Nanočestice za dermalnu primjenu

Brozina, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:163:080272

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Ivona Brozina

Nanočestice za dermalnu primjenu

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Oblikovanje lijekova 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Maria Juga.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Mariu Jugu na mentorstvu, svojim kolegama i obitelji na podršci te posebno mami Rajni na vjeri u moj uspjeh i bezuvjetnoj potpori koju je iskazala tijekom mog studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. OBRAZLOŽENJE TEME 5

3. MATERIJALI I METODE 6

4. REZULTATI I RASPRAVA 7

4.1. NANOČESTICE 7

4.1.1. POLIMERNE NANOČESTICE 7

4.1.2. ANORGANSKE NANOČESTICE 8

4.1.3 ČVRSTE LIPIDNE NANOČESTICE 9

4.2. TRANSPORT NANOČESTICA KROZ KOŽU 11

4.2.1. TRANSPORT KROZ KOŽU 11

4.2.2. TRANSPORT POLIMERNIH NANOČESTICA KROZ KOŽU 13

4.2.3. TRANSPORT ČVRSTIH LIPIDNIH NANOČESTICA KROZ KOŽU 15

4.2.4 TRANSPORT ANORGANSKIH NANOČESTICA KROZ KOŽU 16

4.3. REOLOŠKA SVOJSTVA PRIPRAVAKA S NANOČESTICAMA 17

4.4. LOKALNA PRIMJENA ČVRSTIH LIPIDNIH, POLIMERNIH I ANORGANSKIH NANOČESTICA 18

4.5. PRIPREMA ČVRSTIH LIPIDNIH, POLIMERNIH I ANORGANSKIH NANOČESTICA 22

4.6. INDUSTRIJSKA PROIZVODNJA POLIMERNIH NANOČESTICA 31

5. ZAKLJUCAK 33

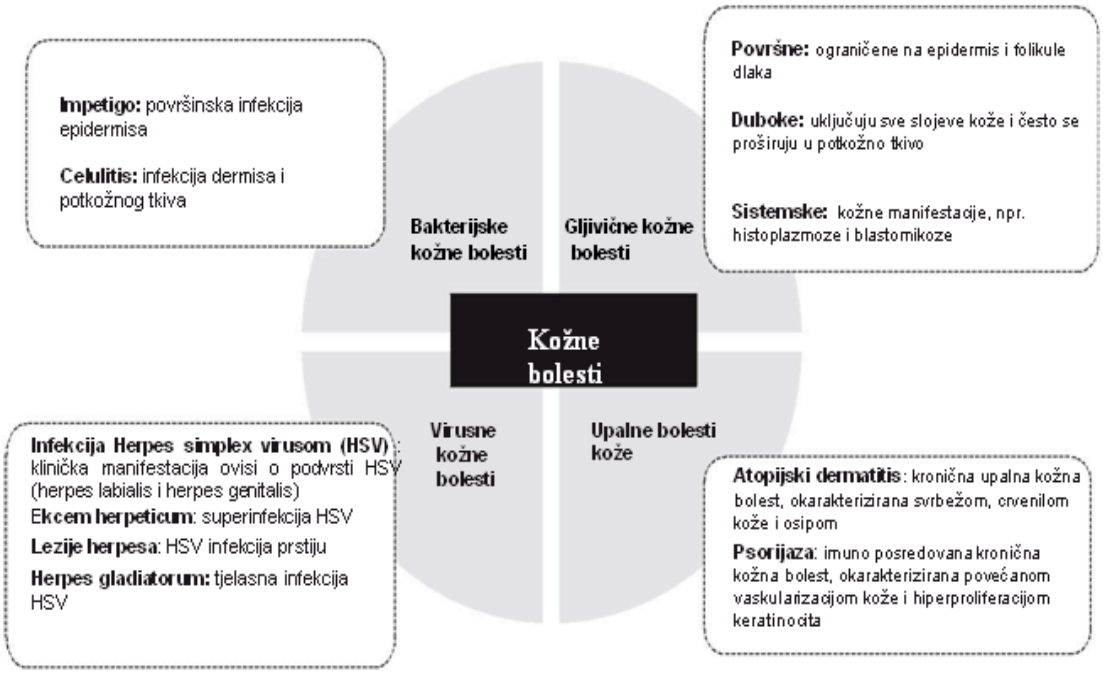
6. LITERATURA 34

7. SAZETAK/SUMMARY 41

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

U današnje vrijeme kožne bolesti predstavljaju rastući problem i svakodnevno utječu na milijune ljudi, a koje uzrokuju znatan zdrastveni i ekonomski teret. Kožne bolesti obuhvaćaju široki niz stanja u rasponu od benignih do po život opasnih bolesti. Postoje razne zarazne kožne bolesti koje mogu biti uzrokovane bakterijskim, gljivičnim i virusnim infekcijama, dok su kronične upalne bolesti kože kao što su psorijaza, atopijski dermatitis i alergijski kontaktni dermatitis posljedica infiltracije upalnih stanica (prvenstveno T stanica), (slika 1). Liječenje navedenih kožnih bolesti konvencionalnim pripravcima je često nezadovoljavajuće te i dalje predstavlja veliki izazov.



Slika 1. Shematski prikaz raznih kožnih bolesti i njihovo podrijetlo.

Uspješnost liječenja zaraznih kožnih bolesti ovisi o vrsti patogenog uzročnika, o stanju i strukturi kože, te o cjelokupnom zdrastvenom stanju pacijenta. (Sigmundsdottir, 2010).
Konvencionalni pripravci za dermalnu primjenu pokrivaju široki raspon terapijskih indikacija, te iako im se molekularne strukture znatno razlikuju ipak zadržavaju određene zajedničke fizikalno-kemijske karakteristike. Kao na primjer, logaritamska vrijednost koeficijenta razdjeljenja u sustavu ulje/voda za lijekove namijenjene za dermalnu primjenu trebala bi biti veća od 6 (logP>6). Time se osigurava optimalna brzina i opseg otpuštanja

lijeka za postizanje zadovoljavajuće lokalne terapijske koncentracije u razumnom vremenskom periodu i za osiguravanje kontinuiranog farmakološkog djelovanja. (Mahrab i sur., 2006).

Najveća prepreka optimalnoj terapiji kožnih bolesti je barijerna funkcija kože, koja značajno utječe na lokalnu bioraspoloživost i djelotvornost lijeka. *Stratum corneum* djeluje kao glavna barijera za lokalnu dostavu lijekova i svojom niskom permeabilnošću ograničava isporuku lijekova lokalnim putem. Učinkovitost isporuke lijeka i terapijski učinak uglavnom ovise o afinitetu difuzije lijeka i interakcijama između formulacijskih ekscipijensa i komponenata membrane. Odnosno, uspjeh lokalne terapije kožnih bolesti ovisi o ciljanoj i lokalnoj isporuci lijeka u bolesne stanice kože.

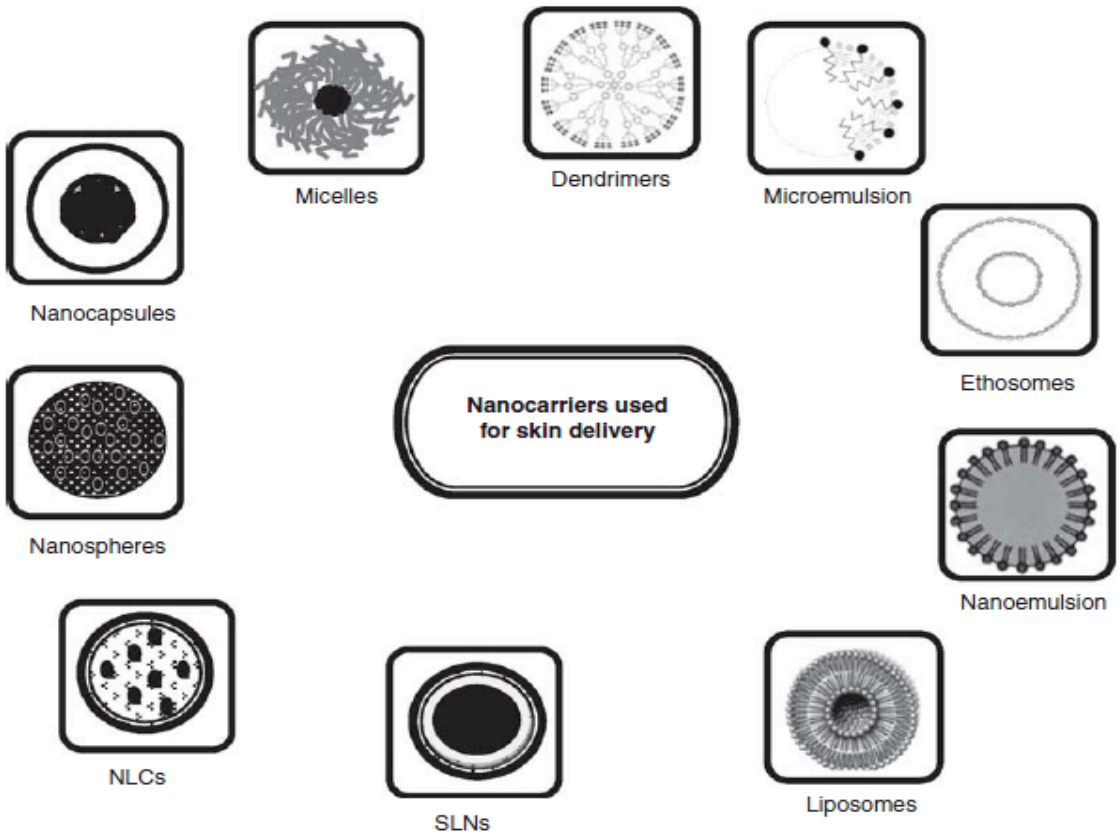
Većina današnjih konvencionalnih lokalnih pripravaka je namijenjena za lokalni učinak lijeka, rađe nego za sistemski učinak. Najčešće konvencionalno lokalno liječenje kože podrazumijeva uporabu masti ili krema. Ponekad lokalna primjena lijekova rezultira nedostatkom suradljivosti pacijenata zbog problema poput masnoće i ljepljivosti povezane s primjenom takvih pripravaka (masti i kreme). Primjenom na kožu, lijekovi iz takvih pripravaka osiguravaju visoko koncentrirani sloj djelatne tvari koji se brzo apsorbira (Jensen i sur., 2011). Zbog niske učinkovitosti isporuke lijeka u konvencionalnim pripravcima, potrebne su visoke koncentracije djelatne tvari za učinkovitu terapiju. Međutim, to također može dovesti do toksičnih reakcija, kao što su iritacije, te alergijske reakcije. Naime, najveći nedostatak većine današnjih konvencionalnih ljekovitih oblika za liječenje kožnih bolesti su nuspojave, koje su posljedica sistemske apsorpcije lijeka, te njegovog utjecaja na cijelo tijelo, a ne samo na kožu. Ostali nedostaci su nekontrolirano isparavanje djelatne tvari i neugodni mirisi (Pradhan, 2011). Nadalje, isporuka lijeka u konvencionalnim pripravcima je često nespecifična, a penetracija kroz kožu je izrazito niska i vrlo varijabilna.

Za postizanje učinkovite terapije nužno je osigurati sljedeća dva parametra, da djelatna tvar dođe do mjesta djelovanja u potrebnoj koncentraciji, te da ostane na mjestu djelovanja u potrebnoj koncentraciji i u potrebnom vremenu.

Kao što je već naglašeno, konvencionalna lokalna terapija ima razna ograničenja i okarakterizirana je s nedostatnom suradljivošću pacijenata, te nedovoljno sigurnom i učinkovitom terapijom (Teichmann i sur., 2007). Farmakokinetički podaci također pokazuju nisku apsorpciju lijeka iz konvencionalnih oblika. Novi terapijski sustavi za dermalnu primjenu lijeka omogućuju prevladavanje problema povezanih s konvencionalnom lokalnom terapijom te bi trebali rezultirati razvojem novih topikalnih formulacija koji osiguravaju poboljšanu penetraciju lijeka kroz kožu i smanjene nuspojave (Pople i Singh, 2011).

Primjenom takvih novih terapijskih sustava moguće je isporučiti potentne djelatne tvari na željeno mjesto s velikom preciznošću.

Razvoj novih terapijskih sustava temelji se na primjeni nanosustava, koji učinkovito kontroliraju oslobađanje djelatne tvari u bolesnoj regiji kože osiguravajući njen lokalni učinak. Nadalje, nanočestice i njihova uska raspodjela veličine omogućava učinkovito ciljano djelovanje u koži i veće zadržavanje lijeka u koži (Bawarski i sur., 2008). Takvi sustavi omogućavanju postepeno oslobađanje lijeka, što rezultira produženom aktivnošću ili pojačanim unosom djelatne tvari i mogućim smanjenjem štetnih učinaka. Nadalje, u takvim sustavima djelatna tvar je inkapsulirana i na taj način zaštićena od prijevremene razgradnje (Zhang i sur., 2010). Jedan od načina optimiziranja lokalne isporuke lijeka na kožu je primjena određenih nosača kao što su liposomi, mikro i nanoemulzije, te anorganske, lipidne i polimerne nanočestice (slika 2).



Slika 2. Slikovni prikaz novih terapijskih sustava za primjenu na kožu

Posebna pozornost je usmjerena na nanočestice, zbog njihovog učinkovitijeg prodiranje kroz rožnati sloj kože i njihovog ciljanog djelovanja. Poznata je činjenica da koža djeluje kao negativno nabijena membrana. Prisutnost naboja na površini nanočestica utječe na difuziju

lijeka kroz kožu (Katahira i sur., 1999). Pozitivno nabijeni terapijski sustavi će jače stupiti u interakcije sa stanicom, te pokazuje veću permeabilnost lijeka i produženi farmakološki učinak.

Stoga, lokalnom primjenom nanočestica na kožu postiže se produženo oslobađanje i održava se lokalizirani učinak što rezultira učinkovitom terapijom mnogih različitih po život opasnih dermatoloških bolesti.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Uspješno liječenje kožnih bolesti je često kompleksno. Istraživanja pokazuju da učinkovito liječenje kožnih bolesti zahtijeva pravodobno prepoznavanje i procjenu bolesti kao i prigodnu i učinkovitu terapiju. Do danas, lokalna terapija kožnih bolesti predstavlja najpovoljniji izbor liječenja, unatoč tome što rožnati sloj kože uvelike ograničava penetraciju djelatne tvari u kožu, što rezultira samo malim postotkom apsorpcije primijenjene doze lijeka.

