

Biokompatibilne lipidno-alginatne nanočestice s velikom uspješnošću uklapanja deksametazona

Ćorić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:279001>

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](#)



Lucija Ćorić

Biokompatibilne lipidno-alginatne nanočestice s velikom uspješnošću uklapanja deksametazona

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner, iskreno zahvaljujem na pruženoj prilici, nesebičnoj podršci, strpljenju i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Biseri Jurišić Dukovski, mag. pharm. i Marini Juretić, mag. pharm. na strpljenju, savjetima i pomoći koje su mi pružile pri izradi eksperimentalnog dijela rada. Zahvaljujem kolegici Ivi Gomboc na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada. Hvala njoj i svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na ugodnom vremenu provedenom na Zavodu.

Veliko hvala mojoj obitelji, prijateljima i Luki na podršci i razumijevanju tijekom izrade diplomskog rada i tijekom cijeloga studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kortikosteroidi	1
1.1.1. Farmakodinamika i terapijska primjena kortikosteroida.....	1
1.1.2. Farmakokinetika kortikosteroida.....	2
1.1.3. Ograničenja primjene (nuspojave) kortikosteroida.....	3
1.2. Deksametazon	4
1.3. Putovi primjene deksametazona	4
1.3.1. Sistemska primjena deksametazona.....	4
1.3.2. Lokalna primjena deksametazona.....	6
1.3.3. Suvremena istraživanja.....	6
1.4. Terapijski nanosustavi deksametazona	8
1.4.1. Suspenzije nanokristala deksametazona.....	14
1.4.2. Polimerne nanočestice s deksametazonom	14
1.4.3. Lipidne nanočestice s deksametazonom.....	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME	19
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Materijali.....	21
3.2. Metode.....	22
3.2.1. Priprava nanočestica	22
3.2.2. Određivanje veličine i zeta-potencijala nanočestica.....	22
3.2.3. Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka.....	23
3.2.4. <i>In vitro</i> oslobađanje deksametazona iz nanočestica	24
3.2.5. Stanična linija i uvjeti uzgoja.....	25
3.2.6. Ispitivanje biokompatibilnosti nanočestica <i>in vitro</i>	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Veličina i zeta-potencijal nanočestica	27
4.2. Uspješnost uklapanja deksametazona	29
4.3. <i>In vitro</i> oslobađanje deksametazona iz nanočestica	30
4.4. Biokompatibilnost nanočestica <i>in vitro</i>	32
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA	36
7. SAŽETAK/ SUMMARY	43

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Kortikosteroidi

Kortikosteroidi su hormoni steroidne strukture koji mogu biti prirodnog ili sintetskog podrijetla. Dijelimo ih na glukokortikoide i mineralokortikoide. Mineralokortikoidi reguliraju zadržavanje vode i elektrolita vezanjem na visokoafinitetne mineralokortikoidne receptore (distalni bubrežni tubuli i druga tkiva povezana s Na^+/K^+ ravnotežom). Glukokortikoidi imaju brojne funkcije u tijelu, a njihovo djelovanje posljedica je vezanja na glukokortikoidne receptore (široka rasprostranjenost u tijelu) koji su nižeg afiniteta od mineralokortikoidnih receptora i selektivni su za glukokortikoide. Na mineralokortikoidne receptore se, osim mineralokortikoida, mogu vezati i glukokortikoidi (Buckingham, 2006).

Glukokortikoidi djeluju na imunološkoj i metaboličkoj razini, imaju protuupalno i imunosupresivno djelovanje. Poremećaj njihove regulacije i djelovanja povezuje se s etiologijom mnogih bolesti što objašnjava njihov velik terapijski potencijal (Buckingham, 2006).

Mehanizam djelovanja glukokortikoida može biti genomski (vezanje na unutarstanični nuklearni receptor te aktivaciju i supresiju transkripcijskih faktora) i negenomski, čija pozadina nije sa sigurnošću utvrđena. Postoji dvojba između nespecifičnog djelovanja na staničnu membranu mijenjanjem njezinih fizičko-kemijskih svojstava i specifičnog vezanja na membranske receptore. Glukokortikoidi mogu potaknuti apoptozu, primjerice stanica multiplog mijeloma ili limfocita, istovremeno inhibirajući apoptozu hepatocita, osteoklasta ili stanica vaskularnog endotela (Urbańska i sur., 2014).

1.1.1. Farmakodinamika i terapijska primjena kortikosteroida

Temeljni mehanizam protuupalnog djelovanja kortikosteroida je indukcija lipokortina-1 (aneksin-1) koji smanjuje aktivnost fosfolipaze A2, posljedično zaustavljajući sintezu eikosanoida, proupalno djelovanje leukocita te sintezu prostaglandina. Utišavanjem ekspresije ciklooksigenaze 1 i ciklooksigenaze 2 također zaustavlja sintezu prostaglandina. Imunosupresivno djelovanje kortikosteroida posljedica je inhibicije nuklearnog faktora κB . Tako se zaustavlja sinteza brojnih citokina što koči proliferaciju T i B limfocita, te sinteza adhezijskih proteina. Također djeluju proapoptotički na nezrele T limfocite (Newton i Holden, 2007; Revollo i Cidlowski, 2009).

Prva terapijska primjena glukokortikoida bila je u liječenju reumatoidnog artritisa. Danas se glukokortikoidi koriste u liječenju hepatitisa, sistemskog lupusa, eritematoze, sarkoidoze te za nadomjestak glukokortikoida kod Addisonove bolesti ili drugih oblika insuficijencije kore nadbubrežne žlijezde. Topikalno se primjenjuju s ciljem liječenja dermatitisa (dermalna primjena), uveitisa (oftalmička primjena), astme (pulmonalna primjena), alergijskog rinitisa (nazalna primjena) i ulceroznog kolitisa te Crohnove bolesti (enteralna primjena) (Urbańska i sur., 2014).

Mineralokortikoidi koriste se u liječenju adrenogenitalnog sindroma, sindroma cerebralnog gubitka soli, adrenalne insuficijencije te posturalne hipotenzije kako bi se nadomjestili fiziološki učinci aldosterona (Freitas i sur., 2000; Løvås i Husebye, 2008).

1.1.2. Farmakokinetika kortikosteroida

Kortikosteroidi se primjenjuju topikalno s ciljem postizanja lokalnog učinka (dermalna primjena, oftalmička primjena, mukozna primjena – nazalna primjena, inhalacija) te oralno ili intravenski (parenteralno) s ciljem postizanja sistemskog učinka. Uslijed velike lipofilnosti, apsorpcija kortikosteroida nakon oralne ili transdermalne primjene je opsežna. Primijenjeni oralno, brzo dostižu vršne koncentracije u plazmi. Još jedna posljedica njihove lipofilnosti je brz prijelaz u međustanični i unutarstanični prostor. U središnjem živčevlju (hipotalamus, hipofiza) vežu se i djeluju preko membranskih receptora, a u perifernim tkivima vežu na citoplazmatske receptore i djeluju preko njih. Prolaze kroz posteljicu i mogu se u malim količinama izlučivati u majčino mlijeko (www.halmed.com). U krvi se zadržavaju kratko, vezani na albumin različitim afinitetom. U jetri se brzo metaboliziraju konjugacijom s glukuronskom kiselinom ili sa sulfatom (u manjoj mjeri) te izlučuju urinom (McKay i Cidlowski, 2003).

Deksametazon se dobro apsorbira iz probavnog trakta; vršna koncentracija u plazmi dostiže se unutar jednog do dva sata nakon primjene, uz velike interindividualne varijacije vršnih koncentracija u plazmi i brzine dostizanja tih vrijednosti. U plazmi se zadržava u prosjeku $3,6 \pm 0,9$ sati.

Nakon intramuskularne primjene vršna koncentracija dostiže se nakon jednog sata, a do kliničkog učinka dolazi nakon 8 sati. Nakon lokalne primjene u zglob ili meka tkiva (lezije) apsorpcija je sporija nego nakon intramuskularne injekcije. Djelovanje je dugotrajno,

nakon intramuskularne primjene 17 do 28 dana, nakon lokalne primjene od 3 dana do 3 tjedna. Vrijeme polueliminacije je od 24 do 72 sata (www.halmed.com).

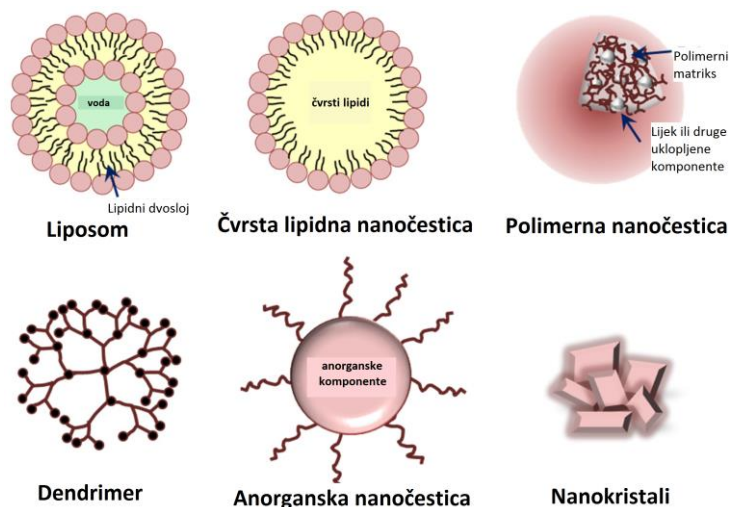
Deksametazon se veže na proteine plazme (uglavnom albumine) do približno 77%. Postotak vezanja deksametazona na proteine, za razliku od kortizola, ostaje praktički nepromijenjen čak i ako se lijek primjeni u višoj koncentraciji (www.halmed.com).

1.1.3. Ograničenja primjene (nuspojave) kortikosteroida

Utjecaj povećane razine glukokortikoida jednak je nuspojavama koje nastaju radi dugotrajne primjene egzogenih glukokortikoida. Neke od njih su redistribucija masnog tkiva, abdominalna pretilost, razgradnja proteina i mišićna slabost, hiperglikemija i diabetes mellitus rezistentan na inzulin, hipertenzija, hiperkolesterolemija, dislipidemija, retencija vode i soli, imunodeficijencija, osteoporoza, poremećaj menstrualnog ciklusa, neplodnost te, ponekad, oštećenje kognitivnih funkcija i depresija (Buckingham i sur., 2006).

Velika lipofilnost kortikosteroida zahtjeva velike doze ukoliko su primijenjeni kao klasični farmaceutski oblici (Urbańska i sur., 2014).

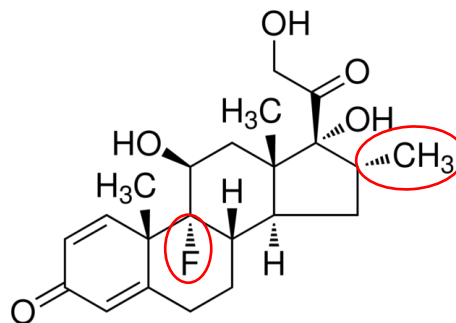
Unatoč brojnim nuspojavama, deksametazon se smatra jednim od najsigurnijih kortikosteroida (Urbańska i sur., 2014) što je dodatni razlog za pronalaženje novih, učinkovitijih i sigurnijih oblika za njegovu primjenu. Primjena glukokortikoida u obliku novih terapijskih sustava (Slika 1.) dovodi do smanjenja nuspojava, brže apsorpcije, veće bioraspodivnosti te selektivnosti u djelovanju lijeka.



Slika 1. Vrste nanočestica (preuzeto i prilagođeno prema Young Yhee i sur., 2016)

1.2. Deksametazon

Deksametazon (Slika 2.) je visoko potentan, dugodjelujući sintetski kortikosteroid pregnanske strukture. Kao analog kortizola, veže se na glukokortikoidne receptore, ali 11 puta većim afinitetom od kortizona što je postignuto dodatkom atoma fluora koji povećava lipofilnost molekule. Uvođenje atoma fluora također povećava vezanje na mineralokortikoidne receptore i protuupalno djelovanje (Foye i sur., 1995). Metilna skupina na atomu C16 povećava glukokortikoidne, a smanjuje mineralokortikoidne učinke (Bentley, 1980).



Slika 2. Struktura deksametazona
(9 α -fluoro-11 β ,17 α ,21-trihidroksi-16 α -metil-1,4-pregnadien-3,20-dion)
(preuzeto i prilagođeno prema Kim i Martin, 2006)

Trenutno se koristi za promicanje diferencijacije mezenhimalnih matičnih stanica u staničnim kulturama (Shrestha i sur., 2015), u oftalmologiji (uveitis), u liječenju proliferativne vitreoretinopatije, subretinalne neovaskularizacije i dijabetičkog makularnog edema. Također se koristi u liječenju alergijskih reakcija jer inhibira funkciju limfocita, fibroblasta, makrofaga i drugih imunskih stanica. U pedijatrijskoj hematologiji koristi se u liječenju akutne limfoblastične leukemije jer inducira apoptozu limfocita B i T (Urbańska i sur., 2014).

1.3. Putovi primjene deksametazona

1.3.1. Sistemska primjena deksametazona

Sistemski učinak deksametazona postiže se oralnom ili parenteralnom primjenom. Apsorpcija nakon oralne primjene dobra je radi njegove lipofilnosti. Za parenteralnom primjenom deksametazona poseže se ako oralna primjena nije moguća te u hitnim slučajevima gdje je brz početak djelovanja nužan (www.halmed.hr). Parenteralna primjena nužna je u akutnim stanjima poput anafilaktičkog šoka, cerebralnog edema, egzacerbacije

multiple skleroze te prilikom ugradnje privremenog transvenoznog stenta kako bi se smanjio upalni odgovor miokarda. Također se koristi kao prijelazno liječenje (kada temeljni lijekovi još ne djeluju u bolesnika u kojih nesteroidnim antireumaticima nije dostignut zadovoljavajući analgetski i protuupalni učinak) kod reumatoidnog artritisa i juvenilnog kroničnog artritisa. Tada se terapija najčešće započinje intravenskom ili intramuskularnom primjenom deksametazona, a nastavlja se oralnom primjenom deksametazona. Kronična stanja poput insuficijencije kore nadbubrežne žljezde, Addisonove bolesti ili kongenitalne adrenalne hiperplazije također zahtijevaju parenteralnu primjenu deksametazona ako se kortizon i hidrokortizon pokažu neučinkovitim.

