

Razvoj in vitro modela rane prikladnog za procjenu učinka nanosustava kitozana i melatonina na migraciju i proliferaciju fibroblasta

Blažević, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:136487>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



Filip Blažević

**Razvoj *in vitro* modela rane prikladnog za
procjenu učinka nanosustava
kitozana i melatonina na migraciju i proliferaciju
fibroblasta**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

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

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

Veliko hvala doc. dr. sc. Jasmini Lovrić na savjetima, podršci i strpljenju tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

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

Veliko hvala svim bližnjima na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog studiranja i što su mi ovo razdoblje života učinili nezaboravnim.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Građa i funkcija kože.....	1
1.1.1. Epidermis.....	2
1.1.2. Epidermokutana veza	3
1.1.3. Dermis	3
1.2. Cijeljenje rane.....	4
1.2.1. Hemostaza	5
1.2.2. Inflamacija (upala).....	5
1.2.3. Proliferacija	6
1.2.4. Maturacija (remodeliranje tkiva).....	8
1.3. Modeli cijeljenja rane	9
1.3.1. <i>In vivo</i> modeli cijeljenja rane	10
1.3.2. <i>In vitro</i> modeli cijeljenja rane.....	12
1.4. Melatonin.....	15
1.4.1. Utjecaj melatonina na cijeljenje rane	16
1.5. Kitozan	17
1.5.1. Utjecaj kitozana na cijeljenje rane.....	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME	20
3. MATERIJALI I METODE.....	22
3.1. Materijali	22
3.2. Metode.....	24
3.2.1. Priprava nanočestica	24
3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka u nanočestice	24
3.2.3. Određivanje veličine nanočestica	25
3.2.4. Određivanje zeta-potencijala nanočestica	25
3.2.5. Stanična linija i uvjeti uzgoja	26
3.2.6. Praćenje dinamike prekrivanja praznina nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica – engl. <i>scratch test</i>	26

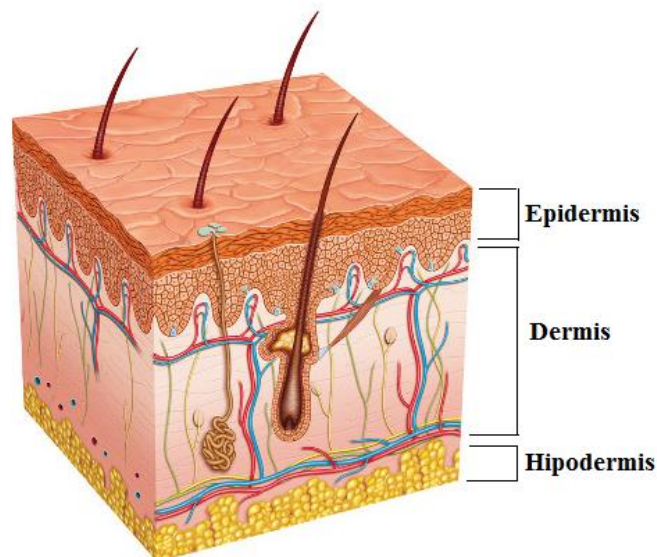
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom	28
4.2. Karakterizacija nanočestica s melatoninom	29
4.3. Ispitivanje prikladnosti <i>in vitro</i> modela rane za procjenu učinka nanočestica s melatoninom na migraciju/proliferaciju fibroblasta.....	31
5.ZAKLJUČCI	42
6.LITERATURA	43
7. SAŽETAK.....	49
7. SUMMARY.....	50
Temeljna dokumentacijska kartica	51
Basic documentation card	52

1. UVOD

1.1. Građa i funkcija kože

Koža je najveći organ ljudskog tijela te predstavlja više od desetine ukupne tjelesne mase prosječnog čovjeka. Koža služi kao fizička barijera prema okolini, što je njena osnovna i najvažnija funkcija. U sklopu funkcije fizičke barijere, koža sprječava gubitak vode i elektrolita, te štiti organizam od fizičkih, kemijskih i mikrobioloških utjecaja.

Koža također sudjeluje u regulaciji temperature, sintezi vitamina D, izlučivanju štetnih tvari (putem odbacivanja rožnatog sloja i sekrecijom iz žlijezda lojnica i znojnica), stvaranju imuniteta te služi kao medijator osjeta pomoću receptora za dodir, hladnoću i toplinu (Čajkovac, 2000).



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

Koža je složen organ koji se sastoji od dva osnovna sloja (epidermis i dermis) unutar kojih se nalaze različiti tipovi stanica i struktura. Potkožno masno tkivo (hipodermis) nalazi se ispod dermisa i ne smatra se dijelom kože (Slika 1). U kožu se ubrajaju i kožni privjesci poput žlijezda lojnica i znojnica, folikula dlaka i noktiju.

1.1.1. Epidermis

Epidermis je vanjski, tanki (debljine oko 120 μm) sloj kože, koji ne sadrži krvne žile, te se transport tvari odvija difuzijom između epidermisa i dermisa i obrnuto. Epidermis se sastoji od 4-5 slojeva: rožnati sloj (*stratum corneum*), svijetli sloj (*stratum lucidum*), zrnati sloj (*stratum granulosum*), trnasti sloj (*stratum spinosum*) i temeljni sloj (*stratum basale*).

Rožnati sloj (stratum corneum)

Rožnati sloj je površinski sloj kože koji se sastoji od 10-30 slojeva mrtvih, spljoštenih keratinocita (korneocita). Korneociti na površini su nepovezani, te se kontinuirano ljušte i zamjenjuju novim korneocitima iz dubljih slojeva epidermisa. Korneociti ne posjeduju jezgru niti stanične organele te su ispunjeni keratinom (skleroprotein), lipidima, masnim kiselinama i ceramidom, a međusobno povezani hidrofobnim lamelarnim lipidnim matriksom.

Zbog navedene građe, rožnati sloj regulira gubitak vode, a istovremeno služi kao fizička barijera prema okolini. Kontinuirano ljuštenje i zamjenjivanje novim stanicama iz dubljih slojeva se naziva deskvamacija, a vrijeme potrebno da stanica iz bazalnog sloja stigne do površine iznosi 28 dana (Čajkovac, 2000).

Svijetli sloj (stratum lucidum)

Svijetli sloj prisutan je samo u dijelovima kože koji se izloženi trenju, a sastoji se od tri do pet slojeva spljoštenih mrtvih keratinocita. U ovom sloju dolazi do potpune razgradnje jezgre i daljnje keratinizacije stanica.

Zrnati sloj (stratum granulosum)

Zrnati sloj se sastoji od jednog do tri sloja keratinocita. U ovom sloju započinje razgradnja jezgre, a u citoplazmi su prisutna keratohijalinska zrnca. Ovdje se nalaze i lamelarna zrnca koja sintetiziraju intercelularne lipide koji se oslobađaju u međustanični prostor.

Trnasti sloj (stratum spinosum)

Trnasti sloj se sastoji od četiri do sedam redova poligonalnih stanica s jezgrama koje sintetiziraju keratin te se stanice počinju morfološki mijenjati i diferencirati. Keratin se udružuje u tonofilamente. U ovom sloju prisutne su i Langerhansove stanice, imunološki aktivne stanice kože.

Temeljni sloj (stratum basale)

Temeljni sloj se sastoji od jednog reda zametnih stanica. Stanice se kontinuirano dijele, a nakon diobe jedna stanica ostaje u bazalnom sloju dok druga migrira iz temeljnog sloja te je podložna diferencijaciji i keratinizaciji. Keratinociti su vezani hemidezmosomima za bazalnu membranu. U ovom sloju nalaze se melanociti (koji na UV-podražaj proizvode pigment melanin), Merkelove stanice (posebno u regijama osjetljivim na dodir poput usana i jagodica prstiju) i Langerhansove stanice.

1.1.2. Epidermokutana veza

Epidermokutana veza je spoj epidermisa s dermisom preko bazalne membrane, koja smanjuje mogućnost odvajanja epidermisa od dermisa prilikom naprežanja kože. Nepravilnog je oblika jer prati valovitu papilarnu liniju koja je građena od trilamelarnih bazalnih keratinocita i kolagenskih vlakana, koji usidruju epidermis u dermis. Također sprječava gubitak vode i elektrolita kao i prodor mikroorganizama u organizam. Krvne žile ne prelaze epidermokutanu granicu te hranjive tvari difuzijom prelaze iz dermisa u epidermis, dok okrajci živaca prelaze u epidermis (Pepić i sur., 2011).

1.1.3. Dermis

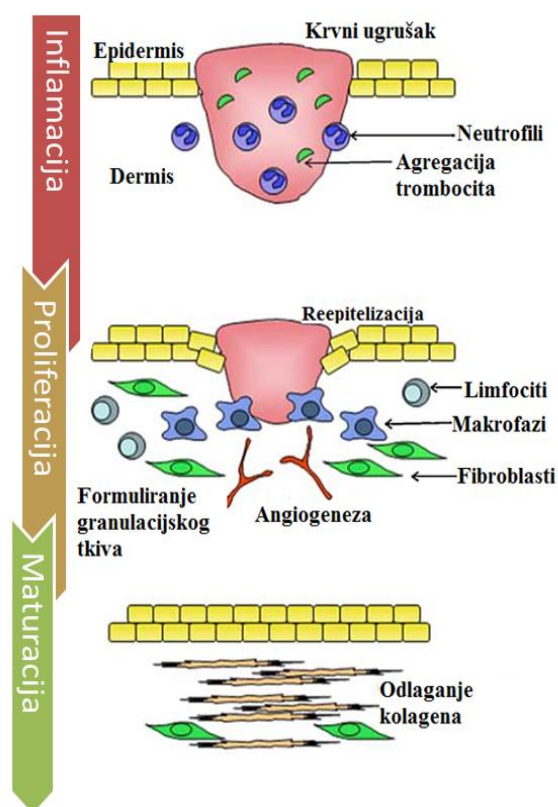
Dermis je unutarnji, deblji dio kože (1 do 2 mm) koji se sastoji od vezivnog tkiva, te kroz koji prolaze folikuli s dlakama i žlijezde znojnice. Vezivno tkivo se sastoji od kolagena i elastičnih vlakana. Kolagenska vlakna se mogu dijagonalno razvlačiti, ali se ne mogu vratiti u prvotni položaj bez elastičnih vlakana. Osnovnu masu dermisa čine glikozaminoglikani, spojevi velike molekulske mase poput hijaluronske kiseline i dermatan sulfata. Oni su kovalentno vezani za proteine i tako izgrađuju proteoglikane. Strukturni proteini su kolagen i elastin, a adhezivni su laminin (povezuje epitelne stanice s bazalnom membranom) i fibronektin (pričvršćuje fibroblaste) (Čajkovac, 2005).

Dermis se sastoji od dva sloja: papilarni (*stratum papillare*) i retikularni (*stratum reticulare*). Deblji retikularni sloj se sastoji od gustih snopova kolagenskih vlakana upletenih u mrežu elastičnih vlakana, a tu se još nalaze krvne i limfne žile, živci, receptori za hladnoću (Krauseovi klipovi), žlijezde lojnice i mišić koji podiže dlaku (*m. arrector pili*). Tanji papilarni sloj je građen od rahlog vezivnog tkiva, a u njemu se nalaze fibroblasti, limfociti i makrofagi. Fibroblasti su zaduženi za biosintezu kolagena, elastina, glikozaminoglikana, proteoglikana, fibronektina, laminina i drugih proteina izvanstaničnog matriksa koji koži daju

potporu i elastičnost. Ovdje se nalaze i krvne kapilare, završetci živaca i osjetilna tjelešca za dodir (Meissnerova tjelešca) (Jurić-Lekić, 1995).

1.2. Cijeljenje rane

Rana se definira kao ozljeda koja znači prekid kontinuiteta kože ili epitela, pri čemu može doći do djelomičnog ili potpunog oštećenja i na dubljim tkivima. Cijeljenje rane je dinamičan i kompleksan biološki odgovor na ozljedu, a sastoji se od četiri faze koje se međusobno preklapaju: hemostaze, inflamacije, proliferacije i maturacije (Slika 2).



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

1.2.1. Hemostaza

Hemostaza je proces prilikom kojeg dolazi do zaustavljanja krvarenja. Nakon ozljeđivanja pokreće se koagulacijska kaskada (intrizična i ekstrizična) koja se sastoji od tri odvojena procesa: kontrakcije krvnih žila, stvaranja trombocitnog čepa i koagulacije. Konačni proces kojim završava hemostaza je urastanje vezivnog tkiva.

Kontrakcijom krvne žile smanjuje se protjecanje krvi kroz ozljedu žile. Kontrakcija nastaje kao rezultat živčanog refleksa, lokalnog miogenog spazma i lokalnih humoralnih čimbenika iz oštećenog tkiva i trombocita poput tromboksana A₂ i prostaglandin 2-alfa koji djeluju kao vazokonstriktori (Huljev, 2013).

Na staničnoj membrani trombocita nalazi se glikoproteinski omotač koji sprječava prijanjanje uz neoštećeni, funkcionalni endotel. Isti glikoproteinski omotač uzrokuje prijanjanje uz oštećeni endotel, što je još više naglašeno ako trombociti dođu u kontakt s kolagenom iz dubljih dijelova stijenke krvne žile. Nakon kontakta s oštećenim endotelom, trombociti počnu mijenjati svoja svojstva (bubrenje, poprimanje nepravilnog oblika). Također postaju ljepljivi za tkivni kolagen i von Willebrandov faktor. Usto počinju lučiti velike količine ADP-a, a njihovi enzimi stvaraju tromboksan A₂. ADP i tromboksan A₂ aktiviraju susjedne trombocite (postaju ljepljivi) koji potom prijanjaju na već aktivirane trombocite i u konačnici stvaraju trombocitni čep. Ukoliko je pukotina na krvnoj žili mala, trombocitni čep može zaustaviti krvarenje. U protivnom, potrebno je stvaranje krvnog ugruška.

Stvaranje krvnog ugruška započinju aktivacijske tvari iz oštećene stijenke krvne žile, iz trombocita te iz krvnih proteina, koje prijanjaju uz oštećenu krvnu žilu. Ugrušak je sastavljen od fibrinskih niti koje se protežu u svim smjerovima. Fibrinske niti zadržavaju krvne stanice, trombocite i plazmu te prijanjaju za oštećenu površinu krvnih žila i sprječavaju krvarenje.

1.2.2. Inflamacija (upala)

Upala je tkivna reakcija na ozljedu. Cilj upale tijekom ozljede kože je ukloniti oštećeno tkivo i stanice kao i strana tijela poput prašine i mikroorganizama iz nastale rane.

Aktivirani trombin uzrokuje povećanje vaskularne permeabilnosti što omogućuje migraciju različitih upalnih faktora i stanica iz intravaskularnog prostora u ekstravaskularni prostor oštećenog tkiva. Istovremeno, nastali krvni ugrušak se počinje otapati uz djelovanje plazmina, enzima koji nastaje aktivacijom iz plazminogena.

Početnu kratkotrajnu vazokonstrikciju zamjenjuje puno duža vazodilatacija koja je uzrokovana histaminom, prostaglandinima, kininima i leukotrienima. Vazodilatacija uzrokuje povećani protok krvi koji omogućuje upalnim faktorima i stanicama (neutrofili, makrofagi i limfociti) da stignu do oštećenog područja.

Tijekom prvih 48 sati nakon ozljede, neutrofili su glavni nositelji upalnog odgovora, ali nisu esencijalni u procesu cijeljenja rane. Oslobađaju medijatore upale i reaktivne oblike kisika koji čiste ranu od nekrotičnog tkiva i bakterija.