Najveći nedostatak trenutnih lokalni pripravaka na tržištu su nuspojave, koje su posljedica sistemske apsorpcije lijeka. Stoga, da bi se postigao lokalizirani učinak i time uklonile nuspojave povezane sa sistemskom apsorpcijom lijeka, je potrebno razviti jednostavniju i manje invazivnu terapiju. Nedavne inovacije uglavnom su usmjerene na istraživanje novih terapijskih sustava kao što su liposomi, mikro i nano emulzije, te anorganske, lipidne i polimerne nanočestice. Predviđa se da će nanotehnologija biti najbrže rastuće područje za održavanje zdravlja kože, kao i za dijagnozu i liječenje kožnih bolesti. Terapijski sustavi nano veličina su od posebnog značaja kod lokalnog liječenja kožnih bolesti, ponajviše zbog njihove uspješnije penetracije kroz kožu, te zbog smanjenih nuspojava.

Nanočestice omogućavaju kontrolirano otpuštanje djelatne tvari na željenom mjestu djelovanja s lokaliziranim učinkom, te time uklanjaju najveći nedostatak konvencionalnih pripravaka. Iako je u literaturi opisana primjena različitih nanočestica u liječenju kožnih bolesti, fokus ovog diplomskog rada bit će na polimernim, čvrstim lipidnim i anorganskim nanočesticama.

3. MATERIJALI I METODE

U izradi ovog teorijskog diplomskog rada korišteni su različiti preglednici znanstvene literature kao što su baze podataka (PubMed, PubFacts, Science Direct), društvena mreža Research Gate, znanstvene i stručne knjige te mrežne stranice sa srodnom tematikom. Više od 90% ovog diplomskog rada temeljeno je na radovima objavljenima u znanstvenim časopisima i stručnim knjigama. Metode rada bile su uglavnom pretraživanje uz pomoć ključnih riječi vezanih za određeno potpoglavlje ovog diplomskog rada.

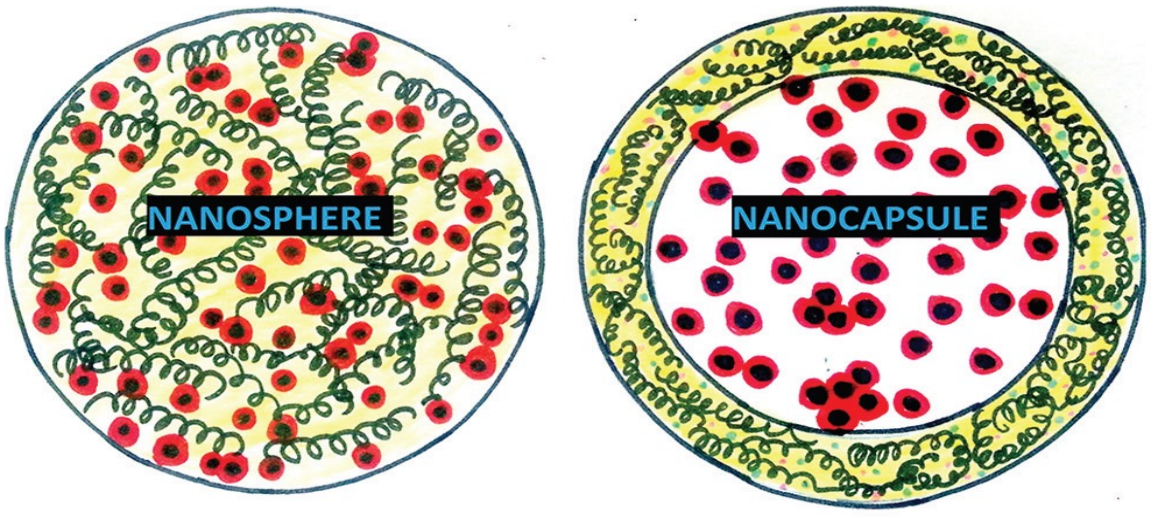
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. NANOČESTICE

Nanočestice su novi terapijski sustavi, koji se preferiraju u odnosu na konvencionalne formulacije, zbog mnogobrojnih prednosti. Ovi koloidni sustavi s veličinom čestica u rasponu od 10 nm do 1000 nm omogućuju ciljano djelovanje lijeka, produženo oslobađanje, zaštitu djelatne tvari od razgradnje, nisku toksičnost i veću adhezivnost lijeka na kožu. Fizikalno-kemijska svojstva nanočestica poput rigidnosti, hidrofobnosti, veličine i naboja su ključna za penetraciju nanočestica kroz kožu (Crosera i sur., 2009). Uporabom terapijskih sustava nano veličina postiže se veća specifičnost u dostavi lijeka, što dovodi do smanjenja nuspojava, zbog primjene manje doze lijeka (Ulbrich i Lamprecht, 2010). Danas na raspolaganju imamo nanosustave kao što su liposomi, mikroemulzije, te polimerne, čvrste lipidne i anorganske nanočestice.

4.1.1. POLIMERNE NANOČESTICE

Polimerne nanočestice mogu se klasificirat kao nanosfere (matriksni sustavi) i nanokapsule (spremišni sustavi koji se sastoje od uljne jezgre), (slika 3).



Slika 3. Struktura nanosfera i nanokapsula

Polimerne nanokapsule su vezikularne čestice veličine manje od 1 μm, koje se sastoje od uljne jezgre okružene ultratankom polimernom ovojnicom koja je stabilizirana s površinski aktivnim tvarima i/ili steričkim stabilizatorima (Nasir, 2010). Difuzija djelatne tvari iz uljne jezgre ovisi o karakteristikama polimerne ovojnice. Tako npr. polimerne ovojnice osjetljive na temperaturu, ispod kritične temperature, inkapsuliraju djelatnu tvar, dok iznad kritične temperature dolazi do otapanja ovojnice i oslobađanja djelatne tvari. Takve polimerne ovojnice se koriste za dostavu lijeka na mjestu upale, kao kod lokalizirane psorijaze, gdje se metotreksat kao djelatna tvar inkapsulira u polimerne ovojnice osjetljive na temperaturu (Nasir, 2010).

Polimerne nanokapsule imaju veći kapacitet uklapanja djelatne tvari, dok su polimerne nanosfere matriksni sustavi s nižim kapacitetom uklapanja.

Polimerne nanočestice kontrolirano otpuštaju uklopljenu djelatnu tvar, koja prvo mora difundirati kroz polimerni matriks da bi prodrijela kroz kožu. One su strukturno stabilne, zahvaljujući svom krutom matriksu, te su u mogućnosti da zadrže svoju strukturu kroz duži vremenski period nakon što se lokalno primjene na kožu (Lboutounne i sur., 2004).

U posljednjih nekoliko godina sve je istaknutija primjena spojeva uklopljenih u polimerne ovojnice u farmaceutske i kozmetičke svrhe. Tako se danas sve češće primjenjuju inkapsulirani proteini i peptidi u lječenju raka, zaraznih bolesti, autoimunih bolesti, kod sindroma stečene imunodeficijencije te protiv starenja.

Većina polimernih nanočestica se zadržava u stratum corneum, a time se poboljšava otpuštanje lijeka kroz kožu, koje ovisi o apsorpcijskim karakteristikama lijeka, kao i o svojstvima mehanizma otpuštanja lijeka.

4.1.2. ANORGANSKE NANOČESTICE

Anorganske nanočestice pokazuju različita kemijska i fizikalna svojstva od svojih inačica većih veličina. Zbog njihovog sastava i fizikalno-kemijskih svojstva, istražuju se u biomedicinske svrhe kao nanonosači za ciljanu i kontroliranu isporuku djelatnih tvari, te kao sredstva za snimanje u dijagnostičke svrhe (Cevc i Vierl, 2010). Nanočestice cinkovog oksida i titanovog dioksida, te metalne nanočestice su glavni predstavnici nosača nono-veličine koji se koriste u te svrhe.

Zahvaljujući njihovom anorganskom porijeklu, oni ostaju stabilni tijekom dužeg vremenskog perioda. Anorganske nanočestice odlikuju se raznovrsnim svojstvima pogodnim za dermalni put primjene lijekova, koji uključuje visoku bioraspoloživost, dobru biokompatibilnost, široku funkcionalnost, potencijal ciljane isporuke (npr. selektivno uništavanje stanica raka, bez djelovanja na zdrave stanice) i kontrolirano oslobađanje djelatne tvari (Xu, 2006). Ovi pokazatelji upućuju na prednosti terapije anorganskim nanočesticama ne samo u području kozmetike, gdje se koriste u terapiji protiv starenja, akni te u pripravcima za njegu i hidrataciju kože, već i za lječenje kožnih bolesti, poput raka kože.

Nanočestice cinkovog oksida (ZnO) i titanijevog dioksida (TiO_2) koje se koriste u kremama za sunčanje, glavni su primjer uporabe anorganskih nanočestica. TiO_2 je učinkovitiji u UV-B području (290-320 nm), dok je ZnO učinkovitiji u UV-A području (320-400 nm). Kombinacijom tih anorganskih nanočestica postiže se UV zaštita u širokom rasponu. Nanočestice TiO_2 i ZnO pojavile su se kao zamjena za mikronizirani titanijev dioksid i zinkov oksid koji su mikro veličina. Navedene nanočestice, zbog svoje transparentnosti i mogućnosti dobivanja prozirnih krema za sunčanje (Smijs i Pavel, 2011).

Metalne nanočestice poput srebra se često koriste zbog antiseptičkog djelovanja. Srebro je učinkovito protiv Meticilin rezistentnih *Staphylococcous aureus* (eng. *Methicillin Resistant Staphylococcous aureus,* MRSA), (Nasir, 2010), nadalje učinkovito je kod onihomikoza (Pinheiro i sur., 2007), kožne lišmanijaze (Crissey, 1998), te mnogih drugih kožnih bolesti.

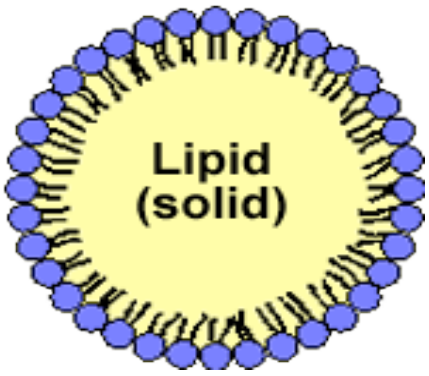
Nanočestice zlata se često koriste kao kontrastna sredstva u dijagnostici, zbog toga što se mogu lako oblikovati na željenu veličinu (0.8 nm do 200 nm), nadalje njihova površina se lako može modificirati u svrhu postizanja željene funkcionalnosti i biokompatibilnosti, te u konačnici putanju nanočestica zlata u organizmu je vrlo lako pratiti (Xu, 2006).

4.1.3 ČVRSTE LIPIDNE NANOČESTICE

Čvrste lipidne nanočestice (eng. Solid lipid nanocarriers, SLN) i nanostrukturirani lipidni nosači (eng. Nanostructured lipid carriers, NLC) su glavni predstvanici lipidnih nanočestica matriksnog tipa.

SLN su sferičnog oblika, promjera u rasponu od 10 nm do 1000 nm. (slika 4).

Čvrste lipidne nanočestice sadrže krutu lipidnu jezgru u kojoj se mogu otopiti lipofilne molekule. Čvrsta lipidna jezgra se stabilizira površinski aktivnim tvarima.



Slika 4. Struktura SLN

Lipidne nanočestice su najčešći tip nanočestica koji se istražuju kao suvremeni nosači za topikalnu primjenu lijekova na kožu (Küchler i sur., 2009), zbog povoljnih karakteristika poput dobrih okluzivnih svojstva, povećanja hidratacije kože, mogućnosti za kontroliranim oslobađanje djelatne tvari, veće penetracije u kožu, ciljanim djelovanjem i izbjegavanjem sistemske apsorpcije i posljedično nuspojava.

Za razliku od polimernih nanočestica, lipidne nanočestice su manje stabilne primjenom na površinu kože. Zabilježeno je da čvrste lipidne nanočestice, nakon lokalne primjene gube svoj prvobitni oblik i otapaju se u periodu od 2 sata, zbog interakcija između lipidnih nanočestica i lipida kože (Junyaprasert i sur., 2009). Te interakcije dovode do smanjenja barijerne funkcije kože i do povećanja penetracije lijeka u kožu (Dubey i sur., 2007). Prema tome, djelatne tvari koje su uklopljene u različite tipove lipidnih nanočestica (matriksni i spremišni tip), odlikuju se većom penetracijom kroz kožu od konvencionalnih oblika. Nadalje, dodavanjem drugih sastojaka kao što je etanol i magnetskih nanočestica, čvrstim lipidnim nanočesticama može se dodatno povećati penetracija kroz kožu. Zbog svoje specifične veličine i svojstava ovisnih o sastavu, lipidne nanočestice mogu prodrijeti kroz nekoliko anatomskih barijera osiguravajući kontrolirano oslobađanje djelatne tvari (Wissing i sur., 2004).

4.2. TRANSPORT NANOČESTICA KROZ KOŽU

4.2.1. TRANSPORT KROZ KOŽU

Koža je najveći organ ljudskog tijela, čija je ukupna površina približno 2 m^2. Djeluje kao barijera između organizma i vanjske okoline. Najvažnije funkcije kože uključuju zaštitu od UV zračenja, fizičkih i kemijskih oštećenja, te mikrobioloških napada. Nadalje, koža ima ulogu u održavanju tjelesne temperature te osjetilnu funkciju , uključujući osjet boli i topline (Degim, 2006).

