaokruživanje stanica, tikvica je lagano protresena kako bi se gotovo sve stanice odvojile od podloge. Nakon odvajanja stanica od podloge, tripsinizacija je inhibirana dodatkom medija korištenog za uzgoj stanica. Suspenzija stanica je centrifugirana pri 800 g i 25 °C tijekom 3 minute. Nakon centrifugiranja, supernatant iznad peleta je uklonjen, a pelet stanica je resuspendiran u svježem mediju. Dio suspenzije stanica prenesen je u novu tikvicu.

3.2.6.3. MTT test

Za određivanje vijabilnosti stanica proveden je MTT kolorimetrijski test prema shemi prikazanoj na Slici 10. HaCaT stanice su nasađene na ploču sa 96 jažica u gustoći od 10^4 stanica/jažici i inkubirane 24 sata. Stanice su brojane pomoću hemocitometra. Prije nanošenja formulacija na stanice, iz svake jažice je uklonjen stanični medij te su stanice isprane sterilnim HBSS-om. Stanice su zatim izložene formulacijama. Nakon dvosatne inkubacije, formulacije su odsisane, stanice su isprane HBSS-om i inkubirane s po 100 μ l svježeg medija. Nakon 24 sata, dodano je 20 μ l MTT reagensa (2,5 mg/ml, konačna koncentracija u jažici \approx 0,5 mg/ml) u svaku jažicu i stanice su inkubirane 45 minuta. Ostatak postupka rađen je izvan aseptičkih uvjeta. Medij s MTT reagensom je odsisan, a u svaku jažicu je dodano po 100 μ l kiselog izopropanola (4 % (V/V) 1 M HCl-a u izopropanolu). Ploče su pokrivene aluminijskom folijom i stavljene na tresilicu dok se kristali formazana nisu otopili (oko 15 minuta) te je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 570 nm. Mjerenje se provelo pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Victor3, PerkinElmer, Sjedinjene Američke Države; Slika 11.). Metabolička aktivnost stanica izražena je u odnosu na negativnu kontrolu (jažice inkubirane samo u HBSS puferu). Sva mjerenja provedena su u triplicatu.



Slika 10. Shematski prikaz kolorimetrijskog MTT testa (preuzeto i prilagođeno prema www.praxilabs.com)



Slika 11. Čitač mikrotitrskih pločica Victor3 (PerkinElmer, Sjedinjene Američke Države)

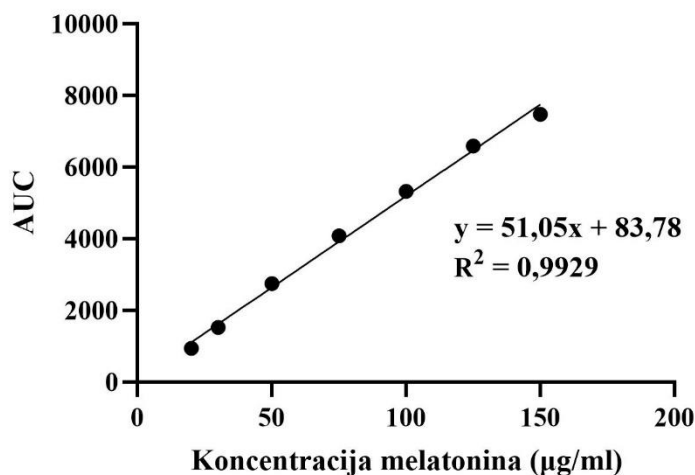
3.2.7. Statistička analiza

Faktor sličnosti f_2 (engl. *similarity factor*) primijenjen je za usporedbu *in vitro* oslobađanja melatonina iz uzoraka (Costa i Lobo, 2001). Ukoliko je f_2 faktor bio veći od 50, profili oslobađanja lijeka smatrani su sličnima (Shah i sur., 1998).

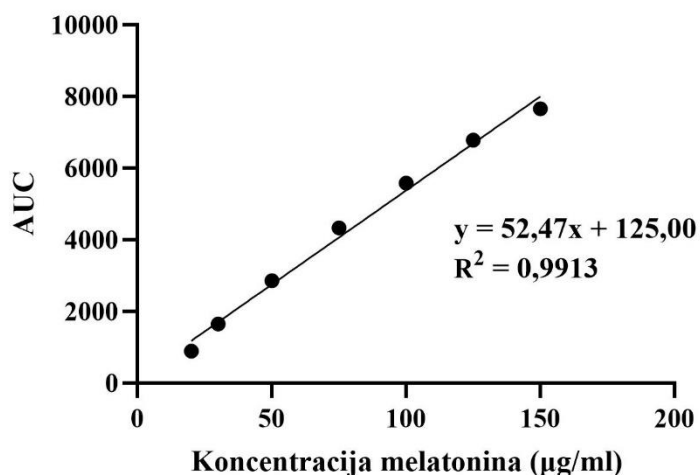
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Kalibracijski pravac ovisnosti površine ispod krivulje o koncentraciji melatonina

U svrhu kvantifikacije melatonina u eksperimentima, izrađeni su koncentracijski nizovi koristeći standardnu otopinu melatonina poznate koncentracije. Na temelju koncentracijskih nizova i očitanih AUC vrijednosti, konstruirani su kalibracijski pravci ovisnosti površine ispod krivulja o koncentraciji melatonina u ispitivanom otapalu (Slika 12., Slika 13.)



Slika 12. Kalibracijski pravac ovisnosti površine ispod krivulje (AUC) o koncentraciji melatonina. Medij za otapanje melatonina bila je fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS; pH 7,4). Vrijednosti prikazane na grafu su srednje vrijednosti, $n = 2$.



Slika 13. Kalibracijski pravac ovisnosti površine ispod krivulje (AUC) o koncentraciji melatonina. Medij za otapanje melatonina bio je fosfatni pufer (pH 5,5). Vrijednosti prikazane na grafu su srednje vrijednosti, $n = 2$.

4.2. Gel s uklopljenim melatoninom i pH formulacije

U pripravi gela s uklopljenim melatoninom, korišten je karbopol kao polimer za formiranje gela (gelirajuća tvar), PEG kao solubilizator te trietanolamin za prilagodbu pH uzorka. Relativno jednostavan sastav pomoćnih tvari pokazao se prikladnim za uklapanje melatonina (Lee i sur., 1997). Neke od prednost jednostavnijih formulacija su manja mogućnost postojanja inkompatibilnosti među sastavnicama te, posljedično, manji potencijal izazivanja iritacija i bolja podnošljivost. Uz to, proces proizvodnje jednostavnije formulacije je jeftiniji (Shelley, 2022). Vrijednost pH navedenog gela prilagođena je dodatkom trietanolamina i iznosila je 5,5, što je uobičajeno za formulacije za dermalnu primjenu (Lukić i sur., 2021).

