

# Optimizacija postupka pripreme polianhidridnih nanočestica s melatoninom

---

**Smenderovac, Martina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:372275>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Martina Smenderovac**

**OPTIMIZACIJA POSTUPKA PRIPREME  
POLIANHIDRIDNIH NANOČESTICA S  
MELATONINOM**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko- biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

*Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru prof.dr.sc. Mariju Jugu na velikom strpljenju i uloženom vremenu pri izradi ovog diplomskog rada. Pomogao mi je svojim savjetima i učinio vrijeme provedeno u laboratoriju nezaboravnim i zabavnim.*

*Najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima na neizmjerne podršci i razumijevanju koju su mi pružali kroz cijelo školovanje i bez kojih ovaj uspjeh ne bi bio moguć. Hvala vam na bezgraničnoj ljubavi i strpljenju.*

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Melatonin.....	1
1.1.1. Opće značajke.....	1
1.1.2. Zaštitna uloga i terapijski potencijal.....	2
1.1.3. Primjena melatonina u usnoj šupljini.....	3
1.1.4. Način primjene melatonina.....	5
1.2. Sluz .....	6
1.2.1. Funkcija i građa sluzi.....	6
1.2.2. Reološka svojstva sluzi.....	8
1.3. Mukopenetrativne nanočestice .....	10
1.3.1. Pasivni mukopenetrirajući sustavi.....	10
1.3.2. Aktivni mukopenetrirajući sustavi.....	13
1.3.3. Nanočestice koje mijenjaju zeta potencijal.....	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	15
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. Kemikalije.....	17
3.2. Instrumenti i pribor.....	17
3.3. Metode.....	18
3.3.1. Priprema konvencionalnih i PEGiliranih nanočestica.....	18
3.3.1.1. Priprema nanočestica s melatoninom.....	18
3.3.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija nanočestica.....	19
3.3.3. Određivanje sadržaja neuklopljenog melatonina.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	22
4.1. Optimizacija postupka pripreme konvencionalnih i PEGiliranih nanočestica.....	22
4.2. Uklapanje melatonina u nanočestice.....	29
4.2.1. Određivanje sadržaja melatonina u uzorcima.....	29
4.2.2. Fizikalno-kemijske karakteristike polianhidridnih čestica s melatoninom.....	32

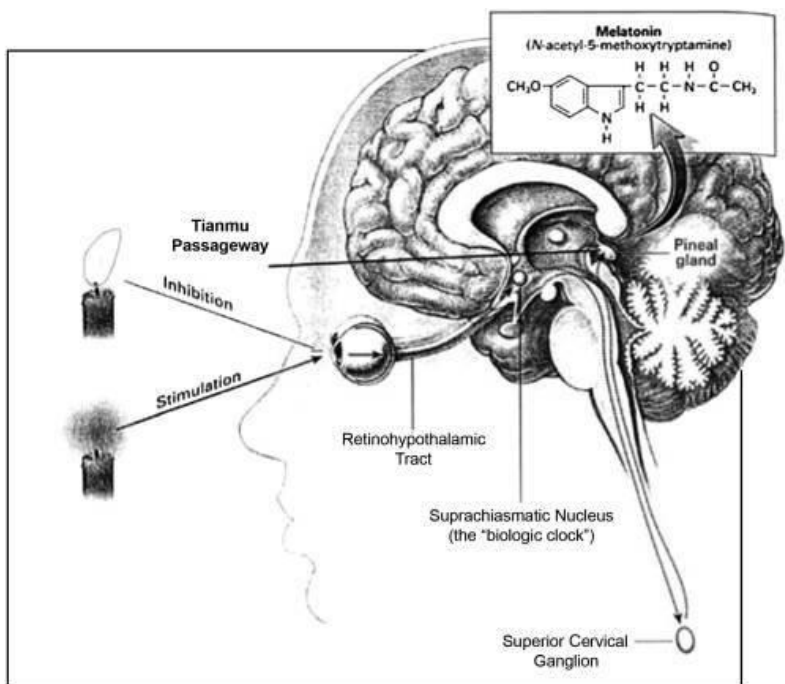
5. ZAKLJUČCI .....	35
6. LITERATURA .....	36
7. SAŽETAK/ SUMMARY.....	40
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

### 1.1 Melatonin

#### 1.1.1 Opće značajke

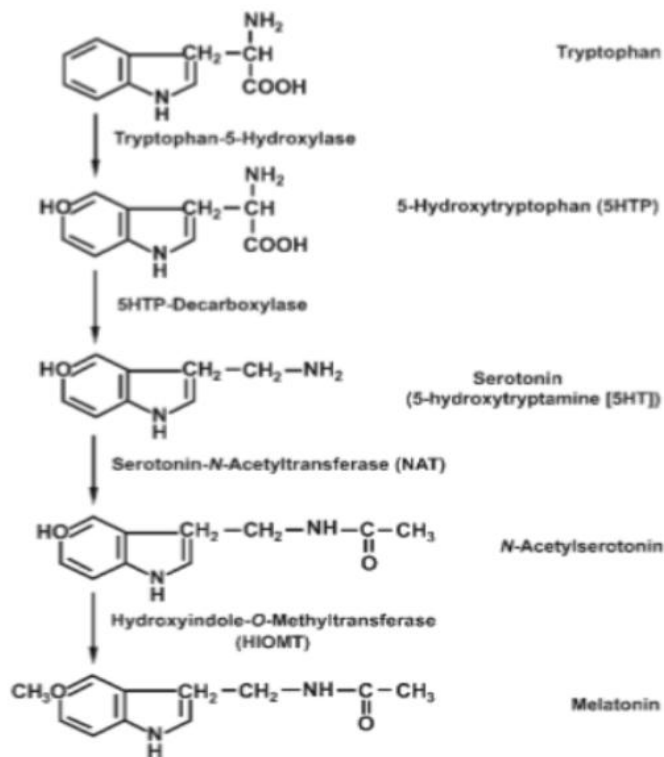
Melatonin (N-acetil-5-metoksitriptamin) je hormon koji se sintetizira primarno u epifizi, ali i u retini, gastrointestinalnom traktu, koštanoj srži, leukocitima, limfocitima, koži... Luči se u cirkadijalnom ritmu pri čemu se najveća koncentracija u plazmi postiže između 3.00 i 4.00 sata nakon ponoći. Cirkadijalni ritam je reguliran intenzitetom svjetlosti koja se prenosi putem retine do suprahijazmatske jezgre hipotalamusa koji omogućuje sintezu melatonina i aktivaciju beta adrenergičnih receptora (Berardis i sur.,2013).



**Slika 1.** Fiziologija sekrecije melatonina djelovanjem svjetlo/mrak podražaja iz okoline. (Cutando i sur., 2007)

Pinealociti uzimaju slobodni triptofan iz krvi te ga hidroksiliraju i dekarboksiliraju do serotonina djelovanjem enzima triptofan-5-hidroksilaza i 5-hidroksitriptofan dekarboksilaza. Preko noći serotonin se konvertira do N-acetilserotonina te metilira do melatonina posredstvom N-acetiltransferaze i hidroksiindol-O-metiltransferaze (Slika 2.). Melatonin ispoljava svoje djelovanje vezanjem na membranske (MT1 i MT2) i nuklearne (RZR/ROR) receptore. MT1 receptori prisutni su u većini organa (mozak, bubrezi, kardiovaskularni

sustav, pankreas, slezena...) te omogućavaju djelovanje melatonina u cijelom tijelu (Slominski i sur., 2012). Poznato je kako se 70% melatonina veže za albumin u plazmi dok se slobodni melatonin izlučuje slinom u usnu šupljinu u približnom udjelu 24% do 33%. Također, zbog velike lipofilnosti, slobodni melatonin lako difundira u sve stanice i međustanične odjeljke. Posebno je velika koncentracija melatonina u mitohondrijima gdje ima važnu ulogu zaštite od oksidativnog stresa (Martin i sur., 2000).



**Slika 2.** *Sinteza melatonina u pinealocitima. (Cutando i sur., 2007)*

### 1.1.2 Zaštitna uloga i terapijski potencijal

Primarna uloga melatonina u organizmu je regulacija cirkadijanog ritma. Nadalje, značajan je i njegov antioksidativni potencijal te vezanje i neutralizacija slobodnih radikala. Indolamin donira elektron radikalu eliminirajući njegovu reaktivnost, pri čemu on sam postaje kation radikal. Melatonin-radikal reagira sa još jednim radikalom pri čemu nastaje netoksični ciklički 3-hidroksimelatonin. Također, ispoljava indirektni antioksidativni učinak

djelovanjem na produkciju radikala NO. Inhibira ekspresiju i aktivnost mtNOS, enzima bitnog za sintezu NO (Aydogan i sur., 2006). Njegov antioksidativni potencijal značajan je kod mnogih bolesti gdje je nastajanje slobodnih radikala dio patologije bolesti. Melatonin je pokazao pozitivne efekte kao dodatak terapiji ili samostalna terapija za liječenje Parkinsonove bolesti, epilepsije, Alzheimerove bolesti, infektivnih i upalnih poremećaja, te psihijatrijskih poremećaja (depresija, shizofrenija, bipolarni poremećaj).

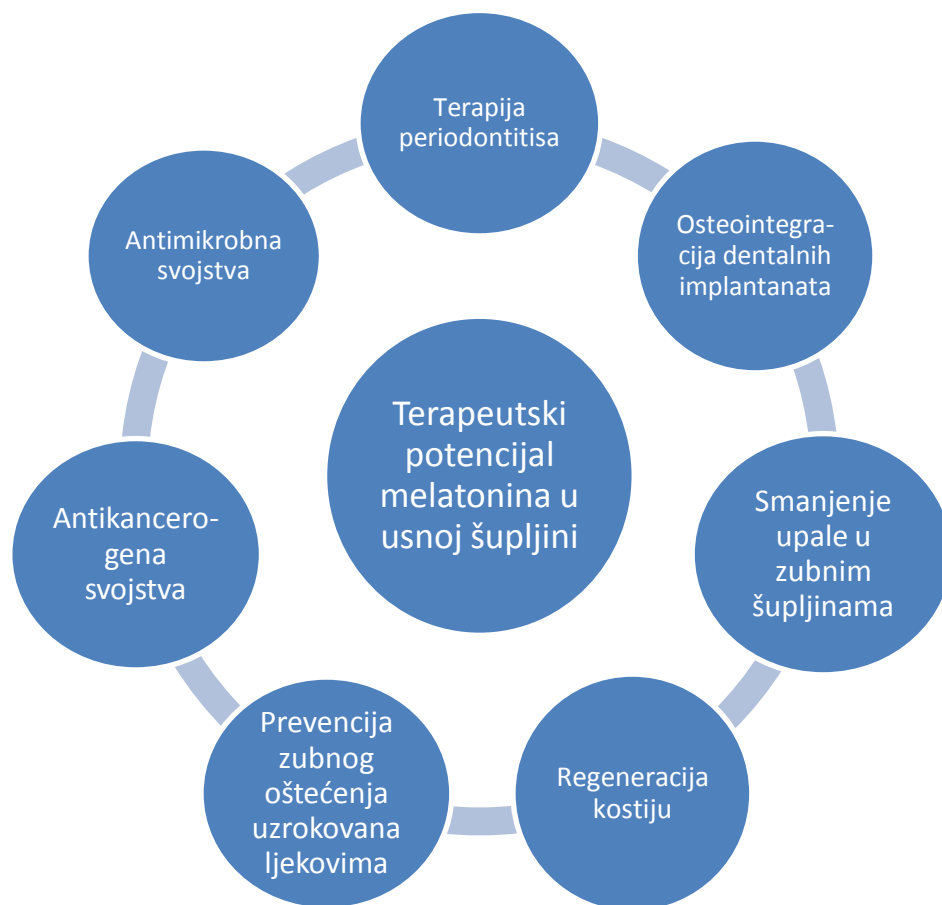
Melatonin djeluje imunomodulatorno tako što promovira produkciju interleukina 2 i interferona gama što posljedično uzrokuje stimulaciju CD4+ limfocita (Garcia-Maurino i sur., 1997). Djelovanjem melatonina na imunološki sustav otvara se potencijal u terapiji nekih vrsta karcinoma (pluća, bubrezi, crijeva, želudac, prostata).

Melatonin djeluje i kao promotor rasta kostiju potičući diferencijaciju osteoblasta i inhibirajući resorpciju osteoklastima. Stimulira sintezu kolagenskih vlakana u osteoblastima te djeluje na ekspresiju sijaloproteina, alkalne fosfataze, osteopontina, osteokalcina- važnih proteinskih markera u kostima, pri čemu smanjuje diferencijaciju osteoblasta sa 21 dana na 12 dana. Zbog svoje antioksidativne uloge, melatonin neutralizira slobodne radikale koji su nužni za djelovanje osteoklasta i resorpciju kostiju (Nakade i sur., 1999). Melatonin povećava masu kostiju te se istražuje potencijalna primjena u terapiji osteoporoze i prilikom ugradnje implantanata.

