

Usporedba učinka fizičkih smjesa i lecitinsko-kitozanskih nanočestica s uklopljenim melatoninom na cijeljenje rane in vitro

Matičević, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:671608>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Marija Matičević

**Usporedba učinka fizičkih smjesa i
lecitinsko-kitozanskih nanočestica s uklopljenim
melatoninom na cijeljenje rane *in vitro***

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutika 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Anite Hafner.

Neizmjerno se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na uloženom trudu, strpljenju, poticajima i savjetima koji su mi bili od neizmjerne važnosti pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem Marini Juretić, mag. pharm. i Biseri Jurišić, mag. pharm. te kolegama Filipu Blaževiću i Mateji Ljubičić na pruženoj pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela rada i ugodnom vremenu provedenom na Zavodu.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na strpljenju i bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog studiranja.

Hvala dragom Bogu koji mi je snaga i zaštita kroz cijeli život.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Građa i funkcija kože.....	1
1.1.1. Epidermis.....	2
1.1.2. Epidermokutana veza	3
1.1.3. Dermis	3
1.2. Cijeljenje rane.....	4
1.2.1. Hemostaza	4
1.2.2. Inflamacija (upala).....	5
1.2.3. Proliferacija	5
1.2.4. Maturacija (remodeliranje tkiva).....	6
1.3. Melatonin.....	8
1.3.1. Utjecaj melatonina na cijeljenje rane	9
1.4. Kitozan	10
1.4.1. Utjecaj kitozana na cijeljenje rane.....	11
1.5. Lecitin.....	12
1.6. Terapijski nanosustavi	13
1.6.1. Nanočestice u razvoju funkcionalnih obloga za rane	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE.....	18
3.1. Materijali	18
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Priprava nanočestica	20
3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka u nanočestice	20
3.2.3. Određivanje veličine nanočestica	21
3.2.4. Određivanje zeta-potencijala nanočestica	21
3.2.5. Stanična linija i uvjeti uzgoja	22

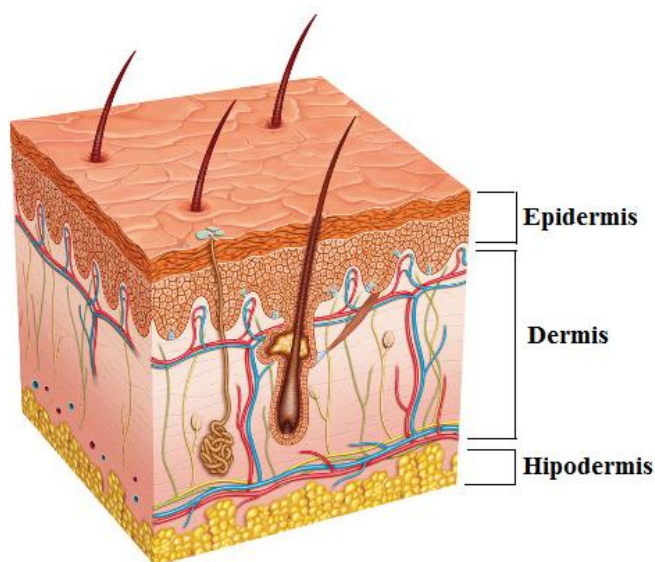
3.2.6. Praćenje dinamike prekrivanja praznina nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica – engl. <i>scratch test</i>	22
3.2.7. Statistička analiza	23
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	24
4.1. Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom.....	24
4.2. Karakterizacija nanočestica s melatoninom	25
4.3. Utjecaj uklopljenosti melatonina u nanočestice na proliferaciju i migraciju HaCaT stanica.....	26
5. ZAKLJUČCI	34
6. LITERATURA	35
7. SAŽETAK.....	40
7. SUMMARY.....	41
Temeljna dokumentacijska kartica.....	42
Basic documentation card	43

1. UVOD

1.1. Građa i funkcija kože

Koža je najveći organ ljudskog tijela te predstavlja otprilike desetinu tjelesne mase prosječnog čovjeka. Ona obavlja brojne funkcije, od kojih je najvažnija funkcija fizičke barijere odnosno sprječavanja gubitka vode, elektrolita i drugih sastojaka tijela te obrane organizma od fizičkih, kemijskih i mikrobioloških utjecaja.

Koža također sudjeluje u regulaciji tjelesne temperature (vazomotoričkim refleksom, sekrecijom znoja i loja te kožnim pigmentom) te sintetizira vitamin D. Vrlo važna sposobnost kože je izlučivanje tvari iz organizma odbacivanjem rožnatog sloja s kojim se odbacuju i tvari koje se nalaze u stanicama rožnatog sloja ili na površini kože. Osim toga izlučivanje se odvija i putem žlijezda znojnica i lojnica. Koža je medijator osjeta te svojim receptorima za dodir, bol, hladnoću, toplinu i pritisak daje organizmu informacije o okolini. Također sudjeluje u stvaranju imuniteta, a u to su uključene Langerhansove stanice (dendritičke stanice unutar bazalnog i spinoznog sloja epidermisa), T-limfociti, makrofagi i histociti (Čajkovac, 2000).



Slika 1: Građa kože (preuzeto iz: www.springwoman.hr)

Koža je građena od dva osnovna sloja: epidemis i dermis. Ispod dermisa se nalazi hipodermis (potkožno tkivo) koji se ne smatra dijelom kože (Slika 1). U kožu se ubrajaju i kožni adneksi kao što su folikuli dlaka, nokti, žlijezde lojnice i znojnice.

1.1.1. Epidermis

Epidermis je vanjski tanji sloj kože debljine oko 0,12 mm koji ne sadrži ni krvne ni limfne žile, a transport tvari odvija se difuzijom iz dermisa u epidermis i obratno. Sastavljen je od 4-5 slojeva: rožnati sloj (*stratum corneum*), svijetli sloj (*stratum lucidum*), zrnati sloj (*stratum granulosum*), trnasti sloj (*stratum spinosum*) i temeljni sloj (*stratum basale*).

Rožnati sloj (stratum corneum)

Rožnati sloj se sastoji od 10-30 slojeva spljoštenih mrtvih keratinocita bez jezgri kojima je citoplazma ispunjena vlaknastim skleroproteinom keratinom. Keratinociti su na površini nepovezani (*stratum corneum disjunctum*), a u nižim slojevima (*stratum corneum conjunctum*) su povezani cementnom tvari - lamelarnim lipidnim matriksom koji se sastoji od bipolarnih proteolipida, kolesterola i njegovih estera, masnih kiselina i ceramida. Zahvaljujući ovakvoj građi, rožnati sloj regulira gubitak vode iz organizma i istovremeno sprječava ulazak štetnih tvari i mikroorganizama putem kože.

Nepovezane rožnate stanice se kontinuirano ljušte i zamjenjuju novim stanicama iz dubljih slojeva što nazivamo deskvamacijom. Vrijeme potrebno da stanica iz bazalnog sloja dođe na površinu kože iznosi 28 dana (Čajkovac, 2000).

Svijetli sloj (stratum lucidum)

Svijetli sloj se sastoji od tri do pet slojeva spljoštenih mrtvih keratinocita, a prisutan je samo u debljim dijelovima kože izloženim trenju kao što su dlanovi i tabani.

Zrnati sloj (stratum granulosum)

Zrnati sloj se sastoji od jednog do tri sloja stanica s jezgrom smještenom u sredini i citoplazmom koja je ispunjena keratohijalinskim zncima. U stanicama zrnatog sloja nalaze se i karakteristična lamelarna zrnca koja sintetiziraju lipide te stapanjem sa staničnom membranom prazne svoj sadržaj u međustanične prostore zrnatog sloja (Jurić-Lekić, 1995).

Trnasti sloj (stratum spinosum)

Trnasti sloj se sastoji od tri do sedam redova poligonalnih stanica s jezgrama i trnastim nastavcima-tonofibrilima. Izdanci susjednih stanica su međusobno pričvršćeni dezmosomima i tako čine međustanične mostove, koji čvrsto povezuju stanice nazubljenog sloja.

Temeljni sloj (stratum basale)

Temeljni sloj se sastoji od jednog reda zametnih stanica koje se kontinuirano dijele. Nakon diobe, jedna od stanica ostaje u bazalnom sloju (besmrtna stanica), a druga migrira kroz epidermis do površine kože i podložna je diferencijaciji i keratinizaciji. Keratinociti bazalnog sloja su vezani hemidezmosomima za bazalnu membranu. Uz keratinocite, bazalni sloj sadrži i melanocite koji su odgovorni za sintezu melanina te u manjem broju Merkelove i Langerhansove stanice.

1.1.2. Epidermokatana veza

Epidermis je povezan s dermisom preko bazalne membrane (epidermokatane veze). Ona je nepravilnog valovitog oblika jer izdanci dermisa, koji se nazivaju papile, ulaze među izbočine epidermisa, koje se nazivaju epidermalni grebeni (Jurić-Lekić, 1995). To je vrlo složena struktura sastavljena od trilamelarnih membrana bazalnih keratinocita i kolagenih fibrila koje usidravaju epidermis u dermis. Epidermokatana veza sprječava prodor tvari u oba smjera te štiti kožu i organizam od gubitka vode i elektrolita. Opskrba krvlju ne prelazi epidermokatanu granicu i zato hranjive tvari iz cirkulacije difuzijom prelaze u epidermis.

1.1.3. Dermis

Dermis je građen od vezivnog tkiva koje podupire epidermis i povezuje ga s potkožnim tkivom. Vezivno tkivo izgrađuje dvije vrste vlakana: kolagena i elastična. Kolagena vlakna prave raznosmjerne tračke i mogu se dijagonalno razvlačiti, ali se ne mogu vratiti u prvotni položaj bez elastičnih vlakana. Osnovna masa dermisa se sastoji od spojeva velike molekulske mase kao što su glikozaminoglikani (hijaluronska kiselina i dermatan sulfat) koji su kovalentno vezani na proteine i tako izgrađuju proteoglikane. Strukturni proteini su kolagen i elastin, a adhezivni laminin (povezuje epitelne stanice s bazalnom membranom) i fibronektin (pričvršćuje fibroblaste). Unutar dermisa se nalaze krvne i limfne žile, živčani završeci, folikuli dlaka, žlijezde lojnice i znojnice (Čajkovac, 2000).

Dermis se sastoji od dva sloja koja nisu jasno razgraničena: papilarni (*stratum papillare*) i retikularni (*stratum reticulare*). Tanki papilarni sloj je građen od rahlog vezivnog tkiva, a tu se nalaze fibroblasti (koji sintetiziraju kolagen), limfociti i makrofagi. Osim vezivnog tkiva, taj sloj sadržava i krvne kapilare, završetke živaca i osjetilna tjelešca za dodir (Meissnerova tjelešca). Retikularni sloj je deblji i sastoji se od gustih snopova kolagena upletenih u mrežu elastičnih vlakana. Tu se još nalaze krvne i limfne žile, živci, receptori za

hladnoću (Krauseovi klipovi), žlijezde lojnice i mišić koji podiže dlaku (*m. arrector pili*) (Jurić-Lekić, 1995).

1.2. Cijeljenje rane

Rana se definira kao ozljeda koju obilježava prekid kontinuiteta kože ili sluznice, pri čemu može doći do djelomičnog ili potpunog oštećenja i na dubljim tkivima. Cijeljenje rane je kompleksan i dinamičan proces koji započinje odmah nakon stvaranja ozljede i sastoji se od četiri faze: hemostaze, inflamacije, proliferacije i maturacije (Slika 2).

1.2.1. Hemostaza

Hemostaza je proces kojim se zaustavlja krvarenje. Nakon ozljeđivanja pokreće se intrinzična i ekstrinzična koagulacijska kaskada koja je rezultat triju odvojenih procesa – kontrakcije krvnih žila, stvaranja trombocitnog čepa i koagulacije. Za pokretanje tih događaja potrebni su mnogi čimbenici kao što su faktor XII, faktor IX, von Willebrandov faktor i drugi.

Kontrakcija nastaje zbog živčanih refleksa, lokalnog miogenog spazma i lokalnih humoralnih čimbenika iz oštećenog tkiva i trombocita. Oštećene stanične membrane oslobađaju tromboksan A2 i prostaglandin 2-alfa. Oba su vrlo jaki vazokonstriktori koji skraćuju vrijeme krvarenja (Huljev, 2013).

Kada trombociti dođu u dodir s oštećenom površinom žile, oni postaju ljepljivi te prijanjaju za tkivni kolagen i von Willebrandov faktor. Usto, oni luče velike količine ADP-a, a njihovi enzimi tromboksan A2. ADP i tromboksan A2 aktiviraju susjedne trombocite i čine ih ljepljivima, te oni prijanjaju uz prethodno aktivirane trombocite što u konačnici vodi do stvaranja trombocitnog čepa. Ako je pukotina na žili malena, trombocitni čep može zaustaviti krvarenje, no ukoliko je veliki otvor mora se stvoriti i krvni ugrušak.

