

Liofilizacija nanosuspenzije melatonina uz dodatak krioprotektora

Rogina, Tin

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:627813>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

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



Tin Rogina

**Liofilizacija nanosuspenzije melatonina uz
dodatak krioprotektora**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, kolegij Farmaceutika pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Anite Hafner. Ovaj rad sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP- 2017-05-4592.

Prije svega, zahvaljujem prof. dr. sc. Aniti Hafner na ukazanom povjerenju te pružanju prilike i podrške za uključivanje u studentski rad nakon tek odslušanih stručnih predmeta, bez čega sigurno ne bih isprobao toliko različitih tehnika i naučio toliko o in situ gelirajućim sustavima. Hvala Vam na svemu, no najviše na stručnom vodstvu i na svim konstruktivnim komentarima.

Zahvaljujem dr. sc. Lauri Nižić Nodilo na ugodno provedenom vremenu u laboratoriju i svim praktičnim savjetima, no prvenstveno na pomoći u pripremi i provedbi ispitivanja. Zahvaljujem i svim zaposlenicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na susretljivosti i gostoprimstvu.

Nakon dvije godine laboratorijskog rada, obilježenog usputnim razgovorom uz Radio Sljeme i (većinom) uspješnim rezultatima, zahvaljujem kolegici Veroniki Riji Tus na upuštanju u ovu avanturu i na svim ispitivanjima koja su postala dio cjeline uz nastavak u obliku ovog rada.

Uz mene su na višegodišnjem studijskom putu bili brojni ljudi koji su se zadržali kraće ili dulje, od studentskog zbora (SZFBF, SZZG, HSZ) do studentske udruge (CPSA), među kojima je svatko ostavio svoj trag. Međutim, najviše zahvaljujem svim prijateljima zbog kojih su se ispiti polagali brže, uz koje je vremena provedeno više, s kojima se smijalo jače i putovalo zajedno.

Na kraju i na početku svega, zahvaljujem svojim roditeljima, koji su svaki ispit proživljavali sa mnom, koji su uvijek bili uz mene, koji su bili glas razuma u svijetu šumova i koji su omogućili sve što je bilo potrebno – na poticanju i usmjeravanju, savjetima i riječima bezuvjetne podrške.

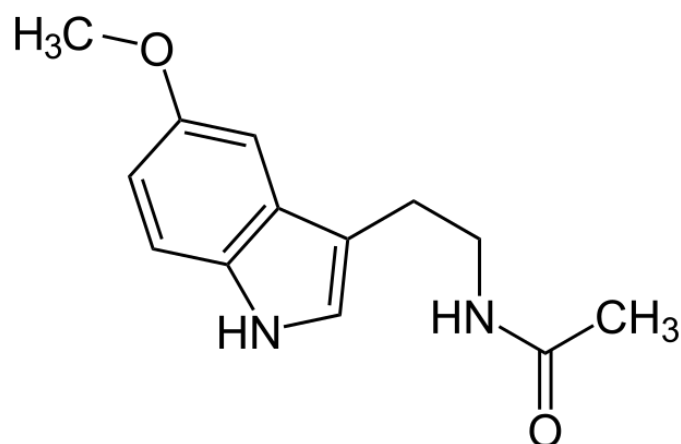
Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. MELATONIN.....	1
1.1.1. Mehanizam djelovanja.....	2
1.1.2. Terapijske mogućnosti nazalne primjene	3
1.1.3. Stanje na tržištu lijekova i dodataka prehrani.....	4
1.2. NANOSUSPENZIJE	4
1.2.1. Vlažno mljevenje	5
1.2.2. Fizičko-kemijska karakterizacija	6
1.2.3. Nanotehnologija u kontekstu nazalne primjene.....	8
1.3. SUŠENJE SMRZAVANJEM	9
1.3.1. Povijesni pregled i usavršavanje metode	9
1.3.2. Osnove i tijek liofilizacije.....	10
1.3.3. Formulacijski parametri.....	12
1.3.3.1. Svrha krio-/lioprotektora.....	13
1.3.4. Procesni i ostali parametri.....	19
2. OBRAZLOŽENJE TEME	22
3. MATERIJALI I METODE	24
3.1. MATERIJALI.....	24
3.2. METODE	24
3.2.1. Priprava nanosuspenzije melatonina.....	24
3.2.2. Određivanje veličine čestica melatonina u nanosuspenziji.....	25
3.2.3. Proces liofilizacije nanosuspenzije melatonina uz dodatak krioprotektora	26
3.2.4. Rekonstitucija nanosuspenzija melatonina iz liofilizata.....	27
3.2.5. Karakterizacija rekonstituiranih nanosuspenzija melatonina	28
3.2.6. Statistička analiza	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Priprava i karakterizacija nanosuspenzije melatonina.....	30
4.2. Priprema nanosuspenzije melatonina uz dodatak krioprotektora	31
4.3. Uspješnost liofilizacije i fizička svojstva rekonstituiranih nanosuspenzija melatonina	33
4.4. Stabilnost liofiliziranih nanosuspenzija melatonina	41
5. ZAKLJUČCI	44
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	45
7. LITERATURA	46
8. SAŽETAK/SUMMARY	60
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. MELATONIN

Melatonin (Slika 1.) je neurohormon indolske strukture (*N*-acetil-5-metoksitriptamin) koji u ljudskom organizmu fiziološki sintetizira i izlučuje primarno epifiza (Claustrat i sur., 2005). Lipofilnog je karaktera i ograničene topljivosti u vodi – 0,1 mg/mL pri 25 °C (Sakellaropoulou i sur., 2022). Sekretija melatonina regulirana je endogenim „satom“ suprahijazmatske jezgre (SCN) koja je smještena unutar hipotalamusa i upravlja svim cirkadijanim ritmovima (Ma i Morrison, 2023). Sinteza započinje od molekule triptofana, uz serotonin kao međuprodukt koji se uz pomoć enzima serotonin-*N*-acetil transferaze (NAT) i hidroksiindol-*O*-metil transferaze (HIOMT) pretvara u melatonin (Klein i Weller, 1970). Transkripcija gena za ove enzime odvija se u ciklusu dan/noć koji predstavlja glavni mehanizam regulacije izlučivanja melatonina. Ono se značajno suprimira pri akutnom izlaganju intenzitetu svjetlosti 2000-2500 lx, a umjerena supresija je uočena i pri kontinuiranom izlaganju sobnom intenzitetu svjetlosti < 500 lx, što može uzrokovati poremećaje spavanja (Lewy i sur., 1980; Gooley i sur., 2011; Farhadi i sur., 2016). Vršne koncentracije u plazmi zabilježene su u razdoblju između 03:00 i 04:00 sata ujutro i iznose otprilike 10-80 µg/noć (Geoffriau i sur., 1999). Uz jednu od najvećih zabilježenih amplituda u razini hormona, kod zdravih odraslih muškaraca dokazano je kako izlučivanje melatonina slijedi dva mehanizma; vrlo niska bazalna sekretija i glavna pulsatilna sekretija, čiji je omjer među pojedincima (interindividualno) varijabilan (Follenius i sur., 1995).



Slika 1. Struktura melatonina

1.1.1. Mehanizam djelovanja

Zahvaljujući periodičnom izlučivanju, melatonin se smatra endogenim sinkronizatorom čija je uloga stabilizirati cirkadijane ritmove, 24-satne cikluse fizioloških promjena i promjena u ponašanju između stanja visoke i niske aktivnosti, te održati njihov međusobni odnos (Zisapel, 2018). Osnovni mehanizam djelovanja melatonina temelji se na četiri različita učinka; vezanje za unutarstanične proteine (npr. kalmodulin), antioksidativni učinak hvatanjem slobodnih radikala i *in vivo* regulacijom enzima (npr. glutation peroksidaza), vezanje za nuklearne *orphan* receptore za koje nisu poznate signalne molekule i vezanje za melatoninске receptore smještene na plazmatskoj membrani (Cardinali i sur., 1997). Receptori za melatonin su transmembranski receptori sa sedam zavojnica na koje su vezani G-proteini (GPCR), klasificirani su kao MT1 i MT2, i široko su rasprostranjeni u različitim tkivima poput mozga, mrežnice, limfocita itd. (Ekmekcioglu, 2006; Liu i sur., 2016). Odgovorni su za pleiotropni učinak melatonina na glavne fiziološke funkcije (regulacija tjelesne temperature i kardiovaskularnog sustava, hemostaza, imunosti odgovor), stanični ciklus (dioba) i biokemijske mehanizme (stanično disanje, zaštita od oksidativnog stresa), koji imaju cirkadijana obilježja i podložni su sezonskim promjenama u duljini trajanja dana (Macchi i Bruce, 2004; Hardeland i sur., 2011; Claustrat i Leston, 2015). Lipofilni karakter melatoninu omogućava prolazak kroz različite membrane, između ostalog kroz krvno-moždanu barijeru u CNS gdje djeluje neuroprotektivno, iako je prolazak u CNS ograničen primjenom oralnih oblika zbog topljivosti (Lee i sur., 2019).

Primjena melatonina pokazala je vrlo dobru učinkovitost i sigurnost u različitim dobnih skupina, bez klinički značajnih štetnih učinaka i promjena u fiziološkim i biokemijskim parametrima. S obzirom na njegovu ulogu u održavanju cirkadijanih ritmova, indirektno u održavanju pravilne arhitekture i kvalitete sna, njegov učinak je prepoznat u liječenju poremećaja spavanja poput nesаницe, poremećaja disanja tijekom spavanja, hipersomnolencije, poremećaja cirkadijanog ritma (spavanje-budnost) i različitih kliničkih oblika parasomnije (Xie i sur., 2017). Učinak kojim melatonin djeluje antioksidativno i sprječava slabljenje fizioloških funkcija, a posebno u različitim regijama mozga, dokazan je u brojnim istraživanjima ishemije i reperfuzije. Osim toga, sudjeluje u zaštiti organizma od upale, stanične apoptoze i ekscitotoksičnosti pomažući ujedno i u obnavljanju funkcije stanica i tkiva (Reiter i sur., 2016; Alghamdi, 2018).

1.1.2. Terapijske mogućnosti nazalne primjene

Nazalna primjena lijekova predstavlja učinkovit i neinvazivan put primjene širokog spektra djelatnih tvari za postizanje primarno lokalnog, ali i sistemskog učinka uz zaobilazanje metabolizma prvog prolaska kroz jetru, te s potencijalom izravne dostave lijeka u mozak zaobilazeći krvno-moždanu barijeru (Illum, 2004; Costantino i sur., 2007). Velika površina epitela sluznice (mukoze) nosne šupljine, velika permeabilnost i opsežna vaskularizacija omogućavaju sistemsku dostavu i brz početak djelovanja lijeka (Wu i sur., 2023). Apsorpcija tako primijenjenog lijeka ovisit će o patofiziološkom stanju sluznice, svojstvima lijeka i farmaceutskom obliku s obzirom na to da neki od oblika, poput kompleksa s ciklodekstrinima, mikrosfera i liposoma, mogu povećati učinak transmukozne dostave lijeka (Song i sur., 2004; Nižić Nodilo i sur., 2021). Izravna dostava lijeka u središnji živčani sustav (CNS) uključuje dva moguća mehanizma transporta; difuzijom kroz epitel (npr. lipofilni lijekovi i male biološke molekule) ili transneuronskim putem duž aksona olfaktornog živca i ogranaka trigeminalnog živca smještenih u olfaktornom i respiratornom području nosne šupljine (Hafner i sur., 2014; Nance i sur., 2022). Lokalnom primjenom omogućava se smanjenje doze lijeka, koja je potrebna za postizanje lokalnog učinka, i smanjenje s njom povezanih sistemskih nuspojava. Sve navedene prednosti, uz jednostavnost samoprimjene, u konačnici mogu rezultirati povećanom adherencijom pacijenata, pogotovo onih s poremećajima gastrointestinalnog sustava, u liječenju različitih akutnih i kroničnih bolesti (Lofts i sur., 2022).

Učinak melatonina ovisit će o tome je li prisutan u fiziološkim (30–400 pM) ili farmakološkim (1–1000 nM) koncentracijama. Primjena melatonina u dozama koje su nekoliko redova veličina veće od vršne noćne koncentracije osigurat će u kratkom vremenu suprafiziološke razine koje će djelovati na MT receptore snažnijom desenzitizacijom i duljim vremenom oporavka, no s očuvanom učinkovitošću nakon ponovljene primjene i bez povratnog *rebound* učinka prilikom ukidanja lijeka (Lemoine i sur., 2011; Claustrat i Leston, 2015; Nikolaev i sur., 2021). S obzirom na poluvrijeme eliminacije, primjena melatonina najčešće je preporučena 45 min prije željenog učinka (Harpsøe i sur., 2015). U kontekstu nazalne primjene, Bechgaard i suradnici (1999) su pokazali kako je bioraspoloživost nakon primjene otopine melatonina za nos (50 µL) u kunića iznosila 55 % bez dodatka i 94 % uz dodatak natrijevog glikolata, u odnosu na bioraspoloživost nakon oralne primjene koja je iznosila manje od 10 % (Lane i Moss, 1985; Bechgaard i sur., 1999). Relativno visoka bioraspoloživost i bez dodatka pojačivača može se objasniti lipofilnošću i malom veličinom molekule melatonina, ukazujući na terapijski potencijal nazalne

primjene uz potreban razvoj prikladnog farmaceutskog oblika s učinkovitom dozom lijeka u ograničenom volumenu (do 200 μ L po nosnici) tekućeg pripravka (Gao i sur., 2020).

1.1.3. Stanje na tržištu lijekova i dodataka prehrani

U RH su trenutno odobrena tri lijeka koja sadrže melatonin kao djelatnu tvar. Svi su odobreni centraliziranim postupkom, tj. odlukom Europske komisije na temelju stručne ocjene Europske agencije za lijekove (EMA). Svima su im zajednički farmaceutski oblik (tableta s produljenim oslobađanjem), način izdavanja (na recept) i ATK skupina (N05CH01; psiholeptici, agonisti melatoninskih receptora). Circadin[®] i Melatonin Neurim[®] su odobreni kao monoterapija za kratkotrajno liječenje primarne insomnije, koju karakterizira loša kvaliteta sna, u bolesnika u dobi od 55 ili više godina, dok je Slenyto[®] odobren za liječenje nesаницe u djece i adolescenata u dobi od 2 do 18 godina s poremećajem iz spektra autizma (engl. *Autism Spectrum Disorder*, ASD) u kojih su mjere higijene spavanja nedovoljne, uz preporuku za proširenje terapijske indikacije na neurogenetičke poremećaje s abnormalnim dnevnim izlučivanjem melatonina i/ili noćnim buđenjima koju je Povjerenstvo za humane lijekove (engl. *Committee for Medicinal Products for Human Use*, CHMP) objavilo u srpnju 2024. (www.halmed.hr; www.ema.europa.eu).

Međutim, pripravci s melatoninom koji se nalaze u ljekarni većinom su registrirani kao dodaci prehrani koji se smatraju koncentriranim izvorima tvari prehranbenog ili fiziološkog učinka i koji podliježu manje striktnim regulatornim zahtjevima prilikom stavljanja na tržište. Trenutno se oko 50 različitih pakiranja nalazi na hrvatskom tržištu. Od farmaceutskih oblika prevladavaju tablete, zatim slijede kapsule, sprej i tablete za žvakanje (<https://sissijavneusluge.dirh.hr>).

1.2. NANOSUSPENZIJE

Norio Taniguchi, japanski znanstvenik, prvi je 1974. upotrijebio pojam „nanotehnologija“ kako bi opisao izradu materijala specifičnih svojstava s nanometarskom preciznošću na razini atoma i molekula (Taniguchi, 1974; Bayda i sur., 2019). Nanosuspenzije, kao jedan od inovativnih sustava za isporuku lijeka, koloidne su disperzije teško topljivih djelatnih tvari usitnjenih do nanometarskih dimenzija i formuliranih uz pomoć površinski aktivnih tvari i/ili polimera kao stabilizatora (Jacob i sur., 2020). Međusobno se razlikuju s obzirom na metodu pripreme, pomoćne tvari, svojstva konačnog farmaceutskog oblika i put primjene. Sastavljene su od nanočestica koje je teško univerzalno definirati zbog multidisciplinarne primjene, no

prihvaćeno je kako se radi o submikronskim česticama veličine < 1000 nm u svim dimenzijama (Malamatari i sur., 2018). Smanjenjem veličine čestica povećava se njihova specifična površina, brzina otapanja i topljivost, što posebno predstavlja jednu od strategija razvoja formulacija djelatnih tvari za oralnu primjenu koje se na temelju biofarmaceutске klasifikacije tvari (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS) svrstavaju u klasu II (slabo topljive, dobro permeabilne) ili u klasu IV (slabo topljive, slabo permeabilne) (Merisko-Liversidge i Liversidge, 2011). Velik udio (> 50 %) danas otkrivenih lijekova slabe je topljivosti u vodi, stoga formulacija karakterizirana povećanom brzinom otapanja predstavlja jedan od izazova u razvoju novih lijekova (Han i sur., 2023).

Prednosti nanosuspenzija dosad su široko istraživane u kontekstu oralne, oftalmičke i inhalacijske primjene, a sve više se otkriva njihov terapijski potencijal i kod ostalih putova primjene poput topikalne, bukalne, nazalne, transdermalne i izravne dostave u mozak, koji mogu osigurati lokalni ili sistemski učinak lijeka. Za njihovu pripravu koristi se više metoda (engl. *bottom-up* ili *top-down*). Pri razvoju formulacije odabiru se pomoćne tvari s obzirom na željeni učinak (stabilizatori, organska otapala, surfaktanti, kosurfaktanti, krioprotektori, osmotski aktivne tvari). Nanosuspenzije mogu biti podvrgnute različitim procesima (sušenje smrzanjem, sušenje raspršivanjem, smrzanje raspršivanjem) kojima se iz tekućeg prevode u čvrsti oblik kako bi im se povećala dugoročna stabilnost i kako bi se mogli lakše uklapati u ostale farmaceutске oblike (Patravale i sur., 2004; Pinar i sur., 2023).

1.2.1. Vlažno mljevenje

Metode pripreme nanosuspenzija dijele se u dvije skupine, ovisno o pristupu. U *bottom-up* procesu (npr. precipitacija) čestice iz molekularne disperzije kondenzacijom/agregacijom rastu, a u češće primjenjivanom *top-down* procesu (npr. mljevenje) rastavljanjem/raspadanjem se smanjuju do nanometarskih dimenzija (Patel i Agrawal, 2011; Ahmadi Tehrani i sur., 2019).

Vlažno mljevenje je metoda kojom se veličina čestica djelatne tvari dispergirane u vodenom mediju uz dodatak kuglica za mljevenje i uslijed rotacije smanjuje zbog sudara i trenja između čestica međusobno, između čestica i okolnog medija s kuglicama te između čestica i stijenki posude (George i Ghosh, 2013). Kritičnim procesnim parametrima pokazali su se volumen punjenja, veličina kuglica za mljevenje i materijal od kojeg su proizvedene, brzina mljevenja i duljina trajanja mljevenja (Peltonen i Hirvonen, 2010; Pinar i sur., 2022). Niska potrošnja energije, jednostavno uvećanje mjerila proizvodnje (engl. *scale-up*), male varijacije između

proizvodnih serija i kapacitet obrade veće količine uzorka čine ovu metodu izrazito pogodnom za razvoj formulacija i industrijsku proizvodnju (Jacob i sur., 2020).

Nanonizacijom čestica dolazi do pozitivne promjene Gibbsove slobodne energije i rezultat toga je termodinamički nestabilna formulacija čije su čestice podložne agregaciji kako bi se smanjila međufazna napetost (Van Eerdenbrugh i sur., 2008; Wang i sur., 2013). U svrhu stabilizacije nanosuspenzija pripremljenih metodom vlažnog mljevenja koriste se pomoćne tvari koje će elektrostatičkim (nabijene površinski aktivne tvari) i/ili steričkim (neutralne površinske aktivne tvari i polimeri) interakcijama biti prepreka aglomeraciji čestica (Ghosh i sur., 2011). Mehanizmu stabilizacije, a posljedično razvoju proizvoda željene veličine čestica nakon mljevenja i dugoročne stabilnosti, najviše pridonose morfološka svojstva početnog materijala, površinska svojstva, stupanj hidrofobnosti i vrijednost entalpije djelatne tvari te fizička svojstva stabilizatora čiji odabir će utjecati na međusobnu interakciju kao jedan od najvažnijih čimbenika u osiguravanju stabilnosti nanosuspenzija (George i Ghosh, 2013).

1.2.2. Fizičko-kemijska karakterizacija

Metoda izrade nanosuspenzije i izbor pomoćnih tvari utječu na udio dispergirane djelatne tvari, fizičku stabilnost, *in vivo* bioraspodjeljivost i sigurnost primjene formulacije (Yang i sur., 2008; Sattar i sur., 2017). Fizičko-kemijska karakterizacija u procesu razvoja nanosuspenzija obuhvaća određivanje njihovih kritičnih značajki kvalitete (engl. *critical quality attributes*, CQA) – veličine čestica, raspodjele veličina čestica, zeta-potencijala čestica i njihovih morfoloških karakteristika (Gao i sur., 2008; Patel i Agrawal, 2011; George i Ghosh, 2013).

Raspodjela veličina čestica izražava se indeksom polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI), bezdimenzijskom veličinom koja služi za procjenu širine i homogenosti raspodjele veličina čestica. Indeks PDI između 0,1 i 0,25 označava usku, a iznad 0,5 relativno široku raspodjelu (Lakshmi i Kumar, 2010; Danaei i sur., 2018). Najčešće tehnike mjerenja veličine čestica su dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS) poznato i kao fotonska korelacijska spektroskopija (engl. *photon correlation spectroscopy*, PCS), zatim laserska difraktometrija (engl. *laser diffractometry*, LD), svjetlosna mikroskopija i brojanje primjenom Coulterovog načela (Aldeeb i sur., 2024). Fotonska korelacijska spektroskopija temelji se na dinamičkom raspršenju zrake svjetlosti određene valne duljine na česticama u nasumičnom gibanju (Brownovo gibanje) koje ovisi o veličini čestica, temperaturi i viskoznosti medija (Stetefeld i sur., 2016). Rezultati dobiveni analizom su z-prosjek uzorka, srednji promjer

ponderiran intenzitetom ukupne populacije čestica, i indeks polidisperznosti (Mishra i sur., 2009; Granata i sur., 2022). Prednosti ove tehnike su jednostavno mjerenje koje zahtijeva male volumene uzorka bez potrebne prethodne kalibracije, precizna i pouzdana analiza, široka primjena i radno područje (< 1 nm do $10 \mu\text{m}$) zbog kojeg je njezina primjena uobičajena u karakterizaciji čestica nanometarskih dimenzija u tekućem mediju (Jans i sur., 2009). Nedostatak je velika osjetljivost na nečistoće, otežano mjerenje netransparentnih uzoraka sa širokom raspodjelom veličina čestica ili nakupinama čestica (Malm i Corbett, 2019; Wishard i Gibb, 2019). S druge strane, laserska difrakcija kao tehnika ima prednost nad ostalima zbog svoje robusnosti i neinvazivnosti, mogućnosti analize čestica šireg raspona veličina (Keck, 2010). Ona se temelji na principu usmjeravanja laserske zrake na čestice pri čemu dolazi do raspršenja, refleksije ili transmisije fotona, a raspršena svjetlost se zatim detektira pod različitim kutovima (Singh, 2016). Izmjereni kutovi su obrnuto proporcionalni veličini čestica izraženoj uz pomoć volumnih promjera – D_{v10} , D_{v50} i D_{v90} (Tanaka i sur., 2022). Sve su ovo prvenstveno *at-line* ili *off-line* tehnike uz koje se mjerenje vrši u odgođenom vremenu, ne prateći odvijanje samog procesa usitnjavanja. U slučaju aglomeracije čestica uslijed nedovoljno kontroliranog i predugog usitnjavanja, ili prevelikog sadržaja čvrste tvari u suspenziji, rezultati mjerenja mogu biti neujednačeni. Iako laserska difrakcija predstavlja važnu laboratorijsku tehniku za određivanje raspodjele veličina čestica djelatne tvari tijekom mljevenja, u fokusu su *on-line* mjerenja u stvarnom vremenu implementirana njihovim usavršavanjem ili primjenom, primjerice, bliske infracrvene (IR) spektroskopije kako bi se iz vremenskih i ekonomskih razloga optimiziralo trajanje procesa (Higgins i sur., 2003).