### 1.1.3 Primjena melatonina u usnoj šupljini

Melatonin ispoljava brojna djelovanja u usnoj šupljini. Slika 3. prikazuje terapijski potencijal koji melatonin može ostvariti. Najznačajnija je njegova uloga u terapiji periodontitisa, bolesti koja zahvaća 40% do 90% populacije (Pihlstorm i sur., 2005). Periodontitis nastaje kao posljedica disbalansa oralnog mikrobioma, akumulacije bakterija u usnoj šupljini i prevelike proizvodnje ROS što uzrokuje upalu, povlačenje zubnog mesa te gubitak zuba. Melatonin smanjuje ekspresiju proupalnih faktora kao C-reaktivni protein, interleukin-6 i TNF alfa, ali i smanjuje aktivnost receptora koji djeluju na nuklearni faktor kappa-B/osteoprotegrin (Cutando i sur., 2015).





**Slika 3.** *Terapeutski potencijal melatonina u oralnoj medicini i usnoj šupljini. (prilagođeno prema Najeeb i sur., 2016)*

Melatonin se pokazao učinkovitim u izgradnji i mineralizaciji zuba nakon ugradnje implantanta kod pasa u kombinaciji sa faktorom rasta (Cutando i sur., 2008). Ispituje se i primjena melatonina u kombinaciji sa zubnim materijalom (metakrilat) pri čemu se smanjuju citotoksični i genotoksični učinci uzrokovani metakrilatom (Blasiak i sur., 2011). Kao imunomodulator, primjećena je učinkovitost melatonina u liječenju infekcija virusom Herpes simplex koja je usporediva sa učinkovitošću aciklovira te prevencija sepse uzrokovane gljivicom *C. albicans* kao i klasične antimikotične aktivnosti. Melatonin ima i onkogenu aktivnost u prevenciji karcinoma usne šupljine, ali i kao adjuvans u smanjenju nuspojava kemoterapije. Inhibira rast kancerogenih stanica, ima antiangiogeni i antiproliferativni učinak te modulira onkogenu ekspresiju (Reiter, 2004).

Melatonin je trenutno indiciran u terapiji poremećaja cirkadijalnog ritma, insomnije, jetlaga, međutim daljnja istraživanja pokazuju velik potencijal u terapiji mnogih kroničnih, upalnih bolesti. Unatoč tome, potrebno je provesti još kliničkih i animalnih studija kako bi se potvrdila stvarna uloga i učinkovitost melatonina u takvim stanjima.

#### 1.1.4 Način primjene melatonina

Melatonin pokazuje kratko vrijeme polueliminacije od približno 45 minuta, varijabilnu apsorpciju iz gastrointestinalnog trakta ovisnu o prehrani te ekstenzivan prvi prolazak kroz jetru zbog čega nije idealan kandidat za klasičnu oralnu primjenu. Postoje brojna istraživanja transmukozne, transdermalne primjene te tableta u obliku kontroliranog oslobađanja pri čemu su se ispitivale koncentracije melatonina i njegovog glavnog metabolita 6-sulfatoksimeletonina u plazmi. Primjena tableta s kontroliranim oslobađanjem pokazivala je veliku varijabilnost koncentracija u plazmi kod ispitivanih subjekata nakon primjene melatonina u istoj dozi. To se može objasniti varijabilnosti prilikom apsorpcije i metabolizma. Transdermalna primjena zaobilazi prvi prolazak kroz jetru što omogućava prirodnije oponašanje koncentracije melatonina u plazmi. Glavni nedostatak takve primjene je deponiranje melatonina u koži što uzrokuje produženo otpuštanje nakon što je lijek trebao prestati djelovati. Oralna transmukozna primjena je alternativni put primjene koji rješava potencijalne probleme primjene melatonina. Izbjegava se prvi prolazak kroz jetru, brzo se postižu optimalne koncentracije lijeka u plazmi, izbjegava se nastajanje depoa te djelovanje prestaje ubrzo nakon uklanjanja flastera. Flaster se nanosi na mukoznu stranu obraza ili usnice, lako se uklanja i dobro se podnosi. Također, omogućeno je i brzo lokalno djelovanje melatonina u usnoj šupljini pri liječenju brojnih komorbiditeta. Pri tome odabir tipa formulacije može utjecati na mjesto djelovanja u usnoj šupljini. Tako primjerice uklapanje melatonina u gel natrijeve karboksimetilceluloze rezultira formulacijom prikladnom za sistemska primjenu melatonina, dok se poloksamersko-lecitinski organogel ističe kao oblik najprikladniji za ostvarivanje lokalnog učinka melatonina u usnoj šupljini jer osigurava njegovu akumulaciju u tkivu sluznice (Flo i sur., 2016).

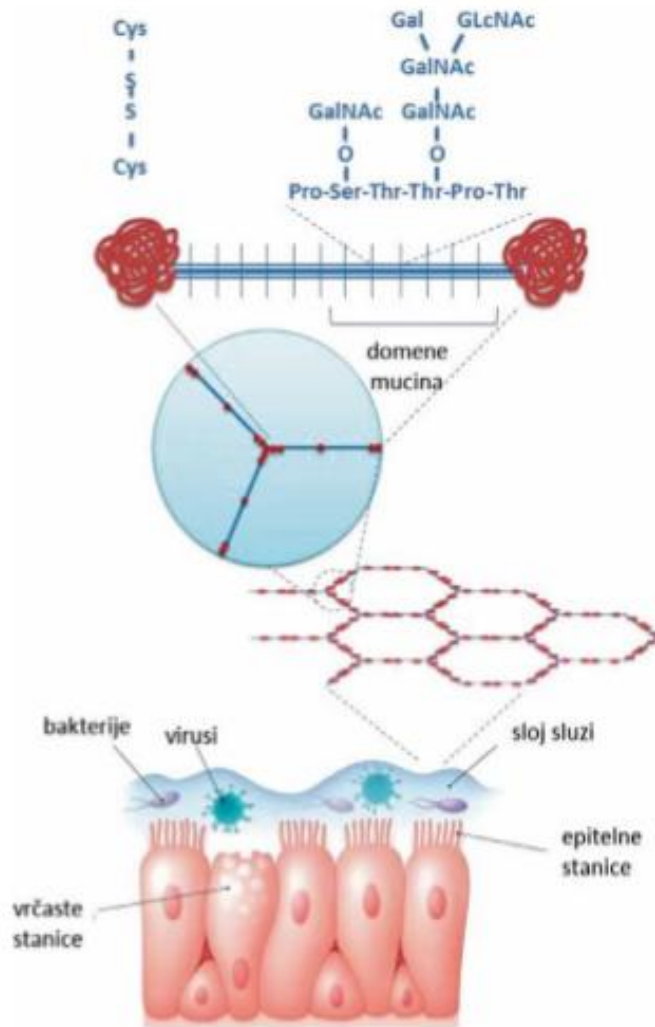
## 1.2 Sluz

### 1.2.1. Funkcija i građa sluzi

Sluz je viskoelastični sloj gela koji oblaže sluznice dišnog, probavnog i ženskog reproduktivnog trakta te površinu oka. Osnovna funkcija je zaštita epitelnog sloja od patogena i stranih čestica, ali također sluz pruža barijeru apsorpciji lijeka. Osim toga, djeluje kao lubrikant pri čemu sprječava gubitak vode i dehidraciju tkiva ( Jajčević, Jug, 2017).

Sastoji se od 97 % vode i 1% mucina te ostalih komponenata kao što su imunoglobulini, anorganske soli, lipidi te odumrle stanice i stanični otpad. Mucini su glikoproteini molekularne mase od 0,5-40 MDa sastavljene od mucinskih monomera i presvučene proteoglikanima. Sadrže dvije domene; PTS domena građena od aminokiselinskog slijeda prolina, treonina i serina presvučena oligosaharidima te gole hidrofobne domene na koje su vezani lipidi (Fröhlich, Roblegg, 2014). Oligosaharidi vezani na kraju PTS domene sprječavaju proteinsku razgradnju. Mucinski monomeri se povezuju disulfidnim mostovima preko PTS domena, dok N- krajevi uzrokuju dimerizaciju i trimerizaciju molekula pri čemu nastaje trodimenzionalna mreža s veličinom pora od 350-500 nm koja utječe na reološka svojstva sluzi (Slika 4.). Mucinska vlakna su promjera 3-10 nm te negativnog naboja zbog prisutstva sijalinske kiseline i sulfata (Pearson i sur., 2016).

Sluz se neprestano izlučuje, a životni vijek joj je kratak. Sluznice u različitim dijelovima tijela se razlikuju po debljini sloja, naboju, pH vrijednosti, temperaturi i reološkim svojstvima ( Tablica 1).



**Slika 4.** Prikaz građe sluzi koju luče vrčaste stanice i strukture mucina, glikoproteinskog monomera građenog od PTS aminokiselinske i hidrofobne regije. Umrežavanjem mucinskih molekula nastaju pore različitih veličina koje ujeću na reološka svojstva sluzi. (prilagođeno prema Boegh, Nielsen, 2015)

**Tablica 1.** Prikaz fizioloških karakteristika različitih sluznica u tijelu. (prilagođeno prema Netsomboon, Bernkop- Schnurch, 2016)

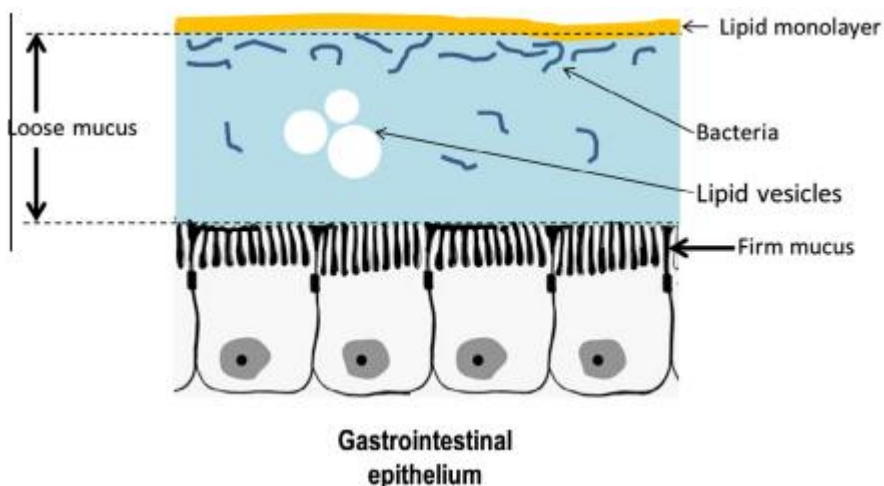
Sluznica	Debljina sloja (μm)	Vrijeme klirensa (min)	Brzina klirensa (mm/min)	Temperatura (°C)	pH vrijednost
Oko	0,02–0,05	5–7,7	–	37,0	7,8
Gornji dišni putevi	15	10–20	5–11	30,2–34,4	5,5–6,5
Donji dišni putevi	55	–	3,5–30	32,5–35,5	7,0
Želudac	170	–	–	37,0	6,40
Tanko crijevo	10	24–48 <sup>(A)</sup>	–	37,0	5,5–7,5
Debelo crijevo	37–100		–	37,0	7,0
Rektum	125	–	–	37,0	7,2
Vagina	50	–	1,5–6,0 <sup>(B)</sup>	37,0	3,5–4,0

<sup>(A)</sup> u satima  
<sup>(B)</sup> mL/dan

### 1.2.2. Reološka svojstva sluzi

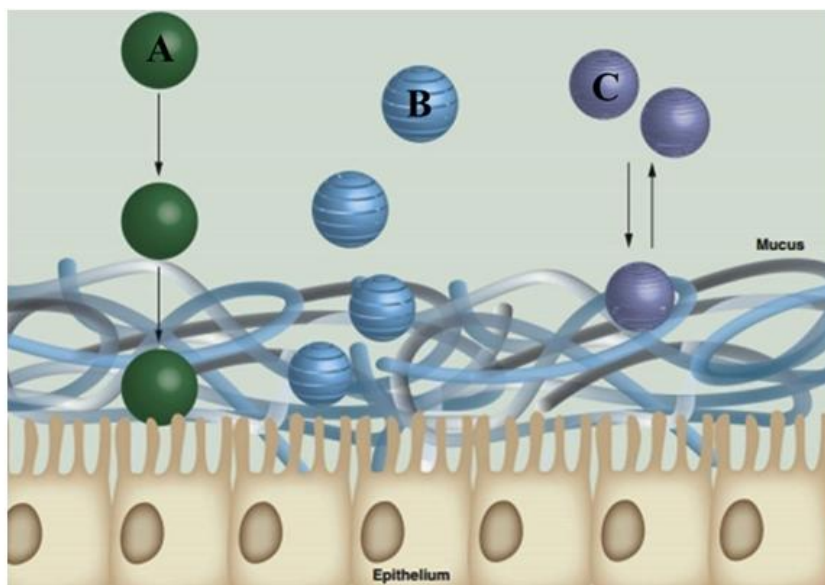
Sluz se dijeli na onu niske i visoke viskoznosti. Sluz niske viskoznosti djeluje kao dinamička barijera u dišnom i probavnom sustavu. U probavnom sustavu konstantno kretanje vode uvelike utječe na gibanje čestica u mukoznom sloju. Apsorpcija vode stvara pokretački gradijent koji potpomaže apsorpciju čestica u dublje slojeve epitela i olakšava njihovo kretanje. Količina apsorbirane vode u ljudskom crijevu iznosi 0.1-0.2 mL/h cm<sup>2</sup> (Lennernäs i sur., 1994). Sluz visoke viskoznosti sadrži mucine vezane na površinu epitelnih stanica te tvori steričku barijeru prolasku bakterija i makromolekula koje su veće od veličine pora mucina. Slika 5. prikazuje gastrointestinalni epitel koji sadrži sluz niske i visoke viskoznosti.