Koža se uglavnom sastoji od dva sloja (*epidermisa* i *dermisa*), uz potkožno tkivo. Sastavljena je od niza različitih stanica, što čini njenu strukturu složenijom od strukture mozga. *Epidermis* je građen od nekoliko vrsta lipida uključujući fosfolipide, fosfatidilkolin, kolesterol i trigliceride. Glavni tipovi stanica koje se nalaze u *epidermisu* su keratinociti, melanociti, Langerhansove stanice i Merkelove stanice. *Epidermis* je podjeljen u nekoliko slojeva, a njegov vanjski dio *stratum corneum* odgovoran je za barijernu funkciju kože, zbog visoke lipofilnosti i kohezije između stanica. *Stratum corneum* se sastoji od keratiniziranih rožnatih stanica ugrađenih u lipidni dvosloj. Njegov izvanstanični lipidni odjeljak čine ceramidi, kolesterol i slobodne masne kiseline (Hadgraft, 2005).

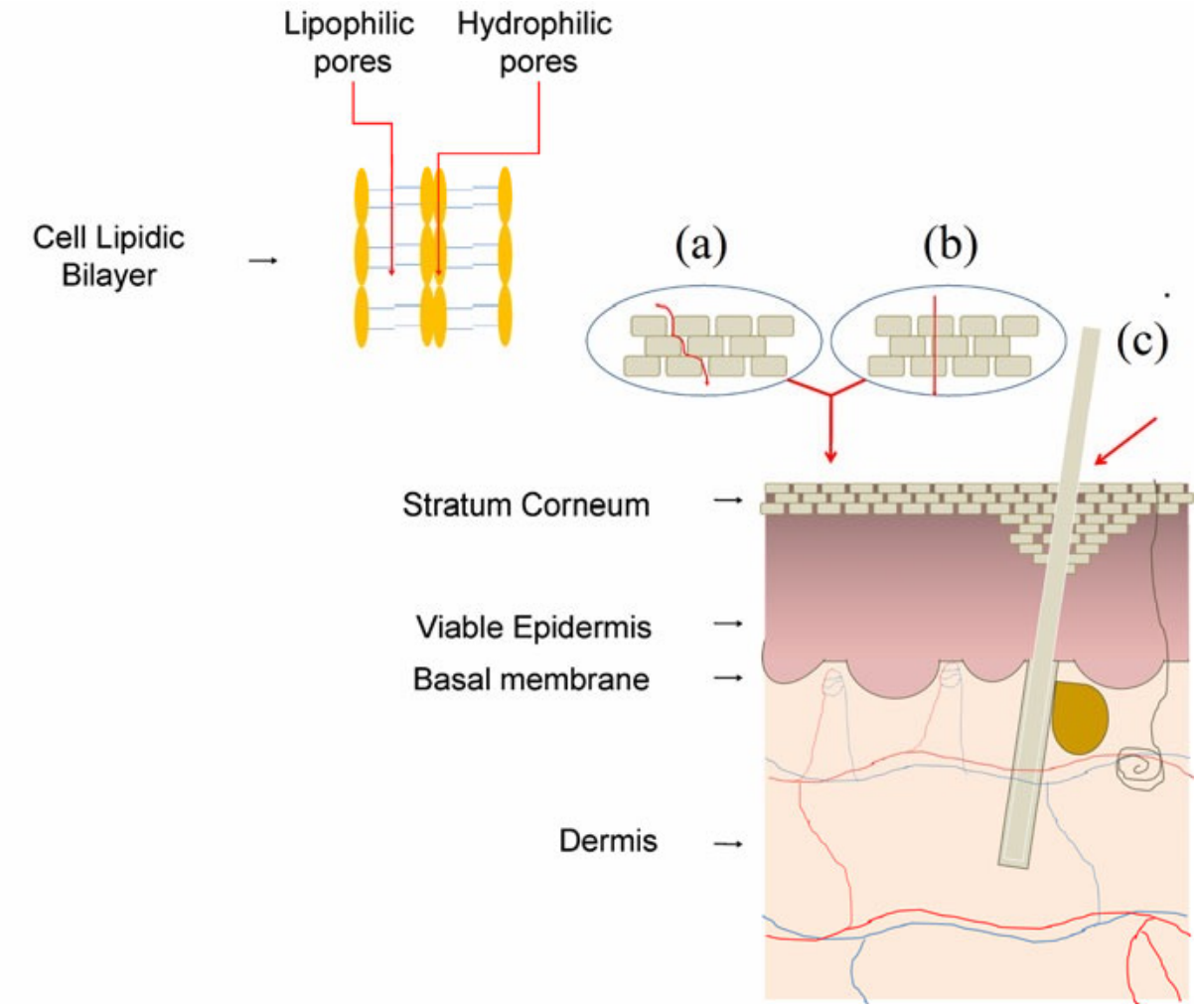
Dermis je sloj iznad potkožnog tkiva i sastavljen je od kolagena, elastina, glikozaminoglikana i fibroblasti. Ovaj sloj je dobro prokrvljen te također sadrži žlijezde znojnice i žlijezde lojnice, te leukocite, adipocite i mastocite.

S obzirom na anatomiju i fiziologiju kože, neke djelatne tvari neće ostvariti željeni farmakološki učinak nakon lokalne primjene na kožu.

Nanotehnologijom možemo utjecati na mehanizam penetracije lijeka kroz kožu, zbog toga što ona osigurava kontrolirano otpuštanje djelatne tvari, povećano zadržavanje lijeka na koži, te pruža zaštitu djelatne tvari od kemijskih ili fizičkih nestabilnosti (Paese i sur., 2009).

Unatoč učinkovitoj barijernoj funkciji kože, neke tvari mogu prodrjeti kroz različite slojeve kože. *Stratum corneum* kao koherentan i kompaktan sloj je ograničavajući čimbenik za proces penetracije lijeka kroz kožu. Permeabilnost nekih tvari kroz *epidermis* je barem 14 puta manja nego permeabilnost tih istih tvari kroz *dermis*. Integritet *stratum corneuma* i koncentracija primijenjenog lijeka su važni čimbenici koji utječu na profil penetracije lijeka. Lipidne komponente *stratum corneuma*, posebno ceramidi, su važni faktori koji pridonose barijernoj funkciji.

Postoji nekoliko pasivnih puteva kojim molekula može prijeći kroz *stratum corneum*, a oni uključuju intacelularni put (putem otapanja molekule u ekstracelularnim lipidima raspoređenim u lipidni dvosloj), transcelularni put (prolaz kroz korneocite i lipidni dvosloj), te putem ili kroz žljezde znojnica ili folikule dlaka (Slika 5). Međutim doprinos prijenosa molekula putem kožnih privjeska (žljezda znojnica i folikula dlaka) je mali, s obzirom da kožni privjesci zauzimaju samo 0,1% površine kože (Moser i sur., 2001). Lijekovi rijetko prolaze kroz kožu putem žljezda znojnica, zbog njihove vijugave putanje i zbog nepovoljnog utjecaja znoja. Dok s druge strane, folikule dlaka su uobičajeni put transporta za neke ione, polarne spojeve i za molekule velike molekulske mase. Ispitivanjima je potvrđeno da folikule dlaka unatoč njihovoj maloj površini, imaju važnu ulogu u permeabilnosti nanočestica, zbog toga što služe kao njihova skladišta (Lademann i sur., 2006).



Slika 5. Transport kroz kožu. (a) intarcelularni, (b) transcelularni i (c) putem folikule dlake.

Samo mali postotak lijekova dostiže svoj cilj kada se lokalno primjeni na kožu. *Stratum corneum* je blago propustan kako za lipofilne tako i za hidrofilne spojeve. Prema tome, transcelularni i intracelularni putevi su najvažniji putevi transporta molekula kroz kožu. Koeficijent raspodjele djelatne tvari između *epidermisa* i farmaceutskog oblika lijeka, odlučujući je faktor o penetraciji djelatne tvari u *epidermis,* što je u konačnici ključni korak u određivanju brzine difuzije djelatne tvari kroz kožu.

Kod dermalne primjene lijekova preferiraju se terapijski sustavi bez kemijskih promotora apsorpcije, radi održavanja normalne barijerne funkcije kože. Primjena kemijskih promotora apsorpcije, kao što su površinski aktivne tvari i organska otapala, može dovesti do smanjenja barijerne funkcije kože te do iritacija i pojave oštećenja na koži (Baroli, 2010).

Nanosustavi kao što su polimerne, anorganske i čvrste lipidne nanočestice koriste se kao alternativa primjeni kemijskih promotora apsorpcije, zbog njihove sposobnosti da povećaju penetraciju djelatne tvari kroz kožu bez izazivanja iritacija (Cevc i Vierl, 2010). Osim toga, kontrolirano oslobađanje djelatne tvari dovodi do smanjene sistemske apsorpcije. Transport nanočestica kroz kožu ovisi o prirodi i fizikalno-kemijskim svojstvima nanočestica, te o prirodi djelatne tvari kao i o stanju kože.

4.2.2. TRANSPORT POLIMERNIH NANOČESTICA KROZ KOŽU

Polimerne nanočestice su od posebnog interesa kod dermalne primjene lijekova, zbog kontroliranog oslobađanja uklopljenih djelatnih tvari, koje prvo moraju difundirati kroz polimerni matriks da bi potom prodrle kroz kožu. Nanokapsule i nanosfere su najčešći tipovi polimernih nanočestica koji se istražuju u smislu njihove penetracije kroz kožu.

Općenito, polimerne nanočestice su vrlo stabilne zahvaljujući svojem rigidnom matriksu i u mogućnosti su da zadrže svoju strukturu kroz duži vremenski period nakon lokalne primjene (Lademann i sur., 2007). Kontakt lijeka s površinom kože je ograničen brzinom difuzije lijeka iz nanočestice. U stvari, neki izvještaji su pokazali da polimerne nanočestice mogu usporiti penetraciju inkapsulirane djelatne tvari do ciljnog mjesta ili u dublje slojeve kože, te mogu povećati količinu zadržanog lijeka u rožnatom sloju kože, u odnosu na druge slojeve. Međutim, količina lijeka u ciljnom mjestu ili u dubljim slojevima kože se povećava s vremenom nakon primjene (Vettor i sur., 2010).

Uspoređujući spremišni i matriksni polimerni sustav, uočeni su vrlo slični profili penetracije lijeka u *stratum corneum* (Alves i sur., 2007). Također je zabilježeno da dolazi do povećanja permeabilnosti djelatne tvari kroz kožu kao i povećannja penetracije djelatne tvari u određeni sloj kože nakon njihovog uklapanjaa u polimerne nanočestice. To povećanje u permeabilnosti i penetraciji pripisuje se velikom izravnom kontaktu nanočestica s rožnatim slojem (zahvaljujući njihovoj velikoj ukupnoj površini), nadalje pripisuje se njihovoj visokoj termodinamičkoj aktivnosti (kao posljedici njihovih nanometarskih veličina), njihovoj mogućnosti taloženja u folikule dlaka, te njihovim površinskim karakteristika (Senyigit i sur., 2010).

Dokazana je pasivna difuzija polimernih nanočestica putem folikula dlaka, a idealna veličina nanočestica za penetraciju kroz folikule dlaka se procjenjuje na između 320 i 750 nm. Manje nanočestice također pokazuju afinitet za pasivnom difuzijom putem folikula dlaka. Spremišni kapacitet folikula dlaka je 10 puta veći od spremišnog kapaciteta rožnatog sloja kože (Lademann i sur., 2010). Polimerne nanočestice veličine 320 nm (polidisperznog indeksa 0.06) mogu se zadržati u folikulama dlaka do 10 dana, te potom bivaju izbačene zbog proizvodnje sebuma.

Pri normalnim fiziološkim uvjetima penetracija polimernih nanočestica u dublje slojeve kože nije značajna, vjerojatnog zbog male veličine međustaničnog prostora (Yow i sur., 2009). Međutim, primjenom konfokalne laserske mikroskopije dokazana je penetracija poli(n-butil cijanokrilat) nanokapsula (188 nm) u epidermis i dermis štakorove kože. Tip kože koji se koristio u ispitivanju mogao je utjecati na rezultate, s obzirom da je koža štakora više propusna od ljudske kože. Hidrofilne vezikule (122 nm), sastavljene od poli(kaprolakton)-poli(etilen glikol)-poli(kaprolakton) kopolimera uspjele su prodrijeti u epidermis ljudske kože (Rastogi i sur., 2009). Primjenom konfokalne mikroskopije opažena je akumulacija vezikula u epidermisu. Spomenute veličine nanočestica su srednje vrijednosti i treba uzeti u obzir prisutnost manjih čestica zbog polidisperznosti. Zapravo, manje polimerne nanočestice (blizu 40 nm) prolaze kroz ljudsku kožu i kožu glodavaca uglavnom putem folikularne rute.

Promotori apsorpcije poput Plurol®-a (poligliceril-6 dioleat), Transcutol®-a (dietilenglikol moetil eter) i Labrasol®-a (PEG-8 kaprilični trigliceridi) utjecajem na lipidnu strukturu kože, mogu poticati penetraciju nanočestica preko *stratum corneuma* kože miša.

4.2.3. TRANSPORT ČVRSTIH LIPIDNIH NANOČESTICA KROZ KOŽU

Čvrste lipidne nanočestice (eng. Solid lipid nanoparticles, SLN) su nanočestice matriksnog tipa načinjene od lipida. Za razliku od polimernih nanočestica, lipidne nanočestice su manje stabilne. Zapaženo je da čvrste lipidne nanočestice nakon lokalne primjene gube svoj oblik i otapaju se u periodu od 2 sata, zbog interakcija među komponenata nanočestica i lipida kože. Te interakcije mogu smanjiti barijernu funkciju kože i povećati okluzivne uvjete na površini kože, što dovodi do favoriziranja procesa penetracije kroz kožu. Osim toga, dodavanjem drugih sastojaka kao što su etanol i magnetske nanočestice čvsrtim lipidnim nanočesticama, može dovesti do dodatnog povećanja u permeabilnosti (Cui i sur., 2009). Dakle, povećanje permeabilnosti djelatne tvari do ciljnog medija ili povećanje penetracije djelatne tvari kroz slojeve kože često se zapaža kada je djelatna tvar uklopljenaa u lipidne nanočestice, bilo matriksnog ili spremišnog tipa (Kang i sur., 2010).

Kod uklapanja djelatnih tvari u čvrste lipidne nanočestice, osim poboljšanja u permeabilnosti i penetraciji djelatne tvari, moguće je opaziti i suprotan rezultat. To se može pripisati povećanju rigidnosti nanočestica, zbog vrste lipida upotrebljenih kao sirovine za njihovu izradu (Mandawgade i Patravale, 2008).