Zeta-potencijal (ζ) je drugi važan parametar koji se razmatra u koloidnim sustavima. Javlja se na granici difuznog sloja čestice i određuje do koje razine će se slično nabijene susjedne čestice međusobno odbijati. Veličina zeta-potencijala primarno služi kao indikator dugoročne fizičke stabilnosti nanosuspenzija, dok je elektrostatička stabilnost povezana s električnim svojstvima na površini čestica uvjetovana disocijacijom nabijenih funkcionalnih skupina koja ovisi o pH medija i pKa molekula djelatne tvari (Jacob i sur., 2020). Zeta-potencijal nanosuspenzija stabiliziranih isključivo elektrostatskim odbijanjima trebao bi iznositi otprilike ± 30 mV. U slučaju kombinirane elektrostatske i steričke stabilizacije, uslijed adsorpcije neionskih surfaktanata ili polimera i prekrivanja površine čestica, ciljna vrijednost zeta-potencijala iznosi ± 20 mV, s time da je poželjna veća apsolutna vrijednost zeta-potencijala budući da su ona i stabilnost suspenzije proporcionalne (Jacobs i Müller, 2002; Németh i sur., 2022). Određivanje zeta-potencijala temelji se na pokretljivosti nanočestica (elektroforetska mobilnost) na temelju

Dopplerovog efekta upotrebom lasera (engl. *laser Doppler velocimetry*, LDV) kada se pomoću elektroda na uzorak primijeni električno polje. Izmjerena elektroforetska pokretljivost se zatim preko Helmholtz-Smoluchowski ili Henryjeve jednadžbe preračunava u zeta-potencijal (Makino i Ohshima, 2010; Clogston i Patri, 2011).

1.2.3. Nanotehnologija u kontekstu nazalne primjene

Nanočestice se i dalje smatraju inovativnim terapijskim sustavima čije se mogućnosti vezano za dostavu lijekova još uvijek istražuju. Osim što mogu povećati topljivost lijeka, učinak nanočestica uključuje i poboljšani terapijski indeks lijeka postignut smanjenjem terapijske toksičnosti ili povećanjem učinkovitosti, ciljano isporuku, kontroliranu brzinu oslobađanja, prikladnost za različite putove primjene i u konačnici smanjenje troškova zdravstvene zaštite (Zhang i sur., 2008a; Gatto i Najahi-Missaoui, 2023). Vrijednost tržišta nanosustava je 2009. iznosila 53 milijarde USD, a do 2025. se predviđa njezin ukupni rast do 334 milijarde USD što ukazuje na velik interes za razvoj i kliničku primjenu nanosustava, međutim pravu vrijednost za zdravstveni sustav potrebno je tek odrediti analizom troška i učinkovitosti (Bosetti i Jones, 2019). Prvi nanolijek odobren 1995. od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA) bio je Doxil, lijek za liječenje raka jajnika, Kaposijevog sarkoma i multiplog mijeloma (Anselmo i Mitragotri, 2016). Na tržištu je 2022. bilo odobreno oko 100 nanolijekova i još ih se 563 nalazilo u kliničkim ispitivanjima, od čega 33 % u fazi I te 21 % u fazi II. Uglavnom su razvijeni u obliku liposoma ili lipidnih nanočestica (33 %), primarno korištenih i istraživanih za liječenje raka (53 %) (Shan i sur., 2022).

Nazalna primjena lijekova zasad je najviše iskorištena u liječenju lokalnih bolesti nosne sluznice (alergija, kongestija, infekcije). Međutim, sve veću pažnju dobiva nazalna primjena cjepiva s obzirom na ulazak brojnih patogenih mikroorganizama preko sluznica respiratornog sustava. Nadalje, terapijski potencijal nazalne primjene lijekova poput melatonina intenzivno se istražuje za liječenje mentalnih i neurodegenerativnih poremećaja poput nesаницe, Parkinsonove bolesti i Alzheimerove bolesti (Illum, 2003). Bhavna i suradnici (2014) istraživali su razvoj nanosuspenzija s donepezilom za nazalnu primjenu. Pripravom nanosuspenzija postignuta je prosječna veličina čestica od 150 do 200 nm i indeks polidisperznosti 0,341. Rezultati dobiveni *in vivo* studijama u štakora pokazali su triput veću koncentraciju donepezila u mozgu postignutu nazalnom primjenom nanosuspenzija u odnosu na primjenu konvencionalnih suspenzija istim putem, dok je vršna koncentracija c_{max} iznosila dvadeset puta

više i postignuta je u triput kraćem vremenu t_{max} . U studijama sigurnosti nije bilo zabilježenih slučajeva mortaliteta ili toksičnosti, ukazujući na zadovoljavajući sigurnosni profil uz postizanje viših koncentracija u mozgu u usporedbi s drugim oblicima (Bhavna i sur., 2014).

Za nazalnu primjenu poželjno je da nanočestice budu veličine 100-400 nm, razvijene uz pomoć biokompatibilnih i biorazgradljivih pomoćnih tvari, ispitanog profila sigurnosti, uz optimalno oslobađanje lijeka u fiziološkim uvjetima (Sonvico i sur., 2018). De Oliveira Junior i suradnici (2019) pripravili su nanočestice s uklopljenim melatoninom za izravnu dostavu lijeka iz nosne šupljine u mozak. Tween (polisorbat) 80 prisutan u formulaciji poboljšao je prolazak nanočestica kroz nosnu sluznicu, modifikacijom površine čestica omogućio njihovu interakciju i prodiranje u olfaktorne epitelne stanice, te steričkom stabilizacijom spriječio međusobnu interakciju i agregaciju. U usporedbi sa slobodnim lijekom, melatonin uklopljen u nanočestice pokazao je pri manjim dozama selektivan učinak u liječenju glioblastoma uz postignute visoke koncentracije melatonina u mozgu nakon nazalne primjene (De Oliveira Junior i sur., 2019).

1.3. SUŠENJE SMRZAVANJEM

1.3.1. Povijesni pregled i usavršavanje metode

Sušenje smrzavanjem u povijesti je, kao jedna od metoda čuvanja hrane, poznato već tisućama godina. Intuitivno su ga koristili narodi poput Eskima, koji su ribu čuvali u hladnim vodama arktičkog područja, i Inka, koji su svoje usjeve čuvali na visokim nadmorskim visinama, čime su ih nesvjesno pri sniženim vrijednostima temperature i tlaka prvo smrzavali i zatim sušili uslijed djelomičnog isparavanja ili sublimacije vode (Varshney i Singh, 2015).

Richard Altmann, njemački patolog i histolog zaslužan za citološki opis mitohondrija u stanici (Vyas i sur., 2016), 1890. je prvi objavio primjenu metode sušenja smrzavanjem u svojim istraživanjima bioloških tkiva (Corver, 2009). Stanične uzorke je pripremao u uvjetima sniženog tlaka i pri temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ u eksikatoru (Paresishvili i Kakabadze, 2024).

Benedict i Manning su 1905. u svrhu sušenja životinjskog tkiva prvi opisali primjenu kemijske pumpe koja je radila na principu istiskivanja zraka iz komore parama etilnog etera i zatim njihovom apsorpcijom u zasebnu komoru s koncentriranom sumpornom kiselinom (Jennings, 2013). Nekoliko godina kasnije, L. F. Shackell je istraživao procesne parametre i unaprijedio metodu u odnosu na tada uobičajeno sušenje isključivo u vakuumu otkrivši kako smrzavanje uzorka prije izlaganja vakuumu smanjuje mogućnost narušavanja strukture, a brzo snižavanje

tlaka prvi put je postignuto uz pomoć modificirane mehaničke vakuumske pumpe (Shackell, 1909). Princip rada i dijelovi prve mehaničke pumpe usporedivi su s dijelovima današnjih liofilizatora: komora za sušenje, kondenzor i vakuumska pumpa (Jennings, 2013).

Sušenje smrzavanjem imalo je svoju široku primjenu posebno tijekom Drugog svjetskog rata u kojem je američka vojska koristila osušenu ljudsku plazmu za saniranje ozljeda i zbrinjavanje žrtava (Glassberg i sur., 2013). Istovremeno su znanstvenici E. B. Chain i H. W. Florey ovom metodom uspješno pročistili penicilin iz tekuće hranjive podloge s plijesnima, povećali njegovu potentnost u liječenju septikemije i omogućili masovnu proizvodnju, za što su 1945. uz A. Fleminga osvojili Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu (Greaves, 1968; Gaynes, 2017).

Za sušenje smrzavanjem danas se upotrebljava i pojam liofilizacija grčkog korijena koji se prvi put spominje 1938. u znanstvenom časopisu *The Journal of Allergy* (Langner i Kern, 1938). Uzevši u obzir poroznu strukturu osušenog materijala i njegov visok afinitet prema otapalu, u kojem je prije sušenja bio dispergiran, znanstvenik L. R. Rey je u svom radu 1960-ih godina opisao svojstvo „liofilnog“ kao onog što spremno resorbira otapalo i obnavlja se u inicijalno tekuće stanje (Varshney i Singh, 2015). Rey je zaslužan i za organizaciju niza simpozija na temu liofilizacije, istraživao je primjenu metode na uzorcima s nevodenim otapalima i potaknuo ostala istraživanja za bolje razumijevanje termodinamike i procesnih uvjeta (Couriel, 1980).

1.3.2. Osnove i tijek liofilizacije

U međuvremenu, otkad je Shackell 1909. prvi upotrijebio liofilizaciju za sušenje proteina, ona je prerasla u važnu laboratorijsku metodu koja se, između ostalog, danas koristi za: 1) očuvanje morfoloških i biokemijskih karakteristika te fiziološke aktivnosti različitih bioloških uzoraka poput bakterija i virusa (Greiff i Pinkerton, 1954b) i 2) povećanje fizičke i kemijske stabilnosti otopina ili suspenzija djelatne tvari, pri čemu na rekonstituciju i/ili infektivnost osušenog materijala utječu parametri smrzavanja i sušenja (Harris i Shackell, 1911; Greiff i sur., 1954a). Osnovni princip liofilizacije uzoraka (Slika 2.) isti je već desetljećima, a proces se može sažeti u nekoliko ključnih koraka (Rey, 1990; Abdelwahed i sur., 2006b; Degobert i Aydin, 2021):

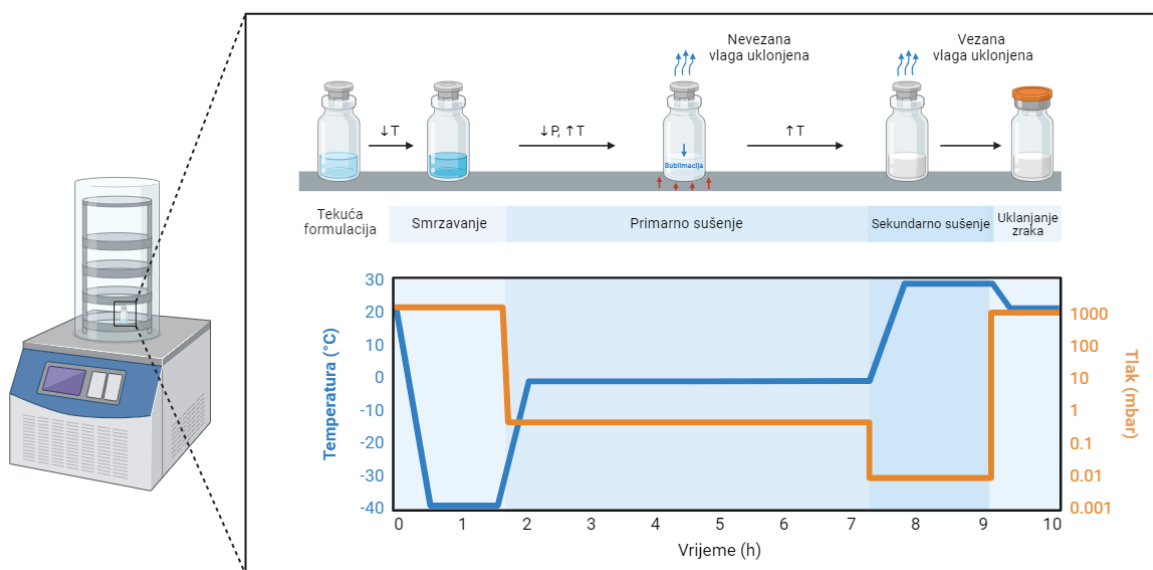
1. **priprema** – razvoj formulacije optimalne koncentracije djelatne tvari u tekućem mediju s pomoćnim tvarima željenog učinka (npr. pufferi, punila, stabilizatori, konzervansi)
2. **smrzavanje** – hlađenje u kojem se odvija nukleacija leda (nastanak jezgre kristalizirajuće tvari), rast kristala i povećanje viskoznosti uslijed promjene koncentracijske raspodjele

otopljene tvari u matriksu koji se zatim skrutnjava i inhibira daljnu kristalizaciju leda. Uzorak je razdvojen na kristaliničnu fazu leda i amorfnu fazu maksimalno koncentrirane otopljene tvari obilježenu staklastim prijelazom pri temperaturi T_g' . Faza smrzavanja odvija se pri atmosferskom tlaku, a rezultat je većinom fazni prijelaz iz vode u led (čvrsto agregatno stanje). Voda koja na kraju zaostane u tekućem stanju naziva se vezana voda.

3. sušenje pod vakuumom

- primarno sušenje (sublimacija leda) – izravni prijelaz iz leda u vodenu paru ispod trojne točke vode uz utrošak energije koja se u obliku topline prenosi do spremnika (endoterman proces). Potrebna je umjereno povišena temperatura kako ne bi došlo do taljenja leda i kolapsa uzorka. Sušenje započinje u gornjim i nastavlja se prema donjim slojevima, a nastala vodena para prolazi kroz osušeni dio uzorka. Nastaje struktura s porama na čijem mjestu su se prethodno nalazili kristali leda. Ova faza se odvija u uvjetima sniženog tlaka koji je postignut uz pomoć vakuumske pumpe kako bi postignuti tlak u komori bio niži od parcijalnog tlaka para iznad površine leda.
- sekundarno sušenje (desorpcija vode) – uklanjanje posljednjih 15-ak % adsorbirane vode koja je zaostala u fazi smrzavanja. Isparavanje snažnije vezanih molekula vode s površine zahtijeva veću količinu energije kako bi ih se razdvojilo od čvrstog uzorka, stoga se ova faza odvija pri višim temperaturama ($< T_g'$) i nižem tlaku u odnosu na uvjete tijekom sublimacije. Ova faza traje kraće u odnosu na primarno sušenje.

4. **skladištenje** – hermetičko zatvaranje spremnika, po mogućnosti u uvjetima inertnih plinova (npr. dušik, argon) radi prevencije ulaska zraka i destabilizacije osušenog uzorka.



Slika 2. Shematski prikaz procesa liofilizacije (napravljeno u www.biorender.com)

Prednosti liofilizacije su sušenje pri vrlo niskim temperaturama, zbog čega je prikladna za sušenje termolabilnih tvari, i nastanak porozne strukture liofilizata (tzv. struktura kolača) koja omogućava jednostavnu rekonstituciju. Nedostatak je sklonost čestica agregaciji koja se javlja kao posljedica stresa prilikom smrzavanja, kada dolazi do zadržavanja čestica u prostorima između kristala leda, smanjene međusobne udaljenosti i veće vjerojatnosti interakcija, ili prilikom sublimacije i uklanjanja smrznutog otapala (Jakubowska i sur., 2022).

Uređaj u kojem se prvenstveno odvija sušenje uzorka zove se liofilizator. Sastoji se od nekoliko osnovnih dijelova: komore za sušenje s policama, sustava za zagrijavanje i dovođenje topline, sustava za postizanje niskog tlaka (vakuumaska pumpa), kondenzora uz pomoć kojeg se vodena para nastala sublimacijom sakuplja i uklanja iz komore za sušenje te pripadajućeg rashladnog sustava koji održava temperaturu kondenzora (Zhao i sur., 2022).

Sustav za zagrijavanje važan je zbog endotermnih procesa u kojima se troši toplina – sublimacija leda (primarno sušenje) i isparavanje vode (sekundarno sušenje). Prijenos topline do spremnika sa smrznutim uzorkom odvija se uz tri različita mehanizma; izravnom kondukcijom između spremnika i police s kojom je spremnik u kontaktu, radijacijom putem elektromagnetskog zračenja koje prodire iz zidova komore i kondukcijom koja se odvija sudaranjem molekula plina međusobno i sa stijenkama spremnika (Brülls i Rasmuson, 2002; Palmkron i sur., 2022).

Cilj liofilizacije nanočestica je: 1) porozna struktura liofilizata, brza rekonstitucija suspenzije; 2) očuvanje fizičko-kemijskih svojstava osušenog proizvoda (npr. veličina čestica); 3) mali udio ostatne vlage (< 2 %) i 4) dobra dugoročna stabilnost formulacije (Abdelwahed i sur., 2006b). Formulacijski i procesni parametri zajedno utječu na svojstva liofilizata pa je poželjno njihovo sveobuhvatno razmatranje, uzimajući u obzir i ekonomski aspekt cijelog procesa, kako bi se u praksi postigao kompromis pri razvoju i utvrđivanju relativno neinvazivnih uvjeta za sušenje te posljedično povećanje stabilnosti koloidnih tekućih farmaceutskih oblika (Franks, 1998).

1.3.3. Formulacijski parametri

Temperatura staklastog prijelaza smrznutog uzorka (T_g'), temperatura kolapsa formulacije (T_c) – iznad koje se narušava makroskopska struktura amorfnog uzorka (Greco i sur., 2013), stabilnost uklopljene djelatne tvari i svojstva korištenih ekscipijensa predstavljaju kritične formulacijske parametre (Tang i Pikal, 2004; Degobert i Aydin, 2021). Vrijednost T_g' , pri kojoj se odvija promjena toplinskog kapaciteta uzorka i prijelaz iz staklastog u viskoelastično stanje,

obično se određuje tehnikom diferencijalne pretražne kalorimetrije (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC), a vrijednost T_c , pri kojoj se uočava narušavanje strukture kolača, tehnikom mikroskopije sušenja smrzavanjem (engl. *Freeze-Drying Microscopy*, FDM) oponašajući proces liofilizacije na malom volumenu uzorka pod mikroskopom (Horn i Friess, 2018).

U slučaju amorfnih formulacija, ako se uzorak zagrijava pri temperaturi iznad T_c tijekom primarnog i sekundarnog sušenja, osim makroskopskog narušavanja strukture dolazi do gubitka poroznosti liofilizata, smanjenja specifične površine uzorka, otežanog uklanjanja vode tijekom sekundarnog sušenja i većeg sadržaja ostatne vlage. Ovo rezultira dugoročno povećanom nestabilnošću formulacije, produljenim vremenom rekonstitucije te izostajanjem elegantne i ujednačene strukture (Franzé i sur., 2018). Kolaps liofilizata zapravo je dinamički proces u kojem je osušena struktura pora blizu zone sublimacije podložna viskoznom strujanju. T_c je obično 1-3 °C viša od T_g' . Međutim, moguće je i zagrijavanje iznad T_c bez kolapsa strukture u slučaju kada do sušenja dolazi prije nego što započne znatno viskozno strujanje djelomično kristalinih formulacija, npr. s manitolom (Greco i sur., 2013).

1.3.3.1. Svrha krio-/lioprotektora

Pomoćne tvari u razvoju formulacija za liofilizaciju (Tablica 1.) s ciljem smanjenja mogućnosti aglomeracije te, u nekim slučajevima, nepovratne fuzije suspendiranih čestica nazivaju se krioprotektori i lioprotektori (Amis i sur., 2020). Razlika među njima može se objasniti prirodom uzorka i procesom kojem je uzorak podvrgnut, pa tako krioprotektori mogu biti pomoćne tvari koje štite proteine i bakterije od oštećenja prilikom smrzavanja i služe njihovom skladištenju u smrznutom obliku (npr. glicerol), a lioprotektori pomoćne tvari čije interakcije i učinak na formulaciju osiguravaju zaštitu malih molekula od stresa prilikom sušenja i skladištenja (Lale i sur., 2011; Bodzen i sur., 2021). Međutim, u kontekstu nanosuspenzija, uobičajena podjela pomoćnih tvari bila bi na krioprotektore koji štite formulaciju od stresa usred smrzavanja, te lioprotektore koji štite formulaciju od stresa tijekom primarnog i sekundarnog sušenja (Abdelwahed i sur., 2006b). Odabir odgovarajućeg krioprotektora važan je zbog mogućih kristalizirajućih svojstava i utjecaja na stabilnost nanočestica tijekom procesa, na kritične temperaturne procesne parametre (temperatura primarnog sušenja $< T_g'$) i na uvjete skladištenja (temperatura skladištenja $> T_g$). Šećeri kao krioprotektori smatraju se najvažnijim čimbenikom u očuvanju veličine čestica, s time da je prednost manjih šećera lakše prekrivanje površine čestica, a prednost disaharida su veće vrijednosti T_g' (Trenkenschuh i Friess, 2021).