Makrofagi fagocitiraju oštećeno tkivo i bakteriju, te su esencijalne stanice u procesu cijeljenja rane, pogotovo u ranoj fazi cijeljenja. Također izlučuju kolagenaze i elastaze, koje razgrađuju oštećeno tkivo i oslobađaju citokine. Trombocitni čimbenik rasta (PDGF, engl. *platelet-derived growth factor*) je citokin koji potiče kemotaksiju i proliferaciju fibroblasta i glatkih mišićnih stanica. Makrofagi su posredno uključeni u angiogenezu jer izlučuju tvari koje privlače endotelne stanice prema rani i potiču njihovu proliferaciju.

T-limfociti migriraju prema rani, prosječno 72 sata nakon ozljede. Migracija je potaknuta oslobađanjem interleukina 1 iz stanica. Limfociti izlučuju limfokine te igraju važnu ulogu u imunosti posredovanoj stanicama (Simon i Meyers, 2014).

1.2.3. Proliferacija

Faza proliferacije započinje tri do pet dana nakon ozljede, te se preklapa s fazom inflamacije. Ovu fazu karakterizira formiranje granulacijskog tkiva koje se sastoji od upalnih stanica, fibroblasta i novih krvnih žila u matriksu građenom od fibronektina, kolagena, glikozaminoglikana i proteoglikana. Faza proliferacije se sastoji od četiri podfaze: epitelizacije, fibroplazije, angiogeneze i kontrakcije.

Epitelizacija

Epitelizacija predstavlja formiranje epitela preko oštećenog tkiva. Proces započinje nekoliko sati nakon ozljede, a uključuje migraciju epidermalnih stanica s jednog ruba rane prema drugom. Nastali epitelni sloj predstavlja barijeru između rane i okoline.

Epidermalne stanice podliježu strukturnim promjenama koje im omogućavaju da se odvoje od susjednih epidermalnih stanica kao i od bazalne membrane. Dolazi do nastajanja unutarstaničnih mikrofilamenata aktina, koji omogućavaju epidermalnim stanicama “puzanje” preko rane. Uslijed migracije, epidermalne stanice odvajaju nekrotično površinsko tkivo od zdravog tkiva koje ostaje zaštićeno epitelnim slojem.

Epidermalne stanice izlučuju kolagenaze koje razgrađuju kolagen i aktivator plazminogena koji potiče stvaranje plazmina. Plazmin potiče otapanja ugruška duž puta kojim stanice migriraju. Također, migrirajuće stanice ulaze u interakciju s fibrinom koji je poprečno povezan s fibronektinom i kolagenom.

Nakon završetka epitelizacije, epidermalne stanice se vraćaju u prvotni oblik i obnavljaju dezmosomske i hemidezmosomske veze s ostalim epidermalnim stanicama i bazalnom membranom.

Fibroplazija

Fibroplazija započinje tri do pet dana nakon ozljede i može trajati do 14 dana. Fibroblasti kože i mezenhimske stanice diferenciraju čime stječu sposobnost migracije i kontrakcije. Fibronektin, PDGF, čimbenik rasta fibroblasta, (FGF, engl. *fibroblast growth factor*), transformirajući faktor rasta (TGF, engl. *transforming growth factor*) i komponenta komplementa 5a (C5a, engl. *complement component*) potiču fibroblaste na migraciju i proliferaciju. Fibronektin služi kao sidro za miofibroblaste koji migriraju prema ozljedi.

Fibroblasti su ključna komponenta granulacijskog tkiva. Zaduženi su za sintezu kolagena, elastina, fibronektina, glikozaminoglikana i proteaza. Broj fibroblasta u rani raste kako broj upalnih stanica opada.

Sinteza i odlaganje kolagena ključni su u ovom dijelu faze proliferacije, ali i općenito u procesu cijeljenja rane. Kolagen je bogat hidroksilizinom i hidroksiprolinom koji mu omogućavaju stvaranje jakih poprečnih veza. Hidroksilacija prolina i lizina u molekuli kolagena ovisna je o prisustvu kisika, vitamina C, iona željeza i alfa-ketoglutarata. Nedostatak kisika i vitamina C dovodi do nedovoljno hidroksiliranog kolagena koji nije u mogućnosti stvarati jake poprečne veze te je zbog toga podložniji pucanju.

Kolagen se fomira u obliku filamenata iz tropokolagena koji nastaju odstranjivanjem terminalnih dijelova prokolagena kojeg stanice izlučuju u izvanstanični prostor. Stvaranje filamenata, fibrila i tkiva događa se u matriksu koji se sastoji od glukozaminoglikana, hijaluronske kiseline, hondroitin sulfata, dermatan sulfata i heparin sulfata za izlučivanje kojih su zaslužni fibroblasti. Sinteza kolagena započinje tri dana nakon ozljede i može se intenzivno nastaviti dva do četiri tjedna. Sinteza je kontrolirana prisustvom kolagenaza koje razgrađuju kolagen kako novi kolagen nastaje (Simon i Meyers, 2014).

Otpriblike 80 % kolagena u koži je kolagen tipa I, dok ostatak čini kolagen tipa III. No

za vrijeme početne faze stvaranja granulacijskog tkiva, većina prisutnog kolagena je kolagen tipa III koji se kasnije tijekom cijeljenja zamjenjuje kolagenom tipa I (Mercandetti i Molnar, 2015).

Angiogeneza

Ključne stanice u stvaranju novih krvnih žila (angiogeneza) u području rane su makrofagi koji kao odgovor na slabu oksigenaciju tkiva izlučuju makrofagni čimbenik angiogeneze (MDAF, engl. *macrophage-derived angiogenesis factor*). MDAF pozitivno utječe na migraciju endotelnih stanica. Makrofagi i epidermalne stanice izlučuju osnovni čimbenik rasta fibroblasta (bFGF, engl. *basic fibroblast growth factor*) i vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) koji također utječu na angiogenezu.

Angiogeneza omogućuje povećani dotok krvi u ranu te posljedično hranjivih tvari i faktora koji pridonose cijeljenju. Čim se zadovolji potreba za novim krvnim žilama angiogeneza prestaje, a suvišne krvne žile se uklanjaju apoptozom.

Kontrakcija

Kontrakcija, definirana kao centripetalni pokreti rubova rane, ima cilj smanjiti veličinu rane, a najviše je izražena 5 do 15 dana od ozljede. Započinje usporedno sa sintezom kolagena, a ovisna je o obliku rane i čvrstoći rubova, kao i o periferno lociranim miofibroblastima, njihovoj vezi s izvanstaničnim matriksom i proliferaciji miofibroblasta.

1.2.4. Maturacija (remodeliranje tkiva)

Remodeliranje tkiva označava uklanjanje granulacijskog tkiva uz revaskularizaciju. Granulacijsko tkivo zamjenjuje okosnica kolagenskih i elastičnih vlakana. Tijekom remodeliranja kolagen tipa III zamjenjuje se kolagenom tipa I, uz postojanje ravnoteže sinteze i razgradnje. Kolagenaze i metaloproteinaze pomažu u uklanjanju starog kolagena na mjestu ozljede.

Tijekom maturacije, fibronektin postupno nestaje, hijaluronska kiselina i glikozaminoglikani zamjenjuju se proteoglikanima, a voda se resorbira iz rane. Navedeni događaji omogućuju kolagenskim vlaknima da se maksimalno približe i tvore poprečne veze koje povećavaju mehaničku otpornost rane.

Remodeliranje počinje oko 21. dana nakon ozljede, nakon što kolagenska mreža

unutar rane postane stabilna (Simon i Meyers, 2014).

Snaga otpora na istezanje rane podrazumijeva silu koja je potrebna da rana pukne neovisno o njezinim dimenzijama. Zacijeljena rana može dosegnuti samo oko 80% mehaničke otpornosti neranjene kože (Mercandetti i Molnar, 2015).

1.3. Modeli cijeljenja rane

Razvijeni su različiti modeli cijeljenja rane za potrebe proučavanja i boljeg razumijevanja pojedinih faza cijeljenja rane. Modeli cijeljenja rane dijele se na *in vivo* i *in vitro* modele. Obje skupine imaju svojih prednosti i nedostataka kao što je i prikazano u Tablici 1 (Stephens i sur., 2013).

Tablica 1: Usporedba prednosti i nedostataka *in vivo* i *in vitro* modela cijeljenja rane

Tip modela	Prednosti	Nedostatci
<i>In vivo</i> modeli	❖ mogućnost istraživanja kompleksne interakcije različitih stanica/organskih sustava uključenih u proces cijeljenja rane ❖ mogućnost istraživanja više čimbenika procesa cijeljenja rane ❖ mogućnost istraživanja utjecaja imunološkog sustava ❖ mogućnost proučavanja više rana na jednoj životinji (kontrolna i tretirana rana su na istoj životinji, manja mogućnost varijabilnosti) ❖ lak pristup području rane ❖ mogućnost selektivne delecije određenih gena s ciljem utvrđivanja njihovog utjecaja na cijeljenje rane ❖ mogućnost simuliranja različitih uzroka ozljede tkiva (mehaničko, kemijsko ili toplinsko oštećenje) ❖ raširena uporaba kao modela za kronične rane	❖ kompleksnost animalnog modela ponekad onemogućuje jasno razlikovanje uloge pojedinih tkiva/tipova stanica u procesu cijeljenja rane ❖ ispitivanje često zahtjeva žrtvovanje životinja čime se onemogućuje nastavak ispitivanja na istoj jedinci ❖ teško kontroliranje veličine i dubine rane ❖ animalna koža i imunosni odgovor nisu istovjetni ljudskima ❖ nepostojanje točnog i reproducibilnog modela za kronične rane ❖ potreba za velikim brojem laboratorijskih životinja s ciljem postizanja statističke značajnosti, nedostatak reproducibilnosti kod različitih laboratorija; istraživanja na velikom broju životinja su iznimno skupa i dugotrajna ❖ uzrokovanje boli u životinja

Tip modela	Prednosti	Nedostatci
<i>In vitro</i> modeli	❖ mogućnost ispitivanja uloge pojedinih tipova stanica i čimbenika u procesu cijeljenja rane ❖ mogućnost provođenja usporednih ispitivanja na oboljelim i zdravim stanicama ❖ mogućnost uspostavljanja humanih staničnih linija za daljnja istraživanja, a uspostavljanje i rad sa staničnim linijama nisu skupi ❖ mogućnost razvijanja kompleksnijih 3D modela za oponašanje uvjeta <i>in vivo</i> ❖ mogućnost provođenja kontinuirane analize (u više vremenskih točaka) na istom modelu ❖ lako podešavanje svojstava modela s ciljem ispitivanja različitih tvari ❖ probirni modeli velikog kapaciteta s obzirom na broj ispitivanih uzoraka u jedinici vremena ❖ smanjena uporaba laboratorijskih životinja	❖ ograničena mogućnost istraživanja interakcija između različitih stanica uključenih u cijeljenje rane (nije moguće istražiti cjelokupan odgovor organizma) ❖ čak ni kompleksni 3D modeli ne mogu do kraja oponašati strukturu i funkciju dijelova kože ❖ neki modeli (npr. primarne stanične linije) imaju ograničen broj dijeljenja ❖ nedostatak cjelokupnog imunosnog odgovora ❖ mogućnost nastajanja staničnih artefakata koji mogu promijeniti ishod eksperimenta

1.3.1. *In vivo* modeli cijeljenja rane

In vivo (animalni) modeli cijeljenja rane omogućuju istraživanja kompleksne interakcije različitih stanica/organskih sustava uključenih u proces cijeljenja rane. *In vivo* modeli razlikuju se prema kompleksnosti. Najjednostavniji animalni modeli podrazumijevaju induciranje rane u laboratorijskih životinja i praćenje dinamike cijeljenja rane. Kompleksniji modeli uključuju fizičke, kemijske ili biološke promjene okoline rane. Koriste se i genski modificirane životinje kada je potrebno simulirati različita stanja bolesti (npr. dijabetes) tj. ispitati njihov utjecaj na proces cijeljenja rane (Stephens i sur., 2013).

Ekscizijska rana u punoj debljini

Ekscizijska rana u punoj debljini nastaje kirurškim odstranjivanjem svih dijelova kože: epidermisa, dermisa, potkožnog masnog tkiva i u miševa, subkutanog glatkog mišića (Wong i sur., 2011). Takav model omogućava istodobno proučavanje svih faza cijeljenja rane te je moguće na jednoj jedinci proučavati procese cijeljenja više rana što omogućava izravno uspoređivanje učinaka različitih tvari/terapijskih sustava na cijeljenje rane. Kirurško izrezivanje izvodi se pod anestezijom te nakon odstranjivanja dlake životinje s područja na kojem se inducira rana. Glavni nedostatak opisanog modela je neujednačenost rana jer se generiraju ručno. Također kompleksnost tog modela onemogućava pojedinačno promatranje faza i podfaza cijeljenja rana, a za potrebe histoloških analiza nužno je žrtvovati životinju.

Punkcijska rana

Punkcijske rane na ušima kunića jedan su od oblika rana u punoj debljini koje se induciraju biopsijskom iglom, a obuhvaćaju narušavanje integriteta epidermisa, dermisa i hrskavice uha. U zečeva se proces cijeljenja odvija od ruba rane prema unutrašnjosti (Williams-Boyce i Daniel, 1980). Cijeljenje rane traje više tjedana te se uzorci za histološku analizu mogu uzimati u različitim vremenskim točkama. S obzirom da se rana inducira biopsijskom iglom, ne postoji velika razlika u veličini pojedinačnih rana te uz to postoji mogućnost induciranja više rana po uhu (Kryger i sur., 2007).

Rana koja ne zahvaća punu debljinu kože

Rana koja ne zahvaća punu debljinu kože inducira se dermatomom, kirurškim instrumentom koji se koristi pri transplataciji kože. S obzirom da se uklanja epidermis i manji dio dermisa, ovaj model služi za promatranje epidermalnog cijeljenja rane. Tijekom uklanjanja epidermisa i dijela dermisa dolazi do početnog krvarenja uslijed poremećaja opskrbe epidermisa krvlju. Rane inducirane dermatomom većih su dimenzija te se koriste kao modeli rana u ispitivanjima koja se provode u većih laboratorijskih životinja poput svinja. Ako se dermatom primjenjuje pravilno, moguće je inducirati rane jednake veličine i dubine. Također, moguće je induciranje više rana na jednoj životinji. U rane koje ne zahvaćaju punu dubinu kože ubrajaju se i modelne opekline (Breuing i sur., 2003).

Mjehurić induciran usisnom silom

Pomoću usisne snage vakuuma, dolazi do odvajanja epidermisa i dermisa u području bazalne membrane tj. do pucanja epidermokutane veze. Nastala praznina između epidermisa i

dermisa popunjava se izvanstaničnom tekućinom. Rane nastale ovim putem ujednačenih su dimenzija (površine i dubine). Nastali mjehurić se potom može ukloniti čime se generira otvorena rana. Pošto ne dolazi do oštećivanja dermisa, ovaj model je idealan za promatranje procesa epitelizacije tijekom cijeljenja rane. Također, moguće je inducirati više takvih rana u jedne životinje. Mjehurići inducirani usisnom silom primjenjivani su kao modeli rane u ispitivanjima provedenim u ljudi (Leivo i sur., 2000).