Također, kod matriksnog tipa lipidnih nanočestica, odnosno kod SLN-a, zapaženo je da interakcije između djelatne tvari i komponenata nanočestica dovode do stvaranja tankog filma na površini kože, te do povećanja adhezivnosti na kožu, što u konačnici dovodi do smanjenja brzine otpuštanja i permeabilnosti inkapsulirane djelatne tvari.

Veličina čestica ima važnu ulogu u permeabilnosti inkapsulirane djelatne tvari. Zapaženo je kako manje čestice u većoj mjeri imaju bolju permeabilnost od većih čestica (Passerini i sur., 2009).

Kao i u slučaju polimernih nanočestica i kod čvrstih lipidnih nanočestica je zabilježeno njihovo nakupljanje u folikulama dlaka. Čvrste lipidne nanočestice veličine oko 200 nm su detektirane u folikulama dlake nakon 24 sata od lokalne primjene.

Penetracija intaktnih čestica nije uobičajena, jer čvrste lipidne nanočestice gube svoj oblik nakon lokalne primjene (Kuchler i sur., 2009).

4.2.4 TRANSPORT ANORGANSKIH NANOČESTICA KROZ KOŽU

Anorganski materijali koriste se u obliku nanočestica u svrhu povećanja transporta djelatne tvari kroz kožu. Bez obzira na vrstu transporta kroz kožu (dermalni i transdermalni put), transport će ovisiti o karakteristikama dimenzija nanočestica (hidrodinamički promjer i oblik; eliptični, sferični), (Shilling i sur., 2010).

Anorganske nanočestice cinkovog oksida (ZnO) i titanovog dioksida (TiO_2) se koriste u zaštitnim kremama za sunčanje. Kako su TiO_2 i ZnO namijenjeni da djeluju kao fizička zaštita u kremama za sunčanje, ti materijali moraju biti dostupni na površini kože kako bi mogli raspršiti sunčevu svjestlost. Stoga, TiO_2 ili ZnO nanočestice ne bi smjele brzo prodrijeti kroz kožu. Zbog toga su provedene mnogobrojne studije o sposobnosti permeacije i penetracije tih nanočestica nakon lokalne primjene na kožu. Nekoliko *in vitro* ispitivanja o permeabilnosti nanočestica ZnO i TiO_2 su pokazala da bez obzira na njihovu veličinu, ne dolazi do prodiranja čestica kroz kožu. Prema tim istraživanjima, nanočestice penetriraju samo u rožnati sloj kože i bivaju zadržane u vanjskim slojevima korneocita (Wu i sur., 2009). Međutim, permeabilnost ovisna o veličini je zabilježena kod primjene nanočestica TiO *in vivo* kod miševa, kroz duži vremenski period. Također je ustanovljeno da čestice veličine 40 nm dosežu dublje slojeve epidermisa u odnosu na čestice od 60 nm. Osim toga, te čestice mogu *in vivo* prodrjeti kroz kožu miša i dosegnut dublje slojeve kože. Međutim, vrlo je važno uzeti u obzir izvor kože korištene u ispitivanju, te obratiti pozornost na činjenicu da je koža miša permeabilnija od ljudske kože (Wu i sur., 2009). Glavni putevi transporta nanočestica ZnO i TiO_2 su intacelularni put, te putem folikula dlaka. Ipak penetracija nanočestica TiO_2 i ZnO nije zabilježena kod ljudi (Lekki i sur., 2007).

Metalne nanočestice poput nanočestica zlata, srebra, željeza, te željezovog oksida privlače pozornost u različitim biomedicinskim područjima. Nnaočestice zlata, željeza i željezovog oksida koriste se u fototermalnoj terapiji hipertermije i kao sredstva za detekciju tumora. Nanočestice srebra se široko koriste u pripravcima za lokalnu primjenu, zbog svojeg antiseptičkog učinka. Zbog svojih nano veličina, ove čestice mogu prodrijeti kroz kožu, što dovodi do sistemske apsorpcije. U posljednjih 10 godina provedene su mnogobrojne studije kako bi se utvrdio kapacitet penetracije ovih sustava.

Studije provedene s nanočesticama zlata (prosječne veličine 15, 102 i 198 nm), pokazale su akumulaciju i penetraciju tih čestica kroz kožu štakora, te je također utvrđeno da je penetracija kroz kožu ovisna o veličini. Manje čestice pokazale su bržu penetraciju. Osim

toga, povećanjem veličine čestica, zaostajno vrijeme (eng. *Lag time*) penetracije čestica se povećava.

In vitro studije pokazale su da metalne nanočestice, poput nanočestica željeza i željezovog oksida srednje veličine manje od 10 nm, mogu prodrijeti kroz kožu. To prodiranje događa se kroz folikule dlaka i kroz lipidni matriks *stratum corneuma*. Iako su takve čestice povremeno detektirane u epidermisu, spektroskopske analize sugeriraju da te metalne nanočestice ne mogu penetrirati kroz kožu. Zabilježena penetracija je zapravo pripisana ekstremno malim dimenzijama čestica (Baroli i sur., 2007). Također nanočestice srebra (25 nm) imaju vrlo nisku apsorpciju kroz kožu. One mogu penetrirati kroz rožnati sloj kože, međutim rijetko dosežu najdublji sloj epidermisa. S obzirom da su čestice promjera u rasponu između 7 i 20 nm uglavnom detektirana u folikulama dlaka, može se zaključiti da su dimenzije nanočestica vrlo važan parametar u smislu njihove penetracije kroz kožu. Zabilježena niska apsorpcija srebra u nekim studijama sugerira otapanje čestica, čime se omogućuje elementarnom srebru da penetrira kroz kožu (Larese i sur., 2009).

Općenito u slučaju metalnih nanočestica, penetracija i permeabilnost kroz kožu je izravno ovisna o njihovoj srednjoj veličini, te manje čestice penetriraju dublje. To penetriranje kroz kožu, događa se uglavnom kroz folikule dlaka i kroz lipidni matriks *stratum corneuma*.

4.3. REOLOŠKA SVOJSTVA PRIPRAVAKA S NANOČESTICAMA

Reološka analiza je temelj za optimizaciju terapijskih sustava za lokalnu primjenu, jer se koristi za predviđanja *in vivo* ponašanja materijala te je neizostavna za razvoj, fizikalno-kemijsku karakterizaciju i kontrolu kvalitete dermatoloških pripravaka (Ramirez i sur., 1999). Reologija proučava svojstva kao što su viskoznost, plastičnost, elastičnost i deformaciju materijala pod utjecajem stresa (Schott, 2000). Reološko ponašanje je specifično za svaki materijal, te je određeno kvalitativnim i/ili kvantitativnim sastavom formulacije. Nadalje, reološka svojstva su povezana s važnim karakteristikama lijeka kao što su fizikalno-kemijska stabilnost, svojstva oslobađanje djelatne tvari, te primjenjivost pojedine formulacije. S obzirom na složenost nanostrukturiranih materijala i uporabom tih sustava kao nosača u lokalnim pripravcima, reološka analiza je nužna za razumijevanje interakcija između nanostrukturiranih nosača i djelatne tvari.

Analiza reoloških svojstava polučvrstih pripravaka (za lokalnu primjenu) s inkorporiranim čvrstim lipidnim nanočesticama je bitna za utvrđivanje tehnološkog potencijala tih sustava. Kako bi se pokazao utjecaj reoloških svojstva na fizikalno-kemijska i biološka svojstva polučvrstih pripravaka s nanočesticama, provedena je analiza reoloških svojstva polučvrstih oblika prije i poslije inkorporiranja čvrstih lipidnih nanočestica.

Čvrste lipidne nanočestice (bez uklopljene djelatne tvari) su pripremljene s Dynasan® 116 ili Dynasan® 116/Mygliol® 812 (70:30), te su inkorporirane u četiri različita hidrogela (Souto i sur., 2004). Hidrogelovi su pripremljeni s 1% ksantanskom gumom, ili s 1.75% hidroksietil celulozom, ili s 0.5% Carbopol® 943, ili s 1% kitozanom. Sve formulacije sadrže 5% glicerola. Nakon inkorporacije čvrstih lipidnih nanočestica (SLN) u hidrogelove, zapaženo je da hidrogelovi s ksantanskom gumom, hidroksietil celulozom i Carbopol® 943 pokazuju plastična svojstva, dok hidrogel s kitozanom pokazuje Newtonovo ponašanje. Opaženo je da SLN imaju strukturu sličnu gelu, te povećanje sadržaja lipida u sustavu dovodi do svojstva tiksotropije (promjene viskoznosti tvari kao posljedice smicanja, te ponovnog povratka u prvotno stanje nakon prestanka djelovanja uzroka poremećaja).

4.4. LOKALNA PRIMJENA ČVRSTIH LIPIDNIH, POLIMERNIH I ANORGANSKIH NANOČESTICA

Lokalna primjena je vrlo atraktivan način primjene lijekova. Međutim, primjena lijekova putem kože je vrlo selektivna, u smislu lijekova koji mogu pasivno prijeći kroz vanjski sloj kože (*stratum corneum*), (Guterres i sur., 2007). Tijekom proteklih pet godina, uporaba SLN je naročito atraktivna u području kozmetike. Studije koje opisuju povećanje kemijske stabilnosti, nestabilnih kozmetičkih pripravaka, kao što su retinol, Q10 koenzim i vitamin C pomoću SLN, dostupne su u literaturi (Wissing i sur., 2004). Osim povećanja stabilnosti nestabilnih spojeva, SLN također smanjuju gubitak vode iz kože i time povećavaju njenu hidrataciju. Nadalje, povećavaju prodiranje djelatnih tvari kroz određene slojeve kože, te produljuju oslobađanje djelatne tvari i smanjuju njihovu sistemsku apsorpciju (Attama i Muller-Goymann, 2008).

Chen i suradnici su istraživali primjenu SLN s inkapsuliranim podofilitoksinom (eng. Podophyllotoxin, POD), koji inhibira rast epitelnih stanica inficiranih humanim papiloma virusom (HPV) u epidermisu. POD se koristi kao lijek za prvu liniju lječenja vaginalnih bradavica. Međutim, ovaj lijek se prilikom lokalne primjene apsorbira sistemski te uzrokuje

ozbiljne nuspojave. Stoga je potrebno razviti formulaciju koja će smanjiti sistemsku apsorpciju djelatne tvari i povećati njeno zadržavanje u epidermisu, što je moguće postići inkapsuliranjem POD u SNL. Studije permeabilnosti kroz kožu, bile su izvedene na Franz difuzijskim ćelijama, koristeći svinjsku kožu. Nakon osam sati primjene POD inkapsuliranih u SLN, prisutnost lijeka u akceptorskom odjeljku Franz difuzijskih ćelija nije bila uočena. Ovaj rezultat pokazuje da nanokapsulirana djelatna tvar ne prodire kroz svinjsku kožu. Dakle, inkapsulacijom POD u SNL može se spriječiti sistemska apsorpcija lijeka nakon lokalne primjene. Nadalje, opažena je četverostruko veća akumulacija lijeka u svinjskoj koži u slučaju inkapsulacije POD u SNL, u odnosu na slobodan oblik.

Mercato i suradnici su proveli istraživanje s uklopljenim benzofenonom-3 (BZ3) u SLN i polimernim nanočesticama u kremi za sunčanje. Veliki je interes za razvojem novih krema za sunčanje, zbog štetnog djelovanja UV zračenja na kožu, poput eritema i indukcije raka kože. Međutim, mnoge kreme za sunčanje poput BZ3 penetriraju kroz kožu uzrokujući alergijske i fototoksične reakcije te iritaciju kože (Simeoni i sur., 2006). Polimerne nanočestice i SLN s inkapsuliranim BZ3, bile su stabilne 40 dana. Penetracija kroz kožu BZ3 uklopljenog u polimerne nanočestice je manja od BZ3 uklopljenog u SNL. Zaštitni faktor (eng. *Sun protector factor*, SPF) je veći kada je BZ3 uklapa u SLN (SPF 21), nego u polimerne nanočestice (SPF 18). U obje formulacije SPF je veći nego kod krema za sunčanje bez nanočestica (SPF 16). Nadalje, BZ3 inkapsuliran u SLN ne pokazuje citotoksične, ni fototoksične učinke u humanim keratinocitima (HaCaT stanicama) i fibroblastima (BABL/c3T3), dok polimerne nanočestice s BZ3, pokazuju potencijal fototoksičnosti u HaCaT stanicama. Ipak, BZ3 inkapsuliran u SNL ili u polimerne nanočestice ne uzrokuje alergijske reakcije kod miševa, što te nanočestice čini vrlo zanimljivim kao nosačima u kremama za sunčanje.

U drugoj studiji, toksičnost SLN pripremljenih s cetilnim esterom sa i bez BZ3, se procjenjivala na embriju zebraste ribice. Zebrasta ribica se pojavljuje kao svestrani model za analizu širokog spektra tvari, uključujući i nanočestice. U ovoj studiji, smrt svih zametaka zabilježena je kad je BZ3 testiran pri koncentracijama do 500 μmol L^{-1}. BZ3 inkapsuliran u SLN ne pokazuje nikakav toksičan učinak, čak ni pri koncentracijama od 550 μmol L^{-1}. Nadalje razvojne promjene u zebrastoj ribici nisu zabilježene, što ukazuje na smanjenje potencijala oštećenja kože kada je BZ3 inkapsuliran u SLN (Marcato i sur., 2008).

Posljednjih godina, farmaceutska i kozmetička primjena peptida i proteina je u poratsu, a uključuje terapiju raka, infektivnih bolesti, autoimunih bolesti, AIDS i tretmane protiv starenja. Međutim, klinička primjena peptida i proteina predstavlja mnoge izazove. Kemijska

i fizička stabilnost ovih molekula ovisi o okolišnim čimbenicima koji uključuju pH, ionsku jakost medija, temperaturu, tlak, metalne ione, površinski aktivne tvari i mješanje. Nadalje, većina ovih molekula je hidrofilna i jednostavno se biorazgrađuje u ljudskom tijelu (Lopedota i sur., 2009).

Terapijski sustavi s nanočesticama omogućuju farmaceutsku i kozmetičku primjenu proteina i peptida, zbog poboljšanja njihove stabilnosti, kao i povećanja njihove *in vivo* aktivnosti i penetracije kroz kožu (Marcato i Duran, 2008).