Tablica 1. Pregled ispitivanja učinkovitosti krio-/lioprotektora pri liofilizaciji nanosuspenzija bez definirane primjene, ili ostalih nanosustava za nazalnu primjenu

Djelatna tvar	Stabilizator	Ispitivani krio-/lioprotektor	Zapažanja	Literatura
Nanosuspenzije (bez definirane primjene)				
itrakonazol	polisorbat 80, poloksamer 338, kremofor EL	saharoza, PVP K15, dekstran (70 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> - saharoza se pokazala kao najbolji krioprotektor - u kombinaciji, poloksamer i dekstran su pokazali negativan učinak na stabilnost nanosuspenzije - na stabilnost čestica utječu koncentracije te odnos stabilizatora i krioprotektora 	(Beirowski i sur., 2011)
kurkumin	PEG-PLA, PVP	glukoza, laktoza, trehaloza, manitol, Kleptose® (hidroksipropil- β -ciklodekstrin)	<ul style="list-style-type: none"> - Kleptose® mijenja temperaturu kolapsa; jedini je s učinkom na očuvanje veličine nanočestica - liofilizacijom je postignuta dugoročna stabilnost (> 1 god.) - na raspodjelu i veličinu čestica najveći utjecaj imali su brzina miješanja, molekulska masa PEG-PLA te omjer djelatne tvari i stabilizatora 	(Chow i sur., 2015)

meloksikam	polisorbat 80, goveđi serumski albumin (BSA)	glukoza, saharoza, laktoza, trehaloza, manitol, maltoza	<p>- manitol je izabran kao krioprotektor na temelju kompaktnog liofilizata i minimalne promjene u izgledu nanosuspenzije nakon rekonstitucije</p> <p>- kombinacijom BSA i manitola najbolje je očuvana veličina čestica, uz najkraće vrijeme rekonstitucije</p>	(Li i sur., 2018)
astaksantin	kitozan, goveđi serumski albumin (BSA)	L-lizin, maltoza, oligomer manoze, kitozan, manitol, sorbitol	<p>- maltoza je pokazala najbolji učinak na zaštitu nanočestica pri liofilizaciji</p> <p>- optimalni sastav krioprotektora (<i>m/V</i>):</p> <ul style="list-style-type: none"> • oligomanoza, 0,46 % • maltoza, 0,44 % • sorbitol, 0,05 % <p>- rezultati dobiveni uz pomoć ANOVA testa i Box-Behnkenovog dizajna eksperimenta</p>	(Zhao i sur., 2023b)
Ostali nanosustavi s različitim pomoćnim tvarima (za nazalnu primjenu)				
mometazon furoat	Solutol HS 15 (makrogol 15 hidroksistearat) + PLGA (biorazgradljivi kopolimerni nosač)	manitol, saharoza	<p>- saharoza (8 %, <i>m/V</i>) je najviše utjecala na očuvanje veličine nanočestica</p> <p>- najveći kumulativni postotak oslobođenog MF-a je uz saharozu i pri pH 6,4 u SDS-u</p> <p>- <i>in vitro</i> oslobađanje MF-a slijedi kinetiku prvog reda</p>	(Far i sur., 2020)

<p>klozapin</p>	<p>polisorbat 80 + <i>Eudragit</i>[®] <i>RS100 i RL100</i> (kopolimeri za produljeno oslobađanje)</p>	<p>manitol, glukoza, trehaloza, saharoza, HP-β-CD</p>	<p>- HP-β-CD (5 i 10 %, <i>m/V</i>) i saharoza (10 %, <i>m/V</i>) su imali najbolji učinak na očuvanje veličine nanočestica</p> <p>- usporedbom prosječne veličine i raspodjele veličina čestica prije i nakon liofilizacije, HP-β-CD (5 %, <i>m/V</i>) se pokazao kao najbolji krioprotektor</p> <p>- pretpostavljeni mehanizam uključuje vodikove veze između CD-a i polarnih skupina na površini nanočestica</p>	<p>(Lombardo i sur., 2023)</p>
<p>dopamin i ekstrakt sjemenki grožđa</p>	<p>polisorbat 80 + <i>Gelucire</i>[®] <i>50/13</i> (<i>neionski surfaktant za čvrste lipidne nanočestice</i>)</p>	<p>saharoza, Me-β-CD</p>	<p>- saharoza (6 %, <i>m/V</i>) je bolji krioprotektor od Me-β-CD</p> <p>- saharoza je utjecala na dugoročnu fizičku stabilnost nanočestica pri 4 °C i vijabilnost ljudske RPMI 2650 nazalne stanične linije tijekom 24 sata</p> <p>- <i>in vitro</i> oslobađanje dopamina u SNF-u potvrđeno je iz svih formulacija</p>	<p>(De Giglio i sur., 2023)</p>

PVP – polivinilpirolidon; PEG-PLA – polietilenglikolom obložen polilaktid; BSA – goveđi serumski albumin; PLGA – polimer mliječne i glikolne kiseline; MF – metazon furoat; SDS – natrijev dodecil sulfat; HP-β-CD – hidroksipropil-β-ciklodekstrin; Me-β-CD – metil-β-ciklodekstrin; SNF – simulirani nosni fluid

U dovoljno visokim koncentracijama krioprotektori za vrijeme smrzavanja imaju sposobnost stvaranja staklastog matriksa povećane viskoznosti, smanjujući pritom mobilnost suspendiranih nanočestica i sprječavajući njihovu mehaničku destrukciju ili aglomeraciju. Staklasti prijelaz, odnosno vitrifikacija amorfne tekuće formulacije omogućava imobilizaciju nanočestica u matriksu koji osigurava njihovu stabilizaciju (Abdelwahed i sur., 2006a). Osim toga,

pretpostavljeno je još nekoliko mehanizama njihovog djelovanja. Stupanjem u interakcije ili prostornom orijentacijom oko suspendiranih čestica stvaraju stabilan omotač, istovremeno istiskujući molekule vode, čime se fizički onemogućava interakcija među česticama i sprječava mehanički stres uzrokovan neposrednom kristalizacijom vode uz njihovu površinu (Zhang i sur., 2008a; Neupane i sur., 2021). Učinkovitost krioprotektora ovisi o strukturnim svojstvima i interakcijama u koje mogu stupati. Primjerice, šećeri s manje intramolekulskih vodikovih veza lakše stupaju u interakcije s nanočesticama i karakterizirani su višim vrijednostima temperature staklastog prijelaza (T_g) koja do određene razine odražava stupanj asocijacije molekula šećera (Taylor i Zografi, 1998; Abdelwahed i sur., 2006b).

Pomoćne tvari koje se koriste kao krioprotektori mogu se podijeliti na one koje mogu i one koje ne mogu prodrijeti kroz staničnu membranu, no ove posljednje su one koje se uobičajeno koriste u liofilizaciji nanosuspenzija djelatnih tvari i pritom mogu biti različite strukture; monosaharidi, disaharidi, polisaharidi, polioli, aminokiseline i viskozni polimeri (Marquez-Curtis i sur., 2015; Jakubowska i sur., 2022). Struktura može utjecati na stabilnost pomoćne tvari, mogućnost i opseg interakcija, te steričku zaštitu suspendiranih čestica. Glukoza (monosaharid), trehaloza (disaharid) i manitol (poliol), šećeri topljivi u vodi sa svojstvom stvaranja staklastog matriksa, ubrajaju se među često korištene krioprotektore (De Los Reyes i sur., 2002; Pinar i sur., 2023).

Glukoza

Glukoza (Slika 3.) je reducirajući šećer koji u svojoj strukturi sadrži pet donorskih i šest akceptorskih mjesta za stvaranje brojnih intra- i intermolekulskih vodikovih veza (Maji i sur., 2023). Pri razvoju i liofilizaciji suspenzija s nanosferama itrakonazola (de Chasteigner i sur., 1996), prisustvo glukoze, saharoze i trehaloze već pri 5 % (m/V) rezultiralo je podjednakim učinkom na očuvanje homogenosti koloidnog sustava i integritet nanosfera. U optimalnim krioprotektivnim uvjetima, glukoza (10 %, m/V) je uzrokovala najmanji gubitak itrakonazola iz nanosfera. Međutim, glukoza kao krioprotektor utječe nepovoljno na makroskopski izgled liofilizata, uzrokuje kolaps strukture kolača i smanjenje volumena (Konan i sur., 2002). Allison i suradnici (2000) su pokazali kako monosaharidi poput glukoze pri smrzavanju ne štite komplekse lipida i DNA uobičajenim mehanizmom stvaranja staklastog matriksa, već je umjesto toga predložena hipoteza izolacije čestica prema kojoj je zaštita lipidnih kompleksa i prevencija njihove aglomeracije rezultat usporavanja difuzije čestica i njihovog prostornog odvajanja unutar viskozne nesmrznute frakcije, uz uvjet dovoljno visoke koncentracije pomoćne tvari (Allison i sur., 2000).

Trehaloza

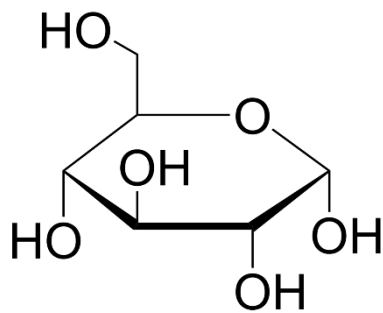
Trehaloza (Slika 4.) je nereducirajući šećer sa stabilizirajućim svojstvima zbog niskoenergetske i simetrične strukture koja se sastoji od dvije monosaharidne jedinice α -glukoze (Walmagh i sur., 2015). U svojoj strukturi sadrži osam donorskih i jedanaest akceptorskih mjesta za stvaranje vodikovih veza. Pri razvoju i liofilizaciji nanosuspenzija ciklosporina (Chacón i sur., 1999), uz dodatak glukoze i trehaloze, za razliku od manitola i sorbitola, opaženo je manje agregata nakon rekonstitucije i uočen je Tyndallov efekt, odnosno pojava raspršenja svjetlosti na česticama koloidnog sustava. Amis i suradnici (2020) su pri probiru krioprotektora za čvrste lipidne nanočestice s progesteronom pokazali kako je uz dodatak trehaloze ostvaren najmanji promjer čestica i osušeni uzorak je vrlo lako rekonstituiran pri svim koncentracijama trehaloze. Mehanizmi kojima trehaloza otopljena u vodi postiže krioprotektivni učinak uključuju stvaranje viskozne disperzije iznad T_g' čija se viskoznost povećava daljnjim smrzavanjem, ili staklastog matriksa ispod T_g' . Pri višim koncentracijama trehaloze u formulaciji povećava se i njezin učinak na smanjenje interakcije među nanočesticama (Amis i sur., 2020).

Manitol

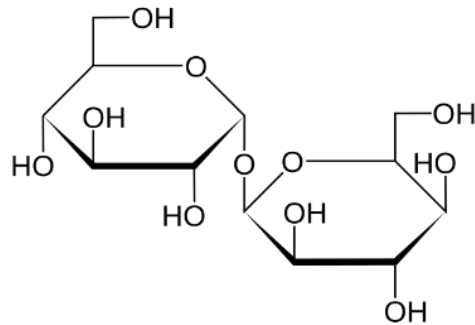
Manitol (Slika 5.) je nereducirajući šećerni alkohol (poliol) jednostavne acikličke strukture kao stereoizomer sorbitola, često u primjeni kao zaslađivač ili osmotski diuretik (Grembecka, 2015; Włodarczyk i sur., 2018). U strukturi sadrži šest donorskih i šest akceptorskih mjesta na kojima je omogućeno stvaranje vodikovih veza. Primjenjuje se kao pomoćna tvar u liofilizaciji zato što smjesa manitola i leda ima visoku eutektičku točku pa je primarno sušenje moguće pri relativno visokim temperaturama i uz kraće trajanje procesa. Manitol osigurava reprezentativan izgled osušenog proizvoda i pri smrzavanju ostvaruje različita svojstva ovisno o brzini hlađenja (npr. moguća kristalizacija iz smrznute vodene otopine), što ga međutim može učiniti slabim krioprotektorom u prisustvu kojeg je djelatna tvar nestabilna nakon sušenja (Kim i sur., 1998; Thakral i sur., 2023). Huang i suradnici (2001) su pokazali kako je, za razliku od trehaloze i saharoze, manitol relativno neučinkovit kao krioprotektor pri smrzavanju formulacija s liposomima koje je prvenstveno potrebno zaštititi od narušavanja strukture i fuzije lipidnih membrana. Međutim, upravo njegov mehanizam mehaničkog stresa i destabilizacije lipidnog dvosloja prilikom kristalizacije pokazao se učinkovitim u proizvodnji ehogenih liposomalnih disperzija sa svojstvom refleksije ultrazvučnih valova (Kumar i sur., 2017).

Zhang i suradnici (2008) su proučavali učinak navedenih krioprotektora na veličinu i uspješnost uklapanja ibuprofena u čvrste lipidne mikročestice nakon liofilizacije. Svi krioprotektori su

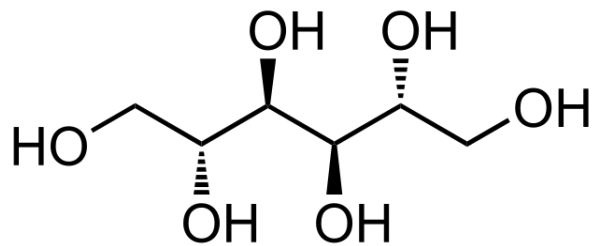
imali manju ili veću sposobnost zaštite mikročestica od stresa u uvjetima njihova smrzavanja i sušenja, te održavanja veličine čestica. Glukoza i trehaloza su, za razliku od manitola, ostvarile bolji krioprotektivni učinak pokazavši kako su amorfne pomoćne tvari prikladnije od onih koje mogu kristalizirati kada se želi postići manja promjena u raspodjeli veličina čestica prije i nakon liofilizacije, kao i veća stabilnost formulacije tijekom skladištenja. Svoj najbolji učinak na raspodjelu veličina čestica i monodisperznost ostvarili su pri različitim koncentracijama; glukoza pri 5 % (*m/m*), a trehaloza pri 15 % (*m/m*), što je objašnjivo razlikom u veličini relativne molekulske mase (glukoza – 180,16 g/mol; trehaloza – 342,30 g/mol) (Zhang i sur., 2008b). Sličan učinak ovih krioprotektora pokazan je i za formulacije nanočestica (Almalik i sur., 2017).



Slika 3. Struktura D-glukoze



Slika 4. Struktura D-trehaloze



Slika 5. Struktura D-manitola

1.3.4. Procesni i ostali parametri

Od preostalih parametara, na kvalitetu i izgled osušenog uzorka utječu procesni parametri (temperatura polica, tlak unutar komore, trajanje ciklusa), spremnik (vrsta, svojstva, oblik, čep), i liofilizator (model, oblik, dijelovi) koji utječu na prijenos topline i mase (Franks, 1998).

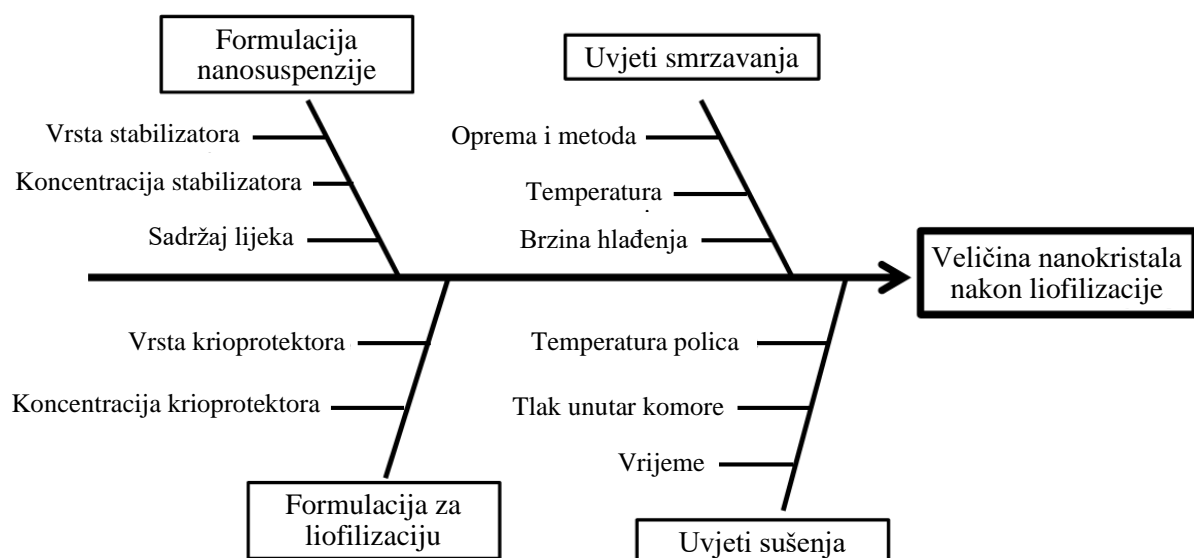
Temperatura unutar komore i s njome povezana temperatura polica, tlak unutar komore i duljina trajanja svake faze jedina su tri procesna parametra koja se mogu izravno kontrolirati. S druge strane, temperatura samog uzorka jedan je od najvažnijih parametara za uspješnost procesa koji nije pod izravnom kontrolom, ali koji se može pratiti s određenim stupnjem nesigurnosti ovisno u kojem dijelu komore se nalazi spremnik s obzirom na to da prijenos topline nije jednak u središtu i na rubovima police (Franks, 1998). Temperatura i brzina smrzavanja utječu na teksturu smrznutog matriksa i morfološka svojstva strukture kolača. Brzim hlađenjem nastaju sitni kristali leda, što je korisno za postizanje porozne strukture kolača i manji mehanički stres zbog vremena koje otopljena tvar provede u kriokoncentriranom stanju, no kasnije sušenje proizvoda je otežano zbog povećanog otpora odvođenju vodene pare (Jameel i sur., 2021; Trenkenschuh i Friess, 2021). Nakon smrzavanja slijedi primarno sušenje, faza koja traje najdulje i koja određuje ekonomsku i industrijsku isplativost metode. Duljina trajanja ove faze ovisi o brzini sublimacije leda na koju, osim strukture smrznutog uzorka, utječe temperatura koja mora biti ograničena kako ne bi došlo do taljenja i kolapsa uzorka, stoga se temperatura tijekom primarnog sušenja održava 2-5 °C ispod T_c (Xiang i sur., 2004; Degobert i Aydin, 2021; Ghaemmaghamian i sur., 2022). Pri višim temperaturama brzina sublimacije raste, a temperaturna ovisnost sublimacije i otpora koji čvrsti dio uzorka pruža faznom prijelazu leda, koji se nalazi u sloju ispod njega, u vodenu paru i odvođenju vodene pare s površine može se objasniti mehanizmom hidrodinamičkog protoka adsorbirane vode (Pikal i sur., 1983).

Otpor prijenosu mase osigurava čep postavljen na način da napola zatvara spremnik tijekom sušenja. Uniformnost ovog otpora unutar seta staklenih vijala predstavlja jedan od kritičnih čimbenika, posebno pri liofilizaciji većeg broja uzoraka čija se učinkovitost sušenja odražava na odstupanje rezultata. Sljedeći kritični čimbenik je oblik vijale kojim se postiže optimalna udaljenost svakog dijela dna vijale od police, a samim time i optimalna dodirna površina između stijenki vijale i police koja je važna za prijenos topline tijekom sušenja. Vijale nominalno istih karakteristika, ali nabavljene od različitih proizvođača, pokazale su drugačiji koeficijent prijenosa topline, stoga su uniformnost, oblik i svojstva vijala te čepova iznimno važni čimbenici koji utječu na rezultate sušenja uzoraka (Pikal i sur., 1984).

Istovremeno optimiranje formulacijskih i procesnih parametara važno je pri postizanju željenih svojstava liofilizata, povećanju učinkovitosti procesa te razmatranju robusnosti liofilizacijskog ciklusa i procesne tolerancije, odnosno dopuštenog odstupanja varijable u proizvodnom procesu od njezine zadane vrijednosti, što je preduvjet za uspješan prijenos i uvećanje mjerila iz laboratorijskih uvjeta u industrijsku proizvodnju (Tsinontides i sur., 2004; Tchessalov i sur.,

2007). Primjerice, prilikom razvoja formulacije s djelatnom ili pomoćnom tvari koja je sklona kristalizaciji, dulje zadržavanje uzorka na temperaturi iznad T_g' rezultirat će rastom većih kristala leda i boljom strukturom kolača, manjim otporom uzorka prema protoku vodene pare, kraćim primarnim sušenjem i manjom specifičnom površinom nakon sublimacije zbog čega će se smanjiti brzina desorpcije i bit će potrebno dulje sekundarno sušenje ili viša temperatura kako bi udio ostatne vlage i stabilnost bili zadovoljavajući (Tang i Pikal, 2004).

Na sličan način, više parametara i njihov međuodnos (Slika 6.) će zajedno utjecati na veličinu nanokristala i njihov indeks redispersibilnosti (engl. *redispersibility index*, RDI) pri liofilizaciji koloidnih nanosustava, ostvarujući različit učinak na formulacije s različitim sastavom djelatne tvari, stabilizatora i krioprotektora. Liofilizacija je primjenjiva na širok spektar djelatnih tvari, no s obzirom na to da su njihova svojstva (npr. hidrofobnost) u korelaciji sa sklonošću agregaciji, posebnu pažnju potrebno je posvetiti razvoju formulacije i smrzavanju kao kritičnom koraku u sušenju nanosuspenzija (Lee i Cheng, 2006; Yue i sur., 2014). Jakubowska i suradnici (2022) su tako pri razvoju i liofilizaciji suspenzija s nanokristalima cilostazola pokazali kako su, pored djelomičnog učinka procesnih parametara (temperatura smrzavanja, brzina hlađenja, temperatura primarnog sušenja), ipak značajan učinak na fizička svojstva i očuvanje veličine nanokristala nakon liofilizacije imali formulacijski parametri, prije svega vrsta i koncentracija krioprotektora (Jakubowska i sur., 2022).



Slika 6. Ishikawa dijagram čimbenika koji utječu na veličinu nanočestica liofiliziranih nanosuspenzija (prilagođeno iz Jakubowska i sur., 2022)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Melatonin je fiziološki prisutan hormon u zdravih ljudi s ulogom u održavanju cirkadijanog ritma, 24-satnog ciklusa u kojem su brojne fiziološke funkcije, poput periferne vazodilatacije, smanjenja tjelesne temperature, regulacije razine kortizola i pospanosti, međusobno povezane (Claustrat i sur., 2005). Egzogeni melatonin primjenjuje se za poboljšanje kvalitete sna, liječenje *jet-lag* sindroma, analgetsko, antioksidativno i protuupalno djelovanje (Zetner i sur., 2016). Bioraspoloživost oralno primijenjenog melatonina pokazala se vrlo ograničenom ($\approx 15\%$) zbog intenzivnog metabolizma prvog prolaska kroz jetru u kojem enzim CYP 1A2 ima dominantnu ulogu, a osim toga farmakokinetika melatonina pod utjecajem je kofeina, duhanskog dima, prehrane i interakcije s drugim lijekovima poput fluvoksamina, selektivnog inhibitora ponovne pohrane serotonina (DeMuro i sur., 2000; Harpsøe i sur., 2015). Upravo iz tog razloga se intenzivno istražuju alternativni putovi primjene, poput nazalne koja predstavlja neinvazivan i klinički relevantan način systemske dostave lijeka kao i izravne dostave lijeka u CNS (Zetner i sur., 2016).