Oralna primjena deksametazona izbor je pri liječenju multipla mijeloma (www.ema.eu), akutnih oblika leukemije, limfoma, miozitisa, trombocitopenijske purpore te običnog pemfigusa. Njegova primjena je prilično široka, oralno se primjenjuje i kod raznih vezivnotkivnih, kožnih, alergijskih, hematoloških i malignih bolesti, također u terapiji nekih bolesti bubrega, oka, dišnih i probavnih organa (www.halmed.com).

Sinergijski učinak deksametazona (primijenjenog oralno) i ondansetrona (antiemetik) koristi se u prevenciji mučnine u bolesnika na kemoterapiji ili radioterapiji (www.halmed.com).

Pripravci s deksametazonom za sistemsku primjenu registrirani u Hrvatskoj su tablete i otopina za injekciju (intravenska i intramuskularna primjena) ili infuziju (www.halmed.hr). Veliki nedostatak sistemske primjene deksametazona su brojne nuspojave (poglavlje 1.1.3.) koje se mogu umanjiti razvojem novih terapijskih sustava deksametazona. U tabličnom prikazu dva su primjera nanočestica kao terapijskih sustava deksametazona za oralnu primjenu (Tablica 1.). Uklanjanje deksametazona u lipidne nanočestice rezultiralo je poboljšanjem apsorpcije iz probavnog sustava (Serpe i sur., 2010). Razvijene su i mikročestice obložene nanočesticama koje omogućuju kontrolirano oslobađanje deksametazona. *In vitro* permeabilnost deksametazona preko monosloja Caco-2 stanica ovisila je o brzini oslobađanja deksametazona. Oslobađanje iz mikročestica obloženih nanokapsulama bilo je sporije od oslobađanja iz mikročestica obloženih nanosferama (Beck i sur., 2007).

1.3.2. Lokalna primjena deksametazona

Lokalna primjena kortikosteroida s ciljem postizanja lokalnog učinka ima brojne prednosti u odnosu na sistemsku: neinvazivna je i jednostavna što rezultira povećanom suradljivošću bolesnika, rezultira smanjenjem učestalosti i intenziteta sistemskih nuspojava i poboljšanom bioraspoloživošću lijeka na mjestu učinka. Lokalna primjena deksametazona obuhvaća dermalnu (razne autoimune kožne bolesti; atopijski dermatitis), okularnu primjenu (uveitis, dijabetički makularni edem) (Tanito i sur., 2011) te primjenu na sluznicu uha (otitis externa, otitis media). Pripravci s deksametazonom za lokalnu primjenu registrirani u Hrvatskoj su kapi, gel i mast za oko te okularni implantat (www.halmed.com).

Lokalni učinak može biti postignut i parenteralnom primjenom deksametazona kao što je intravitrealna (akutne neinfektivne upalne bolesti oka, makularni edem) ili intraartikularna primjena (različiti oblici artritisa i spondilitisa) (www.halmed.com).

Postojao je oblik deksametazona u spreju za nazalnu primjenu, ali povučen je radi ozbiljnih lokalnih i sistemskih nuspojava (Kovarsky i Bishop, 1982). Trenutno nema registriranih pripravaka s deksametazonom za nazalnu niti pulmonalnu primjenu, u Hrvatskoj ni u svijetu. Istražuje se potencijal novih terapijskih sustava s ciljem dostave deksametazona u pluća (Fornaguera i sur., 2015; Kim i sur., 2013).

1.3.3. Suvremena istraživanja

Fokus suvremenih istraživanja uglavnom je na razvoju terapijskih sustava s modificiranim (produljenim ili odgođenim) oslobađanjem deksametazona za intraartikularnu (Butoescu i sur., 2007), transdermalnu (Sahle i sur., 2016), dermalnu (Doge i sur., 2016), okularnu (Pan i sur., 2015), intravitrealnu (Gómez-Gaete i sur., 2008) primjenu te primjenu u korijenski kanal zuba (Shrestha i sur., 2015).

Deksametazon, kao najučinkovitiji i najpotentniji kortikosteroid u liječenju bolesti oka (Ohira i sur., 2015), oblikovan u klasični farmaceutski oblik, ne postiže puni terapijski potencijal. Permeabilnost i bioraspoloživost lijeka nakon primjene u obliku kapi za oko niske su zbog zaštitnih mehanizama poput kornealnog epitela, ispiranja oka suznom tekućinom, barijere krv – očna vodica i krv – mrežnica (www.halmed.hr). S druge strane, invazivni postupci primjene lijeka putem injekcija ili implantata (www.ema.eu) nose rizik komplikacija (krvarenje, infekcija, upala, katarakta). Osim toga, kirurški postupak je skup. Kako bi se

postigla odgovarajuća koncentracija deksametazona u oku nakon sistemske primjene, nužne su visoke koncentracije lijeka u krvi, a deksametazon ima ozbiljne nuspojave. Stoga kontrolirana, kontinuirana dostava lijeka na ciljno mjesto pomoću nanočestica nosi velik napredak u liječenju upalnih bolesti oka. Ispiranje suznom tekućinom može se smanjiti povećanjem viskoznosti sustava (Achouri i sur., 2012; Lihong i sur., 2012) i korištenjem mukoadhezivnih polimera (Di Colo i sur., 2002). Biokompatibilnost nanočestica kao i njihovih razgradnih produkata može se postići pripremom terapijskog sustava bez upotrebe organskih otapala koji mogu djelovati toksično na strukture oka (Rodrigues da Silva i sur., 2011). Uklapanjem deksametazona u terapijske sustave moguće je postići dulju stabilnost i veću bioraspoloživost deksametazona (Kalam, 2016).

Kako bi se dermalnom primjenom lijeka oblikovanog u konvencionalni pripravak postigao lokalni učinak podloga mora ući u rožnati sloj, lijek se mora osloboditi iz podloge, penetrirati kroz slojeve kože te ući u oboljelu stanicu gdje ostvaruje učinak. Veliki nedostatak dermalne primjene lijekova je slaba permeabilnost kroz slojeve kože zbog niske propusnosti rožnatog sloja. Samo lijekovi male molekularne mase (< 500 Da) i odgovarajuće lipofilnosti mogu proći rožnati sloj pasivnim transportom. Stoga se istražuju različite strategije povećanja penetracije lijekova u kožu: primjena mikroigala, elektroporacija, iontoforeza, sonoforeza te primjena nanonosaa lijeka. Nanonosaa omogućuju samostalnu primjenu od strane bolesnika i aplikaciju na veće područje kože stoga su posebice zanimljivi (Du i sur., 2016). Dermalna primjena deksametazona poboljšana je uklapanjem deksametazona u polimerne nanočestice (Du i sur., 2016) zahvaljujući smanjenju nuspojava, boljoj dostavi u kožu, većoj stabilnosti i manjoj citotoksičnosti. Brže prodiranje deksametazona u kožu postignuto je i dermalnom primjenom suspenzije nanokristala lijeka (Doge i sur., 2016).

Prednosti pulmonalne primjene lijeka u obliku novih terapijskih sustava su brojne. Naime, takvim pristupom moguće je poboljšati topljivost lijeka, osigurati bolju raspodjelu doze unutar alveola, opsežniju internalizaciju lijeka u stanice, kontrolirano oslobađanje ili primjenu lijeka veće molekulske mase. Najistraživaniji terapijski sustavi za pulmonalnu primjenu su mikročestice, zatim nanočestice (polimerne, čvrste lipidne nanočestice), nanoemulzije, liposomi, a rjeđe micelle i dendrimeri. Smanjenje čestica lijeka na nanometarsku veličinu može rezultirati povećanjem bioraspoloživosti uslijed veće topljivosti i veće koncentracije lijeka na mjestu apsorpcije, ali i smanjene fagocitoze makrofagima (Illum, 2012). U ispitivanju provedenom u laboratorijskih miševa, pulmonalna primjena deksametazona uklopljenog u polimerne nanočestice rezultirala je lakšom internalizacijom

lijeka u plućne epitelne stanice, duljim zadržavanjem u dubokom plućnom tkivu, učinkovitijim snižavanjem lučenja citokina iz stanica stimuliranih lipopolisaharidima te značajnim terapijskim učincima na eozinofilnu/neutrofilnu astmu (Kim i sur., 2013).

1.4. Inovativni terapijski nanosustavi deksametazona

Tablica 1 donosi pregled razvijenih terapijskih nanosustava deksametazona uz sažeti prikaz sastava, metode pripreme, puta primjene te cilja i rezultata uklapanja deksametazona za svaki od nanosustava.

Tablica 1. Sažeti prikaz radova o novim terapijskim sustavima s deksametazonom

POLIMERI I LIPIDI	METODA PRIPRAVE	PUT PRIMJENE	CILJ UKLAPANJA	KOMENTAR	LITERATURA
Kitozan	Ionotropno geliranje Uklapanje lijeka u nanočestice/adsorpcija lijeka na nanočestice Liofilizacija	Primjena u korijenski kanal zuba <i>In vitro</i> ispitivanje provedeno na dentalnim matičnim stanicama apikalne zubne papile	Kontrola mjesta i vremena odontogene diferencijacije dentalnih matičnih stanica apikalne zubne papile	Produljeno oslobađanje lijeka tijekom 4 tjedna i kontrolirana diferencijacija stanica	Shrestha i sur., 2015
PLGA Alginat (alginatni hidrogel)	Metoda otparavanja otapala iz U/V emulzije Priprava hidrofilnog matriksa umrežavanjem alginata s CaCl ₂	Neuralni implantat (elektroda)	Dobra električna provodljivost i produljeno oslobađanje lijeka (>2 tjedna)	Zadovoljavajuća električna provodljivost tijekom 3 tjedna; produljeno oslobađanje lijeka (mjereno tijekom 3 tjedna)	Kim i Martin, 2006
PLGA	Metoda otparavanja otapala iz V/U/V emulzije Oblaganje PLGA nanočestica s deksametazonom s siRNA	Intraartikularna primjena <i>In vitro</i> ispitivanje provedeno na humanim hondrocitima	Smanjenje genske ekspresije proteina povezanih s reumatoidnim artritismom na humanim hondrocitima	Smanjena genska ekspresija proteina povezanih s reumatoidnim artritismom na humanim hondrocitima	Park i sur., 2012
Poli(trimetilenkarbonat), PVA (stabilizator) Monometoksi poli(etilenglikol)-blok-poli(trimetilenkarbonat) (mPEG ₃ -PTMC ₁₁)	Isoljavanje Metoda otparavanja otapala iz U/V emulzije Liofilizacija	/	Kontrolirano oslobađanje lijeka	Dugotrajnija stabilnost nanočestica (20 tjedana), produljeno oslobađanje (14-60 dana)	Zhang i sur., 2006
PLGA 1,2-dipalmitoil-sn-	Metoda otparavanja otapala iz U/V emulzije	Intravitrealna primjena	Modificirano oslobađanje lijeka	Odgodeno oslobađanje lijeka, uz naglo početno	Gómez-Gaete i sur., 2008

glicero-3-fosfokolin (DPPC)	Sušenje raspršivanjem DPPC, hijaluronske kiseline i suspenzije nanočestica			oslobađanje	
PLA PLGA 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfokolin	Metoda otparavanja otapala iz U/V emulzije	Okularna primjena Intraartikularna primjena	Optimiranje uklapanja i oslobađanja lijeka iz biorazgradljivih PLGA nanočestica pri okularnu primjenu	Neuspješno optimiranje uklapanja lijeka	Gómez-Gaete i sur., 2007
Stearinska kiselina Na – taurokolat Fosfatidilkolin Kolesteril butirat Butanol	Solidifikacija lipidnih nanočestica raspršivanjem mikroemulzije u vodi	Oralna primjena	Veća učinkovitost i manje nuspojava pri oralnoj (sistemske) primjeni lijeka	Veća učinkovitost lijeka radi bolje apsorpcije iz čvrstih lipidnih nanočestica	Serpe i sur., 2010
Poliuretan PCL oligomeri Montmorilonit glina	Dispergiranje gline u vodi te miješanje s vodenom disperzijom poliuretana u koji je uklopljen lijek	Okularna primjena	Terapijski sustav u čijoj pripravi nisu korištena organska otapala	Biokompatibilnost nanočestica i njihovih razgradnih produkata <i>in vitro</i> ; brzo oslobađanje lijeka	Rodrigues da Silva i sur., 2011
Eudragit S100 Span 60 Tween 80	Metoda precipitacije Ukoncentriravanje nanočestica isparavanjem pod sniženim tlakom Mikročestice su obložene nanočesticama sušenjem raspršivanjem	Oralna primjena	Konstantna koncentracija lijeka u plazmi, bolja bioraspoloživost, smanjena varijabilnost bioraspoloživosti između doza	Utvrđena je korelacija između brzine permeacije lijeka preko Caco-2 monosloja i brzine oslobađanja lijeka iz terapijskog sustava; Sporije oslobađanje lijeka iz mikročestica obloženih nanokapsulama u odnosu na mikročestice obložene nanosferama	Beck i sur., 2007