Provedene su mnoge studije penetracije polimernih nanočestica kroz kožu. Ostvareni rezultati pokazuju da veličina čestica, lipofilnost, rigidnost i naboj imaju ključnu ulogu u određivanju profila permeabilnosti nanočestica kroz kožu (Hoet i sur., 2004). Što se tiče naboja nanočestica, proučavale se primjena pozitivnih, negativnih i neutralnih nanočestice lateksa, veličine 50 nm, 100 nm, 200 nm i 500 nm. U toj studiji zapaženo je da su samo negativno nabijene čestice veličine 50 nm i 500 nm mogu prodrijeti kroz kožu (Kohli i Alpar, 2004). Ti rezultati ukazuju da se mora postignuti određena vrijednost naboja kako bi se omogućilo adekvatno odbijanje lipida, što rezultira privremenim stvaranjem kanala unutar kože što dovodi do boljeg prodiranja čestica kroz kožu. U drugoj studiji, zabilježeno je da Nile crvena boja inkapsulirana u polimerne nanočestice (srednjeg promjera 250 nm) doseže veće dubine u koži u odnosu na Nile crvenu boju u nanočesticama propilen glikola istih koncentracija (Alvarez-Roman i sur., 2004). U narednoj studiji zabilježena je akumulacija fluorescentnih nanočestica polistirena (20 nm i 200 nm) u folikulama dlaka, dok njihov prolaz kroz kožu nije dokazan. Temeljem ovog istraživanja, autori zaključuju da u prvoj studiji nije došlo do penetracije polimernih nosača kroz kožu, već da je prodiranje Nile crvene boje vjerojatno povezano s oslobađanjem boje iz nanočestica. Također, je spitivana transkutana permeabilnost nanosfera poli(L-laktid-ko-glikolida) kovalentno vezanih na fluorescein i Texas Red, prilikom čega nije opažena značajnija penetracija čestica kroz kožu. Fluorescein je ostao akumuliran na površini kože, dok se Texas Red oslobodio iz nanočestica i akumulirao u donjem sloju *stratum corneuma* (otprilike 20 μm dubine), tijekom perioda od 5 sati.

Nanokapsule poli(kaprolakton)-poli(etilen glikol)-poli(kaprolakton) kopolimera, prosječnog promjera od 122 nm i debljine polimernog zida od 25 nm, pokazuje svojstvo deformacije (Rastogi i sur., 2009). Studije permeabilnosti su pokazale da ti kopolimeri prodiru kroz slojeve *startum corneuma*. Autori su predložili da deformabilnost ovog sustava povećava propusnost kroz kožu. Retinil palmitat ulje (koje se široko koristi u tretmanima protiv starenja) uklopljeno u polimerne nanočestice prosječnog promjera 215 nm, također pridonosi

deformabilnosti sustava. Ovaj sustav je dovoljno fleksibilan da prođe kroz pore promjera manjeg od 215 nm i da povrati svoju prvobitnu konfiguraciju (sferični oblik). Također, ovaj sustav je nakon 4 sata sposoban dosegnuti u dublje slojeve *stratum corneuma*, što je otprilike 30 μm.

Ove studije pokazuju da se većina polimernih nanočestica zadržava u *stratum corneumu* i da mogu poboljšati otpuštanje djelatne tvari kroz kožu. Fleksibilnost je ključni čimbenik u permeabilnosti i penetraciji djelatne tvari. Sustavi koji su fleksibilniji pokazuju značajnije prodiranje u dublje slojeve kože. Usporedbom između polimernih nanosfera i fleksibilnih polimernih nanokapsula, dokazano je da su kapilarne adhezijske sile dovoljno jake da deformiraju fleksibilne polimerne nanokapsule, ali ne i polimerne nanosfere.

Anorganske nanočestice se koriste u liječenju kožnih bolesti, kao i u kozmetici. Bez sumnje, najčešće korištena vrsta anorganskih nanočestica su nanočestice srebra (Keck i Schwabe, 2009). Uočen je brz porast broja mikroorganizama otpornih na konvencionalnu terapiju antibioticima i antifungalnim lijekovima. Stoga, postoji izražena medicinska potreba za razvojem novih antifungalnih lijekova s novim mehanizmom dijelovanja (Elkeeb i sur., 2010). U liječenju onikomikoza (Tinea unguium), koja pogađa preko 20% svjetske populacije, permeabilnost noktiju je jedan od glavnih čimbenika koji ograničavaju učinkovito liječenje te bolesti. Najčešća terapija je u obliku lakova za nokte, međutim ona je ograničena niskom permeabilnošću djelatne tvari. Strukture antifungalnih lijekova su vrlo različite i uključuju poliene (nistatin) koji *in vitro* pokazuju fungicidno i fungistatsko dijelovanje. Nadalje, uključuju imidazole (klotrimazol, tiokonazol, ekonazol, ketokonazol, mikonazol, sulkonazol i oksikonazol) koji *in vitro* pokazuju fungistatsko dijelovanje, te alilamine i bezilamine (naftifin, terbinafin i butenafin) koji *in vitro* imaju fungistatsko i fungicidno dijelovanje.

Ciklopiroks lak za nokte (8%-na otopina), koji je odobren od strane FDA-a (Food and drug administration), inhibira transport esencijalnih elemenata u stanice gljivice, što narušava sintezu staničnih proteina, DNA i RNA. No nažalost, dvostruko slijepa placebom kontrolirana studija pokazala je da samo 1 od 15 pacijenata koji koriste lak ostvaruju povoljan klinički učinak, odnosno izliječen inficirani nokat. U tom pogledu, značajni napori su napravljeni u posljednjih nekoliko godina, te je nedavno opisana nova skupina antifungalnih lijekova (oksaborol) koja prodire kroz nokat učinkovitije od ciklopiroksa (Hui i sur., 2007). U Europi se koristi amorlofin lak (8 %-na otopina), koji inhibira sintezu ergosterola (komponenta gljivične stanične membrane), a njegova stopa izlječenja iznosi od 45% do 50%. S ciljem razvoja odgovarajućih formulacija za lokalnu primjenu, postoji

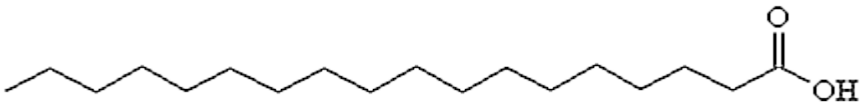
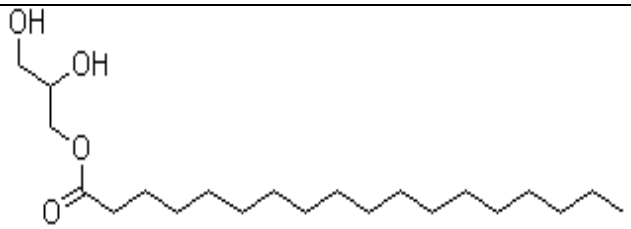
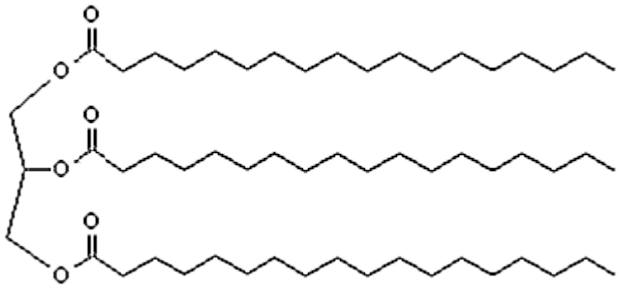
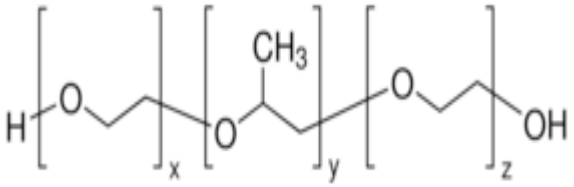
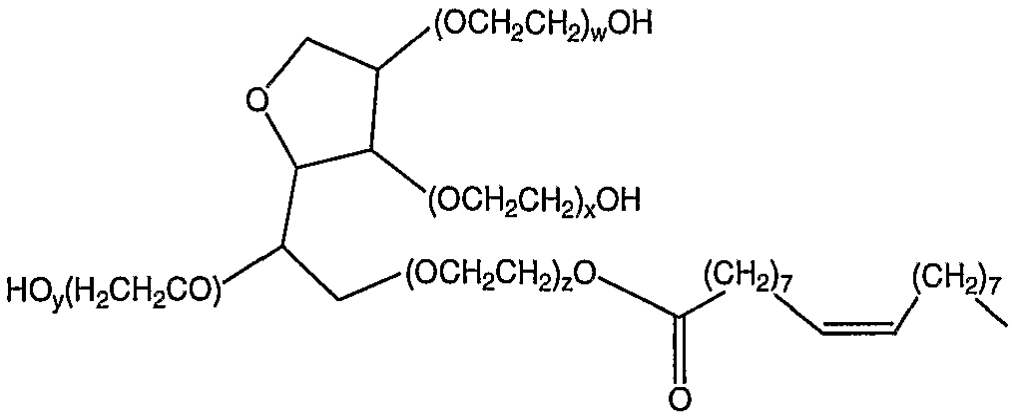
potreba za razvojem novih terapijskih sustava s boljom sposobnošću penetracije u nokat. Jedna od novih strategija, koja ima veliki potencijal, je u primjeni nanočestica. Uporaba nanočestice srebra je novi pristup koji uključuje novi mehanizam djelovanja u liječenju onikomikoza. Prema tome, razvijen je novi proizvod u obliku gela, koji sadrži nanočestice srebra (Duran i sur., 2010). Klinički učinak ovog novog proizvoda je bio ispitan kod bolesnika. Lijek se primjenjivao jedan put dnevno tijekom 120 dana. Tijekom trajanja studije, bolesnici nisu smjeli primati drugu terapiju. Ispitivana skupina bila je formirana nakon dobrovoljnog savjetovanja s pacijentima, koji su bili između 40 i 70 godina i koji su bolovali od *Trychophyton rubrum* infekcije. Liječenje *Trychophyton rubrum* infekcije je vrlo zahtjevno, zbog dubokog penetriranja gljivice u nokat. Tijekom studije u nekoliko pacijenata je zabilježeno da gljivične hife prodiru sve do matriksa nokta (tkivo nokta koji se nalazi ispod ploče nokta). Na slici 6. vizualno je prikazano stanje bolesnika nakon 4 mjeseca terapije.



Slika 6. Prikaz stanja bolesnika nakon 4 mjeseca lokalne terapije s nanočesticama srebra, lijevi nokat pripada desnom stopalu, a desni nokat odgovara normalnom noktu na lijevom stopalu istog pacijenta, koji se koristio kao kontrola.

4.5. PRIPREMA ČVRSTIH LIPIDNIH, POLIMERNIH I ANORGANSKIH NANOČESTICA

Čvrste lipidne nanočestice (SLN) su pripravljene od lipida u čvrstom stanju (na sobnoj i tjelesnoj temperaturi), površinski aktivnih tvari i vode (Slika 7), (Marcato, 2009). Općenito, lipidi koji se koriste su trigliceridi (npr. miristil miristat), gliceridi (npr. gliceril monostearat), masne kiseline (npr. palmitinska kiselina), steroidi (npr. kolesterol) i voskovi (npr. cetil palmitata). Površinske aktivne tvari se koriste za spriječavanje aglomeracije čestica. Zbog toga, izbor površinski aktivnih tvari je vrlo važan korak u pripremi SLN.

LIPIDI	STRUKTURA
Stearinska kiselina	
Gliceril monostearat	
Tristearin	
POVRŠINSKI AKTIVNE TVARI	**STRUKTURA**
Poloksamer F68	
Polisorbat 80	

Slika 7. Prikaz lipida i povšinski aktivnih tvari, koje se koriste u pripremi SLN

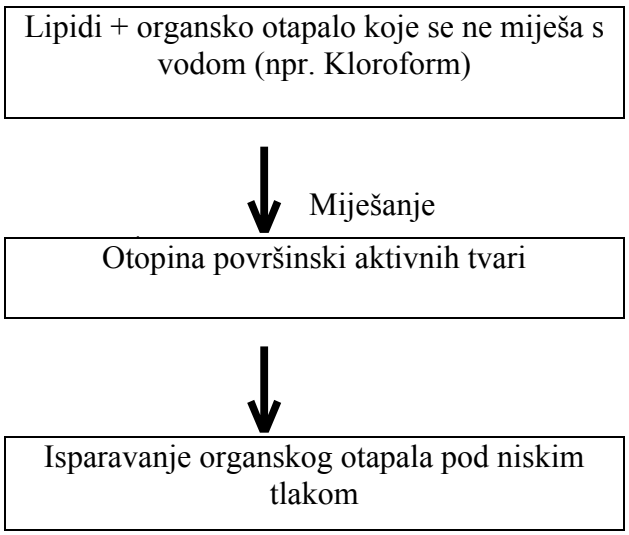
Postoje 4 metode koje se koriste u pripremi SLN: vruća mikroemulzija, emulgiranje i uparavanje otapala, difuzija otapala i homogenizacija pod visokim tlakom (eng. High pressure homogenization, HPH). Najvažnija i najčešće korištena je HPH metoda.

Postupak mikroemulzije razvio je Gasco, a drugi autori su je modificirali. Mikroemulzija se priprema s 10% rastaljenog lipida (npr. stearinske kiseline), 15% površinski aktivnih tvari (npr. Polisorbat 20 ili 60), više od 10% kosurfraktanta (npr. Poloksamer) i vode. Slika 8. prikazuje proces pripreme vruće mikroemulzije. Posljednji korak ove metode je dodatak vruće mikroemulzije u hladnu otopinu površinski aktivnih tvari, da bi došlo do skrućivanja čestica (Pedersen i sur., 2006). Nedostaci ove metode su suvišak vode koji se mora odstraniti, te visoke koncentacije površinski aktivnih tvari i kosurfraktanta. Suvišak vode može se ukloniti ultracentrifugiranjem, liofilizacijom ili dijalizom.