Opekline izazvana vrućom vodom

Primjenom vruće vode na određenu površinu kože stvaraju se mjehurići koji se mogu odstraniti čime se generira otvorena rana. Dubina rane određena je temperaturom vode i vremenom izlaganja. Navedeni model rane primjereniji je za veće laboratorijske životinje, a glavni nedostatak je potreba empirijskog određivanja vremena izlaganja za svaku životinjsku vrstu.

Termalna opekline

Termalna opekline inducira se metalnom pločicom ugrijanom na određenu temperaturu koja se prislanja na kožu tijekom određenog vremena nakon čega nastaje mjehurić koji se kao i kod prethodna dva modela odstrani kako bi se generirala otvorena rana. Dubina rane određena je temperaturom pločice i vremenom izlaganja. Kao i kod opekline izazvanih vrućom vodom, potrebno je empirijski odrediti navedene parametre za svaku životinjsku vrstu. Termalne opekline kao model rane već se široko primjenjuju u raznih životinjskih vrsta, a prvenstveno u svinja (Wang i sur., 2010).

Kod modela koji koriste toplinsku energiju za induciranje rane, treba uzeti u obzir i denaturaciju proteina koja se događa pri izloženosti povišenim temperaturama te potencijalni utjecaj na cijeljenje rane.

1.3.2. *In vitro* modeli cijeljenja rane

Starenje svjetske populacije donosi nove izazove i zahtjeve pri razvijanju inovativnih proizvoda i mogućnosti liječenja s ciljem udovoljavanja potrebama bolesnika. Ispitivanje djelotvornosti i neškodljivosti inovativnih proizvoda korištenjem animalnih modela kao i provođenjem ispitivanja u ljudi često je etički upitno, te dugotrajno i skupo. Zbog toga je sve veća potreba za razvijanjem *in vitro* modela koji mogu poslužiti kao zamjena za *in vivo* modele. *In vitro* modeli omogućavaju jeftino i brzo probiranje tvari, materijala i terapijskih sustava koji bi se mogli potencijalno koristiti u daljnjim ispitivanjima. Na taj način se

smanjuje broj ispitivanja provedenih u laboratorijskih životinja.

Kompleksnost animalnih modela često onemogućuje razlučivanje kako određena tvar ili terapijski sustav djeluje na točno određeni segment procesa cijeljenja rane tj. kako djeluje na točno određeni tip stanica. Jednostavniji modeli cijeljenja rane poput pojedinačnih staničnih linija ili miješanih staničnih kultura omogućavaju promatranje određenih segmenata procesa cijeljenja rane. Moguća je uporaba humanih staničnih linija čime se, za razliku od *in vivo* ispitivanja na animalnim modelima, izbjegava razlika u procesu cijeljenja u životinjskih vrsta i ljudi. Humane stanice mogu biti izolirane iz tkiva pri različitim oboljenjima. Također mogu biti genski modificirane čime se omogućava proučavanje utjecaja različitih bolesti i stanja na cijeljenje rane.

Modelna rana nastala namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica

Modelna rana nastala namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica jedan je od najjednostavnijih modela rane. Omogućava kvantitativno praćenje dinamike prekrivanja praznine nastale oštećivanjem monosloja stanica. Nakon stvaranja modelne rane, stanice s rubova rane počinju migrirati i proliferirati prema središtu s ciljem zatvaranja rane. Dinamika prekrivanja modelne rane (cijeljenja *in vitro*) prati se uspoređivanjem površine praznine u određenim vremenskim intervalima s površinom praznine u trenutku oštećivanja konfluentnog sloja. Korištenjem ove metode, primijećena je razlika između stanica pri migraciji te tako primjerice keratinociti migriraju u grupi tj. pomicanjem rubova rane prema središtu (Poujade i sur., 2007), dok fibroblasti migriraju pojedinačno (Kole i sur., 2005). Metoda se pokazala jednostavnom, jeftinom i prilagodljivom za proučavanje procesa cijeljenja rane. Kontrolirajući uvjete cijeljenja, moguće je odrediti utjecaj različitih tvari, terapijskih sustava i bolesti na proces cijeljenja (Stevenson, 2008).

Kolagenski matriks s uklopljenim fibroblastima

Model u kojem su fibroblasti uklopljeni u kolagenski matriks omogućava uvid u proces remodeliranja ekstracelularnog matriksa od strane dermalnih fibroblasta (Dalon i Ehrlich, 2008). Fibroblasti se stave u otopinu kolagena tipa I te se ovisno o ispitivanju koje se provodi, dodaju različiti induktivni ili inhibitorni faktori, različiti materijali ili različite biomolekule ekstracelularnog matriksa (Stephens, 2006). Nakon toga se nastala smjesa prenese u Petrijevu zdjelicu i ostavi stajati kako bi polimerizacijom nastao trodimenzionalni matriks s uklopljenim stanicama fibroblasta. Postoje dva tipa ovog modela: pričvršćeni (za bazu i stijenke jažice) i slobodni (plutajući) kolagenski matriks s uklopljenim fibroblastima.

Između njih postoje značajne razlike u distribuciji kolagena te broju i morfologiji fibroblasta, zbog kojih se i koriste kao modeli za različite faze cijeljenja rane: pričvršćeni kolagenski matriks s uklopljenim fibroblastima koristi se kao model za proučavanje stvaranja granulacijskog tkiva, a slobodni za proučavanje stvaranja ožiljkastog tkiva (Carlson i Longaker, 2004).

Glavni nedostatak ovog modela je nemogućnost oponašanja cjelovite strukture kože kao i izostanak međustaničnih interakcija jer se u kolagenskom matriksu nalaze samo fibroblasti (Stephens i sur., 2013).

Model kokulture stanica

Model kokulture stanica je razvijen kako bi se što vjernije oponašale interakcije dermalnih i epidermalnih stanica u *in vitro* uvjetima. Razvijeni su modeli kokulture keratinocita i fibroblasta gdje keratinociti kao stanice epidermisa rastu na kolagenskom matriksu koji sadrži fibroblaste. Keratinociti su izloženi zraku te stvaraju stratificirani sloj, a potrebne hranjive tvari dobivaju iz kolagenskog matriksa (Wang i sur., 2003). Također, keratinociti se mogu nasaditi na de-epidermalizirani dermis, te time postići još bolju diferencijaciju epidermisa, te se ovaj tip modela koristi za proučavanje promjena u diferencijaciji keratinocita. Na tržištu su dostupni različiti epidermalni ekvivalenti koji služe kao modeli cjelovite kože i epidermisa (www.skinethic.com, www.mattek.com).

Proces cijeljenja rane proučava se praćenjem staničnog odgovora nakon namjernog oštećivanja modela (O'Leary i sur., 2002). Modeli kokulture stanica omogućavaju proučavanje međustaničnih reakcija, što nije moguće kod jednostavnijih *in vitro* modela. Iako se razvijaju sve napredniji modeli kokulture stanica (Herman i Leung, 2009), još uvijek ne postoji model koji bi mogao oponašati funkcionalnu vaskulaturu ili imunosni odgovor pri cijeljenju rane.

Kultiviranje eksplantirane kože

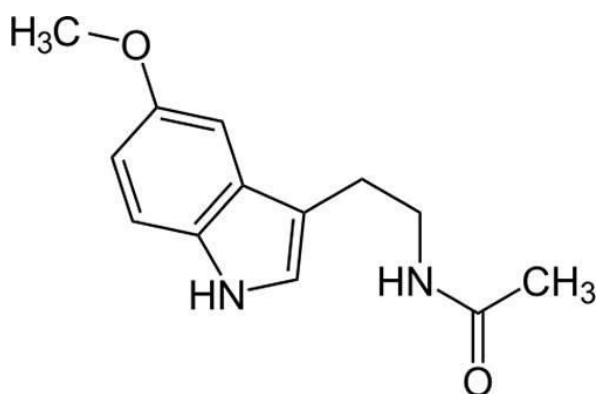
Eksplantacija i kultiviranje kože predstavlja početak *in vitro* ispitivanja epidermisa. Pri kultiviranju eksplantirane kože, stanice rastu na odrezanim krajevima segmenta kože. Keratinociti u početku rastu brže od fibroblasta, ali kasnije fibroblasti brzinom rasta prestižu keratinocite. Kultivirana koža predstavlja *in vitro* model cjelovite kože. Podložna je nekrozi te rijetko ostaje vijabilna dulje od 14 dana. Iako postoji ograničeno vrijeme tijekom kojeg se mogu provoditi ispitivanja, ovaj model se i dalje koristi za proučavanje procesa cijeljenja rane

(Stoll i sur., 2003).

1.4. Melatonin

Melatonin je neurohormon široko rasprostranjen u prirodi, koji je nađen u kralježnjaka, beskralježnjaka, biljaka, algi, jednostaničnih eukariota i bakterija. Melatonin ili N-acetil-5-metoksitriptamin je strukturno indolni amid koji se većinom sintetizira u pinealnoj žlijezdi (epifizi) pod utjecajem ritma izmjene dana i noći. Pinealna žlijezda reagira na svjetlost te se tijekom dana smanjuje sekrecija melatonina.

Melatonin se sintetizira iz serotonina koji je prethodno nastao iz aminokiseline triptofan. Serotonin djelovanjem N-acetiltransferaze i hidroksiindol-O-metiltransferaze prelazi u melatonin (Slika 3). Vrijeme poluživota melatonina je 30 minuta. Metabolizira se u jetri djelovanjem citokrom-P450 monooksigenaza (CYP1A2, CYP1A1, CYP1B1) te se u obliku sulfata izlučuje urinom.



Slika 3. Struktura melatonina

Melatonin i njegovi metaboliti imaju različite učinke neovisne o vezanju na receptore. Ti učinci obuhvaćaju detoksikaciju, antiapopotsko, antigenotoksično i antimutageno djelovanje te mitohondrijsku regulaciju. Najviše pozornosti privuklo je antioksidativno djelovanje melatonina. Melatonin može djelovati kao hvatač slobodnih radikala te može smanjiti oštećenja izazvana reaktivnim oblicima kisika i dušika. Također povećava aktivnost superoksid dismutaze i peroksidaze tj. antioksidativnih enzima, a smanjuje aktivnost prooksidativnih enzima. Unutar stanice, potiče sintezu glutationa i obnovu njegovog reduciranog oblika. Uočeno je i da smanjuje oštećenja uzorkovana ionizirajućim zračenjem (Hardeland i sur., 2006).

Topikalno primijenjen melatonin djeluje fotoprotektivno i smanjuje eriteme nastale UV zračenjem te prevenira fotostarenje, fotokarcinogenezu i druga oštećenja kože nastala UV

zračenjem (Bonnefont-Rousselot, 2010).

1.4.1. Utjecaj melatonina na cijeljenje rane

Melatonin utječe na cijeljenje rane ovisno o dozi, vremenu primjene i ciljanom tkivu. Njegov utjecaj je vidljiv u različitim fazama cijeljenja rane. Tijekom upale, utječe na oslobađanje medijatora upale dok tijekom faze proliferacije utječe na angiogenezu i fibroplaziju (Drobnik, 2012).

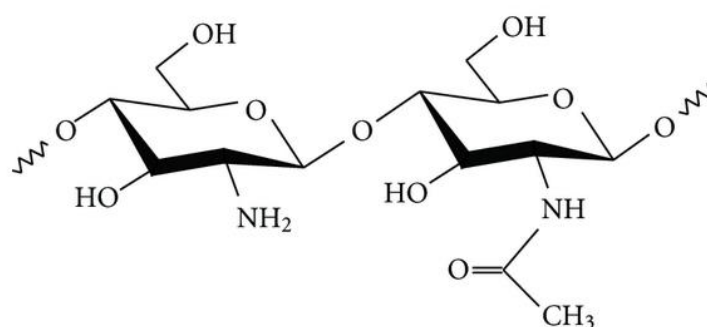
Proturječni zaključci o tome ima li melatonin pozitivan (Carossino i sur., 1996; Drobnik i sur., 2013) ili negativan utjecaj (Bullbiller i sur., 2005; Drobnik i Dabrowski, 1996) na odlaganje kolagena u području rane, mogu se djelomično objasniti razlikom između učinka melatonina kada je primijenjen lokalno i učinaka melatonina putem različitih regulatornih mehanizama kada je primijenjen sistemski (Drobnik, 2012). Stoga je primjereno razvijati terapijske sustave s uklopljenim melatoninom za lokalnu primjenu kako bi se izbjegli nepoželjni sistemski učinci. Također, pokazano je da intradermalna primjena egzogenog melatonina pozitivno utječe na cijeljenje rana (Pugazhenth i sur., 2008). Naime, lokalna primjena melatonina pozitivno utječe na kvalitetu ožiljka preko poboljšanja maturacije i orijentacije kolagenskih vlakana. Smatra se da je utjecaj melatonina na inducibilnu sintazu dušikova oksida (iNOS) odgovaran za pozitivan utjecaj na kvalitetu ožiljka. Tijekom faze upale melatonin smanjuje aktivnost iNOS, dok je tijekom faze proliferacije povećava. Aktivnost iNOS i dušikova oksida za vrijeme faze proliferacije ima utjecaj na angiogenezu i granulaciju (Pugazhenth i sur., 2008).

Melatonin ima izražen utjecaj na imunološki sustav. Utjecaj je ovisan o dozi, te melatonin u koncentracijama iznad fizioloških inducira proliferaciju T-limfocita i proinflammatoryh citokina. Utvrđeno je da u štakora stimulira stvaranje interleukina 1 i faktora tumorske nekroze alfa (TNF- α , eng. *Tumor necrosis factor-alpha*), povećava broj limfocita i NK (engl. *natural killer*) stanica te pojačava fagocitozu (Radogna i sur., 2010).

Za što uspješnije cijeljenje rane neophodno je osigurati optimalne uvjete koji uključuju i sprječavanje razvoja infekcije. Pojava infekcije, osim što može dovesti do pojave sepse, može inhibirati brojne procese uključene u cijeljenje. Utvrđeno je da melatonin ima antibakterijski učinak na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, od kojih je jače izražen učinak na gram-negativne bakterije. Predloženo je više mehanizama antibakterijskog učinka melatonina, od kojih se najvažnijim čini mogućnost vezanja intracelularnih supstrata kao što su masne kiseline (Tekbas i sur., 2007).

1.5. Kitozan

Kitozan je prirodni polimer koji nastaje alkalnom N-deacetilacijom hitina te se sastoji od β -(1,4)-D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina (Slika 4). Hitin je, nakon celuloze, najzastupljeniji polimer u prirodi te je glavni sastojak egzoskeleta člankonožaca i čini staničnu stijenku nekih gljiva i kvasaca. Nakon deacetilacije, amino skupine glukozamina postaju slobodne. U kiselom mediju ($\text{pH} < 6,5$ (pK_a)) dolazi do protonacije amino skupina uslijed čega raste topljivost kitozana u vodenom mediju (Rinaudo, 2006).



Slika 4: Struktura kitozana

Kitozan je biokompatibilan, biorazgradljivi netoksičan kationski polimer bez antigenih svojstava. Različiti tipovi kitozana međusobno se razlikuju prema stupnju deacetilacije (DD, engl. *degree of deacetylation*) i molekulskoj masi (MW, engl. *molecular weight*) te svojstvima poput topljivosti i viskoznosti otopina. Komercijalno dostupni kitozani imaju molekulsku masu 4-2000 kDa, a stupanj deacetilacije 66-95% (Mun i sur., 2006).