PEG omogućuje otapanje melatonina koji je slabo topljiv u vodi te tako djeluje kao solubilizator i osigurava ravnomjernu raspodjelu melatonina unutar gela. Također, PEG poboljšava penetraciju melatonina kroz epidermu što povećava raspoloživost, a samim time i učinkovitost melatonina (Rowe i sur., 2009). Karbopol pomaže održati strukturu gela stabilnom, poboljšava zadržavanje lijeka u formulaciji te omogućava postizanje kontroliranog i produljenog oslobađanja lijeka. Pseudoplastična svojstva gela omogućuju jednostavniju primjenu na kožu (Budhori i sur., 2023).

Iako na pH kože može utjecati mnogo egzogenih i endogenih čimbenika, smatra se da je uobičajen pH raspon zdrave kože između 5,4 i 5,9 (mjereno na podlaktici). Među čimbenike koji utječu na promjenu pH kože ubraja se i psorijaza (Schmid-Wendtner i Korting, 2006). Kod ozlijeđene kože, pH vrijednost prelazi u alkalno područje u rasponu između 7,15 i 8,9 (Gethin, 2007). Iz navedenih razloga, za provedena ispitivanja su pripremljeni mediji za oslobađanje dviju različitih pH vrijednosti. Medij pH vrijednosti 5,5 temelji se na pH zdrave kože, dok formulacija pH vrijednosti 7,4 predstavlja uvjete oštećene kože.

4.3. Termodinamička topljivost melatonina

Termodinamička topljivost je maksimalna količina tvari koja se u određenom volumenu medija može otopiti, pri određenoj temperaturi i tlaku (Bhattachar i sur., 2006). Vrijednosti termodinamičke topljivosti ovisne su o mnogim faktorima kao što su medij ili radni uvjeti provođenja ispitivanja (Veseli i sur., 2019). Ispitana je termodinamička topljivost melatonina u fosfatnom puferu pH 5,5 i fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffer saline*, PBS, pH 7,4).

Kako bi se odredila topljivost melatonina, lijek je u suvišku dodan u otapalo te je tako pripremljen uzorak stavljen na miješanje tijekom 24 sata. Tekućina iznad taloga je profiltrirana, a u filtratu je pomoću HPLC analize određena koncentracija otopljenog melatonina. Uzorci su naknadno razrijeđeni 10 puta zbog uočene prevelike površine ispod krivulje (AUC) nakon provedbe HPLC analize. Pomoću jednadžbe kalibracijskih pravaca i dobivenih AUC vrijednosti prilikom HPLC analize, izračunata je koncentracija melatonina u razrijeđenim uzorcima (Tablica 3., Tablica 4.).

Tablica 3. Podaci za izračun topljivosti melatonina u PBS-u (pH 7,4)

Broj uzorka	AUC	Izračunata koncentracija melatonina (µg/ml)
1	7049,59	136,44
2	7301,76	141,38
3	6480,72	125,30
/	Srednja vrijednost, $n = 3$	
/	6944,02	134,37

AUC: površina ispod krivulje

Tablica 4. Podaci za izračun topljivosti melatonina u fosfatnom puferu (pH 5,5)

Broj uzorka	AUC	Izračunata koncentracija melatonina (µg/ml)
1	8647,65	162,43
2	9613,21	180,83
3	7364,44	137,98
/	Srednja vrijednost, $n = 3$	
/	8541,77	160,41

AUC: površina ispod krivulje

Dobivene vrijednosti topljivosti melatonina moraju se pomnožiti brojem 10 zbog prethodno opisanog razrjeđenja uzorka. U konačnici, topljivost melatonina u fiziološkoj otopini puferiranom fosfatnim puferom (pH 7,4) iznosi $1,34 \pm 0,08$ mg/ml, a u fosfatnom puferu (pH 5,5) iznosi $1,60 \pm 0,22$ mg/ml. Mayet-Cruz i sur., (2021) odredili su topljivost melatonina u vodi te fosfatnim puferima različitih pH vrijednosti. Topljivost u svim ispitanim medijima iznosila je oko 2,5 mg/ml te nije ovisila o pH vrijednosti medija (Mayet-Cruz i sur., 2021). Nižić i sur., (2020) ispitali su topljivost melatonina u umjetnom nosnom fluidu, odnosno vodenoj otopini natrijevog, kalijevog i kalcijevog klorida te su dobili vrijednost od 0,7 mg/ml (Nižić i sur., 2020). Rezultati topljivosti dobiveni u ovom radu uklapaju se u raspon topljivosti melatonina u vodenim medijima prijavljen u literaturi.

4.4. Profili oslobađanja *in vitro*

Odabrani mediji za ispitivanje *in vitro* oslobađanja melatonina bili su fosfatni pufer pH 5,5 i fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffer saline*, PBS, pH 7,4). Fosfatni pufer je prikladan za ovakvo istraživanje jer omogućava održavanje konstantnog pH tijekom provođenja ispitivanja. Takva stabilnost osigurava veću pouzdanost rezultata ispitivanja. Osim održavanja stabilne pH vrijednosti, fosfatni pufer se često koristi u biomedicinskim istraživanjima zbog svoje biokompatibilnosti (Pavani i sur., 2021). PBS može približno oponašati fiziološke uvjete (Sreenivasan i sur., 2024). Navedene pH vrijednosti odabrane su kako bi se simulirali uvjeti zdrave i oštećene kože.

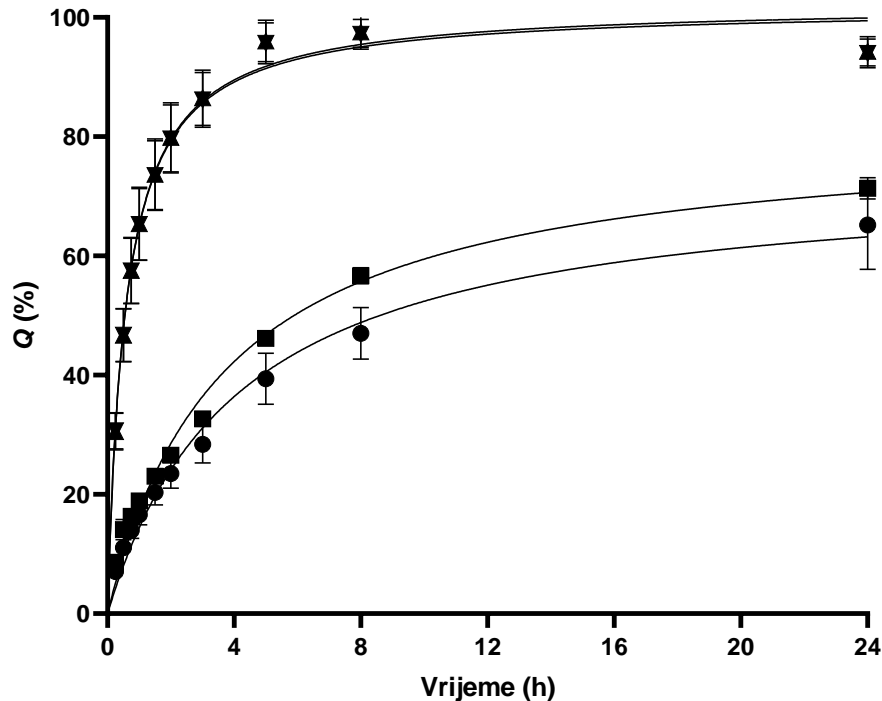
Ispitano je oslobađanje melatonina iz CPM-a korištenjem automatiziranog sustava za ispitivanje oslobađanja *in vitro* s Franzovim difuzijskim ćelijama. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja melatonina iz CPM gela provedeno je pri uvjetima osigurane topljivosti. Profil oslobađanja melatonina iz gela uspoređen je s *in vitro* profilom oslobađanja melatonina iz otopine PEG-a i melatonina pri jednakim koncentracijama kao i u CPM-u (kontrola).