Suvremena istraživanja dijelom su usmjerena na razvoj inovativnih terapijskih nanosustava za unaprjeđenje nazalne primjene lijeka. Različite vrste nanočestica, između ostalog u obliku nanosuspenzija kao koloidnih disperzija čvrstih čestica lijeka u tekućem mediju, povezane su s pozitivnim učinkom na topljivost, stabilnost unutar matriksa, brzinu otapanja, kontrolirano oslobađanje, površinska svojstva, apsorpciju kroz nosnu sluznicu i ciljanu isporuku lijekova (Gandhi i sur., 2024). Izrada nanosuspenzija stabiliziranih polimerima i neionskim surfaktantima predstavlja strategiju razvoja formulacija slabo topljivih lijekova. Međutim, nedostaci su duljina pripreme i koloidna nestabilnost nanosuspenzija koja utječe na rok valjanosti proizvoda tijekom skladištenja (Islam i sur., 2020; Koo i sur., 2024). Liofilizacija, odnosno sušenje smrzavanjem, zasniva se na smrzavanju tekućeg pripravka i sublimaciji leda u uvjetima niskog tlaka i temperature kako bi se iz uzorka uklonila voda. U brojnim istraživanjima, uz optimalno odabrane formulacijske i procesne parametre, liofilizacija se pokazala prikladnim rješenjem za (ne)stabilnost nanosuspenzija. Liofilizacijom nanosuspenzija postiže se dulji rok valjanosti, uz osiguranu jednostavnost i sigurnost transporta i skladištenja (Gatto i Najahi-Missaoui, 2023). Jedan od važnih formulacijskih parametara je vrsta i koncentracija krio-/lioprotektora koji štite uzorak od termičkog i mehaničkog stresa u fazama smrzavanja i sušenja. U tu svrhu uobičajeno se koriste različiti šećeri (monosaharidi i disaharidi) i šećerni alkoholi, od kojih svaki ima specifičan učinak na izgled i svojstva razvijene formulacije (Elbrink i sur., 2023).

Rad predstavlja nastavak istraživanja (Tus, 2023) u sklopu kojeg su razvijene *in situ* gelirajuće nanosuspenzije melatonina odabirom optimalnog masenog omjera melatonina i polisorbata 80 te uz dodatak pektina kao *in situ* gelirajućeg polimera. Pripravljene nanosuspenzije pokazale su svojstvo geliranja nakon miješanja s umjetnim nosnim fluidom što ukazuje na mogućnost produljenog zadržavanja na mjestu primjene.

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost liofilizacije nanosuspenzije melatonina pripravljene metodom vlažnog mljevenja, u svrhu razvoja suhog oblika koristeći monosaharid, disaharid i šećerni alkohol kao krioprotektor, te ispitati njihov utjecaj na kratkoročnu i dugoročnu stabilnost razvijenih liofilizata mjereći veličinu, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal nanokristala u rekonstituiranim suspenzijama, kao parametre uspješnosti očuvanja fizičkih svojstava.

Specifični ciljevi:

- Pripraviti nanosuspenziju melatonina metodom vlažnog mljevenja, pri potvrđenom optimalnom masenom omjeru melatonina i polisorbata 80 kao surfaktanta.
- Ispitati primjenjivost glukoze, trehaloze i manitola, kao potencijalnih krioprotektora za proces liofilizacije nanosuspenzije melatonina.
- Pripraviti suhe oblike nanosuspenzije melatonina postupkom liofilizacije uz dodatak glukoze, trehaloze i manitola kao krioprotektora.
- Ispitati utjecaj tipa krioprotektora na veličinu, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal nanokristala melatonina nakon liofilizacije i rekonstitucije nanosuspenzija.
- Odabrati krioprotektore s odgovarajućim učinkom, te ispitati utjecaj njihove koncentracije na očuvanje veličine, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala čestica melatonina nakon liofilizacije i rekonstitucije nanosuspenzija.
- Ispitati dugoročnu stabilnost pripremljenih liofilizata nanosuspenzija melatonina mjereći veličinu, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal čestica melatonina u uzorcima rekonstituiranim u promatranim vremenskim točkama tijekom 60-dnevnog skladištenja.

3. MATERIJALI I METODE

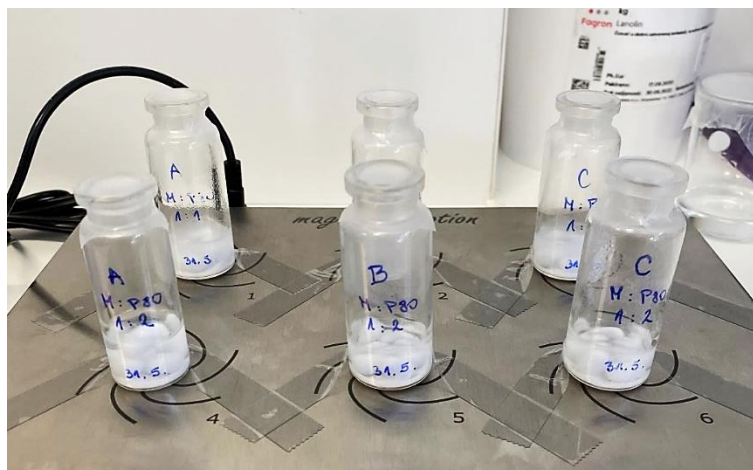
3.1. MATERIJALI

Za pripremu nanosuspencija melatonina u okviru eksperimentalnog dijela ovog rada korišteni su melatonin (Biosynth Ltd, Slovačka) i polisorbitat 80 (Sigma-Aldrich, Njemačka). Za vlažno mljevenje korištene su kuglice od cirkonijevog oksida stabiliziranog itrijem promjera 0,1 mm, 0,2 mm i 0,4–0,6 mm. Za proces sušenja smrzavanjem kao krioprotektori su korišteni bezvodna D(+)-glukoza (Gram-Mol, Hrvatska), D-manitol (Lach-Ner, Češka Republika) i D(+)-trehaloza dihidrat (BDH Prolabo, Engleska).

3.2. METODE

3.2.1. Priprava nanosuspencije melatonina

Nanosuspencija melatonina pripravljena je ranije opisanom metodom vlažnog mljevenja (Bano, 2019). Suspencija melatonina je prvo uz pomoć staklenog štapića širokog promjera pripravljena postupnim rastrljavanjem melatonina s polisorbitatom 80, površinski aktivnom tvari, pri masenom omjeru 1:2 koji je prethodno odabran kao najpovoljniji s obzirom na postignutu veličinu nanokristala i indeks polidisperznosti (Tus, 2023). Zatim je dodana pročišćena voda do konačne koncentracije melatonina i polisorbitata 80 redom od 0,143 i 0,286 % (*m/V*). Suspencija melatonina je dodatno homogenizirana na magnetskoj miješalici. U staklene vijale dimenzija 2 × 6 cm redom su izvagane kuglice za mljevenje promjera 0,1 mm, 0,2 mm i 0,4 – 0,6 mm, po 0,5 g svake vrste do ukupne mase od 1,5 g kuglica za mljevenje, zatim netom pripravljena suspencija mase 2,5 g i nakon toga 5 magnetskih mješača dimenzija 10 × 6 mm. Staklene vijale su zatvorene parafilmom (Parafilm™ M Laboratory Wrapping Film, Bemis Company, Inc., SAD) kako bi se izbjegao gubitak sadržaja. Vlažno mljevenje pripravljene suspencije melatonina provedeno je miješanjem sadržaja staklenih vijala na magnetskoj miješalici pri 350 okretaja u minuti (Slika 7.), kontinuirano tijekom 24 sata i u tamnoj komori zbog fotoosjetljivosti melatonina (Andrisano i sur., 2000; Nižić Nodilo i sur., 2022).



Slika 7. Priprava nanosuspenzije melatonina metodom vlažnog mljevenja (ovdje isključivo u svrhu vizualnog prikaza pripreve nanosuspenzije, inače uz osiguravanje tamnih uvjeta)

3.2.2. Određivanje veličine čestica melatonina u nanosuspenziji

Veličina čestica melatonina u nanosuspenziji i indeks polidisperznosti izmjereni su metodom fotonske korelacijske spektroskopije uz pomoć uređaja Zetasizer Ultra (Malvern Pananalytical Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo; Slika 8.). Pripravljene nanosuspenzije su nakon 24-satnog mljevenja, pomoću plastične brizgalice volumena 2 mL (Becton Dickinson S.A., Španjolska) i igle dimenzija 0,4 × 13 mm (Becton, Dickinson and Company Limited, Irska), odsisane iz staklenih vijala s kuglicama za mljevenje. Alikvot od 1 mL uzorka je automatskom pipetom prenesen u ćeliju (DTS0012) uređaja. Sva mjerenja su provedena u triplicatu pri temperaturi od 25 °C, vremenu ekvibracije od 120 sekundi, uz isto suspenzijsko sredstvo (pročišćena voda).



Slika 8. Uređaj Zetasizer Ultra (Malvern Pananalytical Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)

3.2.3. Proces liofilizacije nanosuspenzije melatonina uz dodatak krioprotektora

Za proces liofilizacije nanosuspenzije melatonina, kao potencijalni krioprotektori odabrani su glukoza, manitol i trehaloza, predstavnici uobičajeno korištenih šećera.

Prije samog procesa sušenja smrzavanjem u pripremljenoj nanosuspenziji melatonina otopljen je krioprotektor (glukoza, manitol ili trehaloza) pri koncentraciji od 0,5 do 2,5 % (*m/V*) (Tablica 2.). Nanosuspenzija melatonina s otopljenim krioprotektorom pripravljena je u duplikatu za svaku vrstu/koncentraciju odabranog krioprotektora, i zatim karakterizirana metodom fotonske korelacijske spektroskopije mjereći veličinu čestica melatonina i indeks polidisperznosti.

Tablica 2. Sastav uzoraka nanosuspenzije melatonina s dodanim krioprotektorom, pripremljenih za sušenje smrzavanjem

uzorak	glukoza (%, <i>m/V</i>)	manitol (%, <i>m/V</i>)	trehaloza (%, <i>m/V</i>)	melatonin (%, <i>m/V</i>)	polisorb 80 (%, <i>m/V</i>)
M.G5	0,5	-	-	0,143	0,286
M.G10	1,0	-	-	0,143	0,286
M.G25	2,5	-	-	0,143	0,286
M.M5	-	0,5	-	0,143	0,286
M.M10	-	1,0	-	0,143	0,286
M.M25	-	2,5	-	0,143	0,286
M.T5	-	-	0,5	0,143	0,286
M.T10	-	-	1,0	0,143	0,286
M.T25	-	-	2,5	0,143	0,286

Alikvoti pripremljenih nanosuspenzija melatonina s dodanim krioprotektorom preneseni su u staklene vijale za liofilizaciju volumena 20 mL (ISO Clear Fiolax Type 1 Glass Vial, Adelphi Healthcare Packaging, Ujedinjeno Kraljevstvo) koje su potom začepljene gumenim čepovima (TopLyo Schott, Ujedinjeno Kraljevstvo) i zaštićene parafilmom (ParafilmTM M Laboratory Wrapping Film, Bemis Company, Inc., SAD). Staklene vijale su zatim ostavljene u zamrzivaču

pri temperaturi od $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon 24-satnog perioda staklene vijale su prenesene iz zamrzivača, uz napola uzdignute gumene čepove kako bi se omogućilo isparavanje leda i protok vodene pare, u prethodno ekvilibriranu komoru Alpha 1-4 liofilizatora (Martin Christ, Njemačka) u kojoj je pomoću vakuumske pumpe (Vacuubrand RZ2, Njemačka) tlak snižen do 0,5 mbar, a temperatura je iznosila $-54\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Slika 9.). Primarno i sekundarno sušenje provedeno je u 24-satnom periodu. Nakon provedenog postupka sušenja smrzanjem, staklene vijale su pri atmosferskom tlaku odmah začepljene, obavijene parafilmom i unutar eksikatora pohranjene u hladnjak pri temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i zaštićene od svjetla sve do njihove rekonstitucije neposredno prije daljnjih ispitivanja. Nanosuspenzija melatonina bez dodatka krioprotektora pripravljena je kao kontrolni uzorak (REF) čija je liofilizacija također provedena na prethodno opisani način.



Slika 9. Sušenje uzoraka u Alpha 1-4 liofilizatoru (Martin Christ, Njemačka)

3.2.4. Rekonstitucija nanosuspenzija melatonina iz liofilizata

Rekonstitucija nanosuspenzija melatonina iz liofiliziranih uzoraka provedena je odmah nakon sušenja smrzanjem svih pripremljenih uzoraka (liofilizati nanosuspenzije uz dodatak glukoze, manitola i trehaloze pri koncentracijama od 0,5, 1 i 2,5 %, *m/V*, te kontrolni uzorak bez dodatka

krioprotektora). Pročišćena voda je, u količini koja odgovara masi originalnog uzorka nanosuspenzije prije liofilizacije (~ 2 g), prenesena u staklenu vijalu u svrhu rekonstitucije nanosuspenzije melatonina. Sadržaj vijale miješan je na magnetskoj miješalici sve do postizanja homogenosti uzorka (30-60 s). Proučavanjem utjecaja vrste i koncentracije krioprotektora na očuvanje veličine i raspodjele veličina čestica, napravljena je selekcija krioprotektora, te su za daljnje ispitivanje fizičke stabilnosti u vremenu odabrana dva s najboljim učinkom (manitol i trehaloza pri koncentraciji od 2,5 %, *m/V*). Rekonstitucija nanosuspenzija iz odabranih liofiliziranih uzoraka provedena je u šest vremenskih točaka tijekom vremena skladištenja (60 dana). Staklene vijale s liofilizatom nanosuspenzija melatonina izvađene su iz hladnjaka i nakratko ostavljene pri sobnoj temperaturi prije same rekonstitucije koja je provedena na prethodno opisan način.

3.2.5. Karakterizacija rekonstituiranih nanosuspenzija melatonina

Veličina i indeks polidisperznosti čestica melatonina u rekonstituiranim nanosuspenzijama izmjereni su metodom fotonske korelacijske spektroskopije, te zeta-potencijal indirektno na temelju elektroforetske pokretljivosti suspendiranih čestica uz pomoć uređaja Zetasizer Ultra (Malvern Pananalytical Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo). Sva mjerenja su provedena u triplikatu pri temperaturi od 25 °C, vremenu ekvibracije od 120 sekundi, u ćelijama DTS0012 (veličina čestica) i DTS1070 (zeta-potencijal). Fizička stabilnost odabranih liofilizata procijenjena je usporedbom veličine i zeta-potencijala čestica melatonina u uzorcima rekonstituiranim u promatranim vremenskim točkama skladištenja, u odnosu na veličinu i zeta-potencijal čestica melatonina u uzorcima rekonstituiranim odmah nakon liofilizacije (0 – 60 dana; Tablica 3.).

Tablica 3. Vremenski slijed ispitivanja stabilnosti liofilizata nanosuspenzija melatonina

uzorak	t ₁ (0. dan)	t ₂ (3. dan)	t ₃ (7. dan)	t ₄ (14. dan)	t ₅ (30. dan)	t ₆ (45. dan)	t ₇ (60. dan)
M.M25	X	X	X	X	X	X	X
M.T25	X	X	X	X	X	X	X

t – vrijeme; M.M25 – liofilizat s manitolom pri koncentraciji od 2,5 % (*m/V*); M.T25 – liofilizat s trehalozom pri koncentraciji od 2,5 % (*m/V*); X – odabrana vremenska točka

3.2.6. Statistička analiza

Statistička analiza svih odabranih rezultata mjerenja provedena je primjenom ANOVA analize varijance s jednim promjenjivim faktorom (engl. *ordinary one-way ANOVA*) i Dunnett testa usporedbe srednjih vrijednosti sa srednjom vrijednošću kontrolne skupine, uz pomoć programa GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, probna verzija). Analiza krioprotektivnog učinka na fizička svojstva i stabilnost nanokristala melatonina provedena je mjerenjem p-vrijednosti, 95-postotnog intervala pouzdanosti srednje vrijednosti i F-omjera u odabranim slučajevima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava i karakterizacija nanosuspencije melatonina

U dosadašnjim istraživanjima nanotehnologija se pokazala kao obećavajuća strategija u svrhu razvoja inovativnih formulacija za sigurnu dostavu melatonina do mjesta djelovanja različitim putovima primjene, čime se sprječava njegova razgradnja u cirkulaciji, smanjuje toksičnost, povećava bioraspoloživost i potiče adherencija pacijenta (Mirza-Aghazadeh-Attari i sur., 2022). U ovom radu je nanosuspencija melatonina pripravljena metodom 24-satnog vlažnog mljevenja uz kuglice od cirkonijevog oksida stabiliziranog itrijem. Uz melatonin, u koncentraciji od 0,143 % (*m/V*), korišten je polisorbata 80 kao površinski aktivna tvar, u koncentraciji od 0,286 % (*m/V*). Veličina nanokristala melatonina i indeks polidisperznosti izmjereni su metodom fotonske korelacijske spektroskopije odmah nakon pripreme nanosuspencije. Veličina nanokristala pripremljenih postupkom vlažnog mljevenja iznosila je $176,4 \pm 3,3$ nm, dok je indeks polidisperznosti iznosio $0,141 \pm 0,013$. Ovi rezultati su u skladu s vrijednostima prethodnih istraživanja (Tus, 2023). Tus je u istraživanju ispitivala ovisnost veličine nanokristala o masenom omjeru melatonina i polisorbata 80 u rasponu od 1:2 do 10:1, pri čemu je nanosuspencija melatonina pripravljena pri masenom omjeru melatonina i polisorbata 80 od 1:2 bila karakterizirana veličinom čestica od $172,0 \pm 0,6$ nm te indeksom polidisperznosti $0,145 \pm 0,032$ (Tus, 2023).

Vlažno mljevenje pokazalo se učinkovitim za pripremu nanosuspencija slabo topljivih djelatnih tvari, poput melatonina, rezultirajući povećanim omjerom površine i volumena čestica, većom topljivošću i većom brzinom otapanja (Müller i Peters, 1998). Prednosti vlažnog mljevenja su zadovoljavajuća kratkoročna fizičko-kemijska stabilnost nanosuspencija te ekonomska i ekološka prihvatljivost s obzirom na jednostavno uvećanje mjerila proizvodnje i minimalnu upotrebu organskih otapala (Niwa i sur., 2011; Pinar i sur., 2022).

Za uspješno nastajanje nanokristala mljevenjem jedan od najvažnijih parametara je prijenos mehaničke energije koji ovisi o sastavu formulacije i svojstvima medija, pa je zbog toga važan empirijski odabir učinkovitog stabilizatora. Polisorbata 80 ili polioksietilen-(20)-sorbitan monooleat je neionski surfaktant male molekulske mase, čija se struktura sastoji od esterskog lanca jednostruko nezasićene oleinske kiseline (C18:1) i više hidrofilnih postraničnih skupina polioksietilena vezanih za heterociklički prsten strukture sorbitana (cikličkog etera sorbitola). Vrijednost hidrofilno-lipofilnog omjera (engl. *hydrophilic-lipophilic balance*, HLB) iznosi 15, te se kao takav pokazao prikladnim za pripremu nanosuspencija, iako u odnosu na polimere veće

molekulske mase stvara tanki adsorpcijski sloj i pruža manje učinkovitu steričku stabilizaciju (Liu i sur., 2011; Elmowafy i sur., 2021). U kontekstu dosadašnjeg razvoja različitih formulacija melatonina, polisorbata 80 je kao surfaktant korišten u pripravi mikronizirane suspenzije i zatim inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima za nazalnu primjenu (Babu i sur., 2008), samoemulgirajućeg nanonosača za okularnu primjenu (Zingale i sur., 2024) te vodene otopine i suspenzije nanokapsula za intraperitonealni put primjene u *in vivo* istraživanjima (Schaffazick i sur., 2008). Babu i suradnici (2008.) su proučavali kako stvaranje inkluzijskih kompleksa melatonina s ciklodekstrinima utječe na topljivost i nazalnu permeabilnost melatonina. Melatonin je pripremljen mljevenjem do mikrometarskih dimenzija, pomiješan sa smjesom hidroksipropilmetilceluloze (HPMC), polisorbata 80 i otopine hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP β CD) i nasumično metiliranog β -ciklodekstrina (RM β CD), pri čemu je melatonin djelomično ili u potpunosti otopljen. HP β CD i RM β CD su, kao pojačivači apsorpcije lipofilnih lijekova, pri koncentraciji od 1 % (*m/V*) u inkluzijskim kompleksima osigurali bolju nazalnu permeabilnost melatonina. Schaffazick i suradnici (2008.) su pokazali kako se uklapanjem melatonina u nanokapsule obložene polisorbatom 80 i uz dodatak polimera (Eudragit S100[®]) može povećati zaštita od lipidne peroksidacije *in vitro* te antioksidativni učinak na mozak *in vivo*, uz pretpostavku poboljšane bioraspoloživosti uslijed ciljane raspodjele nanokapsula i akumulacije lijeka unutar moždanog tkiva. Istraživanja su potvrdila kako polisorbata 80 već i pri djelomičnom oblaganju nanočestica specifično djeluje na ciljanu dostavu lijeka u mozak interakcijom s endotelnim stanicama krvnih žila u mozgu (Sun i sur., 2004). Osim toga, polisorbata 80 može djelovati kao spona između nanočestica i apolipoproteina omogućujući receptorima posredovanu endocitozu, te kao inhibitor efluksnog mehanizma, posebno P-glikoproteina (Pgp), što predstavlja tek nekoliko pretpostavljenih mehanizama za prijenos nanočestica lijeka u mozak čija učinkovitost ovisi o svojstvima i koncentraciji pomoćnih tvari (Kreuter, 2001; Garcia-Garcia i sur., 2005).

4.2. Priprema nanosuspenzije melatonina uz dodatak krioprotektora

Prikladnost nanosuspenzije kao farmaceutskog oblika melatonina za početak je ispitana mjerenjem veličine čestica i indeksa polidisperznosti odmah nakon mljevenja i zatim nakon čuvanja u hladnjaku tijekom 24 sata pri temperaturi od 4 °C. Rezultati mjerenja pokazali su kako je u promatranom razdoblju došlo do nastanka nekoliko subpopulacija čestica različite veličine. U obzir su uzete vrijednosti izmjerene za subpopulaciju većih čestica pokazavši kako

je veličina nanokristala melatonina tijekom 24 sata narasla za $154,1 \pm 15,2$ nm, odnosno za $86,7 \pm 7,3$ % u odnosu na ishodnu veličinu. Vrijednost PDI-ja u promatranom vremenu povećala se za $0,167 \pm 0,021$, odnosno za $130,9 \pm 52,4$ %, što potvrđuje već spomenutu širu raspodjelu veličina čestica kao posljedicu njihove agregacije i pojave nakupina čestica različitih veličina. Navedena zapažanja upućuju na nestabilnost nanosuspenzije i potkrepljuju istraživanje primjenjivosti liofilizacije za povećanje fizičke stabilnosti razvijene formulacije melatonina.