Biokompatibilnost kitozana također ovisi o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi kitozana. Uočeno je da je kod kitozana većeg stupnja deacetilacije toksičnost povezana s molekulskom masom i koncentracijom, dok je kod kitozana manjeg stupnja deacetilacije povezanost s molekulskom masom manje izražena. Kitozan također pokazuje toksičnost prema nekim bakterijama i parazitima. Provedena su različita ispitivanja kojima je utvrđeno da kitozan ima antibakterijski (prema *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*), antimikotički (prema *Candida albicans* i *Aspergillus niger*) i antiparazitni (prema *Leishmania infantum*) učinak (Kean i Thanou., 2010).

1.5.1. Utjecaj kitozana na cijeljenje rane

Kitozan utječe na sve procese cijeljenja rane. U početnim fazama cijeljenja potiče migraciju upalnih stanica, koje potom proizvode velike količine protuupalnih produkata i

čimbenika rasta. Ovim mehanizmom aktivira i povećava funkciju polimorfonuklearnih neutrofila (PMN, engl. *polymorphonuclear neutrophil*), potiče migraciju makrofaga i produkciju fibroblasta. Zahvaljujući pozitivnom naboju, kitozan ulazi u interakciju s negativno nabijenim membranama eritrocita (Miller i sur., 2009).

Stimulacijom fibroblasta moguće je postići veću snagu ožiljaka. Minagawa i suradnici ispitali su učinak otopina kitozana i hitina na brzinu cijeljenja rane, u rasponu koncentracija 0,1 do 10 mg ml⁻¹. Utvrdili su da je snaga ožiljaka i aktivnost kolagenaza veća kod rana tretiranih kitozanom ili derivatima kitozana nego kod rana tretiranih hitinom ili derivatima hitina. Također, kod kitozana većeg stupnja deacetilacije uočena je veća snaga ožiljaka i veća aktivnost fibroblasta. Najbolji učinak primijećen je kod rana tretiranih oligomerima kitozana i hitina (Minagawa i sur., 2007).

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

Kao potvrda biokompatibilnosti kitozana pri cijeljenju rana, Santos i suradnici su istraživali utjecaj kitozana na polimorfonuklearne neutrofile (PMN) preko kvantificiranja količine lizozima i reaktivnih oblika kisika (ROS, engl. *reactive oxygen species*). Utvrdili su da PMN u prisutnosti kitozana izlučuju jednaku količinu lizozima i ROS u odnosu na kontrolu tj. PMN bez prisutnosti kitozana što znači da je kitozan primjeren polimer u razvoju sustava za tretiranje rana. Reaktivni oblici kisika su iznimno važni kod cijeljenja rane, osobito u fazama upale i proliferacije (Santos i sur., 2007). U fazi upale glavna im je funkcija spriječiti infekciju i ukloniti nekrotično tkivo. ROS se izlučuju iz leukocita koji migriraju prema rani, a epitelne stanice na rubovima rane izlučuju vodikov peroksid koji onda privlači leukocite. U fazi proliferacije, vodikov peroksid inducira reepitelizaciju, stimulira sintezu kolagena i diferencijaciju fibroblasta. Važno je da ROS budu prisutni u fiziološkim koncentracijama jer tada promoviraju preživljavanje, proliferaciju i diferencijaciju stanica. Pri višim koncentracijama uzrokuju apoptozu i nekrozu stanica tj. usporavaju proces cijeljenja rane (Yao

i sur., 2008).

Proučavan je i utjecaj kitozana u ranoj fazi cijeljenja rana kostiju i zubi putem produkcije osteopontina iz humanih PMN. Osteopontin je visoko fosforiliran sijaloprotein te je značajna sastavnica mineraliziranog ekstracelularnog matriksa kostiju i zubi. Djeluje preko brojnih receptora koji sudjeluju u različitim signalnim putevima i procesima poput npr. imunološkog odgovora, tumorogeneze, kalcifikacije i cijeljenja rane. *In vitro* ispitivanjem stimulacije polimorfonuklearnih neutrofila čimbenikom stimulacije granulocitnih kolonija (G-CSF, engl. *granulocyte-colony stimulating factor*) i kitozanom utvrđeno je da dolazi do nakupljanja mRNA osteopontina i njegovog oslobađanja u hranidbeni medij. Time je pokazano da kitozan može imati ulogu u ranoj fazi cijeljenja rane (Ueno i sur., 2001).

Antimikrobna aktivnost kitozana također pridonosi uspješnom cijeljenju rane jer sprječava infekciju rane. Točan mehanizam antimikrobne aktivnosti nije u potpunosti razjašnjen. Najšire prihvaćen mehanizam je elektrostatska interakcija pozitivno nabijenog kitozana i negativno nabijenih sastavnica bakterijske površine, npr. anionskih glikana bakterijskog staničnog zida ili fosfolipida u citoplazmatskoj membrani. Interakcija sa sastavnicama stanične membrane može mijenjati permeabilnost, rezultirati istjecanjem intracelularnih elektrolita, glukoze, enzima i drugih proteinskih citoplazmatskih materijala. Mehanizam antimikrobne aktivnosti ovisi i o molekulskoj masi kitozana. Pretpostavlja se da kitozani velike molekulske mase stvaraju polimerni štit koji sprječava ulazak i izlazak nutrijenata iz stanice, dok kitozani manje molekulske ulaze u bakterijske stanice gdje uzrokuju prekid fizioloških procesa poput sinteze mRNA, ukoliko je dovoljno male molekulske mase da penetrira u jezgru. Također kelira metale esencijalne za rast bakterija. Pretpostavlja se da kitozani velike molekulske mase imaju veći učinak na gram-pozitivne, a kitozani male molekulske mase na gram negativne bakterije (Zivanovic i sur., 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cijeljenje rane je kompleksan proces koji uključuje interakcije različitih tipova stanica, izvanstaničnog matriksa i različitih faktora rasta. U procesu cijeljenja rane važnu ulogu imaju fibroblasti koji tijekom inflamatorne faze kemotaksijom migriraju u područje rane gdje sintetiziraju i kasnije remodeliraju novi izvanstanični matriks. Uz dermis, i epidermis, površinski zaštitni sloj kože sastavljen od nekoliko slojeva keratinocita, mora zacijeliti. Keratinociti iz bazalnog sloja migriraju iz područja rubova rane i ozlijeđenih epidermalnih adneksa u područje rane. Keratinociti zatim proliferiraju, raslojavaju se i diferenciraju stvarajući novi epidermis koji prekriva ranu čime se obnavlja zaštitna funkcija kože (Howling i sur., 2001).

Kitozan je biokompatibilni i biorazgradljivi prirodni polimer koji se intenzivno koristi u razvoju terapijskih sustava i funkcionalnih obloga za rane zahvaljujući hemostatskim i antibakterijskim svojstvima te pozitivnom učinku na migraciju i proliferaciju stanica kože. Promoviranjem granulacije i stanične organizacije kitozan osigurava i ubrzava uspješno cijeljenje različitih vrsta rana. Učinci kitozana uvelike ovise o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi kitozana (Dai i sur., 2011).

Melatonin, neurohormon široko rasprostranjen u prirodi, većinom se sintetizira u pinealnoj žlijezdi (epifizi) pod utjecajem ritma izmjene dana i noći. Svoje pleiotropne učinke iskazuje kao neurotransmitor, hormon, citokin i modulator biološkog odgovora te antioksidans (Slominski i sur., 2007). Također ima i antibakterijska svojstva koja se pripisuju njegovoj sposobnosti vezanja intracelularnih supstrata kao što su slobodno željezo i masne kiseline (Tekbas i sur., 2008). Melatonin utječe na cijeljenje rane ovisno o dozi, vremenu primjene i ciljanom tkivu. Njegov utjecaj je vidljiv u različitim fazama cijeljenja rane. Tijekom upale, utječe na oslobađanje medijatora upale dok tijekom faze proliferacije utječe na angiogenezu i fibroplaziju (Drobnik, 2012). Proturječni zaključci o tome ima li melatonin pozitivan (Carossino i sur., 1996; Drobnik i sur., 2013) ili negativan utjecaj (Bullbiller i sur., 2005; Drobnik i Dabrowski, 1996) na odlaganje kolagena u području rane, mogu se djelomično objasniti razlikom između učinka melatonina kada je primijenjen lokalno i učinaka melatonina putem različitih regulatornih mehanizama kada je primijenjen sistemski (Drobnik, 2012). Stoga je primjereno razvijati terapijske sustave s uklopljenim melatoninom za lokalnu primjenu kako bi se izbjegli nepoželjni sistemski učinci.

S razvojem terapijskih sustava s potencijalnim učinkom na cijeljenje rane, raste i potreba za razvijanjem *in vitro* modela rane koji mogu poslužiti kao zamjena za *in vivo* modele pri procjeni njihovog potencijala. *In vitro* modeli omogućavaju jeftino i brzo probiranje tvari, materijala i terapijskih sustava koji bi se mogli potencijalno koristiti u daljnjim ispitivanjima. Na taj način se smanjuje broj ispitivanja provedenih u laboratorijskih životinja (Stephens i sur., 2013).

Stanične kulture fibroblasta i keratinocita koriste se kao *in vitro* modeli rane u preliminarnim ispitivanjima potencijalnog učinka različitih tvari i inovativnih terapijskih sustava na cijeljenje rane (Howling i sur., 2001; Shrimanker i sur., 2003). Pri takvim ispitivanjima, modelna rana predstavljena je oštećenjem konfluentnog sloja stanica kože, a cijeljenje rane proliferacijom i migracijom stanica, odnosno prekrivanjem praznina nastalih oštećivanjem konfluentnog sloja stanica (engl. *scratch test*). (Stephens i sur., 2013)

Ovaj diplomski rad nastavak je istraživanja lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom kojima je utvrđen potencijal ubrzavanja procesa epitelizacije rane *in vitro* ispitivanjima na humanoj staničnoj liniji keratinocita (HaCaT) (Blažević i Milekić, 2015). Daljnja procjena terapijskog potencijala nanosustava uključuje ispitivanje učinka na migraciju i proliferaciju fibroblasta.

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost korištenja MJ90 fibroblasta kože u pripravi *in vitro* modela rane koji bi omogućio procjenu učinka lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na proliferaciju i migraciju fibroblasta *in vitro*. Razvoj diskriminatornog modela omogućio bi probir formulacija s najvećim potencijalnim učinkom na cijeljenje rane.

Specifični ciljevi

1. Pripraviti lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom koristeći kitozan molekulske mase 50-150 kDa i stupnja deacetilacije >90%;
2. Odrediti fizičko-kemijska svojstva pripremljenih nanočestica
 - veličinu i raspodjelu veličina čestica
 - površinski naboj
 - sadržaj uklopljenog lijeka;
3. razviti protokol pripreme modelne rane temeljene na MJ90 fibroblastima odnosno ispitati utjecaj fibronektina i seruma na brzinu proliferacije/migracije fibroblasta pri cijeljenju modelne rane izložene lecitinsko-kitozanskim nanočesticama s melatoninom

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za pripravu nanočestica korišteni su:

- lecitin S45 (Lipoid GmbH, Njemačka),
- melatonin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- kitozan klorid, stupanj deacetilacije >90 %, molekulska masa 50-150 kDa (C114; Protosan®, NovaMatrix, Norveška),

Za uzgoj stanične linije fibroblasta MJ90 (Institut Ruđer Bošković, Hrvatska) korišteni su:

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

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

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

Tablica 2: Sastav HBSS pufera

Sol	Proizvođač
kalcijev klorid (CaCl_2 bezvodni; 140 mg/L)	Sigma-Aldrich, Njemačka
magnezijev klorid ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 100 mg/L)	Merck, Njemačka
magnezijev sulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 100 mg/L)	Kemig, Hrvatska
kalijev klorid (KCl; 400 mg/L)	Kemig, Hrvatska
kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4 ; 60 mg/L)	Kemika, Hrvatska
natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO_3 ; 350 mg/L)	Kemig, Hrvatska
natrijev klorid, (NaCl; 8000 mg/L)	Kemig, Hrvatska
dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4 bezvodni; 48 mg/L)	Fluka, Švicarska
D-glukoza (1000 mg/L)	Kemig, Hrvatska
4-(2-hidroksietil)-1- piperazinetansulfonska kiselina (HEPES; 30 mM)	AppliChem/Panreac, Njemačka

3.2. Metode

3.2.1. Priprava nanočestica

Pripravljena je otopina kitozana (C114) koncentracije 10 mg/ml u pročišćenoj vodi. Otopina lecitina koncentracije 25 mg/ml pripravljena je u 96% etanolu. Za pripravu lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom, melatonin je otopljen u etanolnoj otopini lecitina u koncentraciji od 5 mg/ml odnosno u masenom omjeru 1:5 prema lecitinu.

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

3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka u nanočestice

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

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

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

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

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

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

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

Dijalizirani uzorci suspenzija nanočestica korišteni su u svim daljnjim ispitivanjima.

3.2.3. Određivanje veličine nanočestica

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

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

3.2.4. Određivanje zeta-potencijala nanočestica

Zeta-potencijal određen je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (PCS) (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, UK). Zeta-potencijal je elektrokinetički potencijal u koloidnim disperzijama. Vrijednost zeta-potencijala određuje se indirektno mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica. U sustavu za mjerenje elektroforetske pokretljivosti čestica korišten je 10 mW He-Ne laser. Elektroforetska pokretljivost izračunava se iz spektra frekvencija koje proizlaze iz detektiranih fotona svjetlosti. S obzirom da se nabijene čestice nalaze u promjenjivom električnom polju, one se gibaju i raspršuju svjetlost. Intenzitet raspršene svjetlosti mijenja se frekvencijom koja ovisi o brzini gibanja čestica. Mjerenja su provedena pri 25°C . Zeta-potencijal nanočestica mjereno je nakon odgovarajućeg razrjeđivanja 10 mM otopinom NaCl.

3.2.5. Stanična linija i uvjeti uzgoja

U radu su korišteni fibroblasti kože MJ90 (Institut R. Bošković, Hrvatska). Stanice su uzgojene u skladu s protokolom kojeg preporučuje proizvođač te su nasadene u sterilnim uvjetima u posude za uzgoj od 25, 75, 150 cm² i na ploče s 24 jažice. Uzgajane su u inkubatoru (Sanyo CO₂ incubator, Japan) pri 37 °C, 5% CO₂ i 95% relativne vlažnosti. Za uzgoj MJ90 fibroblasta korišten je hranidbeni medij DMEM koji je sadržavao antibiotike penicilin, streptomycin i amfotericin B uz dodatak 10% FBS-a.

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

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

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

Fibroblasti su nasadeni pri gustoći od 5×10^4 na ploče s 24 jažice (TPP, Švicarska) koje su bile obložene ili neobložene fibronektinom. Oblaganje fibronektinom provedeno je u skladu s uputom proizvođača (Sigma-Aldrich, SAD). Pripravljena je otopina fibronektina koncentracije 9,5 µg/ml razrjeđivanjem alikvota otopine fibronektina (1 mg/ml) HBSS puferom. U svaku jažicu nanoseno je 200 µl pripravljene otopine fibronektina, čime je osigurano potrebno oblaganje fibronektinom od 1 µg/cm² površine jažice. Ploča je zatim ostavljena u inkubatoru u periodu od 20 minuta (Sanyo CO₂ incubator, Japan) pri 37°C. Nakon uklanjanja ostatka tekućine, ploča s jažicama stajala je otklopljena dok god se površina jažica nije u potpunosti osušila.