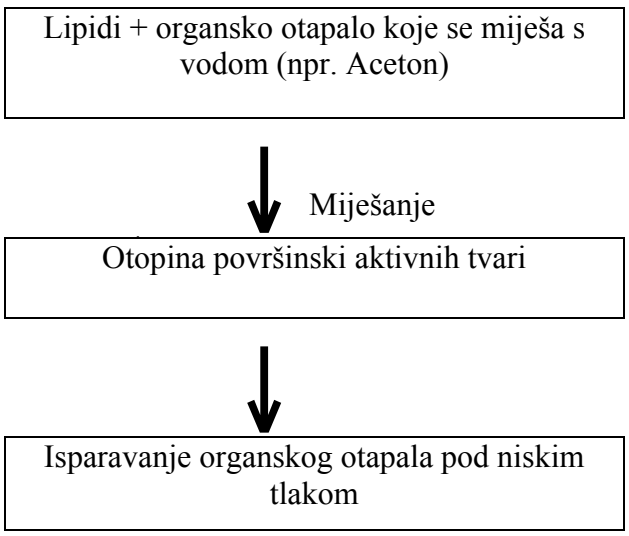
Slika 8. Shema pripreme SLN medotom vruće mikroemulzije

Slika 9 prikazuje shemu pripreme SLN metodom emulgiranja i uparavanja otapala. Nakon dodatka otopine lipida i organskog otapala koji se ne miješa s vodom, otopini površinski aktivnih tvari, nastaje emulzija tipa U/V. Prednost ove metode je mogućnost uklapanja termolabilnih molekula, međutim ova metoda ima i nedostatke, kao što su ostatna otapala u konačnom proizvodu, te popratna proizvodnja mikročestica (Uner, 2006).



Slika 9. Shematski prikaz pripreme SLN metodom emulgiranja i uparavanja otapala.

Metoda difuzije otapala je prvo razvijena za pripremu polimernih nanočestica. Ova metoda je jednostavna i ne zahtjeva posebnu opremu (Slika 10). Međutim, njen nedostatak je uporaba organskih otapala i poteškoće vezane uz proizvodnju u većem razmjeru (eng. Scale up process), (Hu i sur., 2006).

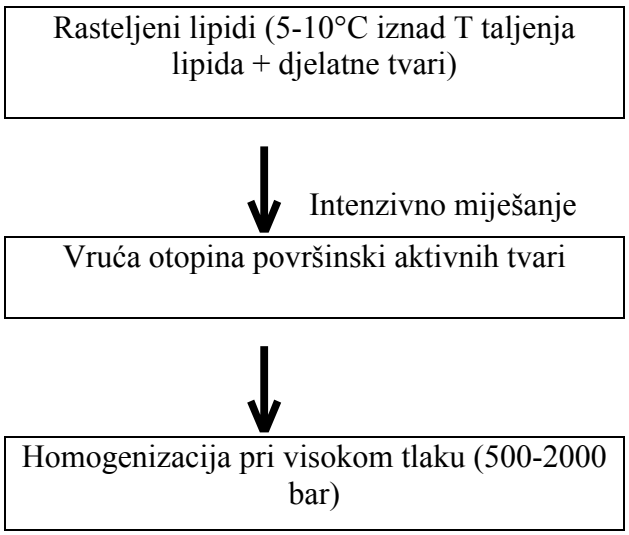


Slika 10. Shematski prikaz pripreme SLN metodom difuzije otapala

U postupku HPH disperzija se homogenizira pri visokom tlaku (500-2000 bar) kroz usku šupljinu (nekoliko mikrometara) i ubrzava preko kratke udaljenosti pri velikoj brzini (oko 100 km/h). Pod djelovanjem visokog tlaka i kavitacije nastaju nanočestice. HPH metoda se

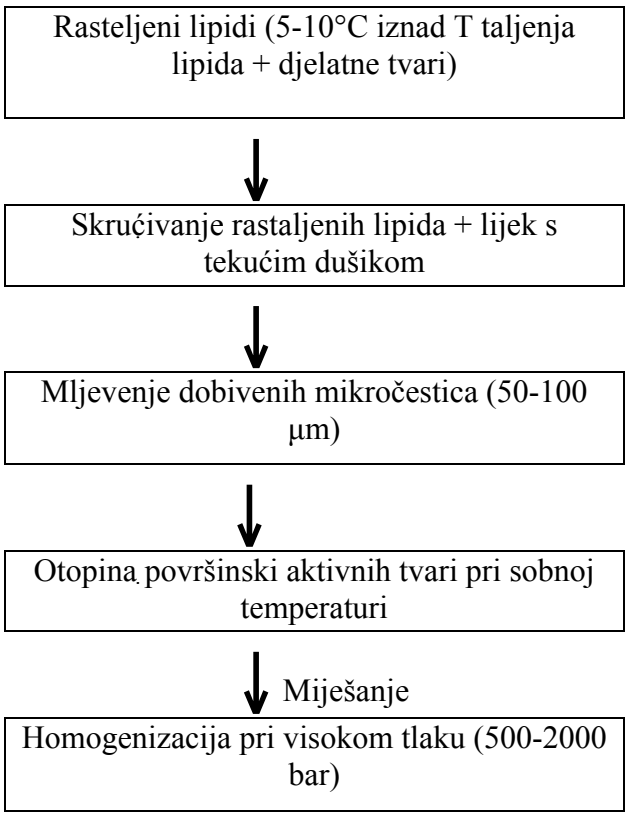
može provesti na dva načina, putem vruće homogenizacije i hladne homogenizacije. U vrućoj HPH cijeli proces se provodi pri temperaturama iznad temperature tališta lipida. Nakon homogenizacije emulzije, disperzija se ohladi kako bi se dobile čvrste lipidne nanočestice. Shema na slici 11 prikazuje postupak vruće HPH. Općenito, 1-3 ciklusa je dovoljno za dobivanje nanočestica zadovoljavajućeg raspona veličina. Ova metoda se najčešće primjenjuje za uklapanje lipofilnih lijekova (Mehnert i Mader, 2001).

Postupak hladne homogenizacije se primjenjuje za uklapanje hidrofilnih lijekova. Shema na slici 12 prikazuje hladni postupak homogenizacije. Čvrsto stanje matriksa smanjuje migraciju hidrofilne djelatne tvari u vodenu fazu, te povećava učinkovitost inkapsuliranja. Nadalje u ovoj metodi je moguće inkapsulirati termolabilne tvari zbog vrlo kratkog vremena u kojem je lijek izložen visokim temperaturama.



Slika 11. Shematski prikaz pripreme SLN metodom vruće homogenizacije

Postupkom vruće homogenizacije dobivaju se nanočestice veličine manje od 500 nm, dok postupkom hladne homogenizacije nastaju nanočestice većih veličina. Međutim, smanjenje velićine nanočestica može se postići povećanjem tlaka (Uner i sur., 2007).



Slika 12. Shematski prikaz pripreme SLN metodom hladne homogenizacije

Prednosti HPH metode (vruće ili hladne) su proizvodnja SLN bez uporabe organskih otapala i jednostavan *scale up* proces. Međutim, primjena visokog tlaka može dovesti do spajanja čestica, a visoke temperature primjenjene u procesu mogu ubrzati raspadanje lijeka i nanočestica.

Glavne metode koje se koriste za pripravu polimernih nanočestice mogu se podijeliti u dvije kategorije: metode bazirane na polimerizaciji monomera i metode bazirane na modifikaciji polimera (Vauthier i Bouchemal, 2009). Polimerizacija monomera se rjeđe koristi zbog neželjenih kemijskih reakcija, koje mogu inaktivirati djelatnu tvar, te također zbog toga što zahtijeva dodatni korak pročišćavanja za uklanjanje inicijatora polimerizacije i ostatnih monomera. Zbog toga, najčešća korištena metoda za pripremu nanočestica je modifikacija polimera. Modificirani polimeri koji se najčešće koriste su biorazgradljivi i biokompatibilni, te su odobreni od strane FDA. Primjeri uključuju poli(D,L-laktid, PLA), poli(ε-kaprolakton, PCL), poli(D,L-glikolid, PLG) i poli(laktid-ko-glikolid, PLGA). Polimeri koji su biokopatibilni ali ne i biorazgradljivi su naprimjer poli-alkil-cijanokrilat, koji se također koristi za lokalnu primjenu. Prirodni biorazgradljivi i biokompatibilni polimeri su kitozan i alginat, koji se također široko koriste u ovom području. Upotreba stabilizatora je

nužna, zbog povećanja površinske napetosti kao posljedice smanjenja veličine čestica. Polivinil alkohol je jedan od najčešće korištenih stabilizatora, zbog većeg kapaciteta stabilizacije i sprečavanja agregacije u odnosu na ostale stabilizatore. Međutim, njegova primjena je ograničena, zbog toga što nije prikladan za intravenoznu primjenu. Poloksameri, također poznati kao Pluronic®, se naširoko koriste kao stabilizatori zbog manje citotoksičnosti. Dok polisorbati i njihovi esteri (Tweens i Spans) se koriste kao neionske lipofilne i hidrofilne površinski aktivne tvari.

Glavne metode pripreme polimernih nanočestica, koje se temelje na modifikaciji svojstava polimera su: nanoprecipitacija, emulgiranje i uparavanje otapala, isoljavanje i difuzija otapala. Izbor metode ovisi o željenim karakteristikama nanočestica (veličine i polidisperznosti), o tipu polimera, kao i o svojstvima lijeka kojeg treba uklopiti u nanočesticu.

Nanoprecipitacija je metoda izbora kada su polimer i lijek topljivi u organskom otapalu koji se miješa s vodom. To je jednostavna, brza, reproducibilna i ekonomična metoda pripreme polimernih nanočestica. Ovisno o kemijskoj komponenti, koloidna suspenzija se sastoji od nanosfera ili nanokapsula i lijeka koji je otopljen u, adsorbiran na ili kemijski vezan za polimerni matriks (Guterres i sur., 2007). U pripremi nanosfera, polimer i lijek se otapaju u organskom otapalu koji se miješa s vodom, naprimjer u acetonu, dok se nanokapsule dobivaju nanoprecipitacijom iz modificiranih polimera. U ovom slučaju, ulja kao što su kapronski ili kaprinski trigliceridi i po izboru lipofilna površinski aktivna tvar, su također otopljeni u organskoj fazi. Zatim se organska faza dodaje u vodenu fazu, pri čemu dolazi do brze difuzije organskog otapala prema vodi. Sastojci koji su netopljivi u vodi talože se formirajući nanočestice. Organsko otapalo odstrani se isparavanjem ili drugim metodama ekstrakcije i konačna suspenzija se koncentrira. Prosječni promjeri nanosfera i nanokapsula dobivenih ovom metodom se kreću oko 100 nm i 200 nm (Teixeira i sur., 2010). Varijable u ovoj tehnici o kojima ovisi veličina čestica su vrsta otapala i polimera. Druge varijable kao što su volumen faza, brzina miješanja i vrsta i koncentracija stabilizatora ne utječu značajno na veličinu čestica. U razvoju nanokapsula treba provesti test topljivosti, kako bi se uvjerili da je polimer netopljiv u ulju. Također, topljivost lijeka u ulju treba biti visoka da bi se spriječilo „curenje“ lijeka nakon pripreme.

Druga najčešće korištena metoda je emulgiranje i uparavanje otapala. To je postupak u kojem se otapalo koje se ne miješa s vodom koristi u organskoj fazi. Glavna otapala koja se koriste u ovoj tehnici su diklormetan i kloroform. U ovoj metodi, organska faza koja sadrži lijek i polimer, dodaje se u vodenu fazu koja sadrži stabilizator. Zatim, emulzija tipa ulje u vodi

(U/V) dobiva se postupcima emulgiranja uz primjenu ultrazvuka, koloidnog mlina ili mehaničkim miješanjem. Čestice nastaju uklanjanjem otapala, te iz svake kapljice nastaje jedna čestica. Nanokapsule je također moguće pripremiti na ovaj način, dodavanjem ulja u organsku fazu. Više je varijabli uključeno u ovaj proces nego u nanoprecipitaciji, poput brzine miješanja, viskoznosti vodene faze, vrste površinski aktivnih tvari i omjera organske i vodene faze. Distribucija veličine čestica uglavnom ovisi o brzini miješanja, te o koloidnim karakteristikama kao što je Ostwald-ovo zrenje (Teixeira i sur., 2008). Modifikacija ovog postupka, kojim se dobiva dvostruka emulzija tipa voda-u-ulju-u-vodi (V/U/V), u pravilu se koristi za uklapanje lijekova topljivih u vodi. U ovom postupku polimer se otopi u organskom otapalu, te prema potrebi dodaje se lipofilna površinski aktivna tvar. Vodena faza koja sadrži djelatnu tvar se emulgira u organskoj fazi, čime se dobiva prva emulzija tipa voda-u-ulju. Ta se emulzija zatim dodaje u vodenu fazu i provodi se proces emulgiranja, čime se u konačnici dobiva dvostruka emulzija tipa V/U/V. Uklanjanjem organskog otapala formiraju se nanočestice koje sadrže uklopljene hidrofilne djelatne tvari, koje su obično veće od nanočestica dobivenih metodom jednostruke emulzije. Postoji još jedan pristup, a to je uporaba višestruke emulzije tipa U/V/U, koja ostvaruje bolje rezultate u uklapanju hidrofilnih djelatnih tvari i manji indeks polidisperznosti od nanočestica pripremljenih iz emulzija tipa V/U/V. Dodatkom soli kao što je NaCl u vodenu fazu, izbjegava se migracija lijeka u vanjsku vodenu fazu, čime se povećava učinkovitost uklapanja (Marcato i sur., 2010).

Metoda isoljavanja (eng. Salting out) je nadogradnja metoda nanoprecipitacije i emulgiranja i isparavanja otapala, u kojima se emulzija dobiva s otapalom koji se miješa s vodom, na primjer aceton. Vodenoj fazi se dodavaju visoke koncentracije soli ili saharoze, prije dodavanja organskoj fazi. Soli koje se obično koriste su kalcijev klorid, natijev klorid, magnezijev acetat i magnezijev klorid. Topljivost organske faze se mijenja, zbog zadržavanja molekula vode koje otapaju elektrolite. Umjesto difuzijskog procesa, razdvajanje faza se postiže dodavanjem organske faze u vodenu fazu. Nakon emulgiranja, nanočestice se dobivaju dodatkom destilirane vode. Organsko otapalo u kapima difundira do vodene faze i polimeri se istalože. Otapalo i sredstva za isoljavanje se obično uklanjaju filtracijom. Glavne varijable u tom procesu su koncentracija stabilizatora i sredstva za isoljavanje (Galindo-Rodriguez i sur., 2005).