Brojne tvari stvaraju slabe kemijske veze s lancima mucina. Lipofilne tvari će ulaziti u interakcije s hidrofobnim domenama molekule mucina, dok će hidrofilne stvarati vodikove veze s glikoziliranim domenama mucina. Pozitivno nabijene tvari će stvarati ionske veze s negativno nabijenim lancima sijalinske kiseline vezane na mucin (Boegh, Nielsen, 2015).



**Slika 5.** Prikaz sluzi niske i visoke viskoznosti na površini gastrointestinalnog epitela (Cone, 2009.)

Veličina čestica utječe na njihovu apsorpciju kroz sloj sluzi. Čestice veličine 100 nm lakše penetriraju kroz mukozni sloj od onih većih. Veće čestice se adheriraju na površini mukoznog sloja te ne mogu prodrijeti u dublje slojeve epitela, dok manje čestice mogu penetrirati u dublje slojeve do površine epitelnih stanica (Slika 6.) Ta saznanja su bitna za razvoj pojedinih ljekovitih oblika te ciljanu dostavu lijeka u organizmu.

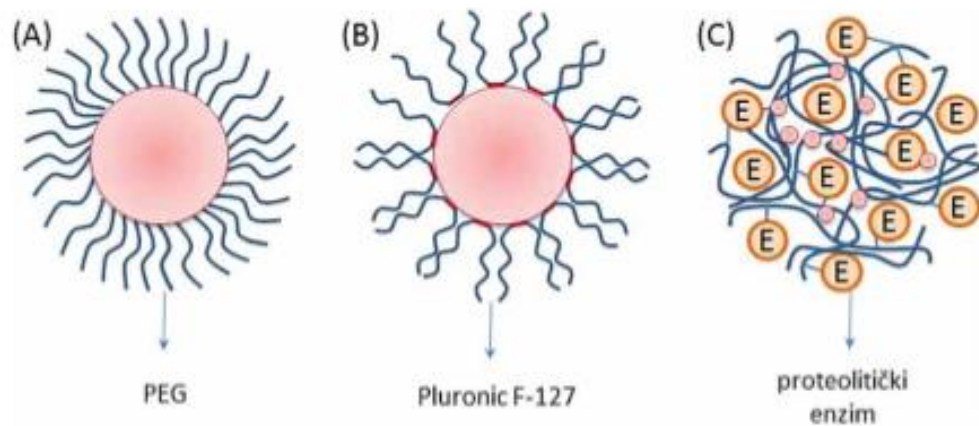


**Slika 6.** Prikaz različitih čestica: A) mukopenetrativne čestice B) mukoadhezivne čestice C) čestice izvan mukoznog sloja. (Laffleur i sur., 2014)

### 1.3 Mukopenetrativne nanočestice

#### 1.3.1 Pasivni mukopenetrirajući sustavi

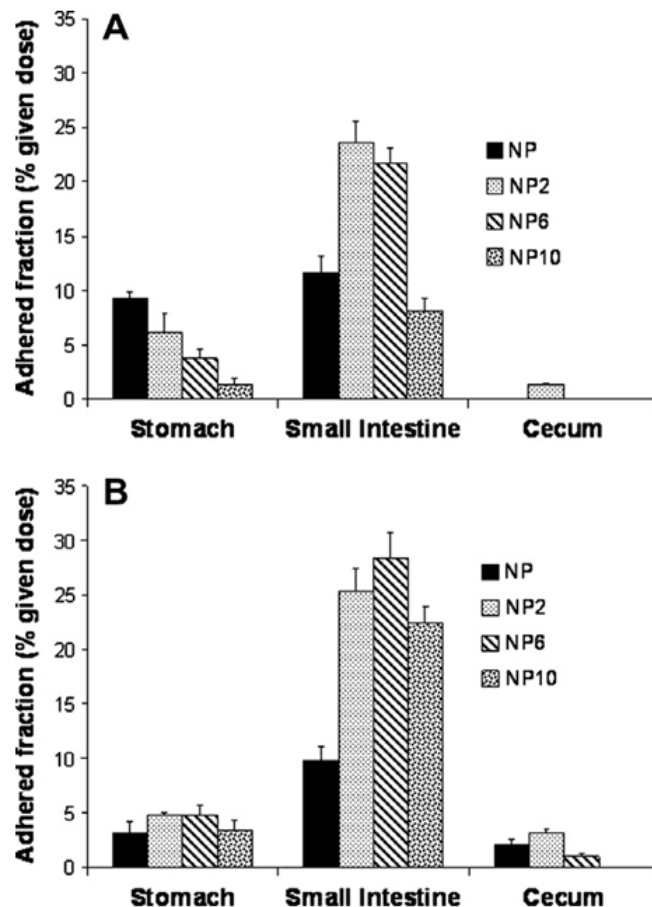
Mukopenetrativne nanočestice imaju izražena svojstva penetrabilnosti kroz sloj sluzi do površine epitelnih stanica, a variranjem veličine i svojstva površine čestica može se utjecati na penetrabilnost sustava smanjivanjem interakcija između nosača i sluzi (Liu i sur., 2014). Najčešći način povećanja penetrabilnosti nanočestica je oblaganje površine različitim polimerima (Slika 7.).



**Slika 7.** Shematski prikaz građe mukopenetrativnih nanočestica: A) PEGilirane nanočestice B) nanočestice obložene poloksamerom C) mukolitičke nanočestice s površinom funkcionaliziranom enzimima. Prilagođeno prema Liu i sur., 2014.

Najčešće korišteni polimer je polietilenglikol (PEG) niske molekularne mase od 2-10 kDa. PEG je neionogeni hidrofilni polimer koji ima i mukoadhezivna i mukopenetrabilna svojstva ovisno o molekularnoj masi i gustoći vezanja na površini čestica. PEG niske molekularne mase ima kraće lance, ulazi u manje interakcija sa mucinom u sluzi te ima bolja penetrirajuća

svojstva. Povećanjem molekularne mase raste dužina lanaca PEGa, povećavaju se hidrofobne i elektrostatske interakcije lanaca s mucinom te se čestice adheriraju na površinu sluzi. Najveću mukopenetrabilnost imaju nanočestice gusto obložene PEG-om molekularne mase 6000 Da čiji lanci poprimaju konformaciju „četke“ te se one nakon oralne primjene brzo transportiraju do tankog crijeva i permeiraju do površine epitela sluzice. Tamo se apsorbiraju na površinu membrane i ispuštaju sadržaj kroz duži vremenski period (Yoncheva i sur., 2005). Slika 8. prikazuje penetraciju nanočestica do epitela različitih sluznica ovisno o molekularnoj masi PEG-a nakon 1 i 3 sata. PEGilirane nanočestice su negativno nabijene te ne pokazuju afinitet za vezanje na negativno nabijene lance mucina. Smatra se da upravo negativan naboj pridonosi brznoj penetraciji uslijed elektrostatskog odbijanja s lancima mucina (Inchaurraga i sur., 2015.). PEGilirane nanočestice imaju velik potencijal za liječenje upalnih bolesti, lokalnu dostavu citostatika kod liječenja karcinoma kolona, lokalnu dostavu mikrobiocida kod prevencije širenja seksualno prenosivih bolesti i slično (Maisel i sur., 2015).





**Slika 8.** *Grafički prikaz adheriranih nanočestica na površinu epitela u različitim dijelovima gastrointestinalnog trakta štakora nakon (A) 1 sata i (B) 3 sata. Prikazane su nanočestice bez PEG-a (NP), PEGilirane sa PEG 2000 (NP2), sa PEG 6000 (NP6) i PEG 10000 (NP10). Studija je pokazala da nakon 1 h od primjene konvencionalne nanočestice (NP) pokazuju veću interakciju s mukozom u želucu, dok se PEGilirane NP2 i NP6 više adheriraju u tankom crijevu u odnosu na NP i NP10. Nakon 3 h adherirane frakcije NP2, NP6 i NP10 u tankom crijevu su podjednake i puno veće u odnosu na konvencionalne (NP). U želucu koncentracije svih nanočestica nakon 3 h su znatno manje i podjednake (Zabaleta i sur., 2012).*

Za oblaganje nanočestica mogu se koristiti i poloksameri (Pluronic®) koji su građeni od polioksietilena (PEO) i polioksipropilena (PPO). Zbog prisutstva hidrofilnih (PEO) i hidrofobnih (PPO) dijelova često se njima oblažu nanočestice, ali se i ugrađuju u liposome. Hidrofobni dijelovi priliježu uz hidrofobnu površinu nanočestica ili se ugrađuju u fosfolipidni dvosloj liposoma, dok hidrofilni dio strši poput „četke“ sa površine čestica. Istraživanja pokazuju da oblaganje PLGA nanočestica poloksamerom povećava njihovu brzinu difuzije u gustoj sluzi iz gornjih sinusa (Liu i sur., 2014.).

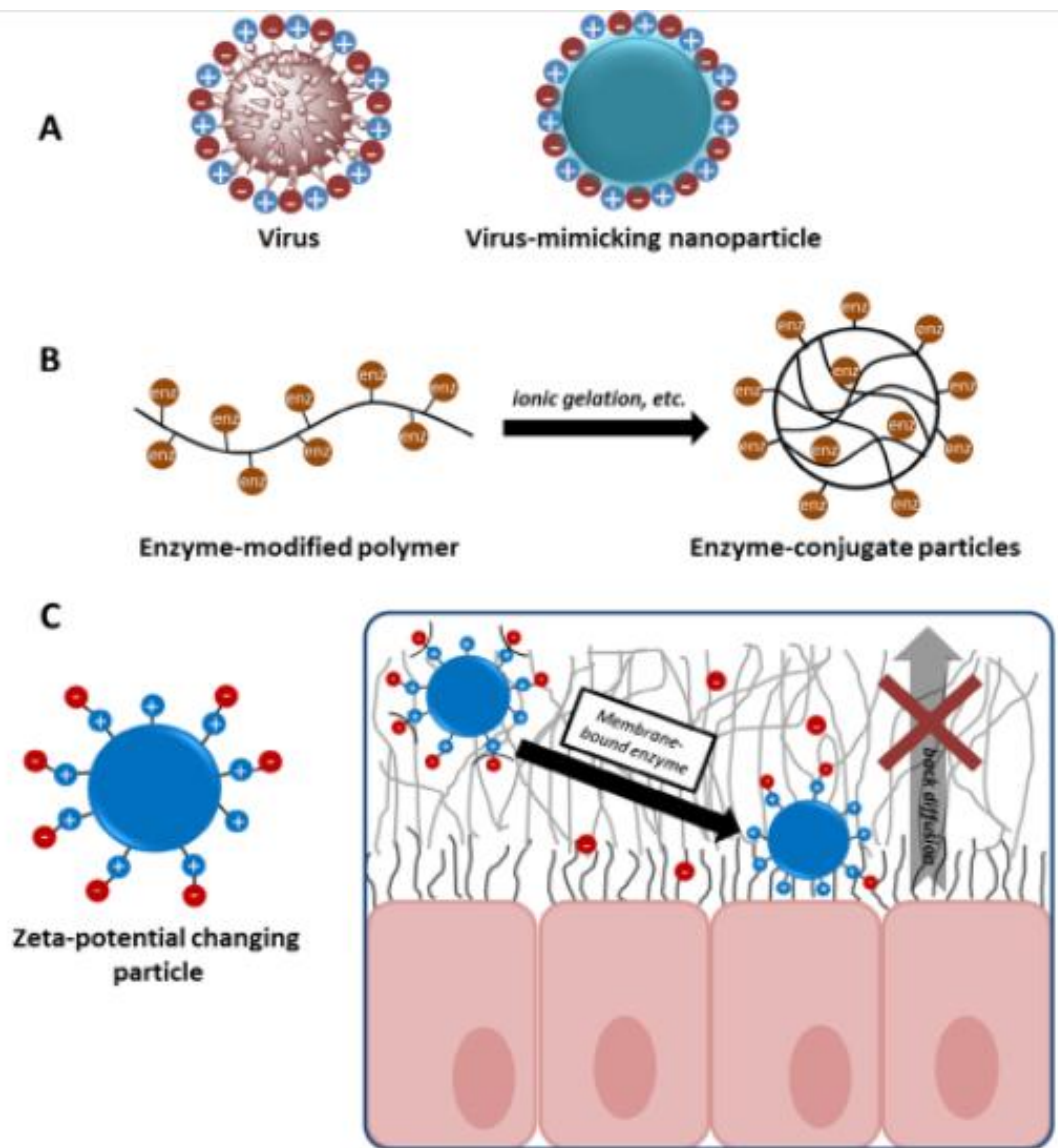
Nova strategija za razvoj mukopenetrativnih čestica je imitacija površine i svojstava virusa. Virusi vrlo lako prolaze mukoznu barijeru difundirajući kroz sluz zahvaljujući karakterističnim svojstvima na površini. Površina virusa sadrži pozitivan i negativan naboj koji zbog međusobnih snažnih interakcija ne reagira sa sluzi. U fiziološkom pH virusi su neutralnog ili lagano negativnog zeta potencijala (Michen, Graule, 2010). Nanočestice koje imaju ista svojstva naboja na površini kao i virusne čestice pripremaju se kombinacijom citosana i kornitin sulfata (Slika 9A). Takve nanočestice imaju bolja svojstva difuzije od konvencionalnih nanočestica te se smanjuju njihova mukoadhezivna, a povećavaju mukopenetrabilna svojstva.