Nakon nasađivanja, fibroblastima je bilo potrebno 24 sata za postizanje odgovarajuće konfluentnosti u hranidbenom mediju s 10% FBS-a, neovisno o prisustvu fibronektina. Nakon postizanja konfluentnosti, stanicama je uklonjen hranidbeni medij i zamijenjen hranidbenim medijem bez ili s nižim postotnim udjelom seruma (0,5 % FBS-a). Nakon 24 h sloj stanica je po sredini jažice zagreban vrhom pipete od 10 μ l kako bi se pripravila modelna rana.

Variranjem eksperimentalnih uvjeta (obloženost jažica fibronektinom, koncentracija FBS-a u hranidbenom mediju nakon postizanja konfluentnosti) razvijena su četiri protokola priprave modelne rane kako je navedeno u Tablici 3.

Tablica 3: Razlike u protokolima priprave modelne rane

	Fibronectin (1 μ g/cm ²)	DMEM s 0,5% FBS
1. protokol	+	+
2. protokol	-	+
3. protokol	+	-
4. protokol	-	-

+ , - : prisustvo ili odsustvo navedenog uvjeta

Nakon stvaranja modelne rane, monosloj je ispran HBSS puferom (pH 6,0) kako bi se uklonile odvojene stanice.

Modelne rane tretirane su priređenim suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom te praznim lecitinsko-kitozanskim nanočesticama pri koncentraciji kitozana od 2,5 μ g/ml. Kao kontrole korištene su otopine melatonina (2,5 μ g/ml) i kitozana (2,5 μ g/ml), te suspenzija lecitinskih nanočestica (50 μ g/ml). Stanice su tretirane 2 sata nakon čega su suspenzije, odnosno otopine odsisane, a zatim isprane HBSS puferom te im je vraćen svježi hranidbeni medij s udjelom seruma ovisno o primijenjenom protokolu (Tablica 3).

Dinamika prekrivanja praznina praćena je invertnim mikroskopom (Primover, Carl Zeiss AG, Njemačka) spregnutim s kamerom (Samsung, 5 pixel) tijekom 48 sati nakon tretiranja. Za obradu slika korišten je program ImageJ (National Institute of Health, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

Uspješno su pripravljene lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom metodom ionotropnog geliranja (Sonvico i sur., 2006). Metoda se temelji na elektrostatskoj interakciji pozitivno nabijenih amino skupina kitozana i negativno nabijenih sastavnica lecitina. Prednosti te metode su jednostavnost, priprava nanočestica u vodenom mediju i blagi uvjeti pri kojima nastaju nanočestice. Naboj nanočestica je pozitivan, a ovisi o tipu lecitina i kitozana te masenom omjeru kitozana i lecitina u formulaciji (Hafner i sur., 2009). Zbog pozitivnog naboja lecitinsko-kitozanske nanočestice stupaju u elektrostatsku interakciju s negativno nabijenim biološkim strukturama iz čega proizlazi mukoadhezivnost nanočestica (Hafner i sur., 2015).

Lecitinsko-kitozanske nanočestice su u središtu mnogih znanstvenih istraživanja kao terapijski sustav namijenjen različitim putovima primjene lijeka. Nanočestice pripravljene s lecitinom Lipoid S45 i masenim omjerom lecitina i kitozana od 20:1, pospješile su permeabilnost melatonina preko monosloja Caco-2 stanica u usporedbi s permeabilnošću melatonina iz otopine, bez narušavanja integriteta stanične membrane i smanjenja vijabilnosti stanica (Hafner i sur., 2009). Utvrđen je i potencijal lecitinsko-kitozanskih nanočestica kao nosača lipofilnih lijekova poput klobetazol-17-propionata (Şenyiğit i sur., 2010) i melatonina (Hafner i sur., 2011) pri(trans)dermalnoj primjeni. *In vitro* ispitivanjem utvrđena je i biokompatibilnost nanočestica s keratinocitima i fibroblastima kože (Hafner i sur., 2011).

Lecitinsko-kitozanske nanočestice također su ispitivane i kao nosači pri topikalnoj primjeni oftalmičkih lijekova poput amfotericina B (Chhonker i sur., 2015) i melatonina (Hafner i sur., 2015). Zahvaljujući mukoadhezivnim svojstvima, lecitinsko-kitozanske nanočestice s uklopljenim amfotericinom B osigurale su veći antifungalni učinak prema gljivicama vrsta *Candida albicans* i *Aspergillus fumigatus* nego pripravci dostupni na tržištu (Chhonker i sur., 2015). Zahvaljujući produljenom oslobađanju melatonina i duljem zadržavanju na mjestu primjene, lecitinsko-kitozanske nanočestice bi mogle povećati bioraspoloživost melatonina u oku *in vivo* u usporedbi s otopinom.

U ovom radu pri pripravi lecitinsko-kitozanskih nanočestica korišten je kitozan C114 molekulske mase 50-150 kDa i stupnja deacetilacije >90%. Maseni omjer lecitina i kitozana iznosio je 20:1, dok je maseni omjer između melatonina i lecitina iznosio 1:5. Lecitinsko-

kitozanske nanočestice s melatoninom su označene kao MLC114, dok su nanočestice bez melatonina označene kao LC114.

Usporedbe radi, pripravljene su i lecitinske nanočestice s melatoninom označene kao ML i prazne lecitinske nanočestice označene kao L.

4.2. Karakterizacija nanočestica s melatoninom

Glavna svojstva pripremljenih lecitinsko-kitozanskih i lecitinskih nanočestica sa i bez melatonina prikazani su u Tablici 4.

Uspješnost uklapanja melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice (MLC114) iznosila je $25,8 \pm 2,2$ %, dok je sadržaj melatonina u odgovarajućoj suspenziji iznosio $103,1 \pm 8,9$ µg/ml. Sadržaj melatonina u suspenziji lecitinskih nanočestica (ML) iznosio je $81,1 \pm 5,1$ µg/ml, što ukazuje na bolje uklapanje melatonina u lecitinsko-kitozanske nego u lecitinske nanočestice.

Veličina lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom određena je u dijaliziranim sustavima nakon razrjeđenja pročišćenom vodom. Srednji promjer lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom (MLC114) iznosio je $254,6 \pm 5,0$ nm dok je srednji promjer praznih nanočestica (LC114) iznosio $242,9 \pm 3,1$ nm. Lecitinske nanočestice bile su značajno manjeg srednjeg promjera od lecitinsko-kitozanskih nanočestica. Tako su srednji promjeri lecitinskih nanočestica s melatoninom (ML) i praznih lecitinskih nanočestica (L) iznosili redom $96,1 \pm 1,8$ nm odnosno $80,2 \pm 5,1$ nm. Usporedbom srednjih promjera nanočestica s melatoninom i praznih nanočestica može se zaključiti da je uklapanje melatonina rezultiralo blagim porastom veličine nanočestica.

Raspodjela veličina pripremljenih nanočestica prikazana je indeksom polidisperznosti (PDI) koji se može kretati od 0 za monodisperzni sustav do 1 za potpuno heterodisperzni sustav. Sve pripravljene nanočestice bile su karakterizirane relativno širokom raspodjelom veličina čestica na što ukazuju vrijednosti indeksa polidisperznosti prikazane u Tablici 4. Razlog tome vjerojatno je polidisperznost molekulske mase polimernih lanaca korištenog kitozana (Hafner, 2008).

Zeta-potencijal lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom određen je u dijaliziranim sustavima nakon razrjeđenja 10 mM otopinom NaCl. Površinski naboj nanočestica je neizostavan vid karakterizacije nanočestica jer o njemu ovise biokompatibilnost i interakcije nanočestica s biološkim strukturama na mjestu primjene.

Lecitinske nanočestice su negativnog površinskog naboja ($-32,6 \pm 4,1$ mV) dok su lecitinsko-kitozanske nanočestice pozitivno nabijene ($24,2 \pm 0,8$ mV). Pozitivni zeta-potencijal proizlazi iz prisustva amino skupina kitozana na površini nanočestica koje su pozitivno nabijene pri danom pH ($\text{pH} < 6,5$). Iz usporedbe zeta-potencijala odgovarajućih praznih nanočestica i nanočestica s melatoninom, može se zaključiti da melatonin nije utjecao na površinski naboj nanočestica tj. da je uklopljen unutar lipofilnih domena nanočestica.

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

Tablica 3: Glavna svojstva lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

Nanočestice	Srednji promjer (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)	UU (%)	DL (%)	C _M (μg/ml)
MLC114	$254,6 \pm 5,0$	$0,37 \pm 0,06$	$24,2 \pm 0,8$	$25,8 \pm 2,2$	$3,8 \pm 0,4$	$103,1 \pm 8,9$
LC114	$242,9 \pm 3,1$	$0,35 \pm 0,03$	$23,8 \pm 0,8$	-	-	-
ML	$96,1 \pm 1,8$	$0,4 \pm 0,03$	$-32,6 \pm 4,1$	$20,1 \pm 2,1$	$3,6 \pm 0,5$	$81,1 \pm 5,1$
L	$80,2 \pm 5,1$	$0,38 \pm 0,02$	$-31,2 \pm 2,0$	-	-	-

Prikazane su srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$).

PDI, indeks polidisperznosti

UU (%), uspješnost uklapanja: $\text{sadržaj lijeka/teorijski sadržaj lijeka} \times 100$

DL (%), $\text{sadržaj lijeka/ispitivana količina nanočestica} \times 100$

C_M (μg/ml), $\text{sadržaj lijeka/volumen suspenzije nanočestica}$

4.3. Ispitivanje prikladnosti *in vitro* modela rane za procjenu učinka nanočestica s melatoninom na migraciju/proliferaciju fibroblasta

Cijeljenje rane je kompleksan proces koji uključuje interakcije različitih tipova stanica, izvanstaničnog matriksa i različitih faktora rasta. U procesu cijeljenja rane važnu ulogu imaju fibroblasti koji su odgovorni za stvaranje i remodeliranje novog izvanstaničnog matriksa. Uz fibroblaste, u procesu cijeljenja rane važnu ulogu imaju i keratinociti koji iz bazalnog sloja migriraju iz područja rubova rane i ozlijeđenih epidermalnih adneksa u područje rane gdje zatim proliferiraju, raslojavaju se i diferenciraju stvarajući novi epidermis (Howling i sur., 2001).

Stanične kulture fibroblasta i keratinocita koriste se kao *in vitro* modeli rane u preliminarnim ispitivanjima potencijalnog učinka različitih tvari i inovativnih terapijskih sustava na cijeljenje rane (Howling i sur., 2001; Shrimanker i sur., 2003). Pri takvim ispitivanjima, modelna rana predstavljena je oštećenjem konfluentnog sloja stanica kože, a cijeljenje rane proliferacijom i migracijom stanica, odnosno prekrivanjem praznina nastalih oštećivanjem konfluentnog sloja stanica (engl. *scratch test*).

S razvojem terapijskih sustava s potencijalnim učinkom na cijeljenje rane, raste i potreba za razvijanjem *in vitro* modela rane koji mogu poslužiti kao zamjena za *in vivo* modele pri procjeni njihovog potencijala. *In vitro* modeli omogućavaju jeftino i brzo probiranje tvari, materijala i terapijskih sustava koji bi se mogli potencijalno koristiti u daljnjim ispitivanjima. Na taj način se smanjuje broj ispitivanja provedenih u laboratorijskih životinja. Jednostavniji modeli cijeljenja rane poput pojedinačnih staničnih linija ili miješanih staničnih kultura omogućavaju promatranje određenih segmenata procesa cijeljenja rane. Iako postoji mogućnost razvijanja kompleksnijih 3D modela za cjelovitije oponašanje uvjeta *in vivo*, isti ne mogu do kraja oponašati strukturu i funkciju dijelova kože kao ni imunosti odgovor organizma (Stephens i sur., 2013).

Blažević i Milekić (2015) ispitali su utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na cijeljenje (epitelizaciju) rane *in vitro* praćenjem dinamike prekrivanja praznina nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja keratinocita kože (HaCaT) (engl. *scratch test*). Prije stvaranja modelne rane, stanice su nasadene na ploču s 24 jažice, te je nakon postizanja konfluentnosti stanicama uklonjen hranidbeni medij s 10 % FBS te zamijenjen hranidbenim medijem bez seruma na 24 h. Nakon toga je sredina jažice zagrebana pipetom od 10 µl kako bi se stvorila modelna rana. Monosloj stanica je potom ispran HBSS

puferom (pH =6,0) te su stanice tretirane suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom te praznim lecitinsko-kitozanskim nanočesticama u koncentraciji od 5 µg/ml kao i otopinama melatonina (5 µg/ml), otopinama kitozana (5 µg/ml) i lecitinskim nanočesticama (100 µg/ml) koje su služile kao kontrola. Prethodno je bilo utvrđeno da lecitinsko-kitozanske nanočestice ne smanjuju vijabilnost HaCaT stanica pri koncentracijama kitozana manjim od 10 µg/ml. Stanice su tretirane 2 sata nakon čega su isprane HBSS puferom te im je vraćen hranidbeni medij bez seruma. Proliferacija i migracija stanica izražena je smanjenjem površine praznine nastale namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica tj. postotkom prekrivenosti prvotno formirane praznine, 24 i 48 sati nakon dvosatnog tretiranja stanica. Upotrebom navedenog protokola, razvijen je diskriminatorni model rane pomoću kojeg je bilo moguće usporediti učinak lecitinsko-kitozanskih nanočestica sa i bez melatonina, pripremljenih upotrebom kitozana različite molekulske mase (50-150 i 150-400 kDa) i/ili stupnja deacetilacije (DD 75-90 i >90%), na proliferaciju/migraciju keratinocita. Utvrđeno je da je utjecaj nanočestica na cijeljenje rane *in vitro* ovisio o sadržaju melatonina u nanočesticama i tipu kitozana korištenom u njihovoj pripravi. Najbrže cijeljenje rane *in vitro* zabilježeno je kod modelne rane izložene nanočesticama s melatoninom pripremljenima s kitozanom manje molekulske mase (50-150 kDa) i većeg stupnja deacetilacije (>90 %) (Blažević i Milekić, 2015).

Primjenom *in vitro* modela rane temeljenog na keratinocitima kože izvršen je probir sustava s najvećim potencijalnim učinkom na epitelizaciju rane. Daljnja procjena terapijskog potencijala nanosustava uključuje ispitivanje učinka na migraciju i proliferaciju fibroblasta. Fibroblasti kože nalaze se u dermisu, gdje su zaduženi za biosintezu kolagena, elastina, glikozaminoglikana, proteoglikana, fibronektina, laminina i drugih proteina izvanstaničnog matriksa koji koži daju potporu i elastičnost. Zbog navedenog, imaju važnu ulogu u cijeljenju rane, prvenstveno u fazama proliferacije i maturacije u kojima u točno određenim podfazama sintetiziraju i razgrađuju kolagen različitog tipa, elastin i druge konstituente dermisa kože. *In vitro* model rane temeljen na fibroblastima neophodan je za procjenu učinka lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na proliferaciju i migraciju fibroblasta *in vitro*, te usporedbu s kontrolnim uzorcima kao što su prazne lecitinsko-kitozanske nanočestice, lecitinske nanočestice sa i bez melatonina te otopine melatonina i kitozana. Razvoj diskriminatornog modela omogućio bi probir formulacija s najvećim potencijalnim učinkom na cijeljenje rane.