Proces zgrušavanja započinju aktivacijske tvari iz oštećene stijenke žile, iz trombocita te iz krvnih proteina koje prijanjaju uz oštećenu stijenku krvne žile. Ugrušak je sastavljen od fibrinskih niti koje se protežu u svim smjerovima i zadržavaju krvne stanice, trombocite i plazmu. Fibrinske niti prijanjaju i za oštećene površine krvnih žila i sprječavaju krvarenje (Guyton i Hall, 2003).

1.2.2. Inflamacija (upala)

Upala je tkivna reakcija na ozljedu čiji je cilj osloboditi organizam od početnog uzroka staničnog oštećenja (npr. mikroorganizama i toksina) i od posljedice takvog oštećenja: nekrotičnih stanica i tkiva (Kujundžić i sur., 2003).

Početnu kratkotrajnu vazokonstrikciju posredovanu simpatomimetičkim lokalnim učincima i dijelom tromboksanom A₂, brzo zamjenjuje vazodilatacija posredovana histaminom, prostaglandinima (PGE₂, PGF₂ i PGD₂), prostaciklinima i leukotrienima. Takva vazodilatacija uzrokuje povećanje protoka u upaljenom području što pridonosi većem dotoku kemotaktički pobuđenih stanica, kisika i supstrata (Gamulin i sur., 2005). Trombociti također luče faktore rasta kao što su: epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF), trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF), transformirajući čimbenik rasta-β (engl. *transforming growth factor-β*, TGF-β) i nekoliko citokina. Ove tvari dovode do jačeg djelovanja upalnih leukocita na mjestu ozljede (Kondo i Ishida, 2010).

U početnoj fazi upale, najdominantniji su neutrofil koji u kontaktu s upalotvornim noksama luče brojne citokine, interleukin-1 (IL-1) i faktor nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor*, TNF-α) te sudjeluju u uklanjanju bakterija i nekrotiziranog tkiva (Kos, 2008).

Makrofagi imaju veliku ulogu u ranom procesu cijeljenja rane. Oni fagocitiraju bakterije i ostatke oštećenog tkiva te oslobađaju razne proupalne citokine (IL-1 i IL-6) i faktore rasta: fibroblastni faktor rasta (engl. *fibroblast growth factor*, FGF), EGF, TGF-β i PDGF. Makrofagi također započinju razvoj granulacijskog tkiva te promoviraju angiogenezu (www.emedicine.medscape.com). Limfociti koje luče T-limfociti djeluju na endotelne stanice krvnih žila i upalne stanice koje imaju ulogu u promjenama propusnosti krvnih žila te angiogenezi.

1.2.3. Proliferacija

Faza proliferacije sastoji se od reepitelizacije, formiranja granulacijskog tkiva i neovaskularizacije.

Reepitelizacija

Oslobađanje EGF-a, TNF-α i FGF-a djeluje stimulatивно na migraciju i proliferaciju epitelnih stanica, što potiče reepitelizaciju. Epidermalne stanice se strukturno mijenjaju i odvajaju od ostalih epidermalnih stanica i bazalne membrane. Izlučuju kolagenazu koja

razgrađuje kolagen i aktivator plazminogena koji stvara plazmin. Plazmin promovira otapanje ugruška duž puta kojim keratinociti migriraju, a oni ulaze u interakciju sa fibrinom koji je poprečno vezan na fibronektin i kolagen. Nakon postizanja zatvorene rane, keratinociti se podvrgavaju stratifikaciji i diferencijaciji da vrate postojeću barijeru (Kondo i Ishida, 2010).

Formiranje granulacijskog tkiva

Formiranje granulacijskog tkiva započinje tri do pet dana nakon ozljede i može potrajati do čak 14 dana. FGF, TGF- β i PDGF uzrokuju infiltraciju fibroblasta koji su ključni u granulacijskom tkivu. Oni su odgovorni za produkciju kolagena, elastina, fibronektina, glikozaminoglikana i proteaza. Fibroblasti se, pod utjecajem TGF- β i PDGF-a, fenotipski pretvaraju u miofibroblaste koji se slažu uz granicu ekstracelularnog matriksa olakšavajući zatvaranje rane.

U ovoj fazi događa se i sinteza kolagena koji se izlučuje u ekstracelularni prostor u obliku prokolagena. Nakon uklanjanja terminalnih dijelova prokolagena peptidazom nastaje tropokolagen koji s drugim molekulama tropokolagena stvara kolagenske filamente. Stvaranje filamenata i vlakana događa se u matriksu koji se sastoji od glikozaminoglikana, hijaluronske kiseline, dermatan sulfata i heparin sulfata koje luče fibroblasti (www.emedicine.medscape.com).

Proizvodnja obilne međustanične tvari i slaganje miofibroblasta uz granicu ekstracelularnog matriksa izaziva fenomen stezanja odnosno kontrakciju rane koja je biološki važna budući da se takvim ponašanjem veziva postiže cijeljenje rane (Gamulin i sur., 2005).

Neovaskularizacija

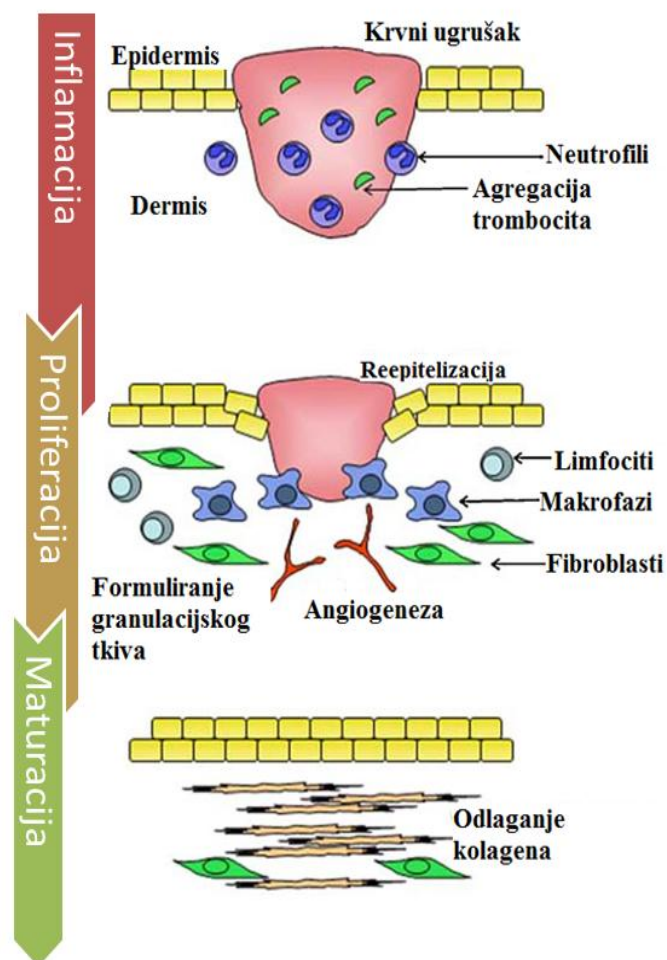
Makrofagi, ne samo da pojačavaju proces upale nego i luče vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i FGF te promiču angiogenezu. Neovaskularizacija je osnova za sintezu, odlaganje i organizaciju novog ekstracelularnog matriksa. Ona rezultira boljim protokom krvi prema ozljedi i većom perfuzijom faktora potrebnih za cijeljenje (Kondo i Ishida, 2010).

1.2.4. Maturacija (remodeliranje tkiva)

Remodeliranje tkiva označava uklanjanje granulacijskog tkiva uz revaskularizaciju. Granulacijsko tkivo zamjenjuje okosnica kolagenskih i elastičnih vlakana koja se zatim prožima sa proteoglikanima i glikoproteinima. Konačni produkt ovog procesa je ožiljkasto

tkivo. Remodeliranje kolagenom tijekom promjene od granulacijskog tkiva do ožiljka ovisi o kontinuiranoj sintezi i razgradnji kolagena. Tu se uspostavlja ravnoteža između kolagenaza i metaloproteinaza koje uklanjaju stari kolagen, i tkivnih inhibitora metaloproteinaza koji ograničavaju utjecaj kolagenolitičkih enzima.

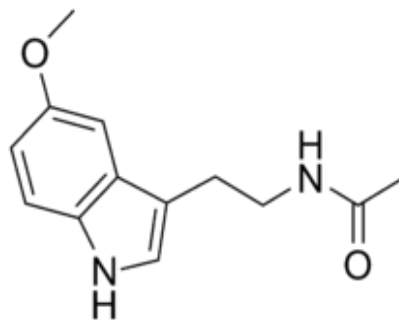
Zacjeljena rana može dosegnuti samo oko 80 % mehaničke otpornosti neranjene kože. Otprilike mjesec dana nakon stvaranja ožiljka uočava se pojava pigmenta. Periferna živčana vlakna uočavaju se dosta kasnije, a limfne žile nikada (Kos, 2008).



Slika 2: Faze inflamacije, proliferacije i maturacije u procesu cijeljenja rane (preuređeno prema Kondo i Ishida, 2010).

1.3. Melatonin

Melatonin (N-acetil-5-metoksitriptamin) je neurohormon koji je široko rasprostranjen u prirodi; nađen je u kralježnjaka, beskralježnjaka, biljaka, algi, jednostaničnih eukariota i bakterija. Luči ga pretežito epifiza (pinealna žlijezda), a može se sintetizirati i u leći, retini, koštanoj srži, probavnom sustavu i koži. Najveća sekrecija melatonina događa se noću oko 3-4 h ujutro, dok svjetlo blokira sekreciju melatonina te se njegova koncentracija tijekom dana smanjuje (Hardeland i sur., 2006).



Slika 3. Struktura melatonina

Melatonin se sintetizira iz triptofana koji se najprije prevodi u serotonin, a zatim djelovanjem enzima N-acetiltransferaze i hidroksiindol-O-metil transferaze nastaje melatonin (Slika 3). Kodiranje mRNA tih enzima ovisno je o ritmu izmjene dana i noći. Melatonin se metabolizira u jetri putem citokrom P450 monooksigenaza pri čemu nastaje 6-hidroksimelatonin koji nakon konjugacije prelazi u 6-sulfatoksimeatonin te se izlučuje urinom.

Primarna zadaća melatonina je prenijeti poruku o dnevnom ciklusu izmjene svjetla i tame strukturama u organizmu. On regulira cirkadijani ritam, promotor je spavanja, a također ima funkciju u reprodukciji, potrošnji energije i regulaciji tjelesne mase. Melatonin ima pleiotropne učinke kao neurotransmiter, hormon, citokin i modulator biološkog odgovora te je antioksidans širokog spektra. Smatra se da melatonin iskazuje svoj pleiotropni učinak uslijed dobre permeabilnosti kroz stanične membrane zahvaljujući maloj molekularnoj masi i amfifilnom karakteru. Melatonin iskazuje pleiotropne učinke preko svojih MT1 i MT2 receptora, a može imati učinak i neovisno o receptorima što uključuje zaštitu od oksidativnog oštećenja, antiapoptotičku i antimutagenu aktivnost (Slominski i sur., 2007).

Melatonin smanjuje oštećenja tkiva uzrokovana reaktivnim oblicima kisika i dušika djelujući kao hvatač slobodnih radikala, te stimulira antioksidativne enzime kao što su

superoksid dismutaza, katalaza i glutation reduktaza (Radogna i sur., 2010). Smatra se da povećava efikasnost mitohondrijske oksidativne fosforilacije, time vjerojatno smanjuje istjecanje elektrona i proizvodnju slobodnih radikala (Tunali i sur., 2004). Tim mehanizmima melatonin smanjuje količinu slobodnih radikala i oksidativni stres te tako protektivno djeluje u stanjima povezanim s oksidativnim stresom kao što su kronični upalni procesi, rak, neurodegenerativne bolesti i starenje.

Utvrđeno je da melatonin, u bolesnika s Alzheimerovom bolešću, značajno smanjuje atrofiju mozga i napredovanje bolesti. Također melatonin prevenira stvaranje eritema uzrokovanog UV zračenjem te ima fotoprotektivan učinak na humane keratinocyte i fibroblaste (Bonfont-Rousselot., 2010).

1.3.1. Utjecaj melatonina na cijeljenje rane

Melatonin utječe na brojne procese u cijeljenju rane. U fazi upale on inducira proizvodnju IL-1, TNF- α , citokina i TGF- β te reducira s upalom povezanu aktivaciju fosfolipaze A2, ciklooksigenaze i lipooksigenaze koje imaju ulogu u produkciji prostaglandina i leukotriena (Soybir i sur., 2003). Također stimulira proliferaciju monocita i fibroblasta što utječe na angiogenezu te inhibira aktivnost sintaze dušikovog oksida (NOS) koja katalizira produkciju NO radikala koji mogu izazvati oštećenje krvnih žilica i vaskularnu hiporeaktivnost (Radogna i sur., 2010).