### 1.3.2 Aktivni mukopenetrirajući sustavi

Aktivni mukopenetrirajući sustavi nastaju uklapanjem mukolitičkih agensa koji cijepaju trodimenzionalnu strukturu sluzi. Mukolitički agensi ne uništavaju cijelu površinu mukoze već samo dio kojim se mukolitička čestica kreće, olakšavajući joj put kroz mukožu. Razvijena su do sada dva različita mukolitička sustava. S jedne strane je N-acetilcistein koji razgrađuje disulfidne mostove u cisteinom bogatim regijama mucina pri čemu se smanjuje viskoznost sluzi i olakšava transport čestica. Drugi pristup uključuje imobilizaciju mukolitičkih enzima kao što su tripsin, papain ili bromelain na površinu nanočestica ili na polimer prije formiranja nanočestica (Slika 9B). Imobilizacija enzima se postiže kovalentnim vezanjem preko prostetskih skupina ili ionskim interakcijama. Nanočestice funkcionalizirane papainom pokazuju značajniju mukopenetrativnost kroz intestinalnu sluz. Međutim, takav pristup je potrebno detaljnije istražiti zbog mogućnosti apsorpcije endotoksina i drugih toksičnih tvari kroz oštećenu mukožu (Jajčević, Jug, 2017).

### 1.3.3 Nanočestice koje mijenjaju zeta potencijal

Mukozni sloj je negativnog naboja zbog prisutstva sijalinske i sulfonske kiseline u strukturi. Zbog toga se neutralne i negativno nabijene nanočestice mogu lako kretati kroz mukozni sloj dok pozitivno nabijene nanočestice ostaju imobilizirane u mukoznom sloju zbog ionskih interakcija (Bansil, Turner, 2006). S druge strane, pozitivni naboj omogućava veći unos nanočestica endocitozom u stanice. Stoga, cilj je razviti negativno nabijene nanočestice koje mogu promijeniti zeta potencijal nakon penetracije kroz mukozni sloj (Slika 9C). Promjena naboja bi omogućila imobilizaciju nanočestica na ciljanom mjestu apsorpcije lijeka. Promjenu naboja omogućavaju enzimi vezani za površinu membrane mukoznog epitela. Nedavna studija koju su proveli Bonengel i suradnici pokazala je da su nanočestice građene od polietilenimin-6-fosfoglukurnoske kiseline promijenile zeta potencijal od -6.4 do +2.8 u prisutstvu intestinalne alkalne fosfataze. Slični sustavi su još uvijek u fazi istraživanja.



**Slika 9.** Shematski prikaz: A) čestice koje imitiraju virus B) čestice konjugirane enzimom C) čestice koje mijenjaju zeta potencijal (Netsomboon; Bernkop-Schnürch, 2015).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U današnje vrijeme jedan od najčešćih i najjednostavnijih načina primjene lijeka je oralnim putem. Međutim, pri tome glavni problemi su razgradnja lijeka u probavnom traktu, loša topljivost pojedinih djelatnih tvari te ograničena apsorpcija uslijed loše permeabilnosti. Kako bi savladali navedena ograničenja istražuju se različiti terapijski sustavi. Nanočestice imaju sve veću praktičnu primjenu u tehnologiji, medicini i istraživanju. Razvijeno je i novo područje znanosti nazvano nanomedicina. Nanočestice štite uklopljenu djelatnu tvar supstanciju od razgradnje posredovane niskim pH i probavnim enzimima, smanjuju toksično djelovanje lijeka na organizam dok se modifikacijom površine nanočestica utječe na penetrabilnost i selektivnost dostave lijeka. Zbog svojih povoljnih karakteristika nalaze sve veću primjenu u dijagnostici, terapiji i prevenciji bolesti (Iglesias i sur., 2016).

Mukopenetrativne nanočestice omogućuju dostavu lijeka kroz sluznicu oka, respiratornog, gastrointestinalnog i reproduktivnog trakta. Takva ciljana dostava ima brojne prednosti kao što su terapija lokalnih oboljenja u cilju izbjegavanja sistemske apsorpcije te izbjegavanje sistemskih nuspojava lijeka. Modifikacijom površine nanočestica različitim polimerima povećava se penetrabilnost kroz mukoznu barijeru i učinkovitija dostava lijeka do epitelnih stanica (Netsomboon, Bernkop- Schnürch, 2015).

Osnovni cilj ovog diplomskog rada je priprema nanočestica odgovarajućih fizikalnih karakteristika procesom jednostavne desolvatacije pri čemu je korišten polianhidridni polimer komercijalnog naziva Gantrez® AN 169. Riječ je o kopolimeru metil vinil etera i anhidrida jabučne kiseline koji procesom desolvatacije spontano stvara nanočestice, a jednostavno se funkcionalizira u bezvodnom mediju. Cilj istraživanja je bio pripremiti nanočestice koje bi veličinom i karakteristikama površine bile prikladne za primjenu na sluznice s potencijalno mukopenetrativnim karakteristikama. Kako bi se povećala penetrabilnost nanočestica površina je modificirana vezanjem polietilenglikola molekularne mase 6 kDa pri čemu se pratio utjecaj PEGiliranja na svojstva nanočestica. U optimiranu formulaciju nanočestica uklopit će se melatonin s ciljem povećanja njegovog terapijskog potencijala. Melatonin je endogeni indolamin koji pokazuje brojne zaštitne učinke u

ljudskom organizmu, djeluje kao antioksidans i imunomodulator, a sve veću primjenu pokazuje u oralnoj medicini, terapiji periodontitisa i zubnog karijesa. Mukopenetrativne nanočestice u čvrstom stanju pripremit će se postupkom liofilizacije uz dodatak odgovarajućeg krioprotektanta koji će osigurati stabilnost i karakteristike nanočestica prilikom liofilizacije s ciljem pripreme oblika koji je prihvatljiv za skladištenje i transport.

### 3. MATERIJALI I METODE

Pri izvođenju eksperimentalnog dijela diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije, instrumenti i pribor.

#### 3.1 Kemikalije

- Aceton (Sigma- Aldrich, SAD)
- Etanol (CARLO ERBA Reagents SAS, Francuska)
- Gantrez AN-169 polimer molekularne mase 2000 kDa (Ashland, SAD)
- Melatonin (Sigma- Aldrich, SAD)
- Natrijev klorid (Kemig d.o.o., Hrvatska)
- Polietilenglikol Mr 6000 (Sigma- Aldrich, SAD)
- Saharoza (VWR Chemicals, Belgium)
- Visokopročišćena voda

#### 3.2 Instrumenti i pribor

- Biofuge stratus centrifuga (Heraeus, Njemačka)
- Eppendorf centrifuga 5804 (Eppendorf AG, Njemačka)
- Martin Christ  $\alpha$ -1,4 liofilizator (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka)
- Magnetska mješalica (Fisher Scientific, SAD)
- Peristaltička pumpa (Ismatec, Njemačka)
- Precizna analitička vaga Mettler Toledo XS105 (Mettler Toledo, Španjolska)
- Rotavapor R-200 (Büchi, Njemačka)
- Varian Cary 50 UV/Vis spektrofotometar (Varian Inc., SAD)
- Vortex Mixer
- Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Velika Britanija)

### 3.3 Metode

#### 3.3.1 Priprema konvencionalnih i PEGiliranih nanočestica

Nanočestice se pripremaju metodom jednostavne desolvatacije pri čemu je korišten PVMA/MA polimer u rasponu koncentracija od 20 do 45 mg/mL. Konvencionalne nanočestice (NP) pripremljene su desolvatacijom otopine polimera u 6 mL acetona uz miješanje na magnetnoj mješalici pri rasponu brzina od 400 do 1000 rpm. Kod pripreme PEGiliranih nanočestica (PEG NP) polimer je otopljen u 4 mL acetona uz miješanje na magnetskoj mješalici. Potom se otapa polietilenglikol molekularne mase 6000 Da u 2 mL acetona uz lagano zagrijavanje i miješanje na kupelji do otapanja. Masa dodanog polietilenglikola uvijek iznosi 15 % mase dodanog polimera. Otopljeni PEG se dodaje polimeru uz inkubaciju i miješanje na magnetskoj mješalici 1 sat. Nakon toga se dodaje 30 mL visokopročišćene vode u oba pripravka pomoću peristaltičke pumpe uz prilagodbu brzine od 0,75 do 6 mL/min. Nakon 5 minuta miješanja pripravci se uparavaju na Rotavaporu uz spuštanje tlaka sa 300 na 80 mbara. Uparavanje se odvija do potpunog isparavanja organskog otapala, a pripravak se nadopunjava do 30 mL dodatkom pročišćene vode. 300  $\mu$ L uzorka se odvaja za mjerenje veličine nanočestica i zeta potencijala, a ostatak se centrifugira pri 20 000 g u trajanju od 20 minuta uz temperaturu 20 °C. Supernatant se odvaja, a talog se resuspendira u 4 mL 15% saharoze i podliježe postupku liofilizacije tijekom 18 sati. Nakon liofilizacije, vaganjem se određuje prinos te se čestice resuspendiraju u 2 mL pročišćene vode uz vorteksiranje kako bi se odredila veličina, zeta potencijal i polidisperznost nakon liofilizacije.

##### 3.3.1.1 Priprema nanočestica sa melatoninom

Konvencionalne i PEGilirane nanočestice pripremaju se na gore opisani način. Nakon desolvatacije polimera u acetonu i inkubacije od 20 minuta kod konvencionalnih čestica, odnosno sat vremena kod PEGiliranih nanočestica dodaje se 20 mg odnosno 40 mg melatonina otopljenog u 2 mL acetona. Uzorci se miješaju 5 minuta na magnetnoj mješalici,

potom se dodaje 30 mL pročišćene vode automatskom pumpom i uparavaju na Rotavaporu. Uzorci se centrifugiraju na ranije opisan način, a supernatant se koristi za određivanje sadržaja neuklopljenog melatonina UV-Vis spektrofotometrijom. Talog se resuspendira otopinom saharoze i liofilizira.

### 3.3.2 Fizikalno-kemijska karakterizacija nanočestica

Nakon pripreme uzoraka određuju se fizikalno- kemijska svojstva dobivenih nanočestica kao što su veličina, zeta potencijal i polidisperznost. Metoda pomoću koje se određuju naziva se fotonska korelacijska spektroskopija (photon correlation spectroscopy, PCS), a temelji se na raspršivanju svjetlosti laserske zrake određene valne duljine u tekućem mediju (Sugimoto, 2001). Uređaj kojim je mjerenje izvršeno je Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Velika Britanija) pri 25 °C. Korišten je monokromatski koherentni He-Ne laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ), a kut detekcije raspršene svjetlosti je 90°.

Priprema uzorka za mjerenje veličine nanočestica se dobiva pipetiranjem 300  $\mu\text{L}$  pripravaka nanočestica i razrjeđivanjem sa 5 mL visokopročišćene vode. Uređaj tada određuje veličinu čestica u nanometarskom i mikrometarskom rasponu. Za mjerenje zeta potencijala razrjeđujemo 300  $\mu\text{L}$  pripravaka nanočestica sa 5 mL 10 mM natrijevim kloridom. Zeta potencijal je razlika potencijala između mobilnog disperznog i stacionarnog sloja fluida pričvršćenog na dispergirane čestice. Koristi se kao pokazatelj stabilnosti koloidnih disperzija jer ukazuje na stupanj odbojnosti susjednih, slično nabijenih čestica u otopini. Fotonskom korelacijskom spektroskopijom može se odrediti indeks polidisperznosti (PDI). Polidisperznost je mjera heterogenosti veličina čestica u otopini. Čestice mogu biti monodisperzne (iste veličine, mase i oblika) i polidisperzne (nastaju polimerizacijom čestica). Nanočestice se smatraju stabilnima ukoliko je indeks polidisperznosti niži od 0,3 te ukoliko se nije značajno promijenio tijekom perioda inkubacije (Iglesias i sur., 2016).



