Ispitivanje antimikrobnog učinka lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

Tomljanović, Paula

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:163:028903

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Paula Tomljanović

Ispitivanje antimikrobnog učinka lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

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

Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na prijateljskom pristupu i stručnoj pomoći.

Zahvaljujem se komentorici izv. prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na stručnom vođenju kroz proces izrade dijela diplomskog rada.

Hvala kolegi Filipu Blaževiću na pruženoj pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela rada i ugodnom druženju.

Najveća zahvala ide mojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje, te sestri, prijateljima koji su me podržavali kroz sve godine studiranja. Svi oni su mi bili veliki oslonac kada je bilo najpotrebnije.

Sadržaj

1 UVOD 1
1.1 Nanotehnologija i terapijski nanosustavi 1
1.2 Nanosustavi (nanoantibiotici) u borbi protiv rezistentnih bakterija 1
1.2.1 Epidemiologija antimikrobne rezistencije 1
1.2.2 Prednosti nanoantibiotika 2
1.2.3 Mehanizmi kojima nanočestice sprječavaju rezistenciju mikroba 2
1.3 Kitozan-biopolimer izbora 7
1.3.1 Kitozan kao polimer izbora u izradi terapijskih (nano)sustava 7
1.3.2 Antimikrobni učinak kitozana 8
1.4 Melatonin 11
1.4.1 Primjena melatonina 11
1.4.2 Antimikrobni učinak melatonina 13
2 OBRAZLOŽENJE TEME 14
3 MATERIJALI I METODE 16
3.1 Materijali 16
3.2 Metode 17
3.2.1 Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom 17
3.2.2 Određivanje uspješnosti uklapanja melatonina u nanočestice 17
3.2.3 Određivanje veličine nanočestica 18
3.2.4 Određivanje zeta-potencijala nanočestica 18
3.2.5 Priprema inokuluma 19
3.2.6 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) kitozana 19
4 REZULTATI I RASPRAVA 20
4.1 Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom 20
4.2 Karakterizacija nanočestica s melatoninom 21
4.3 Ispitivanje antimikrobnog učinka nanočestica s melatoninom 23
5 ZAKLJUČCI 27
6 LITERATURA 28
7 SAŽETAK 33
8 SUMMARY 34
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 35
BASIC DOCUMENTATION CARD 36

1 UVOD

1.1 Nanotehnologija i terapijski nanosustavi

Nanotehnologija predstavlja znanost i inženjerstvo koji se bave dizajnom, sintezom, karakterizacijom i primjenom materijala čija je najmanja funkcionalna jedinica barem po jednoj dimenziji nanometarske veličine (Hamidi i sur., 2013). Danas je nanotehnologija široko rasprostranjena u svim granama industrije. Njezina primjena u biomedicini je od posebne važnosti. Suvremenim istraživanjima razvijaju se nanosustavi i ispituje mogućnost njihove primjene u području dijagnostike, ciljane dostave i kontroliranog oslobađanja lijeka. Terapijski nanosustavi su koloidni nosači djelatne tvari veličine od 10-1000 nm građeni od prirodnih, polusintetskih ili sintetskih polimera (Nagpal i sur., 2010). Specifična svojstva i ponašanje u biološkoj mikrookolini proizlaze iz male veličine čestica zbog čega ih karakterizira velika površina u odnosu na volumen. Terapijski nanosustavi mogu poboljšati topljivost uklopljenog lijeka, produljiti mu vrijeme zadržavanja u sistemskoj cirkulaciji, osigurati kontrolirano oslobađanje, smanjiti učestalost doziranja, odnosno smanjiti sistemske nuspojave (Zhang i sur., 2008).

1.2 Nanosustavi (nanoantibiotici) u borbi protiv rezistentnih bakterija

1.2.1 Epidemiologija antimikrobne rezistencije

Rezistencija na antimikrobne lijekove danas predstavlja veliki problem u humanoj medicini (Hajipour i sur., 2012). Neki od rezistentnih sojeva bakterija su meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomicin-rezistentni *Staphylococcus aureus*, penicilin-rezistentni *Streptococcus pneumonie*, rezistentni soj *Mycobacterium tuberculosis* i mnogi drugi (Pelgrift i Friedman, 2013). Rezistencija bakterija uzrok je primjene većih doza lijekova i posljedično veće toksičnosti, neuspješnog liječenja i duljeg zadržavanja u bolnici i na kraju povećanog mortaliteta (Huh i Kwon, 2011; Riley i sur., 2012). Stoga se sve više istražuju antimikrobni nanosustavi na koje patogeni ne mogu razviti rezistenciju. Nanomaterijali koji sami pokazuju antimikrobnu aktivnost ili podižu učinkovitost i sigurnost primjene antibiotika nazivaju se nanoantibiotici (Huh i sur., 2011). Njihov potencijal u liječenju infekcija istražen je i potvrđen *in vitro* i *in vivo*.