Nanočestice je prije procesa liofilizacije potrebno zaštititi od fizičko-kemijskih naprezanja i mehaničkog stresa. U tu svrhu su u ovom radu upotrijebljena tri različita krio-/lioprotektora iz uobičajeno korištene skupine saharida: glukoza, manitol i trehaloza. Ovi krio-/lioprotektori odabrani su na temelju prethodnih istraživanja uspješnosti očuvanja fizičkih svojstava koloidnih sustava, odnosno zaštite sustava od stresa tijekom faze smrzavanja ili sušenja procesa liofilizacije (Chacón i sur., 1999; Hua i sur., 2003; Kumar i sur., 2017; Andreana i sur., 2023).

S ciljem ispitivanja prikladnosti glukoze, manitola i trehaloze kao potencijalnih krioprotektora za proces liofilizacije nanosuspenzije melatonina, veličina nanokristala melatonina određena je nakon dodatka krioprotektora u nanosuspenziju i uspoređena s veličinom nanokristala prije dodatka krioprotektora. Tako je veličina nanokristala melatonina nakon otapanja glukoze, manitola i trehaloze pri koncentraciji od 2,5 % (*m/V*) u pripremljenoj nanosuspenziji melatonina iznosila redom $216,4 \pm 3,3$ nm, $186,5 \pm 2,2$ nm i $184,1 \pm 1,6$ nm, što iznosi $121,3 \pm 0,8$ %, $106,5 \pm 0,8$ % i $105,0 \pm 0,5$ % u odnosu na veličinu nanokristala prije dodatka krioprotektora (Tablica 4.). Dodatak glukoze rezultirao je statistički vrlo značajnim ($p < 0,0001$) porastom veličine pripremljenih nanokristala melatonina, dok je dodatak manitola i trehaloze rezultirao manje značajnom promjenom ($0,01 < p < 0,05$). Ipak, sva tri krioprotektora korištena su u daljnjim ispitivanjima, s obzirom na prihvatljivu veličinu nanokristala melatonina u njihovom prisustvu.

Tablica 4. Veličina i PDI nanokristala melatonina izraženi kao apsolutna vrijednost i postotni omjer srednjeg promjera nanokristala i PDI-ja nakon i prije dodatka krioprotektora

uzorak	Veličina nanokristala (nm)	Veličina nanokristala (%)	PDI	PDI (%)
M.G25	$216,4 \pm 3,3$	$121,3 \pm 0,8$	$0,226 \pm 0,022$	$173,5 \pm 4,6$
M.M25	$186,5 \pm 2,2$	$106,5 \pm 0,8$	$0,124 \pm 0,006$	$89,0 \pm 4,2$
M.T25	$184,1 \pm 1,6$	$105,0 \pm 0,5$	$0,140 \pm 0,011$	$111,6 \pm 7,1$

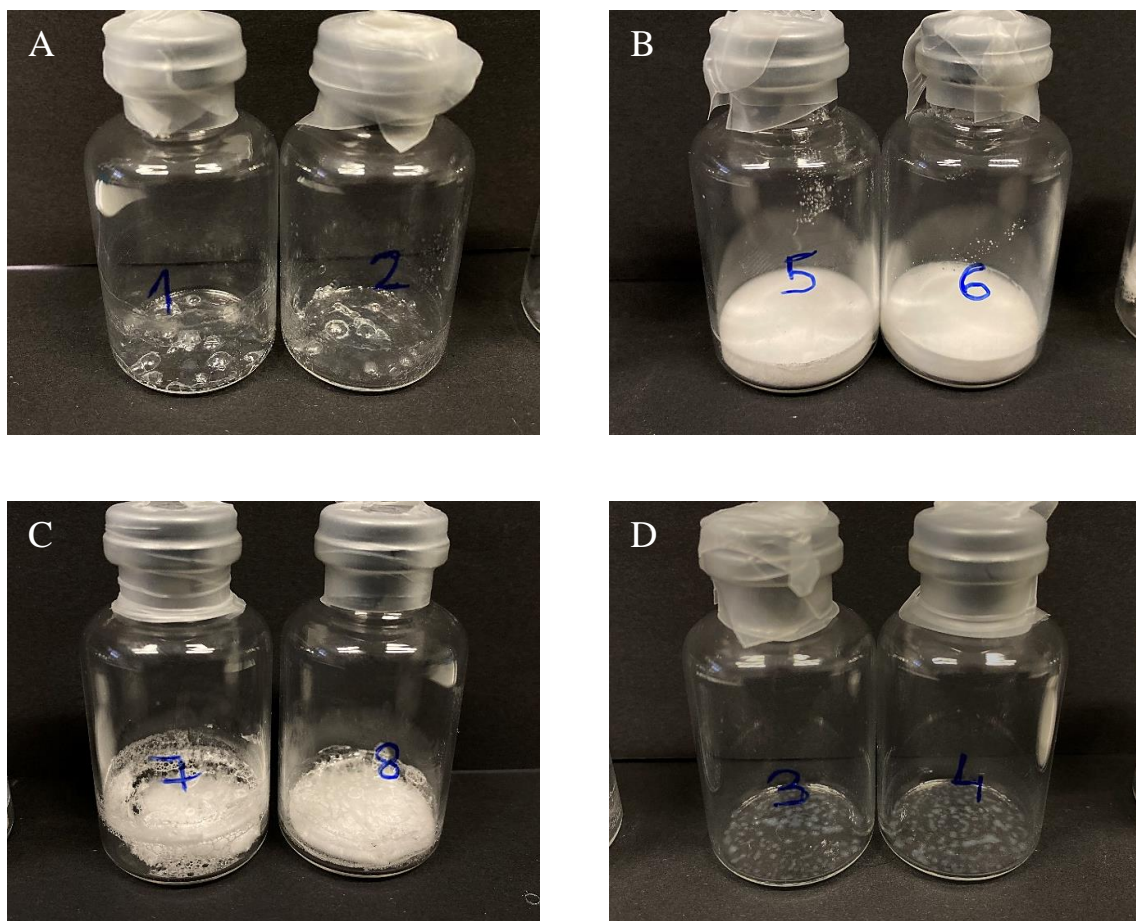
Glukoza, manitol i trehaloza su redom monosaharid, šećerni alkohol i disaharid ugljikohidratne strukture, s razlikom u reducirajućim svojstvima, broju vodikovih veza koje mogu tvoriti i učinkovitosti zaštite nanočestica u procesu liofilizacije. Stupanj očuvanja fizičkih svojstava nanočestica, a zatim i redisperzibilnost suspenzije značajno ovise o svojstvima i ponašanju krioprotektora tijekom smrzavanja, pri različitim temperaturama i brzinama smrzavanja. Šećeri s većom topljivošću u vodi će vjerojatnije formirati amorfno staklasto stanje i ostvariti bolji krioprotektivni učinak u odnosu na one s malom topljivošću koji su skloni kristalizaciji i mogu destabilizirati nanočestice (Abdelwahed i sur., 2006b; Kumar i sur., 2017). Sposobnost stvaranja vodikovih veza u korelaciji je s narušavanjem vodikovih veza među molekulama vode i inhibicijom rasta kristala (Lee i Baiz, 2022). Osim stvaranja vodikovih veza i zamjene molekula vode, mehanizam staklastog prijelaza ovisi i o viskoznosti disperzije koja raste s porastom koncentracije krioprotektora i smanjenjem temperature, i izraženija je u prisustvu disaharida u odnosu na monosaharide (Weng i sur., 2019). Polisorbat 80 na sličan način može ostvariti krioprotektivni učinak, prije svega kada je prisutan u formulaciji proteina koje štiti od interakcija s kristalima leda s obzirom na brzinu smrzavanja i veličinu površine kristala leda (Hillgren i sur., 2002).

4.3. Uspješnost liofilizacije i fizička svojstva rekonstituiranih nanosuspenzija melatonina

U daljnjem ispitivanju korištena su sva tri prethodno odabrana krioprotektora u svrhu očuvanja veličine, raspodjele veličina i naboja nanokristala melatonina (obloženih polisorbatom 80), očuvanja reprezentativne strukture kolača (liofilizata) i lakše rekonstitucije u ishodnom volumenu nanosuspenzije.

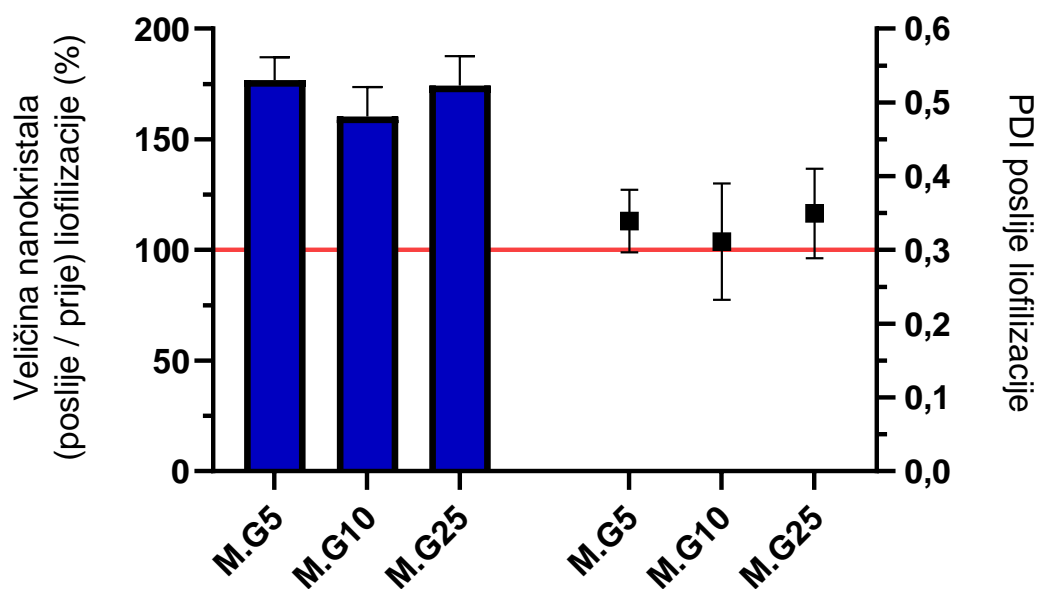
Prije početka procesa liofilizacije u uzorku nanosuspenzije otopljena je glukoza, manitol ili trehaloza pri koncentraciji u rasponu od 0,5 do 2,5 % (*m/V*). Pripremljen je i kontrolni uzorak bez dodatka krioprotektora. Raspon koncentracija odabran je na temelju prethodnih istraživanja u kojima su krioprotektori uglavnom bili prisutni u koncentracijama od 0,1 do 10 % (*m/V*). Naime, Pardeshi i suradnici (2023) su u svojem preglednom radu prikazali razvoj i značajke kvalitete procesa liofilizacije u istraživanjima različitih formulacija pa su, primjerice, kitozanske nanočestice s DNA liofilizirane uz dodatak 0,1-0,3 % (*m/V*) manitola ili 0,5 % (*m/V*) trehaloze. U drugom primjeru su PEG-PLA nanočestice s kurkuminom liofilizirane uz dodatak glukoze, manitola ili trehaloze u koncentraciji od 10 % (*m/V*) (Pardeshi i sur., 2023).

Liofilizacija pripremljene nanosuspenzije melatonina bez dodatka krioprotektora rezultirala je značajnim povećanjem ($p < 0,0001$) promjera nanočestica u rekonstituiranom uzorku, koji je iznosio $239,0 \pm 3,7$ nm (povećanje za $34,2 \pm 3,3$ % u odnosu na promjer nanočestica u ishodnom uzorku) što ukazuje na agregaciju čestica uslijed nezaštićenog napreznja. Istodobno, PDI se povećao za $0,040 \pm 0,019$. Uzorak je bio nereprezentativne strukture i otežane rekonstitucije, vjerojatno kao posljedica kolapsa i nepotpunog sušenja uzorka. Otapanjem posebno manitola u suspenziji nanokristala, nakon liofilizacije dobivena je reprezentativna porozna struktura kolača (Slika 10.) zauzimajući volumen jednak volumenu suspenzije prije liofilizacije uz posljedično već dokazanu olakšanu rekonstituciju liofilizata i očuvanu ishodnu raspodjelu veličina čestica nanosuspenzije (Pardeshi i sur., 2023). Prisustvo trehaloze uzrokovalo je djelomični kolaps, a prisustvo glukoze potpuni kolaps strukture kolača. Međutim, svi liofilizirani uzorci, bez obzira na vrstu i koncentraciju krioprotektora, relativno su lako redispergirani.



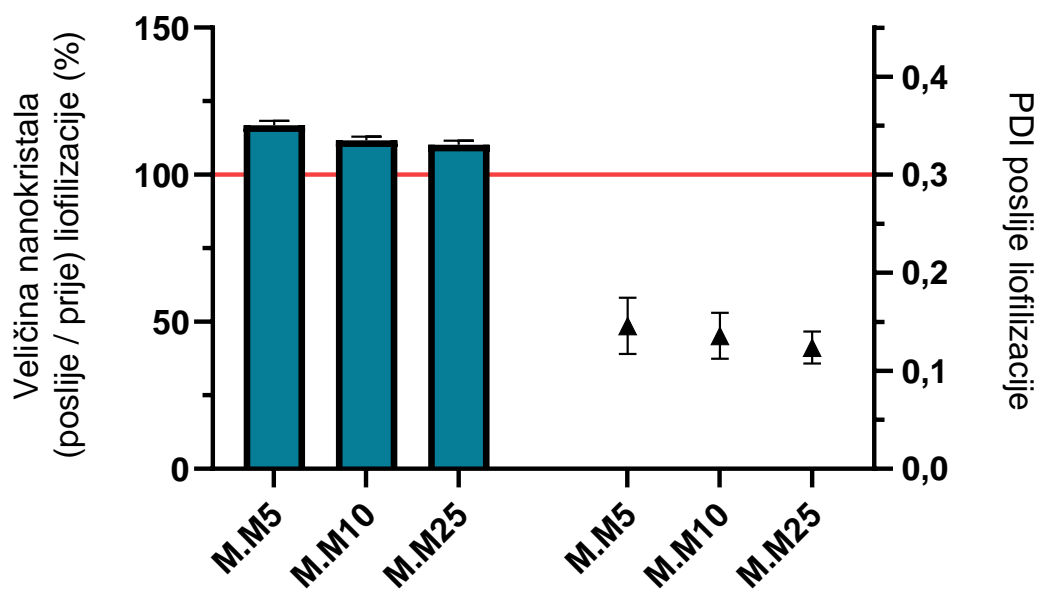
Slika 10. Usporedba strukture kolača uzoraka nanosuspenzija melatonina (0,143 %, m/V) liofiliziranih uz odabrane krioprotektore u koncentraciji od 2,5 % (m/V); glukoza (A), manitol (B), trehaloza (C) i kontrolni uzorak (REF) bez dodatka krioprotektora (D).

Uspješnost očuvanja veličine i raspodjele veličina nanokristala melatonina nakon liofilizacije u prisustvu krioprotektora (glukoze, manitola ili trehaloze), odnosno rekonstitucije u ishodnom volumenu suspenzije, prikazana je na Slikama 11.-13. (crvena linija označava 100-postotni stupanj očuvanja veličine nanokristala i najveću prihvatljivu vrijednost indeksa polidisperznosti od 0,3). Dodatak glukoze kao krioprotektora nije rezultirao odgovarajućim izgledom liofilizata (Slika 10.), niti je osigurao prihvatljivu veličinu nanokristala u rekonstituiranom uzorku. Naime, veličina nanokristala u rekonstituiranim uzorcima u odnosu na ishodnu veličinu iznosila je od $160,3 \pm 13,4 \%$ do $176,9 \pm 10,2 \%$ (Slika 11.) pri koncentraciji glukoze od 0,5 do 2,5 % (m/V), zbog čega se glukoza pokazala najmanje prihvatljivim krioprotektorom. Indeks polidisperznosti nanokristala u rekonstituiranoj suspenziji iznosio je od $0,311 \pm 0,079$ do $0,349 \pm 0,061$ i također nije bio zadovoljavajući, s obzirom na to da je bio iznad vrijednosti od 0,3 koja se smatra prihvatljivom u sustavima za dostavu lijeka i ukazuje na homogenu populaciju nanočestica (Zhang i Wang, 2023). Musumeci i suradnici (2013) su slično ispitivali učinak glukoze kao krioprotektora na fizička svojstva PLGA i PLGA-PEG nanočestica melatonina uz polisorbitat 80 kao surfaktant. Pritom je veličina čestica varirala od 100 do 500 nm, odnosno bila je dva do tri puta veća u odnosu na veličinu čestica prije liofilizacije (Musumeci i sur., 2013).

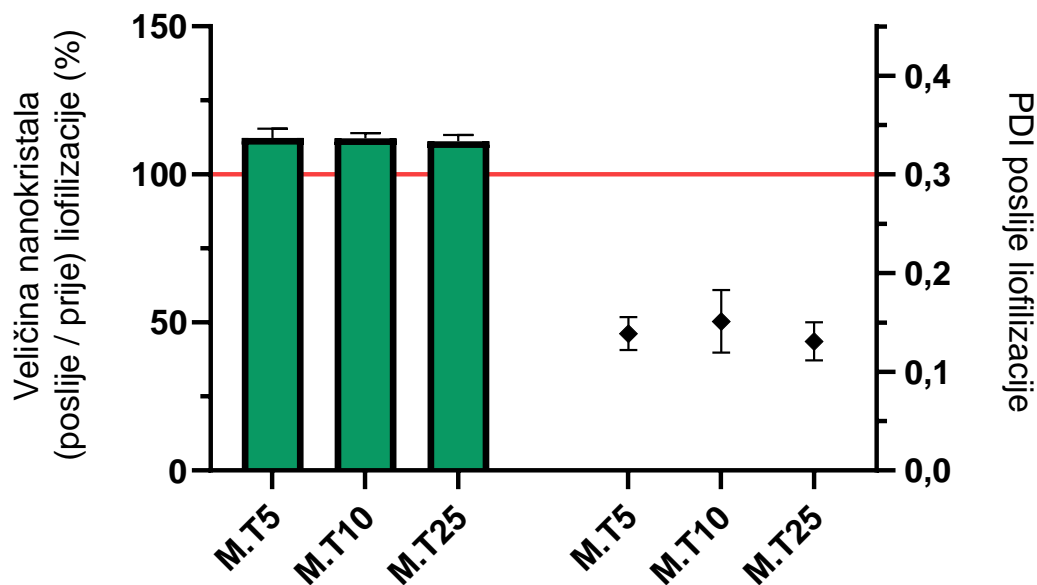


Slika 11. Veličina (stupci) i indeks polidisperznosti (PDI, ■) nanokristala melatonina nakon liofilizacije uz dodatak glukoze (G) pri koncentraciji od 0,5, 1,0 i 2,5 % (m/V), i rehidracije do ishodnog volumena. Veličina je izražena kao postotni omjer srednjeg promjera nanokristala u rekonstituiranoj i ishodnoj suspenziji. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD, $n = 6$.

Manitol i trehaloza kao krioprotektori osigurali su sličan stupanj očuvanja veličine čestica i indeksa polidisperznosti. Pri koncentraciji manitola od 0,5, 1,0 i 2,5 % (*m/V*) veličina nanokristala u rekonstituiranim uzorcima u odnosu na ishodnu veličinu iznosila je redom $116,8 \pm 1,5$ %, $111,7 \pm 1,3$ % i $110,2 \pm 1,4$ % (Slika 12.). Porast koncentracije manitola rezultirao je statistički značajnim smanjenjem veličine nanokristala ($p < 0,05$), približavajući se pritom 100-postotnom očuvanju njihove veličine. Indeks polidisperznosti se također smanjivao s porastom koncentracije manitola od $0,146 \pm 0,029$ do $0,124 \pm 0,016$, odnosno pri svim koncentracijama je iznosio manje od 0,3 zadovoljavajući kriterij prihvatljive raspodjele veličina. S druge strane, pri koncentraciji trehaloze od 0,5, 1,0 i 2,5 % (*m/V*) veličina nanokristala u rekonstituiranim uzorcima u odnosu na ishodnu veličinu iznosila je redom $112,3 \pm 3,1$ %, $112,1 \pm 1,8$ % i $111,2 \pm 2,1$ % (Slika 13.). Razlika u stupnju očuvanja veličine pri različitim koncentracijama trehaloze pokazala se značajnom ($p < 0,05$) tek pri koncentraciji od 2,5 % (*m/V*). Indeks polidisperznosti bio je manji od 0,3 i iznosio je od $0,131 \pm 0,019$ do $0,151 \pm 0,032$. U konačnici, za razliku od glukoze, manitol i trehaloza su kao potencijalni krioprotektori osigurali zadovoljavajuće odstupanje veličine nanokristala i indeksa polidisperznosti rekonstituiranih uzoraka pri svim ispitivanim koncentracijama, iako je najbolji učinak postignut pri koncentraciji od 2,5 % (*m/V*).



Slika 12. Veličina (stupci) i indeks polidisperznosti (PDI, ▲) nanokristala melatonina nakon liofilizacije uz dodatak manitola (M) pri koncentraciji od 0,5, 1,0 i 2,5 % (*m/V*), i rehidracije do ishodnog volumena. Veličina je izražena kao postotni omjer srednjeg promjera nanokristala u rekonstituiranoj i ishodnoj suspenziji. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD, $n = 6$.