### 3.3.3 Određivanje sadržaja neuklopljenog melatonina

Prvo je provedena validacija analitičke metode za određivanje sadržaja melatonina. Matična otopina je pripravljena odvagom 10 mg melatonina i otapanjem u 10 mL koncentriranog etanola te nadopunjena do 100 mL pročišćenom vodom. Potom su uzimani alikvoti matične otopine volumena od 250 do 4000  $\mu\text{L}$  i razrjeđivani sa smjesom vode i etanola u volumnom omjeru 1:4 do 10 mL. Na taj način je priređen niz otopina različitih koncentracija i mjerena je njihova apsorbancija na 278 nm pomoću Varian Cary 50 UV/Vis spektrofotometra (Varian Inc., SAD). Kao slijepa proba koristi se smjesa etanola i vode u volumnom omjeru 1:4. Iz tih podataka dobiva se kalibracijski pravac ovisnosti apsorbancije na 278 nm i koncentracije melatonina koji omogućava određivanje radnog područja, granice dokazivanja i granice određivanja. Potom se u iduća dva dana ponavljaju ta mjerenja kako bi se ispitala međudnevna ponovljivost.

Nakon pripreme nanočestica, uzorci se centrifugiraju te se odvaja supernatant od taloga. U talogu se nalaze nanočestice s uklopljenim melatoninom, dok iz supernatanta određujemo zaostali, neuklopljeni melatonin. Alikvoti supernatanta su osušeni smrzavanjem kako bi se izbjegle analitičke interferencije ostataka acetona te potom resuspendirani u 4 mL etanola uz zagrijavanje na vodenoj kupelji. Potom se uzima po 1 mL resuspendirane otopine i razrjeđuje do 10 mL sa pročišćenom vodom uz vorteksiranje kako bi se uklonio zrak. Sadržaj neuklopljenog melatonina se određuje UV/Vis spektrofotometrijom pri 278 nm pri čemu iz dobivenih apsorbancija možemo odrediti koncentraciju i masu melatonina u supernatantu.

Postotak uklopljenog lijeka izračunat je prema izrazu:

$$\text{Postotak uklopljenog lijeka} = \left[ 1 - \frac{\text{masa melatonina u supernatantu}}{\text{ukupna masa melatonina uzeta u preparaciju}} \right] \times 100\%$$

Sadržaj melatonina u konvencionalnim nanočesticama izračunat je prema izrazu:

$$\text{Sadržaj melatonina} = \frac{\% \text{uklapanja} \times m_{\text{melatonina}}}{\text{prinos} \times (m_{\text{melatonina}} + m_{\text{PVMA/MA}} + m_{\text{saharoza}})} \times 100\%$$

Sadržaj melatonina u PEGiliranim nanočesticama izračunat je prema izrazu:

$$\text{Sadržaj melatonina} = \frac{\% \text{uklapanja} \times m_{\text{melatonina}}}{\text{prinos} \times (m_{\text{melatonina}} + m_{\text{PVMA/MA}} + m_{\text{PEG}} + m_{\text{saharoza}})} \times 100\%$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Optimizacija postupka pripreme konvencionalnih i PEGiliranih nanočestica

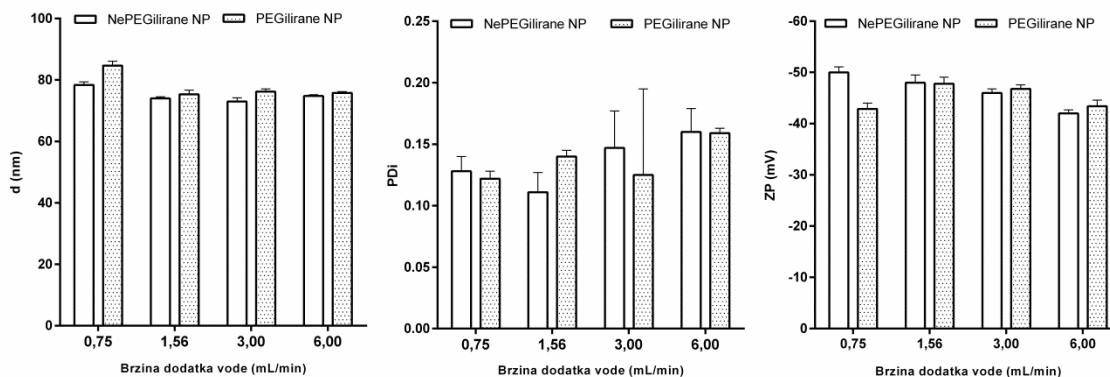
Nanočestice su pripremljene metodom jednostavne desolvatacije korištenjem Gantreza®, kopolimera metil vinil etera i anhidrida jabučne kiseline. Tijekom pripreme nanočestica mijenjani su parametri brzine dodatka vode, brzine miješanja sustava i koncentracije polimera u otopini. Promjenom parametara promatra se promjena svojstva nanočestica kao što su veličina, zeta potencijal i indeks polidisperznosti. Parametri koji ostaju konstantni prilikom pripreme nanočestica su duljina inkubacije, omjer volumena organske i vodene faze te omjer masa polimera i PEGa (100:15). Istovremeno se promatraju dvije vrste nanočestica: konvencionalne i PEGilirane sa polietilenglikolom molekularne mase 6 000 Da. Cilj je bio prirediti monodisperzne nanočestice s veličinom manjom od 200 nm. Sustav se smatra stabilnim i monodisperznim ukoliko je indeks polidisperznosti manji od 0,3 (Iglesias i sur., 2016). Nanočestice su pripremljene u organskom mediju (acetone) jer su istraživanja pokazala da u vodenom mediju polimer hidrolizira u topljivi dikiselinski oblik te je nastajanje nanočestica onemogućeno.

Najprije se proučavao utjecaj brzine dodatka vode tijekom procesa desolvatacije na karakteristike formiranih nanočestica. Dodatkom vode u otopinu kopolimera u acetone dolazi do formiranja nanočestica te brzina dodatka vode je stoga bitan parametar koji utječe na svojstva nanočestica. Rezultati su prikazani u Tablici 2. Voda je dodavana brzinom od 0,75 mL/min, 1,56 mL/min, 3,00 mL/min i 6,00 mL/min. Pri tome, koncentracija otopine polimera iznosila je 20 mg /mL, a brzina miješanja uzorka 1 000 rpm.

**Tablica 2.** Utjecaj brzine dodatka vode prilikom procesa pripreme nanočestica postupkom desolvacije PVMA/MA kopolimera na karakteristike pripremljenih nanočestica kod koncentracije otopine polimera u acetonu od 20 mg/mL i brzinu miješnja uzorka od 1000 rpm: srednji hidrodinamički promjer ( $d$ ), indeks polidisperznosti (PDi) i zeta potencijal ( $\zeta$ ).

Brzina dodatka vode (mL/min)	NePEGiliranenanočestice			PEGiliranenanočestice		
	$d$ (nm)	PDi	$\zeta$ (mV)	$d$ (nm)	PDi	$\zeta$ (mV)
0,75	78,4±1,0	0,128±0,012	-50,0±1,1	84,7±1,4	0,122±0,006	-42,9±1,1
1,56	74,0±0,5	0,111±0,016	-48,0±1,5	75,3±1,4	0,140±0,005	-47,8±1,3
3,00	73,0±1,2	0,147±0,030	-46,1±0,8	76,2±0,9	0,125±0,070	-46,8±0,8
6,00	74,8±0,4	0,160±0,019	-42,0±0,7	75,8±0,04	0,159±0,004	-43,4±1,2

Pripremljene nanočestice pokazuju raspon veličina od 73,0 do 84,7 nm pri čemu su PEGilirane nanočestice uvijek veće pri istoj brzini dodatka vode u odnosu na nePEGilirane nanočestice (Slika 10). Mjerenja pokazuju da nešto veće čestice nastaju pri brzini dodatka vode od 0,75 mL/min, dok su pri ostalim brzinama dodavanja vode veličine nanočestica podjednake. U pravilu, PEGilirane nanočestice su nešto veće od konvencionalnih, što je u skladu sa postojećom literaturom gdje je veličina PEGiliranih čestica veća od onih konvencionalnih. Iako ta razlika u veličini nije toliko značajna, može se pripisati četkastoj strukturi površine koja nastaje vezanjem lanaca PEGa. S obzirom na prikazane rezultate, može se zaključiti kako brzina dodatka vode tijekom procesa desolvatacije nije kritičan parametar koji određuje veličinu nastalih nanočestica. Međutim, veličina pripremljenih nanočestica je značajno ispod ciljane veličine te je potrebno dalje optimirati proces pripreme promjenom drugih parametara kako bi se priredile nanočestice ciljanog raspona veličina.



**Slika 10.** Utjecaj brzine dodatka vode prilikom procesa pripreme nanočestica postupkom desolvacije PVMA/MA kopolimera na srednji hidrodinamički promjer ( $d$ ), indeks polidisperznosti ( $PDI$ ) i zeta potencijal ( $\zeta$ ) čestica. Koncentracija otopine PVMA/MA u acetonu iznosila je 20 mg/mL, a brzina miješanja uzorka 1000 rpm.

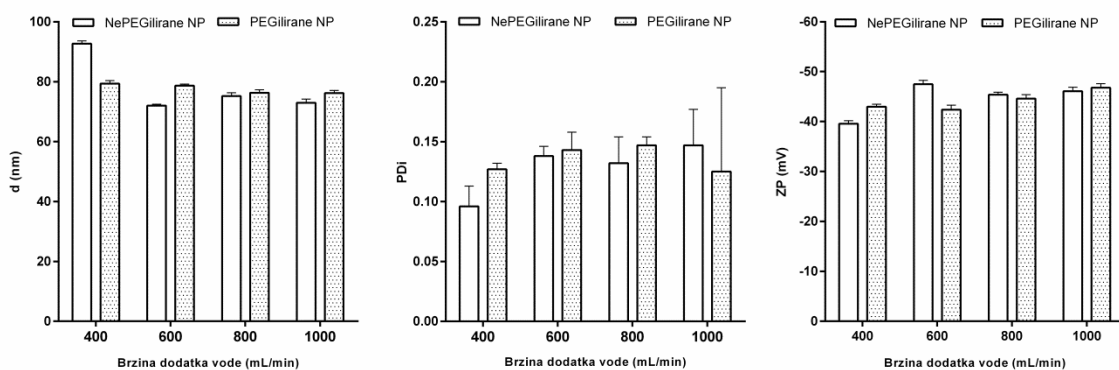
Nadalje, rezultati prikazuju da je indeks polidisperznosti nanočestica kod svih brzina dodatka vode manji od 0,2 te da nema značajnih odstupanja neovisno o promjeni brzine dodatka vode (Slika 10). Najveći indeks polidisperznosti je pri brzini dodatka vode od 6,00 mL/min i iznosi 0,160, a najmanji 0,111 pri brzini od 1,56 mL/min za nePEGilirane nanočestice. Iz navedenih podataka indeksa polidisperznosti možemo zaključiti da su sustavi monodisperzni pri svim brzinama dodatka vode. Osim toga, vrijednosti zeta potencijala se kreću od -42,0 do -50,0 mV. Uočava se kako povećanjem brzine dodatka vode se vrijednosti zeta potencijala smanjuju, izuzev pri brzini od 0,75 ml/min za PEGilirane nanočestice gdje je zeta potencijal najmanji. Negativan zeta potencijal nanočestica je poželjan kako ne bi došlo do interakcija nanočestica s lancima mucina i mukoadherencije. S obzirom na vrijednosti indeksa polidisperznosti i zeta potencijala čestica, u daljnjim formulacija pripreme nanočestica voda je dodavana brzinom od 3 mL/min.

Zatim je ispitivan utjecaj brzine miješanja sustava tijekom procesa desolvacije nanočestica na karakteristike nanočestica (Tablica 3). Ispitivan je utjecaj brzine miješanja od 400 rpm, 600 rpm, 800 rpm i 1 000 rpm.

**Tablica 3.** Utjecaj brzine miješanja tijekom procesa pripreme nanočestica postupkom desolvacije na karakteristike pripremljenih nanočestica kod koncentracije otopine polimera u acetonu od 20 mg/mL i brzinu dodatka vode od 3 ml/min: srednji hidrodinamički promjer ( $d$ ), indeks polidisperznosti (PDi) i zeta potencijal ( $\zeta$ ).