1.2.2 Prednosti nanoantibiotika

Nanoantibiotici mogu dostaviti antimikrobne lijekove u ciljna tkiva oslobađanjem uslijed djelovanja kemijskog stimulansa, magnetskog polja, promjene temperature ili pH (Sandhiya i sur., 2009; Dufresne i sur., 2004). Antimikrobne nanočestice određene građe i veličine (npr. Fe_2O_3 280 nm; TiO_2 25, 80, 155 nm; Mn_2O_3 30 nm; ^{13}C nanočestice 36 nm) učinkovite su pri liječenju različitih infekcija zahvaljujući prolasku kroz specifične biološke barijere, primjerice kroz krvno moždanu barijeru (Hu i Gao, 2010). Usto, nanoantibiotici mogu biti dizajnirani tako da imaju željena fizičko-kemijska svojstva, i to s ciljem minimiziranja sistemskih nuspojava klasičnih antimikrobnih lijekova (primjerice, hepatotoksičnost cefalosporina, ototoksičnost i nefrotoksičnost aminoglikozida) (Hetrick i sur., 2008). Nanočestice smanjuju nuspojave uklopljenih lijekova poboljšavajući im topljivost i stabilnost (Zhang i sur., 2010; Moghimi i sur., 2005). Zahvaljujući nespecifičnom mehanizmu djelovanja, patogeni ne mogu razviti rezistenciju na nanoantibiotike (Taubes, 2008). Nanoantibiotici mogu poboljšati terapijski indeks, poboljšati topljivost lijeka, produljiti vrijeme cirkuliranja (povećati $t_{1/2}$), osigurati kontrolirano oslobađanje lijeka odnosno poboljšati mu farmakokinetička svojstva (Zhang i sur., 2010). Mogu istodobno dostaviti više antimikrobnih lijekova na ciljno mjesto u svrhu postizanja sinergijskog učinka (Zhang i sur., 2010; Zhang i sur., 2008).

1.2.3 Mehanizmi kojima nanočestice sprječavaju rezistenciju mikroba

Nanočestice s antimikrobnim učinkom poput kitozanskih nanočestica, nanočestica koje oslobađaju dušikov oksid i metalnih nanočestica, učinkovite su u liječenju infekcija uzrokovanih rezistentnim patogenima zahvaljujući njihovom nespecifičnom antimikrobnom djelovanju. Koriste se kako bi nadvladale postojeće mehanizme rezistencije, kao što su smanjen unos i povećani efluks lijeka iz bakterijske stanice, stvaranje biofilma i rezistencija unutarstaničnih bakterija (Pelgrift i sur., 2013). Nanočestice najčešće objedinjuju više mehanizama antimikrobnog djelovanja, uslijed čega sprječavaju i razvoj rezistencije. Također nanočesticama je moguće dostaviti antimikrobni lijek na ciljno mjesto u većoj koncentraciji, čime se također umanjuje problem razvoja rezistencije, uz istodobno izbjegavanje nuspojava koje bi uslijedile pri primjeni većih doza antibiotika putem klasičnih ljekovitih oblika (Leid i sur., 2012).

Kitozanske nanočestice

Kitozan je derivat hitina, polimer koji se sastoji od N-acetil glukozaminskih ostataka i glukozaminskih ostatka raspoređenih slučajnim redoslijedom (Huh i Kwon, 2011). Svaka deacetilirana amino skupina kitozana ima $pK_a \sim 6,5$ pa je većina tih grupa protonirana pri pH $< 6,5$. Antimikrobni učinak kitozana temelji se na nekoliko različitih mehanizama koji osiguravaju učinak bez mogućnosti razvoja rezistencije. Prvi od mehanizama je elektrostatska interakcija pozitivno nabijenog kitozana i negativno nabijenog staničnog zida ili membrane mikroba koja rezultira povećanjem permeabilnosti ovojnice te istjecanjem citoplazmatskog sadržaja (uključujući ione i proteine) iz stanice mikroba (Pelgrift i sur., 2013). Kako je negativni naboj na površini stanica mikroba evolucijski očuvan i ne može se promijeniti jednostrukom genskom mutacijom, razvoj rezistencije na kitozan nije moguć. Usto, kitozan se također može vezati za DNK u jezgri stanice mikroba, inhibirajući transkripciju mRNA i posljedično translaciju proteina. Kitozan također kelira ione metala smanjujući aktivnost metaloproteina mikroba. Važna je i njegova uloga u procesu cijeljenja rane. Naime, kitozan inhibira oslobađanje upalnih citokina i povećava regrutaciju fibroblasta i taloženje kolagena tipa III, čime uzrokuje brže cijeljenje rane te smanjuje mogućnost razvoja infekcije. Antimikrobna aktivnost kitozana može se povećati oblikovanjem u nanočestice, čime se postiže velik omjer površine prema volumenu kao i velika gustoća pozitivnog naboja na površini čestica. To osigurava intenzivnije vezanje za stanični zid i membranu mikroba i posljedično veću antimikrobnu aktivnost (Pelgrift i sur., 2013).

Nanočestice koje oslobađaju dušikov oksid

Antimikrobna aktivnost dušikovog oksida očituje se uglavnom kroz reaktivne intermedijere dušikovog oksida (RNOS), koji nastaju reakcijom dušikovog oksida sa superoksidnim ionom. Pri koncentraciji dušikovog oksida većoj od 1 mM, nastaje značajna količina RNOS koji osiguravaju antimikrobni učinak, i to putem nekoliko mehanizama (Schairer i sur., 2012):

- RNOS stupaju u reakciju sa cisteinskim, metioninskim, tirozinskim, fenilalaninskim i triptofanskim aminokiselinskim ostacima bakterijskih proteina, uključujući proteine stanične membrane.

- RNOS oštećuju DNA izravno ili potičući stvaranje vodikovog peroksida i alkilirajućih tvari koje oštećuju DNA.
- RNOS reagiraju sa prostetičkom skupinom proteina, kao što su Fe-S klasteri i hem.
- RNOS inaktiviraju metaloproteine koji sadrže cink i time inhibiraju stanično disanje mikroba.
- RNOS uzrokuju lipidnu peroksidaciju.