U usporedbi s kontrolom, CPM formulacija je pokazala produljeno oslobađanja lijeka (Slika 14.). Pri pH 7,4 se iz uzorka s kontrolom nakon 5 sati oslobodilo 95,6 % melatonina, dok je iz CPM formulacije pri istoj pH vrijednosti zabilježeno sporije oslobađanje, te je u istom vremenu oslobođeno 46,2 % melatonina. Uz promatranje grafičkog prikaza profila oslobađanja različitih formulacija (Slika 14.), profile je moguće usporediti i izračunom faktora sličnosti f_2 . Faktor f_2 treba biti veći od 50 kako bi se profili oslobađanja lijeka smatrali sličnima (Shah i sur., 1998). Uočeno je nešto brže oslobađanje melatonina iz CPM-a pri pH 7,4 u usporedbi s medijem pH vrijednosti 5,5. Nakon 5 sati, iz CPM formulacije pri pH 7,4 oslobođeno je 46,2 % melatonina, dok se iz CPM formulacije pri pH 5,5 nakon istog vremena oslobodilo 39,4 % melatonina. Vrijednost pH s kojom je gel u kontaktu može utjecati na reološka svojstva gela (Islam i sur., 2004). Reološka karakterizacija formulacije daje informaciju o utjecaju različitih pH vrijednosti na bitna reološka svojstva gela, primjerice viskoznost (Varma i sur., 2004). Provedena statistička analiza rezultirala je faktorom sličnosti između ta dva mjerenja od 52,86, stoga se profili oslobađanja melatonina iz CPM-a pri različitim pH vrijednostima medija smatraju sličnima. Profili oslobađanja kontrolnog uzorka su pri obje vrijednosti pH pokazale gotovo identičan profil, što potvrđuje i faktor sličnosti f_2 koji za ta dva profila oslobađanja iznosi 99,19. Faktori sličnosti preostalih profila oslobađanja nisu pokazali

vrijednosti veće od 50, stoga te formulacije nisu smatrane sličnima. Faktor sličnosti f_2 izračunat je prema sljedećoj jednačbi:

$$f_2 = 50 \times \log\{[1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \times 100\} \quad (1)$$

pri čemu je n broj točaka vremena (u ovom slučaju iznosi 10), a R_t i T_t su vrijednosti udjela oslobođenog lijeka referentnog i testnog profila u vremenu t .



Slika 14. *In vitro* profili oslobađanja melatonina iz CPM gela u mediju pH vrijednosti 5,5 (krug) i 7,4 (kvadrat), u usporedbi s difuzijom lijeka iz otopine melatonina i PEG-a u mediju pH vrijednosti 5,5 (trokut) i 7,4 (obrnuti trokut). Q (%) označuje kumulativni postotni udio oslobođenog lijeka u promatranom vremenu (tijekom 24 sata). Vrijednosti prikazane na grafu su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, $n = 3$.

Određena je kinetika oslobađanja melatonina iz formulacija usporedbom pet različitih kinetika oslobađanja (Friuli i sur., 2022; Gouda i sur., 2017). Za svaki model određen je koeficijent determinacije (R^2), te je prema njemu zaključeno koji model najbolje opisuje oslobađanje lijeka (Udovičić i sur., 2007). Što je R^2 bliži 1, model je prikladniji za opis oslobađanja lijeka (Chicco i sur., 2021). Za izračun su korištene sljedeće jednačbe:

Kinetika nultog reda:
$$c_0 - c_t = k_{c0} \times t \quad (2)$$

Kinetika prvog reda:
$$\log c_t = \log c_0 - k_c/2,303 \quad (3)$$

Higuchijev model:
$$Q = k_H \times t^{1/2} \quad (4)$$

Korsmeyer-Peppasov model:
$$\log Q = \log k_{KP} + n \log t \quad (5)$$

Hixson-Crowellov model:
$$m_0^{1/3} - m_t^{1/3} = k_{HC} \times t \quad (6)$$

pri čemu c_0 označava koncentraciju oslobođenog lijeka u vremenu $t = 0$, c_t koncentraciju oslobođenog lijeka u vremenu t , Q kumulativnu količinu oslobođenog lijeka, n faktor koji pokazuje mehanizam oslobađanja, m_0 masu čestica u vremenu $t = 0$, m_t masu čestica u vremenu t , a k_c , k_H , k_{KP} i k_{HC} konstante oslobađanja lijeka.

Iz podataka o koeficijentu determinacije (Tablica 5.) može se zaključiti da oslobađanje melatonina iz CPM formulacije u oba medija najbolje opisuje Korsmeyer-Peppasov model, što je u skladu s literaturom koja opisuje oslobađanje djelatne tvari iz karbopolskih gelova (Suhail i sur., 2020). Korsmeyer-Peppasov model je složeniji model kinetike oslobađanja lijeka jer uzima u obzir difuziju lijeka i eroziju nosača (Budhori i sur., 2023). Vrijednost n određuje mehanizam oslobađanja lijeka. Pritom, $n \leq 0,5$ ukazuje na Fickov mehanizam difuzije, dok vrijednost $n > 0,5$ ukazuje na ne-Fickov mehanizam difuzije ili anomalnu difuziju. Vrijednost n za CPM formulaciju pH 5,5 iznosi 0,4249, a za CPM formulacija pH 7,4 iznosi 0,4063, što upućuje na Fickov mehanizam difuzije (Suhail i sur., 2020). To znači da je brzina oslobađanja melatonina određena bubrenjem polimernog matriksa i brzinom difuzije lijeka kroz taj matriks (Schliecker i sur., 2004). Ovaj bi se model trebao koristiti samo za opisivanje ponašanja za prvih 60 % oslobođenog lijeka (Ahmed i sur., 2019). Dobiveni rezultati uspoređeni su s dostupnom literaturom u kojoj je opisano *in vitro* oslobađanje diklofenaka iz karbopolskog gela za dermalnu primjenu (udio karbopola 0,75 %, m/m i pH 6,0). Nakon 6 sati, $56,8 \pm 4,6$ % diklofenaka je oslobođeno iz ispitivanog gela (Hamed i sur., 2016), što se poklapa s rezultatima dobivenima u ovom radu.

Tablica 5. Jednadžbe koje opisuju kinetike oslobađanje melatonina iz CPM formulacija te analiza prikladnosti kinetike nultog reda, kinetike prvog reda, Higuchijevog modela, Korsmejer-Peppasovog modela i Hixson-Crowellovog modela koristeći faktor determinacije (R^2).