Brzina miješanja (rpm)	NePEGiliranenanočestice			PEGiliranenanočestice		
	d (nm)	PDi	$\zeta$ (mV)	d (nm)	PDi	$\zeta$ (mV)
400	92,7±0,9	0,096±0,017	-39,6±0,6	79,4±1,0	0,127±0,005	-43,0±0,5
600	72,0±0,5	0,138±0,008	-47,5±0,8	78,7±0,5	0,143±0,015	-42,4±0,9
800	75,2±1,1	0,132±0,022	-45,4±0,5	76,3±1,0	0,147±0,007	-44,6±0,8
1000	73,0±1,2	0,147±0,030	-46,1±0,8	76,2±0,9	0,125±0,070	-46,8±0,8

Iz prikazanih podataka, vidljivo je da brzina miješanja sustava tijekom procesa desolvacije također nije kritičan parametar koji bi značajnije utjecao na karakteristike nanočestica. Veličina kako nePEGiliranih, tako i PEGiliranih nanočestica ne varira značajno s promjenom brzine miješanja (Slika 11). Isti trend je uočen i kod vrijednosti indeksa polidisperznosti i zeta potencijala (Slika 11). S obzirom da su pripremljene nanočestice malih dimenzija, što bi moglo dovesti do niskog kapaciteta uklapanja melatonina u nanočestice, proces pripreme je dalje modificiran, mijenjajući koncentraciju polimera u sustavu, uz brzinu miješanja od 600 rpm i brzinu dodatka vode od 3 mL/min. Rezultati su prikazani u Tablici 4.



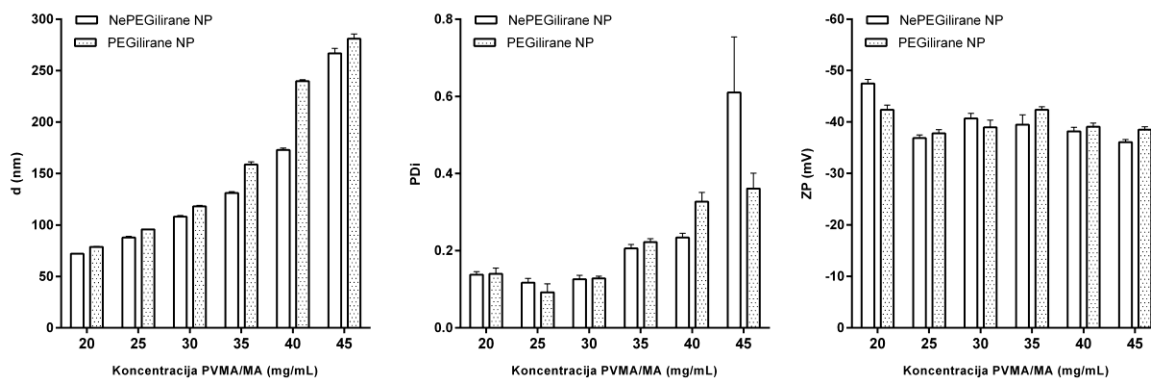
**Slika 11.** Utjecaj brzine miješanja uzorka prilikom procesa pripreme nanočestica postupkom desolvacije PVMA/MA kopolimera na srednji hidrodinamički promjer ( $d$ ), indeks

polidisperznosti (PDi) i zeta potencijal ( $\zeta$ ) čestica. Koncentracija otopine PVMA/MA u acetonu iznosila je 20 mg/mL, a brzina dodatka vode 3 mL/min.

**Tablica 4.** Utjecaj koncentracije otopine polimera u acetonu na karakteristike nanočestica pripremljene postupkom desolvacije uz brzinu miješanja od 600 rpm i brzinu dodatka vode od 3 ml/min: srednji hidrodinamički promjer (d), indeks polidisperznosti (PDi) i zeta potencijal ( $\zeta$ ).

Koncentracija PVM/MA (mg/mL)	NePEGilirane nanočestice			PEGilirane nanočestice		
	d (nm)	PDi	$\zeta$ (mV)	d (nm)	PDi	$\zeta$ (mV)
20	72,0±0,5	0,138±0,008	-47,5±0,8	78,7±0,5	0,143±0,015	-42,4±0,9
25	87,7±1,2	0,117±0,011	-36,9±0,6	95,7±0,1	0,092±0,022	-37,8±0,7
30	108,1±0,3	0,126±0,010	-40,7±1,0	118,0±1,0	0,128±0,006	-39,0±1,4
35	131,1±1,2	0,206±0,010	-39,5±1,9	158,8±2,5	0,222±0,009	-42,4±0,6
40	172,9±1,8	0,234±0,011	-38,2±0,8	239,8±1,3	0,327±0,024	-39,1±0,7
45	266,8±4,9	0,610±0,144	-36,1±0,5	281,1±4,5	0,361±0,040	-38,5±0,6

Na Slici 12. prikazana ovisnosti srednjeg hidrodinamičkog promjera (d) o koncentraciji polimera PVMA/MA u sustavu. Vidljiv je eksponencijalan rast veličine nanočestica s porastom koncentracije polimera, a veličina nanočestica se kreće u rasponu od 72,0 nm i 281,1 nm. U pravilu, PEGilirane nanočestice pokazuju veći srednji hidrodinamički promjer u odnosu na nePEGilirane nanočestice pri istoj koncentraciji polimera. U istraživanju koje su proveli Iglesias i sur. pri korištenju koncentracije polimera od 20 mg/mL veličina PEGiliranih nanočestica je 184 nm, a nePEGiliranih 219 nm pri istim uvjetima. U odnosu na njihovo istraživanje uočljivo je značajno odstupanje jer u gore navedenoj Tablici 4. postignuta je ta veličina tek pri koncentracijama polimera većim od 40 mg/mL. Također, PEGilirane nanočestice su u prosjeku za 9% veće od nePEGiliranih, osim pri koncentraciji polimera od 40 mg/mL u kojem slučaju su one veće 38,7%. U istraživanju koje su proveli Zabaleta i sur. pri koncentraciji polimera od 20 mg/mL veličina nePEGiliranih nanočestica punjenih paklitakselom je 177 nm, a onih PEGiliranih sa paklitakselom je 178 nm. Razlog takvih odstupanja u odnosu na dva provedena istraživanja može biti kao posljedica različitih šarža nabavljenog polimera. S obzirom na dobivenu zadovoljavajuću veličinu nanočestica pri daljnoj optimizaciji svojstava nanočestica korištena je koncentracija polimera od 40 mg/mL.



**Slika 12.** Utjecaj koncentracije PVMA/MA kopolimera u acetonskoj fazi tijekom pripreme nanočestica postupkom desolvacije na srednji hidrodinamički promjer ( $d$ ), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal ( $\zeta$ ) čestica. Brzina miješanja uzorka iznosila je 600 rpm, a brzina dodatka vode 3 mL/min..

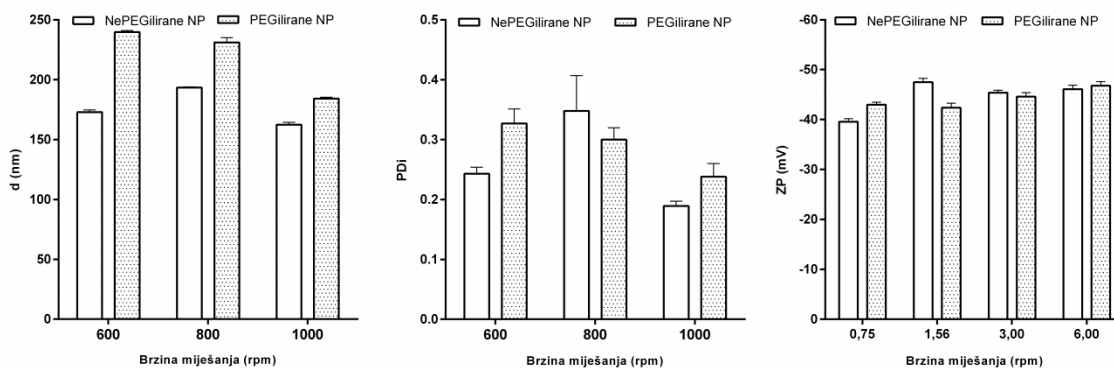
Koncentracija polimera utječe i na polidisperznost nanočestica, koja raste s porastom koncentracije polimera, dok je njen učinak na vrijednost zeta potencijala zanemariv (Slika 12). S obzirom na prikazane rezultate može se zaključiti kako koncentracija polimera od 45 mg/mL nije pogodna za pripremu nanočestica jer rezultira nastajanjem polidisperznih čestica čija je veličina izvan zadanog raspona vrijednosti. Čini se da je maksimalna koncentracija PVMA/MA kopolimera u sustavu koja rezultira nastajanjem nanočestica prihvatljive veličine 40 mg/mL. Kako bi se smanjila polidisperznost sustava pri navedenoj koncentraciji kopolimera, priprema je ponovljena uz promjenu brzine miješanja sustava tijekom procesa desolvacije od 600, 800 i 1000 rpm. U Tablici 5. prikazan je utjecaj brzine miješanja na srednji dinamički promjer ( $d$ ), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal ( $\zeta$ ) pri koncentraciji polimera od 40 mg/mL i brzini dodatka vode od 3 mL/min.



**Tablica 5.** Utjecaj brzine miješanja tijekom procesa pripreme nanočestica postupkom desolvatacije uz koncentraciju PVMA/MA kopolimera od 40 mg/mL i brzinu dodatka vode od 3 mL/min na karakteristike nanočestica: srednji hidrodinamički promjer ( $d$ ), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal ( $\zeta$ ).

Brzina miješanja (rpm)	NePEGiliranenanočestice			PEGiliranenanočestice		
	d (nm)	PDI	$\zeta$ (mV)	d (nm)	PDI	$\zeta$ (mV)
600	172,9±1,8	0,234±0,011	-38,2±0,8	239,8±1,3	0,327±0,024	-39,1±0,7
800	193,4±0,7	0,348±0,059	-37,8±1,1	231,2±3,9	0,300±0,020	-33,6±0,4
1000	162,5±1,9	0,189±0,008	-36,0±1,1	184,2±1,2	0,238±0,022	-40,3±0,9

Iz prikazanih podataka vidljivo je da se kod viših koncentracija PVMA/MA kopolimera u sustavu, veličina nanočestica, kao i vrijednost indeksa polidisperznosti može dodatno regulirati promjenom brzine miješanja (Slika 13), dok vrijednost zeta potencijala ostaje nepromijenjena. S obzirom na ciljane karakteristike nanočestica (veličina čestica <200 nm i PDI < 0.2), optimalnom se pokazala brzina miješanja od 1000 rpm uz koncentraciju polimera od 40 mg/mL i brzini dodatka vode od 3 mL/min. Ovi rezultati mogu se pripisati činjenici da pri većim koncentracijama polimera i manjim brzinama miješanja se više polimera ugrađuje i formira nanočestice što rezultira porastom njihove veličine i polidisperznosti, dok povećanjem brzine miješanja se djelomično sprječava ugradnja polimera u nanočestice te nastaju monodisperzne čestice manjeg srednjeg hidrodinamičkog promjera.

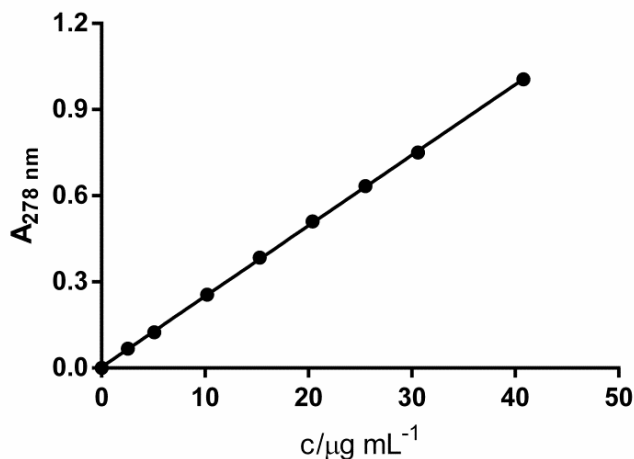


**Slika 13.** Utjecaj brzine miješanja sustava tijekom pripreme nanočestica postupkom desolvacije PVMA/MA kopolimera na srednji hidrodinamički promjer ( $d$ ), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal ( $\zeta$ ) čestica. Koncentracija polimera u uzorku iznosila je 40 mg/mL, a brzina dodatka vode 3 mL/min.