Nanočestice koje sadrže metale

Nanočestice koje sadrže metale poput srebra, cinka, magnezija, bakra, titanija i zlata, višestrukim mehanizmima inhibiraju rast mikroba ili djeluju mikrobicidno (Pelgrift i sur., 2013). Od svih su najviše istraživane nanočestice koje sadrže srebro. Antimikrobnu aktivnost pokazuju ioni srebra (Ag+) koji ulaze u interakciju sa skupinama proteina staničnog zida i membrane bakterije koje sadrže fosfor ili sumpor. Vezanje iona srebra na negativno nabijene dijelove membrane stvara pore u membrani, zbog čega sadržaj citoplazme istječe iz stanice. To može uzrokovati i smrt stanice. Kada se nađu unutar stanice mikroba, ioni srebra djeluju antimikrobno putem još nekoliko mehnizama (Knetsch i Koole, 2011):

- inhibiraju citokrome transportnog lanca elektrona u mikroba;
- oštećuju DNK i RNK mikroba;
- inhibiraju replikaciju DNK mikroba, inhibirajući time dijeljenje stanica;
- denaturiraju 30 S podjedinicu ribosoma, čime sprječavaju translaciju proteina;
- uzrokuju nastajanje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) koji su toksični i za bakterijske stanice i za stanice domaćina;
- inhibiraju sintezu staničnog zida u gram-pozitivnih bakterija.

Nanočestice kao nosači antimikrobnih lijekova

Nanočestice s antimikrobnim djelovanjem mogu istodobno služiti i kao nosači konvencionalnih ili nekonvencionalnih lijekova s antimikrobnim djelovanjem (Cevher i sur., 2006; Pelgrift i Friedman, 2013). Nanočesticama je moguće dostaviti dva ili više lijekova istodobno te osigurati njihov sinergijski učinak, što je važno u borbi protiv rezistencije na postojeće lijekove (Zhang i sur., 2010). Nanočesticama poput liposoma i dendrimera moguće

je nadvladati mehanizme rezistencije kao što su smanjeni unos i povećani efluks lijeka iz bakterijske stanice.

Liposomi su vezikule građene od jednog ili više fosfolipidnih dvosloja i vodene jezgre, prikladne za uklapanje i hidrofilnih i lipofilnih lijekova. Zahvaljujući svojoj strukturi lako se stapaju sa staničnom membranom mikroba, oslobađajući uklopljeni lijek u dostatnoj koncentraciji u membranu ili citoplazmu mikrobne stanice (Zhang i sur., 2010; Huh i Kwon, 2011). Pri tim koncentracijama dolazi do zasićenja transmembranskih transportnih sustava odgovornih za efluks lijeka iz mikrobne stanice.

Dendrimeri su polimeri karakterizirani vrlo razgranatom trodimenzionalnom strukturom, što im daje veliki omjer površine prema volumenu (Zhang i sur., 2010; Huh i Kwon, 2011). Dendrimeri na čijoj se površini nalazi veliki broj pozitivno nabijenih kvarternih amonijevih spojeva, vežu se na negativno nabijenu površinu stanice mikroba i tako povećavaju permeabilnost membrane. To omogućava ulazak drugih dendrimera u stanicu, čime se nadilaze mehanizmi rezistencije kojima se smanjuje ulazak lijeka u stanicu. Istodobno dolazi i do istjecanja citoplazme iz stanice (Zhang i sur., 2010). U konačnici dendrimeri razaraju membranu mikrobne stanice. Zahvaljujući opisanim mehanizmima dendrimeri kao terapijski sustavi s uklopljenim lijekom imaju veći antimikrobni učinak od slobodnog lijeka (Pelgrift i sur., 2013).

Neke nanočestice mogu spriječiti nastanak bakterijskog biofilma ili razarati postojeći biofilm, koji predstavlja još jedan od uzroka razvoja rezistencije bakterija. Biofilm je nakupina bakterijskih stanica koje su uklopljene u izvanstanični matriks građen od polisaharida, proteina i nukleinskih kiselina. Biofilm omogućuje komunikaciju između bakterija te adheziju bakterijskih populacija za površinu, a također služi i kao zaštita od vanjskih nepovoljnih čimbenika (primjerice fagocitoze ili utjecaja antiobiotika) (Costertoni i sur., 1999). S obzirom da ne odgovaraju na konvencionalnu antibakterijsku terapiju, bakterijski biofilmovi često uzrokuju ponavljajuće infekcije. U novije vrijeme intenzivno se razvijaju mikro i nanočestice koje mogu služiti kao nosači konvencionalnih ili nekonvencionalnih lijekova s antimikrobnim djelovanjem, ali i nespecifično djelovati na rast bakterija i stvaranje biofilma zahvaljujući specifičnoj građi i površinskim svojstvima (Pelgrift i sur., 2013; Forier i sur., 2014).

Uklapanjem antimikrobnih lijekova u nanonosače poboljšava im se i djelovanje na unutarstanične bakterije. Nanočestice, uključujući i liposome, dovoljno su male da ih fagociti

domaćina (koji sadrže unutarstanične bakterije) mogu fagocitirati. Nakon fagocitoze iz nanočestica se oslobađa uklopljeni lijek koji unutar stanice djeluje na mikrobe. Time se, čak i pri malim primijenjenim dozama, unutar zaraženih stanica domaćina može postići velika koncentracija lijeka (Huang i sur., 2011). Velika koncentracija lijeka na mjestu infekcije osigurava baktericidan učinak prije razvoja rezistencije, dok mala primijenjena doza smanjuje mogućnost razvoja rezistencije u bakterija izvan mjesta djelovanja nanočestica. Terapijski nanosustavi pokazali su potencijal u borbi s mikrobima unutar alveolarnih makrofaga (primjerice, *M. Tuberculosis, L. Monocytogenes*). Život unutar stanice domaćina štiti takve mikrobe od djelovanja mnogih klasičnih antibiotika. Vezanje manoze na površinu nanočestica s uklopljenim antimikrobnim lijekom, osigurava njihovu ciljanu dostavu do alveolarnih makrofaga, na čijoj površini se nalaze receptori za manozu. *In vivo* je dokazano da je pulmonalna primjena liposoma konjugiranih s manozom rezultirala značajno većom koncentracijom antimikrobnih lijekova u alveolarnim makrofagima u odnosu na pneumocite tipa II (Huh i Kwon, 2011).