Kinetika	Jednadžbe koje opisuju oslobađanje	R^2
CPM formulacija s medijem pH vrijednosti 5,5		
Nulti red	$y = -0,0244x + 0,8543$	0,7936
Prvi red	$y = -0,018x - 0,0644$	0,9028
Higuchijev model	$y = 0,139x + 0,0277$	0,9705
Korsmejer-Peppasov model	$y = 0,4964x - 0,7972$	0,9847
Hixson-Crowellov model	$y = 0,0115x + 0,0496$	0,8695
CPM formulacija s medijem pH vrijednosti 7,4		
Nulti red	$y = -0,0267x + 0,8258$	0,7505
Prvi red	$y = -0,0216x - 0,0793$	0,8759
Higuchijev model	$y = 0,1545x + 0,0413$	0,9479
Korsmejer-peppasov model	$y = 0,4785x - 0,7247$	0,9795
Hixson-Crowellov model	$y = 0,0133x + 0,0605$	0,8369

4.5. Biokompatibilnost formulacija *in vitro*

Karbopol je vrlo česta sastavnica farmaceutskih proizvoda za lokalnu primjenu i njegova primjena smatra se sigurnom. Prema podacima iz *Priručnika o farmaceutskim pomoćnim tvarima*, nisu pronađeni dokazi o reakcijama preosjetljivosti u ljudi nakon lokalne primjene karbopola (Rowe i sur., 2009). Karbopol nije toksičan i nije iritans što ga čini prikladnom pomoćnom tvari za razvoj gelova za primjenu na kožu (Safitri i sur., 2020). Klinički podaci za procjenu iritacije kože i potencijala preosjetljivosti karbopola uključuju studije provedene na ljudima u kojima su testirane koncentracije do 1,0 % (*m/m*) karbopola. U

tim studijama, pokazan je niski potencijal karbopola za iritaciju kože i preosjetljivost (Church i Nichols, 2017).

PEG 3350 se često koristi u farmaceutskim proizvodima za lokalnu primjenu (Jang i sur., 2015). Takva upotreba se smatra sigurnom jer sistemska apsorpcija nije očekivana (Fruijtier, 2005). Ipak, lokalna primjena pripravaka koji sadrže PEG nije preporučena pacijentima sa zatajenjem bubrega, opsežnim opeklinama ili otvorenim ranama. PEG 3350 je prikladan izbor pomoćne tvari za ispitivanu gel formulaciju iz razloga što nije toksičan i nije iritans (Rowe i sur., 2009).

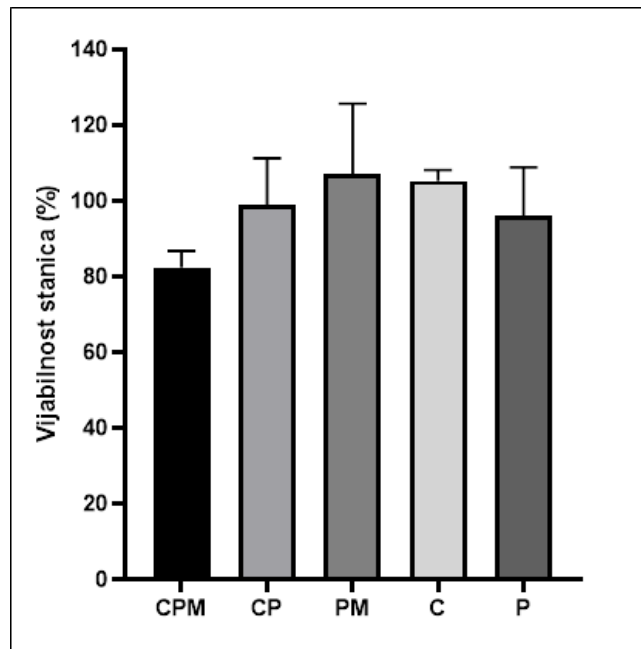
Za određivanje vijabilnosti stanica proveden je MTT kolorimetrijski test (Slika 10.). Metabolička aktivnost stanica izražena je u odnosu na negativnu kontrolu (jažice inkubirane samo u HBSS puferu). Vijabilnost je računata prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{Vijabilnost (\%)} = \frac{A_{570F}}{A_{570K}} \times 100 \quad (7)$$

pri čemu je A_{570F} izmjerena apsorbanacija formulacije, a A_{570K} izmjerena apsorbanacija kontrole.

Prema ISO standardu (10993-5, 2009), ako je izmjerena vijabilnost ispod 70 % u odnosu na negativnu kontrolu, ispitivana formulacija ima potencijal za citotoksičnost. Temeljem dobivenih rezultata MTT testa u ovom radu (Slika 15.), može se zaključiti da ispitivana formulacija CPM nema citotoksični potencijal.

Soriano i sur., (2020) ispitali su citotoksičnost nanogela s melatoninom (1 %, *m/m*) na HaCaT staničnom modelu. Nanogel je sastavljen od poloksamera 407, kitozana i hijaluronske kiseline. Određena vijabilnost stanica iznosila je gotovo 100 % (Soriano i sur., 2020). Ipak, zbog ograničenja *in vitro* modela, tako dobiveni podaci ne mogu izravno predvidjeti situaciju *in vivo*. Kako bi se točnije predvidjelo ponašanje formulacije *in vivo*, može se upotrijebiti *in vitro-in vivo* koleracija (engl. *in vitro-in vivo correlation*, IVIVC). IVIVC je prediktivni matematički model koji opisuje vezu između *in vitro* i *in vivo* odgovora, no u dostupnim smjernicama još nisu definirani standardizirani IVIVC modeli za dermalne formulacije (Rath i Kanfer, 2023).



Slika 15. Vijabilnost HaCaT stanica tretiranih CPM gelom i odgovarajućim kontrolnim otopinama: karbopol i PEG (CP), PEG i melatonin (PM), karbopol (C) te PEG (P) u HBSS puferu. Omjer ispitnog uzorka i HBSS pufera u svim uzorcima iznosio je 1:5. Vijabilnost stanica ispitivana je MTT testom te je izražena u postotku u odnosu na vijabilnost stanica tretiranih samo HBSS puferom. Prikazana je srednja vrijednost \pm standardna devijacija, $n = 3$.