PLGA	V/U/V metoda Liofilizacija	Intraartikularna primjena	Sporija eliminacija iz zgloba, postupno oslobađanje lijeka, izostanak nuspojava, dulje zadržavanje mikročestica sa supramagnetskim željezovim oksidom pri djelovanju vanjskog magnetskog polja	Produljeno oslobađanje (mjereno tijekom 8 dana)	Butoescu i sur., 2007
Eudragit® L 100	Nanoprecipitacija	Transdermalna primjena	Evaluacija nanočestica kao dermalnih nosača i postizanje različite brzine oslobađanja lijeka	Biokompatibilnost nanočestica <i>in vitro</i> ; Sporije oslobađanje lijeka pri bubrenju nanočestica u odnosu na oslobađanje pri eroziji nanočestica	Sahle i sur., 2016
PVA Etilceluloza Eudragit® RS Stearoil makrogol gliceridi Čvrsti trigliceridi s hidrogeniranim gliceridima ulja kokosa, pčelinjim voskom i esterima polioksietilena (eng. <i>ceteareth-25</i>) kao aditivima (Witepsol® S55) HEC	Vlažno kuglično mljevenje (priprava suspenzije nanokristala) Metoda otparavanja otapala (priprava polimernih nanočestica) Priprava lipidnih nanočestica visokotlačnom homogenizacijom	Dermalna primjena	Usporedba različitih <i>in vitro</i> metoda ispitivanja oslobađanja lijeka iz terapijskih nanosustava za dermalnu primjenu	Utvrđena je najveća prikladnost primjene Franz difuzijske ćelije pri ispitivanju oslobađanja lijeka iz sustava ispitanih u radu	Balzus i sur., 2016
Hiperrazgranati poliglicerol (jezgra) Diblok kopolimeri PCL i PEG (vanjska ljuska)	Metoda otparavanja otapala	Dermalna primjena	Manje nuspojava, bolja dostava lijeka	Manje nuspojava, bolja dostava u kožu, dobra stabilnost, niska citotoksičnost, lagani	Du i sur., 2016

				prijenos na uvećano mjerilo	
Etilceluloza	Vlažno kuglično mljevenje (priprava suspenzije nanokristala) Metoda otparavanja otapala (priprava polimernih nanočestica)	Dermalna primjena	Modificirano oslobađanje lijeka iz različitih ljekovitih oblika	Značajno brža penetracija lijeka u kožu pri primjeni suspenzije nanokristala; Odgodeno oslobađanje i penetracija lijeka uklopljenog u nanočestice	Doge i sur., 2016
PLGA	Metoda otparavanja otapala	Placentarni prijenos lijeka fetusu	Poboljšanje transporta lijeka kroz ljudsku placentu	Poboljšani transport lijeka kroz ljudsku placentu više od 10 puta	Ali i sur., 2013.
PLGA Polisorbat 80	Metoda otparavanja otapala	Pulmonalna primjena	Smanjenje toksičnosti i hemolitičkih učinaka inhaliranog lijeka	Utvrđena je biokompatibilnost disperzija nanočestica <i>in vitro</i>	Fornaguera i sur., 2015
Poli(fenilacetilen) Poli(fenilacetilen-ko-akrilat) (P(PA-co-AA))	Nanočestice su pripravljene metodom s jednom emulzijom bez surfaktanta	/	Modificirano oslobađanje lijeka iz različitih polimernih nanočestica	Kopolimer P(PA-co-AA) pokazuje povećanu sposobnost uklapanja lijeka, uz kontrolu veličine, naboja i oslobađanja;	Fratoddi i sur., 2012
Kitozan Na-tripolifosfat Hijaluronska kiselina	Ionotropno geliranje	Okularna primjena	Povećanje bioraspoloživosti okularno primijenjenog lijeka	Dobra stabilnost (mjerena tijekom 3 mj.) Visoka koncentracija na površini oka i dostava u prednje i stražnje očne komore pri primjeni lijeka uklopljenog u nanočestice	Kalam, 2016
Flt1 peptid HA konjugati	Konjugiranje peptida i polimera	Pulmonalna primjena	Povećanje učinkovitosti liječenja neutrofilne astme	Učinkovita internalizacija u plućne epitelne stanice; Dugotrajno zadržavanje	Kim i sur., 2013

				u dubokom plućnom tkivu; Učinkovitije snižavanje lučenja citokina iz stanica stimuliranih lipopolisaharidima; Značajni terapijski učinci na eozinofilnu / neutrofilnu astmu u miša	
PLGA	Metoda difuzije otapala	Okularna, subkonjunktivalna primjena	Produljeno oslobađanje lijeka	Održavanje konstantne koncentracije lijeka u ciljnom tkivu barem 7 dana nakon subkonjunktivalne primjene u štakora	Pan i sur., 2015
Polietilenglikolom obložen polilaktid (PEG-PLA)	Metoda otparavanja otapala iz U/V emulzije	Intraperitonealna primjena	Smanjenje nuspojava i povećanje učinkovitosti: uspoređem eliminacije lijeka iz cirkulacije i povećanjem raspoloživosti lijeka u unutarnjem uhu nakon sistemske primjene	Smanjenje nuspojava i povećanje učinkovitosti lijeka – očuvanje bubnjača na funkcionalnoj i histološkoj razini	Sun i sur., 2016
3-merkaptio-1-propansulfonat (3MPS)	Redukcija u vodenoj otopini H _{Au} C ₁₄ s natrijevim borohidridom uz 3MPS	/	Razvoj nanočestica s velikim uklapanjem lijeka i produljenim oslobađanjem	Uspješnost uklapanja 70-80% i produljeno oslobađanje tijekom 5 dana (70%)	Venditti i sur., 2014

PLGA – polimer mliječne i glikolne kiseline; PLA – polimer mliječne kiseline; PVA – polivinil alkohol; HEC – hidroksietilceluloza; PCL – polikaprolakton; PEG – polietilenglikol

1.4.1. Suspenzije nanokristala deksametazona

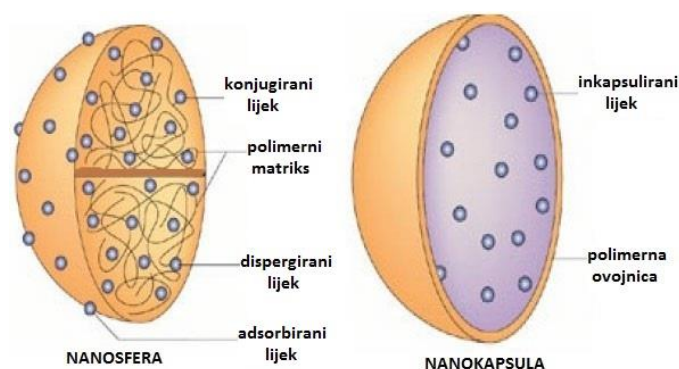
Nanokristali djelatne tvari kao farmaceutski oblik počeli su se razvijati tijekom devedesetih godina prošlog stoljeća. Njihova je specifičnost, ujedno i prednost, što ne sadrže nanonosače već samo djelatnu tvar i stabilizator (u vrlo malom udjelu). To uklanja potrebu toksikološkog ispitivanja nanonosača koje je skupo i dugotrajno. Proizvode se kako bi se poboljšala topljivost i bioraspoloživost teško topljivih djelatnih tvari, uz smanjenje nuspojava. Trenutno su registrirani ljekoviti pripravci s djelatnom tvari u obliku nanokristala za parenteralnu (intramuskularnu) i oralnu primjenu (Lovrić i sur., 2015). U slučaju deksametazona koji je također slabo topljiv lijek, ispitana je dermalna primjena suspenzije nanokristala (Doge i sur., 2016). Uočena je brža penetracija lijeka u kožu u odnosu na kremu s deksametazonom ili nanočestice kao nosače deksametazona. Razlog tome je veća adhezivnost nanokristala (veći broj manjih čestica – veća specifična površina) i brže otapanje. Pri dermalnoj ili oralnoj primjeni, nanokristali nose vrlo nizak rizik od nuspojava ili toksičnosti. Kod parenteralne primjene bitna je količina koju internaliziraju makrofagi mononuklearnog fagocitnog sustava. Taj proces može utjecati na razinu lijeka u krvi uslijed produljenog oslobađanja iz mononuklearnog fagocitnog sustava, ali i uzrokovati toksične učinke lijeka zbog velike koncentracije u pojedinim organima (Müller i sur., 2011).

Prednost izrade nanokristala također je jednostavna prilagodba industrijskom mjerilu (10 mg – 500 kg) (Lovrić i sur., 2015). Trenutno se za izradu nanokristala koriste vlažno mljevenje i visokotlačna homogenizacija ili kombinacije tih dvaju metoda. Vlažnim mljevenjem dobiveni su kristali deksametazona (Doge i sur., 2016) tako što je suspenzija lijeka miješana s kuglicama od cirkonija tijekom 3h. Na kraju su veće čestice uklonjene filtracijom. Visokoenergijski proces visokotlačne homogenizacije temelji se na prolasku suspenzije lijeka velikom brzinom kroz mali otvor (10 μ m). Čestice lijeka usitnjene su radi kavitacije, sudara s drugim kristalima i sa čeličnim zidom te radi sile otpora tekućine (Müller i sur., 2011).

1.4.2. Polimerne nanočestice s deksametazonom

Polimerne nanočestice su kao terapijski sustavi nosači djelatne tvari veličine od 1 do 1000 nm. Dijeleg se na nanokapsule (spremišni tip), koje sadrže lijek u jezgri, i nanosfere (matriksni tip), koje imaju lijek uklopljen u matriks ili adsorbiran na površini (Slika 3). Osim

što uspješno dostavljaju lijek na mjesto djelovanja, štite ga od prerane razgradnje. Količina uklopljenog lijeka u polimerne nanočestice može se lako mijenjati promjenom polimernog sastava. Specifične funkcionalne skupine mogu se vezati na površinu nanočestica što omogućuje ciljanu dostavu lijeka u željeno tkivo i smanjuje nuspojave. Produljeno oslobađanje lijeka dovodi do rjeđe primjene lijeka i poboljšanja suradljivosti pacijenta (Fornaguera i sur., 2015). S druge strane, nanočestice pokazuju neke nedostatke u usporedbi s mikročesticama. Sklonije su agregaciji u suhom obliku, dok u vodenoj suspenziji mogu biti razgrađene hidrolizom ili mogu sedimentirati.



Slika 1. Vrste polimernih nanočestica (preuzeto i prilagođeno prema Sharma i sur., 2014)

Polimerne nanočestice mogu biti pripremljene polimerizacijom monomera ili disperzijskim tehnikama iz prethodno formiranih polimera. Disperzijske tehnike obuhvaćaju otparavanje otapala, nanoprecipitaciju/zamjenu otapala, emulgiranje/difuziju otapala, isoljavanje, dijalizu ili dispergiranje pomoću superkritičnog fluida. Nanoprecipitacija je reproducibilna i brza metoda sastavljena od samo jednog koraka. Temelj metode je nastanak koloidne suspenzije na granici organske i vodene faze. Organska faza, u kojoj su otopljeni polimer i lijek, injektira se u vodenu fazu u kojoj polimer nije topljiv. Vodena faza se miješa kako bi se formirala koloidna suspenzija. Miješanje se nastavlja dok se ne oblikuju nanokapsule. Organsko se otapalo zatim otpari (Balzus i sur., 2016).

Polimerne nanočestice često se pripravlja iz nanoemulzija, metodom otparavanja otapala. Nanoemulzija može biti U/V tipa (Kim i Martin, 2006; Zhang i sur., 2006; Gómez-Gaete i sur., 2007; Gómez-Gaete i sur., 2008; Ali i sur., 2013; Fornaguera i sur., 2015; Balzus i sur., 2016; Doge i sur., 2016; Du i sur., 2016; Sun i sur., 2016) ili V/U/V tipa (Butoescu i sur., 2007; Park i sur., 2012). Nanoemulzije su emulzije s veličinom kapljica između 20 i 500

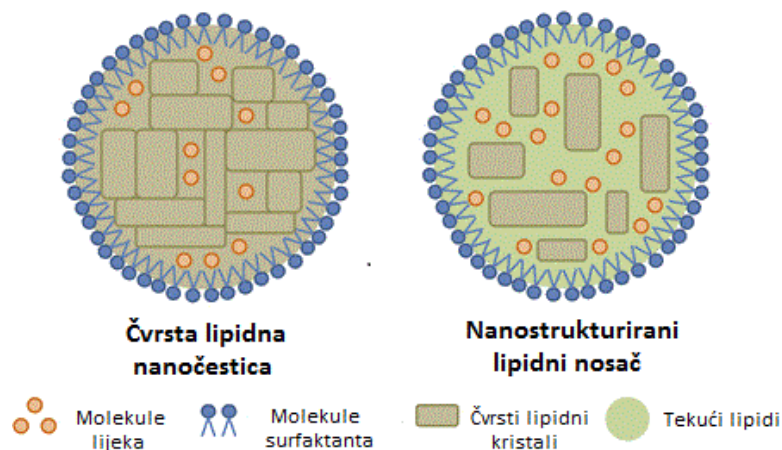
nm. Pokazuju visoku kinetičku stabilnost, prozirne su i zahtjevaju utrošak energije pri nastajanju. Uobičajena metoda njihove priprave je inverzija faza emulzije. Pritom je bitno da je korišteno otapalo prikladno za biomedicinsku primjenu te da su uvjeti pri kojima se metoda izvodi blagi i sigurni (Fornaguera i sur., 2015).

Isoljavanje je temeljeno na emulgiranju polimerne otopine (otapalo koje se miješa s vodom) i vodene otopine soli. Faze se ne miješaju radi velike koncentracije soli. Dodatkom vode, nanočestice se formiraju kako organsko otapalo prelazi u vodenu fazu (Zhang i sur., 2006).