Polimerne nanočestice

Farmakokinetička svojstva antimikrobnog lijeka kao i učinkovitost i sigurnost njegove primjene moguće je poboljšati uklapanjem u polimerne nanočestice. Odabirom prikladnog polimera i razvojem odgovarajućeg nanosustava može se poboljšati stabilnost lijeka pri različitim uvjetima priprave i skladištenja, kao i u biološkim tekućinama. Sama fizičko-kemijska svojstva polimernih nanočestica (veličina, zeta potencijal i profil oslobađanja uklopljenog lijeka) mogu se optimirati mijenjanjem duljine polimernog lanca, odabirom najprikladnijeg surfaktanta i otapala u pripravi nanočestica, a s ciljem optimiranja interakcije nanočestica s biološkim strukturama i uzročnicima infekcije. Prednost predstavlja i mogućnost uvođenja funkcionalnih skupina na površinu nanočestica s ciljem vezanja na specifične ligande ili konjugiranja djelatne tvari (Huh i Kwon, 2011).

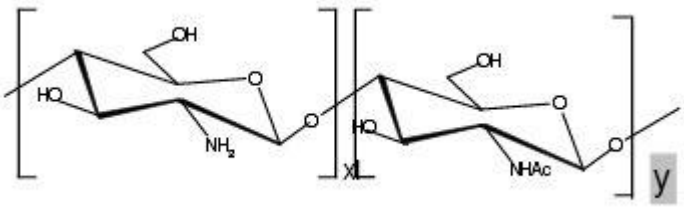
Dvije su vrste polimera najčešće korištene pri pripravi nanočestica kao nosača antimikrobnih lijekova: linearni polimeri (npr. polialkil-akrilati i polimetil-metakrilati) i amfifilni blok kopolimeri. Iz linearnih polimera pripravljaju se nanokapsule ili nanosfere. Nanosfere su matriksni sustavi u kojima je lijek jednoliko dispergiran ili je adsorbiran na njihovoj površini. Nanokapsule su vezikularni sustavi kod kojih se može razlikovati unutrašnjost ili jezgra čestice od vanjske polimerne ovojnice. Kod takvih sustava lijek je

obično otopljen u samoj jezgri čestice, ali može biti i adsorbiran na površini čestice. Amfifilni blok kopolimeri samoorganiziranjem u vodenoj sredini stvaraju micele s hidrofobnom jezgrom u koju se mogu uklopiti lipofilni lijekovi, te hidrofilnim omotačem prikladnim za uklapanje hidrofilnih lijekova (Letchford i Burt, 2007; Grottkau i sur., 2013).

1.3 Kitozan-biopolimer izbora

Hitin je polisaharid životinjskog podrijetla i karakteristične vlaknaste strukture. Sastavni je dio skeleta člankonožaca (rakova, škampa i jastoga) (Kumar i sur., 2005). Redukcijom acetiliranih amino grupa (35-40 %) nastaju 2-amino-2-deoksi-D-glukoza i 2-acetamido-2-deoksi-D-glukoza, koje su međusobno povezane β-(1-4)-glikozidnom vezom tj. nastaje kitozan (Slika 1). S obzirom na molekulsku masu, kitozani se dijele na kitozane male molekulske mase (<50 kDa), srednje molekulske mase (50-150 kDa) i velike molekulske mase (>150 kDa). Stupanj deacetilacije kitozana može biti između 45 i 98%. U farmaceutskoj industriji rabe se kitozani većeg stupnja deacetilacije (> 85 %) (Martinac i Filipović-Grčić, 2002).

Kitozan je netopljiv u vodi, ali s obzirom da je slaba baza (pKa = 6,5) u kiselom mediju dolazi do protoniranja amino skupina, a kitozan postaje pozitivno nabijena molekula topljiva u vodenom mediju. Topljivost kitozana ovisi o njegovom biološkom podrijetlu, molekulskoj masi i stupnju deacetilacije (Shepherd i sur., 1997) .



Slika 1: Parcijalno deacetilirani hitin (prilagođeno prema Dutta i sur., 2004)

1.3.1 Kitozan kao polimer izbora u izradi terapijskih (nano)sustava

Literaturni pregled ukazuje na kontinuirani porast broja znanstvenih istraživanja u čijem su fokusu kitozanske nanočestice kao terapijski sustavi namijenjeni različitim putovima primjene lijeka. Koriste se za nazalnu i oralnu dostavu peptida, kao nosači za nazalna cjepiva,

za lokalnu okularnu primjenu lijeka te za ciljnu dostavu lijekova. Oralno primijenjene nanočestice mogu zaštititi lijek od razgradnje u probavnom sustavu i poboljšati apsorpciju lijeka (Samstein i sur., 2008). Nazalno primijenjene kitozanske nanočestice, zahvaljujući pozitivnom naboju, međudjeluju s negativno nabijenom površinom sluznice. Na taj način produljuju zadržavanje lijeka na mjestu apsorpcije i poboljšavaju bioraspoloživost nazalno primijenjenog lijeka (Singla i Chawla, 2001). Kitozanske nanočestice također se koriste za okularnu primjenu lijekova, a njihov učinak se očituje povećanom bioraspoloživošću lijeka i produljenim zadržavanjem u prekornealnom području (Chhonker i sur., 2015; Gratieri i sur., 2011). Topikalno primijenjene nanočestice kitozana koriste se za pospješivanje cijeljenja rana (Bonferoni i sur., 2014; Gopal i sur., 2014).