5. ZAKLJUČCI

- Dobivena je linearna ovisnost površine ispod krivulje o koncentraciji melatonina u ispitivanim otapalima (u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (pH 7,4) te u fosfatnom puferu pH vrijednosti 5,5).
- Gel karbopola (0,1 %, *m/m*) i PEG-a (5 %, *m/m*) s uklopljenim melatoninom pripremljen je iz koncentrirane otopine karbopola 940 i PEG-a 3350 miješanjem u pročišćenoj vodi te uz dodatak melatonina pri koncentraciji od 0,1 % (*m/m*, formulacija CPM). Vrijednost pH formulacije prilagođena je do 5,5 pomoću trietanolamina.
- Ispitivanjem termodinamičke topljivosti melatonina utvrđeno je da topljivost melatonina u fiziološkoj otopini puferiranom fosfatnim puferom (pH 7,4) iznosi $1,34 \pm 0,08$ mg/ml, a u fosfatnom puferu (pH 5,5) $1,60 \pm 0,22$ mg/ml.
- Iz formulacije CPM oslobođeno je 46,2 % i 39,4 % lijeka pri pH medija redom 7,4 i 5,5, dok je tijekom istog vremena iz kontrolne otopine (otopina PEG-a i melatonina jednakih koncentracija kao i u formulaciji CPM) difundiralo gotovo 100 % lijeka u oba ispitana medija. Izračunati faktori sličnosti između profila oslobađanja melatonina iz CPM-a i odgovarajuće kontrole iznosili su 16,37 i 1,07 redom za medije pH 5,5 i 7,4, potvrđujući postizanje produljenog oslobađanja melatonina iz formulacije CPM.
- Zabilježeno je nešto brže oslobađanje melatonina iz CPM-a pri pH 7,4 u usporedbi s medijem pH vrijednosti 5,5, no ispitivanjem faktora sličnosti pokazano je da razlika nije statistički značajna ($f_2 = 52,86$).
- Sličnima su se pokazali profili oslobađanja melatonina iz kontrolne otopine pri objema pH vrijednostima ($f_2 = 99,19$).
- Usporedbom koeficijenta determinacije (R^2) za pet mogućih kinetika oslobađanja (kinetika nultog reda, kinetika prvog reda, Higuchijev model, Hixson-Crowellov model i Korsmeyer-Peppasov model), određeno je da oslobađanje melatonina iz CPM-a u oba ispitana medija najbolje opisuje Korsmeyer-Peppasov model.
- Izračunata vrijednost n ukazuje na difundiranje melatonina Fickovim mehanizmom iz formulacije CPM.
- Formulacija CPM te odgovarajući kontrolni uzorci bili su biokompatibilni s HaCaT stanicama *in vitro*. Vijabilnost stanica određena MTT kolorimetrijskim testom nakon izlaganja formulaciji CPM i odgovarajućim kontrolnim uzorcima bila je u rasponu od $82,5 \pm 4,3$ % do $107,2 \pm 18,5$ %.
- Biofarmaceutska karakterizacija provedena u ovom radu ukazuje na potencijal formulacije CPM kao farmaceutskog oblika za dermalnu primjenu melatonina.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

°C	Celzijev stupanj
CPM	karbopolski gel s melatoninom uz polietilenglikol kao solubilizator
AUC	površina ispod krivulje (engl. <i>area under curve</i>)
<i>c</i>	koncentracija
DMEM	Dulbeccov modificirani Eaglov medij (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
<i>f₂</i>	faktor sličnosti (engl. <i>similarity factor</i>)
h	sat
HaCaT	stanična linija humanih keratinocita
HBSS	Hankova uravnotežena otopina soli (engl. <i>Hank's balanced salt solution</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
L	litra
<i>m</i>	masa
m	metar
M	molarnost
min	minuta
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (engl. <i>phosphate buffer saline</i> , pH 7,4)
PEG	polietilenglikol
pH	vrijednost pH, negativni logaritam množinske koncentracije vodikovih iona u otopini

R^2	koeficijent determinacije
rcf	relativna centrifugalna sila (engl. <i>relative centrifugal force</i>)
t	vrijeme
UV	ultraljubičasto zračenje (engl. <i>ultraviolet radiation</i>)
V	volumen

7. LITERATURA

Ahmad SB, Ali A, Bilal M, Rashid SM, Wani AB, Bhat RR, Rehman MU. Melatonin and Health: Insights of Melatonin Action, Biological Functions, and Associated Disorders. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(6), 2437-2458.

Ahmed L, Atif R, Eldeen T, Yahya I, Omara A, Eltayeb M. Study the Using of Nanoparticles as Drug Delivery System Based on Mathematical Models for Controlled Release. *IJLTEMAS*, 2019, 8(5). 52-56.

Amaral FGD, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab*, 2018, 62(4), 472-479.

Andrisano V, Bertucci C, Battaglia A, Cavrini V. Photostability of drugs: photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, 23(1), 15-23.

Bartosova L, Bajgar J. Transdermal drug delivery *in vitro* using diffusion cells. *Curr Med Chem*, 2012, 19(27), 4671-4677.

Ben-David MA, Elkayam R, Gelernter I, Pfeffer RM. Melatonin for Prevention of Breast Radiation Dermatitis: A Phase II, Prospective, Double-Blind Randomized Trial. *Isr Med Assoc J*, 2016, 18(3-4), 188-192.

Bhattachar SN, Deschenes LA, Wesley JA. Solubility: it's not just for physical chemists. *Drug Discovery Today*, 2006, 11, 1012-1018.

Bisht P, Badola A. Gel as a topical drug delivery system: a review. *JETIR*, 2019, 6, 4, 321-330.

Blanchard G, Pich C, Hohl D. HaCaT cells as a model system to study primary cilia in keratinocytes. *Exp Dermatol*, 2022, 31(8), 1276-1280.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 1988, 106(3), 761-771.

Brady J, Durig T, Lee PI, Li JX. Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition). U: Chapter 7 - Polymer Properties and Characterization. Qiu Y, Chen Y, Zhang GGZ, Yu L, Mantri RV, urednici, Academic Press, 2017, 181-223.

Brown MB, Martin GP, Jones SA, Akomeah FK. Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. *Drug Delivery*, 2006, 13(3), 175–187.

Bruschi ML. Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems. U: Mathematical models of drug release. Bruschi ML, urednici, Woodhead Publishing, 2015, 63-86.

Budhori A, Tiwari A, Tiwari V, Sharma A, Kumar M, Gautam G, Virmani T, Kumar G, Alhalmi A, Noman OM, Hasson S, Mothana RA. QbD Design, Formulation, Optimization and Evaluation of Trans-Tympanic Reverse Gelatination Gel of Norfloxacin: Investigating Gene-Gene Interactions to Enhance Therapeutic Efficacy. *Gels*, 2023, 9, 657.

Buhse L, Kolinski R, Westenberger B, Wokovich A, Spencer J, Chen CW, Turujman S, Gautam-Basak M, Kang GJ, Kibbe A, Heintzelman B, Wolfgang E. Topical drug classification. *Int J Pharm*, 2005, 295(1-2), 101-112.

Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, 2005, 27(2), 189-200.

Chelu M, Musuc AM. Polymer Gels: Classification and Recent Developments in Biomedical Applications. *Gels*, 2023, 9(2), 161.

Chicco D, Warrens MJ, Jurman G. The coefficient of determination R-squared is more informative than SMAPE, MAE, MAPE, MSE and RMSE in regression analysis evaluation. *PeerJ Comput Sci*, 2021, 7, 623.

Church DJ i Nichols A. 2017. WIPO Patent WO/2017/212422

Costa P, Lobo MS. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*, 2001, 13(2), 123-133.

Development and Validation of *In Vitro* Release Testing for Semisolid Formulations, <https://particlesciences.com>, pristupljeno 7.7.2024.

Discover XTT Assay Virtual Lab Simulation from PraxiLabs, 2023., <https://praxilabs.com>, pristupljeno 22.8.2024.

Dissolution Enhancer Cells, <https://www.agilent.com>, pristupljeno 22.8.2024.