## 4.2 Uklapanje melatonina u nanočestice

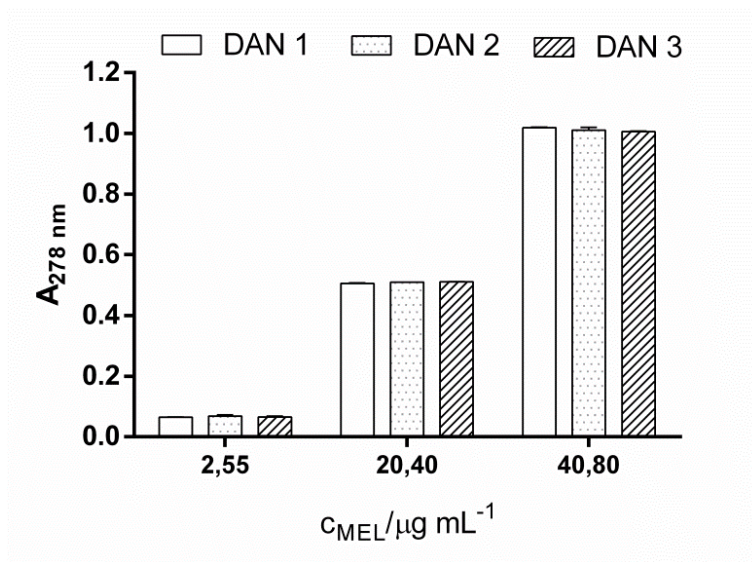
### 4.2.1 Određivanje sadržaja melatonina u uzorcima

Prvi korak u procesu ispitivanja uklapanja melatonina u nanočestice je razvoj i validacija analitičke metode za određivanje sadržaja melatonina. Validacijom analitičkog postupka se utvrđuje i dokumentira prikladnost ispitivanog analitičkog postupka za određenu primjenu. Validacija analitičkog postupka jamči da će se u propisanim uvjetima njegove primjene dobiti valjani rezultati. Prema zahtjevima *Dobre proizvođačke prakse (GMP)* i *Dobre laboratorijske prakse (GLP)* postupci validacije su postali obaveza. Validaciju treba provesti pri razvoju i uvođenju nove analitičke metode, kao i pri promjeni bilo kojeg dijela već validirane analitičke metode. Analitičke značajke koje se određuju u postupku validacije su: preciznost, specifičnost/selektivnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost i radno područje, točnost i izdržljivost (otpornost). Koji parametri će se ispitivati u postupku validacije, ovisit će o namjeni analitičke metode (Nigović i sur., 2014). Kalibracijski pravac prikazan je na Slici 14.



**Slika 14.** Kalibracijski pravac melatonina u izmjeren pri 278 nm.

Preciznost analitičke metode ukazuje na slaganje niza ponovljenih mjerenja iz istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima. Preciznost se može iskazati kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost izražava podudaranje rezultata dobivenih istom metodom pri istim uvjetima u kratkom vremenskom periodu. Na slici 15. prikazana je međudnevna ponovljivost određivanja sadržaja melatonina UV/Vis spektrofotometrijskom metodom u vremenskom periodu od 3 dana. Unutar jednog dana je mjerena apsorbancija za 3 različite koncentracije te su se ta mjerenja ponavljala u iduća 2 dana. Iz grafičkog prikaza je vidljivo da su vrijednosti apsorbancije za pojedinu koncentraciju jednake. Time je zadovoljen parametar ponovljivosti jer se pri istim uvjetima i koristeći istu metodu dobivaju isti rezultati u kratkom periodu.



**Slika 15.** Međudnevna ponovljivost UV/VIS spektrofotometrijskog određivanja sadržaja melatonina.

Linearnost je svojstvo metode da unutar određenog intervala daje vrijednosti koje su izravno proporcionalne koncentraciji analita. Linearnost se može odrediti iz kalibracijske krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji analita i izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca  $k$ , koji treba biti veći od 0,999. Linearnost metode za određivanja sadržaja melatonina je

0,9998 (Tablica 6.). Iz tog podatka je vidljivo kako je parametar linearnosti te metode zadovoljen.

**Tablica 6.** Podaci dobiveni analizom kalibracijskog pravca melatonina.

koeficijent baždarnog pravca	odsječak na ordinati	Linearnost	granica dokazivanja ( $\mu\text{g/mL}$ )	granica određivanja ( $\mu\text{g/mL}$ )	radno područje ( $\mu\text{g/mL}$ )
$0,02460 \pm 0,0001$	$0,0035 \pm 0,0009$	0.9998	0.01	0.03	1.00-40.00

Radno područje je raspon između donje i gornje koncentracije analita unutar kojeg analitička metoda ima prihvatljive vrijednosti linearnosti, preciznosti i točnosti. Radno područje metode za određivanje sadržaja melatonina iznosi 1,00-40,00  $\mu\text{g/mL}$  (Tablica 6.).

Granica dokazivanja (limit of detection, LOD) je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može dokazati, ali ne i odrediti, pri zadanim uvjetima. Računa se prema jednadžbi:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{a}$$

gdje je  $\sigma$  standardno odstupanje određenog broja mjerenja signala slijepog pravca, dok je  $a$  nagib kalibracijskog pravca. Granica dokazivanja za određivanje sadržaja melatonina iznosi 0,01  $\mu\text{g/mL}$  (Tablica 6.).

Granica određivanja (limit of quantitation, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri zadanim uvjetima metode. Računa se prema jednadžbi:

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a}$$

gdje je  $\sigma$  standardno odstupanje određenog broja mjerenja signala slijepog pravca, dok je  $a$  nagib kalibracijskog pravca. Granica određivanja za sadržaj melatonina iznosi 0,03  $\mu\text{g/mL}$  (Tablica 6.).

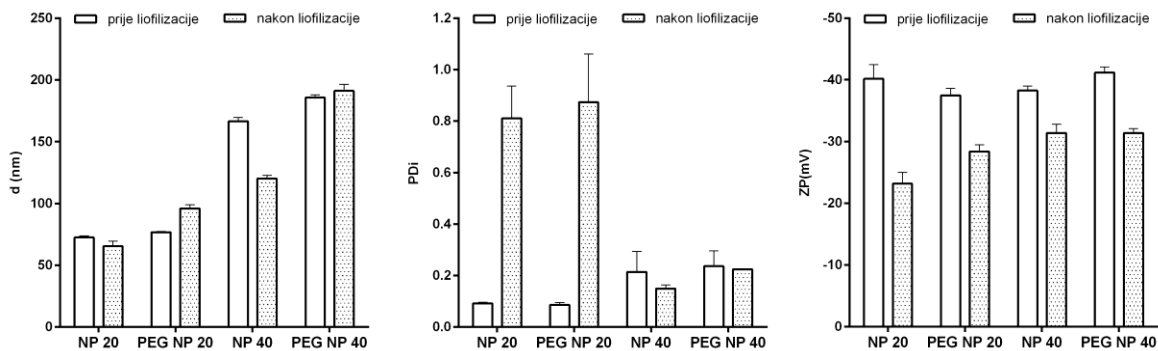
#### 4.2.2 Fizikalno- kemijske karakteristike polianhidridnih čestica s melatoninom

Melatonin je uklopljen u nePEGilirane i PEGilirane nanočestice koje su pripravljene korištenjem niske (20 mg/mL) i visoke (40 mg/mL) koncentracije kopolimera, pri čemu su pripravljene nanočestice manjeg (NP20 i PEGNP20) i većeg promjera (NP40 i PEGNP40). U svim preparacijama, omjer količine melatonina i PVMA/MA kopolimera iznosio je 1:10. Cilj je bio ispitati kakva se sposobnost uklapanja melatonina u nanočestice različitih dimenzija. Osim toga, nanočestice su liofilizirane te je ispitan utjecaj liofilizacije i saharoze kao krioprotektanta na fizikalnokemijska svojstva nanočestica. Rezultati su prikazani u Tablici 7.

**Tablica 7.** *Fizikalno-kemijske karakteristike polianhidridnih nanočestica s melatoninom: srednji promjer (d), indeks polidisperznosti (PDi) i zeta potencijal ( $\zeta$ ) prije i nakon liofilizacije.*

Uzorak	d (nm)		PDi		$\zeta$ (mV)	
	prije lio	nakon lio	prije lio	nakon lio	prije lio	nakon lio
NP20	72,5±1,3	65,5±4,1	0,092±0,004	0,811±0,125	-40,2±2,3	-23,2±1,8
PEG NP20	76,7±0,5	92,9±3	0,086±0,009	0,874±0,187	-37,5±1,3	-28,4±1,1
NP40	166,6±3,0	120,2±2,5	0,214±0,008	0,149±0,014	-38,3±0,7	-31,4±1,4
PEG NP40	185,7±2,3	191,2±5,3	0,236±0,060	0,224±0,002	-41,2±0,9	-31,4±0,7

Uklapanjem melatonina u nePEGilirane i PEGilirane nanočestice došlo je do promjene njihovog promjera koji je nešto manji nego kod nanočestica koje nisu sadržavale melatonin (Tablica 3 i 5), dok se vrijednosti indeksa polidisperznosti i zeta potencijala nisu značajnije razlikovale. Pri tome, PEGilirane nanočestice su nešto većeg promjera od nePEGiliranih nanočestica s uklopljenim melatoninom, što je u skladu s dosadašnjim rezultatima ispitivanja. Liofilizacija je utjecala na promjer nanočestica te je došlo do značajne promjene vrijednosti indeksa polidisperznosti kod NP20 i PEG NP20 nanočestica, što upućuje na agregaciju čestica tijekom procesa liofilizacije. Također, liofilizacija je utjecala na smanjenje vrijednosti zeta potencijala, a taj učinak je bio izraženiji kod manjih čestica (NP20 i PEG NP20). Navedeni rezultati pokazuju da je potrebno dalje optimirati proces liofilizacije promjenom brzine smrzavanja uzorka kao i koncentracije krioprotektanta



**Slika 16.** Utjecaj postupka sušenja smrzavanjem na srednji promjer ( $d$ ), indeks polidisperznosti ( $PDI$ ) i zeta potencijal ( $\zeta$ ) razvijenih polianhidridnih nanočestica s melatoninom.

Veličina nanočestica značajno je utjecala na sposobnost uklapanja melatonina (Tablica 8.). Nanočestice manjih dimenzija (NP20 i PEG NP20) uklapaju 54,5 do 59,2% manje melatonina u odnosu na čestice većih dimenzija (NP40 i PEG NP 40). Postotak uklapanja melatonina u NP40 i PEG NP40 je u skladu s rezultatima drugih istraživača. Primjerice, uspješnost ukapanja memantina u PVMA/MA nanočestice srednjeg promjera 179 nm iznosi  $38.78 \pm 11.8$  (Prieto i sur., 2012). Nadalje, opaženo je da PEGilacija PVMA/MA kopolimera nepovoljno utječe na uklapanje melatonina (Tablica 8.). S obzirom na sadržaj melatonina u NP40 i PEG NP40 nanočesticama moguće je očekivati povoljni terapijski učinak melatonina nakon primjene na sluznice usne šupljine. Naime, prethodna istraživanja su pokazala da topička primjena formulacije s 1% melatonina na sluzice usne šupljine značajno pridonosi liječenju bolesti parodontita (Cutando i sur., 2013). No kako bi se sa većom sigurnošću procijenio terapijski potencijal razvijenih nanočestica s melatoninom, potrebna su daljnja istraživanja.

**Tablica 8.** Fizikalno- kemijske karakteristike polianhidridnih čestica s melatoninom: Prinos, uklapanje i sadržaj melatonina u nePEGilirane i PEGilirane nanočestice pripravljene korištenjem različitih koncentracija PVMA/MA kopilimera (20 i 40 mg/mL).

Uzorak	Prinos (%)	Uklapanje melatonina (%)	Sadržaj melatonina u NP (mg/g)
NP20	64,07	15,61±2,35	8,86
PEG NP20	65,47	12,83±2,85	7,12
NP40	68,10	34,37±4,74	12,62
PEG NP40	69,89	31,46±4,49	11,25

## 5. ZAKLJUČCI

- Proces pripreme polianhidridnih nanočestica optimiran je promjenom brzine dodatka vode i brzine miješanja tijekom procesa desolvatacije te promjenom koncentracije PVMA/MA kopolimera u sustavu, a pratila se promjena srednjeg hidrodinamičkog promjera, zeta potencijala i indeksa polidisperznosti pripremljenih nanočestica.
- Ciljana svojstva nanočestica (veličina oko 200 nm i monodisperznost sustava) postignuta su pri brzini dodatka vode od 3 mL/min, brzini miješanja sustava od 1000 rpm te koncentraciji polimera od 40 mg/mL.
- Pripremom PEGiliranih i nePEGiliranih nanočestica procesom jednostavne desolvatacije pri zadanim uvjetima pripremljene su čestice u rasponu veličina od  $162,5 \pm 1,9$  do  $184,2 \pm 1,2$  nm, indeksa polidisperznosti od  $0,189 \pm 0,008$  do  $0,238 \pm 0,022$  te zeta potencijala od  $-36,0 \pm 1,1$  do  $-40,3 \pm 0,9$ .
- Proces liofilizacije uz saharozu kao krioprotektant nepovoljno utječe na fizikalno-kemijske karakteristike nanočestica te je potrebna njegova daljnja optimizacija.
- Postotak uklapanja melatonina u nanočestice ovisan je o dimenzijama nanočestica te je uklapanje oko 50% više u nanočestice većeg promjera.
- Sadržaj melatonina u nanočesticama je dostatan za postizanje povoljnih terapijskih učinaka primjenom na sluznice usne šupljine.
- Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se nedvosmisleno mogao potvrditi terapijski potencijal razvijenih nanočestica s melatoninom.