Kitozan je prirodni, netoksični, biorazgradljivi i biokompatibilni polimer. Kako se svojstva (nano)sustava mogu razlikovati od svojstava ishodnog polimera potrebno je ispitati biokompatibilnost svakog novog terapijskog sustava temeljenog na kitozanu. U obzir treba uzeti i druge tvari iz kojih je sustav izgrađen, te fizičko-kemijska svojstva sustava (posebice površinska svojstva). Biokompatibilnost će svakako ovisiti i o planiranom mjestu primjene.

Biorazgradljivost je također važno svojstvo kitozana. Različiti derivati kitozana mogu imati različite putove metaboličke razgradnje. Poznavanje metabolizma svakog od derivata bitno je za određivanje toksikološkog profila i daljnju mogućnost upotrebe u formuliranju učinkovitog i netoksičnog terapijskog sustava (Kean i Thanou, 2010). Kitozan se razgrađuje na manje oligomere i monomere hidrolizom veze između dviju glukozaminskih jedinica, N-acetil-glukozaminskih jedinica ili veze glukozamina i N-acetil-glukozamina. Kitozan se razgrađuje kemijskim procesima i enzimskom katalizom. Što je veći stupanj deacetilacije to je veći stupanj razgradnje. Razgradnja enzimskom katalizom ovisi i o dostupnosti kitozanskih amino grupa (Kean i Thanou, 2010).

1.3.2 Antimikrobni učinak kitozana

Kitozan ima antimikrobni učinak na široki spektar mikroorganizama kao što su gram-pozitivne i gram-negativne bakterije te gljivice. Antimikrobno djelovanje kitozana ovisno je o molekulskoj masi i stupnju deacetilacije kao i građi staničnog zida ciljane bakterije. Predložena su tri različita mehanizma antimikrobnog djelovanja kitozana (Goy i sur., 2009). Prvi od njih temelji se na elektrostatskoj interakciji pozitivno nabijenih amino skupina

kitozana i negativno nabijene stanične membrane mikroba. Ta elektrostatska interakcija rezultira:

- promjenom permeabilnosti zida membrane, koja dovodi do osmotske neuravnoteženosti i posljedične inhibicije rasta mikroorganizama;
- hidrolizom peptidoglikana u staničnom zidu mikroorganizama, koja rezultira istjecanjem unutarstaničnih elektrolita kao što su kalijevi ioni i druge sastavnice male molekulske mase (proteini, nukleinske kiseline, glukoza, laktat dehidrogenaza).

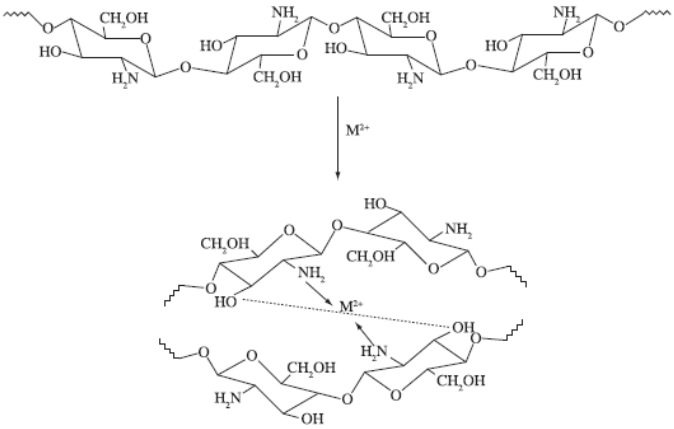
Što je veći broj pozitivno nabijenih amino skupina, veća je i antimikrobna aktivnost kitozana. Iz istog razloga kitozan ima veću antimikrobnu aktivnost nego hitin (Másson, 2008).

Vanjska membrana gram-negativnih bakterija građena je od lipopolisaharida koji sadrže fosfatne i pirofosfatne skupine, zbog kojih je negativnije nabijena nego membrana gram-pozitivnih bakterija (membrana gram-pozitivnih bakterija građena je od peptidoglikana vezanih za polisaharide i teikoične kiseline). Zbog toga je istjecanje unutarstaničnog sadržaja u prisutnosti kitozana veće u gram-negativnih nego u gram-pozitivnih bakterija (Chung, 2008; Eaton, 2008). Iako su neki autori naveli da je jači utjecaj kitozana na gram-pozitivne bakterije, (Coma, 2003; Duta, 2009), dokazano je da je hidrofilnost gram-negativnih bakterija značajno veća u odnosu na gram-pozitivne, čineći ih osjetljivijim na kitozan (Chung i sur., 2004).

Drugi predloženi mehanizam je vezanje kitozana za DNK u jezgri mikrobne stanice, te posljedična inhibicija transkripcije glasničke RNK i translacije proteina. Iako je taj mehanizam prihvaćen kao moguć, vjerojatnost prolaska kitozana u citoplazmu stanice je mala i ovisi o molekulskoj masi kitozana. Tako je, konfokalnom laserskom pretražnom mikroskopijom utvrđeno prisustvo oligomera kitozana unutar *E. Coli* izložene kitozanu (Liu i sur., 2001).

Treći mehanizam je keliranje metala, esencijalnih nutrijenata koji su potrebni za rast mikroba. Amino skupine kitozana omogućavaju keliranje metalnih kationa (Helander i sur., 2001). Taj mehanizam učinkovitiji je pri višem pH kada amino skupine kitozana nisu protonirane pa je elektronski par na dušiku amina dostupan za doniranje metalnim ionima. Predložen je model koji se temelji na sustavu kitozan-bakar, koji pokazuje kako pH utječe na dostupnost slobodnih mjesta za kompleksaciju (Guibal, 2004). Wang i suradnici (2005) predložili su model gdje je metal akceptor elektrona koji se veže na jedan ili više kitozanskih

lanaca putem NH_2 skupina, formirajući mostove sa hidroksilnim skupinama (Slika 2). Ovaj mehanizam nije najvažniji, jer su mjesta koja su dostupna za interakciju ograničena, i, ovisno o koncentraciji metala, može doći do njihovog zasićenja.