Često korišten polimer za pripremu polimernih nanočestica je kopolimer mliječne i glikolne kiseline (poli(laktid-ko-glikolična kiselina), PLGA) (Kim i Martin, 2006; Park i sur., 2012; Gómez-Gaete i sur., 2008; Gómez-Gaete i sur., 2007; Ali i sur., 2013; Butoescu i sur., 2007; Fornaguera i sur., 2015; Pan i sur., 2015) jer je biokompatibilan i biorazgradljiv. Klinički je dokazane sigurnosti i odobren je od strane Europske agencije za lijekove (Danhier i sur., 2012). Kao stabilizator, koristi se polisorbit 80, surfaktant koji nema toksične niti hemolitičke učinke (Fornaguera i sur., 2015). Kitozan je linearni aminopolisaharid, biokompatibilan i biorazgradljiv. Pokazuje antimikrobnu aktivnost (Shrestha i sur., 2015). Osim njih, koriste se alginat, želatina, polietilenimin i drugi. Politrimetilen karbonat (PTMC) razgrađuje se *in vivo* erozijom na komponente koje nisu kisele (kiselost razgradnih produkata poliestera može biti štetna za lijek), a njegovi homopolimeri i blok kopolimeri s monometoksi polietilenglikolom (mPEG-PTMC) stabilni su u vodi. Razgrađuju se tek pomoću lipaza, enzimatskom erozijom površine što je prikladno svojstvo za izradu nanočestica (Zhang i sur., 2006). Dipalmitoil glicerofosfatidilkolin (DPPC) i hijaluronska kiselina također su biokompatibilni i biorazgradljivi stoga su korišteni za oblikovanje nanočestica metodom otparavanja otapala iz U/V emulzije (Gómez-Gaete i sur., 2008). Ista metoda korištena je za izradu nanočestica iz polilaktida (PLA) ili PLGA (Gómez-Gaete i sur., 2007). Razvijene su nanosfere i nanokapsule iz Eudragita S100 (amonij metakrilat kopolimer tipa B) (Beck i sur., 2007). Polikaprolakton (PCL) je pogodan za izradu nanočestica jer omogućuje prilagodbu veličine čestica i sadržaja uklopljenog lijeka. Polietilenglikol (PEG) može stabilizirati nanonosae u vodi sprječavajući njihovu agregaciju (Du i sur., 2016).

1.4.3. Lipidne nanočestice s deksametazonom

Lipidne nanonosače možemo podijeliti na čvrste lipidne nanočestice (engl. *solid lipid nanoparticles*, SLN) i nanostrukturirane lipidne nosače (engl. *nanostructured lipid carriers*, NLC), nove terapijske sustave veličine manje od 1000 nm (Slika 4.). Sastavljeni su od biokompatibilnih i biorazgradljivih lipofilnih komponenti i visoke su fizičke stabilnosti. Velika im je prednost što su jeftiniji i njihova priprava se lakše prevodi na industrijsko mjerilo u odnosu na bilo koji drugi nanonosač. Brže se razgrađuju u odnosu na polimerne nanočestice, no moguće je i produljeno ili kontrolirano oslobađanje lijeka (Barbosa i sur., 2016). Vrlo mala veličina osigurava dobar kontakt s kožom, stoga i bolju penetraciju lijeka u kožu. Moguće je postići okluzivne uvjete i bolju hidrataciju kože (Balzus i sur., 2016).



Slika 2. Vrste lipidnih nanočestica (preuzeto i prilagođeno prema Yingchoncharoen i sur., 2016)

Čvrste lipidne nanočestice prva su generacija nanočestica (1991.). Sastavljene su od čvrstih lipida (0.1-30%, m/m) (pročišćeni trigliceridi, kompleksne smjese glicerida i voskova), surfaktanta (0.5-5%, m/m) i vode. Prikladne su za pulmonalnu primjenu lijekova s lokalnim ili sistemskim djelovanjem. Proizvode se iz mikroemulzija, precipitacijom, visokotlačnom homogenizacijom ili raspršivanjem talina u struji hladnog zraka (engl. *spray congealing*) (Rainer i sur., 2000).

Čvrste lipidne nanočestice sastavljene od natrijeva butirata ili kolesteril-butirata poboljšavaju protuupalni učinak perifernih mononuklearnih stanica. Povećavaju njihovu sposobnost adhezije na stanice vaskularnog endotela, proizvodnju superoksidnog iona (O_2^-) i

oslobađanje mijeloperoksidaze *in vitro*. U proizvodnji SLN korišteni su stearinska kiselina kao lipidni matriks, fosfatidilkolin kao surfaktant i natrijev taurokolat kao kosurfaktant. Napravljena je topla mikroemulzija od lipidnih sastavnica koja je dispergirana u hladnoj vodi (Serpe i sur., 2010).

Nanostrukturirani lipidni nosači pokazuju bolja svojstva od SLN jer su sastavljeni od smjese čvrstih i tekućih lipida. Radi toga imaju više šupljina koje omogućuju uklapanje veće količine lijeka. Osim toga, time je onemogućena prerana kristalizacija i oslobađanje lijeka prilikom skladištenja. Često korištene čvrste lipidne komponente su pčelinji vosak, karnauba vosak, stearinska kiselina i druge. Tekuće lipidne komponente mogu biti Miglyol (dekanoična i oktanoična kiselina, glicerol), oleinska kiselina, palmino ili maslinovo ulje i druge. Kao emulgatori dolaze Pluronic i Tween. Mogu se izraditi toplom ili hladnom visokotlačnom homogenizacijom, metodom difuzije otapala, tehnologijom sa superkritičnim fluidom ili metodom dvostruke emulzije. Najčešće je korištena metoda difuzije otapala (Selvamuthukumar i Velmurugan, 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Glukokortikoidi su hormoni steroidne strukture koji mogu biti prirodnog ili sintetskog podrijetla. Djeluju na imunološkoj i metaboličkoj razini, protuupalno i imunosupresivno. Poremećaj njihove regulacije i djelovanja povezuje se s etiologijom mnogih bolesti što objašnjava njihov veliki terapijski potencijal (Buckingham, 2006). Dijelimo ih na glukokortikoide i mineralokortikoide.

Danas se glukokortikoidi koriste u liječenju hepatitisa, sistemskog lupusa, eritematoze, sarkoidoze te za nadomjestak glukokortikoida kod Addisonove bolesti ili drugih oblika insuficijencije kore nadbubrežne žlijezde. Topikalno se primjenjuju s ciljem liječenja dermatitisa (dermalna primjena), uveitisa (oftalmička primjena), astme (pulmonalna primjena), alergijskog rinitisa (nazalna primjena) i ulceroznog kolitisa te Crohnove bolesti (enteralna primjena) (Urbańska i sur., 2014).

Unatoč brojnim nuspojavama, deksametazon se smatra jednim od najsigurnijih glukokortikoida što je dodatni razlog za pronalaženje novih, učinkovitijih i sigurnijih oblika za njegovu primjenu. Primjena glukokortikoida u obliku novih terapijskih sustava dovodi do smanjenja nuspojava, brže apsorpcije, veće bioraspoloživosti te selektivnosti u djelovanju lijeka. Dosad su razvijeni brojni terapijski sustavi s deksametazonom: nanokristali, mikročestice, lipidne i polimerne nanočestice.

U ovome radu pripravljene su lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom. Alginat se često koristi u pripravi terapijskih nanosustava zahvaljujući njegovoj biokompatibilnosti, biorazgradljivosti te mukoadhezivnosti (Gombotz i Wee, 1998). Lipidi korišteni u pripravi nanočestica su lecitin S45 (u svom sastavu ima 45% fosfatidilkolina) i dimetildioktadecil amonij bromid. Lecitin je smjesa fosfolipida koja posjeduje emulgirajuća svojstva. Prikladan je za izradu nosača lipofilnih lijekova, siguran je i biokompatibilan (Clementino i sur., 2016). Dimetildioktadecil amonij bromid je tetraalkil amonijev spoj. Sadrži dugi alkilni lanac zahvaljujući kojemu ima lipofilna svojstva. U izradi nanočestica korišten je kako bi omogućio elektrostatsku interakciju lipidne smjese s negativno nabijenim alginatom (Plantić, 2017).

Lipidno-alginatne nanočestice pripravljene s lecitinom S100 (> 94% fosfatidilkolina) već su ranije ispitane i pokazale su se prikladnim sustavom za uklapanje deksametazona

(Plantić, 2017). Cilj ovog rada bio je pripremiti lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom koristeći lecitin S45 kao glavnu lipidnu sastavnicu, odrediti im fizičko-kemijska svojstva te ispitati biokompatibilnost *in vitro*. Pripravljene nanočestice karakterizirane su s obzirom na veličinu i raspodjelu veličina nanočestica, površinski naboj, sadržaj i profil oslobađanja uklopljenog lijeka. Biokompatibilnost nanočestica s deksametazonom određena je praćenjem metaboličke aktivnosti imortaliziranih stanica humanog epitela rožnice (HCE-T) nakon tretiranja suspenzijama nanočestica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U ovome istraživanju, za pripravu lipidno-alginatnih nanočestica korišten je dimetildioktadecil amonij bromid (DDAB; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka), lecitin S45 (Lipoid GmbH, Njemačka) i natrijev alginat (Protan, Norveška). U nanočestice je uklopljen lijek, deksametazon (Sanofi Aventis, Francuska). Etanol (96%, Kemig, Hrvatska) je korišten za pripravu otopine lecitina. Otopina NaCl (10 mM, Kemig, Hrvatska) korištena je za razjeđivanje suspenzija nanočestica prije mjerenja zeta-potencijala. Puffer balansirani Hankovim solima (engl. *Hank's balanced salt solution*, HBSS; pH 7,4) pripremljen je otapanjem bezvodnog kalcijevog klorida (CaCl_2 bezvodni; 140 mg L^{-1}), magnezijevog klorida ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 100 mg L^{-1}), magnezijevog sulfata ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 100 mg L^{-1}), kalijevog klorida (KCl; 400 mg L^{-1}), kalijevog dihidrogenfosfata (KH_2PO_4 ; 60 mg L^{-1}), natrijevog bikarbonata (NaHCO_3 ; 350 mg L^{-1}), natrijevog klorida (NaCl; 8000 mg L^{-1}); dinatrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4 bezvodni; 48 mg L^{-1}), D-glukoze (1000 mg L^{-1}) i 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetsulfonske kiseline (HEPES; 30 mM) u pročišćenoj vodi. Korištena je natrijeva lužina (T.T.T. d.o.o., Hrvatska) za podešavanje pH pufera balansirani Hankovim solima. Ispitivanje biokompatibilnosti lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom provedeno je na HCE-T/R stanicama (engl. *Human Corneal Epithelial cells – Transformed*, #158, Švicarska). Medij korišten za uzgoj stanica je DMEM F-12 (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), a sadržavao je dimetilsulfoksid (DMSO, engl. *Dimethyl sulfoxide Cell culture grade*, AppliChem GmbH, Njemačka), epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal Growth factor E9644-ZMG*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka), humani inzulin (engl. *Insulin solution human*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka), fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovine serum Heat Inactivated*, Biosera, Missouri, SAD) te antibiotike (penicilin, streptomycin, amfotericin B, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka). U pripremi stanica za određivanje vijabilnosti korišteni su tripsin (Trypsin 2,5%, Lonza, Belgija), EDTA (200mg/L Versene (EDTA), Lonza, Belgija) i fosfatni puffer (PBS, engl. *Phosphate Buffered Saline*; Lonza, Belgija). Za određivanje viabilnosti stanica nakon tretiranja suspenzijom nanočestica s lijekom korišten je [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-25-difeniltetrazol bromid] (MTT; BioChemica, AppliChem, Njemačka) i izopropanol (VWR Chemicals, Francuska).

3.2. Metode

3.2.1. Priprava nanočestica

Za pripravu lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom etanolna faza pripravljena je otapanjem lecitina S45 (25 mg ml⁻¹), kationskog lipida (DDAB; 0,2 mg ml⁻¹, 0,28 mg ml⁻¹, 0,32 mg ml⁻¹ ili 0,36 mg ml⁻¹) i deksametazona (5 mg ml⁻¹) u 96 %-tnom etanolu. Maseni omjer lecitina i kationskog lipida iznosio je redom: 50:5, 50:7, 50:8 i 50:9, ovisno o koncentraciji kationskog lipida u etanolnoj otopini. Maseni omjer lecitina i deksametazona kod svih uzoraka bio je 1:5.

Pripravljena je i otopina alginata u pročišćenoj vodi (10 mg ml⁻¹). Alikvot otopine alginata od 0,5 ml razrijeđen je pročišćenom vodom do volumena od 23 ml.

Nanočestice s uklopljenim deksametazonom pripravljene su injektiranjem 2 ml etanolne otopine lecitina, kationskog lipida i deksametazona u 23 ml razrijeđene otopine alginata uz miješanje na magnetskoj miješalici brzinom od 890 okr/min. Za injektiranje je korištena Hamiltonova igla unutarnjeg promjera 0,75 mm. Pripravljene suspenzije nanočestica filtrirane su kroz membranski celulozni filter (0,45 µm, Millipore, Švicarska) kako bi se odijelio neuklopljeni (precipitirani) deksametazon od nanočestica s uklopljenim lijekom. Filtrirani uzorci korišteni su u svim daljnjim ispitivanjima (Plantić, 2017).

Prazne nanočestice pripravljene su injektiranjem 2 ml etanolne otopine lecitina i kationskog lipida u 23 ml razrijeđene otopine alginata, te su korištene kao kontrolni uzorci u daljnim ispitivanjima.

3.2.2. Određivanje veličine i zeta-potencijala nanočestica

Metodom fotonske korelacijske spektroskopije (engl. *Photon correlation spectroscopy*; PCS) na uređaju Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, UK) određeni su veličina, polidisperznost i zeta-potencijal praznih nanočestica te onih s uklopljenim lijekom. Prije mjerenja veličine i polidisperznosti, suspenzija nanočestica razrijeđena je pročišćenom vodom u volumnom omjeru 1:4. Zeta-potencijal nanočestica mjeren je u uzorcima razrijeđenim 10 mM otopinom NaCl u volumnom omjeru 1:4.