Fernandez-Lazaro D, Celorrio San Miguel AM, Roche E. The role of melatonin as an adjuvant therapeutic strategy in the modulation of carcinogenesis. A narrative review. *J Cancer Metastasis Treat*, 2024, 10, 15.

Flo A, Cambras T, Diez-Noguera A, Calpena A. Melatonin pharmacokinetics after transdermal administration changes according to the time of the day. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 96, 164-170.

Food and Drug Administration [FDA] Guidance for Industry, 1997., FDA-1997-D-0380 - SUPAC-SS: Nonsterile Semisolid Dosage Forms; Scale-Up and Post-Approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls; *In Vitro* Release Testing and *In Vivo* Bioequivalence Documentation, <https://www.fda.gov>, pristupljeno 18.8.2024.

Friuli V, Pisani S, Conti B, Bruni G, Maggi L. Tablet Formulations of Polymeric Electrospun Fibers for the Controlled Release of Drugs with pH-Dependent Solubility. *Polymers*, 2022, 14, 21-27.

Fruijtjer C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology*, 2005, 214. 1-38.

Fu Y, Kao WJ. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opin Drug Delivery*, 2010, 7(4), 429-444.

Gethin G. The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds*, 2007, 3(3), 52-56.

Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23), 12827.

Goldberg DJ, Robinson DM, Granger C. Clinical evidence of the efficacy and safety of a new 3-in-1 anti-aging topical night serum-in-oil containing melatonin, bakuchiol, and ascorbyl tetraisopalmitate: 103 females treated from 28 to 84 days. *J Cosmet Dermatol*, 2019, 18, 806-814.

Gouda R, Baishya H, Qing Z. Application of mathematical models in drug release kinetics of carbidopa and levodopa ER tablets. *J Dev Drugs*, 2017, 6(02), 1-8.

Granger C, Brown A, Aladren S, Narda M. Night Cream Containing Melatonin, Carnosine and Helichrysum italicum Extract Helps Reduce Skin Reactivity and Signs of Photodamage: Ex Vivo and Clinical Studies. *Dermatol Ther (Heidelb)*, 2020, 10, 1315–1329.

Greco G, Di Lorenzo R, Ricci L, Di Serio T, Vardaro E, Laneri S. Clinical Studies Using Topical Melatonin. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(10), 51-67.

Gupta V, Trivedi P. Lipid Nanocarriers for Drug Targeting U: Chapter 15 - *In vitro* and *in vivo* characterization of pharmaceutical topical nanocarriers containing anticancer drugs for skin cancer treatment. Grumezescu AM, urednici, William Andrew Publishing, 2018, 563-627.

Hamed R, Al Baraghtli T, Alkilani AZ, Abu-Huwaij R. Correlation Between Rheological Properties and *In Vitro* Drug Release from Penetration Enhancer-Loaded Carbopol Gels. *J Pharm Innov*, 2016, 11, 339-351 (2016).

Hatem S, Nasr M, Moftah NH, Ragai MH, Geneidi AS, Elkheshen SA. Clinical cosmeceutical repurposing of melatonin in androgenic alopecia using nanostructured lipid

carriers prepared with antioxidant oils. *Expert Opin Drug Delivery*, 2018a, 15(10), 927-935.

Hatem S, Nasr M, Moftah NH, Ragai MH, Geneidi AS, Elkheshen SA. Melatonin vitamin C-based nanovesicles for treatment of androgenic alopecia: Design, characterization and clinical appraisal. *Eur J Pharm Sci*, 2018b, 122, 246-253.

Ho TC, Chang CC, Chan HP, Chung TW, Shu CW, Chuang KP, Duh TH, Yang MH, Tyan YC. Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules*, 2022, 27(9), 2902.

Islam MT, Rodriguez-Hornedo N, Ciotti S, Ackermann C. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. *Pharm Res*, 2004, 21(7), 1192-1199.

International Organization for Standardization [ISO], 2000., ISO/IEC 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity, <https://www.iso.org>, pristupljeno 23.6.2024.

Jang HJ, Shin CY, Kim KB. Safety Evaluation of Polyethylene Glycol (PEG) Compounds for Cosmetic Use. *Toxicol Res*, 2015, (2), 105-136.

Jaworek AK, Szepietowski JC, Hałubiec P, Wojas-Pelc A, Jaworek J. Melatonin as an Antioxidant and Immunomodulator in Atopic Dermatitis-A New Look on an Old Story: A Review. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(8), 1179.

Jug M, Hafner A, Lovrić J, Lusina Kregar M, Pepić I, Vanić Željka, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. *In vitro* dissolution/release methods for mucosal delivery systems. *ADMET & DMPK*, 2017, 5(3), 173-82.

Kandarova H, Pobiš P. The „Big Three“ in biocompatibility testing of medical devices: implementation of alternatives to animal experimentation-are we there yet? *Front Toxicol*, 2024, 5,1337468.

Kim Y, Park EJ, Kim TW, Na DH. Recent Progress in Drug Release Testing Methods of Biopolymeric Particulate System. *Pharmaceutics*, 2021, 13(8), 1313.

Klicks J, Molitor E, Fauth T, Rudolf R, Hafner M. *In vitro* skin three-dimensional models and their applications. *Journal of Cellular Biotechnology*, 2017, 3, 21-39.

Kulkarni M, Potdar S, Date AA, Marfatiya A. *In Vitro* Release Testing of Acyclovir Topical Formulations Using Immersion Cells. *Assay Drug Dev Technol*, 2021, 19(2), 75-84.

Lee BJ, Choi HG, Kim CK, Parrott KA, Ayres JW, Sack RL. Solubility and stability of melatonin in propylene glycol and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin vehicles. *Arch Pharm Res*, 1997, 20(6), 560-565.

Lin CC, Anseth KS. PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine. *Pharm Res*, 2009, 26, 631-643.

Lukić M, Pantelić I, Savić SD. Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products. *Cosmetics*, 2021, 8(3), 69.

Lusina Kregar M, Durrigl M, Rožman A, Jelčić Ž, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Development and validation of an *in vitro* release method for topical particulate delivery systems. *Int J Pharm*, 2015, 485(1-2), 202-214.

Mayet-Cruz L, Rodriguez JM, Jung-Cook H. Development of a dissolution test for melatonin sublingual tablets using a factorial experimental design. *Farmacia*, 2021, 69(1), 169-173.

McKim JM Jr. Building a tiered approach to *in vitro* predictive toxicity screening: a focus on assays with *in vivo* relevance. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2010, 13(2), 188-206.

MTT assay for cell proliferation, viability and cytotoxicity with the ASSIST PLUS pipetting robot, 2021., <https://www.integra-biosciences.com>, pristupljeno 22.8.2024.

Munoz-Jurado A, Escribano BM, Caballero-Villarraso J, Galvan A, Aguera E, Santamaría A, Tunez I. Melatonin and multiple sclerosis: antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulator mechanism of action. *Inflammopharmacology*, 2022, 30(5), 1569-1596.

Nižić L, Potas J, Winnicka K, Szekalska M, Erak I, Gretić M, Jug M, Hafner A. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 141, 105-115.