Metoda difuzije otapala je modifikacija metode isoljavanja, u kojoj se upotebljava otapalo koje se djelomično miješa s vodom, kao na primjer etil acetat. Prije procesa emulgacije, zasićena otopina vode i otapala dobiva se njihovim miješanjem i odvajanjem faza. Polimer i djelatna tvar otapaju se u zasićenoj otopini vode i organskog otapala, dok se površinski

aktivna tvar otapa u vodenoj fazi. Te se faze zatim emulgiraju. Sljedeći korak je razrjeđenje s vodom, u kojem organsko otapalo difundira iz kapljica, čime se formiraju nanočestice. Prosječni promjeri čestica uglavnom se kreću između 140 nm i 650 nm. Glavne varijable u tom postupku su brzina miješanja i vrsta otapala, koje se mogu prilagoditi kako bi se smanjila veličina čestica i povećala mješavost sa vodom.

Procedure koje se koriste za pripremu različitih vrsta metalnih nanočestica su vrlo slične, a zajednički im je korak redukcija metalnih iona. Postupak redukcije upotrebom natrijevog borhidrida se najčešće koristi za proizvodnju nanočestica srebra, dok druge metode uključuju upotrebu citrata, glukoze, hidrazina i askorbata. Jedna od strategija za dobivanje kontrolirane veličine čestica uključuje postupak od dva koraka, u kojem se prvo koristi jako pa slabo redukcijsko sredstvo (Marambio-Jones i Hoek, 2010). Druga metoda koja se koristi za sintezu nanočestica srebra je solvatirana disperzija metalnih atoma (eng. Solvated metal atom dispersion, SMAD). U ovoj metodi, metal ko-isparava s otapalom na ohlađenu površinu tekućeg dušika. Uklanjanjem tekućeg dušika, metalni atomi i otapalo se zagrijavaju, što uzrokuje agregaciju metalnih atoma. Nanočestice dobivene SMAD metodom se dalje pročišćavaju grijanjem u inertnoj atmosferi u prisutnosti odabranih liganda, što dovodi do proizvodnje čestica uskog raspona veličine. Kao rezultat tog procesa, dobivaju se monodisperzne sferične čestice (Smetana i sur., 2008).

Kod „zelenih“ metoda sinteze nanočestica srebra koriste se polisaharidi, polifenoli, Tollens-ov reagens (amonijeva otopina srebrovog nitrata koja sadrži diaminsrebrov(I) kation, koji je oksidirajući reagens), zračenje i biološka redukcija (Sharma i sur., 2009). Kod korištenja polisaharida, redukcija srebra je povezana s oksidacijom aldehidnih skupina u karboksilne skupine. Nanočestice srebra se također mogu sintetizirati ozračivanjem srebrove otopine soli koja sadrži redukcijska i zaštitna sredstva. Biološki postupci za proizvodnju nanočestica srebra, uključuju korištenje bioloških ekstrakta iz organizama kao redukcijskih i zaštitnih sredstava. Takvi ekstrakti mogu uključivati proteine, aminokiseline, vitamine i polisaharide. Biljni ekstrakti se također koriste u proizvodnji nanočestica srebra kao redukcijska sredstva za srebrove ione. Zelenim metodama sinteze se daje prednost nad konvencionalnim metodama (Panacek i sur., 2006).

Bakterijske vrste *Bacillus licheniformis* i *Klebsiella pneumoniae*, te gljive *Verticillium spp., Fusarium oxysporum, Aspergillus flavus* i *Aspergillus niger,* također mogu sintetizirati nanočestice srebra (Rai i sur., 2010). Biosinteza nanočestica srebra putem mikroorganizama uključuje sljedeće korake: približno 10 g *Fusarium oxysporum* biomase se stavi u bocu konusnog oblika koja sadži 100 mL destilirane vode, te se drži 72 h na 28°C, a zatim se

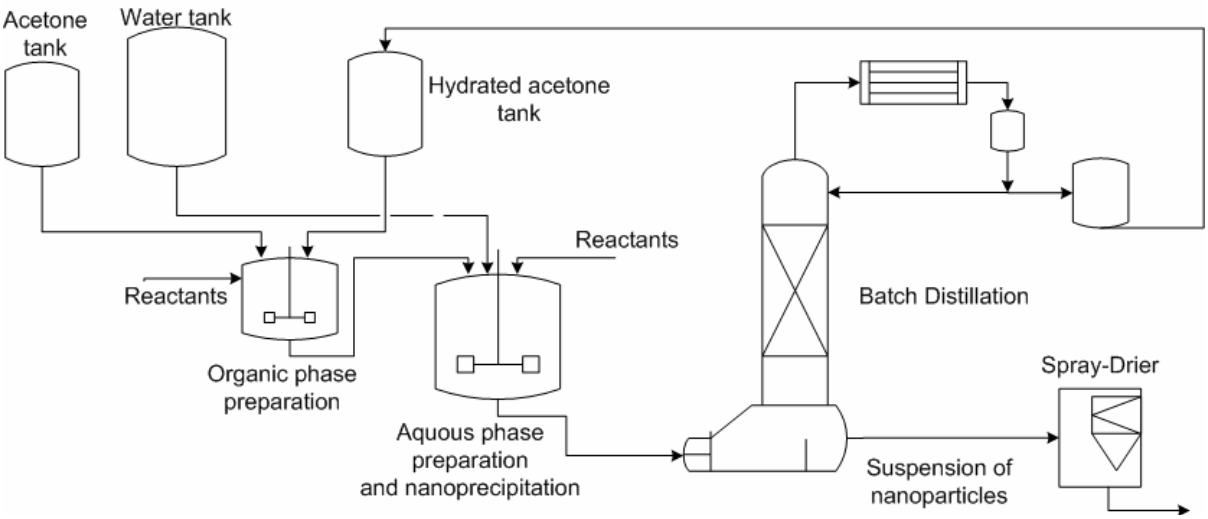
vodena komponenta otopine odvoji filtriranjem. Gljivičnom filtratu dodaje se $AgNO_3$ (10^{-3} mol L^{-1}) i sustav se pohranjuje nekoliko sati na 28°C. Kinetika pripreme nanočestica srebra može se pratiti UV-VIS spektrofotometrijom na 400 nm. Glavne metode karakterizacije su UV-VIS apsorpcija i transmisijski elektronski mikroskop za analizu morfologije nanočestica.

4.6. INDUSTRIJSKA PROIZVODNJA POLIMERNIH NANOČESTICA

Jedna od metoda koja se primjenjuje za laboratorijsku proizvodnju nanočestica je nanoprecipitacija, koja je prvi put predstavljena 1989. godine. To je jednostavna metoda za dobivanje nanokapsula putem taloženja biorazgradljivog i modificiranog polimera, nakon prijenosa semi-polarnog otapala koji se miješa s vodom, iz lipofilne otopine. Kao rezultat toga, ovaj postupak daje sferične vezikularne nanokapsule, koje se sastoje od uljaste šupljine, u kojoj je lijek otopljen i okružen tankom stijenkom dobivenom taloženjem polimera. Kada organska i vodena faza dođu u kontakt, otapalo difundira iz organske faze u vodenu fazu i sa sobom nosi polimerne lance, koje su još uvijek u otopini. Dakle, difuzijom otapala u vodenu fazu, prateći polimerni lanci agregiraju formirajući nanokapsule.

Kod industrijalizacije nekog proizvoda, obavezan korak je provođenje preliminarne analize profitabilnosti, uzimajući u obzir glavne čimbenike koji pridonose ulaganju, proizvodnji i troškovima (Turton i sur., 2003). Osim toga, kada se projektira industrijski proces, važno je ne ograničiti se na točnu reprodukciju laboratorijskog postupka. Trebalo bi uzeti u obzir nekoliko tehnički održivih opcija i analizirati njihov ekonomski potencijal.

Autori su analizirali kako se nanočestice pripremaju u laboratorijskim razmjerima i na temelju toga su predložili nekoliko alternativa za industrijsku proizvodnju. Zatim, na temelju ekonomske analize zaključili su koja je od predloženih alternativa najpogodnija za industrijsku proizvodnju (Slika 13).



Slika 13. Shema alternativnog prijedloga industrijske proizvodnje polimernih nanokapsula

Konačno, iz analiza profitabilnosti autori su zaključili da je bolje podijeliti dnevnu proizvodnju na najmanje dvije serije umjesto jedne. Time se smanjuju troškovi ulaganja, što se u konačnici reflektira na smanjenje konačne cijene proizvoda. Naprimjer, kada se proizvodi 10 kg na dan samo prodajna cijena iznad 1 250,00$ po kilogramu osigurava pozitivnu neto vrijednost na kraju deset godina. Dok u slučaju proizvodnje 20 kg na dan, prodajna cijena koja osigurava pozitivnu neto vrijednost iznosi 1 000,00$ po kilogramu.
Međutim, važno je napomenuti da djelatne tvari u lijekovima i kozmetičkim pripravcima dolaze tek u malim koncentracijama, stoga ovi rezultati cijena dobiveni ekonomskim analizama ne bi trebali biti ograničavajući čimbenik kod industrijske proizvodnje.

5. ZAKLJUČAK

Glavne prednosti primjene polimernih, anorganskih i čvrstih lipidnih nanočestica nad konvencionalnom topikalnom terapijom su smanjenje nuspojava, veća penetracija i permeabilnost djelatne tvari kroz kožu, produženo oslobađanje i zaštita djelatne tvari od razgradnje.

Smanjenje nuspojava je rezultat kombinacije smanjenja sistemske apsorpcije i ciljanog djelovanja, što omogućuje primjenu manjih doza lijeka.

Akumulacija nanočestica u folikule dlaka dovodi do visokih lokalnih koncentracija uklopljenih djelatnih tvari, koje potom difundiraju u različite slojeve kože i omogućavaju produženo oslobađanje djelatne tvari.

Veća stabilnost terapijskih sustava nanometarskih veličina pripisuje se uklapanju djelatne tvari u matriksne ili spremišne sustave, čime se sprječava prijevremena razgradnja djelatnih tvari pod utjecajem vanjskih čimbenika.

Povećanje u permeabilnosti i penetraciji djelatnih tvari inkapsuliranih u čvrste lipidne nanočestice (eng. SLN) je posljedica interakcija lipidnih komponenata SLN i lipida iz *stratum corneuma*, što dovodi do smanjenja barijerne funkcije kože. S druge strane, polimerne nanočestice ne penetriraju u rožnati sloj kože, već je povećanje permeabilnosti djelatnih tvari posljedica velikog izravnog kontakta nanočestica s rožnatim slojem kože i visokoj termodinamičkoj aktivnosti nanočestica.

6. LITERATURA

Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. J. Control. Release, 2004, 99, 53–62.

Alves M., Scarrone AL, Santos M, Pohlmann AR, Guterres SS. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. Int. J. Pharm, 2007, 341, 215–220.

Attama AA, Müller-Goymann CC. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. Colloid Surf A-Physicochem. Eng. Asp, 2008, 315, 189–195.

Baroli B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? J. Pharm. Sci, 2010, 99, 21–50.

Bawarski WE, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa SA. Emerging nanopharmaceuticals. Nanomed Nanotechnol Biol Med, 2008, 4, 82-273.

Beck R, Guterres S, Pohlmann S. Nanocosmetics and Nanomedicines. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2011, str.12-137.

Cevc G, Vierl U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. J. Control Release, 2010, 141, 277–299.

Crosera M, Bovenzi M, Maina G, Adami G, Zanette C, Florio C, *et al*. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: A review of the literature. Int Arch Occup Environ Health, 2009, 82, 10, 43-55.

Degim TI. New tools and approaches for predicting skin permeability. Drug Discov. Today, 2006, 11, 11–12.

Durán N, Bergman-Rossi B, Marcato PD, De Conti R. Biogenic and chemical silver nanoparticles formulation to treat cutaneous leishmaniasis via intralesional treatment. Brazilian Patent, 2010.

Elkeeb R, AliKhan A, Elkeeb L, Hui X, Maibach HI. Transungual drug delivery: Current status. Int. J. Pharm, 2010, 384, 1–8.

Galindo-Rodriguez S, Allemann E, Doelker E, Fessi H. J. Drug Deliv. Sci. Technol, 2005, 15, 347–354.

Gupta S, Bansal R, Gupta S, Jindal N, Jindal A. Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. Indian Dermatology Online Journal, 2013, 268-271.

Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. Drug Target Insights, 2007, 2, 147–157.

Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: the years of enlightenment. Int. J. Pharm, 2005, 305, 2–12.

He R, Cui DX, Gao F. Preparation of fluorescence ethosomes based on quantum dots and their skin scar penetration properties. Mater. Lett, 2009, 63, 1662–1664.

Hoet PHM, Brüske-Hohlfeld I, Satata O.V. Nanoparticles – known and unknown health risks. J. Nanobiotech, 2004, 2, 12–26.

Hu FQ, Jiang SP, Du YZ, Yuan H, Ye YQ, Zeng S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. Int. J. Pharm, 2006, 314, 83– 89.

Hui X, Baker SJ, Wester RC, Barbadillo S, Cashmore AK, Sanders V, Hold KM., Akama T, Zhang YK, Plattner JJ., Maibach HI. In vitro penetration of a novel oxaborole antifungal (AN2690) into the human nail plate. J. Pharm. Sci, 2007, 96, 2622–2631.

Jensen LB, Petersson K, Nielsen HM. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. Eur J Pharm Biopharm, 2011, 79, 68-75.

Kang MJ, Eum JY, Jeong MS, Choi SE, Park SH, Cho HI, Cho CS, Seo SJ, Lee MW, Choi YW. Facilitated Skin Permeation of Oregonin by Elastic Liposomal Formulations and Suppression of Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. Biol. Pharm. Bull, 2010, 33, 100–106.

Katahira N, Murakami T, Kugai S, et al. Enhancement of topical delivery of a lipophilic drug from charged multilamellar liposomes. J Drug Target, 1999, 6, 14-405.