Pri određivanju veličine i zeta-potencijala nanočestica PCS metodom uzorak se obasjava koherentnom He-Ne laserskom zrakom ($\lambda = 633 \text{ nm}$, 10 mW) koja se raspršuje na dispergiranim česticama pod kutom od 90° . Pri tome dolazi do fluktuiranja intenziteta raspršene svjetlosti, jer su dispergirane čestice u stalnom (Brownovom) gibanju. Bilježi se intenzitet raspršene svjetlosti u vremenu. Vrijednost zeta-potencijala određuje se indirektnim mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica. U promjenjivom električnom polju nabijene se čestice gibaju i raspršuju svjetlost. Frekvencija intenziteta raspršene svjetlosti mijenja se ovisno o brzini gibanja čestica. Bilježi se intenzitet raspršene svjetlosti te iz tog spektra frekvencija računa se elektroforetska pokretljivost, odnosno zeta-potencijal. Mjerenja su provedena pri 25°C (Hafner, 2008).

3.2.3. Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka

Količina uklopljenog lijeka određena je na uređaju UPLC (eng. *Ultra-Performance Liquid Chromatography*; Agilent Infinity 1290, Agilent, California, USA). Korištena je Acquity UPLC BEH Shield RP18 kolona ($1.7 \mu\text{m}$, $2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$) (Waters, Massachusetts, USA), a elucija je bila izokratična. Otapalo, natrijev acetat pripremljeno je otapanjem $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u Milli-Q™ vodi (0.3 mg/ml) (Merck-Millipore, Massachusetts, USA). Pomoću ledene octene kiseline (Merck-Millipore), pH je prilagođen na 4.5. Otapalo je filtrirano kroz celulozni membranski filter ($0.2 \mu\text{m}$; Whatman, Germany) prije upotrebe. Kao mobilna faza korištena je smjesa otapalo/acetanitril (Merck-Millipore). Brzina protoka mobilne faze bila je $0,4 \text{ ml/min}$ pri temperaturi od 50°C . Vrijeme zadržavanja lijeka bilo je $1,18 \text{ min}$, a detekcija je provedena na 254 nm . Suspenzije nanočestica s deksametazonom razrijeđene su 50 puta u metanolu te filtrirane prije analize (Whatman® Spartan® syringe filters, regenerated cellulose membrane, pore size $0.22 \mu\text{m}$) (Plantić, 2017). Sljedeće formule korištene su u računanju sadržaja uklopljenog lijeka (Plantić, 2017):

Uspješnost uklapanja deksametazona (UU):

$$\text{UU} = \{[\text{masa uklopljenog lijeka}] / [\text{teorijska masa lijeka}]\} \times 100$$

Sadržaj deksametazona u nanočesticama (engl. *drug loading*, DL(%)):

$$\text{DL} (\%) = \{[\text{masa uklopljenog lijeka}] / [\text{masa nanočestica}]\} \times 100$$

Sadržaj lijeka (C) u suspenziji nanočestica određen je prema jednadžbi:

$$C (\mu\text{g/ml}) = [\text{masa uklopljenog lijeka}] / [\text{volumen suspenzije nanočestica}].$$

3.2.4. *In vitro* oslobađanje deksametazona iz nanočestica

Profil oslobađanja deksametazona iz lipidno-alginatnih nanočestica ispitan je metodom dijalize. Suspenzija nanočestica s deksametazonom (2 ml, tj. 10 mg lijeka) stavljena je u dijalizacijsku vrećicu od celuloza acetata (Spectra/Por®, MW cut-off 12-14 kDa, Medicell International Ltd, UK) te je vrećica zatvorena s obje strane i prenesena u čašu s 30 ml 0,03% (*m/m*) vodene otopine natrij dodecil sulfata (receptorski medij). Medij je konstantno miješan magnetskim mješačem pri brzini od 150 okr/min kako bi se eliminirao utjecaj stacionarnog difuzijskog sloja na brzinu oslobađanja lijeka. Alikvoti receptorskog medija (2 ml) uzimani su svakih sat vremena, tijekom 5 sati te nakon 24 sata te su, nakon svakog uzimanja, nadomješteni svježim medijem. Svaki uzorak razrijeđen je s 1 mL pročišćene vode i zaleđen u eppendorf epruvetama kako bi nakadno bio analiziran sadržaj deksametazona. Analiza je obavljena na uređaju UPLC kako je opisano u odjeljku 3.2.3.. Suspenzije nanočestica s deksametazonom razrijeđene su 50 puta u metanolu te filtrirani prije analize (Whatman® Spartan® syringe filters, regenerated cellulose membrane, pore size 0.22 μm). Na isti način je određena koncentracija lijeka u suspenziji nanočestica unutar dijalizacijske vrećice na kraju ispitivanja oslobađanja lijeka *in vitro*. Sva mjerenja rađena su u triplikatu.

Sličnost profila oslobađanja deksametazona iz lipidno-alginatnih nanočestica pripremljenih s različitim masenim omjerom kationskog lipida i lecitina procijenjena je temeljem faktora sličnosti (engl. *similarity factor*, f_2):

$$f_2 = 50 \cdot \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [\bar{R}(t) - \bar{T}(t)]^2}{n}}} \right]$$

gdje je n = broj eksperimentalnih točaka, $R(t)$ = srednji postotni udio oslobođenog lijeka iz referentnog pripravka u vremenu t , $T(t)$ = srednji postotni udio oslobođenog lijeka iz ispitivanog pripravka u vremenu t (Blažević i Milekić, 2015).

3.2.5. Stanična linija i uvjeti uzgoja

U ispitivanju vijabilnosti stanica nakon izlaganja lipidno-alginatnim nanočesticama s deksametazonom korištene su imortalizirane stanice humanog epitela rožnice (HCE-T; RIKEN Cell Bank, Japan). Stanice su uzgajane u sljedećim uvjetima: 37°C, 5% CO₂ i 95% relativne vlažnosti. Za uzgoj stanica korišten je DMEM/F12 hranidbeni medij (Lonza, Švicarska) u tikvicama površine 25, 75 i 150 cm² ili na pločama sa 24 jažice (TPP, Švicarska). Medij sadrži fetalni goveđi serum, inzulin (5 µg ml⁻¹), dimetil sulfoksid (0,5%), epidermalni faktor rasta (10 ng mL⁻¹) te antibiotike, Penicilin/Streptomycin/Amfotericin B. Stanice su uzgajane u sterilnim uvjetima. Konfluentnost je kontrolirana invertnim mikroskopom (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka), a nakon postizanja 80-90% konfluentnosti, stanice su presađivane u novu tikvicu. Pritom je medij uklonjen, a stanice isprane fosfatnim puferom. Zatim su stanice isprane 0,02 % (m/V) otopinom EDTA i inkubirane s 0,25 % (m/V) otopinom tripsina tijekom 5 min, pri 37°C. Učinak tripsina inhibiran je dodatkom DMEM/F12 medija u volumnom omjeru prema tripsinu 3:2 nakon što su stanice odvojene od podloge. Stanični medij mijenjan je svaka dva dana (Belanović, 2015).

3.2.6. Ispitivanje biokompatibilnosti nanočestica *in vitro*

Kako bismo ispitili biokompatibilnost pripremljenih nanočestica na HCE-T stanicama, stanice su nasadene na ploče s 24 jažice (TPP, Švicarska) pri gustoći od 2×10⁴ stanica/jažici. Nakon 2 dana postigle su odgovarajuću konfluentnost. Suspenzije lipidno-alginatnih i lipidnih nanočestica (koje su služile kao kontrola) razrijeđene su HBSS puferom (pH 7,4) do koncentracije nanočestica od 50, 100, 200 i 400 µg ml⁻¹ (koncentracija nanočestica izražena je koncentracijom lecitina u sustavu). Stanični medij je uklonjen i stanice su isprane HBSS puferom (pH 7,4). Stanice su zatim izložene suspenzijama nanočestica tijekom 30 minuta. Kao negativna kontrola korištene su stanice inkubirane u HBSS-u. Nakon 30 minuta, stanice su isprane HBSS-om dva puta. Inkubirane su u svježem staničnom mediju (500 µl/jažici) tijekom 24 h.

Vijabilnost stanica određena je MTT testom kojim ispitujemo metaboličku aktivnost stanica. Test se temelji na promjeni boje otopine MTT. Otopina je žute boje, a stanice pomoću NAD(P)H-ovisne oksidoreduktaze mogu prevesti MTT u ljubičaste kristale formazana koji su

netopljivi u vodi. Intenzitet ljubičaste boje mjeri se spektrofotometrijski, a izmjerena apsorbancija izravno je proporcionalna metaboličkoj aktivnosti stanica. Stanice su tretirane otopinom MTT-a (5 mg ml^{-1}) u fosfatnom puferu (pH 7,4), u volumnom omjeru 1:10. Inkubirane su tijekom 30 minuta pri 37°C . Zatim je otopina uklonjena, stanice lizirane, a formazan otopljen u izopropanolu (30 ml izopropanola u $100 \mu\text{l}$ koncentrirane klorovodične kiseline). Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 570 nm (Victor3, PerkinElmer, SAD). Metabolička aktivnost stanica izražena je kao relativna u odnosu na netretirane stanice inkubirane u HBSS-u. Sva mjerenja rađena su u kvadriplikatu (Belanović, 2015).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Veličina i zeta-potencijal nanočestica

U ovom radu pripravljene su i karakterizirane lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom u čijem sastavu su kao lipidne komponente korišteni lecitin S45 (45% fosfatidilkolina) i kationski lipid DDAB u različitim masenim omjerima. Veličina, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal praznih nanočestica (K) i nanočestica s deksametazonom (KD) prikazani su u Tablici 2. Kao kontrolni uzorci, pripravljene su i karakterizirane lipidne nanočestice s najvećim (LK9) i najmanjim (LK5) udjelom kationskog lipida.

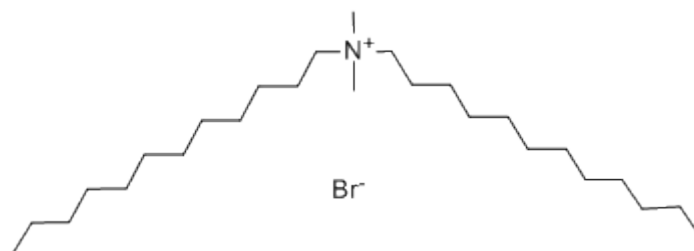
Lecitin je površinski aktivna tvar koja posjeduje emulgirajuća svojstva. Sastoji se najvećim dijelom od fosfatidilkolina, fosfatidiletanolamina i fosfatidilinozitola. Dugo je u upotrebi u izradi liposoma i nanočestica radi povoljnih svojstava – biorazgradljivosti i biokompatibilnosti. Daje mogućnost produljenog oslobađanja (Clementino i sur., 2016).

Tablica 1. Veličina (srednji promjer), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal lipidno-alginatnih nanočestica

Uzorak	Srednji promjer (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)
LK5	104,1 ± 3,1	0,273 ± 0,02	19,9 ± 1,9
LK9	111,2 ± 0,5	0,288 ± 0,08	33,5 ± 4,8
K5	200,7 ± 7,3	0,278 ± 0,05	-32,8 ± 1,4
K7	208,9 ± 7,5	0,241 ± 0,06	-37,6 ± 2,3
K8	208,4 ± 2,3	0,233 ± 0,02	-37,0 ± 0,9
K9	195,1 ± 3,4	0,241 ± 0,01	-39,7 ± 1,5
K5D	191,6 ± 1,3	0,321 ± 0,03	-35,1 ± 0,7
K7D	197,0 ± 4,1	0,282 ± 0,03	-39,4 ± 0,9
K8D	192,9 ± 1,8	0,279 ± 0,01	-40,8 ± 0,8
K9D	200,3 ± 3,7	0,237 ± 0,01	-42,0 ± 0,6

LK – nanočestice od lecitina i kationskog lipida; K – nanočestice od lecitina, kationskog lipida i alginata; KD – nanočestice od lecitina, kationskog lipida i alginata s uklopljenim deksametazonom. Broj u oznakama uzoraka predstavlja masu kationskog lipida (mg) korištenu u pripravi nanočestica na 50 mg lecitina; Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).

Dimetildioktadecil amonij bromid je kationski surfaktant. Može se koristiti u postizanju željenih kemijskih svojstava terapijskog sustava i u njegovoj stabilizaciji. Surfaktanti klase dialkildimetil amonij bromida pokazuju veliku sličnost s lipidima jer imaju dva duga hidrofobna lanca (Slika 5.). Općenito pokazuju veću biokompatibilnost od jednolančanih lipida (Kanwar i sur., 2016).



Slika 3. Dimetildioktadecil amonij bromid

U izradi nanočestica korišten je kako bi osigurao pozitivan naboj lipidne smjese i elektrostatsku interakciju s negativno nabijenim alginatom. Takav postupak dobivanja nanočestica naziva se ionotropno geliranje. Deksametazon će se zahvaljujući svojoj lipofilnosti uklopiti u fosfolipidne lance lecitina. Zeta potencijal lipidnih nanočestica s najmanjim i najvećim sadržajem kationskog lipida redom je iznosio $19,9 \pm 1,9$ mV i $33,5 \pm 4,8$ mV. Time je potvrđeno da je sadržaj kationskog lipida korišten u izradi nanočestica odgovarajuć i da se može očekivati elektrostatska interakcija s alginatom.

Alginat je anionski polisaharid, često korišten u izradi terapijskih sustava zahvaljujući pogodnim svojstvima kao što su biokompatibilnost, biorazgradljivost i mukoadhezivnost (Gombotz i Wee, 1998). Dodatkom alginata, čestice rastu i mijenjaju naboj u negativni (Tablica 2.) što dokazuje prisustvo alginata na površini nanočestica. Primjerice, lipidne nanočestice pripravljene iz lecitina i kationskog lipida pri masenom omjeru od 50:9 (LK9; Tablica 2) imale su srednji promjer od $111,2 \pm 0,5$ nm i zeta-potencijal od $33,5 \pm 4,8$ mV, dok su odgovarajuće lipidno-alginatne nanočestice (K9; Tablica 2.) bile karakterizirane srednjim promjerom od $195,1 \pm 3,4$ nm i zeta-potencijalom od $-39,7 \pm 1,5$ mV. Veličina nanočestica nije se značajnije mijenjala s promjenom masenog omjera lecitina i kationskog lipida. Negativni naboj nanočestica blago je rastao s povećanjem sadržaja kationskog lipida jer se time povećavala interakcija s negativno nabijenim alginatom. Dio negativno nabijenih skupina alginata stupa u elektrostatsku interakciju s pozitivno nabijenim skupinama kationskog lipida, dok je drugi dio, slobodan na površini nanočestice, zaslužan za ukupni

negativni naboj nanočestica. Slična zapažanja već su zabilježena pri pripravi lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom uz lecitin S100 kao glavnu lipidnu sastavnicu (Plantić, 2017). Međutim, količina kationskog lipida potrebna za postizanje odgovarajućih svojstava nanočestica, poput odgovarajućeg naboja, bila je veća pri izradi nanočestica od lecitina S45, koji je negativniji, nego pri izradi nanočestica od lecitina S100 (Plantić, 2017) koji je manje negativan.