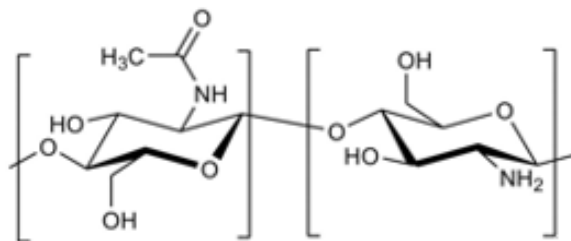
U literaturi možemo naići na suprotna mišljenja o utjecaju melatonina na sintezu kolagena i proliferaciju fibroblasta. Gómez-Florit i suradnici (2013) proučavali su utjecaj melatonina na gingivalne fibroblaste i utvrdili da melatonin povećava razinu kolagena, dekorina (proteoglikan koji regulira organizaciju kolagena) i smanjuje omjer MMP1/TIMP1 (metaloproteinaza matriksa 1/ tkivni inhibitor metaloproteinaze 1) te pridonosi cijeljenju tkiva gingive. Također je utvrđeno da topikalno i intraperitonealno primijenjen, melatonin može smanjiti napredovanje ulkusa i potaknuti njegovo cijeljenje (Sener i sur., 2006). Neka ranija istraživanja su pokazala da u pinealektomiranih štakora dolazi do povećanja, a primjenom melatonina do supresije sinteze kolagena u području rane (Bulbuler i sur., 2005; Drobnik i Dabrowski., 1996). Ipak učinak melatonina ovisi o načinu i mjestu njegove primjene te koncentraciji u tkivu. Tako su Drobnik i Dabrowski (1996) utvrdili da primjena melatonina ujutro povećava, a popodne smanjuje razinu kolagena.

Melatonin ima i antibakterijski učinak koji je jače izražen za gram-negativne nego za gram-pozitivne bakterije. Zbog svoje amfifilne strukture, melatonin prelazi bakterijski

stanični zid te smanjuje raspoloživost intracelularnih supstrata vežući slobodno željezo i masne kiseline i na taj način ograničava rast bakterija (Tekbas i sur., 2008). Antibakterijski učinak melatonina važan je aspekt njegovog utjecaja na cijeljenje rane. Naime, sprječavanje infekcije je izuzetno važno u procesu cijeljenja rane jer infekcija može produljiti proces cijeljenja, izazvati daljnje oštećenje tkiva te dovesti do sepse.

1.4. Kitozan

Kitozan je prirodni polimer dobiven deacetilacijom hitina, sastavljen od $\beta(1\rightarrow4)$ povezanih D-glukozaminskih i N-acetil-D-glukozaminskih jedinica (Slika 4). Hitin je glavni strukturni polisaharid beskralješnjaka i nižih biljaka, koji je uz celulozu najzastupljeniji polimer u prirodi. Kitozan je slaba baza ($pK_a = 6,5$), te u kiselom mediju ($pH < 6,5$) dolazi do protoniranja slobodnih amino skupina glukozamina, iz čega proizlaze jedinstvena svojstva kitozana.



Slika 4: Struktura kitozana

Kitozan je zajednički naziv za sve deacetilirane oblike hitina, koji se međusobno razlikuju po stupnju deacetilacije i molekulskoj masi. Molekulska masa kitozana može biti između 50 i 2000 kDa, a stupanj deacetilacije između 40 i 98 %. Viskoznost kitozanskih otopina usko je povezana s molekulskom masom i stupnjem deacetilacije. Što je više slobodnih amino-skupina u polimernom lancu kitozana, veća je i mogućnost nastajanja vodikovih veza, a kao posljedica promjene u konformaciji molekule povećava se viskoznost kitozanske otopine.

Kitozan ima izvanredna svojstva biokompatibilnosti, biorazgradljivosti i bioadhezivnosti, vrlo važna za biomedicinsku primjenu. Danas se razvijaju razni ljekoviti preparati u kojima je kitozan nosač ljekovite tvari, a rezultati pokazuju veliki uspjeh u postizanju kontinuiranog i kontroliranog oslobađanja lijeka uklopljenog u kitozanski matriks (Martinac i Filipović-Grčić, 2002).

Zanimljivo je da kitozan i njegovi derivati imaju antimikrobni učinak na neke bakterije (*Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*), gljivice (*Candida albicans* i *Aspergillus niger*) i parazite (*Leishmania infantum*) što bi moglo poslužiti kao pomoć u kontroli infektivnih bolesti (Kean i Thanou, 2010).

1.4.1. Utjecaj kitozana na cijeljenje rane

Kitozan znatno utječe na sve procese u cijeljenju rane. U ranim fazama cijeljenja kitozan potiče migraciju upalnih stanica koje proizvode veliku količinu proupalnih produkata i čimbenika rasta. Tako aktivira i povećava funkciju polimorfonuklearnih neutrofila (PMN), potiče migraciju makrofaga i produkciju fibroblasta. Kitozan također posjeduje i hemostatska svojstva koja su neovisna o klasičnoj koagulacijskoj kaskadi, a temelje se na interakciji između negativno nabijenih membrana eritrocita i pozitivno nabijenog kitozana (Millner i sur., 2009).

Stupanj deacetilacije i molekulska masa kitozana važni su čimbenici o kojima ovisi stimulacija fibroblasta. Ispitivanjem kojeg su proveli Minagawa i suradnici utvrđeno je ubrzano cijeljenje i povećanje kolagenazne aktivnosti kod rana tretiranih otopinom kitozana ili hitina. Pokazano je da je snaga ožiljka i aktivnost kolagenaze bila veća kod rana tretiranih kitozanom ili derivatima kitozana nego kod rana tretiranih hitinom ili derivatima hitina. Također, pri većem stupnju deacetilacije kitozana, uočena je veća snaga ožiljka i veća aktivnost fibroblasta. Najveći učinak primijećen je kod rana tretiranih oligomerima kitozana i hitina (Minagawa i sur., 2007).

Howling i suradnici ispitivali su utjecaj hitina i kitozana različitog stupnja deacetilacije, ali slične molekulske mase, na proliferaciju humanih fibroblasta kože i keratinocita *in vitro*. Kitozani relativno velikog stupnja deacetilacije snažno su stimulirali proliferaciju fibroblasta, dok su kitozani manjeg stupnja deacetilacije imali slabiji učinak. Stimulativni učinak na proliferaciju fibroblasta zahtijevao je prisutnost seruma u mediju. Moguće objašnjenje je da se kitozan veže za faktore rasta kao što je heparin i trombocitni faktor rasta, stabilizira ih i aktivira te na taj način indirektno utječe na proliferaciju fibroblasta. Uočen je inhibitorni učinak kitozana na proliferaciju humanih keratinocita (Howling i sur., 2001).

Kitozan ima širok spektar antimikrobnog djelovanja protiv bakterija, gljivica i plijesni, čime privlači veliku pažnju istraživača. Antimikrobna aktivnost kitozana rezultat je kombinacije nekoliko mehanizama ovisno o tipu mikroorganizma i svojstvima kitozana.

Najšire prihvaćen mehanizam antibakterijskog djelovanja je elektrostatska interakcija pozitivno nabijenog kitozana i negativno nabijenih sastavnica bakterijske površine, npr. anionskih glikana bakterijskog staničnog zida ili fosfolipida u citoplazmatskoj membrani. Interakcija sa sastavnicama stanične membrane može mijenjati permeabilnost, rezultirati istjecanjem intracelularnih elektrolita, glukoze, enzima i drugih proteinskih citoplazmatskih materijala. Pretpostavlja se da kitozani velike molekulske mase stvaraju polimerni štit koji sprječava ulazak i izlazak nutrijenata iz bakterije, a da kitozani male molekulske mase ulaze u bakterijske stanice gdje se vežu za komponente u citoplazmi što uzrokuje prekid fizioloških procesa. Tako kitozan može kelirati metale koji su esencijalni za rast bakterije, a ako je dovoljno male molekulske mase može i penetrirati u jezgru gdje inhibira sintezu mRNA i proteina. Također se pretpostavlja da kitozani velike molekulske mase imaju veći učinak na gram-pozitivne, a kitozani male molekulske mase na gram-negativne bakterije (Zivanovic i sur., 2015).

1.5. Lecitin

Lecitin je naziv za niz srodnih spojeva, mješavinu fosfolipida koji su neophodni našem tijelu za sve biološke funkcije, a nalaze se u stanicama svih živih organizama. Fosfolipidi grade lipidni dvosloj bioloških membrana i igraju veliku ulogu u staničnom metabolizmu (Shchipunov, 2001).

Lecitin se najčešće dobiva iz žumanjka i različitih uljanica kao što su lan, pamuk, suncokret, uljana repica i soja. Sojin lecitin se najviše koristi zbog svojih izvrsnih svojstava emulgiranja, boje i okusa. Karakterističan sastav sojinog lecitina je: fosfatidilkolin (21%), fosfatidiletanolamin (22%), fosfatidilinozitol (19%), fosfatidna kiselina i ostali fosfatidi (5%), uz ostale komponente. Sastav lecitina ovisi o njegovom izvoru i stupnju čistoće. Ostali faktori važni za kvalitetu lecitina su boja i mikrobiološka svojstva. Boja prirodnog lecitina je crvenkasto-smeđa, a izbjeljivanjem sa vodikovim peroksidom dobiva se produkt svijetlo žute boje (Sheng, 2009).

Lecitin se koristi kao emolijens, emulgator i stabilizator. Važna je njegova upotreba u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. U prehrambenoj industriji koristi se kao emulgator (E322) u proizvodnji hrane, a kao takav smanjuje površinsku napetost vode i omogućuje miješanje ulja i masti s vodom. U vodenim otopinama fosfolipidi lecitina mogu tvoriti liposome, lipidne dvosloje, micide i lamelarne strukture, ovisno o hidrataciji i temperaturi (Shchipunov, 2001). Lecitin se široko primjenjuje u raznim farmaceutskim

oblicima poput intramuskularnih i intravenskih injekcija, pripravcima za parenteralnu prehranu i topikalnim pripravcima kao što su kreme i masti. Primijenjen topikalno ne uzrokuje iritaciju ni senzibilizaciju. Sastavnica je pripravaka za enteralnu i parenteralnu prehranu, a fosfatidilkolin je prepoznat kao važan nutrijent u razvoju fetusa i novorođenčeta (Sheng, 2009).

Lecitin je prirodni izvor kolina i inozitola. Neophodan je za sintezu acetilkolina, glavnog neurotransmitora u moždanim ovojnicama. Nedostatak acetilkolina uzrokuje pojavu raznih neuroloških oboljenja zato se lecitin koristi za liječenje poremećaja pamćenja, demencije, Parkinsonove i Alzheimerove bolesti te anksioznosti. Za lecitin često kažemo da je “hrana za mozak“ jer povoljno djeluje na učenje i pamćenje (www.drugs.com).

1.6. Terapijski nanosustavi

Nanotehnologija je multidisciplinarno znanstveno područje koja se bavi dizajnom, sintezom, karakterizacijom i primjenom materijala čija je najmanja funkcionalna jedinica barem po jednoj dimenziji nanometarske veličine. Nanotehnologija otvara nove terapijske mogućnosti tvarima koje zbog svojih intrinzičkih svojstava imaju ograničenja u primjeni. Terapijski nanosustavi poboljšavaju topljivost lijekova slabo topljivih u vodi, zaštićuju tvari podložne razgradnji u biološkom okruženju, kontroliraju njihovo oslobađanje, poboljšavaju im bioraspoloživost i farmakokinetička svojstva utječući na procese apsorpcije, raspodjele i eliminacije, odnosno povećavaju učinkovitost i sigurnost njihove primjene (Hafner i sur., 2014).

Nanočestice su čvrsti koloidni nosači djelatne tvari veličine 10-1000 nm, građeni od prirodnih, polusintetskih ili sintetskih polimera. Specifična svojstva i interakcije nanočestica u biološkom okruženju posljedica su male i kontrolirane veličine čestica te velike površine u odnosu na volumen. Brojna suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj nanočestica kao terapijskih sustava s ciljem poboljšanja topljivosti uklopljenog lijeka, produljenja poluvijeka lijeka u sistemskej cirkulaciji, kontroliranog oslobađanja lijeka, smanjenja učestalosti doziranja, ciljane dostave lijeka, odnosno smanjenja sistemskih nuspojava. Nanočesticama je moguće dostaviti dva ili više lijekova istodobno te osigurati njihov sinergistički učinak, što je važno u borbi protiv rezistencije na postojeće lijekove (Zhang i sur., 2010).

Kitozan predstavlja polimer izbora u razvoju polimernih nanočestica zahvaljujući svojstvima biokompatibilnosti, biorazgradljivosti te mukoadhezivnosti. Biorazgradljivost i biokompatibilnost kitozana su, uz veličinu nanočestica, svojstva koja određuju sigurnost

primjene kitozanskih nanočestica. Mukoadhezivnost kitozanskih nanočestica osigurava dulje zadržavanje na mjestu apsorpcije te posljedično veću bioraspoloživost uklopljenog lijeka. Usto, kitozanske nanočestice mogu pospješiti apsorpciju lijeka preko epitela sluznice uslijed interakcije kitozana s međustaničnim čvrstim vezama odnosno reverzibilnog otvaranja međustaničnih čvrstih veza, čime se pospješuje paracelularni transport hidrofилnih djelatnih tvari. Zahvaljujući svim navedenim svojstvima, danas se intenzivno razvijaju kitozanske nanočestice kao terapijski sustavi namijenjeni različitim putovima primjene, primjerice oralnoj, nazalnoj, okularnoj i (trans)dermalnoj primjeni.