## 6. LITERATURA

Aydogan S, Yerer MB, Goktas A. Melatonin and nitric oxide. *J Endocrinol Invest*, 2006, 29, 281-287.

Bansil R, Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2006, 11, 164-170.

Bénès L, Claustrat B, Horrière F, Geoffriau M, Konsil J, Parrott KA, DeGrande G, McQuinn RL, Ayres JW. Transmucosal, oral controlled-release, and transdermal drug administration in human subjects: A crossover study with melatonin. *J Pharm Sci*, 1997, 86, 1115-1119.

Boegh M, Nielsen HM. Mucus as a barrier to drug delivery- Understanding and mimicking the barrier properties. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2015, 116, 179-186.

Bonengel S, Prufert F, Perera G, Schauer G, Bernkop-Schnurch A. Polyethylene imine-6-phosphogluconic acid nanoparticles- a novel zeta potential changing system. *Int J Pharm*, 2015, 483, 19-25.

Carpentieri AR, Peralta Lopez ME, Aguilar J, Solà VM. Melatonin and periodontal tissues: Molecular and clinical perspectives. *Pharm Res*, 2017, 125, 224-231.

Cengiz MI, Cengiz S, Wang HL. Melatonin and oral cavity. *Int J Dent*, 2012.

Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv*, 2009, 61, 75-85.

Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: Potential Functions in the Oral Cavity. *J Periodont*, 2007, 78, 1094-1102.

Cutando A, López-Valverde A, Gómez-de Diego R, Arias-Santiago S, de Vicente- Jiménez J. Effect of gingival application of melatonin on alkaline and acid phosphatase, osteopontin and osteocalcin in patients with diabetes and periodontal disease. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 2013, 18, 657-663.

Cutando A, Montero J, Gómez-de Diego R, Ferrera MJ, López-Valverde A. Effect of topical application of melatonin on serum levels of C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6) and

tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in patients with type 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. *J Clin Exp Dent*, 2015, 628-633.

Czesnikiewicz-Guzik M, Konturek SJ, Loster B, Wisniewska G, Majewski S. Melatonin and its role in oxidative stress related diseases of oral cavity. *J Physio Pharm*, 2007, 58, 5-19.

De Berardis D, Marini S, Fornaro M, Srinivasan V, Iasevoli F, Tomasetti C, Valchera A, Perna G, Quera-Salva M, Martinotti G, Di Giannantonio M. The melatonergic system in mood and anxiety disorders and the role of agomelatine: implications for clinical practice. *Int J Mol Sci*, 2013, 14, 12458-12483.

Flo A, Calpena AC, Halbaut L, Araya EI, Fernández F, Clares B. Melatonin delivery: Transdermal and transbuccal evaluation in different vehicles. *Pharm Res*, 2016, 33, 1615-1627.

Fröhlich E, Roblegg E. Mucus as barrier for drug delivery by nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 2014, 14, 126-136.

Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: A possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol*, 1997, 159, 574-581.

Iglesias T, López de Cerain A, Irache JM, Martín-Arbella N, Wilcox M, Pearson J, Azqueta A. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mucus permeation capacity of several surface modified poly(anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery. *Int J Pharm*, 2017, 517, 67-69.

Inchaurraga L, Martín-Arbella N, Zabaleta V, Quincoces G, Peñuelas I, Irache JM. In vivo study of the mucus-permeating properties of PEG-coated nanoparticles following oral administration. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 97, 280-289.

Jajčević S, Jug M. Mukopenetrativne nanočestice- nov terapijski sustav za dostavu lijeka putem sluznica. *Farmaceutski glasnik*, 2017, 73, 613-620.

Laffleur F, Hintzen F, Shahnaz G. Development and in vitro evaluation of slippery nanoparticles for enhanced diffusion through native mucus. *Nanomedicine*, 2014, 9, 387-396.

Lennernäs H, Ahrenstedt Ö, Ungell AL. Intestinal drug absorption during induced net water absorption in man; a mechanistic study using antipyrine, atenolol and enalaprilat. *Br J Clin Pharmacol*, 1994, 37, 589-596.

Liu M, Zhang J, Shan W, Huang Y. Developments of mucus penetrating nanoparticles. *Asian J Pharm Sci*, 2014, 10, 275-282.

Maisel K, Ensign L, Reddy M, Cone R, Hanes J. Effect of surface chemistry on nanoparticle interaction with gastrointestinal mucus and distribution in the gastrointestinal tract following oral and rectal administration in the mouse. *J Control Release*, 2015, 197, 48-57.

Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuna-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide- included mitochondrial oxidative stress. *FA-SEB J*, 2000, 14, 1677-1679.

Michen B, Graule T. Isoelectric points of viruses. *J Appl Microbiol*, 2010, 109, 388-397.

Najeeb S, Khurshid Z, Zohaib S, Sohail Zafar M. Therapeutic potential od melatonin in oral medicine and periodontology. *Kaohsiung J Med Sci*, 2016, 32, 391-396.

Nakade O, Koyama H, Ariji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res*, 1999, 27, 106-110.

Netsomboon K, Bernkop-Schnürch A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 98, 76-89.

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova- Praktikum, Zagreb, Farmaceutsko- biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014. str 135-137.

Pearson JP, Chater IP, Wilcox MD. The properties of the mucus barrier, a unique gel- how can nanoparticles cross it? *Ther Deliv*, 2016, 7, 229-244.

Philstorm BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*, 2005, 366, 1809-1820.

Prieto E, Puente B, Uixera A, Garcia De Jalon JA, Perez S, Pablo L, Irache JM, Garcia MA, Bregante MA. Gantrez AN nanoparticles for ocular delivery of memantine: In vitro release evaluation in albino rabbits. *Ophthalmic Research*, 2012, 48, 109-117.

Reiter RJ. Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *J Pineal Res*, 2004, 37, 213-214.

Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 351, 152-166.

Sugimoto T. Characterization of products. *Monodispersed Particles*, 2001.

Zabaleta V, Ponchel G, Salman H, Agüeros M, Vauthier C, Irache JM. Oral administration of paclitaxel with pegylated poly(anhydride) nanoparticles: Permeability and pharmacokinetic study. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 81, 514-523.

## 7. SAŽETAK

Cilj ovog diplomskog rada bila je priprema mukoadhezivnih i mukopenetrativnih, polianhidridnih nanočestica s melatoninom. Melatonin je endogeni spoj koji je pokazao značajan terapijski potencijal u liječenju bolesti usne šupljine, stimulaciji imunološkog sustava te kao adjuvans u borbi protiv infekcija. Uklapanjem melatonina u nanočestice omogućava se njegova apsorpcija kroz mukozu te izbjegavanje prvog prolaska kroz metabolizam, brži početak djelovanja i ciljano djelovanje. Oblaganjem površine nanočestica polietilenglikolom može se utjecati na njihov transport na sluznici te tako pripremiti mukoadhezivne (nePEGilirane) i mukopenetrativne (PEGilirane) nanočestice. Pri tome je nužna optimizacija tehnološkog postupka pripreme s ciljem pripreme nanočestica ciljanih svojstava. Rezultati ispitivanja pokazuju da promjenom koncentracije polianhidridnog polimera je moguće kontrolirati veličinu nanočestica, dok brzina dodatka vode i miješanje sustava tijekom postupka desolvatacije u pravilu pridonosi nastajanju monodisperznih nanočestica. Nanočestice željenih svojstava pripremljene su pri brzini dodatka vode od 3 mL/min, brzini miješanja od 1000 rpm i koncentraciji polimera od 40 mg/mL te je postignuto zadovoljavajuće uklapanje melatonina. PEGilirane i nePEGilirane nanočestice s melatoninom u krutom stanju uspješno su pripremljene postupkom liofilizacije i predstavljaju potencijalno koristan terapijski sustav za liječenje bolesti usne šupljine.

## 7. SUMMARY

The aim of this graduate thesis was the preparation of mucoadhesive and mucopenetrative polyanhydride nanoparticles loaded with melatonin. Melatonin is an endogenous compound that has shown significant therapeutic potential in the treatment of oral cavity diseases, immune system stimulation acting as an adjuvant to combat infections. Encapsulation of melatonin into the nanoparticles enhances its absorption through the mucus, avoiding the first passage metabolism, thus providing faster onset and localised action. Coating of the nanoparticle surface with polyethylene glycol can affect their transport through mucous. Therefore, we have prepared mucoadhesive (non-PEGylated) and mucopenetrative (PEGylated) nanoparticles. Technological process of nanoparticle preparation was optimised with the aim of preparing the nanoparticles of the targeted properties. The results show that by varying the concentration of polyhydric polymer is possible to control the size of nanoparticles, while the rate of addition of water and the mixing rate of the system during the desolvation process is generally responsible for the formation of monodisperse nanoparticles. The nanoparticles of targeted properties were prepared at a water addition rate of 3 mL / min, a mixing rate of 1000 rpm and the polymer concentration of 40 mg / mL, with a satisfactory melatonin encapsulation efficiency. PEGylated and non-PEGylated melatonin nanoparticles in solid state are successfully prepared by lyophilization and represent a potentially useful delivery system for the treatment of oral cavity diseases.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### OPTIMIZACIJA POSTUPKA PRIPREME POLIANHIDRIDNIH NANOČESTICA S MELATONINOM

**Martina Smenderovac**

#### SAŽETAK

Cilj ovog diplomskog rada bila je priprema mukoadhezivnih i mukopenetrativnih, polianhidridnih nanočestica s melatoninom. Melatonin je endogeni spoj koji je pokazao značajan terapijski potencijal u liječenju bolesti usne šupljine, stimulaciji imunološkog sustava te kao adjuvans u borbi protiv infekcija. Uklapanjem melatonina u nanočestice omogućava se njegova apsorpcija kroz mukozu te izbjegavanje prvog prolaska kroz metabolizam, brži početak djelovanja i ciljano djelovanje. Oblaganjem površine nanočestica polietilenglikolom može se utjecati na njihov transport na sluznici te tako pripremiti mukoadhezivne (nePEGilirane) i mukopenetrativne (PEGilirane) nanočestice. Pri tome je nužna optimizacija tehnološkog postupka pripreme s ciljem priprave nanočestica ciljanih svojstava. Rezultati ispitivanja pokazuju da promjenom koncentracije polianhidridnog polimera je moguće kontrolirati veličinu nanočestica, dok brzina dodatka vode i miješanje sustava tijekom postupka desolvatacije u pravilu pridonosi nastajanju monodisperznih nanočestica. Nanočestice željenih svojstava pripremljene su pri brzini dodatka vode od 3 mL/min, brzini miješanja od 1000 rpm i koncentraciji polimera od 40 mg/mL te je postignuto zadovoljavajuće uklapanje melatonina. PEGilirane i nePEGilirane nanočestice s melatoninom u krutom stanju uspješno su pripremljene postupkom liofilizacije i predstavljaju potencijalno koristan terapijski sustav za liječenje bolesti usne šupljine.

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

Rad sadrži: 44 stranice, 16 slika, 8 tablica i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

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. Anita Hafner**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr.sc. Jasna Jablan**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Technology  
Domagojeva 2, 1000 Zagreb, Croatia

Diploma Thesis

### OPTIMIZING THE PREPARATION PROCESS OF MELATONIN LOADED POLYANHYDRIDE NANOPARTICLES

Martina Smenderovac  
SUMMARY

The aim of this graduate thesis was the preparation of mucoadhesive and mucopenetrative polyanhydride nanoparticles loaded with melatonin. Melatonin is an endogenous compound that has shown significant therapeutic potential in the treatment of oral cavity diseases, immune system stimulation acting as an adjuvant to combat infections. Encapsulation of melatonin into the nanoparticles enhances its absorption through the mucus, avoiding the first passage metabolism, thus providing faster onset and localised action. Coating of the nanoparticle surface with polyethylene glycol can affect their transport through mucous. Therefore, we have prepared mucoadhesive (non-PEGylated) and mucopenetrative (PEGylated) nanoparticles. Technological process of nanoparticle preparation was optimised with the aim of preparing the nanoparticles of the targeted properties. The results show that by varying the concentration of polyhydric polymer is possible to control the size of nanoparticles, while the rate of addition of water and the mixing rate of the system during the desolvation process is generally responsible for the formation of monodisperse nanoparticles. The nanoparticles of targeted properties were prepared at a water addition rate of 3 mL / min, a mixing rate of 1000 rpm and the polymer concentration of 40 mg / mL, with a satisfactory melatonin encapsulation efficiency. PEGylated and non-PEGylated melatonin nanoparticles in solid state are successfully prepared by lyophilization and represent a potentially useful delivery system for the treatment of oral cavity diseases.

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

Thesis includes: 44 pages, 16 figures, 8 tables i 40references. Original is in Croatian language.

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

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

**Dr.sc. Jasna Jablan**, Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: September 2018.