Nanočesticama je određen i indeks polidisperznosti (PDI). On govori o ujednačenosti veličine unutar jedne serije nanočestica. Kreće se između 0 i 1, gdje 0 označava da su sve nanočestice jednake veličine (monodisperzni sustav), a 1 da je uzorak izrazito polidisperzan. Indeks polidisperznosti pripremljenih lipidno–alginatnih nanočestica je oko 0,27 iz čega je vidljivo da su nanočestice relativno ujednačene veličine. Polidisperznost nanočestica nije značajnije ovisila o masenom omjeru lecitina i kationskog lipida što je već zapaženo kod nanočestica pripremljenih od lecitina S100, kationskog lipida i alginata (Plantić, 2017).

Nanočestice s uklopljenim deksametazonom imaju nešto manju veličinu od lipidno-alginatnih nanočestica istog sastava bez uklopljenog lijeka. To može značiti da deksametazon utječe na organizaciju lipida i polimera, odnosno strukturu nanočestice. To je također već uočeno kod nanočestica pripremljenih od lecitina S100, kationskog lipida i alginata (Plantić, 2017). Tome u prilog govori i blaga promjena zeta-potencijala nanočestica uslijed uklapanja deksametazona.

4.2. Uspješnost uklapanja deksametazona

Uspješnost uklapanja (UU) je omjer mase uklopljenog lijeka i teorijske mase lijeka, tj. mase lijeka upotrebljene u izradi nanočestica. Masa uklopljenog lijeka izražena prema masi nanočestica predstavlja sadržaj lijeka u nanočesticama (engl. *drug loading*; DL). Masa nanočestica jednaka je zbroju masa svih komponenti od kojih su nanočestice sastavljene (masa lecitina, kationskog lipida, alginata i uklopljenog deksametazona). Koncentracija lijeka u suspenziji nanočestica (C) je omjer mase uklopljenog lijeka i volumena pripravljene suspenzije.

S obzirom na sadržaj uklopljenog lijeka, pripravljene lipidno-alginatne nanočestice pokazale su se prikladnim nanonosacem deksametazona. Uspješnost uklapanja deksametazona u pripravljene lipidno-alginatne nanočestice kretala se između 71,6 i 83,3 % te je rasla sa smanjenjem sadržaja kationskog lipida u nanočesticama. Tako je najveća uspješnost uklapanja zabilježena kod uzorka pripremljenog s najmanjim sadržajem kationskog

lipida (maseni omjer lecitina i kationskog lipida 50:5; K5D; Tablica 3.). U usporedbi s nanočesticama pripremljenim s lecitinom S100 (Plantić, 2017), nanočestice pripremljene u ovom radu osigurale su bolje uklapanje deksametazona.

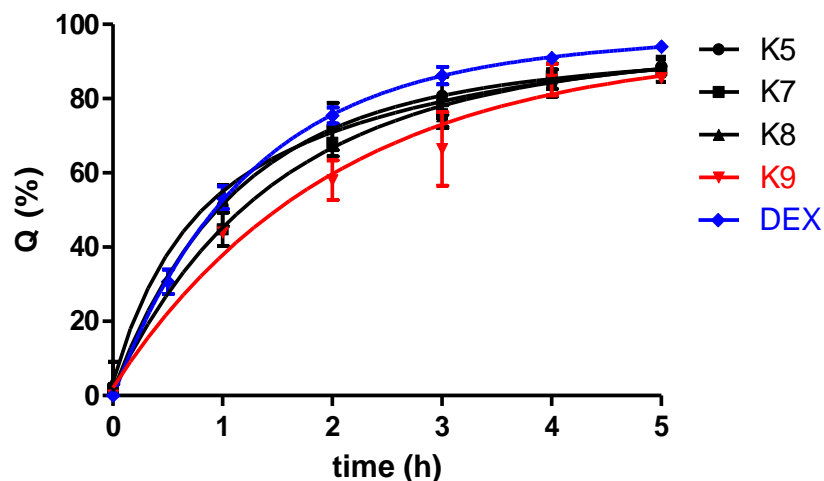
Tablica 3. Uspješnost uklapanja, sadržaj i koncentracija deksametazona u suspenziji lipidno-alginatnih nanočestica

Uzorak*	UU (%)	DL (%)	C (µg/ml)
K5	83,3 ± 1,9	11,9 ± 0,3	333 ± 8
K7	75,8 ± 0,7	10,5 ± 0,1	303 ± 3
K8	71,6 ± 1,5	9,8 ± 0,2	286 ± 6
K9	70,5 ± 6,4	9,5 ± 0,9	282 ± 25

UU – uspješnost uklapanja lijeka; DL – sadržaj lijeka; C – koncentracija lijeka u suspenziji nanočestica; *Broj u oznakama uzoraka predstavlja masu kationskog lipida (mg) korištenu u pripravi nanočestica na 50 mg lecitina. Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3)

4.3. *In vitro* oslobađanje deksametazona iz nanočestica

O brzini oslobađanja lijeka iz terapijskog sustava ovisi njegova apsorpcija i raspoloživost na mjestu djelovanja. Metode koje se koriste za ispitivanje profila oslobađanja lijeka *in vitro* mogu više ili manje imitirati stvarne uvjete oslobađanja lijeka *in vivo*. Odabir metode i njezinih postavki ovisi o tome ima li provođenje navedenog ispitivanja za cilj usporediti razvijene pripravke prema profilu oslobađanja lijeka ili je temeljni cilj predvidjeti ponašanje pripravka *in vivo* (Balzus i sur., 2016). U ovom radu, metodom dijalize određen je profil oslobađanja deksametazona tijekom 5 sati. Kao receptorski medij korištena je otopina natrij lauril sulfata (0,03%, *m/m*), kako bi se postigli uvjeti osigurane topljivosti. Uspoređena je brzina oslobađanja deksametazona iz lipidno-alginatnih nanočestica ovisno o sadržaju kationskog lipida u sustavu.



Slika 6. Profil oslobađanja deksametazona iz lipidno-alginatnih nanočestica tijekom 5 sati

K – lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom (broj označava mg kationskog lipida u lipidnoj smjesi na 50 mg lecitina); DEX – otopina deksametazona u 0,03 % otopini natrij-lauril sulfata

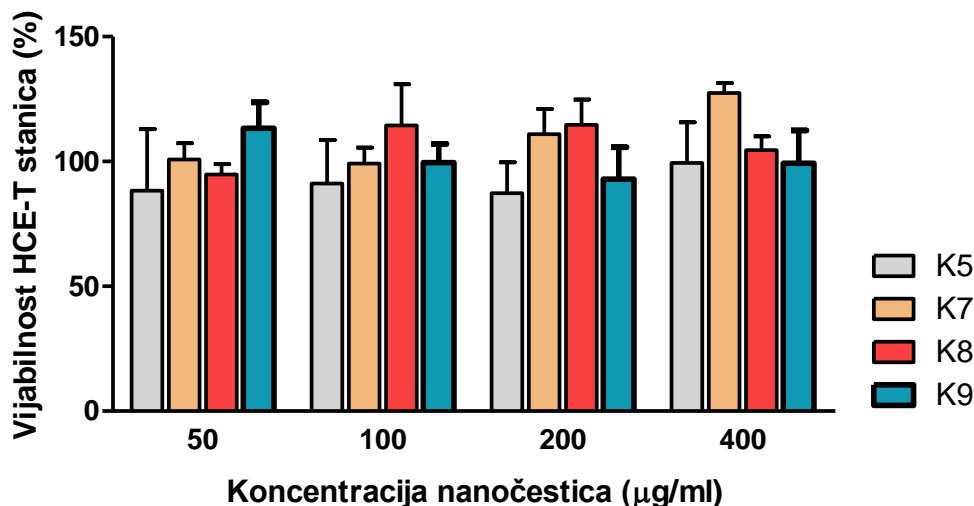
Udjeli oslobođenog deksametazona u ovisnosti o vremenu za sve pripravljene lipidno-alginatne nanočestice prikazani su na Slici 6. Trend oslobađanja sličan je za sve četiri vrste nanočestica ($t_{1/2}$ od 1 do 1,5 h; 80% uklopljenog lijeka oslobodi se nakon 5 h). Nanočestice s najmanje kationskog lipida (K5D) pokazuju najbrže oslobađanje lijeka, ali i nanočestice K7D dostižu ih već nakon prvog sata. Nanočestice K8D osiguravaju neznatno sporije oslobađanje, dostiže prva dva nakon 3 sata, dok nanočestice K9D najviše usporavaju oslobađanje lijeka, te nakon 5 sati oslobađanja postižu isto oslobađanje lijeka kao i ostala tri sustava, 80% od uklopljene količine. Kao pozitivna kontrola korištena je otopina deksametazona. Uklapanje lijeka u nanočestice rezultiralo je značajnim usporenjem oslobađanja u odnosu na difuziju lijeka iz otopine jedino u slučaju nanočestica s najvećim sadržajem kationskog lipida (K9D; $f_2 = 45,7$). Usporedbom profila oslobađanja deksametazona iz preostalih lipidno-alginatnih nanočestica s profilom difuzije deksametazona iz otopine nije utvrđena značajna razlika (f_2 , je iznosio 67,1, 57,2 i 61,9 redom za K5D, K7D i K8D). Utjecaj udjela kationskog lipida na brzinu oslobađanja deksametazona zapažen je i kod nanočestica pripremljenih od lecitina S100, kationskog lipida i alginata (Plantić, 2017).

4.4. Biokompatibilnost nanočestica *in vitro*

Alginat i lecitin smatraju se netoksičnim, biokompatibilnim tvarima koje se često koriste u pripravi inovativnih terapijskih sustava. Unatoč tome potrebno je ispitati i biokompatibilnost proizvedenih nanočestica. U ovom radu ispitivanje biokompatibilnosti lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom provedeno je na imortaliziranim stanicama humanog epitela rožnice (HCE-T). Te su stanice odabrane kao model jer je deksametazon najučinkovitiji i najpotentniji kortikosteroid u liječenju bolesti oka (Zhang i sur., 2015). Osim toga, velika je potreba za njegovim uklapanjem u nove terapijske sustave jer oblikovan u konvencionalni ljekoviti oblik poput kapi za oko ne postiže puni terapijski potencijal. U detekciji vijabilnosti korišten je MTT test, kolorimetrijski test redukcije tetrazolina. Ako stanice nisu oštećene, metabolički su aktivne i reduciraju blijedožuti internalizirani MTT pomoću dehidrogenaza u ljubičasto obojeni netopljivi formazan.

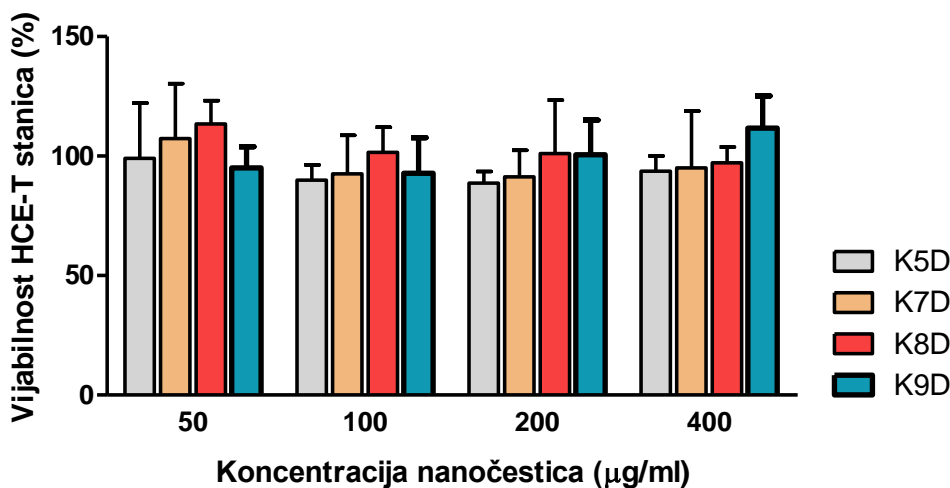
Boja je detektirana spektrofotometrijski i izmjerena apsorbancija izravno je proporcionalna metaboličkoj aktivnosti stanica. Ispitana je vijabilnost stanica tretiranih suspenzijom nanočestica različitih koncentracija (50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml). Kao kontrolni uzorci korištene su suspenzije praznih lipidnih (LK) i lipidno-alginatnih (K) nanočestica.

Provedena ispitivanja pokazala su da su razvijene lipidno-alginatne nanočestice biokompatibilne sa stanicama epitela rožnice u ispitivanim koncentracijama i vremenu izlaganja, neovisno o sadržaju deksametazona i masenom omjeru lecitina i kationskog lipida u nanočesticama (Slika 7. i 8.).



Slika 7. Vijabilnost stanica HCE-T nakon polusatnog izlaganja suspenziji lipidno-alginatnih nanočestica.