Također se opsežno istražuje potencijal kitozanskih nanočestica kao nosača djelatne tvari u terapiji tumora te genskoj terapiji. Istodobno se istražuje i njihova primjenjivost kao vektora za nevirusnu dostavu gena ili proteinskih molekula te nosača cjepiva u pospješivanju imunizacije (Nagpal i sur., 2010).

1.6.1. Nanočestice u razvoju funkcionalnih obloga za rane

Cijeljenje rane je kompleksan proces koji uključuje integrirani odgovor različitih vrsta stanica i faktora rasta kako bi se postigla brza obnova strukture kože i njene funkcije. Cijeljenju rane pridonose funkcionalne obloge za rane koje osiguravaju optimalnu vlažnost, toplinu, pH, mogućnost izmjene plinova, te prevenciju/suzbijanje infekcije rane (Triller i sur., 2012).

Najnovija istraživanja u okviru razvoja funkcionalnih obloga temelje se na primjeni (bio)polimera s učinkom na cijeljenje rana, primjerice kroz utjecaj na migraciju i proliferaciju stanica kože, antimikrobni učinak te hemostatsko djelovanje (Triller i sur., 2012). Također, terapijski nanosustavi mogu utjecati na mikrookolišne uvjete rane (npr. pH, količinu eksudata rane) ovisno o polimernom sastavu i specifičnim fizičko-kemijskim svojstvima sustava kao što su veličina, naboj, reološka svojstva te sposobnost bubrenja (Mayet i sur., 2014).

Polimerne nanočestice zanimljive su zbog svoje biokompatibilnosti, biorazgradljivosti i netoksičnosti, te kontrolirane dostave djelatne tvari (antibiotika, protuupalnih tvari, antioksidansa, antiseptika ili antitijela) u područje rane. Istodobno, uslijed iznimno velikog omjera površine prema volumenu, površinska svojstva nanočestica značajno utječu na njihovu biofarmaceutsku aktivnost. Tako se, modificiranjem površinskih svojstava nanočestica, mogu modelirati interakcije s biološkim sustavima i prilagođavati njihov učinak u biološkom okruženju, primjerice na migraciju i proliferaciju stanica kože (Mayet i sur., 2014). Na taj način moguće je i dizajnirati nanočestice koje, uslijed međudjelovanja s bakterijskom

staničnom stijjenkom, pokazuju različita nespecifična antibakterijska svojstva, ali i učinak na biofilm, čime se mogu prevladati ograničenja klasičnih antibiotika (Zhang i sur., 2010). Naime, za cijeljenje rane bez komplikacija i ožiljaka vrlo je važno spriječiti infekciju. Nanočestice s antimikrobnim djelovanjem mogu istodobno služiti i kao nosači konvencionalnih ili nekonvencionalnih lijekova s antimikrobnim djelovanjem (Cevher i sur., 2006; Pelgrift i Friedman, 2013).

Kitozan i njegovi derivati pokazali su se izvrsnim materijalima u razvoju funkcionalnih obloga za rane zahvaljujući hemostatskim i antibakterijskim svojstvima te pozitivnom učinku na migraciju i proliferaciju stanica kože. U literaturi su opisane funkcionalne obloge temeljene na kitozanu kao što su fibrozni materijali, hidrogelovi i membrane (Jayakumar i sur., 2011). Svojstva tih obloga su biokompatibilnost, niska toksičnost, sposobnost upijanja eksudata i antibakterijska aktivnost. Suvremena istraživanja usmjerena na razvoj kitozanskih nanočestica s utjecajem na proces cijeljenja rane, nastoje objediniti poznate učinke kitozana (učinak na cijeljenje rana, antibakterijski učinak) i jedinstvena fizičko-kemijska svojstva nanočestica (mala i kontrolirana veličina čestica, velika površina u odnosu na volumen, visoka reaktivnost, funkcionalna struktura, mogućnost uklapanja i kontroliranog oslobađanja djelatne tvari) s ciljem razvoja inovativnih funkcionalnih obloga unaprijeđene terapijske vrijednosti (Zhang i sur., 2010, Bonferoni i sur., 2014, Delleri i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cijeljenje rane je kompleksan proces koji uključuje integrirani odgovor različitih vrsta stanica i faktora rasta kako bi se postigla brza obnova strukture kože i njene funkcije. Kronične i akutne inficirane rane mogu uslijed komplikacija i sporog cijeljenja predstavljati veliki klinički problem. Najnovija istraživanja u okviru razvoja funkcionalnih obloga temelje se na primjeni (bio)polimera s učinkom na cijeljenje rana, primjerice kroz utjecaj na migraciju i proliferaciju stanica kože, antimikrobni učinak te hemostatsko djelovanje. Razvijaju se polimerni terapijski nanosustavi koji mogu pridonijeti procesu cijeljenja ovisno o sadržaju djelatne tvari, polimernom sastavu i specifičnim fizičko-kemijskim svojstvima (Mayet i sur., 2014).

Kitozan je biokompatibilni i biorazgradljivi prirodni polimer koji se pokazao izvrsnim materijalom u razvoju funkcionalnih obloga za rane zahvaljujući hemostatskim i antibakterijskim svojstvima te pozitivnom učinku na migraciju i proliferaciju stanica kože. Utvrđeni antimikrobni učinak ovisi o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi kitozana kao i građi staničnog zida ciljane bakterije. Uz antimikrobno djelovanje, promoviranjem granulacije i stanične organizacije kitozan osigurava i ubrzava uspješno cijeljenje različitih vrsta rana (Dai i sur., 2011).

Melatonin je neurohormon kojeg pretežito luči epifiza, ovisno o prisutnosti svjetla i tame. On regulira cirkadijani ritam, promotor je spavanja, a također ima funkciju u reprodukciji, potrošnji energije i regulaciji tjelesne mase. Svoje pleiotropne učinke melatonin iskazuje kao neurotransmiter, hormon, citokin i modulator biološkog odgovora te je antioksidans širokog spektra (Slominski i sur., 2007). Melatonin utječe na brojne procese u cijeljenju rana kao što su oslobađanje medijatora upale, proliferacija i migracija stanica, angiogeneza i akumulacija kolagena u području rane. Također posjeduje i antibakterijski učinak koji je jače izražen za gram-negativne nego za gram-pozitivne bakterije. Antibakterijski učinak pripisuje se njegovoj sposobnosti vezanja intracelularnih supstrata kao što su slobodno željezo i masne kiseline (Tekbas i sur., 2008).

U ovom radu pripravljene su lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom direktnim injektiranjem etanolne otopine lecitina i melatonina u vodenu otopinu kitozana. Korištena su četiri tipa kitozana koja se međusobno razlikuju prema stupnju deacetilacije i/ili molekulskoj masi. Usporedbe radi, pripravljene su i prazne lecitinsko-kitozanske nanočestice.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj fizičke uklopljenosti melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice na cijeljenje rane *in vitro*. U tu svrhu uspoređivan je utjecaj suspenzija lecitinsko-kitozanskih nanočestica s uklopljenim melatoninom i smjese suspenzija praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica i otopine melatonina na dinamiku cijeljenja modelne rane. Modelna rana predstavljena je oštećenjem konfluentnog sloja keratinocita kože (HaCaT stanica), a cijeljenje rane proliferacijom i migracijom stanica tj. smanjenjem površine praznine nastale namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica, u periodu od 48 sati nakon tretiranja stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za pripravu nanočestica korišteni su:

- lecitin S45 (Lipoid GmbH, Njemačka),
- melatonin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- četiri tipa kitozana (Protosan[®] CL 113, 114, 213, 214, NovaMatrix, Norveška).

Tablica 1: Svojstva korištenih kitozana

	Oznaka	Stupanj deacetilacije (%)	Molekulska masa (kDa)
Kitozan 113	C113	75-90	50-150
Kitozan 114	C114	>90	50-150
Kitozan 213	C213	75-90	150-400
Kitozan 214	C214	>90	150-400

Za uzgoj stanične linije HaCaT (keratinociti kože; Cell Line Services, Njemačka) korišteni su:

- hranidbeni medij DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), fosfatni pufer bez Ca i Mg (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS), smjesa antibiotika (penicilin, streptomycin i amfotericin B), tripsin 2,5% i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) nabavljeni od Lonze (Švicarska),
- fetalni teleći serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS), nabavljen od Biosere (Francuska)
- posude za uzgoj stanica, nabavljene od TPP-a (Švicarska) i Falcona (SAD)

Etanol (96%) korišten je za pripravu otopine lecitina, a otopina NaCl (10 mM) korištena je za razrjeđivanje suspenzija nanočestica prije mjerenja zeta-potencijala.

U ispitivanju cijeljenja rane *in vitro* korišten je pufer balansiran Hankovim solima (engl. *Hank's balanced Salt Solution*, HBSS pufer) pH 6,0, pripravljen otapanjem soli navedenih u Tablici 2, u pročišćenju vodi.

Tablica 2: Sastav HBSS pufera

Sol	Proizvođač
kalcijev klorid (CaCl ₂ bezvodni; 140 mg/L)	Sigma-Aldrich, Njemačka
magnezijev klorid (MgCl ₂ × 6H ₂ O; 100 mg/L)	Merck, Njemačka
magnezijev sulfat (MgSO ₄ × 7 H ₂ O; 100 mg/L)	Kemig, Hrvatska
kalijev klorid (KCl; 400 mg/L)	Kemig, Hrvatska
kalijev dihidrogenfosfat (KH ₂ PO ₄ ; 60 mg/L)	Kemika, Hrvatska
natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO ₃ ; 350 mg/L)	Kemig, Hrvatska
natrijev klorid, (NaCl; 8000 mg/L)	Kemig, Hrvatska
dinatrijev hidrogenfosfat (Na ₂ HPO ₄ bezvodni; 48 mg/L)	Fluka, Švicarska
D-glukoza (1000 mg/L)	Kemig, Hrvatska
4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (HEPES; 30 mM)	AppliChem/Panreac, Njemačka

3.2. Metode

3.2.1. Priprava nanočestica

Pripravljene su otopine četiri tipa kitozana (C113, C114, C213 i C214; Tablica 1) koncentracije 10 mg/ml u pročišćenoj vodi. Otopina lecitina koncentracije 25 mg/ml pripravljena je u 96% etanolu. Za pripravu lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom, melatonin je otopljen u etanolnoj otopini lecitina u koncentraciji od 5 mg/ml odnosno u masenom omjeru 1:5 prema lecitinu.

Otopine kitozana (250 µL) razrijeđene su pročišćenom vodom do volumena od 23 ml. Suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom pripravljene su injektiranjem 2 ml etanolne otopine lecitina i melatonina kroz iglu unutarnjeg promjera 0,75 mm, u 23 ml razrijeđene otopine kitozana uz miješanje na magnetskoj miješalici (900 okr/min). U pripremljenim suspenzijama nanočestica koncentracija kitozana iznosila je 100 µg/ml, a maseni omjer lecitina i kitozana 20:1. Usporedbe radi, pripravljene su lecitinsko-kitozanske nanočestice bez melatonina (prazne nanočestice), i to opisanom postupkom uz izostavljanje melatonina.

3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka u nanočestice

Uklopljenost lijeka u nanočestice, odnosno sadržaj lijeka u nanočesticama određen je metodom dijalize kojom je moguće odvojiti neuklopljeni lijek od nanočestica s uklopljenim lijekom. Odgovarajući volumen (4 ml) suspenzije nanočestica stavljen je u dijalizacijsku vrećicu od celuloza acetata (Spectra/Por[®], MW cut-off 12 000 – 14 000 Da, Medicell International Ltd, UK). Zatim je vrećica uronjena u receptorsku fazu (100 ml pročišćene vode). Uz neprekidno miješanje na magnetskoj miješalici (300 okr/min), iz receptorske faze uzimani su uzorci od 2 ml svakih 10 min, a uzeti volumen nadoknađen je sa 2 ml pročišćene vode. Uzorci su razrijeđeni s 1 ml pročišćene vode, a onda je određena koncentracija melatonina UV-Vis spektrofotometrom ($\lambda=278$ nm) (Cary 50, Varian Inc., SAD). Ispitivanje je zaustavljeno kada su u uzastopnim uzorcima receptorske faze izmjerene jednake koncentracije lijeka (nakon 120 min).

Uspješnost uklapanja lijeka (UU) određena je prema sljedećoj jednadžbi:

$$UU = \frac{[ukupni\ lijek] - [neuklopljeni\ lijek]}{[ukupni\ lijek]} \times 100$$

Sadržaj melatonina u nanočesticama (engl. *drug loading*, DL(%)) izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$DL (\%) = \frac{[ukupni\ lijek] - [neuklopljeni\ lijek]}{[masa\ nanočestica]} \times 100$$

Sadržaj melatonina (C_M) u suspenziji nanočestica izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$C_M (\mu\text{g/ml}) = \frac{[ukupni\ lijek] - [neuklopljeni\ lijek]}{[volumen\ suspenzije\ nanočestica]}$$

Dijalizirani uzorci suspenzija nanočestica korišteni su u svim daljnjim ispitivanjima.