Prije provođenja ispitivanja potencijalnog učinka različitih tvari/terapijskih sustava na

cijeljenje rane korištenjem *in vitro* modela, potrebno je ispitati biokompatibilnost tih istih tvari/terapijskih sustava sa stanicama fibroblasta i/ili keratinocita, odnosno odrediti koncentracije pri kojima ispitivane tvari/terapijski sustavi ne uzrokuju smanjenje vijabilnosti korištenih stanica (Felice i sur., 2015). Biokompatibilnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica sa fibroblastima kože MJ90 prethodno je ispitana praćenjem metaboličke aktivnosti stanica nakon dvosatnog izlaganja nanočesticama pri koncentraciji kitozana od 1,25 do 20 µg/ml (Ljubičić, 2015). U pripravi nanočestica korištena su četiri tipa kitozana koja se međusobno razlikuju po molekulskoj masi (50-150 kDa ili 150-400 kDa) i/ili stupnju deacetilacije (75-90 % ili >90 %). Osim o koncentraciji kitozana u sustavu, biokompatibilnost nanočestica ovisila je i o stupnju deacetilacije kitozana. Sve ispitivane suspenzije nanočestica su pri koncentraciji kitozana od 10 i 20 µg/ml značajno smanjivale vijabilnost stanica. U slučaju stanica tretiranih nanočesticama pripremljenim s kitozonom većeg stupnja deacetilacije (DD > 90%), vijabilnost se značajno smanjila već pri koncentracijama kitozana od 5 µg/ml. U usporedbi sa suspenzijama nanočestica, otopine kitozana su imale izraženiji citotoksični učinak. Ispitivanjem citotoksičnosti određena je koncentracija kitozana u sustavu pri kojoj ima smisla ispitivati učinak lecitinsko-kitozanskih nanočestica na cijeljenje rane *in vitro* i ona iznosi 5 µg/ml za suspenzije nanočestica pripremljene s kitozanim manjeg stupnja deacetilacije te 2,5 µg/ml za suspenzije nanočestica pripremljene s kitozanim većeg stupnja deacetilacije.

Zbog svega navedenog, u svrhu ispitivanja mogućnosti korištenja MJ90 fibroblasta kože u pripravi *in vitro* modela rane, korišten je kitozan molekulske mase 50-150 kDa i stupnja deacetilacije > 90%. Modelne rane tretirane su suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana od 2,5 µg/ml.

Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na cijeljenje rane *in vitro*, određen je praćenjem dinamike prekrivanja praznina nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja fibroblasta kože MJ90. Fibroblasti su nasadeni pri gustoći od 5×10^4 na ploče s 24 jažice koje su bile obložene ili neobložene fibronektinom. Nakon nasađivanja, fibroblastima je bilo potrebno 24 sata za postizanje odgovarajuće konfluentnosti u hranidbenom mediju s 10% FBS-a, neovisno o prisustvu fibronektina. Nakon postizanja konfluentnosti, stanicama je uklonjen hranidbeni medij i zamijenjen hranidbenim medijem bez ili s nižim postotnim udjelom seruma (0,5 % FBS-a). Nakon 24 h sloj stanica je po sredini jažice zagreban vrhom pipete od 10 µl kako bi se pripremila modelna rana. Variranjem eksperimentalnih uvjeta (obloženost jažica fibronektinom, koncentracija FBS-a u

hranidbenom mediju nakon postizanja konfluentnosti) razvijena su četiri protokola pripreve modelne rane (Tablica 3).

Fibronektin je glikoprotein ekstracelularnog matriksa i ima važnu ulogu u procesu cijeljenja rane. U kralježnjaka postoje dva tipa fibronektina: plazmatski i celularni fibronektin. Plazmatski fibronektin cirkulira u krvi, te se, pri ozljedi krvne žile, uz pomoć aktiviranog oblika plazmatske transglutaminaze (koagulacijski faktor XIIIa) poprečno veže za fibrin i sudjeluje u adheziji, migraciji i agregaciji trombocita pri stvaranju krvnog ugruška. Prisutnost fibronektina u fibrinskom matriksu neophodna je za migraciju stanica u krvni ugrušak i za aktivaciju fibroblasta koji potom počinju stvarati celularni fibronektin kao i ostale molekule ekstracelularnog matriksa koje tvore granulacijsko tkivo. Fibronektin unutar granulacijskog tkiva u gustoj mreži okružuje fibroblaste, a koji se prethodno polariziraju usporedno s fibrilima plazmatskog fibronektina. Stvaranjem fibronektinske mreže, fibronektin utječe na različite stanične procese kao i na odlaganje i sastav ostalih molekula ekstracelularnog matriksa (Wing i Midwood, 2011). Zbog opisane uloge fibronektina u organizmu, oblaganje površine jažice fibronektinom u *in vitro* uvjetima koristi se kako bi se ubrzalo i poboljšalo učvršćivanje fibroblasta za površinu jažice (Lotz i sur., 1989) i pozitivno utjecalo na njihovu migraciju (Greiling i Clark, 1997).

FBS je najčešće korišteni dodatak hranidbenim staničnim medijima. Serum je stanicama neophodan za rast i dijeljenje jer sadrži brojne faktore rasta, hormone, transportne proteine, faktore koji utječu na prijanjanje i migraciju, aminokiseline, vitamine, elemente u tragovima te inhibitore proteaza. Usto, sastojci seruma mogu vezati i inaktivirati toksične tvari osiguravajući i indirektno uvjete neophodne za rast stanica (Gstraunthaler, 2003).

Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na proliferaciju i migraciju MJ90 fibroblasta *in vitro* ispitan je pri pH 6,0 koji je osiguran razrjeđivanjem suspenzija nanočestica (pH 5,8-6,0) HBSS puferom navedene pH vrijednosti. Modelne rane tretirane su pripremljenom suspenzijom lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom te praznim lecitinsko-kitozanskim nanočesticama pri koncentraciji kitozana od $2,5 \mu\text{gml}^{-1}$. Kao kontrole korištene su otopine melatonina ($2,5 \mu\text{gml}^{-1}$) i kitozana ($2,5 \mu\text{gml}^{-1}$), te lecitinske nanočestice ($50 \mu\text{gml}^{-1}$). Za sve protokole pripreve modelne rane, cijeljenje modelnih rana tretiranih otopinom melatonina i lecitinskim nanočesticama nije se razlikovalo od cijeljenja kontrolne modelne rane (netretirane stanice izložene HBSS puferu).

Cijeljenje modelnih rana pripremljenih protokolom I (fibronektin +, serum +; Tablica 3) prikazano je na Slici 5. Modelne rane tretirane nanočesticama (LC114 i MLC114) te

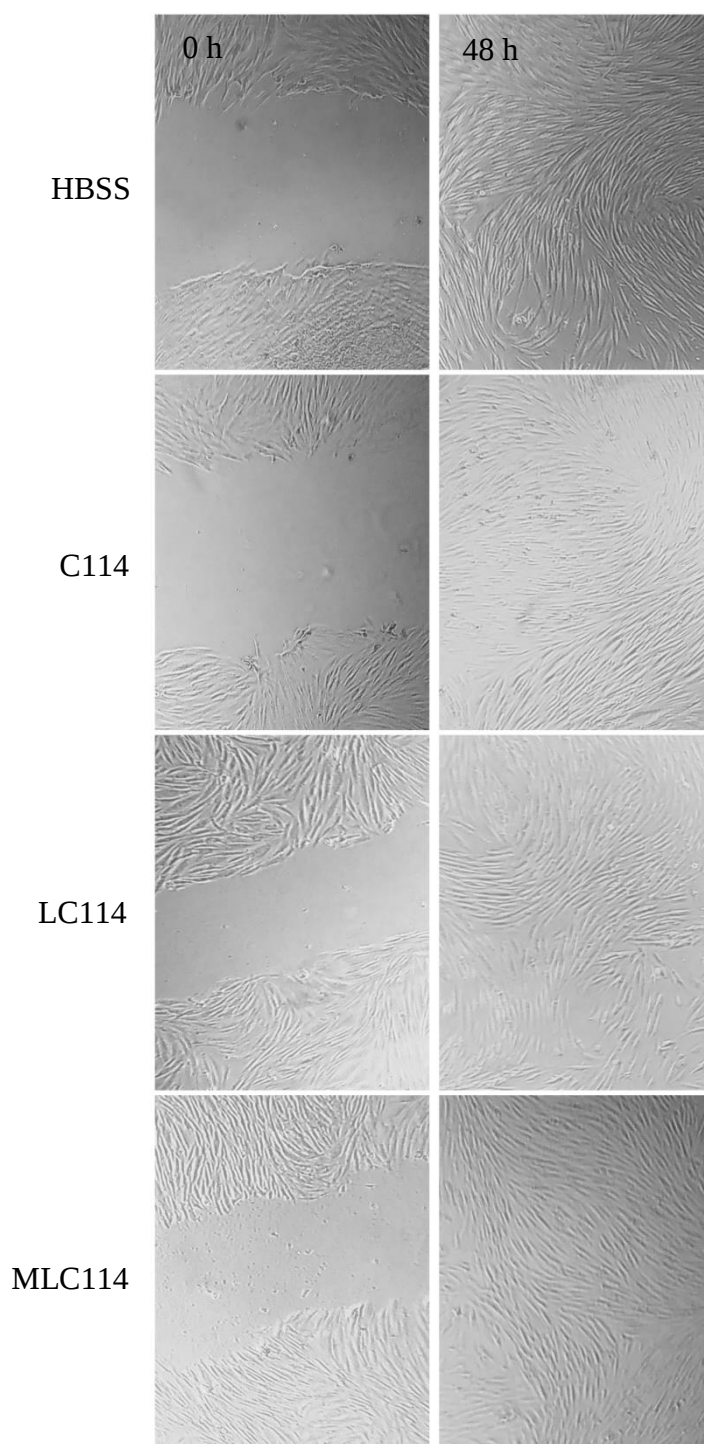
otopinom kitozana (C114) u potpunosti su zacijelile u periodu od 48 h nakon tretiranja, jednako kao i kontrolna modelna rana (netretirane stanice izložene HBSS puferu). Prisustvom FBS-a u DMEM-u i fibronektina kojim su jažice bile obložene, stanicama su osigurani optimalni uvjeti za rast i dijeljenje, te migraciju i prijanjanje. Pri takvim uvjetima nije bilo moguće evaluirati učinak samih nanočestica i otopine kitozana na migraciju i proliferaciju stanica. Tome u prilog govori i potpuno cijeljenje modelne rane tretirane otopinom kitozana u koncentraciji od $2,5 \mu\text{gml}^{-1}$ za koju je prethodno utvrđeno da značajno smanjuje vijabilnost fibroblasta (Ljubičić, 2015).

Cijeljenje modelnih rana pripremljenih protokolom II (fibronektin -, serum +; Tablica 3) prikazano je na Slici 6. Pri tom protokolu, kontrolna modelna rana (modelna rana izložena HBSS puferu) nije u potpunosti zacijelila u periodu od 48 h. Istodobno, uočeno je potpuno cijeljenje rane tretirane lecitinsko-kitozanskim nanočesticama s melatoninom. Usporedbom cijeljenja modelnih rana tretiranih nanočesticama s melatoninom (MLC114) i praznim nanočesticama (LC114) može se zaključiti da je uklapanje melatonina rezultiralo ubrzanjem procesa cijeljenja *in vitro*. Prema očekivanjima, otopina kitozana (C114) usporila je proces cijeljenja rane *in vitro* u odnosu na kontrolu. Dobiveni rezultati ukazuju na diskriminatorsnost modelne rane pripremljene protokolom II pri utvrđivanju učinka ispitivanih sustava na migraciju/proliferaciju fibroblasta. Diskriminatorsnost je postignuta uskraćivanjem fibronektina što je najvjerojatnije rezultiralo sporijom migracijom fibroblasta u područje modelne rane. Takvo objašnjenje u skladu je s opisanom ulogom fibronektina pri uzgajanju fibroblasta *in vitro* (Greiling i Clark, 1997).

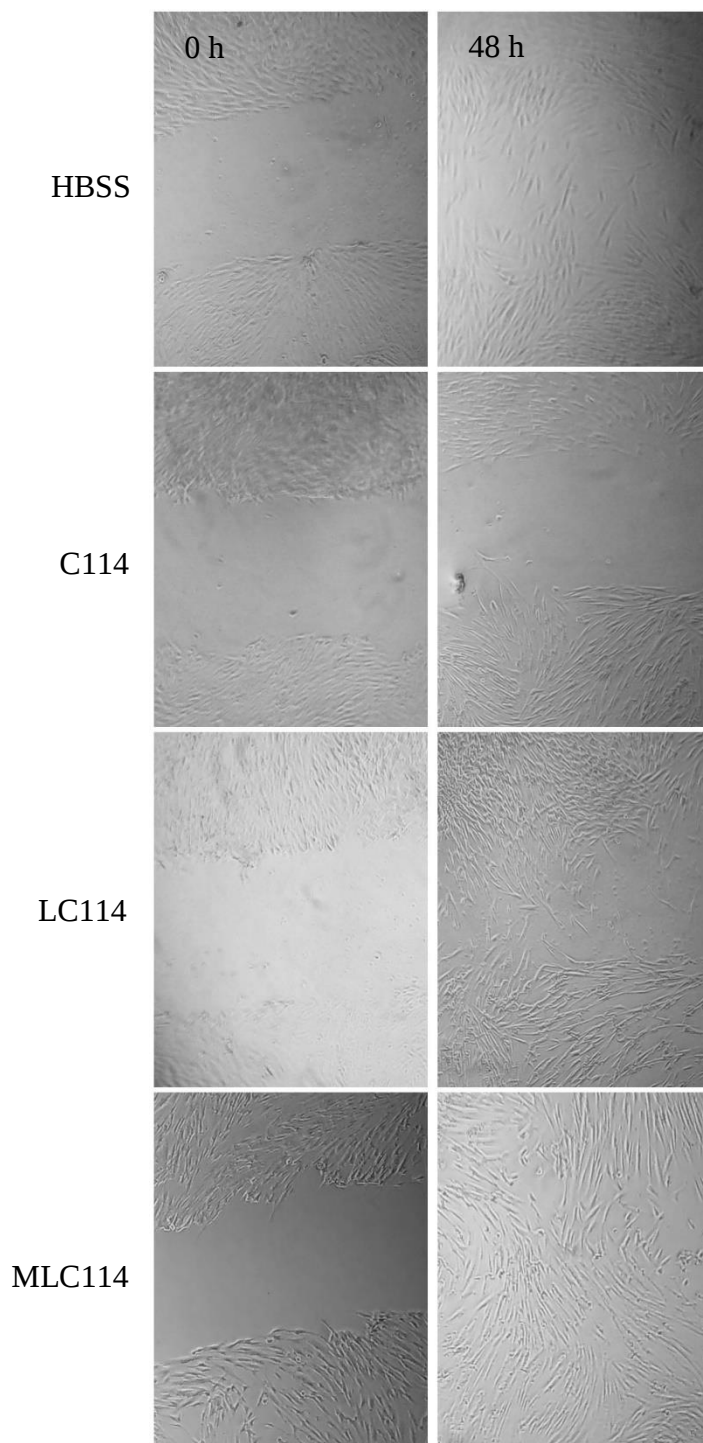
Cijeljenje modelnih rana pripremljenih protokolom III (fibronektin +, serum -; Tablica 3.) prikazano je na Slici 7. Nije uočena značajna razlika između cijeljenja kontrolne modelne rane (rane izložene HBSS puferu) i rana tretiranih suspenzijama nanočestica (MLC114 i LC114). Otopina kitozana (C114) usporila je proces cijeljenja rane *in vitro* u odnosu na kontrolu. Cijeljenje kontrolne modelne rane pripremljene protokolom III bilo je sporije od cijeljenja kontrolne modelne rane pripremljene protokolom II (fibronektin -, serum +) što ukazuje na važnost seruma za rast i dijeljenje te migraciju fibroblasta. Usto, uskraćivanje seruma rezultiralo je i blagom promjenom u morfologiji fibroblasta koji nisu bili jednako vretenasti kao i u prisustvu seruma.