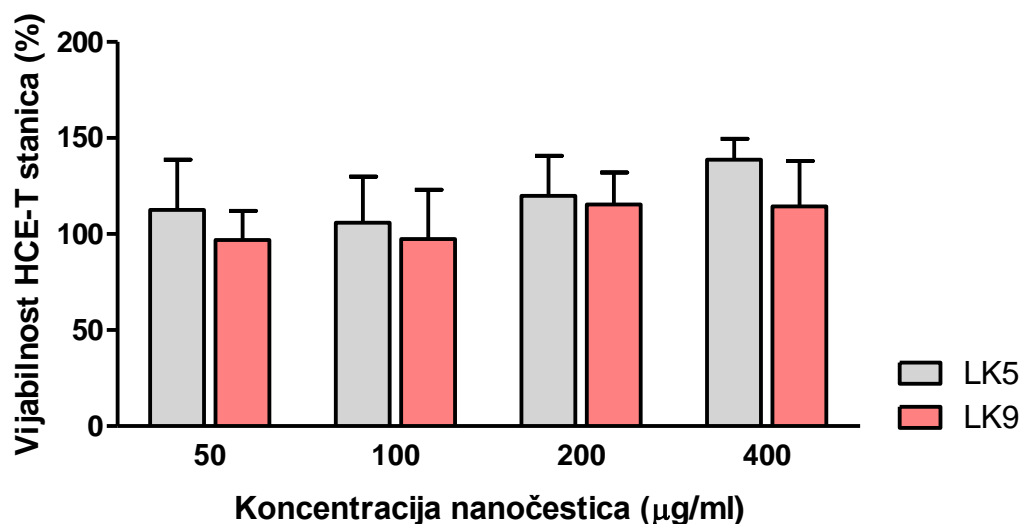
Broj u oznakama uzoraka predstavlja masu kationskog lipida (mg) korištenu u pripravi nanočestica na 50 mg lecitina. Suspenzije nanočestica u koncentraciji od 50 do 400 µg/ml pripravljene su razrjeđivanjem s HBSS-om (pH 7,4). Vijabilnost stanica izražena je u odnosu na stanice inkubirane u HBSS-u (pH 7,4). Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± SD (n=3).



Slika 8. Vijabilnost stanica HCE-T nakon polusatnog izlaganja suspenziji lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom.

Broj u oznakama uzoraka predstavlja masu kationskog lipida (mg) korištenu u pripravi nanočestica na 50 mg lecitina. Suspenzije nanočestica u koncentraciji od 50 do 400 µg/ml pripravljene su razrjeđivanjem s HBSS-om (pH 7,4). Vijabilnost stanica izražena je u odnosu na stanice inkubirane u HBSS-u (pH 7,4). Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± SD (n=3).

Biokompatibilnost razvijenih nanočestica očekivana je s obzirom na njihov negativan naboj i znatno manju mogućnost smanjenja vijabilnosti stanica u odnosu na pozitivno nabijene nanočestice koje temeljem elektrostatske interakcije mogu dovesti do oštećenja stanične mebrane. Istodobno, ispitana je biokompatibilnost pozitivno nabijenih lipidnih nanočestica pripremljenih iz lecitina i kationskih lipida (Slika 9.).



Slika 9. Vijabilnost stanica HCE-T nakon polusatnog izlaganja suspenziji lipidnih nanočestica.

Broj u oznakama uzoraka predstavlja masu kationskog lipida (mg) korištenu u pripravi nanočestica na 50 mg lecitina. Suspenzije nanočestica u koncentraciji od 50 do 400 µg/ml pripravljene su razrjeđivanjem s HBSS-om (pH 7,4). Vijabilnost stanica izražena je u odnosu na stanice inkubirane u HBSS-u (pH 7,4). Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± SD (n=3).

Nije uočen negativan utjecaj na vijabilnost HCE-T nanočestica usprkos izraženom pozitivnom zeta-potencijalu, posebice u slučaju LK9 nanočestica ($33,5 \pm 4,8$ mV). Smanjena toksičnost kationskog lipida uklapanjem u lipidne sustave s velikim udjelom biokompatibilnih sastavnica kao što je lecitin već je dokumentirana u literaturi (Kanwar i sur., 2016; Hariharan i sur., 2006; Plantić, 2017).

5. ZAKLJUČCI

- Nanočestice pripravljene ionskom interakcijom alginata i smjese lecitina S45 i kationskog lipida DDAB (50:5, 50:7, 50:8 i 50:9, *m/m*) pokazale su se prikladnima za uklapanje deksametazona.
- Uspješnost uklapanja deksametazona u lipidno-alginatne nanočestice iznosila je od 70,5 do 83,3 %. Nanočestice s masenim omjerom lecitina i kationskog lipida od 50:5 karakterizirane su najvećim uklapanjem lijeka.
- Za sve pripravljene lipidno-alginatne nanočestice, srednji promjer iznosio je oko 200 nm, neovisno o masenom omjeru lecitina i kationskog lipida, a indeks polidisperznosti kretao se između 0,237 i 0,321.
- Nanočestice su negativno nabijene. Zeta-potencijal kretao se između -35,1 i -42,0 mV. Negativni naboj nanočestica rastao je s porastom sadržaja kationskog lipida u njihovom sastavu.
- Produljeno oslobađanje deksametazona iz nanočestica postignuto je jedino u slučaju nanočestica s najvećim sadržajem dimetildioktadecil amonij bromida.
- Izlaganje HCE-T stanica suspenzijama nanočestica u rasponu koncentracija od 50 do 400 µg/ml i trajanju od 30 minuta nije rezultiralo značajnijim smanjenjem vijabilnosti stanica.

6. LITERATURA

Achouri D, Alhanout K, Piccerelle P, Andrieu VR. Recent advances in ocular drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*, 2012, 39, 1599–1617.

Ali H, Kalashnikova I, White MA, Sherman M, Rytting E. Preparation, characterization, and transport of dexamethasone-loaded polymeric nanoparticles across a human placental *in vitro* model. *Int J Pharm*, 2013, 454, 149–157.

Bahadar H, Maqbool F, Niaz K, Abdollahi M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran Biomed J*, 2016, 20, 1-11.

Balzus B, Colombo M, Sahla FF, Zoubari G, Staufenbiel S, Bodmeier R. Comparison of different *in vitro* release methods used to investigate nanocarriers intended for dermal application. *Int J Pharm*, 2016, 513, 247-254.

Barbosa JP, Neves AR, Silva AM, Barbosa MA, Reis MS, Santos SG. Nanostructured lipid carriers loaded with resveratrol modulate human dendritic cells. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11, 3501-3516.

Beck RCR, Pohlmann AR, Hoffmeister C, Gallas MR, Collnot E, Schaefer UF, Guterres SS, Lehr CM. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: Correlation between *in vitro* drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 67, 18–30.

Belanović J. In vitro ispitivanje sigurnosti oftalmičke primjene lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom. Diplomski rad. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2015.

Bentley PJ. Endocrine Pharmacology: Physiological Basis and Therapeutic Applications. Cambridge, Cambridge University Press, 1980, str. 158.

Blažević F, Mikelić T. Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na cijeljenje rane *in vitro*. Studentski rad za rektorovu nagradu, Zagreb, 2015.

Buckingham JC. Glucocorticoids: Exemplars of multi-tasking (Review). *Br J Pharmacol*, 2006, 147, 258-268.

Butoescu N, Jordan O, Burdet P, Stadelmann P, Petri-Fink A, Hofmann H, Doelker E. Dexamethasone-containing biodegradable superparamagnetic microparticles for intra-articular

administration: Physicochemical and magnetic properties, *in vitro* and *in vivo* drug release. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 72, 529–538.

Clementino A, Batger M, Garrastazu G, et al. The nasal delivery of nanoencapsulated statins – an approach for brain delivery. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11, 6575–6590.

Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr at V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J Control Release*, 2012, 161, 505–522.

Di Colo G, Zambito Z, Burgalassi S, Serafini A, Saettone MF. Effect of chitosan on *in vitro* release and ocular delivery of ofloxacin from erodible inserts based on poly(ethylene oxide). *Int J Pharm*, 2002, 248, 115–122.

Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 2002, 9, 6–19.

Doge N, Honzke S, Schumacher F, Balzus B, Colombo M, Hadam S, Rancan F, Blume-Peytavi U, Schafer-Korting M, Schindler A, Ruhl E, Stahl Skov P, Church M, Hedtrich S, Kleuser B, Bodmeier R, Vogt A. Ethyl cellulose nanocarriers and nanocrystals differentially deliver dexamethasone into intact, tape-stripped or sodium lauryl sulfate-exposed *ex vivo* human skin - assessment by intradermal microdialysis and extraction from the different skin layers. *J Control Release*, 2016, 242, 25–34.

Donaldson K, Borm PJ, Castranova V, Gulumian M. The limits of testing particle-mediated oxidative stress *in vitro* in predicting diverse pathologies; relevance for testing of nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*, 2009, 6, 13.

Du F, Honzke S, Neumann F, Keilitz J, Chen W, Ma N, Hedtrich S, Haag R. Development of biodegradable hyperbranched core-multishell nanocarriers for efficient topical drug delivery. *J Control Release*, 2016, 242, 42–49.

Fornaguera C, Llinas M, Solans C, Caldero G. Design and *in vitro* evaluation of biocompatible dexamethasone-loaded nanoparticle dispersions, obtained from nano-emulsions, for inhalatory therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 125, 58–64.

Foye WO, Lemke TL, Williams DA. Principles of Medicinal Chemistry. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1995, str. 457–459.

Fratoddi I, Venditti I, Cametti C, Palocci C, Chronopoulou L, Marino M, Acconcia F, Russo MV. Functional polymeric nanoparticles for dexamethasone loading and release. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, 93, 59–66.

Freitas J, Santos R, Azevedo E, Costa O, Carvalho M, de Freitas AF. Clinical improvement in patients with orthostatic intolerance after treatment with bisoprolol and fludrocortisone. *Clin Auton Res*, 2000, 10, 293–299.

Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 31, 267–285.

Gómez-Gaete C, Fattal E, Silva L, Besnard M, Tsapis N. Dexamethasone acetate encapsulation into Trojan particles. *J Control Release*, 2008, 128, 41–49.

Gómez-Gaete C, Tsapis N, Besnard M, Bochot A, Fattal E. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *Eur J Pharm*, 2007, 331, 153–159.

Hafner A. Kitozansko-lecitinske nanočestice za nazalnu i (trans)dermalnu primjenu melatonina. Doktorska disertacija. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2008.

Hariharan S, Bhardwaj V, Bala I, Sitterberg J, Bakowsky U, Ravi Kumar MNV. Design of Estradiol Loaded PLGA Nanoparticulate Formulations: A Potential Oral Delivery System for Hormone Therapy. *Pharm Res*, 2006, 23, 184-195.

Illum L. Nasal drug delivery — Recent developments and future prospects. *J Control Release*, 2012, 161, 254–263.

Kalam MA. Development of chitosan nanoparticles coated with hyaluronic acid for topical ocular delivery of dexamethasone. *Int J Biol Macromol*, 2016, 89, 127–136.

Kanwar R, Kaur G, Mehta SK. Revealing the potential of Didodecyldimethylammonium bromide as efficient scaffold for fabrication of nano liquid crystalline structures. *Chem Phys Lipids*, 2016, 196, 61–68.

Kim DH, Martin DC. Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery. *Biomaterials*, 2006, 27, 3031–3037.

- Kim H, Park HT, Tae YM, Kong WH, Sung DK, Hwang BW, Kim KS, Kim YK, Hahn SK. Bioimaging and pulmonary applications of self-assembled Flt1 peptide-hyaluronic acid conjugate nanoparticles. *Biomaterials*, 2013, 34, 8478-8490.
- Kovarsky J, Bishop JO. Delayed fracture union associated with dexamethasone nasal spray. *Arthritis Rheum*, 1982, 25, 599-600.
- Lihong W, Xin C, Yongxue G, Yiyang B, Gang C. Thermoresponsive ophthalmic poloxamer/tween/carbopol in situ gels of a poorly water-soluble drug fluconazole: preparation and *in vitro-in vivo* evaluation. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40, 1402–1410.
- Lovrić J, Hafner A, Radiković M, Juretić M, Dürriegl M, Perina Lakoš G, Pepić I. Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva. *Farm glas*, 2015, 71, 7–8.
- Løvås K, Husebye ES. Replacement therapy for Addison's disease: recent developments. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008, 17, 497-509.
- McKay LI, Cidlowski JA. Pharmacokinetics of Corticosteroids. U: Holland-Frei Cancer Medicine. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR i sur., urednici, Hamilton (ON), BC Decker, 2003, dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13300/>.
- Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals--special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 78, 1-9.
- Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50, 161-177.
- Newton R, Holden NS. Separating Transrepression and Transactivation: A Distressing Divorce for the Glucocorticoid Receptor?. *Mol Pharmacol*, 2007, 72, 799-809.
- Ohira A, Hara K, Johannesson G, Tanito M, Asgrimsdottir GM, Lund SH, Loftsson T, Stefansson E. Topical dexamethasone γ -cyclodextrin nanoparticle eye drops increase visual acuity and decrease macular thickness in diabetic macular oedema. *Acta Ophthalmol*, 2015, 93, 610–615.

Pan Q, Xu Q, Boylan NJ, Lamb NW, Emmert D, Yang JC, Tang L, Heflin T, Alwadani S, Eberhart CG, Stark WJ, Hanes J. Corticosteroid-loaded biodegradable nanoparticles for prevention of corneal allograft rejection in rats. *J Control Release*, 2015, 201, 32-40.

Park JS, Yang HN, Jeon SY, Woo DG, Kim MS, Park KH. The use of anti-COX2 siRNA coated onto PLGA nanoparticles loading dexamethasone in the treatment of rheumatoid arthritis. *Biomaterials*, 2012, 33, 8600-8612.

Plantić I. Lipidno-alginatne nanočestice za nazalnu primjenu deksametazona. Diplomski rad. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2017.

Product information, Dimethyldioctadecylammonium bromide, <http://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno 20.12.2016.

Revollo JR, Cidlowski JA. Mechanisms Generating Diversity in Glucocorticoid Receptor Signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1179, 167–178.