3.2.3. Određivanje veličine nanočestica

Veličina nanočestica određena je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*; PCS) (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, UK). PCS metodom se određuje veličina dispergiranih čestica u području od 2 nm do 3 μm . Mjerenje se provodi obasjavanjem uzorka monokromatskom koherentnom laserskom zrakom, te se bilježi intenzitet svjetlosti raspršene na česticama pod određenim kutom.

U mjernim sustavima upotrebljen je monokromatski koherentni 10 mW He-Ne laser ($\lambda=633$ nm), a kut detekcije raspršene svjetlosti je bio 90°. Mjerenja su provedena pri 25°C. Veličina čestica mjerena je nakon odgovarajućeg razrjeđivanja pročišćenom vodom.

3.2.4. Određivanje zeta-potencijala nanočestica

Zeta-potencijal određen je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (PCS) (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, UK). Zeta-potencijal je elektrokinetički potencijal u koloidnim disperzijama. Vrijednost zeta-potencijala određuje se indirektno mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica. U sustavu za mjerenje elektroforetske pokretljivosti čestica korišten je 10 mW He-Ne laser. Elektroforetska pokretljivost izračunava se iz spektra frekvencija koje proizlaze iz detektiranih fotona svjetlosti. S obzirom da se nabijene čestice nalaze u

promjenjivom električnom polju, one se gibaju i raspršuju svjetlost. Ovisno o brzini gibanja mijenja se i frekvencija svjetlosti. Mjerenja su provedena pri 25 °C. Zeta-potencijal nanočestica mjeren je nakon odgovarajućeg razrjeđivanja s 10 mM otopinom NaCl.

3.2.5. Stanična linija i uvjeti uzgoja

U ovom radu korištena je humana stanična linija HaCaT (keratinociti kože; Cell Line Services, Njemačka). Stanice su uzgajane u skladu s protokolom kojeg preporučuje proizvođač. Stanice su nasadene u sterilnim uvjetima u posudama za uzgoj od 25, 75 i 150 cm², ili na pločama sa 24 jažice, te su uzgajane u inkubatoru pri 37°C, 5% CO₂ i 95% relativne vlažnosti. Konfluentnost je kontrolirana invertnim mikroskopom (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka). Za uzgoj HaCaT stanica kao hranidbeni medij korišten je DMEM koji je sadržavao penicilin, streptomycin i amfotericin uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma.

Nakon postizanja 80-90% konfluentnosti, stanice su presađivane u novu tikvicu. Prilikom presađivanja medij je odsisan te su stanice isprane s PBS-om koji je potom uklonjen, a zatim su stanice inkubirane s otopinom EDTA (0,02 % *m/V*) pri 37°C u periodu od 2,5 minute. Stanice su tripsinizirane otopinom tripsina (0,125 % *m/V*), a nakon odvajanja stanica od podloge učinak tripsina je inhibiran dodatkom medija (DMEM/10% FBS) u volumnom omjeru prema tripsinu 3:2. Stanični medij je mijenjan svaka dva dana.

3.2.6. Praćenje dinamike prekrivanja praznina nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica – engl. *scratch test*

Utjecaj suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom i smjese suspenzije praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica i otopine melatonina na cijeljenje rane *in vitro*, određen je praćenjem dinamike prekrivanja praznina nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica (engl. *scratch test*). Metoda se temelji na stvaranju modelne rane (engl. *scratch*) na konfluentnom monosloju stanica. Stanice na krajevima modelne rane proliferiraju/migriraju prema središtu dok ne dođe do zatvaranja modelne rane, odnosno dok ne dođe do međusobnog kontakta stanica.

HaCaT stanice nasadene su pri gustoći od 10⁵ stanica/jažici na ploče s 24 jažice (TPP, Švicarska) nakon čega im je bilo potrebno 24 sata za postizanje odgovarajuće konfluentnosti u mediju s 10% FBS-a.

Nakon postizanja konfluentnosti, stanicama je uklonjen medij i zamijenjen s medijem bez seruma. Nakon 24 h sloj stanica je po sredini jažice zagreban vrhom pipete od 10 μ l kako bi se stvorila modelna rana. Monosloj je potom ispran HBSS-om (pH 6,0) kako bi se uklonile odvojene stanice. Modelne rane tretirane su priređenim suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom, i smjesom suspenzije praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica i otopine melatonina pri koncentraciji kitozana od 5 μ g/ml. Kao kontrole korištene su otopina melatonina (5 μ g/ml) i suspenzija praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana od 5 μ g/ml. Stanice su tretirane 2 sata nakon čega su suspenzije, odnosno otopine odsisane, a stanice isprane HBSS-om te im je vraćen svježi medij bez seruma. Dinamika prekrivanja praznina praćena je invertnim mikroskopom (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka) spregnutim s kamerom (Samsung, 5 pixel) tijekom 48 sati nakon tretiranja. Za obradu slika korišten je program ImageJ (National Institute of Health, SAD).

3.2.7. Statistička analiza

Za statističku analizu podataka korišten je 1-way ANOVA test nadopunjen multiparametarskim Tukey's post-hoc testom (granica značajnosti $P < 0,05$). Računanje je provedeno pomoću GraphPad Prism programa (GraphPad Software, Inc., San Diego, SAD; www.graphpad.com).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom uspješno su pripravljene metodom ionotropnog geliranja koje se temelji na elektrostatskoj interakciji između pozitivno nabijenih amino skupina kitozana i negativno nabijenih polianiona (u ovom slučaju sastavnica lecitina koje pridonose njegovom negativnom naboju). Prednosti metode su njezina jednostavnost i mogućnost pripreme nanočestica u vodenom mediju te blagi uvjeti pri kojima nastaju nanočestice. Reverzibilno umrežavanje elektrostatskom interakcijom prihvatljivije je od kemijskog umrežavanja jer se prije svega izbjegava upotreba toksičnih reagensa. Najpoznatiji polianion koji može elektrostatski međudjelovati s pozitivno nabijenim kitozonom je tripolifosfat (TPP). Pri pripravi kitozanskih nanočestica metodom ionotropnog geliranja na veličinu i širinu raspodjele veličina čestica utječe raspodjela molekulskih masa kitozana, stupanj deacetilacije, koncentracija i molarni omjer kitozana i polianiona (Hafner, 2008).

U pripravi lecitinsko-kitozanskih nanočestica korištena su četiri tipa kitozana koja se međusobno razlikuju po molekulskoj masi i stupnju deacetilacije (Tablica 1). Tako su iz kitozana C113, C114, C213 i C214 pripravljene lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom označene redom kao MLC113, MLC114, MLC213 i MLC214. Maseni omjer lecitina i kitozana u svim pripravcima iznosio je 20:1, dok je maseni omjer između melatonina i lecitina iznosio 1:5.

Nanočestice bez melatonina (prazne nanočestice) pripravljene su opisanim postupkom uz izostavljanje melatonina. Prazne lecitinsko-kitozanske nanočestice označene su kao LC113, LC114, LC213, LC214, ovisno o tipu kitozana korištenom u njihovoj pripravi.

Dosadašnjim istraživanjima potencijala lecitinsko-kitozanskih nanočestica kao nosača melatonina utvrđena je povećana permeabilnost i zadržavanje u koži melatonina uklopljenog u nanočestice u usporedbi s melatoninom iz otopine (Hafner i sur., 2011). Također melatonin uklopljen u nanočestice bolje je permeirao kroz monosloj Caco-2 stanica kao modela epitelne barijere, u usporedbi s melatoninom iz otopine (Hafner i sur., 2009). Mukoadhezivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica osigurava dulje zadržavanje na mjestu primjene, a za očekivati je, i posljedično veću apsorpciju uklopljenog lijeka.

Özcan i suradnici utvrdili su prednosti uklapanja diflukortolona u lecitinsko-kitozanske nanočestice uspoređujući ih s komercijalnom dostupnom kremom koja sadrži

diflukortolon. Diflukortolon, potentan kortikosteroid koji se koristi lokalno u liječenju raznih kožnih oboljenja, pokazao je mnoge sistemske nuspojave uslijed svoje perkutane apsorpcije. Uklapanjem diflukortolona u lecitinsko-kitozanske nanočestice povećana je njegova perkutana apsorpcija i nakupljanje u epidermisu bez oštećenja funkcije kožne barijere i to pri manjim dozama u odnosu na komercijalno dostupnu kremu. Smanjenje doze diflukortolona važno je za smanjenje njegovih sistemskih nuspojava, te ovaj terapijski sustav predstavlja važan korak u daljnjem istraživanju lokalnih kortikosteroida u liječenju različitih kožnih oboljenja (Özcan i sur., 2013). Tan i suradnici došli su do slične spoznaje utvrdivši povećanu koncentraciju kvercetina u koži uklapajući ga u lecitinsko-kitozanske nanočestice (Tan i sur., 2011).

4.2. Karakterizacija nanočestica s melatoninom

Glavna svojstva lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom prikazana su u Tablici 3.

Uspješnost uklapanja melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice iznosila je od $23,3 \pm 1,9\%$ do $26,1 \pm 4,1\%$, dok se sadržaj melatonina u odgovarajućim suspenzijama kretao od $105,2 \pm 7,5 \mu\text{g/ml}$ do $114,3 \pm 9,8 \mu\text{g/ml}$.

Srednji promjeri praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica bili su u rasponu od $239,7 \pm 2,7$ do $260,9 \pm 3,4$ nm. Srednji promjeri odgovarajućih lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom iznosili su između $242,7 \pm 3,5$ i $263,4 \pm 7,9$ nm. Većina uzoraka karakterizirana je relativno širokom raspodjelom veličina čestica na što ukazuju vrijednosti indeksa polidisperznosti prikazane u Tablici 3.

Vrijednosti zeta-potencijala bile su pozitivne ($24,6$ do $30,7$ mV) za sve ispitivane lecitinsko-kitozanske nanočestice. Promjena vrijednosti zeta-potencijala od negativne za koloidnu suspenziju lecitina (približno -33 mV; Hafner i sur., 2009) u pozitivne, za sve ispitivane lecitinsko-kitozanske nanočestice (Tablica 3), ukazuje na prisustvo pozitivno nabijenih amino skupina kitozana na površini nanočestica. Amino skupine kitozana pozitivno su nabijene u sustavimapri pH vrijednostima manjim od pK_a kitozana ($\sim 6,5$). Uklapanje melatonina nije utjecalo na površinski naboj nanočestica.

Veličina i površinski naboj nanočestica ovisili su o molekulskoj masi i stupnju deacetilacije kitozana. Tako su nanočestice najvećeg srednjeg promjera i najvećeg zeta-potencijala pripravljene s kitozanom većeg stupnja deacetilacije i veće molekulske mase

(C214), dok su nanočestice najmanjeg srednjeg promjera i najmanjeg zeta-potencijala pripravljene s kitozonom manjeg stupnja deacetilacije i manje molekulske mase (C113).

Svi navedeni rezultati vezani uz sadržaj uklopljenog melatonina, veličinu, polidisperznost i površinski naboj nanočestica, u skladu su s prethodno ostvarenim rezultatima (Blažević i Milekić, 2015), što ukazuje na ponovljivost i reproducibilnost pripreve lecitinsko-kitozanskih nanočestica metodom ionotropnog geliranja.

Tablica 3. Glavna svojstva lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

	Srednji promjer (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)	UU (%)	DL (%)	C_M (µg/ml)
MLC 113	242,7± 3,5 (239,7±2,7)	0,27±0,03 (0,27±0,04)	24,8±0,4 (24,6±0,5)	23,3±1,9	3,63±0,41	105,2±7,5
MLC 114	254,8±5,4 (245,4±4,2)	0,37±0,04 (0,36±0,04)	25,5±0,9 (25,0±0,6)	23,9±1,9	3,66±0,42	103,3±12,0
MLC 213	255,0±7,2 (248,8±4,6)	0,33±0,02 (0,31±0,05)	27,7±1,2 (27,1±1,3)	25,3±3,1	3,61±0,42	101,6±12,1
MLC 214	263,4±7,9 (260,9±3,4)	0,39±0,04 (0,34±0,06)	30,6±1,0 (30,7±1,5)	26,1±4,1	3,78±0,48	114,3±9,8

Vrijednosti u zagradama odnose se na prazne nanočestice. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n = 3).

PDI, indeks polidisperznosti

UU (%), uspješnost uklapanja: sadržaj lijeka/teorijski sadržaj lijeka × 100

DL (%), sadržaj lijeka/ispitivana količina nanočestica × 100

CM (µg/ml), sadržaj lijeka/volumen suspenzije nanočestica

4.3. Utjecaj uklopljenosti melatonina u nanočestice na proliferaciju i migraciju HaCaT stanica

Cijeljenje rane je kompleksan proces koji uključuje interakcije stanica, izvanstaničnog matriksa i signalnih molekula. U procesu cijeljenja rane važnu ulogu imaju fibroblasti i keratinociti. Tijekom faze upale fibroblasti migriraju u područje rane gdje sintetiziraju i remodeliraju novi izvanstanični matriks, čija je glavna sastavnica kolagen. Uz dermis, i

epidermis kao površinski zaštitni sloj kože, mora zacijeliti. Keratinociti iz bazalnog sloja migriraju iz područja rubova rane i ozlijeđenih epidermalnih adneksa u područje rane. Keratinociti zatim proliferiraju, raslojavaju se i diferenciraju, stvarajući novi epidermis koji prekriva ranu, odnosno novi površinski zaštitni sloj kože (Howling i sur., 2001).