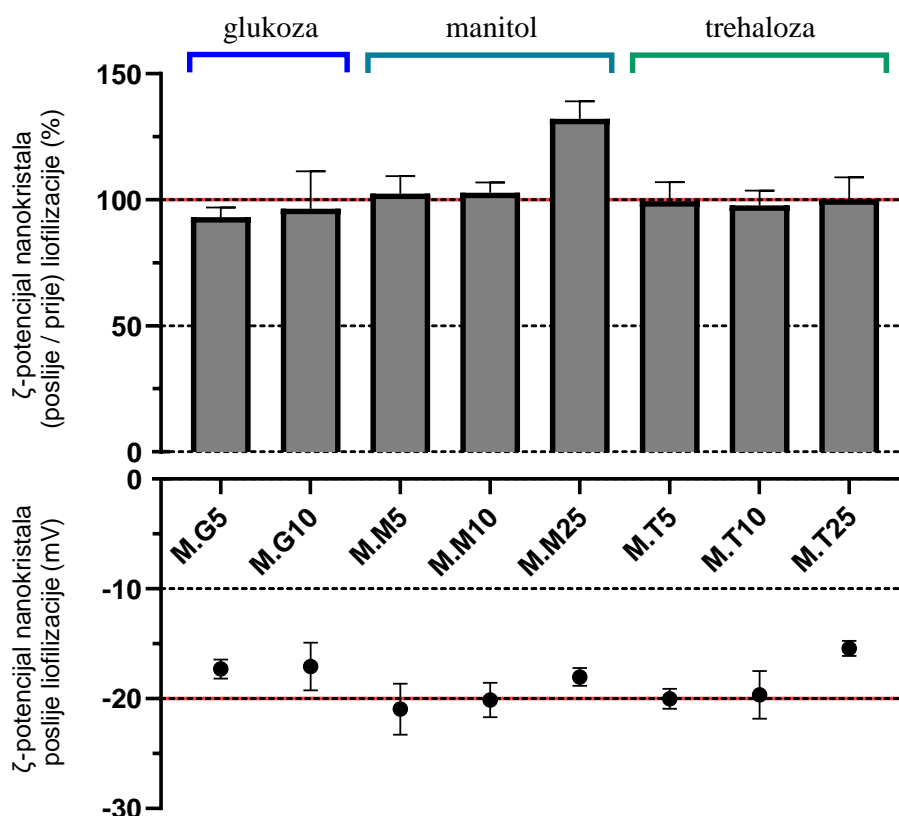


Slika 13. Veličina (stupci) i indeks polidisperznosti (PDI, ●) nanokristala melatonina nakon liofilizacije uz dodatak trehaloze (T) pri koncentraciji od 0,5, 1,0 i 2,5 % (*m/V*), i rehidracije do ishodnog volumena. Veličina je izražena kao postotni omjer srednjeg promjera nanokristala u rekonstituiranoj i ishodnoj suspenziji. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD, $n = 6$.

Hafner i suradnici (2011) su optimirali uvjete liofilizacije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom u svrhu dugoročnog očuvanja njihove fizičko-kemijske stabilnosti. Prisustvo glukoze rezultiralo je nižom temperaturom staklastog prijelaza, djelomičnim kolapsom strukture liofiliziranog uzorka i većim udjelom ostatne vlage, zbog čega se glukoza pokazala slabijim krioprotektorom u odnosu na trehalozu koja je pri koncentraciji od 2,5 % (*m/V*) pozitivno utjecala na očuvanje svojstava nanočestica i uspjeh liofilizacije (Hafner i sur., 2011). Slično je pokazano i na primjeru liofilizacije liposomalnih suspenzija s uklopljenim ftorafurom, analogom pirimidina i antimetabolitom s protutumorskim učinkom, i vitaminom A. U slučaju glukoze kao krioprotektora, u usporedbi s manitolom, trehalozom i saharozom, zabilježena je najniža temperatura staklastog prijelaza i najveća promjena u promjeru liposoma, dok je trehaloza pri koncentraciji od 10 % (*m/V*) imala najveći protektivni učinak na očuvanje veličine i stabilnosti liposoma zbog čega se pokazala kao najprikladniji krioprotektor (Hua i sur., 2003).

Mjerenje potencijala na površini čestice fotonskom korelacijskom spektroskopijom temelji se na kretanju čestica pod utjecajem električnog polja. Vrijednost zeta-potencijala služi za procjenu interakcija između nanočestica i ekscipijensa koje mogu uzrokovati promjenu naboja

na površini čestice, utjecati na međusobne interakcije i fizičko-kemijsku stabilnost koloidnih disperzija. Veća apsolutna vrijednost zeta-potencijala označava veće odbijanje među susjednim jednako nabijenim česticama u disperziji i manju mogućnost njihove agregacije (Elmowafy i sur., 2021). Maseni omjer surfaktanta i djelatne tvari, duljina trajanja mljevenja i brzina mljevenja utječu na veličinu i naboj na površini nanočestica. U slučaju primjene polisorbata 80 kao surfaktanta, dokazano je kako vrijednost zeta-potencijala oko ± 20 mV potpuno stabilizira nanosuspenciju kombinacijom elektrostatičkog i steričkog učinka (Singh i sur., 2011). Slika 14. prikazuje uspješnost očuvanja zeta-potencijala nanokristala nakon liofilizacije u prisustvu krioprotektora i rekonstitucije u ishodnom volumenu suspenzije. Vrijednost zeta-potencijala uz dodatak manitola i trehaloze u koncentracijama od 0,5 i 1,0 % (m/V) kretala se u rasponu od $-19,7 \pm 2,2$ mV do $-21,0 \pm 2,3$ mV, odnosno blizu su vrijednosti od ± 20 mV koja je prethodno postavljena kao jedan od indikatora prihvatljive stabilnosti nanosuspencija (Li i sur., 2021).



Slika 14. Zeta-potencijal nanokristala melatonina nakon liofilizacije uz dodatak glukoze (0,5 % i 1,0 %, m/V), manitola (0,5 %, 1,0 % i 2,5 %, m/V) i trehaloze (0,5 %, 1,0 % i 2,5 %, m/V), i rehidracije do ishodnog volumena. Prikazan je postotni omjer zeta-potencijala nanokristala u rekonstituiranoj i ishodnoj suspenziji (stupci) te zeta-potencijal nanokristala izmjeren u rekonstituiranoj suspenziji (●). Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD, $n = 3$.

Iako je polisorbata 80 neionski surfaktant, u literaturi je često zabilježen negativni zeta-potencijal nanočestica kao rezultat njegove adsorpcije na površini nanočestica, zbog eventualno prisutnih onečišćenja surfaktanta u obliku slobodnih masnih kiselina ili adsorpcije negativno nabijenih hidroksilnih iona iz vode na površinu nanočestica (Nižić Nodilo i sur., 2022; Zhao i sur., 2023a). Porast vrijednosti zeta-potencijala može biti posljedica promjene debljine adsorbiranog sloja na površini nanočestica ili stvaranja vodikovih veza, uz neutralizaciju površinskog naboja kao rezultat (Attia Shafie i Mohammed Fayek, 2013).

Tablica 5. Rezultati ANOVA testa s jednostrukom klasifikacijom za odabrane uzorke

(parametar)	M.M25	M.T25	REF
Veličina nanokristala			
Vrijednost poslije liofilizacije (nm) ± SD	191,6 ± 1,2	195,4 ± 2,1	239,0 ± 3,7
Promjena od početne vrijednosti (nm) ± SD	17,8 ± 2,3	19,7 ± 3,5	60,9 ± 4,8
Promjena od početne vrijednosti (%) ± SD	110,2 ± 1,4	111,2 ± 2,1	134,2 ± 3,3
Razlika u odnosu na REF (%) (95 % CI)	23,98 (20,58; 27,38)	22,98 (19,58; 26,38)	
Statistička značajnost u odnosu na REF ^a	Da (****)	Da (****)	
p-vrijednost	< 0,0001	< 0,0001	
F-omjer testa = 189,4; p-vrijednost < 0,0001			
Indeks polidisperznosti (PDI)			
Vrijednost poslije liofilizacije ± SD	0,124 ± 0,016	0,131 ± 0,019	0,192 ± 0,021
Promjena od početne vrijednosti ± SD	-0,021 ± 0,026	0,002 ± 0,033	0,040 ± 0,019
Promjena od početne vrijednosti (%) ± SD	86,3 ± 16,3	103,9 ± 24,0	126,5 ± 13,7
Razlika u odnosu na REF (%) (95 % CI)	40,27 (14,21; 66,32)	22,63 (-3,430; 48,68)	
Statistička značajnost u odnosu na REF ^a	Da (**)	Ne (ns)	
p-vrijednost	0,0035	0,0910	
F-omjer testa = 7,141; p-vrijednost = 0,0066 (< 0,05)			

Zeta-potencijal			
Vrijednost poslije liofilizacije (mV) ± SD	-18,02 ± 0,81	-15,42 ± 0,69	-9,61 ± 0,57
Promjena od početne vrijednosti (mV) ± SD	-4,37 ± 0,89	0,04 ± 1,36	6,25 ± 0,97
Promjena od početne vrijednosti (%) ± SD	132,1 ± 7,0	100,1 ± 8,7	60,7 ± 4,3
Razlika u odnosu na REF (%) (95 % CI)	-71,34 (-82,89; -59,79)	-39,41 (-50,96; -27,86)	
Statistička značajnost u odnosu na REF ^a	Da (****)	Da (****)	
p-vrijednost	< 0,0001	< 0,0001	
F-omjer testa = 140,0; p-vrijednost < 0,0001			

^a ns – p > 0,05; * – p ≤ 0,05; ** – p ≤ 0,01; *** – p ≤ 0,001; **** – p ≤ 0,0001

U svrhu utvrđivanja statistički značajne razlike između učinka odabranih krioprotektora na fizička svojstva nanokristala melatonina u rekonstituiranim uzorcima nakon liofilizacije, provedena je ANOVA analiza varijance s jednim promjenjivim faktorom. Rezultati analize su prikazani u Tablici 5. Odabran je uzorak svakog krioprotektora koji je uzrokovao najmanju promjenu veličine nanokristala prije i poslije liofilizacije (M.M25 i M.T25). Statistička analiza izračunata je u odnosu na vrijednosti rekonstituiranog kontrolnog uzorka (REF) podvrgnutog istom procesu liofilizacije, no bez dodatka krioprotektora. U odnosu na uzorak REF, a samim time i na uzorke M.M25 i M.T25, glukoza je rezultirala značajno većim povećanjem veličine nanokristala (p < 0,0001), stoga nije uzeta u obzir za daljnju statističku obradu.

P-vrijednost je indikator statističke značajnosti rezultata pokazujući kolika je vjerojatnost da je uočena razlika između skupova rezultata posljedica slučajnosti, uz p < 0,05 koja je postavljena kao minimalna razina statističke značajnosti. 95-postotni interval pouzdanosti označava raspon mogućih vrijednosti unutar kojeg se stvarna vrijednost nalazi s vjerojatnošću od 95 %. F-omjer kao pozitivna vrijednost predstavlja značajnost razlike između promatranih srednjih vrijednosti.

U usporedbi s vrijednostima rekonstituiranog kontrolnog uzorka, manitol i trehaloza su već pri koncentraciji od 0,5 % (m/V) ostvarili statistički značajan učinak (p < 0,05) na očuvanje veličine nanokristala koji je dodatno izražen pri koncentraciji od 2,5 % (m/V). Trehaloza (2,5 %, m/V) je ostvarila veći stupanj očuvanja fizičkih svojstava nanokristala melatonina, poput indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala, u usporedbi s manitolom. Statistička analiza pokazala je usporediv učinak manitola i trehaloze (2,5 %, m/V) na očuvanje veličine i raspodjele veličina (p > 0,05), te statistički značajnu razliku u učinku na očuvanje zeta-potencijala (p < 0,05).

Prema tome, manitol i trehaloza su kao krioprotektori ostvarili sličan i zadovoljavajući učinak na očuvanje veličine nanokristala melatonina tijekom liofilizacije u odnosu na kontrolni uzorak (REF) podvrgnut procesu liofilizacije bez dodatka krioprotektora. Manitol je pritom rezultirao reprezentativnijom strukturom liofilizata, a trehaloza većim stupnjem očuvanja vrijednosti zeta-potencijala. Stoga su ovi krioprotektori odabrani za daljnje ispitivanje stabilnosti liofilizirane nanosuspenzije melatonina za vrijeme skladištenja. Ispitan je njihov učinak pri koncentraciji od 2,5 % (*m/V*) koja je rezultirala najmanjim povećanjem veličine nanokristala i najmanjim indeksom polidisperznosti.

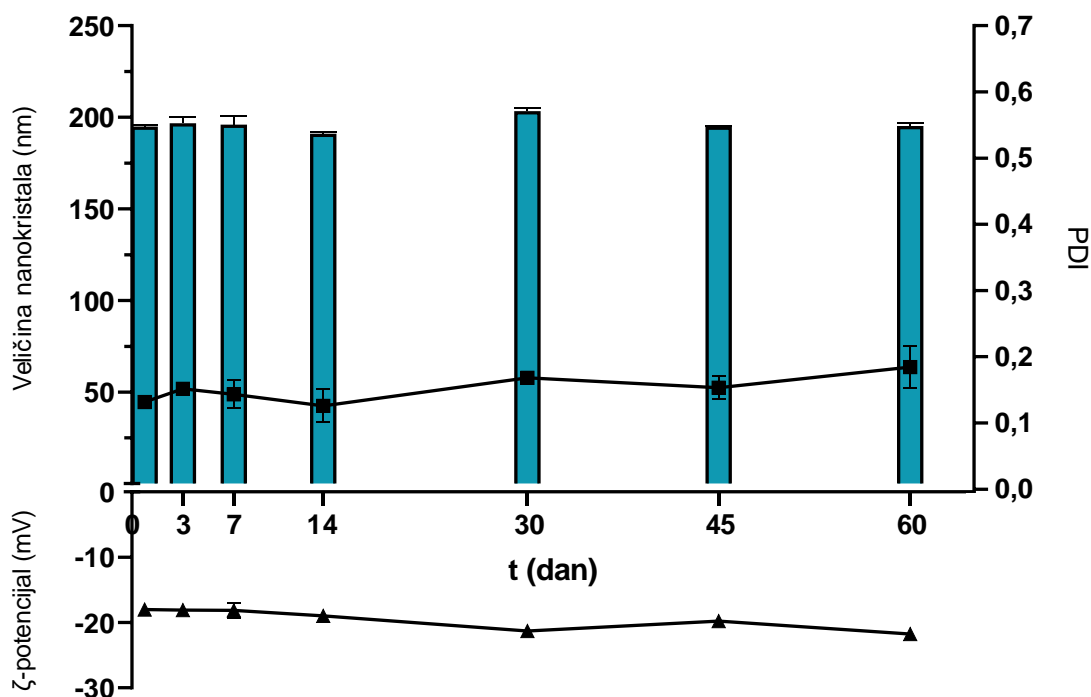
4.4. Stabilnost liofiliziranih nanosuspenzija melatonina

U daljnjem ispitivanju promatrana je stabilnost liofiliziranih nanosuspenzija melatonina pripremljenih uz dodatak manitola i trehaloze pri koncentraciji od 2,5 %, *m/V* (M.M25 i M.T25) u odabranim vremenskim točkama. Odabir tipa i koncentracije krioprotektora temeljen je na rezultatima ispitivanja uspješnosti liofilizacije i karakterizacije rekonstituiranih nanosuspenzija melatonina koji su raspravljani u prethodnom odjeljku.

Stabilnost liofiliziranih nanosuspenzija melatonina M.M25 i M.T25 promatrana je tijekom razdoblja od 60 dana, odnosno dva mjeseca. Uzorci su odmah nakon liofilizacije u staklenim vijalama zaštićeni parafilmom i pohranjeni u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C. U odabranim vremenskim točkama promatrani su izgled liofilizata i fizička svojstva nanokristala mjerenjem njihove veličine, raspodjele veličina (PDI) i površinskog naboja čestica (zeta-potencijala) u uzorku nakon rekonstitucije u ishodnom volumenu nanosuspenzije.

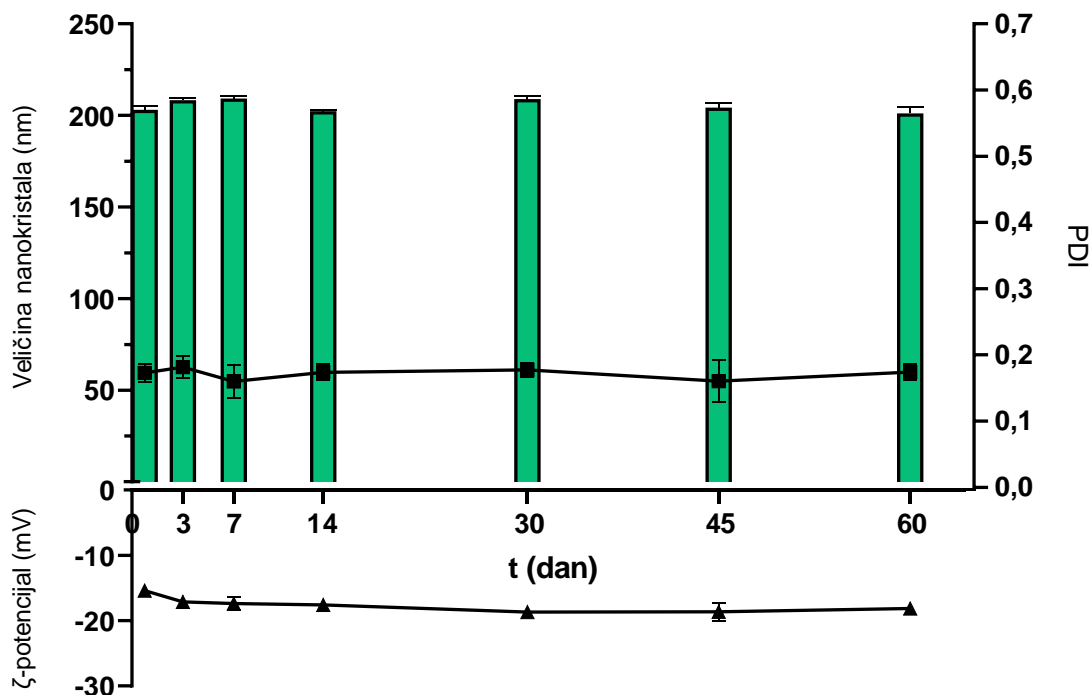
Ni u jednom ispitivanom uzorku nije bilo vidljive promjene boje ili izgleda liofilizata tijekom skladištenja. Liofilizati, nakon što su izvađeni iz hladnjaka i kratko ostavljeni na sobnoj temperaturi, jednostavno su i brzo redispergirani uz dodatak pročišćene vode. Veličina čestica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal mjereni u rekonstituiranim uzorcima većinom su ostali sačuvani u odnosu na odgovarajuće parametre svježe pripremljene nanosuspenzije (Slike 15. i 16.), ukazujući pritom na odgovarajuću stabilnost liofiliziranih nanosuspenzija u promatranom razdoblju skladištenja do 60 dana. U prisustvu manitola (2,5 %, *m/V*) veličina nanokristala iznosila je $195,2 \pm 1,9$ nm nakon 60 dana skladištenja. Vrijednost PDI-ja se pokazala relativno varijabilnom u odnosu na početnu vrijednost raspodjele veličina nanokristala, no i nakon 60 dana ona je iznosila $0,184 \pm 0,032$, zadovoljavajući uvjet jednolike raspodjele veličina ($< 0,3$).

Apsolutna vrijednost zeta-potencijala blago se povećala do vrijednosti od $-21,8 \pm 0,2$ mV ukazujući na potencijalno zadovoljavajući učinak površinskog naboja na međusobno odbijanje i stabilizaciju čestica (Slika 15.).



Slika 15. Veličina (stupci), indeks polidisperznosti (PDI, ■) i zeta (ζ)-potencijal (▲) nanokristala melatonina nakon liofilizacije uz dodatak manitola (M) pri koncentraciji od 2,5 % (*m/V*), i rehidracije do ishodnog volumena 0, 3, 7, 14, 30, 45 i 60 dana nakon liofilizacije. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD, $n = 3$.

Uz dodatak trehaloze (2,5 %, *m/V*) veličina nanokristala nakon 60 dana skladištenja iznosila je $201,2 \pm 3,7$ nm, odnosno nije se značajno promijenila u odnosu na ishodnu vrijednost ($p > 0,05$). Vrijednost PDI-ja je tijekom cijelog promatranog razdoblja ostala nepromijenjena, dakle pokazala se relativno manje varijabilnom nego u slučaju manitola. U uzorku koji je čuvan 60 dana iznosila je $0,174 \pm 0,012$, zadovoljavajući uvjet jednolike raspodjele veličina ($< 0,3$). Apsolutna vrijednost zeta-potencijala istog uzorka iznosila je $-18,1 \pm 0,9$, što ukazuje na nešto manji stabilizirajući učinak nego u slučaju manitola (poželjno oko ± 20 mV) (Slika 16.).



Slika 16. Veličina (stupci), indeks polidisperznosti (PDI, ■) i zeta (ζ)-potencijal (▲) nanokristala melatonina nakon liofilizacije uz dodatak trehaloze (T) pri koncentraciji od 2,5 % (m/V), i rehidracije do ishodnog volumena 0, 3, 7, 14, 30, 45 i 60 dana nakon liofilizacije. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD, $n = 3$.

U konačnici, provedena ispitivanja stabilnosti za vrijeme skladištenja uglavnom su potvrdila očuvanje ključnih fizičkih svojstava razvijenih formulacija. Učinak trehaloze kao krioprotektora pri koncentraciji od 2,5 % (m/V) pokazao se relativno boljim za očuvanje ukupnih fizičkih svojstava i stabilnost liofilizirane nanosuspencije, u odnosu na manitol pri istoj koncentraciji (2,5 %, m/V). Ovakav rezultat u skladu je s ranije opisanim krioprotektivnim učinkom trehaloze (2,5 %, m/V) (Hafner i sur., 2011). Naime, liofilizacijom suspencije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom uz dodatak trehaloze pri koncentraciji od 2,5 % (m/V), pripremljen je stabilni liofilizat s mogućnošću rekonstitucije ishodne suspencije nanočestica tijekom razdoblja od 7 mjeseci (Hafner i sur., 2011). Trehaloza je i u kasnijim istraživanjima pokazala povoljan krioprotektivni učinak zbog visoke temperature staklastog prijelaza, izostanka kemijske reaktivnosti i male higroskopnosti, osiguravajući fizičku i kemijsku stabilnost liofiliziranih formulacija (Pardeshi i sur., 2023).