Slika 2:Kompleks kitozana i metala (prilagođeno prema Wang i sur., 2005)

Biološka aktivnost kitozana ovisi o njegovoj molekulskoj masi i stupnju deacetilacije. U više istraživanja je pokazano da sa smanjenjem molekulske mase kitozana raste njegov utjecaj na rast i razmnožavanje mikroorganizama. Polimerni lanci manje molekulske mase su mobilniji, lakše zauzimaju ispruženu konformaciju i stupaju u intenzivniju ionsku interakciju s površinom mikroorganizma (Kumar i sur., 2005). Također, s povećanjem stupnja deacetilacije kitozana raste i njegov antimikrobni učinak, što je posljedica veće gustoće pozitivno nabijenih amino skupina na njegovom lancu i intenzivnije interakcije s površinom mikroorganizma (Goy i sur., 2009).

Često je primjena kitozana u biomedicini ograničena njegovom slabom topljivošću u vodi. Stoga se uvođenjem permanentnog pozitivnog naboja na polimernom lancu kitozana pripravljaju različiti derivati kitozana topljivi u vodi. Tako dobivenim kationskim polielektrolitima topljivost ne ovisi o pH vodenog medija.

Vodotopljivi derivati kitozana najčešće se pripravljaju kvarternizacijom atoma dušika amino skupina. Primjerice, metiliranjem kitozana koje se provodi u suspenziji dimetilsulfata, NaOH-a i NaCl-a nastaje N,N,N-trimetilkitozan. Metilira se amino skupina kitozana na C-2 položaju (Britto i sur., 2008). Utvrđena je veća antimikrobna aktivnost kvarternih soli kitozana od samog kitozana u obliku baze (Sadeghi i sur., 2008).

Osim kvarternih soli kitozana postoje i drugi vodotopljivi derivati kao što su hidroksipropil i karboksimetil kitozani. Hidroksipropilni derivati kitozana sa visokim stupnjem supstitucije nisu topljivi u vodi, ali nakon cijepljenja maleinske kiseline na polimerni lanac postaju topljivi u neutralnom pH te imaju veću antimikrobnu aktivnost nego sami kitozan (Xie i sur., 2002).

1.4 Melatonin

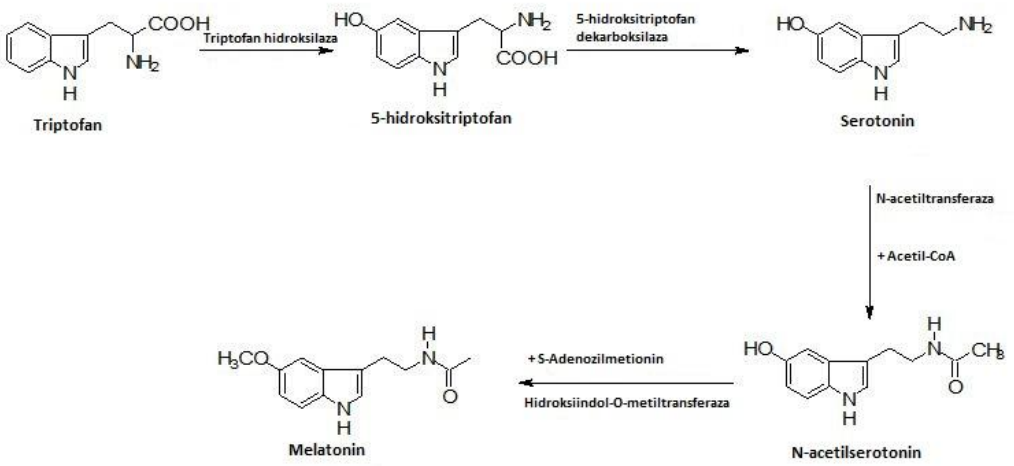
Melatonin (N-acetil-5-metoksitriptamin) je neurohormon kojeg možemo pronaći u bakterija, jednostaničnih eukariota, algi, gljiva, biljaka, životinja i ljudi (Tan i sur., 2010). Sintetizira se prvenstveno u epifizi pa se stoga naziva hormonom epifize. Do danas, otkrivene su mu brojne funkcije, a najviše se povezuje s regulacijom cirkadijanog ritma.

1.4.1 Primjena melatonina

Iako se njegova sposobnost da posvjetljuje kožu punoglavaca znala još od 1917., melatonin je prvi puta izoliran 1958.g. iz ekstrakta goveđe hipofize te je strukturno okarakteriziran. Primarno se sintetizira i izlučuje iz pinealocita (stanica epifize) ali možemo ga naći i u koštanoj srži, limfocitima, trombocitima, koži, mrežnici te stanicama probavnog sustava. Sinteza se odvija većinom tijekom noći, dok je preko dana suprimirana (Pavić i Zorc, 2013).

Melatonin je po kemijskom sastavu indolamin, a sintetizira se iz aminokiseline triptofan u četiri koraka: 1. Hidroksilacija L-Triptofana; 2. Dekarboksilacija uz dekarboksilazu aromatskih aminokiselina; 3. N-acetilacija serotonina; 4. O-metilacija acetiliranog serotonina (Slika 3).

Nakon što je sintetiziran, melatonin difuzijom prelazi u kapilarni sustav i cerebrospinalnu tekućinu te brzo dospijeva do svih tkiva i tjelesnih tekućina što dokazuje i njegova prisutnost u krvi, urinu, spermi i majčinom mlijeku. Metabolizira se većinom u jetri uz enzime citokrom P450 ali moguć je i neenzimski metabolizam, djelovanjem slobodnih radikala i drugih oksidansa pri čemu nastaje ciklički 3-hidroksimelatonin koji ima sposobnost izravnog hvatanja dvaju hidroksilnih radikala (Chowdury i sur., 2008).