Stanične kulture fibroblasta i keratinocita koriste se kao *in vitro* modeli rane u preliminarnim ispitivanjima potencijalnog učinka različitih tvari i inovativnih terapijskih sustava na cijeljenje rane (Howling i sur., 2001; Shrimanker i sur., 2003). Pri takvim ispitivanjima, modelna rana predstavljena je oštećenjem konfluentnog sloja stanica kože, a cijeljenje rane proliferacijom i migracijom stanica, odnosno prekrivanjem praznina nastalih oštećivanjem konfluentnog sloja stanica (engl. *scratch test*). Prije provođenja ispitivanja potencijalnog učinka različitih tvari/terapijskih sustava na cijeljenje rane opisanom metodom, potrebno je ispitati biokompatibilnost tih istih tvari/terapijskih sustava sa stanicama fibroblasta i/ili keratinocita, odnosno odrediti koncentracije pri kojima ispitivane tvari/terapijski sustavi ne uzrokuju smanjenje vijabilnosti korištenih stanica (Felice i sur., 2015).

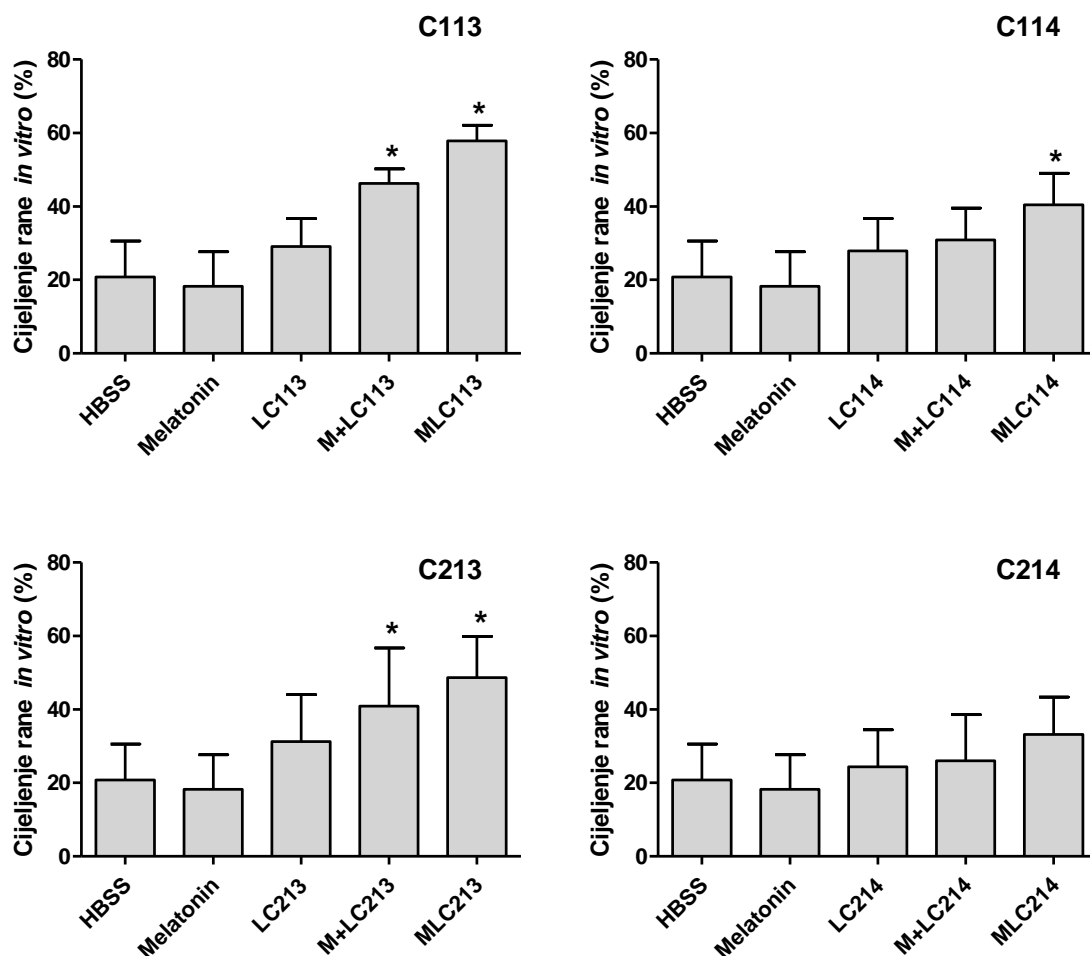
Blažević i Milekić (2015) ispitivali su utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na proliferaciju migraciju humanih keratinocita (HaCaT). Prethodno su utvrdili da izlaganje HaCaT stanica suspenzijama nanočestica s melatoninom pri koncentraciji kitozana manjoj od 20 µg/ml nije značajnije utjecalo na vijabilnost stanica, neovisno o tipu korištenog kitozana. Pri tretiranju stanica otopinama kitozana manjeg stupnja deacetilacije značajno smanjenje vijabilnosti stanica uočeno je pri koncentracijama kitozana od 10 i 20 µg/ml, dok je u slučaju kitozana većeg stupnja deacetilacije vijabilnost stanica značajno smanjena već pri koncentraciji kitozana od 5 µg/ml. Temeljem tih rezultata, pri ispitivanju utjecaja nanočestica na cijeljenje rane *in vitro*, modelne rane tretirane su pripremljenim suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana od 5 µg/ml. Kao kontrole korištene su otopine melatonina (5 µg/ml) i kitozana (5 µg/ml), te lecitinske nanočestice (100 µg/ml). Utvrđeno je da su, za razliku od otopina kitozana koje su usporavale cijeljenje (epitelizaciju) rane *in vitro*, suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica odgovarajuće koncentracije kitozana ubrzavale navedeni proces. Učinak nanočestica na cijeljenje rane *in vitro* ovisio je o sadržaju melatonina u nanočesticama (nanočestice s melatoninom imale su bolji učinak od praznih nanočestica) i tipu kitozana korištenom u njihovoj pripravi.

Također je utvrđeno da je uklapanje melatonina u nanočestice rezultiralo produljenim oslobađanjem melatonina, koje može utjecati na biofarmaceutsku aktivnost razvijenog terapijskog sustava (Blažević i Milekić, 2015).

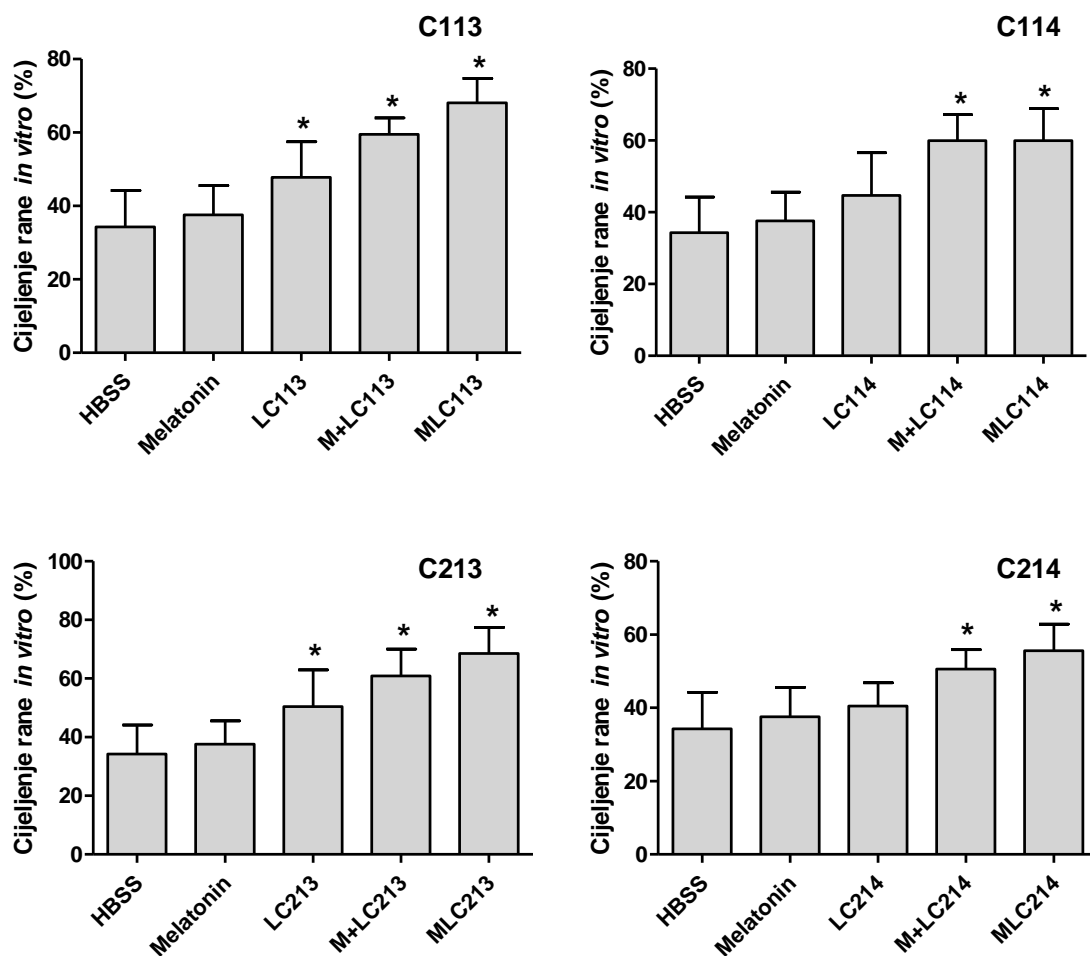
Usto, poznato je da uklapanje djelatnih tvari u nanonosače, posebice one pozitivnog površinskog naboja, može utjecati na njihovu internalizaciju (ulazak u stanicu) (Verma i Stellacci, 2010). Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj fizičke uklopljenosti melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice na cijeljenje rane *in vitro*. U tu svrhu uspoređivan je utjecaj suspenzija nanočestica s uklopljenim melatoninom i smjese suspenzija praznih nanočestica i otopine melatonina na migraciju/proliferaciju HaCaT stanica.

Proliferacija/migracija stanica (cijeljenje rane *in vitro*) izražena je smanjenjem površine praznine nastale namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica tj. postotkom prekrivenosti prvotno formirane praznine, 24 i 48 sati nakon dvosatnog tretiranja stanica (Slike 5-7).

Modelne rane tretirane su suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom (MLC113, MLC114, MLC213 i MLC214) pri koncentraciji kitozana od 5 µg/ml i odgovarajućim smjesama suspenzija praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica i otopine melatonina (M+LC113, M+LC114, M+LC213 i M+LC214). Kao kontrole korištene su otopina melatonina (5 µg/ml) i prazne lecitinsko-kitozanske nanočestice (LC113, LC114, LC213 i LC214) pri koncentraciji kitozana od 5 µg/ml.