5. ZAKLJUČCI

- Uspješno je pripravljena nanosuspenzija melatonina metodom 24-satnog vlažnog mljevenja pri koncentraciji melatonina od 0,143 % (*m/V*) i pri koncentraciji polisorbata 80 kao površinski aktivne tvari od 0,286 % (*m/V*), odnosno u konačnom masenom omjeru melatonina i polisorbata 80 od 1:2.
- Veličina nanokristala melatonina unutar svježe pripravljene nanosuspenzije iznosila je $176,4 \pm 3,3$ nm, uz indeks polidisperznosti od $0,141 \pm 0,013$.
- Liofilizacija pripravljene nanosuspenzije melatonina i rekonstitucija do ishodnog volumena rezultirali su povećanjem veličine nanokristala do $239,0 \pm 3,7$ nm, odnosno za $34,2 \pm 3,3$ %, i indeksa polidisperznosti do $0,192 \pm 0,021$, odnosno za $26,5 \pm 13,7$ %.
- Prisustvo krioprotektora u nanosuspenziji melatonina podvrgnutoj liofilizaciji pokazalo se važnim formulacijskim parametrom za očuvanje fizičkih svojstava nanokristala u rekonstituiranoj nanosuspenziji.
- Liofilizacija nanosuspenzije melatonina uz dodatak manitola rezultirala je liofilizatom volumena jednakog volumenu suspenzije prije liofilizacije. U slučaju trehaloze uočen je djelomični kolaps, a u slučaju glukoze potpuni kolaps strukture liofilizata.
- Glukoza se pri ispitivanim koncentracijama (od 0,5 do 2,5 %, *m/V*) pokazala potpuno neprikladnim krioprotektorom, u prisustvu kojeg su se veličina nanokristala i indeks polidisperznosti u rekonstituiranom uzorku povećali u odnosu na ishodne vrijednosti.
- Manitol i trehaloza su pri koncentracijama od 0,5 do 2,5 % (*m/V*) osigurali zadovoljavajuće očuvanje fizičkih svojstava nanokristala melatonina nakon liofilizacije. Porastom koncentracije krioprotektora u liofiliziranoj nanosuspenziji djelomično se povećala uspješnost očuvanja veličine i raspodjele veličina nanokristala.
- Uz dodatak manitola ili trehaloze pri koncentraciji od 2,5 % (*m/V*) uspješno je očuvana fizička stabilnost liofiliziranih uzoraka nanosuspenzije melatonina tijekom 60-dnevnog skladištenja. S obzirom na veći stupanj očuvanja fizičkih svojstava i manje varijabilne vrijednosti tijekom skladištenja, trehaloza se pokazala prikladnijim krioprotektorom.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

®	registrirani trgovački znak
ASD	poremećaj iz spektra autizma
BCS	biofarmaceutska klasifikacija tvari
°C	Celzijev stupanj
c_{\max}	vršna koncentracija u plazmi
CHMP	Povjerenstvo za humane lijekove
CNS	središnji živčani sustav
CQA	kritična značajka kvalitete
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija
EMA	Europska agencija za lijekove
FDA	Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država
FDM	mikroskopija sušenja smrzavanjem
HALMED	Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode
HLB	hidrofilno-lipofilni omjer
LD	laserska difraktometrija
LDV	lasersko mjerenje brzine na temelju Dopplerovog efekta
min	minuta
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija
PDI	indeks polidisperznosti
PEG-PLA	polietilenglikolom obložen polilaktid
pH	negativan dekadski logaritam aktiviteta vodikovih iona u otopini
pKa	negativan logaritam konstante disocijacije kiseline
PLGA	polimer mliječne i glikolne kiseline
RDI	indeks redisperzibilnosti
SD	standardna devijacija
t	vrijeme
T_c	temperatura kolapsa
T_g'	temperatura staklastog prijelaza
t_{\max}	vrijeme postizanja vršne koncentracije u plazmi
ζ-potencijal	zeta-potencijal

7. LITERATURA

Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006a, 63, 87 – 94.

Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006b, 58, 1688 – 1713.

Ahmadi Tehrani A, Omranpoor MM, Vatanara A, Seyedabadi M, Ramezani V. Formation of nanosuspensions in bottom-up approach: theories and optimization. *Daru, J Fac Pharm, Tehran Univ Med Sci*, 2019, 27, 451 – 473.

Aldeeb MME, Wilar G, Suhandi C, Elamin KM, Wathoni N. Nanosuspension-Based Drug Delivery Systems for Topical Applications. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19, 825 – 844.

Alghamdi BS. The neuroprotective role of melatonin in neurological disorders. *J Neurosci Res*, 2018, 96, 1136 – 1149.

Allison SD, Molina MC, Anchordoquy TJ. Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis. *Biochim Biophys Acta, Biomembr*, 2000, 1468, 127 – 138.

Almalik A, Alradwan I, Kalam MA, Alshamsan A. Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating. *Saudi Pharm J*, 2017, 25, 861 – 867.

Amis TM, Renukuntla J, Bolla PK, Clark BA. Selection of Cryoprotectant in Lyophilization of Progesterone-Loaded Stearic Acid Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics*, 2020, 12, 892.

Andreana I, Bincoletto V, Manzoli M, Rodà F, Giarraputo V, Milla P, Arpicco S, Stella B. Freeze Drying of Polymer Nanoparticles and Liposomes Exploiting Different Saccharide-Based Approaches. *Materials*, 2023, 16, 1212.

Andrisano V, Bertucci C, Battaglia A, Cavrini V. Photostability of Drugs: Photodegradation of Melatonin and Its Determination in Commercial Formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, 23, 15 – 23.

Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic. *Bioeng Transl Med*, 2016, 1, 10 – 29.

Attia Shafie MA, Mohammed Fayek HH. Formulation and Evaluation of Betamethasone Sodium Phosphate Loaded Nanoparticles for Ophthalmic Delivery. *J Clin Exp Ophthalmol*, 2013, 4, 1 – 11.

Babu RJ, Dayal P, Singh M. Effect of Cyclodextrins on the Complexation and Nasal Permeation of Melatonin. *Drug Delivery*, 2008, 15, 381 – 388.

Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 2019, 25, 112.

Bechgaard E, Lindhardt K, Martinsen L. Intranasal absorption of melatonin in vivo bioavailability study. *Int J Pharm*, 1999, 182, 1 – 5.

Beirowski J, Inghelbrecht S, Arien A, Gieseler H. Freeze-Drying of Nanosuspensions, 1: Freezing Rate Versus Formulation Design as Critical Factors to Preserve the Original Particle Size Distribution. *J Pharm Sci*, 2011, 100, 1958 – 1968.

Bhavna, Md S, Ali M, Ali R, Bhatnagar A, Baboota S, Ali J. Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: In vitro and in vivo safety evaluation. *Int J Biol Macromol*, 2014, 67, 418 – 425.

Bodzen A, Jossier A, Dupont S, Mousset PY, Beney L, Lafay S, Gervais P. Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried *Lactobacillus* strain survival to long-term storage. *BMC Biotechnol*, 2021, 21, 66.

Bosetti R, Jones SL. Cost-Effectiveness of Nanomedicine: Estimating the Real Size of Nano-Costs. *Nanomedicine*, 2019, 14, 1367 – 1370.

Brülls M, Rasmuson A. Heat transfer in vial lyophilization. *Int J Pharm*, 2002, 246, 1 – 16.

Cardinali DP, Golombek DA, Rosenstein RE, Cutrera RA, Esquifino AI. Melatonin site and mechanism of action: single or multiple? *J Pineal Res*, 1997, 23, 32 – 39.

Chacón M, Molpeceres J, Berges L, Guzmán M, Aberturas MR. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. *Eur J Pharm Sci*, 1999, 8, 99 – 107.

Chow SF, Wan KY, Cheng KK, Wong KW, Sun CC, Baum L, Chow AHL. Development of highly stabilized curcumin nanoparticles by flash nanoprecipitation and lyophilization. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 94, 436 – 449.

Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*, 2005, 9, 11 – 24.

Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, 2015, 61, 77 – 84.

Clogston JD, Patri AK. Zeta Potential Measurement. U: Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery, *Methods in Molecular Biology*. McNeil SE, urednik, Totowa, New Jersey, Humana Press, 2011, str. 63 – 70.

Corver J. The Evolution of Freeze-Drying. *Innovations Pharm Technol*, 2009, 66 – 70.

Costantino HR, Illum L, Brandt G, Johnson PH, Quay SC. Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm*, 2007, 337, 1 – 24.

Couriel B. Freeze Drying: Past, Present, and Future. *PDA J Pharm Sci Technol*, 1980, 34, 352 – 357.

Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari MR. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 2018, 10, 57.

De Chasteigner S, Cavé G, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F. Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: a feasibility study. *Drug Dev Res*, 1996, 38, 116 – 124.

De Giglio E, Bakowsky U, Engelhardt K, Caponio A, La Pietra M, Cometa S, Castellani S, Guerra L, Fracchiolla G, Poeta ML, Mallamaci R, Cardone RA, Bellucci S, Trapani A. Solid Lipid Nanoparticles Containing Dopamine and Grape Seed Extract: Freeze-Drying with Cryoprotection as a Formulation Strategy to Achieve Nasal Powders. *Molecules*, 2023, 28, 7706.

De Los Reyes M, Saenz L, Lapierre L, Crosby J, Barros C. Evaluation of glucose as a cryoprotectant for boar semen. *Vet Rec*, 2002, 151, 477 – 480.

De Oliveira ER Jr, Nascimento TL, Salomão MA, Da Silva ACG, Valadares MC, Lima EM. Increased Nose-to-Brain Delivery of Melatonin Mediated by Polycaprolactone Nanoparticles for the Treatment of Glioblastoma. *Pharm Res*, 2019, 36, 131.

Degobert G, Aydin D. Lyophilization of Nanocapsules: Instability Sources, Formulation and Process Parameters. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 1112.

DeMuro RL, Nafziger AN, Blask DE, Menhinick AM, Bertino JS Jr. The Absolute Bioavailability of Oral Melatonin. *J Clin Pharmacol*, 2000, 40, 781 – 784.

Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother*, 2006, 60, 97 – 108.

Elbrink K, Van Hees S, Holm R, Kiekens F. Optimization of the different phases of the freeze-drying process of solid lipid nanoparticles using experimental designs. *Int J Pharm*, 2023, 635, 122717.

Elmowafy M, Shalaby K, Al-Sanea MM, Hendawy OM, Salama A, Ibrahim MF, Ghoneim MM. Influence of Stabilizer on the Development of Luteolin Nanosuspension for Cutaneous Delivery: An In Vitro and In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 1812.

European Medicines Agency – Medicines, 1995., <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>, pristupljeno 31.07.2024.

Far J, Abdel-Haq M, Gruber M, Abu Ammar A. Developing Biodegradable Nanoparticles Loaded with Mometasone Furoate for Potential Nasal Drug Delivery. *ACS Omega*, 2020, 5, 7432 – 7439.

Farhadi N, Gharghani M, Farhadi Z. Effects of long-term light, darkness and oral administration of melatonin on serum levels of melatonin. *Biomed J*, 2016, 39, 81 – 84.

Follenius M, Weibel L, Brandenberger G. Distinct modes of melatonin secretion in normal men. *J Pineal Res*, 1995, 18, 135 – 140.

Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998, 45, 221 – 229.

Franzé S, Selmin F, Samaritani E, Minghetti P, Cilurzo F. Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging. *Pharmaceutics*, 2018, 10, 139.

Gandhi S, Shastri DH, Shah J, Nair AB, Jacob S. Nasal Delivery to the Brain: Harnessing Nanoparticles for Effective Drug Transport. *Pharmaceutics*, 2024, 16, 481.

Gao L, Zhang D, Chen M, Duan C, Dai W, Jia L, Zhao W. Studies on pharmacokinetics and tissue distribution of oridonin nanosuspensions. *Int J Pharm*, 2008, 355, 321 – 327.

Gao M, Shen X, Mao S. Factors influencing drug deposition in the nasal cavity upon delivery via nasal sprays. *J Pharm Investig*, 2020, 50, 251 – 259.

Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Couvreur P. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain?. *Int J Pharm*, 2005, 298, 274 – 292.

Gatto MS, Najahi-Missaoui W. Lyophilization of Nanoparticles, Does It Really Work? Overview of the Current Status and Challenges. *Int J Mol Sci*, 2023, 24, 14041.

Gaynes R. The Discovery of Penicillin – New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23, 849 – 853.

Geoffriau M, Claustrat B, Veldhuis J. Estimation of frequently sampled nocturnal melatonin production in humans by deconvolution analysis: Evidence for episodic or ultradian secretion. *J Pineal Res*, 1999, 27, 139 – 144.

George M, Ghosh I. Identifying the correlation between drug/stabilizer properties and critical quality attributes (CQAs) of nanosuspension formulation prepared by wet media milling technology. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 48, 142 – 152.

Ghaemmaghamian Z, Zarghami R, Walker G, O'Reilly E, Ziaee A. Stabilizing vaccines via drying: Quality by design considerations. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 187, 114313.

Ghosh I, Bose S, Vippagunta R, Harmon F. Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth. *Int J Pharm*, 2011, 409, 260 – 268.

Glassberg E, Nadler R, Gendler S, Abramovich A, Spinella PC, Gerhardt RT, Holcomb JB, Kreiss Y. Freeze-Dried Plasma at the Point of Injury: From Concept to Doctrine. *Shock*, 2013, 40, 444 – 450.

Gooley JJ, Chamberlain K, Smith KA, Khalsa SBS, Rajaratnam SMW, Van Reen E, Zeitzer JM, Czeisler CA, Lockley SW. Exposure to Room Light before Bedtime Suppresses Melatonin Onset and Shortens Melatonin Duration in Humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96, E463 – E472.

Granata G, Riccobene C, Napoli E, Geraci C. Polymeric Nanocapsules Containing Fennel Essential Oil: Their Preparation, Physicochemical Characterization, Stability over Time and in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 873.

Greaves RIN. Serum-plasma preservation: Historical review. *Cryobiology*, 1968, 5, 76 – 86.

Greco K, Mujat M, Galbally-Kinney KL, Hammer DX, Ferguson RD, Iftimia N, Mulhall P, Sharma P, Kessler WJ, Pikal MJ. Accurate Prediction of Collapse Temperature using Optical Coherence Tomography-Based Freeze-Drying Microscopy. *J Pharm Sci*, 2013, 102, 1773 – 1785.

Greiff D, Blumenthal H, Chiga M, Pinkerton H. The effects on biological materials of freezing and drying by vacuum sublimation. II. Effect on influenza virus. *J Exp Med*, 1954a, 100, 89 – 101.

Greiff D, Pinkerton H. The effects on biological materials of freezing and drying by vacuum sublimation. I. Development and testing of apparatus. *J Exp Med*, 1954b, 100, 81 – 88.

Grembecka M. Sugar alcohols – their role in the modern world of sweeteners: a review. *Eur Food Res Technol*, 2015, 241, 1 – 14.

Hafner A, Dürriegl M, Pepić I, Filipović-Grčić J. Short- and Long-Term Stability of Lyophilised Melatonin-Loaded Lecithin/Chitosan Nanoparticles. *Chem Pharm Bull*, 2011, 59, 1117 – 1123.

Hafner A, Škrinjar D, Filipović-Grčić J. Mogućnosti nazalne primjene lijekova. *Farm Glas*, 2014, 70, 303 – 321.

HALMED – Lijekovi/Baza lijekova, 2007., <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/> pristupljeno 01.08.2024.

Han J, Xiao B, Le PK, Mangwandi C. Enhancement of the Solubility of BS Class II Drugs with MOF and MOF/GO Composite Materials: Case Studies of Felodipine, Ketoprofen and Ibuprofen. *Materials*, 2023, 16, 1554.

Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin – A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol*, 2011, 93, 350 – 384.

Harpsøe NG, Andersen LPH, Gögenur I, Rosenberg J. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol*, 2015, 71, 901 – 909.

Harris DL, Shackell LF. The Effect of Vacuum Desiccation on the Virus of Rabies, with Remarks on a New Method. *Am J Public Health*, 1911, 1, 52 – 53.

Higgins JP, Arrivo SM, Thurau G, Green RL, Bowen W, Lange A, Templeton AC, Thomas DL, Reed RA. Spectroscopic Approach for On-Line Monitoring of Particle Size during the Processing of Pharmaceutical Nanoparticles. *Anal Chem*, 2003, 75, 1777 – 1785.

Hillgren A, Lindgren J, Aldén M. Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH. *Int J Pharm*, 2002, 237, 57 – 69.

Horn J, Friess W. Detection of Collapse and Crystallization of Saccharide, Protein, and Mannitol Formulations by Optical Fibers in Lyophilization. *Front Chem*, 2018, 6, 4.

Hua ZZ, Li BG, Liu ZJ, Sun DW. Freeze-Drying of Liposomes with Cryoprotectants and Its Effect on Retention Rate of Encapsulated Ftorafur and Vitamin A. *Dry Technol*, 2003, 21, 1491 – 1505.

Huang SL, Hamilton AJ, Nagaraj A, Tiukinhoy SD, Klegerman ME, Mcpherson DD, Macdonald RC. Improving ultrasound reflectivity and stability of echogenic liposomal dispersions for use as targeted ultrasound contrast agents. *J Pharm Sci*, 2001, 90, 1917 – 1926.

Illum L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56, 3 – 17.

Illum L. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions. *J Control Release* (Proceeding of the Seventh European Symposium on Controlled Drug Delivery), 2003, 87, 187 – 198.

Islam SU, Shehzad A, Ahmed MB, Lee YS. Intranasal Delivery of Nanoformulations: A Potential Way of Treatment for Neurological Disorders. *Molecules*, 2020, 25, 1929.

Jacob S, Nair AB, Shah J. Emerging role of nanosuspensions in drug delivery systems. *Biomater Res*, 2020, 24, 3.

Jacobs C, Müller RH. Production and Characterization of a Budesonide Nanosuspension for Pulmonary Administration. *Pharm Res*, 2002, 19, 189 – 194.

Jakubowska E, Bielejewski M, Milanowski B, Lulek J. Freeze-drying of drug nanosuspension – study of formulation and processing factors for the optimization and characterization of redispersible cilostazol nanocrystals. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 74, 103528.

Jameel F, Alexeenko A, Bhambhani A, Sacha G, Zhu T, Tchessalov S, Kumar L, Sharma P, Moussa E, Iyer L, Fang R, Srinivasan J, Tharp T, Azzarella J, Kazarin P, Jalal M. Recommended Best Practices for Lyophilization Validation-2021 Part I: Process Design and Modeling. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 22, 221.

Jans H, Liu X, Austin L, Maes G, Huo Q. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies. *Anal Chem*, 2009, 81, 9425 – 9432.

Jennings TA. Lyophilization: Introduction and Basic Principles. Boca Raton, CRC Press, 2013. (prvo izdanje 31. 08. 1999.)

Keck CM. Particle size analysis of nanocrystals: Improved analysis method. *Int J Pharm (Pharmaceutical Nanoparticles)*, 2010, 390, 3 – 12.

Kim AI, Akers MJ, Nail SL. The Physical State of Mannitol after Freeze-Drying: Effects of Mannitol Concentration, Freezing Rate, and a Noncrystallizing Cosolute. *J Pharm Sci*, 1998, 87, 931 – 935.

Klein DC, Weller JL. Indole Metabolism in the Pineal Gland: A Circadian Rhythm in *N*-Acetyl-Transferase. *Science*, 1970, 169, 1093 – 1095.

Konan YN, Gurny R, Allémann E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *Int J Pharm*, 2002, 233, 239 – 252.

Koo J, Lim C, Oh KT. Recent Advances in Intranasal Administration for Brain-Targeting Delivery: A Comprehensive Review of Lipid-Based Nanoparticles and Stimuli-Responsive Gel Formulations. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19, 1767 – 1807.

Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47, 65 – 81.

Kumar KN, Mallik S, Sarkar K. Role of freeze-drying in the presence of mannitol on the echogenicity of echogenic liposomes. *J Acoust Soc Am*, 2017, 142, 3670 – 3676.

Lakshmi P, Kumar GA. Nanosuspension technology: A review. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2010, 2, 35 – 40.

Lale SV, Goyal M, Bansal AK. Development of lyophilization cycle and effect of excipients on the stability of catalase during lyophilization. *Int J Pharm Investig*, 2011, 1, 214 – 221.

Lane EA, Moss HB. Pharmacokinetics of Melatonin in Man: First Pass Hepatic Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985, 61, 1214 – 1216.

Langner PH Jr, Kern RA. Studies on the immunology of hay fever: A. Confirmation of blocking substance formation by pollen treatment B. Use of lyophile serum in study and treatment. *J Allergy*, 1938, 10, 1 – 14.

Lee E, Baiz CR. How cryoprotectants work: hydrogen-bonding in low-temperature vitrified solutions. *Chem Sci*, 2022, 13, 9980 – 9984.

Lee J, Cheng Y. Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions. *J Control Release*, 2006, 111, 185 – 192.

Lee JG, Woo YS, Park SW, Seog DH, Seo MK, Bahk WM. The Neuroprotective Effects of Melatonin: Possible Role in the Pathophysiology of Neuropsychiatric Disease. *Brain Sci*, 2019, 9, 285.

Lemoine P, Garfinkel D, Laudon M, Nir T, Zisapel N. Prolonged-release melatonin for insomnia – an open-label long-term study of efficacy, safety, and withdrawal. *Ther Clin Risk Manag*, 2011, 7, 301 – 311.

Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA, Markey SP. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science*, 1980, 210, 1267 – 1269.

Li J, Wang Z, Zhang H, Gao J, Zheng A. Progress in the development of stabilization strategies for nanocrystal preparations. *Drug Deliv*, 2021, 28, 19 – 36.

Li Q, Chen F, Liu Y, Yu S, Gai X, Ye M, Yang X, Pan W. A novel albumin wrapped nanosuspension of meloxicam to improve inflammation-targeting effects. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13, 4711 – 4725.

Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2016, 56, 361 – 383.

Liu P, Rong X, Laru J, van Veen B, Kiesvaara J, Hirvonen J, Laaksonen T, Peltonen L. Nanosuspensions of poorly soluble drugs: preparation and development by wet milling. *Int J Pharm*, 2011, 411, 215 – 222.

Lofts A, Abu-Hijleh F, Rigg N, Mishra RK, Hoare T. Using the Intranasal Route to Administer Drugs to Treat Neurological and Psychiatric Illnesses: Rationale, Successes, and Future Needs. *CNS Drugs*, 2022, 36, 739 – 770.

Lombardo R, Ruponen M, Rautio J, Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L, Calosi L, Bani D, Lampinen R, Kanninen KM, Koivisto AM, Penttilä E, Löppönen H, Pignatello R. Development of Lyophilised Eudragit® Retard Nanoparticles for the Sustained Release of Clozapine via Intranasal Administration. *Pharmaceutics*, 2023, 15, 1554.

Ma MA, Morrison EH. Neuroanatomy, Nucleus Suprachiasmatic. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island, StatPearls Publishing, 2023.

Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*, 2004, 25, 177 – 195.

Maji D, Maity NC, Biswas R. Structure and dynamics of a glucose-based cryoprotectant mixture: a computer simulation study. *Theor Chem Acc*, 2023, 142, 43.

Makino K, Ohshima H. Electrophoretic Mobility of a Colloidal Particle with Constant Surface Charge Density. *Langmuir*, 2010, 26, 18016 – 18019.

Malamatari M, Taylor KMG, Malamataris S, Douroumis D, Kachrimanis K. Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications. *Drug Discov Today*, 2018, 23, 534 – 547.

Malm AV, Corbett JCW. Improved Dynamic Light Scattering using an adaptive and statistically driven time resolved treatment of correlation data. *Sci Rep*, 2019, 9, 13519.

Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JAW. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*, 2015, 71, 181 – 197.

Merisko-Liversidge E, Liversidge GG. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63, 427 – 440.

Mirza-Aghazadeh-Attari M, Mihanfar A, Yousefi B, Majidinia M. Nanotechnology-based advances in the efficient delivery of melatonin. *Cancer Cell Int*, 2022, 22, 43.

Mishra PR, Shaal LA, Müller RH, Keck CM. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *Int J Pharm*, 2009, 371, 182 – 189.