Rodrigues da Silva G, da Silva-Cunha Jr. A, Behar-Cohen F, Ayres E, Oréface RL. Biodegradable polyurethane nanocomposites containing dexamethasone for ocular route. *Mater Sci Eng*, 2011, 31, 414–422.

Sahle FF, Balzus B, Gerecke C, Kleuser B, Bodmeier R. Formulation and *in vitro* evaluation of polymeric enteric nanoparticles as dermal carriers with pH-dependent targeting potential. *Eur J Pharm*, 2016, 92, 98–109.

Sažetak opisa svojstava lijeka - Deksametazon Krka 20 mg tablete, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 1.3.2017.

Sažetak opisa svojstava lijeka - Deksametazon Sandoz 4 mg/ml otopina za injekciju, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 1.3.2017.

Sažetak opisa svojstava lijeka - Dexafluid 1,315 mg/ml kapi za oko, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 1.3.2017.

Sažetak opisa svojstava lijeka - Maxitrol kapi za oko, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 15.12.2016.

Sažetak opisa svojstava lijeka - Neofordex 40 mg tablete , <http://www.ema.eu>, pristupljeno 1.3.2017.

Sažetak opisa svojstava lijeka - Ozurdex okularni implantat, <http://www.ema.eu>, pristupljeno 1.3.2017.

Selvamuthukumar S, Velmurugan R. Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug carrier for cancer chemotherapy. *Lipids Health Dis*, 2012, 11, 159.

Serpe L, Canaparo R, Daperno M, Sostegni R, Martinasso G, Muntoni E, Ippolito L, Vivenza N, Pera A, Eandia M, Gascod MR, Zara GP. Solid lipid nanoparticles as anti-inflammatory drug delivery system in a human inflammatory bowel disease whole-blood model. *Eur J Pharm Sci*, 2010, 39, 428–436.

Sharma G, Jasuja ND, Ali MI, Joshi SC. A Review on Nanomedicinal and Nanosensing Potential of Nanoparticles. *Int J Bio Che*, 2014, 8, 58-84.

Shrestha S, Diogenes A, Kishen A. Temporal-controlled Dexamethasone Releasing Chitosan Nanoparticle System Enhances Odontogenic Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla. *J Endod*, 2015, 41, 1253-1258.

Sun C, Wang X, Chen D, Lin X, Yu D, Wu H. Dexamethasone loaded nanoparticles exert protective effects against Cisplatin-induced hearing loss by systemic administration. *Neurosci Lett*, 2016, 619, 142-148.

Tanito M, Hara K, Takai Y, Matsuoka Y, Nishimura N, Jansook P, Loftsson T, Stefánsson E, Ohira A, Topical dexamethasone-Cyclodextrin microparticle eye drops for diabetic macular edema, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52, 7944.

Urbańska J, Karewicz A, Nowakowska M. Polymeric delivery systems for dexamethasone. *Life Sci*, 2014, 6, 1–6.

Venditti I, Fontana L, Fratoddi I, Battocchio C, Cametti C, Sennato S, Mura F, Sciubba F, Delfini M, Russo MV. Direct interaction of hydrophilic gold nanoparticles with dexamethasone drug: Loading and release study. *J Colloid Interface Sci*, 2014, 418, 52–60.

Wu W, Chaudhuri S, Brickley DR, Pang D, Karrison T, Conzen SD. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res*, 2004, 64, 1757-1764.

Yingchoncharoen P, Kalinowski DS, Richardson DR, Barker EL. Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: what is available and what is yet to come. *Pharm Rew*, 2016, 68, 701-787.

Young Yhee J, Im J, Seonghun Nho R. Advanced Therapeutic Strategies for Chronic Lung Disease Using Nanoparticle-Based Drug Delivery. *J Clin Med*, 2016, 5, 82.

Zhang K, Yao S, Li G, Hu Y. One-step fabrication of gold nanoparticles/carbon nanosheets hybrid by sonoelectrochemical technique for efficient surface-enhanced Raman scattering. *Nanoscale*, 2015, 7, 2659-2666.

Zhang Z, Grijpma DW, Feijen J. Poly(trimethylene carbonate) and monomethoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(trimethylene carbonate) nanoparticles for the controlled release of dexamethasone. *J Control Release*, 2006, 111, 263–27.

7. SAŽETAK

Glukokortikoidi su hormoni steroidne strukture koji mogu biti prirodnog ili sintetskog podrijetla. Djeluju protuupalno i imunosupresivno. Poremećaj njihove regulacije i djelovanja povezuje se s etiologijom mnogih bolesti što objašnjava njihov velik terapijski potencijal. Topikalno se primjenjuju s ciljem liječenja dermatitisa (dermalna primjena), uveitisa (oftalmička primjena), astme (pulmonalna primjena), alergijskog rinitisa (nazalna primjena) i ulceroznog kolitisa te Crohnove bolesti (enteralna primjena). Unatoč brojnim nuspojavama, deksametazon se smatra jednim od najsigurnijih glukokortikoida što je dodatni razlog za pronalaženje novih, učinkovitijih i sigurnijih oblika za njegovu primjenu.

Cilj ovog rada bio je pripremiti lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom, koristeći lecitin S45 kao glavnu lipidnu sastavnicu, odrediti im sadržaj lijeka, veličinu, zeta potencijal te odrediti profil oslobađanja i ispitati biokompatibilnost *in vitro*. Lipidno-alginatne nanočestice pripravljene su temeljem elektrostatske interakcije smjese lipida (lecitina S45 i kationskog lipida dimetildioktadecil amonij bromida) i alginata. Korištenje lecitina S45 u pripremi nanočestica rezultiralo je velikom uspješnošću uklapanja deksametazona (70,5 do 83,3 %). Nanočestice s različitim masenim omjerom lecitina S45 i kationskog lipida (50:5, 50:7, 50:8 i 50:9) bile su srednjeg promjera između 191,6 i 200,3 nm, negativnog zeta-potencijala (između -35,1 i -42,0 mV) te relativno velikog sadržaja deksametazona (9,5 – 11,9 %). Nanočestice su osigurale produljeno oslobađanje deksametazona jedino u slučaju nanočestica s najvećim sadržajem kationskog lipida. Biokompatibilnost nanočestica s deksametazonom ispitana je praćenjem metaboličke aktivnosti stanica epitela rožnice (HCE-T) *in vitro* nakon izlaganja tretiranih suspenzijama nanočestica (50 – 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Tretiranje HCE-T stanica suspenzijama nanočestica u ispitivanom rasponu koncentracija i trajanju nije rezultiralo značajnijim smanjenjem metaboličke aktivnosti odnosno vijabilnosti stanica. Provedena preliminarna ispitivanja ukazuju na potencijal razvijenih nanočestica za topikalnu primjenu deksametazona.

SUMMARY

Glucocorticoids are a group of natural and synthetic analogues of the steroid hormones that exhibit multiple effects on the inflammatory and immune responses in human, resulting in anti-inflammatory and immunosuppressive action and wide range of therapeutic indications. Topical synthetic corticosteroids are used to treat various conditions such as dermatitis (dermal delivery), uveitis (ophthalmic delivery), asthma (pulmonary delivery), allergic rhinitis (nasal delivery), ulcerative colitis and Crohn's disease (enteral delivery). Despite numerous side effects, dexamethasone is considered as one of the safest glucocorticoids, giving rise to development of innovative platforms for its effective and safe delivery.

The aim of this work was to prepare dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles using lecithin S45 as the main lipid constituent, determine the drug loading, their size, zeta potential and the release profile, also to investigate the biocompatibility *in vitro*. Lipid/alginate nanoparticles were prepared based on ionic interaction between lipid mixture (lecithin S45 and cationic lipid dimethyldioctadecylammonium bromide) and alginate. The use of lecithin S45 for the preparation of nanoparticles resulted in high dexamethasone entrapment efficiency (70.5 to 83.3%). Nanoparticles differing in lecithin S45 to cationic lipid weight ratio (50:5, 50:7, 50:8 and 50:9) had mean diameter ranging from 191.6 to 200.3 nm, negative zeta-potential (-35.1 to -42.0 mV) and relatively high dexamethasone content (9.5 to 11.9 %). Nanoparticles allowed sustained release of dexamethasone only in case of nanoparticles with the highest content of cationic lipid. Biocompatibility of nanoparticles was determined *in vitro* by evaluating metabolic activity of corneal epithelial cells (HCE-T) treated with nanoparticles suspension (50 – 400 µg ml⁻¹). Cells treatment with nanoparticles at concentration range employed resulted in no significant decrease in cell metabolic activity (i.e. viability). These preliminary investigations show the potential of developed nanoparticles for dexamethasone topical delivery.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

BIOKOMPATIBILNE LIPIDNO-ALGINATNE NANOČESTICE S VELIKOM USPJEŠNOŠĆU UKLAPANJA DEKSAMETAZONA

Lucija Ćorić

SAŽETAK

Glukokortikoidi su hormoni steroidne strukture koji mogu biti prirodnog ili sintetskog podrijetla. Djeluju protuupalno i imunosupresivno. Poremećaj njihove regulacije i djelovanja povezuje se s etiologijom mnogih bolesti što objašnjava njihov velik terapijski potencijal. Topikalno se primjenjuju s ciljem liječenja dermatitisa (dermalna primjena), uveitisa (oftalmička primjena), astme (pulmonalna primjena), alergijskog rinitisa (nazalna primjena) i ulceroznog kolitisa te Crohnove bolesti (enteralna primjena). Unatoč brojnim nuspojavama, deksametazon se smatra jednim od najsigurnijih glukokortikoida što je dodatni razlog za pronalaženje novih, učinkovitijih i sigurnijih oblika za njegovu primjenu. Cilj ovog rada bio je pripremiti lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom, koristeći lecitin S45 kao glavnu lipidnu sastavnicu, odrediti im sadržaj lijeka, veličinu, zeta potencijal te odrediti profil oslobađanja i ispitati biokompatibilnost *in vitro*. Lipidno-alginatne nanočestice pripravljene su temeljem elektrostatske interakcije smjese lipida (lecitina S45 i kationskog lipida dimetildioktadecil amonij bromida) i alginata. Korištenje lecitina S45 u pripremi nanočestica rezultiralo je velikom uspješnošću uklapanja deksametazona (70,5 do 83,3 %). Nanočestice s različitim masenim omjerom lecitina S45 i kationskog lipida (50:5, 50:7, 50:8 i 50:9) bile su srednjeg promjera između 191,6 i 200,3 nm, negativnog zeta-potencijala (između -35,1 i -42,0 mV) te relativno velikog sadržaja deksametazona (9,5 – 11,9 %). Nanočestice su osigurale produljeno oslobađanje deksametazona jedino u slučaju nanočestica s najvećim sadržajem kationskog lipida. Biokompatibilnost nanočestica s deksametazonom ispitana je praćenjem metaboličke aktivnosti stanica epitela rožnice (HCE-T) *in vitro* nakon izlaganja tretiranih suspenzijama nanočestica (50 – 400 µg ml⁻¹). Tretiranje HCE-T stanica suspenzijama nanočestica u ispitivanom rasponu koncentracija i trajanju nije rezultiralo značajnijim smanjenjem metaboličke aktivnosti odnosno vijabilnosti stanica. Provedena preliminarna ispitivanja ukazuju na potencijal razvijenih nanočestica za topikalnu primjenu deksametazona.

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

- Rad sadrži: 44 stranice, 9 grafičkih prikaza, 3 tablice i 67 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
- Ključne riječi: Lecitin; Alginat; Deksametazon; Nanočestice; Biokompatibilnost *in vitro*
- Mentor: **Dr. sc. Anita Hafner**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
- Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Jasmina Lovrić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10 000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

BIOCOMPATIBLE LIPID/ALGINATE NANOPARTICLES WITH HIGH DEXAMETHASONE ENTRAPMENT EFFICIENCY

Lucija Ćorić

SUMMARY

Glucocorticoids are a group of natural and synthetic analogues of the steroid hormones that exhibit multiple effects on the inflammatory and immune responses in human, resulting in anti-inflammatory and immunosuppressive action and wide range of therapeutic indications. Topical synthetic corticosteroids are used to treat various conditions such as dermatitis (dermal delivery), uveitis (ophthalmic delivery), asthma (pulmonary delivery), allergic rhinitis (nasal delivery), ulcerative colitis and Crohn's disease (enteral delivery). Despite numerous side effects, dexamethasone is considered as one of the safest glucocorticoids, giving rise to development of innovative platforms for its effective and safe delivery.

The aim of this work was to prepare dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles using lecithin S45 as the main lipid constituent, determine the drug loading, their size, zeta potential and the release profile, also to investigate the biocompatibility *in vitro*. Lipid/alginate nanoparticles were prepared based on ionic interaction between lipid mixture (lecithin S45 and cationic lipid dimethyldioctadecylammonium bromide) and alginate. The use of lecithin S45 for the preparation of nanoparticles resulted in high dexamethasone entrapment efficiency (70.5 to 83.3%). Nanoparticles differing in lecithin S45 to cationic lipid weight ratio (50:5, 50:7, 50:8 and 50:9) had mean diameter ranging from 191.6 to 200.3 nm, negative zeta-potential (-35.1 to -42.0 mV) and relatively high dexamethasone content (9.5 to 11.9 %). Nanoparticles allowed sustained release of dexamethasone only in case of nanoparticles with the highest content of cationic lipid. Biocompatibility of nanoparticles was determined *in vitro* by evaluating metabolic activity of corneal epithelial cells (HCE-T) treated with nanoparticles suspension (50 – 400 µg ml⁻¹). Cells treatment with nanoparticles at concentration range employed resulted in no significant decrease in cell metabolic activity (i.e. viability). These preliminary investigations show the potential of developed nanoparticles for dexamethasone topical delivery.

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

Thesis includes: 44 pages, 9 figures, 3 tables and 67 references. Original is in Croatian language.
Keywords: Lecithin; Alginate; Dexamethasone; Nanoparticles; Biocompatibility *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. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2017.