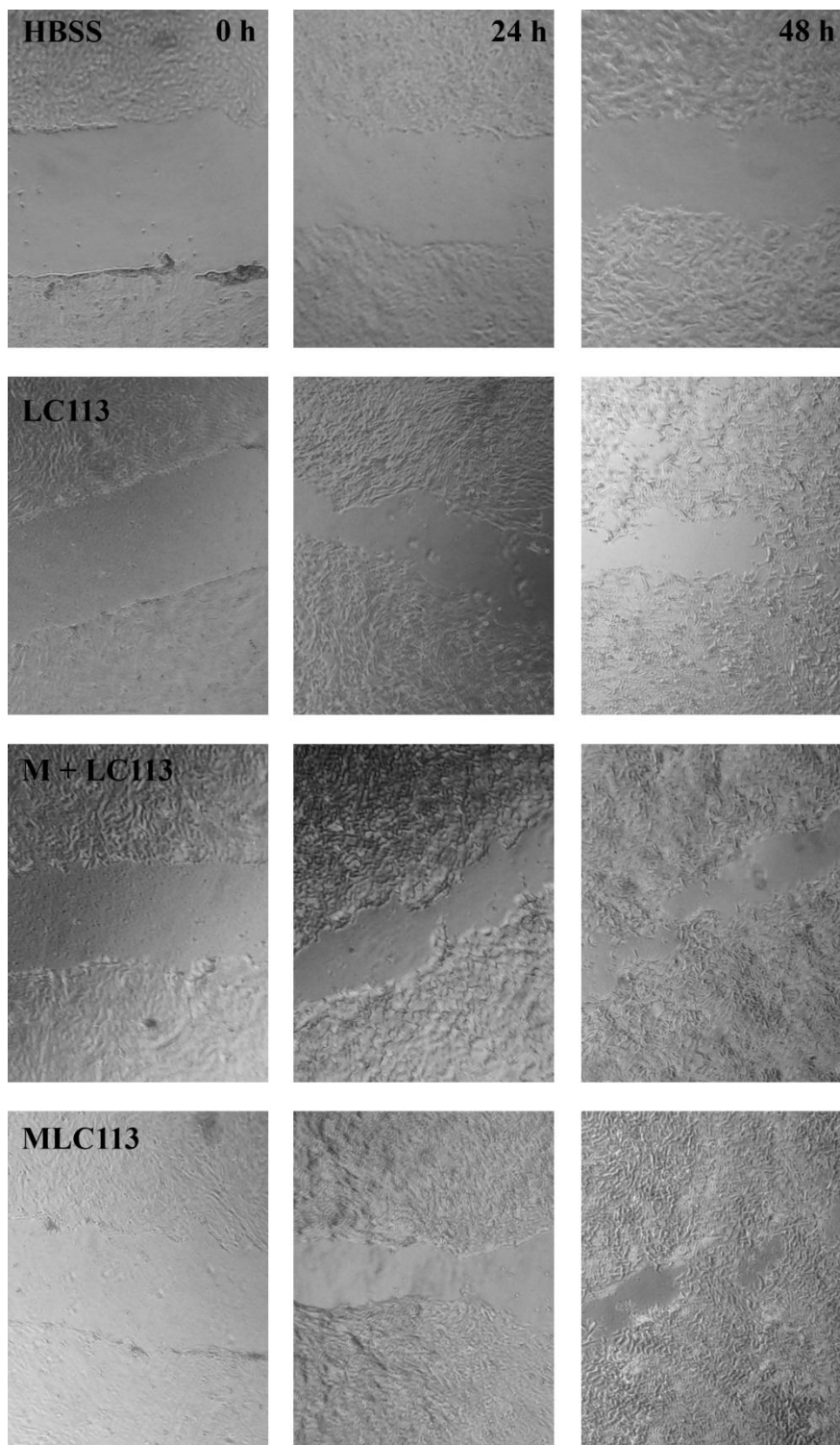
Slika 5: Utjecaj suspenzija lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom pripremljenih s kitozansom C113, C114, C213 i C214, i odgovarajućih smjesa suspenzija praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica i otopine melatonina na cijeljenje rane *in vitro* u 24-satnom periodu. Cijeljenje rane *in vitro* izraženo je postotkom prekrivenosti površine praznine nastale namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica 24 sata nakon dvosatnog tretiranja stanica. Modelne rane tretirane su priređenim suspenzijama pri koncentraciji kitozana od 5 $\mu\text{g/ml}$. Kao kontrole korištene su otopina melatonina (5 $\mu\text{g/ml}$) i suspenzije praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana od 5 $\mu\text{g/ml}$. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD (n=3). *Razlikuju se od netretiranih stanica inkubiranih u HBSS-u (P < 0,05).



Slika 6: Utjecaj suspenzija lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom pripremljenih s kitozonom C113, C114, C213 i C214, i odgovarajućih smjesa suspenzija praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica i otopine melatonina na cijeljenje rane *in vitro* u 48-satnom periodu. Cijeljenje rane *in vitro* izraženo je postotkom prekrivenosti površine praznine nastale namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica 48 sati nakon dvosatnog tretiranja stanica. Modelne rane tretirane su priređenim suspenzijama pri koncentraciji kitozana od 5 $\mu\text{g/ml}$. Kao kontrole korištene su otopina melatonina (5 $\mu\text{g/ml}$) i suspenzije praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana od 5 $\mu\text{g/ml}$. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD (n=3). *Razlikuju se od netretiranih stanica inkubiranih u HBSS-u (P < 0,05).

U 24-satnom periodu nakon tretiranja, otopina melatonina te suspenzije praznih nanočestica nisu značajno ubrzale proces cijeljenja rane *in vitro* u odnosu na kontrolu (netretirane stanice inkubirane u HBSS-u; Slika 5). Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom MLC113, MLC114 i MLC 213, te smjese suspenzija praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica i otopine melatonina M+LC113 i M+LC213, značajno su ubrzale proces cijeljenja *in vitro* u odnosu na netretirane stanice inkubirane u HBSS-u (postotak cijeljenja rane *in vitro* iznosio je $57,9 \pm 4,2$ % za MLC113, $40,4 \pm 8,6$ % za MLC114, $48,7 \pm 11,2$ % za MLC213, $46,3 \pm 3,9$ % za M+LC113, $40,9 \pm 15,8$ % za M+LC213 te $20,8 \pm 9,8$ % za stanice inkubirane s HBSS-om) (Slika 5).

Nakon 48 sati od tretiranja stanica sve suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom i sve smjese suspenzija praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica i otopine melatonina značajno su ubrzale proces cijeljenja rane *in vitro* u odnosu na stanice inkubirane s HBSS-om (Slika 6). Najbrže cijeljenje rane *in vitro* zabilježeno je kod modelne rane izložene nanočesticama s melatoninom pripravljene s kitozanom manje molekulske mase i manjeg stupnja deacetilacije (MLC113). Postotak cijeljenja rane *in vitro* iznosio je redom $68,1 \pm 6,7$ %, $60,0 \pm 9,0$ %, $68,5 \pm 8,9$ % i $55,6 \pm 7,2$ % za MLC113, MLC114, MLC213 i MLC214 nanočestice, a $59,5 \pm 4,5$ %, $60 \pm 7,3$ %, $60,9 \pm 9,1$ % i $50,6 \pm 5,3$ % za smjese M+LC113, M+LC114, M+LC213 i M+LC214 te $34,3 \pm 9,9$ % za stanice inkubirane s HBSS-om. Ti rezultati upućuju na bolji učinak suspenzija nanočestica s uklopljenim melatoninom na proces cijeljenja rana *in vitro* u usporedbi sa odgovarajućim smjesama suspenzija praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica i otopine melatonina, međutim nije postignuta razina statističke značajnosti $P < 0,05$. Od kontrolnih uzoraka (otopine melatonina i suspenzija praznih nanočestica), u 48-satnom periodu od tretiranja, jedino su suspenzije praznih nanočestica pripravljene s kitozanim manjeg stupnja deacetilacije (C113 i C213) značajno ubrzale cijeljenje rane *in vitro* u odnosu na netretirane stanice inkubirane u HBSS-u.



Slika 7: Brzina cijeljenja modelnih rana nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja HaCaT stanica te izloženih suspenziji lecitinsko-kitozanskih nanočestica pripremljenih s kitozansom C113 (LC113), smjesi suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica i otopine melatonina (M+LC113) te suspenziji lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom (MLC113), u usporedbi sa stanicama inkubiranim u HBSS-u (pH 6,0). Modelne rane tretirane su navedenim sustavima pri koncentraciji kitozana od 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Iz svega se može zaključiti da učinak fizičkog uklapanja melatonina u nanočestice i posljedični utjecaj na brzinu oslobađanja lijeka i eventualno internalizaciju, nije presudan za učinak ispitivanog sustava na cijeljenje rane *in vitro*. Pozitivni učinak smjesa suspenzija praznih nanočestica i otopine melatonina na cijeljene rane *in vitro* ukazuje na sinergijski učinak kitozana i melatonina na proliferaciju/migraciju tretiranih stanica. Ipak, nanočestice s uklopljenim melatoninom predstavljaju potencijalno vrijedan terapijski sustav koji može osigurati dulju stabilnost melatonina u usporedbi s pripravcima u kojima melatonin nije uklopljen u polimerni nosač (Tursilli i sur., 2006). Također, produljenim oslobađanjem melatonina može osigurati manju koncentraciju melatonina u području rane te posljedično manju sistemsku izloženost (Zhang i sur., 2008).

5. ZAKLJUČCI

- Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom uspješno su pripravljene ionskom interakcijom između lecitina i kitozana. U pripravi nanočestica korištena su četiri tipa kitozana koja se međusobno razlikuju po molekulskoj masi i/ili stupnju deacetilacije.
- Pripravljene su nanočestice srednjeg promjera od $242,7 \pm 3,5$ do $263,4 \pm 7,9$ nm, pozitivnog zeta-potencijala (24,6 do 30,7 mV) te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina ($3,6 \pm 0,4$ % do $3,8 \pm 0,5$ %). Veličina i površinski naboj nanočestica ovisili su o molekulskoj masi i stupnju deacetilacije kitozana.
- Najbrže cijeljenje rane *in vitro* zabilježeno je kod modelne rane izložene nanočesticama s melatoninom pripravljene s kitozanom manje molekulske mase i manjeg stupnja deacetilacije (MLC113).
- Suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s uklopljenim melatoninom pokazale su bolji učinak na proces cijeljenja rane *in vitro* u usporedbi sa smjesom suspenzija praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica i otopine melatonina, međutim nije postignuta razina statističke značajnosti $P < 0,05$.
- Utjecaj fizičkog uklapanja melatonina u nanočestice nije bio presudan za učinak ispitivanog sustava na cijeljenje rane *in vitro*. Ipak, nanočestice s uklopljenim melatoninom predstavljaju potencijalno vrijedan terapijski sustav koji može osigurati dulju stabilnost melatonina, a produljenim oslobađanjem njegovu manju koncentraciju u području rane te posljedično manju sistemsku izloženost melatoninu.

6. LITERATURA

- Blažević F, Milekić T. Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na cijeljenje rane *in vitro*. Rad za rektorovu nagradu, Zagreb, 2015.
- Bonferoni MC, Sandri G, Deller E, Rossi S, Ferrari F, Mori M, Caramella C. Ionic polymeric micelles based on chitosan and fatty acids and intended for wound healing. Comparison of linoleic and oleic acid. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 87, 101-106.
- Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 2010, 278, 55-67.
- Bulbuler N, Dogru O, Yekeler H, Cetinkaya Z, Ilhan N, Kirkil C. Effect of melatonin on wound healing in normal and pinealectomized rats. *J Surg Res*, 2005, 123, 3-7.
- Cevher E, Orhan Z, Mülazimoğlu L, Şensoy D, Alper M, Yildiz A, Özsoy Y. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. *Int J Pharm*, 2006, 317, 127-135.
- Čajkovac M. Kozmetologija. Jastrebarsko, Naklada Slap, 2000, str. 25-31.
- Dai T, Tanaka M, Hueng Y, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011, 9, 857-879.
- Deller E, Bonferoni MC, Sandri G, Rossi S, Ferrari F, Fante CD, Perotti C, Grisoli P, Caramella C. Development of chitosan oleate ionic micelles loaded with silver sulfadiazine to be associated with platelet lysate for application in wound healing. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 88, 643-650.
- Drobnik J, Dabrowski R. Melatonin suppresses the pinealectomy-induced elevation of collagen content in a wound. *Cytobios*, 1996, 340, 51-58.
- Felice F, Zambito Y, Belardinelli E, Fabiano A, Santoni T, Di Stefano R. Effect of different chitosan derivatives on *in vitro* scratch wound assay: A comparative study. *Int J Biol Macromol*, 2015, 76, 236-241.

- Gómez-Florit M, Ramis JM, Monjo M. Anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of melatonin on human gingival fibroblasts *in vitro*. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86, 1784-1790.
- Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2003, str. 419-421.
- Hafner A. Kitozansko-lecitinske nanočestice za nazalnu i (trans)dermalnu primjenu melatonina. Doktorski rad, Zagreb, 2008.
- Hafner A, Lovrić J, Pepić I, Filipović-Grčić J. Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. *J Microencapsul*, 2011, 28, 807-815.
- Hafner A, Lovrić J, Perina Lakoš G, Pepić I. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *Int J Nanomed*, 2014, 9, 1005-1023.
- Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grčić J. Melatonin-loaded lecithin nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm*, 2009, 381, 205-213.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38, 313-316.
- Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes *in vitro*. *Biomaterials*, 2001, 22, 2959-2966.
- Huljev D. Prepreke u cijeljenju rane. *Acta Med Croatica*, 2013, 67, 5-10.
- Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv*, 2011, 29, 322-337.
- Jurić-Lekić G. Koža. U: Osnove histologije. Bradamante Ž i Kostović-Knežević Lj, urednici, Zagreb, Školska knjiga, 1995, str. 359-368.
- Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Delivery Rev*, 2010, 62, 3-11.
- Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int*, 2010, 203, 93-98.