Omidian H, Wilson RL. Long-Acting Gel Formulations: Advancing Drug Delivery across Diverse Therapeutic Areas. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(4), 493.

Patil PB, Datir SK, Saudagar RB. A Review on Topical Gels as Drug Delivery System. *J Drug Delivery Ther*, 2019, 9(3), 989-994.

Pavani P, Kumar K, Rani A, Venkatesu P, Lee MJ. The influence of sodium phosphate buffer on the stability of various proteins: Insights into protein-buffer interactions. *J Mol Liq*, 2021, 331, 115753.

Poza JJ, Pujol M, Ortega-Albas JJ, Romero O. Insomnia Study Group of the Spanish Sleep Society (SES). Melatonin in sleep disorders. *Neurologia (Engl Ed)*, 2022, 37(7), 575-585.

Radojčić Redovniković I, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V. Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 2016, 11 (3-4), 169-175.

Rath S, Kanfer I. *In Vitro-In Vivo* Correlations (IVIVC) for Predicting the Clinical Performance of Metronidazole Topical Creams Intended for Local Action. *Pharmaceutics*, 2023, 15(1), 268.

Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London, Pharmaceutical Press, 2009, str. 110-115.

Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London, Pharmaceutical Press, 2009, str. 517-522.

Rusanova I, Martinez-Ruiz L, Florido J, Rodriguez-Santana C, Guerra-Librero A, Acuna-Castroviejo D, Escames G. Protective Effects of Melatonin on the Skin: Future Perspectives. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19), 4948.

Safitri F, Nawangsari D, Febrina D. Overview: Application of Carbopol 940 in Gel. International Conference on Health and Medical Sciences, Yogyakarta, 2020, 80-84.

Scheuer C, Pommergaard HC, Rosenberg J, Gogenur I. Melatonin's UVR protective effect. *Photodermatol photoimmunol photomed*, 2014, 30, 180-188.

Schliecker G, Schmidt C, Fuchs S, Ehinger A, Sandow J, Kissel T. *In vitro* and *in vivo* correlation of busserelin release from biodegradable implants using statistical moment analysis. *J Controlled Release*, 2004, 94 (1), 25-37.

Schmid-Wendtner MH, Korting HC. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol Physiol*, 2006, 19(6), 296-302.

Senkal S, Burukcu D, Hayal T, Kiratli B, Sisli H, Sagrac D, Asutay B, Sumer E, Sahin F, Dogan A. 3D culture of HaCaT keratinocyte cell line as an *in vitro* toxicity model. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 2022, 23(2), 211-220.

Shah VP, Tsong Y, Sathe P, Liu JP. *In vitro* dissolution profile comparison – statistics and analysis of the similarity factor, f_2 . *Pharm Res*, 1998, 15(6), 889-896.

Shelley S. Topical Formulations in Pharma-Balancing Form and Function. *Pharm Technol*, 2022, 46(5), 28-31.

Skin Permeation Test (Franz Cell Technique), <https://nawah-scientific.com>, pristupljeno 22.8.2024.

Slominski AT, Hardeland R, Zmijewski MA, Slominski RM, Reiter RJ, Paus R. Melatonin: A Cutaneous Perspective on its Production, Metabolism, and Functions. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(3), 490-499.

Soriano JL, Calpena AC, Rincon M, Perez N, Halbaut L, Rodriguez-Lagunas MJ, Clares B. Melatonin nanogel promotes skin healing response in burn wounds of rats. *Nanomedicine (Lond)*, 2020, 15(22), 2133-2147.

Sreenivasan S, Patil SS, Rathore AS. Does Aggregation of Therapeutic IgGs in PBS Offer a True Picture of What Happens in Models Derived from Human Body Fluids?. *J Pharm Sci*, 2024, 113(3), 596-603.

Suhail M, Wu PC, Minhas M. Using Carbomer-Based Hydrogels for Control the Release Rate of Diclofenac Sodium: Preparation and *In Vitro* Evaluation. *Pharmaceuticals*, 2020, 13, 399.

Tohid H, Aleem D, Jackson C. Major Depression and Psoriasis: A Psychodermatological Phenomenon. *Skin Pharmacol Physiol*, 2016, 29(4), 220-230.

Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougerou C. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15(3), 434-443.

Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije?. *Biochem Med*, 2007, 17 (1), 10-15.

USP, 2016. <87> Biological reactivity tests, *in vitro*, u: USP-NF, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, SAD.

USP, 2023. <1724> Semisolid drug products – performance tests, u: USP-NF, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, SAD.

Valenta C, Auner BG. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58(2), 279-89.

Varma MVS, Kaushal AM, Garg A, Garg S. Factors affecting mechanism and kinetics of drug release from matrix-based oral controlled drug delivery systems. *Am J Drug Deliv*, 2004, 2, 43-57.

Vasey C, McBride J, Penta K. Circadian Rhythm Dysregulation and Restoration: The Role of Melatonin. *Nutrients*, 2021, 13(10), 3480.

Veseli A, Žakelj S, Kristl A. A review of methods for solubility determination in biopharmaceutical drug characterization. *Drug Dev Ind Pharm*, 2019, 45(11), 1717-1724.

Zetner D, Kamby C, Gulen S, Christophersen C, Paulsen CB, Piga E, Hoffmeyer B, Mahmood F, Rosenberg J. Quality-of-life outcomes following topical melatonin application against acute radiation dermatitis in patients with early breast cancer: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Pineal Res*, 2023, 74, 128-140.

8. SAŽETAK / SUMMARY

Melatonin je neurohormon koji se istražuje za liječenje raznih bolesti i stanja. Broj istraživanja dermalnih formulacija melatonina raste zbog njegovog potencijala u liječenju upalnih bolesti kože, sprječavanju znakova starenja, zaštiti kože od UV zračenja i zacjeljivanju rana. Dermalni put primjene lijeka omogućuje jednostavnost korištenja i postizanje visoke koncentracije lijeka izravno na mjestu primjene. Gelovi za dermalnu primjenu omogućuju dulje zadržavanje djelatne tvari na mjestu primjene te produljeno oslobađanje uklopljenog lijeka. Cilj ovog rada bio je odrediti biofarmaceutska svojstva karbopolskog gela s melatoninom za dermalnu primjenu. Pripremljen je gel karbopola (0,1 %, *m/m*) i polietilenglikola (PEG-a; 5 %, *m/m*) s uklopljenim melatoninom (0,1 %, *m/m*; formulacija CPM). Termodinamička topljivost melatonina u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (pH 7,4) iznosila je $1,34 \pm 0,08$ mg/ml, a u fosfatnom puferu (pH 5,5) $1,60 \pm 0,22$ mg/ml. Ispitivanjem *in vitro* oslobađanja melatonina, CPM formulacija je, u usporedbi s kontrolnom otopinom, karakterizirana produljenim oslobađanjem lijeka. Zabilježeno je nešto brže oslobađanje melatonina iz CPM-a pri pH 7,4 u usporedbi s medijem pH vrijednosti 5,5, no razlika nije pokazana statistički značajnom ($f_2 = 52,86$). Usporedba dobivenih profila oslobađanja melatonina iz CPM-a u oba medija s poznatim matematičkim modelima pokazala je najbolju podudarnost s Korsmeyer-Peppasovim modelom. Difuzija melatonina iz formulacije pratila je Fickov mehanizam. Vijabilnost od $82,5 \pm 4,3$ % određena MTT testom potvrdila je biokompatibilnost formulacije CPM. Biofarmaceutska karakterizacija provedena u ovom radu ukazuje na potencijal formulacije CPM kao farmaceutskog oblika za dermalnu primjenu melatonina.