Cijeljenje modelnih rana pripremljenih protokolom IV (fibronektin -, serum -; Tablica 3.) prikazano je na Slici 8. Uskraćivanje fibronektina i seruma rezultiralo je značajnim usporavanjem rasta i dijeljenja stanica svih modelnih rana (tretiranih rana i kontrolne rane) te

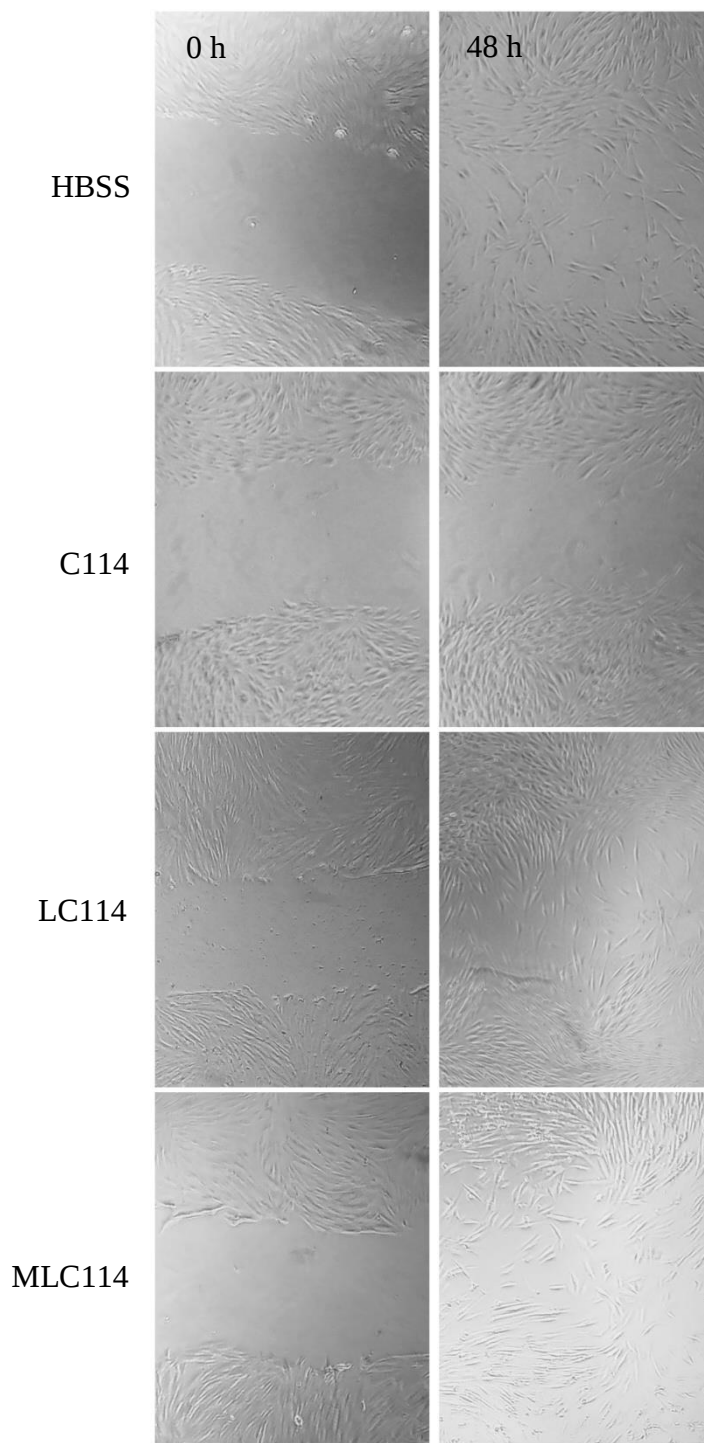
istodobno značajnom promjenom morfoloških svojstava stanica. Stanice su postale osjetljivije što je, u slučaju modelnih rana tretiranih otopinom kitozana, rezultiralo značajnim smanjenjem vijabilnosti stanica i povećanjem površine rane.



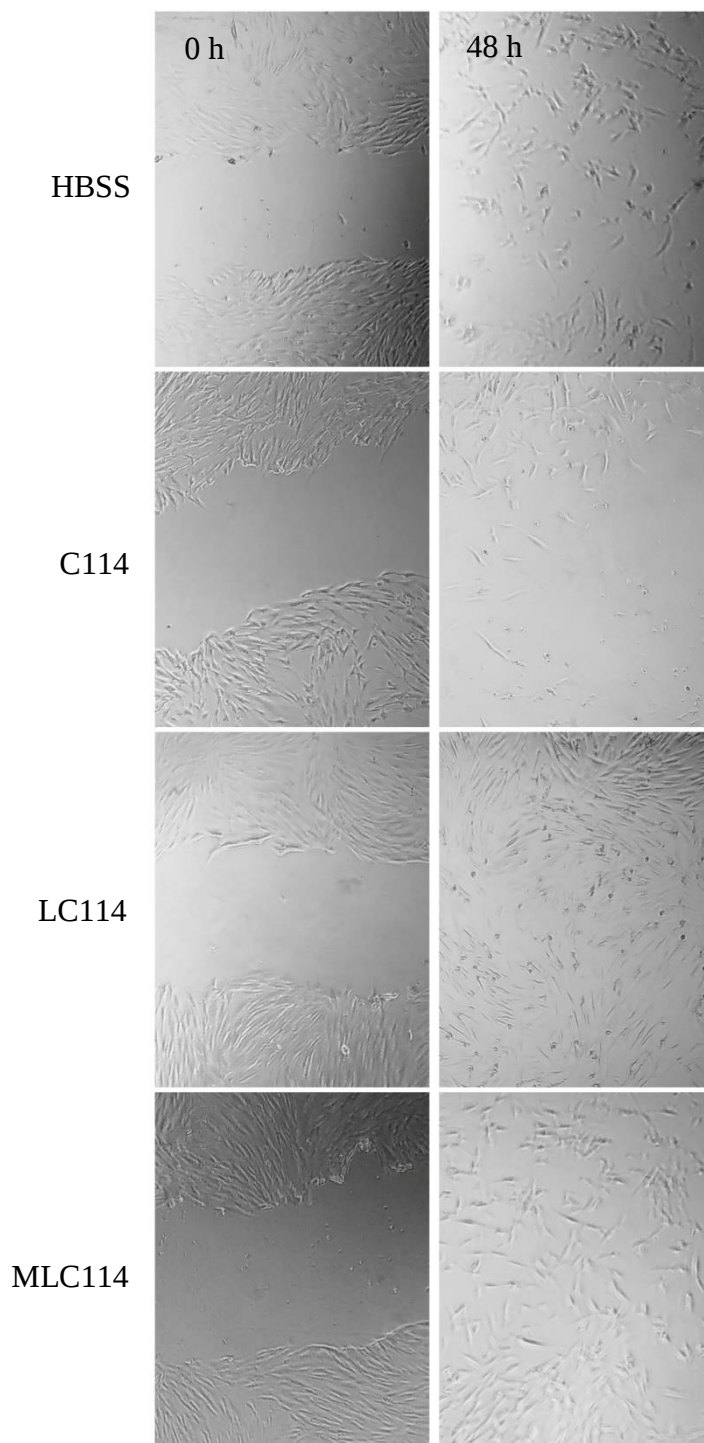
Slika 5. Cijeljenje modelnih rana nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja MJ90 fibroblasta te izloženih otopini kitozana C114, lecitinsko-kitozanskim nanočesticama pripravljenim s kitozansom C114 (LC114) te lecitinsko-kitozanskim nanočesticama s melatoninom pripravljenim s kitozansom C114 (MLC114) u usporedbi sa stanicama inkubiranim u HBSS-u (pH 6,0). Modelne rane pripravljene su prema protokolu I (fibronektin -, serum +) te su tretirane otopinom kitozana i suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana od $2,5 \mu\text{gml}^{-1}$ (pH 6,0).



Slika 6. Cijeljenje modelnih rana nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja MJ90 fibroblasta te izloženih otopini kitozana C114, lecitinsko-kitozanskim nanočesticama pripravljenim s kitozanom C114 (LC114) te lecitinsko-kitozanskim nanočesticama s melatoninom pripravljenim s kitozanom C114 (MLC114) u usporedbi sa stanicama inkubiranim u HBSS-u (pH 6,0). Modelne rane pripravljene su prema protokolu II (fibronektin +, serum -) te su tretirane otopinom kitozana i suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana od $2,5 \mu\text{gml}^{-1}$ (pH 6,0).



Slika 7. Cijeljenje modelnih rana nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja MJ90 fibroblasta te izloženih otopini kitozana C114, lecitinsko-kitozanskim nanočesticama pripremljenim s kitozanom C114 (LC114) te lecitinsko-kitozanskim nanočesticama s melatoninom pripremljenim s kitozanom C114 (MLC114) u usporedbi sa stanicama inkubiranim u HBSS-u (pH 6,0). Modelne rane pripravljene su prema protokolu III (fibronektin -, serum +) te su tretirane otopinom kitozana i suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana od $2,5 \mu\text{gml}^{-1}$ (pH 6,0).



Slika 8. Cijeljenje modelnih rana nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja MJ90 fibroblasta te izloženih otopini kitozana C114, lecitinsko-kitozanskim nanočesticama pripravljenim s kitozanom C114 (LC114) te lecitinsko-kitozanskim nanočesticama s melatoninom pripravljenim s kitozanom C114 (MLC114) u usporedbi sa stanicama inkubiranim u HBSS-u (pH 6,0). Modelne rane pripravljene su prema protokolu IV (fibronektin -, serum -) te su tretirane otopinom kitozana i suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana od $2,5 \mu\text{gml}^{-1}$ (pH 6,0).

Zaključno, razvijen je protokol pripreme modela rane temeljenog na imortaliziranoj staničnoj liniji MJ90 fibroblasta koji omogućuje ispitivanje utjecaja lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na brzinu proliferacije/migracije fibroblasta. Pri uvjetima osiguranim protokolom II (fibronektin -, serum +) pripravljene su modelne rane zadovoljavajuće diskriminatornosti pri procjeni učinka ispitivanih sustava na brzinu cijeljenja *in vitro*. Diskriminatornost je postignuta uskraćivanjem fibronektina. Dosadašnja istraživanja učinka različitih derivata kitozana na migraciju/proliferaciju fibroblasta provedena su ispitivanjima temeljenim na primarnim staničnim linijama fibroblasta (Felice i sur., 2015; Howling i sur., 2001). Prednost imortaliziranih staničnih linija pred primarnim staničnim je puno veći broj dijeljenja kroz koje stanice mogu proći prije promjene svojih svojstava te posljedično manja varijabilnost rezultata. Istodobno, primjenom razvijenog modela rane, utvrđen je pozitivan učinak suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na proliferaciju i migraciju fibroblasta *in vitro*.

5.ZAKLJUČCI

- Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom uspješno su pripravljene ionskom interakcijom lecitina i kitozana. U pripravi nanočestica korišten je kitozan molekulske mase 50-150 kDa i stupnja deacetilacije >90%.
- Pripravljene nanočestice bile su srednjeg promjera od $254,6 \pm 5,0$ nm i pozitivnog zeta-potencijala od $24,2 \pm 0,8$ mV te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina od $3,76 \pm 0,39$ %.
- Razvijen je protokol pripreme modela rane temeljenog na imortaliziranoj staničnoj liniji MJ90 fibroblasta koji omogućuje ispitivanje utjecaja lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na brzinu proliferacije/migracije fibroblasta.
- Pri uvjetima koji su isključivali oblaganje jažica fibronektinom, te uključivali zamjenu hranidbenog medija s 10 % FBS-a hranidbenim medijem s 0,5 % FBS-a nakon postizanja konfluentnosti, pripravljene su modelne rane zadovoljavajuće diskriminatornosti.
- Modelne rane tretirane lecitinsko-kitozanskim nanočesticama s melatoninom brže su cijelile u odnosu na rane tretirane HBSS puferom, praznim lecitinsko-kitozanskim nanočesticama te otopinama kitozana i melatonina.

6.LITERATURA

- Blažević F, Milekić T. Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na cijeljenje rane *in vitro*. Rad za rektorovu nagradu, Zagreb, 2015.
- Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 2010, 278, 55-67.
- Breuing K, Kaplan S, Liu P, Onderdonk AB, Eriksson E. Wound fluid bacterial levels exceed tissue bacterial counts in controlled porcine partial-thickness burn infections. *Plast Reconstr Surg*, 2003, 111, 781–788.
- Bulbul N, Dogru O, Yekeler H, Cetinkaya Z, Ilhan N, Kirkil C. Effect of melatonin on wound healing in normal and pinealectomized rats. *J Surg Res*, 2005, 123, 3-7.
- Carlson MA, Longlaker MT. The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence. *Wound Rep Reg*, 2004, 12, 134–147.
- Carossino A, Lombardi A, Matucci-Cerinic M, Pignone A, Cagnoni M. Effect of melatonin on normal and sclerodermic skin fibroblast proliferation. *Clin Exp Rheumatol.*, 1996, 14, 493-508.
- Chhonker YS, Prasad YD, Chandasana H, Vishvkarma A, Mitra K, Shukla PK, Bhatta RS. Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72, 1451–1458.
- Čajkovac M. Kozmetologija. Jastrebarsko, Naklada Slap, 2000, str. 25-31.
- Dai T, Tanaka M, Hueng Y, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011, 9, 857-879.
- Dallon JC, Ehrlich HP. A review of fibroblast-populated collagen lattices. *Wound Repair Regen*, 2008, 16, 472–479.
- Drobnik J. Wound healing and the effect of pineal gland and melatonin. *J Exp Integr Med*, 2012, 2, 3-14.
- Drobnik J, Dabrowski R. Melatonin suppresses the pinealectomy-induced elevation of collagen content in a wound. *Cytobios*, 1996, 340, 51-58.

- Drobnik J, Owczarek K, Piera L, Tosik D, Olczak S, Ciosek J, Hrabec E. Melatonin-induced augmentation of collagen deposition in cultures of fibroblasts and myofibroblasts is blocked by luzindole – a melatonin membrane receptors inhibitor. *Pharmacological Reports*, 2013, 65, 642–649.
- EpiDerm Tissue Model, 2015, <http://www.mattek.com>, pristupljeno 12. 10. 2015
- Felice F, Zambito Y, Belardinelli E, Fabiano A, Santoni T, Di Stefano R. Effect of different chitosan derivatives on *in vitro* scratch wound assay: A comparative study. *Int J Biol Macromol*, 2015, 76, 236-241.
- Greiling D, Clark RA. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *Journal of Cell Science*, 1997, 110, 861-870.
- Gstraunthaler G. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-free Cell Culture. *Alternatives to Animal Experimentation*, 2003, 20, 275-281.
- Hafner A. Kitozansko-lecitinske nanočestice za nazalnu i (trans)dermalnu primjenu melatonina. Doktorski rad, Zagreb, 2008.
- Hafner A, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Lechitin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. *J Microencapsul*, 2011, 28, 807-815.
- Hafner A, Lovrić J, Duvnjak Romić M, Juretić M, Pepić I, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Evaluation of cationic nanosystems with melatonin using an eye-related bioavailability prediction model. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 75, 142-150.
- Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grčić J. Melatonin-loaded lecithin nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm*, 2009, 381, 205-213.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38, 313-316.
- Herman IM, Leung A. Creation of human skin equivalents for the *in vitro* study of angiogenesis in wound healing. *Methods Mol Biol*, 2009, 467, 241–248.

- Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes *in vitro*. *Biomaterials*, 2001, 22, 2959-2966.
- Huljev D. Prepreke u cijeljenju rane. *Acta Med Croatica*, 2013, 67, 5-10.
- Jurić-Lekić G. Koža. U: Osnove histologije. Bradamante Ž i Kostović-Knežević Lj, urednici, Zagreb, Školska knjiga, 1995, str. 359-368.
- Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Delivery Rev*, 2010, 62, 3-11.
- Kole TP, Tseng Y, Jiang I, Katz JL, Wirtz D. Intracellular mechanics of migrating fibroblasts. *Mol Biol Cell*, 2005, 16, 328–338.
- Kryger ZB, Sisco M, Roy NK, Lu L, Rosenberg D, Mustoe TA. Temporal expression of the transforming growth factor-Beta pathway in the rabbit ear model of wound healing and scarring. *J Am Coll Surg*, 2007, 205, 78–88.
- Leivo T, Kiistala U, Vesterinen M, Owaribe K, Burgeson RE, Virtanen I, Oikarinen A. Re-epithelialization rate and protein expression in the suction-induced wound model: comparison between intact blisters, open wounds and calcipotriol-pretreated open wounds. *Br J Dermatol*, 2000, 142, 991–1002.
- Lotz MM, Burdsal CA, Erickson HP, McClay DR. Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *Journal of Cell Biology*, 1989, 4, 1795-1805.
- Ljubičić M. Utjecaj tipa kitozana na biokompatibilnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom. Diplomski rad, 2015.
- Matičević M. Usporedba učinka fizičkih smjesa i lecitinsko-kitozanskih nanočestica s uklopljenim melatoninom na cijeljenje rane *in vitro*. Diplomski rad, 2015.
- Millner RW, Lockhart AS, Bird H, Alexiou C. A new hemostatic agent: initial life-saving experience with Celox (chitosan) in cardiothoracic surgery. *Ann Thorac Surg*, 2009, 87, 13-14.

- Minagawa T, Okamura Y, Shigemasa Y, Minami S, Okamoto Y. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydr Polym*, 2007, 67, 640-644.
- O'Leary R, Arrowsmith M, Wood EJ. Characterization of the living skin equivalent as a model of cutaneous re-epithelialization. *Cell Biochem Funct*, 2002, 20, 129–141
- Pepić I, Sinovčić T, Filipović-Grčić J. Hormonsko starenje kože. *Farmaceutski glasnik*, 2011, 67, 11-26.
- Pugazhenthir K, Kapoor M, Clarkson AN, Hall I, Appleton I. Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds. *J Pineal Res.*, 2008, 44, 387-396.
- Radogna F, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80, 1844-1852.
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 2006, 31, 603–632.
- Santos TC, Marques AP, Silva SS, Oliveira JM, Mano JF, Castro AG, Reis RL. *In vitro* evaluation of the behaviour of human polymorphonuclear neutrophils in direct contact with chitosan-based membranes. *J Biotechnol.*, 2007, 132, 218-226.
- Şenyigit T, Sonvico F, Barbieri S, Ozer O, Santi P, Colombo P. Lecithin/ chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. *J Controlled Release*, 2010, 142, 368–373.
- Shrimanker M, Patel N, Modi H, Dave R. A review: screening models for wound healing activity in animals. *Am J PharmTech Res*, 2013, 3, 2249-3387.
- Skin ethic, 2015, <http://www.episkin.com>, pristupljeno 12. 10. 2015.
- Skin wound healing, 2015., <http://emedicine.medscape.com>, pristupljeno 10.10.2015.
- Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J, Paus R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab*, 2007, 19, 17-24.
- Sonvico F, Cagnani A, Rossi A, Motta S, Di Bari MT, Cavatorta F, Alonso MJ, Deriu A, Colombo P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *Int J Pharm*, 2006, 324, 67–73.

- Stephens P, Caley M, Peake M. Alternatives for Animal Wound Model Systems U: Methods in Molecular Biology. Gourdie RG i Myers TA, urednici, New York, Humana Press, 2013, str. 177-274.
- Stephens P, Davies KJ, Al-Khateeb T, ShepherdJP, Thomas DW. A comparison of the ability of intra-oral and extra-oral fibroblasts to stimulate extracellular matrix reorganization in a model of wound contraction. *J Dent Res*, 1996, 75, 1358–1364.
- Stevenson S, Taylor AH, Meskiri A, SharpeDT, Thornton MJ. Differing responses of human follicular and nonfollicular scalp cells in an *in vitro* wound healing assay: effects of estrogen on vascular endothelial growth factor secretion. *Wound Repair Regen*, 2008, 16, 243–253.
- Stoll SW, Kansra S, Elder JT. Keratinocyte outgrowth from human skin explant cultures is dependent upon p38 signaling. *Wound Repair Regen*, 2003, 11, 346–353.
- Tekbas OF, Ogur R, Korkmaz A, Kilic A, Reiter RJ. Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule. *J Pineal Res*, 2008, 44, 222-226.
- Ueno H, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T, Fujinaga T. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. *Biomaterials*, 2001, 22, 1667–1673.
- Wang XQ, Kravchuk O, Kimble RM. A retrospective review of burn dressings on a porcine burn model. *Burns*, 2010, 36, 680–687
- Williams-Boyce PK, Daniel JC Jr. Regeneration of rabbit ear tissue. *J Exp Zool*, 1980, 212, 243–253.
- Wing ST, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 2011, 4-21.
- Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011:969618
- Wound healing and repair, 2015., <http://emedicine.medscape.com>, pristupljeno 10.10.2015.
- Yao H, Guo L, Jiang BH, Luo J, Shi X. Oxidative stress and chromium(VI) carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2008, 27, 77-88.

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

7. SAŽETAK

Cijeljenje rane je kompleksan proces koji uključuje interakcije različitih tipova stanica, izvanstaničnog matriksa i različitih faktora rasta. U procesu cijeljenja rane važnu ulogu imaju fibroblasti koji tijekom inflamatorne faze kemotaksijom migriraju u područje rane gdje sintetiziraju i kasnije remodeliraju novi izvanstanični matriks. S razvojem terapijskih sustava s potencijalnim učinkom na cijeljenje rane, raste i potreba za razvijanjem *in vitro* modela rane koji mogu poslužiti kao zamjena za *in vivo* modele pri procjeni potencijala razvijenih sustava. *In vitro* modeli omogućuju jeftino i brzo probiranje tvari, materijala i terapijskih sustava koji bi se mogli potencijalno koristiti u daljnjim ispitivanjima. Time se smanjuje broj ispitivanja provedenih u laboratorijskih životinja.

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost korištenja MJ90 fibroblasta kože u pripravi *in vitro* modela rane koji bi omogućio procjenu učinka lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na proliferaciju i migraciju fibroblasta *in vitro*. Razvoj diskriminatornog modela omogućio bi probir formulacija s najvećim potencijalnim učinkom na cijeljenje rane.

Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom uspješno su pripravljene ionskom interakcijom lecitina i kitozana. Korišten je kitozan molekulske mase 50-150 kDa i stupnja deacetilacije >90%. Pripravljene su nanočestice srednjeg promjera od $254,6 \pm 5,0$ nm, pozitivnog zeta-potencijala od $24,2 \pm 0,8$ mV te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina od $3,8 \pm 0,4$ %. Variranjem eksperimentalnih uvjeta (obloženost jažica fibronektinom, koncentracija FBS-a u hranidbenom mediju nakon postizanja konfluentnosti) razvijena su četiri protokola pripreme modelne rane temeljene na imortaliziranoj staničnoj liniji MJ90 fibroblasta. Pri uvjetima koji su isključivali oblaganje jažica fibronektinom, te uključivali zamjenu hranidbenim medija s 10% FBS-a hranidbenim medijem s 0,5 % FBS-a nakon postizanja konfluentnosti, pripravljene su modelne rane zadovoljavajuće diskriminatornosti te je omogućena procjena učinka ispitivanih sustava na brzinu cijeljenja *in vitro*. Primjenom razvijenog modela rane, utvrđen je pozitivan učinak suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na proliferaciju i migraciju fibroblasta *in vitro*.

7. SUMMARY

Wound healing is a complex process which includes interactions of different cell types, extracellular matrix and different growth factors. In the process of wound healing fibroblasts have an important role. During the inflammatory phase they migrate by chemotaxis to the wound site where they synthesize and later remodel extracellular matrix. Development of drug delivery systems with the potential effect on wound healing increases the need for the development of *in vitro* wound healing models which can serve as a substitute for *in vivo* wound models in evaluation of the potential of systems developed. *In vitro* models allow for cheap and fast screening of substances, materials and drug delivery systems which could be potentially used for further evaluations. In that way the number of tests performed on laboratory animals can be reduced.

The aim of this work was to investigate the possibility of using MJ90 dermal fibroblasts in the preparation of *in vitro* wound healing model which would enable the evaluation of the effect of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles on the proliferation and migration of fibroblasts *in vitro*. Development of the discriminative model would allow for screening of the formulations with the greatest potential effect on the wound healing.

Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles were successfully prepared by ionic interaction between lecithin and chitosan. Chitosan used was characterised by the molecular weight of 50-150 kDa and deacetylation degree above 90 %. Nanoparticles had mean diameter of 254.6 ± 5.0 nm, positive zeta-potential of 24.2 ± 0.8 mV and sufficient melatonin entrapment (3.8 ± 0.4 %). By varying experimental conditions (fibronectin plate coating, concentration of FBS in the medium after reaching the confluence) four protocols for the preparation of wound healing model based on immortalized MJ90 fibroblast cell line were developed. Under conditions excluding fibronectin plate coating but including replacement of medium supplemented with 10 % of FBS with medium supplemented with 0.5 % FBS after reaching the confluence, discriminative wound healing model was prepared, allowing for the evaluation of the effect of the tested drug delivery systems on the wound healing *in vitro*. Using the developed wound healing model, the positive effect of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles on the proliferation and migration of fibroblasts was observed.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

RAZVOJ *IN VITRO* MODELA RANE PRIKLADNOG ZA PROCJENU UČINKA NANOSUSTAVA KITOZANA I MELATONINA NA MIGRACIJU I PROLIFERACIJU FIBROBLASTA

Filip Blažević

SAŽETAK

Cijeljenje rane je kompleksan proces koji uključuje interakcije različitih tipova stanica, izvanstaničnog matriksa i različitih faktora rasta. U procesu cijeljenja rane važnu ulogu imaju fibroblasti koji tijekom inflamatorne faze kemotaksijom migriraju u područje rane gdje sintetiziraju i kasnije remodeliraju novi izvanstanični matriks. S razvojem terapijskih sustava s potencijalnim učinkom na cijeljenje rane, raste i potreba za razvijanjem *in vitro* modela rane koji mogu poslužiti kao zamjena za *in vivo* modele pri procjeni potencijala razvijenih sustava. *In vitro* modeli omogućuju jeftino i brzo probiranje tvari, materijala i terapijskih sustava koji bi se mogli potencijalno koristiti u daljnjim ispitivanjima. Time se smanjuje broj ispitivanja provedenih u laboratorijskih životinja.

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost korištenja MJ90 fibroblasta kože u pripravi *in vitro* modela rane koji bi omogućio procjenu učinka lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na proliferaciju i migraciju fibroblasta *in vitro*. Razvoj diskriminatornog modela omogućio bi probir formulacija s najvećim potencijalnim učinkom na cijeljenje rane. Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom uspješno su pripravljene ionskom interakcijom lecitina i kitozana. Korišten je kitozan molekulske mase 50-150 kDa i stupnja deacetilacije >90%. Pripravljene su nanočestice srednjeg promjera od $254,6 \pm 5,0$ nm, pozitivnog zeta-potencijala od $24,2 \pm 0,8$ mV te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina od $3,8 \pm 0,4$ %. Variranjem eksperimentalnih uvjeta (obloženost jažica fibronektinom, koncentracija FBS-a u hranidbenom mediju nakon postizanja konfluentnosti) razvijena su četiri protokola pripreme modelne rane temeljene na imortaliziranoj staničnoj liniji MJ90 fibroblasta. Pri uvjetima koji su isključivali oblaganje jažica fibronektinom, te uključivali zamjenu hranidbenog medija s 10% FBS-a hranidbenim medijem s 0,5 % FBS-a nakon postizanja konfluentnosti, pripravljene su modelne rane zadovoljavajuće diskriminatornosti te je omogućena procjena učinka ispitivanih sustava na brzinu cijeljenja *in vitro*. Primjenom razvijenog modela rane, utvrđen je pozitivan učinak suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na proliferaciju i migraciju fibroblasta *in vitro*.

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

Rad sadrži: 56 stranica, 8 grafičkih prikaza, 3 tablice i 60 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

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

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, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: prosinac 2015.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

DEVELOPMENT OF *IN VITRO* WOUND HEALING MODEL SUITABLE FOR EVALUATION OF THE EFFECT OF NANOSYSTEMS OF CHITOSAN AND MELATONIN ON THE MIGRATION AND PROLIFERATION OF FIBROBLASTS

Filip Blažević

SUMMARY

Wound healing is a complex process which includes interactions of different cell types, extracellular matrix and different growth factors. In the process of wound healing fibroblasts have an important role. During the inflammatory phase they migrate by chemotaxis to the wound site where they synthesize and later remodel extracellular matrix. Development of drug delivery systems with the potential effect on wound healing increases the need for the development of *in vitro* wound healing models which can serve as a substitute for *in vivo* wound models in evaluation of the potential of systems developed. *In vitro* models allow for cheap and fast screening of substances, materials and drug delivery systems which could be potentially used for further evaluations. In that way the number of tests performed on laboratory animals can be reduced.

The aim of this work was to investigate the possibility of using MJ90 dermal fibroblasts in the preparation of *in vitro* wound healing model which would enable the evaluation of the effect of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles on the proliferation and migration of fibroblasts *in vitro*. Development of the discriminative model would allow for screening of the formulations with the greatest potential effect on the wound healing. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles were successfully prepared by ionic interaction between lecithin and chitosan. Chitosan used was characterised by the molecular weight of 50-150 kDa and deacetylation degree above 90 %. Nanoparticles had mean diameter of 254.6 ± 5.0 nm, positive zeta-potential of 24.2 ± 0.8 mV and sufficient melatonin entrapment (3.8 ± 0.4 %). By varying experimental conditions (fibronectin plate coating, concentration of FBS in the medium after reaching the confluence) four protocols for the preparation of wound healing model based on immortalized MJ90 fibroblast cell line were developed. Under conditions excluding fibronectin plate coating but including replacement of medium supplemented with 10 % of FBS with medium supplemented with 0.5 % FBS after reaching the confluence, discriminative wound healing model was prepared, allowing for the evaluation of the effect of the tested drug delivery systems on the wound healing *in vitro*. Using the developed wound healing model, the positive effect of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles on the proliferation and migration of fibroblasts was observed.

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

Thesis includes: 56 pages, 8 figures, 3 tables and 60 references. Original is in Croatian language.

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

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

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

Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: December 2015.