Slika 3 :Sinteza melatonina (Carocci i sur., 2014, www.intechopen.hr)

Najistaknutije djelovanje melatonina je regulacija cirkadijanog ritma tj. ciklusa spavanja i budnosti. Tama pospješuje njegovu sintezu i sekreciju pa tako što je dulja noć, dulja je i njegova sekrecija. On je tzv. somnogen, tj. tvar koja potiče spavanje. Produljuje REM fazu sna, povećava sekreciju kortizola, te smanjuje tjelesnu temperaturu, što dovodi do uspavljivanja. Prva indikacija pri kojoj se danas koristi je poremećaj dnevnog bioritma uslijed promjene vremenskih zona (engl. *jet lag*) ali koristi se i u osoba koje rade noćne smjene i u slijepih ljudi u kojih sinteza melatonina nije regulirana izmjenom ciklusa svjetlo/tama. Koristi se kod kronične primarne nesanice, narkolepsije ili poremećaja spavanja u djece s ADHD-om. Starenjem opada razina melatonina te kvaliteta sna, pa se razmatra primjena melatonina u starijih ljudi (Pandi –Perumal i sur., 2006).

Melatonin ima i jako antioksidativno djelovanje te je jači antioksidans od vitamina C i E (Chowdhury i sur., 2008). Dokazano je i njegovo imunostimulativno djelovanje. Melatonin je učinkovit u snižavanju sistoličkog i dijastoličkog tlaka u bolesnika s hipertenzijom. Vezanje melatonina na MT2 receptore uzrokuje vazodilataciju te smanjuje arterijski puls i otpor, no međutim s druge strane melatonin uzrokuje i vazokonstrikciju vežući se na MT1 receptore. Djeluje na arterijski krvni tlak i preko autonomnog živčanog sustava, stoga primjena egzogenog melatonina povećava tonus vagusa i smanjuje koncentraciju noradrenalina u cirkulaciji (Pandi-Perumal i sur., 2006). Utječe na sintezu, sekreciju i djelovanje steroidnih i nesteroidnih hormona. Djeluje na sintezu hormona rasta, tireotropina i adrenokortikotropina. Utječe na metabolizam kalcija i fosfora preko paratireoidnih žlijezda i na periferne učinke

kortikosteroida preko hipofizno-adrenalne osi. Zbog inhibicije osi hipotalamus-hipofiza-gonade, melatonin ima jaki utjecaj na reprodukciju sisavaca koji se pare sezonski, ali i ljudi. S obzirom da melatonin stimulira sekreciju progesterona, koja posljedično uzrokuje inhibiciju sekrecije gonadotropin otpuštajućeg hormona, koji je uključen u propadanje žutog tijela, razmatra se njegova moguća primjena za održavanje žutog tijela u trudnoći. Utvrđeno je i njegovo antitumorsko djelovanje (Pavić i Zorc, 2013).

1.4.2 Antimikrobni učinak melatonina

Učinkovitost melatonina u liječenju infektivnih bolesti opsežno je istraživana (Nunnari i sur., 2003, Lopez Gonzalez i sur., 1998, Bonilla i sur., 2004; Reynolds i sur., 2003; Gitto i sur., 2001). Sva provedena *in vivo* istraživanja potvrdila su primjenjivost melatonina u liječenju infektivnih bolesti. Antimikrobni učinak melatonina ispitivan je *in vitro* (Wang i sur., 2001; Ozturk i sur., 2000, Konar i sur., 2000, Tekbas i sur., 2008). Pokazano je da melatonin inhibira rast gljivice *Candida albicans* pri koncentraciji od 300 μg/ml (Ozturk i sur., 2000). Tekbas i suradnici (2008) ispitivali su antimikrobni učinak melatonina na 3 različita rezistentna soja bakterija: meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), karbapenem rezistentni *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter Baumannii.* Navedene bakterije glavni su uzročnici bolničkih infekcija. Nakon 24 sata inkubacije MIK melatonina iznosila je 250 μg/ml za gram-pozitivne bakterije, i 125 μg/ml za gram negativne bakterije. Nakon 48 sati inkubacije MIK melatonina je smanjena na 125 μg/ml za gram-pozitivne bakterije i na 31,25 μg/ml za gram-negativne bakterije. Time je pokazano da melatonin ima antibakterijski učinak na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije *in vitro*, a djelovanje je potentnije za gram-negativne bakterije. Učinak se pripisuje njegovom svojstvu vezanja intracelularnih supstrata kao što su slobodno željezo i masne kiseline.

Rezultati provedenog istraživanja ukazuju da se aktivnost melatonina kao antibiotika razlikuje od ostalih antimikrobnih lijekova. Razlike u minimalnim inhibitornim koncentracijama nakon 24- i 48-satne inkubacije upućuju na zaključak da melatonin regulira proliferaciju/dijeljenje bakterija. Melatonin reducira sadržaj lipida u mikroorganizmima i ima visoki kapacitet vezanja metala. Prema tome melatonin prolongira lag fazu rasta bakterije reducirajući unutarstanične supstrate i smanjujući eksponencijalnu i stacionarnu fazu.

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Antimikrobna rezistencija je sposobnost mikroorganizama da razviju otpornost na, do tada, učinkovit lijek. Rezistencija na antimikrobne lijekove danas je vrlo raširen problem koji dovodi do primjene većih doza lijekova i posljedično veće toksičnosti, neuspješnog liječenja i duljeg zadržavanja u bolnici te, na kraju, povećanog mortaliteta. Stoga se sve više istražuju terapijski nanosustavi nespecifičnog antimikrobnog djelovanja, na koje patogeni ne mogu razviti rezistenciju. Njihov potencijal u liječenju infekcija istražen je i potvrđen *in vitro i in vivo* (Pelgrift i sur., 2013).