Melatonin is a neurohormone currently under investigation for the treatment of various diseases and conditions. The number of studies on dermal melatonin formulations is increasing, due to its potential in treating inflammatory skin diseases, preventing signs of aging, protecting the skin from UV radiation, and promoting wound healing. The dermal drug administration route enables the simplicity of application and high drug concentration at the site of application. Dermal gels enable prolonged retention of the active substance at the application site and its prolonged release. The aim of this study was to determine the biopharmaceutical properties of a carbopol gel with melatonin for dermal administration. The gel was prepared using carbopol (0.1%, w/w) and polyethylene glycol (PEG; 5%, w/w) with the addition of melatonin (0.1%, w/w; CPM formulation). The thermodynamic solubility of melatonin in phosphate buffered saline (pH 7.4) was 1.34 ± 0.8 mg/mL, and 1.60 ± 0.22 mg/mL in phosphate buffer (pH 5.5). *In vitro* release study showed the prolonged melatonin release from CPM formulation compared to the control solution. A slightly more rapid release of melatonin from CPM was observed at pH 7.4 compared to the medium with a pH value of 5.5, but the difference was not statistically significant ($f_2 = 52.86$). Comparison of the melatonin release profiles from CPM in both media with known mathematical models showed the best fit with the Korsmeyer-Peppas model. The diffusion of melatonin from the formulation followed Fickian mechanism. The viability of $82.5 \pm 4.3\%$ determined by the MTT assay confirmed the biocompatibility of the CPM formulation. Biopharmaceutical characterization performed in this study indicates the potential of the CPM formulation as a pharmaceutical form for dermal application of melatonin.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

BIOFARMACEUTSKA KARAKTERIZACIJA KARBOPOLSKOG GELA ZA DERMALNU PRIMJENU MELATONINA

Asja Fajtović

SAŽETAK

Melatonin je neurohormon koji se istražuje za liječenje raznih bolesti i stanja. Broj istraživanja dermalnih formulacija melatonina raste zbog njegovog potencijala u liječenju upalnih bolesti kože, sprječavanju znakova starenja, zaštiti kože od UV zračenja i zacjeljivanju rana. Dermalni put primjene lijeka omogućuje jednostavnost korištenja i postizanje visoke koncentracije lijeka izravno na mjestu primjene. Gelovi za dermalnu primjenu omogućuju dulje zadržavanje djelatne tvari na mjestu primjene te produljeno oslobađanje uklopljenog lijeka. Cilj ovog rada bio je odrediti biofarmaceutska svojstva karbopolskog gela s melatoninom za dermalnu primjenu. Pripravljen je gel karbopola (0,1 %, *m/m*) i polietilenglikola (PEG-a; 5 %, *m/m*) s uklopljenim melatoninom (0,1 %, *m/m*; formulacija CPM). Termodinamička topljivost melatonina u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (pH 7,4) iznosila je $1,34 \pm 0,08$ mg/ml, a u fosfatnom puferu (pH 5,5) $1,60 \pm 0,22$ mg/ml. Ispitivanjem *in vitro* oslobađanja melatonina, CPM formulacija je, u usporedbi s kontrolnom otopinom, karakterizirana produljenim oslobađanjem lijeka. Zabilježeno je nešto brže oslobađanje melatonina iz CPM-a pri pH 7,4 u usporedbi s medijem pH vrijednosti 5,5, no razlika nije pokazana statistički značajnom ($f_2 = 52,86$). Usporedba dobivenih profila oslobađanja melatonina iz CPM-a u oba medija s poznatim matematičkim modelima pokazala je najbolju podudarnost s Korsmeyer-Peppasovim modelom. Difuzija melatonina iz formulacije pratila je Fickov mehanizam. Vijabilnost od $82,5 \pm 4,3$ % određena MTT testom potvrdila je biokompatibilnost formulacije CPM. Biofarmaceutska karakterizacija provedena u ovom radu ukazuje na potencijal formulacije CPM kao farmaceutskog oblika za dermalnu primjenu melatonina.

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

Rad sadrži: 54 stranica, 15 grafičkih prikaza, 5 tablica i 89 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: melatonin, karbopol, dermalni gel, *in vitro* oslobađanje, HaCaT stanice

Mentor: **Dr. sc. Laura Nižić Nodilo**, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Laura Nižić Nodilo**, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Doc. dr. sc. Zora Rukavina, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

Rad prihvaćen: Kolovoz 2024.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

BIOPHARMACEUTICAL CHARACTERIZATION OF CARBOPOL GEL FOR THE DERMAL APPLICATION OF MELATONIN

Asja Fajtović

SUMMARY

Melatonin is a neurohormone currently under investigation for the treatment of various diseases and conditions. The number of studies on dermal melatonin formulations is increasing, due to its potential in treating inflammatory skin diseases, preventing signs of aging, protecting the skin from UV radiation, and promoting wound healing. The dermal drug administration route enables the simplicity of application and high drug concentration at the site of application. Dermal gels enable prolonged retention of the active substance at the application site and its prolonged release. The aim of this study was to determine the biopharmaceutical properties of a carbopol gel with melatonin for dermal administration. The gel was prepared using carbopol (0.1%, w/w) and polyethylene glycol (PEG; 5%, w/w) with the addition of melatonin (0.1%, w/w; CPM formulation). The thermodynamic solubility of melatonin in phosphate buffered saline (pH 7.4) was 1.34 ± 0.8 mg/mL, and 1.60 ± 0.22 mg/mL in phosphate buffer (pH 5.5). *In vitro* release study showed the prolonged melatonin release from CPM formulation compared to the control solution. A slightly more rapid release of melatonin from CPM was observed at pH 7.4 compared to the medium with a pH value of 5.5, but the difference was not statistically significant ($f_2 = 52.86$). Comparison of the melatonin release profiles from CPM in both media with known mathematical models showed the best fit with the Korsmeyer-Peppas model. The diffusion of melatonin from the formulation followed Fickian mechanism. The viability of $82.5 \pm 4.3\%$ determined by the MTT assay confirmed the biocompatibility of the CPM formulation. Biopharmaceutical characterization performed in this study indicates the potential of the CPM formulation as a pharmaceutical form for dermal application of melatonin.

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

Thesis includes: 54 pages, 15 figures, 5 tables and 89 references. Original is in Croatian language.

Keywords: melatonin, carbopol, dermal gel, *in vitro* release, HaCaT cells

Mentor: **Laura Nižić Nodilo, Ph.D.** Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Laura Nižić Nodilo, Ph.D.** Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Zora Rukavina, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Emerik Galić, Ph.D. Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2024