Müller RH, Peters K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique. *Int J Pharm*, 1998, 160, 229 – 237.

Musumeci T, Bucolo C, Carbone C, Pignatello R, Drago F, Puglisi G. Polymeric nanoparticles augment the ocular hypotensive effect of melatonin in rabbits. *Int J Pharm*, 2013, 440, 135 – 140.

Nance E, Pun SH, Saigal R, Sellers DL. Drug delivery to the central nervous system. *Nat Rev Mater*, 2022, 7, 314 – 331.

Németh Z, Csóka I, Semnani Jazani R, Sipos B, Haspel H, Kozma G, Kónya Z, Dobó DG. Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 1798.

Neupane YR, Huang C, Wang X, Chng WH, Venkatesan G, Zharkova O, Wacker MG, Czarny B, Storm G, Wang JW, Pastorin G. Lyophilization Preserves the Intrinsic Cardioprotective Activity of Bioinspired Cell-Derived Nanovesicles. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 1052.

Nikolaev G, Robeva R, Konakchieva R. Membrane Melatonin Receptors Activated Cell Signaling in Physiology and Disease. *Int J Mol Sci*, 2021, 23, 471.

Niwa T, Miura S, Danjo K. Universal wet-milling technique to prepare oral nanosuspension focused on discovery and preclinical animal studies – Development of particle design method. *Int J Pharm*, 2011, 405, 218 – 227.

Nižić Nodilo L, Perkušić M, Ugrina I, Špoljarić D, Jakobušić Brala C, Amidžić Klarić D, Lovrić J, Saršon V, Safundžić Kučuk M, Zadravec D, Kalogjera L, Pepić I, Hafner A. In situ gelling nanosuspension as an advanced platform for fluticasone propionate nasal delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2022, 175, 27 – 42.

Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Amidžić Klarić D, Jakobušić Brala C, Perkušić M, Pepić I, Lovrić J, Saršon V, Safundžić Kučuk M, Zadravec D, Kalogjera L, Hafner A. A Dry Powder Platform for Nose-to-Brain Delivery of Dexamethasone: Formulation Development and Nasal Deposition Studies. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 795.

Palmkron SB, Gustavsson L, Wahlgren M, Bergensthål B, Fureby AM. Temperature and Heat Transfer Control During Freeze Drying. Effect of Vial Holders and Influence of Pressure. *Pharm Res*, 2022, 39, 2597 – 2606.

Pardeshi SR, Deshmukh NS, Telange DR, Nangare SN, Sonar YY, Lakade SH, Harde MT, Pardeshi CV, Gholap A, Deshmukh PK, More MP. Process development and quality attributes for the freeze-drying process in pharmaceuticals, biopharmaceuticals and nanomedicine delivery: a state-of-the-art review. *Futur J Pharm Sci*, 2023, 9, 99.

Paresishvili T, Kakabadze Z. Freeze-Dried Mesenchymal Stem Cells: From Bench to Bedside. Review. *Adv Biol*, 2024, 8, 2300155.

Patel VR, Agrawal YK. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *J Adv Pharm Technol Res*, 2011, 2, 81 – 87.

Patravale VB, Date AA, Kulkarni RM. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56, 827 – 840.

Peltonen L, Hirvonen J. Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62, 1569 – 1579.

Pikal MJ, Roy ML, Shah S. Mass and Heat Transfer in Vial Freeze-Drying of Pharmaceuticals: Role of the Vial. *J Pharm Sci*, 1984, 73, 1224 – 1237.

Pikal MJ, Shah S, Senior D, Lang JE. Physical Chemistry of Freeze-drying: Measurement of Sublimation Rates for Frozen Aqueous Solutions by a Microbalance Technique. *J Pharm Sci*, 1983, 72, 635 – 650.

Pınar SG, Canpınar H, Tan Ç, Çelebi N. A new nanosuspension prepared with wet milling method for oral delivery of highly variable drug Cyclosporine A: development, optimization and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Sci*, 2022, 171, 106123.

Pınar SG, Oktay AN, Karaküçük AE, Çelebi N. Formulation Strategies of Nanosuspensions for Various Administration Routes. *Pharmaceutics*, 2023, 15, 1520.

Pregled registra – Registar dodataka prehrani i hrane za posebne prehrambene potrebe, 2015., https://sissijavneusluge.dirh.hr/SISSI_JavneForme/PregledRegistra.aspx, pristupljeno 05.07.2024.

Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*, 2016, 61, 253 – 278.

Rey L. New ventures in freeze drying. *Nature*, 1990, 345, 185 – 186.

Sakellaropoulou A, Siamidi A, Vlachou M. Melatonin/Cyclodextrin Inclusion Complexes: A Review. *Molecules*, 2022, 27, 445.

Sattar A, Chen D, Jiang L, Pan Y, Tao Y, Huang L, Liu Z, Xie S, Yuan Z. Preparation, characterization and pharmacokinetics of cyadox nanosuspension. *Sci Rep*, 2017, 7, 2289.

Schaffazick SR, Siqueira IR, Badejo AS, Jornada DS, Pohlmann AR, Netto CA, Guterres SS. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 69, 64 – 71.

Shackell LF. An improved method of desiccation, with some applications to biological problems. *Am J Physiol*, 1909, 24, 325 – 340.

Shan X, Gong X, Li J, Wen J, Li Y, Zhang Z. Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12, 3028 – 3048.

Singh AK. Chapter 4 – Experimental Methodologies for the Characterization of Nanoparticles. U: Engineered Nanoparticles – Structure, Properties and Mechanisms of Toxicity. Singh AK, urednik, Cambridge, Academic Press, 2016, str. 125 – 170.

Singh SK, Srinivasan KK, Gowthamarajan K, Singare DS, Prakash D, Gaikwad NB. Investigation of preparation parameters of nanosuspension by top-down media milling to improve the dissolution of poorly water-soluble glyburide. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 78, 441 – 446.

Song Y, Wang Y, Thakur R, Meidan VM, Michniak B. Mucosal drug delivery: membranes, methodologies, and applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2004, 21, 195 – 256.

Sonvico F, Clementino A, Buttini F, Colombo G, Pescina S, Stanisçuaski Guterres S, Raffin Pohlmann A, Nicoli S. Surface-Modified Nanocarriers for Nose-to-Brain Delivery: From Bioadhesion to Targeting. *Pharmaceutics*, 2018, 10, 34.

Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*, 2016, 8, 409 – 427.

Sun W, Xie C, Wang H, Hu Y. Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. *Biomaterials*, 2004, 25, 3065 – 3071.

Tanaka H, Ochii Y, Moroto Y, Hirata D, Ibaraki T, Ogawara K. Nanocrystal Preparation of Poorly Water-Soluble Drugs with Low Metal Contamination Using Optimized Bead-Milling Technology. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 2633.

Tang X, Pikal MJ. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharm Res*, 2004, 21, 191 – 200.

Taniguchi N. On the Basic Concept of 'Nano-Technology'. Proceedings of the International Conference on Production Engineering Part II, Tokyo, 1974, 18 – 23.

Taylor LS, Zografi G. Sugar – polymer hydrogen bond interactions in lyophilized amorphous mixtures. *J Pharm Sci*, 1998, 87, 1615 – 1621.

Tchessalov S, Dixon D, Warne N. Principles of lyophilization cycle scale-up. *Am Pharm Rev*, 2007, 10, 88 – 92.

Thakral S, Sonje J, Munjal B, Bhatnagar B, Suryanarayanan R. Mannitol as an Excipient for Lyophilized Injectable Formulations. *J Pharm Sci*, 2023, 112, 19 – 35.

- Trenkenschuh E, Friess W. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. *Eur J Pharm Biopharm*, 2021, 165, 345 – 360.
- Tsinontides SC, Rajniak P, Pham D, Hunke WA, Placek J, Reynolds SD. Freeze drying – principles and practice for successful scale-up to manufacturing. *Int J Pharm*, 2004, 280, 1 – 16.
- Tus VR. Razvoj in situ gelirajuće nanosuspenzije melatonina za nazalnu primjenu. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2023.
- Van Eerdenbrugh B, Van Den Mooter G, Augustijns P. Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *Int J Pharm*, 2008, 364, 64 – 75.
- Varshney D, Singh M. History of Lyophilization. U: *Lyophilized Biologics and Vaccines*. Varshney D, Singh M, urednici, New York, Springer, 2015, str. 3 – 10.
- Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell*, 2016, 166, 555 – 566.
- Walmagh M, Zhao R, Desmet T. Trehalose Analogues: Latest Insights in Properties and Biocatalytic Production. *Int J Mol Sci*, 2015, 16, 13729 – 13745.
- Wang Y, Zheng Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J Control Release*, 2013, 172, 1126 – 1141.
- Weng L, Stott SL, Toner M. Exploring Dynamics and Structure of Biomolecules, Cryoprotectants, and Water Using Molecular Dynamics Simulations: Implications for Biostabilization and Biopreservation. *Annu Rev Biomed Eng*, 2019, 21, 1 – 31.
- Wishard A, Gibb BC. Dynamic Light Scattering – an all-purpose guide for the supramolecular chemist. *Supramol Chem*, 2019, 31, 608 – 615.
- Wlodarczyk SR, Custódio D, Pessoa A Jr, Monteiro G. Influence and effect of osmolytes in biopharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 131, 92 – 98.
- Wu D, Chen Q, Chen X, Han F, Chen Z, Wang Y. The blood-brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8, 217.
- Xiang J, Hey JM, Liedtke V, Wang DQ. Investigation of freeze-drying sublimation rates using a freeze-drying microbalance technique. *Int J Pharm*, 2004, 279, 95 – 105.
- Xie Z, Chen F, Li WA, Geng X, Li C, Meng X, Feng Y, Liu W, Yu F. A review of sleep disorders and melatonin. *Neurol Res*, 2017, 39, 559 – 565.

Yang JZ, Young AL, Chiang PC, Thurston A, Pretzer DK. Fluticasone and budesonide nanosuspensions for pulmonary delivery: Preparation, characterization, and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci*, 2008, 97, 4869 – 4878.

Yue PF, Li G, Dan JX, Wu ZF, Wang CH, Zhu WF, Yang M. Study on formability of solid nanosuspensions during solidification: II novel roles of freezing stress and cryoprotectant property. *Int J Pharm*, 2014, 475, 35 – 48.

Zetner D, Andersen LPH, Rosenberg J. Pharmacokinetics of Alternative Administration Routes of Melatonin: A Systematic Review. *Drug Res*, 2016, 66, 169 – 173.

Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther*, 2008a, 83, 761 – 769.

Zhang L, Liu L, Qian Y, Chen Y. The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM). *Eur J Pharm Biopharm*, 2008b, 69, 750 – 759.

Zhang S, Wang C. Effect of stirring speed on particle dispersion in silica synthesis. *Nano-Struct Nano-Objects*, 2023, 35, 100994.

Zhao S, Wang Z, Wang X, Kong B, Liu Q, Xia X, Liu H. Characterization of Nanoemulsions Stabilized with Different Emulsifiers and Their Encapsulation Efficiency for Oregano Essential Oil: Tween 80, Soybean Protein Isolate, Tea Saponin, and Soy Lecithin. *Foods*, 2023a, 12, 3183.

Zhao Y, Wang Z, Liu S, Xie S, Xie Y, Li R, Oda H. Lyoprotectant Formulation and Optimization of the J-Aggregates Astaxanthin/BSA/Chitosan Nanosuspension. *Biomolecules*, 2023b, 13, 496.

Zhao Y, Zhao S, Ma Z, Ding C, Chen J, Li J. Chitosan-Based Scaffolds for Facilitated Endogenous Bone Re-Generation. *Pharmaceuticals*, 2022, 15, 1023.

Zingale E, Bonaccorso A, D'Amico AG, Lombardo R, D'Agata V, Rautio J, Pignatello R. Formulating Resveratrol and Melatonin Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) for Ocular Administration Using Design of Experiments. *Pharmaceutics*, 2024, 16, 125.

Zisapel N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *Br J Pharmacol*, 2018, 175, 3190 – 3199.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Melatonin je hormon lipofilnog karaktera i ograničene topljivosti u vodi koji u ljudskom organizmu fiziološki sintetizira epifiza. Ostvaruje pleiotropni učinak na glavne fiziološke funkcije, stanični ciklus i biokemijske mehanizme s cirkadijanim obilježjima. Terapijska primjena se primarno odnosi na poremećaje spavanja poput nesanice. Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj inovativnih farmaceutskih oblika melatonina. Izrada nanosuspenzija predstavlja jednu od strategija oblikovanja slabo topljivih lijekova s ciljem povećanja topljivosti, brzine otapanja i bioraspoloživosti. Međutim, glavno ograničenje je dugoročna nestabilnost nanosuspenzija i sklonost čestica agregaciji. Sušenje smrzavanjem, odnosno liofilizacija, pokazalo se kao jedna od metoda razvoja čvrstih oblika nanosuspenzija povećane fizičke stabilnosti.

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost liofilizacije nanosuspenzije melatonina u svrhu razvoja suhog oblika koristeći glukozu, manitol i trehalozu (0,5 – 2,5 %, *m/V*) kao krioprotektore, te ispitati njihov utjecaj na kratkoročnu i dugoročnu stabilnost razvijenih liofilizata mjereći veličinu, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal nanokristala u rekonstituiranim suspenzijama. Nanosuspenzija melatonina (0,143 %, *m/V*) pripravljena je metodom vlažnog mljevenja uz dodatak polisorbata 80 (0,286 %, *m/V*) kao površinski aktivne tvari, u masenom omjeru 1:2. Veličina čestica ishodne nanosuspenzije iznosila je $176,4 \pm 3,3$ nm uz indeks polidisperznosti od $0,141 \pm 0,013$. Liofilizacija nanosuspenzije melatonina uz dodatak manitola rezultirala je liofilizatom volumena jednakog volumenu suspenzije prije liofilizacije. U slučaju trehaloze uočen je djelomični kolaps, a u slučaju glukoze potpuni kolaps strukture liofilizata. Manitol i trehaloza su pri koncentracijama od 0,5 do 2,5 % (*m/V*) osigurali zadovoljavajuće očuvanje fizičkih svojstava nanokristala melatonina nakon liofilizacije, za razliku od glukoze. Porastom koncentracije manitola i trehaloze u liofiliziranoj nanosuspenziji djelomično se povećala uspješnost očuvanja veličine i raspodjele veličina nanokristala. Tijekom skladištenja pri 4 °C u razdoblju od 60 dana, uz manitol i trehalozu (2,5 %, *m/V*) kao krioprotektore, uspješno su sačuvani izgled liofilizata i fizička svojstva nanokristala nakon rekonstitucije, čime je potvrđen njihov krioprotektivni učinak u procesu liofilizacije nanosuspenzije melatonina.

Melatonin is a lipophilic hormone with limited water solubility, which is physiologically synthesized in the human body by the pineal gland. It has a pleiotropic effect on the main physiological functions, the cell cycle, and biochemical mechanisms with circadian characteristics. Therapeutic use is primarily related to sleep disorders such as insomnia. Nowadays, research is focused on the development of innovative pharmaceutical forms of melatonin. The production of nanosuspensions represents one of the strategies for the formulation of poorly soluble drugs with the aim of increasing their solubility, dissolution rate and bioavailability. However, the main limitation is the long-term instability of nanosuspensions and the tendency of particles to aggregate. Freeze drying, i.e. lyophilisation, proved to be one of the methods of developing solid forms of nanosuspensions with increased physical stability.

The aim of this work was to examine the possibility of lyophilisation of melatonin nanosuspension for the purpose of developing a dry form using glucose, mannitol and trehalose (0.5-2.5%, w/v) as cryoprotectants, and to examine their influence on the short-term and long-term stability of the developed lyophilisates by measuring size, polydispersity index and zeta-potential of nanocrystals in reconstituted suspensions. Nanosuspension of melatonin (0.143%, w/v) was prepared by the method of wet milling with the addition of polysorbate 80 (0.286%, w/v) as a surfactant, in a weight ratio of 1:2. The particle size within the initial nanosuspension was 176.4 ± 3.3 nm with a polydispersity index of 0.141 ± 0.013 . Lyophilisation of the melatonin nanosuspension in the presence of mannitol resulted in a lyophilisate volume equal to the volume of the suspension before lyophilisation. In the case of trehalose, a partial collapse was observed, and in the case of glucose, a complete collapse of the structure of the lyophilisate was observed. Mannitol and trehalose at concentrations from 0.5 to 2.5 % (w/v) ensured satisfactory preservation of the physical properties of melatonin nanocrystals after lyophilisation, in contrast to glucose. Increasing the concentration of mannitol and trehalose in the lyophilised nanosuspension partially increased the success of preserving the size and size distribution of nanocrystals. During storage at 4 °C for a period of 60 days, with mannitol and trehalose (2.5 %, w/v) as cryoprotectants, the appearance of the lyophilisate and the physical properties of the nanocrystals after reconstitution were successfully preserved, thus confirming their cryoprotective effect in the process of lyophilisation of melatonin nanosuspensions.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

LIOFILIZACIJA NANOSUSPENZIJE MELATONINA UZ DODATAK KRIOPROTEKTORA

Tin Rogina

SAŽETAK

Melatonin je hormon lipofilnog karaktera i ograničene topljivosti u vodi koji u ljudskom organizmu fiziološki sintetizira epifiza. Ostvaruje pleiotropni učinak na glavne fiziološke funkcije, stanični ciklus i biokemijske mehanizme s cirkadijanim obilježjima. Terapijska primjena se primarno odnosi na poremećaje spavanja poput nesanice. Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj inovativnih farmaceutskih oblika melatonina. Izrada nanosuspenzija predstavlja jednu od strategija oblikovanja slabo topljivih lijekova s ciljem povećanja topljivosti, brzine otapanja i bioraspodjelivosti. Međutim, glavno ograničenje je dugoročna nestabilnost nanosuspenzija i sklonost čestica agregaciji. Sušenje smrzanjem, odnosno liofilizacija, pokazalo se kao jedna od metoda razvoja čvrstih oblika nanosuspenzija povećane fizičke stabilnosti. Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost liofilizacije nanosuspenzije melatonina u svrhu razvoja suhog oblika koristeći glukozu, manitol i trehalozu (0,5 – 2,5 %, *m/V*) kao krioprotektore, te ispitati njihov utjecaj na kratkoročnu i dugoročnu stabilnost razvijenih liofilizata mjereći veličinu, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal nanokristala u rekonstituiranim suspenzijama. Nanosuspenzija melatonina (0,143 %, *m/V*) pripravljena je metodom vlažnog mljevenja uz dodatak polisorbata 80 (0,286 %, *m/V*) kao površinski aktivne tvari, u masenom omjeru 1:2. Veličina čestica ishodne nanosuspenzije iznosila je $176,4 \pm 3,3$ nm uz indeks polidisperznosti od $0,141 \pm 0,013$. Liofilizacija nanosuspenzije melatonina uz dodatak manitola rezultirala je liofilizatom volumena jednakog volumenu suspenzije prije liofilizacije. U slučaju trehaloze uočen je djelomični kolaps, a u slučaju glukoze potpuni kolaps strukture liofilizata. Manitol i trehaloza su pri koncentracijama od 0,5 do 2,5 % (*m/V*) osigurali zadovoljavajuće očuvanje fizičkih svojstava nanokristala melatonina nakon liofilizacije, za razliku od glukoze. Porastom koncentracije manitola i trehaloze u liofiliziranoj nanosuspenziji djelomično se povećala uspješnost očuvanja veličine i raspodjele veličina nanokristala. Tijekom skladištenja pri 4 °C u razdoblju od 60 dana, uz manitol i trehalozu (2,5 %, *m/V*) kao krioprotektore, uspješno su sačuvani izgled liofilizata i fizička svojstva nanokristala nakon rekonstitucije, čime je potvrđen njihov krioprotektivni učinak u procesu liofilizacije nanosuspenzije melatonina.

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

Rad sadrži: 61 stranica, 16 grafičkih prikaza, 5 tablica i 180 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: melatonin; nanosuspenzije; liofilizacija; krioprotektor; glukoza; manitol; trehaloza

Mentor: **Dr. sc. Anita Hafner**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Laura Nižić Nodilo, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2024.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

FREEZE-DRYING OF MELATONIN NANOSUSPENSION IN THE PRESENCE OF A CRYOPROTECTANT

Tin Rogina

SUMMARY

Melatonin is a lipophilic hormone with limited water solubility, which is physiologically synthesized in the human body by the pineal gland. It has a pleiotropic effect on the main physiological functions, the cell cycle, and biochemical mechanisms with circadian characteristics. Therapeutic use is primarily related to sleep disorders such as insomnia. Nowadays, research is focused on the development of innovative pharmaceutical forms of melatonin. The production of nanosuspensions represents one of the strategies for the formulation of poorly soluble drugs with the aim of increasing their solubility, dissolution rate and bioavailability. However, the main limitation is the long-term instability of nanosuspensions and the tendency of particles to aggregate. Freeze drying, i.e. lyophilisation, proved to be one of the methods of developing solid forms of nanosuspensions with increased physical stability. The aim of this work was to examine the possibility of lyophilisation of melatonin nanosuspension for the purpose of developing a dry form using glucose, mannitol and trehalose (0.5-2.5%, w/v) as cryoprotectants, and to examine their influence on the short-term and long-term stability of the developed lyophilisates by measuring size, polydispersity index and zeta-potential of nanocrystals in reconstituted suspensions. Nanosuspension of melatonin (0.143%, w/v) was prepared by the method of wet milling with the addition of polysorbate 80 (0.286%, w/v) as a surfactant, in a weight ratio of 1:2. The particle size within the initial nanosuspension was 176.4 ± 3.3 nm with a polydispersity index of 0.141 ± 0.013 . Lyophilisation of the melatonin nanosuspension in the presence of mannitol resulted in a lyophilisate volume equal to the volume of the suspension before lyophilisation. In the case of trehalose, a partial collapse was observed, and in the case of glucose, a complete collapse of the structure of the lyophilisate was observed. Mannitol and trehalose at concentrations from 0.5 to 2.5 % (w/v) ensured satisfactory preservation of the physical properties of melatonin nanocrystals after lyophilisation, in contrast to glucose. Increasing the concentration of mannitol and trehalose in the lyophilised nanosuspension partially increased the success of preserving the size and size distribution of nanocrystals. During storage at 4 °C for a period of 60 days, with mannitol and trehalose (2.5 %, w/v) as cryoprotectants, the appearance of the lyophilisate and the physical properties of the nanocrystals after reconstitution were successfully preserved, thus confirming their cryoprotective effect in the process of lyophilisation of melatonin nanosuspensions.

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

Thesis includes: 61 pages, 16 figures, 5 tables and 180 references. Original is in Croatian language.

Keywords: melatonin; nanosuspensions; lyophilisation; cryoprotectant; glucose; mannitol; trehalose

Mentor: **Anita Hafner, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Hafner, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

The thesis was accepted: August 2024