- Kos J. Ozljede i rane: definicija, etiologija i podjela. Cijeljenje rane i opći principi liječenja, 2008., <http://www.vef.unizg.hr>, pristupljeno 03. 06. 2015.
- Kovač Z. Upale. U: Patofiziologija. Gamulin S, Marušić M. Kovač Z i sur., urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2005, str. 507-534.
- Kujundžić M. i suradnici. Klinička patofiziologija. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2003, str. 53-55.
- Lecithin, 2014., <http://www.drugs.com>, pristupljeno 15. 06. 2015.
- Martinac A, Filipović-Grčić J. Kitozan – biopolimer 21. stoljeća. *Farm. Glas*, 2002, 58, 1-10.
- Mayet N, Choonara YE, Kumar P, Tomar LK, Tyagi C, Du Toit LC, Pillay V. A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems. *J Pharm Sci*, 2014, 103, 2211-2230.
- Millner RW, Lockhart AS, Bird H, Alexiou C. A new hemostatic agent: initial life-saving experience with Celox (chitosan) in cardiothoracic surgery. *Ann Thorac Surg*, 2009, 87, 13-14.
- Minagawa T, Okamura Y, Shigemasa Y, Minami S, Okamoto Y. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydr Polym*, 2007, 67, 640-644.
- Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Chitosan nanoparticles: A promising system in novel drug delivery. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58, 1423-1430.
- Özcan İ, Azizoğlu E, Şenyiğit T, Özyazıcı M, Özer Ö. Enhanced dermal delivery of diflucortolone valerate using lecithin/chitosan nanoparticles: *in-vitro* and *in-vivo* evaluations. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8, 461-475.
- Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Delivery Rev*, 2013, 65, 1803-1815.
- Radogna F, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80, 1844-1852.

- Sener G, Sert G, Ozler SA, Arbak S, Gedik N, Ayanoğlu-Dülger G. Melatonin protects against pressure ulcer-induced oxidative injury of the skin and remote organ in rats. *J Pineal Res*, 2006, 40, 280-287.
- Shchipunov YA. Lecithin organogel: A micellar system with unique properties. *Colloid Surface A*, 2001, 183-185, 541-554.
- Sheng JJ. Lecithin. U: Handbook of Pharmaceutical Excipients. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, urednici, London, Chicago, *Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association*, 2009, str. 414-416.
- Shrimanker M, Patel N, Modi H, Dave R. A review: screening models for wound healing activity in animals. *Am J PharmTech Res*, 2013, 3, 2249-3387.
- Skin wound healing, 2015., <http://emedicine.medscape.com>, pristupljeno 03. 06. 2015.
- Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J, Paus R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab*, 2007, 19, 17-24.
- Soybir G, Topuzlu C, Odabaş Ö, Dolay K, Bilir A, Köksoy F. The effects of melatonin on angiogenesis and wound healing. *Surg Today*, 2003, 33, 896-901.
- Tan Q, Liu W, Guo C, Zhai G. Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6, 1621-1630.
- Tekbas OF, Ogur R, Korkmaz A, Kilic A, Reiter RJ. Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule. *J Pineal Res*, 2008, 44, 222-226.
- Triller C, Huljev D, Smrke DM. Primjena suvremenih obloga u liječenju kroničnih rana. *Acta Med Croatica*, 2012, 66, 65-70.
- Tunali T, Sener G, Yarat A, Emekli N. Melatonin reduces oxidative damage to skin and normalizes blood coagulation in a rat model of thermal injury. *Life Science*, 2005, 76, 1259-1265.
- Tursilli R, Casolari A, Iannuccelli V, Scalia S. Enhancement of melatonin photostability by encapsulation in lipospheres. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40, 910-914.
- Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*, 2010, 6, 12-21.

Wound healing and repair, 2015., <http://emedicine.medscape.com>, pristupljeno 03. 06. 2015.

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

Zhang L, Pornpattananankul D, Hu CM, Huang CM. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Curr Med Chem*, 2010, 17, 585-594.

Zivanovic S, Davis RH, Golden DA. Chitosan as an antimicrobial in food products.U: Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality. Taylor TM, urednik, 2015, 153-173.

7. SAŽETAK

Cijeljenje rane je kompleksan proces koji uključuje integrirani odgovor različitih vrsta stanica i faktora rasta kako bi se postigla brza obnova strukture kože i njene funkcije. Cijeljenju rane pridonose funkcionalne obloge za rane koje osiguravaju optimalnu vlažnost, toplinu, pH, mogućnost izmjene plinova, te prevenciju/suzbijanje infekcije rane. Istražuje se i primjena (bio)polimera koji kroz utjecaj na migraciju i proliferaciju stanica kože, antimikrobni učinak ili hemostatsko djelovanje mogu utjecati na proces cijeljenja rane. Razvijaju se polimerni terapijski nanosustavi čiji učinak ovisi o sadržaju djelatne tvari, polimernom sastavu i specifičnim fizičko-kemijskim svojstvima.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj fizičke uklopljenosti melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice na cijeljenje rane *in vitro*. U tu svrhu uspoređivan je utjecaj suspenzija nanočestica s uklopljenim melatoninom i smjese suspenzija praznih nanočestica i otopine melatonina na dinamiku cijeljenja modelne rane predstavljene oštećenjem konfluentnog sloja keratinocita kože.

Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom uspješno su pripravljene ionskom interakcijom između lecitina i kitozana. Korištena su četiri tipa kitozana koja se međusobno razlikuju prema stupnju deacetilacije (75-90% ili > 90%) i/ili molekulskoj masi (50-150 ili 150-400 kDa). Pripravljene su nanočestice srednjeg promjera od $242,7 \pm 3,5$ do $263,4 \pm 7,9$ nm, pozitivnog zeta-potencijala ($24,8 \pm 0,4$ do $30,6 \pm 1,0$ mV) te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina ($3,6 \pm 0,4$ % do $3,8 \pm 0,5$ %). Suspenzije nanočestica s uklopljenim melatoninom pokazale su bolji učinak na proces cijeljenja rane *in vitro* u usporedbi sa smjesom suspenzija praznih nanočestica i otopine melatonina, međutim nije postignuta razina statističke značajnosti $P < 0,05$. Utjecaj fizičkog uklapanja melatonina u nanočestice nije bio presudan za učinak ispitivanog sustava na cijeljenje rane *in vitro*. Ipak, nanočestice s uklopljenim melatoninom predstavljaju potencijalno vrijedan terapijski sustav koji može osigurati dulju stabilnost melatonina, a produljenim oslobađanjem njegovu manju koncentraciju u području rane te posljedično manju sistemsku izloženost melatoninu.

7. SUMMARY

Wound healing is a complex process involving integrated response of different cells and growth factors resulting in renewal of skin structure and functions. Innovative wound dressings are designed to provide optimal conditions for wound healing such as adequate wound humidity, temperature, pH, gaseous exchange and prevention/treatment of infection. The special attention is paid at (bio)polymers with the potential to improve wound healing by influencing migration/proliferation of skin cells, antimicrobial or haemostatic activity, as well as on polymeric nanosystems with the effect based on the content of the active compound, polymeric composition and its physico-chemical properties.

The aim of this work is to investigate the influence of physical entrapment of melatonin into lecithin/chitosan nanoparticles on wound healing *in vitro*. For that purpose, the effect of suspension of melatonin-loaded nanoparticles on wound healing was compared with the effect of suspension of melatonin-free nanoparticles mixed with melatonin solution, using human keratinocyte cell line in *in vitro* scratch test. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles were successfully prepared by ionic interaction between lecithin and chitosan. Four types of chitosan used differed in molecular weight (50-150 kDa or 150-400 kDa) and/or deacetylation degree (75-90 % or > 90 %). Nanoparticles had mean diameter ranging between $242.7 \pm 3.5 - 263.4 \pm 7.9$ nm, positive zeta-potential ($24.8 \pm 0.4 - 30.6 \pm 1.0$ mV) and sufficient melatonin entrapment (3.6 ± 0.4 % - 3.8 ± 0.5 %). There was a trend towards improved effect of suspensions of melatonin-loaded nanoparticles on wound healing *in vitro* compared to suspensions of melatonin-free nanoparticles mixed with melatonin solution. However, the statistical significance level $p \leq 0.05$ was not achieved. Melatonin physical entrapment into nanoparticles was shown not to be crucial for the effect of system investigated on wound healing *in vitro*. However, melatonin-loaded nanoparticles represent potentially valuable delivery system which can provide prolonged melatonin stability and prolonged melatonin release resulting in lower melatonin concentration at the wound site and consequent lower systemic melatonin exposure.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

USPOREDBA UČINKA FIZIČKIH SMJESA I LECITINSKO-KITIZANSKIH NANOČESTICA S UKLOPLJENIM MELATONINOM NA CIJELJENJE RANE *IN VITRO*

Marija Matičević

SAŽETAK

Cijeljenje rane je kompleksan proces koji uključuje integrirani odgovor različitih vrsta stanica i faktora rasta kako bi se postigla brza obnova strukture kože i njene funkcije. Cijeljenju rane pridonose funkcionalne obloge za rane koje osiguravaju optimalnu vlažnost, toplinu, pH, mogućnost izmjene plinova, te prevenciju/suzbijanje infekcije rane. Istražuje se i primjena (bio)polimera koji kroz utjecaj na migraciju i proliferaciju stanica kože, antimikrobni učinak ili hemostatsko djelovanje mogu utjecati na proces cijeljenja rane. Razvijaju se polimerni terapijski nanosustavi čiji učinak ovisi o sadržaju djelatne tvari, polimernom sastavu i specifičnim fizičko-kemijskim svojstvima.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj fizičke uklopljenosti melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice na cijeljenje rane *in vitro*. U tu svrhu uspoređivan je utjecaj suspenzija nanočestica s uklopljenim melatoninom i smjese suspenzija praznih nanočestica i otopine melatonina na dinamiku cijeljenja modelne rane predstavljene oštećenjem konfluentnog sloja keratinocita kože. Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom uspješno su pripravljene ionskom interakcijom između lecitina i kitozana. Korištena su četiri tipa kitozana koja se međusobno razlikuju prema stupnju deacetilacije (75-90% ili > 90%) i/ili molekulskoj masi (50-150 ili 150-400 kDa). Pripravljene su nanočestice srednjeg promjera od $242,7 \pm 3,5$ do $263,4 \pm 7,9$ nm, pozitivnog zeta-potencijala ($24,8 \pm 0,4$ do $30,6 \pm 1,0$ mV) te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina ($3,6 \pm 0,4$ % do $3,8 \pm 0,5$ %). Suspenzije nanočestica s uklopljenim melatoninom pokazale su bolji učinak na proces cijeljenja rane *in vitro* u usporedbi sa smjesom suspenzija praznih nanočestica i otopine melatonina, međutim nije postignuta razina statističke značajnosti $P < 0,05$. Utjecaj fizičkog uklapanja melatonina u nanočestice nije bio presudan za učinak ispitivanog sustava na cijeljenje rane *in vitro*. Ipak, nanočestice s uklopljenim melatoninom predstavljaju potencijalno vrijedan terapijski sustav koji može osigurati dulju stabilnost melatonina, a produljenim oslobađanjem njegovu manju koncentraciju u području rane te posljedično manju sistemsku izloženost melatoninu.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 7 grafičkih prikaza, 3 tablice i 52 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kitozan; Melatonin; Lecitin; Nanočestice; Cijeljenje rane *in vitro*

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

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

Dr. sc. Jasmina Lovrić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2015.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

COMPARISON OF THE EFFECT OF PHYSICAL MIXTURES AND MELATONIN-LOADED NANOPARTICLES ON WOUND HEALING *IN VITRO*

Marija Matičević

SUMMARY

Wound healing is a complex process involving integrated response of different cells and growth factors resulting in renewal of skin structure and functions. Innovative wound dressings are designed to provide optimal conditions for wound healing such as adequate wound humidity, temperature, pH, gaseous exchange and prevention/treatment of infection. The special attention is paid at (bio)polymers with the potential to improve wound healing by influencing migration/proliferation of skin cells, antimicrobial or haemostatic activity, as well as on polymeric nanosystems with the effect based on the content of the active compound, polymeric composition and its physico-chemical properties.

The aim of this work is to investigate the influence of physical entrapment of melatonin into lecithin/chitosan nanoparticles on wound healing *in vitro*. For that purpose, the effect of suspension of melatonin-loaded nanoparticles on wound healing was compared with the effect of suspension of melatonin-free nanoparticles mixed with melatonin solution, using human keratynocyte cell line in *in vitro* scratch test. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles were successfully prepared by ionic interaction between lecithin and chitosan. Four types of chitosan used differed in molecular weight (50-150 kDa or 150-400 kDa) and/or deacetylation degree (75-90 % or > 90 %). Nanoparticles had mean diameter ranging between 242.7 ± 3.5 – 263.4 ± 7.9 nm, positive zeta-potential (24.8 ± 0.4 – 30.6 ± 1.0 mV) and sufficient melatonin entrapment (3.6 ± 0.4 % - 3.8 ± 0.5 %). There was a trend towards improved effect of suspensions of melatonin-loaded nanoparticles on wound healing *in vitro* compared to suspensions of melatonin-free nanoparticles mixed with melatonin solution. However, the statistical significance level $p \leq 0.05$ was not achieved. Melatonin physical entrapment into nanoparticles was shown not to be crucial for the effect of system investigated on wound healing *in vitro*. However, melatonin-loaded nanoparticles represent potentially valuable delivery system which can provide prolonged melatonin stability and prolonged melatonin release resulting in lower melatonin concentration at the wound site and consequent lower systemic melatonin exposure.

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

Thesis includes: 43 pages, 7 figures, 3 tables and 52 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Chitosan; Melatonin; Lecithin; Nanoparticles; Wound healing *in vitro*

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

Reviewers: **Anita Hafner, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasmina Lovrić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Šegvić Klarić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2015.