Keck CM, Schwabe K. Silver-Nanolipid Complex for Application to Atopic Dermatitis Skin: Rheological Characterization, In Vivo Efficiency and Theory of Action. J. Biom. Nanotechnol, 2009, 5, 428–436.

Kohli AK, Alpar HO. Potential Use of Nanoparticles for Transcutaneous Vaccine Delivery: Effect of Particle Size and Charge. Int. J. Pharm, 2004, 275, 13–17.

Küchler S, Radowski MR, Blaschke T, Dathe M, Plendl J, Haag R, Schäfer- Korting M, Kramer KD. Nanoparticles for skin penetration enhancement – A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. Eur. J. Pharm. Biopharm, 2009, 71, 243–250.

Lademann J, Otberg N, Richter H, Meyer L, Audring H, Teichmann A, Thomas S, Knüttel A, Sterry W. Nanoparticles-an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. Eur. J. Pharm. Biopharm, 2007, 66, 159–164.

Lademann J, Richter H, Schaefer S, Blume-Peytavi U, Teichmann A, Otberg N, Sterry W. Hair follicles – A Long-Term Reservoir for Drug Delivery. Skin Pharmacol. Physiol, 2006, 19, 232–236.

Lademann J, Richter H, Schanzer S, Knorr F, Meinke M, Sterry ., Patzelt A. Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects. Eur. J. Pharm. Biopharm, 2010, 110-140.

Larese FF, D'Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi ., Bovenzi M, Maina G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. Toxicology, 2009, 255, 33–37.

Lboutounne H, Faivre V, Falson F, Pirot F. Characterization of transport of chlorhexidine loaded nanocapsules through hairless and wistar rat skin. Skin Pharmacol Physiol, 2004, 17, 82-176.

Lekki J, Stachura Z, Dabros W, Stachura J, Menzel F, Reinert T, Butz T, Pallon J, Gontier E, Ynsa MD, Moretto P, Kertesz Z, Szikszai Z, Kiss AZ. On the follicular pathway of

percutaneous uptake of nanoparticles: Ion microscopy and autoradiography studies. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res, 2007, 260, 174–177.

Lopedota A, Trapani A, Cutrignelli A, Chiarantini L, Pantucci E, Curci R, Manuali ., Trapani G. The use of Eudragit RS 100/cyclodextrin nanoparticles for the transmucosal administration of glutathione. Eur. J. Pharm. Biopharm, 2009, 72, 509–520.

Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Can drug bearing liposomes penetrate intact skin? J Pharm Pharmacol, 2006, 58, 29-415.

Mandawgade SD, Patravale VB. Development of SLNs from natural lipids: Application to topical delivery of tretinoin. Int. J. Pharm, 2008, 363, 132–138.

Marambio-Jones C, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J. Nanopart. Res, 2010, 12, 1531–1551.

Marcato PD. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. Rev. Eletronica Fármacia, 2009, 6, 1–37.

Marcato PD, Adami LF, Caverzan J, Huber SC, Misset T, den Hertog J, Ferreira CV, Durán N. Solid Lipid Nanoparticles as Sunscreen Carrier System and its Toxicity in Zebrafish Embryos. Proceeding Nanotechnology and Applications, 2008, 615.

Marcato PD, Adami LF, Ferreira IR, Melo PS, Durán N. Comparative study of peptide encapsulation in polymeric and in solid lipid nanoparticles. J. Biomed. Nanotechnol, 2010.

Marcato PD, Durán N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. J. Nanosci. Nanotechnol, 2008, 8, 2216–2229.

Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. Adv. Drug Deliv. Rev, 2001, 47, 165–196.

Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. Eur. J. Pharm. Biopharm, 2001, 52, 103–112.

Nasir A. Nanodermatology. A bright glimpse just beyond the horizon part I. Skin Therapy Lett, 2010, 15, 1-4.

Paese K, Jäger A, Poletto FS, Pinto EF, Rossi-Bergmann B, Pohlmann AR, Guterres SS. Semisolid formulation containing a nanoencapsulated sunscreen: effectiveness, *in vitro* photostability and immune response. J. Biomed. Nanotechnol, 2009, 5, 1–7.

Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, Sharma V, Nevecna T, Zboril R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. J. Phys. Chem, 2006, 110, 16248–16253.

Passerini N, Gavini E, Albertini B, Rassu G, Di Sabatino M, Sanna V, Giunchedi P, Rodriguez L. Evaluation of solid lipid microparticles produced by spray congealing for topical application of econazole nitrate. J. Pharm. Pharmacol, 2009, 61, 559–567.

Pedersen N, Hansen S, Heydenreich AV, Kristensen HG, Poulsen HS. Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA, streptavidin and biotinylated ligands. Eur. J. Pharm. Biopharm, 2006, 62, 155–162.

Pople PV, Singh KK. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: application to topical delivery of tacrolimus. Eur J Pharm Biopharm, 2011, 79, 82-94.

Pradhan SK. Microsponges as the versatile tool for drug delivery system. Int J Res Pharm Chem, 2011, 1, 58-243.

Rai M, Birla S, Gupta I, Ingle A, Gad A, Abd-Elsalam K, Marcato PD, Durán N. Diversity in synthesis and bioactivity of inorganic nanoparticles: Progress and pitfalls. In: Sekhon, B.S. Bioactive Inorganic Nanoparticles, Singapore, Ludhiana, 2010.

Ramirez A, Fresno MJ, Jiménez MM, Selle E. Rheological study of Carbopol ® UltrezTM 10 hydroalcoholic gels, I: Flow and thixotropic behavior as a function of pH and polymer concentration. Die Pharmazie, 1999, 54, 444.

Rastogi R, Anand S, Koul V. Flexible polymerosomes-An alternative vehicle for topical delivery. Colloids Surf, 2009, 72, 161–166.

Schilling K, Bradford B, Castelli D, Dufour E, Nash JF, Pape W, Schulte S, Tooley I, van den Boschi J, Schellauf F. Human safety review of “nano” titanium dioxide and zinc oxide. Photochem. Photobiol. Sci, 2010, 9, 495–509.

Schott H. Rheology in Remington: the science and practice of pharmacy. In: Gennaro, A.R. (ed.), 20th edn. University of the Sciences in Philadelphia, Philadelphia, 2000.

Şenyiğit T, Sonvico F, Barbieri S, Özer Ö, Santi P, Colombo P. Lecithin/ chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. J. Control. Release, 2010, 142, 368–373.

Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. Adv. Colloid Interface Sci, 2009, 145, 83–96.

Sigmundsdottir H. Improving topical treatments for skin Diseases. Trends Pharmacol Sci, 2010, 31, 45-239.

Simeoni S, Scalia S, Tursilli R, Benson H. Influence of Cyclodextrin Complexation on the in vitro Human Skin Penetration and Retention of the Sunscreen Agent, Oxybenzone. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem, 2006, 54, 275–282.

Smetana A, Klabunde K, Marchin G, Sorensen C. Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. Langmuir, 2008, 24, 7457–7464.

Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Muller RH. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. Eur. J. Pharm. Biopharm, 2004, 58, 83–90.

Teichmann A, Heuschkel S, Jacobi U, et al. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. Eur J Pharm Biopharm, 2007, 66, 64-159.

Teixeira Z, Durán N, Guterres SS. Annatto Polymeric Microparticles: Natural Product Encapsulation by the Emulsion–Solvent Evaporation Method. J. Chem. Edu, 2008, 85, 946–947.

Teixeira Z, Zanchetta B, Melo BAG, Oliveira LL, Santana MHA, Paredes- Gamero EJ, Justo GZ, Nader HB, Guterres SS, Durán N. Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsules: Characterization and permeation studies. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2010, 81, 374–380.

Turton R, Bailie RC, Whiting WB, Shaeiwits JA. Analysis, Synthesis, and Design of Chemical Processes, 2nd edn. Prentice-Hall, New Jersey, 2003.

Ulbrich W, Lamprecht A. Targeted drug delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. J R Soc Interface, 2010, 7, 55-66.

Üner M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. Phamazie, 2006, 61, 375–386.

Üner M, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, 2007, 10, 43–56.

Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacturing of polymeric nanoparticles. Pharm Res, 2009, 26, 1025–1058.

Vettor M, Bourgeois S, Fessi H, Pelletier J, Perugini P, Pavanetto F, Bolzinger MA. Skin absorption studies of octyl-methoxycinnamate loaded poly(D,L-lactide) nanoparticles: Estimation of the UV filter distribution and release behaviour in skin layers. J. Microencapsul, 2010, 27, 253–262.

Wissing SA, Müller RH, Manthel L, Mayer C. Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy. Pharm. Res, 2004, 21, 400– 405.

Wu J, Liu W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, Xub H, Yang X, Zeng FD. Toxicity and penetration of TiO2 nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. Toxicol. Lett, 2009, 191, 1–8.

Yow HN, Wu X, Routh AF, Guy RH. Dye diffusion from microcapsules with different shell thickness into mammalian skin. Eur. J. Pharm. Biopharm, 2009, 72, 62–68.

Zhang L, Pornpattananangkul D, Hu CMJ, Huang CM. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. Curr Med Chem, 2010, 17, 94-585.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Nanočestice su novi terapijski sustavi s veličinom čestica u rasponu od 10 nm do 1000 nm. Uporabom terapijskih sustava nano veličina, kao što su polimerne, anorganske i čvrste lipidne nanočestice, postiže se ciljano djelovanje lijeka, produženo oslobađanje, zaštita djelatne tvari od razgradnje te smanjenje nuspojava, zbog smanjenja sistemske apsorpcije.

Transport nanočestica kroz kožu ovisi o nekoliko čimbenika, a uključuje prirodu i fizikalno-kemijska svojstva nanočestica, prirodu djelatne tvari i stanje kože. Nanočestice koje stupaju u interakcije s lipidima rožnatog sloja kože obično dovode do većeg stupnja penetracije, što se uglavnom zapaža kod čvrstih lipidnih nanočestica, dok polimerni sustavi uglavnom ograničavaju penetraciju djelatnih tvari kroz kožu.

Nanostrukturirani materijali su vrlo obećavajući terapijski sustavi za lokalnu primjenu lijekova, zbog mnogobrojnih prednosti u odnosu na konvencionalne oblike. Stoga se sve češće koriste kako u kozmetičke svrhe, tako i u liječenju kožnih bolesti poput karcinoma kože i vitiliga. Međutim još uvijek postoje brojni izazovi vezani za primjenu ovih sustava kod određenih vrsta djelatnih tvari.

Nanoparticles are new drug delivery systems with a particle size ranging from 10 nm to 1000 nm. The use of nano size therapeutic systems, such as a polymer, inorganic and solid lipid nanoparticles provides targeted drug delivery, controlled release, protection of drug from degradation and reduction of side effects, due to the reduction of systematic absorption.

Transportation of nanoparticles through the skin depends on a number of factors, including the nature and physicochemical properties of the nanoparticles, the nature of the active substance and the skin condition. Nanoparticles which interact with the *stratum corneum* lipids usually lead to a greater degree of penetration, as commonly observed for lipid nanoparticles, while polymeric systems, usually limit the skin permeation of substances.

Nanostructured materials are very promising drug delivery systems for topical application, because of their numerous advantages over conventional forms. Therefore, it is increasingly being used both in cosmetic purposes, as well as in the treatment of skin diseases such as skin cancer and vitiligo. However, there are still some challenges related to the application of these systems to different classes of active substances.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

NANOČESTICE ZA DERMALNU PRIMJENU

Ivona Brozina

SAŽETAK

Nanočestice su novi terapijski sustavi s veličinom čestica u rasponu od 10 nm do 1000 nm. Uporabom terapijskih sustava nano veličina, kao što su polimerne, anorganske i čvrste lipidne nanočestice, postiže se ciljano djelovanje lijeka, produženo oslobađanje, zaštita djelatne tvari od razgradnje te smanjenje nuspojava, zbog smanjenja sistemske apsorpcije.

Transport nanočestica kroz kožu ovisi o nekoliko čimbenika, a uključuje prirodu i fizikalno-kemijska svojstva nanočestica, prirodu djelatne tvari i stanje kože. Nanočestice koje stupaju u interakcije s lipidima rožnatog sloja kože obično dovode do većeg stupnja penetracije, što se uglavnom zapaža kod čvrstih lipidnih nanočestica, dok polimerni sustavi uglavnom ograničavaju penetraciju djelatnih tvari kroz kožu.

Nanostrukturirani materijali su vrlo obećavajući terapijski sustavi za lokalnu primjenu lijekova, zbog mnogobrojnih prednosti u odnosu na konvencionalne oblike. Stoga se sve češće koriste kako u kozmetičke svrhe, tako i u liječenju kožnih bolesti poput karcinoma kože i vitiliga. Međutim još uvijek postoje brojni izazovi vezani za primjenu ovih sustava kod određenih vrsta djelatnih tvari.

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

Rad sadrži:	42 stranice, 12 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 72 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	polimerne nanočestice, čvrste lipidne nanočestice, anorganske nanočestice
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. Jasna Jablan, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagrebu
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of pharmaceutical technology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

NANOPARTICLES FOR DERMAL USE

Ivona Brozina

SUMMARY

Nanoparticles are new drug delivery systems with a particle size ranging from 10 nm to 1000 nm. The use of nano size therapeutic systems, such as a polymer, inorganic and solid lipid nanoparticles provides targeted drug delivery, controlled release, protection of drug from degradation and reduction of side effects, due to the reduction of systematic absorption.

Transportation of nanoparticles through the skin depends on a number of factors, including the nature and physicochemical properties of the nanoparticles, the nature of the active substance and the skin condition. Nanoparticles which interact with the *stratum corneum* lipids usually lead to a greater degree of penetration, as commonly observed for lipid nanoparticles, while polymeric systems, usually limit the skin permeation of substances. Nanostructured materials are very promising drug delivery systems for topical application, because of their numerous advantages over conventional forms. Therefore, it is increasingly being used both in cosmetic purposes, as well as in the treatment of skin diseases such as skin cancer and vitiligo. However, there are still some challenges related to the application of these systems to different classes of active substances.

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

Thesis includes: 42 pages, 12 figures, 1 tables and 72 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Polymer nanoparticles, solid lipid nanoparticles, inorganic nanoparticles

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
Jasna Jablan, Ph.D. *Senior Teaching Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
The thesis was accepted: June 2015.