Kitozan je prirodni polimer koji nastaje deacetilacijom hitina, strukturnog polisaharida beskralježnjaka i nižih biljaka. Njegova povoljna svojstva kao što su biorazgradljivost, biokompatibilnost i bioadhezivnost omogućila su mu biomedicinsku primjenu. Kitozan ima antimikrobni učinak na široki spektar mikroorganizama, koji se temelji na nekoliko različitih mehanizama koji osiguravaju učinak bez mogućnosti razvoja rezistencije. Antimikrobno djelovanje kitozana ovisno je o molekulskoj masi i stupnju deacetilacije kao i građi staničnog zida ciljanog mikroba (Goy i sur., 2009).

Melatonin (N-acetil-5-metoksitriptamin) je neurohormon prisutan u bakterija, jednostaničnih eukariota, algi, gljiva, biljaka, životinja i ljudi (Tan i sur., 2010). Sintetizira se prvenstveno u epifizi pa se stoga naziva hormonom epifize. Do danas su mu otkrivene brojne funkcije, a najviše se povezuje s regulacijom cirkadijanog ritma. Učinkovitost melatonina u liječenju infektivnih bolesti opsežno je istraživana (Nunnari i sur., 2003, Lopez Gonzalez i sur., 1998, Bonilla i sur., 2004; Reynolds i sur., 2003; Gitto i sur., 2001). Sva provedena *in vivo* istraživanja potvrdila su primjenjivost melatonina u liječenju infektivnih bolesti. Antimikrobni učinak melatonina ispitivan je *in vitro* (Wang i sur., 2001; Ozturk i sur., 2000, Konar i sur., 2000, Tekbas i sur., 2008). Pokazano je da melatonin inhibira rast gljivice *Candida albicans* pri koncentraciji od 300 μg/ml (Ozturk i sur., 2000). Tekbas i suradnici (2008) pokazali su da melatonin ima antibakterijski učinak na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Učinak se pripisuje njegovom svojstvu vezanja intracelularnih supstrata kao što su slobodno željezo i masne kiseline.

Cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobnu aktivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom, pripravljenih iz kitozana koji se međusobno razlikuju po molekulskoj masi i

stupnju deacetilacije. 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).

Specifični ciljevi:

- Pripraviti lecitinsko-kitozanske nanočestice s uklopljenim melatoninom, korištenjem kitozana različitog stupnja deacetilacije i/ili molekulske mase;
- Pripravljenim nanočesticama odrediti veličinu i raspodjelu veličina čestica, površinski naboj i sadržaj uklopljenog lijeka;
- Ispitati antimikrobnu aktivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom i otopina kitozana na bakteriju *S. aureus* ATCC 29213, odnosno odrediti minimalne inhibitorne koncentracije kitozana u suspenzijama nanočestica i samim otopinama kitozana metodom dvostruke mikrodilucije u skladu s CLSI smjernicama (CLSI, 2007) u Müller-Hinton bujonu.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

U izradi eksperimentalnog dijela rada korišten je:

- kitozan (Protasan UP Cl 113, 114, 213, 214, Nova Matrix, Norveška)
- lecitin S45 (lecitin iz soje, 45% fosfatidilkolina; Lipoid GmbH, Njemačka)
- melatonin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- etanol (96%) korišten je za pripravu otopina lecitina
- otopina NaCl (10 mM) korištena je za razrjeđivanje suspenzija nanočestica prije mjerenja zeta potencijala

Ostale kemikalije bile su od hrvatskog proizvođača Kemiga.

Stupanj deacetilacije i molekulska masa korištenih kitozana prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1:Svojstva pojedinog tipa kitozana

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

Za ispitivanje antimikrobnog učinka (odnosno određivanja minimalne inhibitorne koncentracije, MIK) otopina kitozana i suspenzija lecitinsko-kitozanskih nanočestica korišteni su:

- mikrotitarske pločice s 96 jažica (Microplate 96 W, Greiner-bio.one)
- Müller-Hinton bujon (MH bujon; Merck, Njemačka)
- nefelometar (tvrtke bioMereiux)

Sav mikrobiološki materijal bio je steriliziran autoklaviranjem na 121°C/1 atmosfera tijekom 20 min. Ispitivane bakterijske vrste uzete su iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutskog-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kontrolni

mikroorganizam je *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Za vizualizaciju minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) primijenjena je modificirana CLSI mikrodilucija u bujonu koja kao reagens koristi 2,3,5-trifeniltetrazolin klorid (TTC; Aldrich).

3.2 Metode

3.2.1 Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

Pripravljene su osnovne otopine četiri tipa kitozana (C113, C114, C213, C214) koncentracije 10 mg/ml u pročišćenoj vodi. Lecitin je otopljen u 96 % etanolu pri koncentraciji od 25 mg/ml. Melatonin je otopljen u etanolnoj otopini lecitina u masenom omjeru prema lecitinu od 1:5.

Neposredno prije priprave lecitinsko-kitozanskih nanočestica osnovne otopine kitozana volumena 0,25 ml razrijeđene su pročišćenom vodom do 23 ml. Suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom pripravljene su injektiranjem 2 ml etanolne otopine lecitina i melatonina, koristeći Hamiltonovu iglu unutarnjeg promjera 0,75 mm, u 23 ml razrijeđene otopine kitozana uz miješanje na magnetskoj mješalici brzinom od 900 okretaja/min. Maseni omjer lecitina i kitozana u pripravljenim suspenzijama nanočestica iznosio je 20:1. Koncentracija kitozana u priređenim sustavima iznosila je 100 μg/ml.

Suspenzije praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica pripravljene su na isti način bez dodatka melatonina.

3.2.2 Određivanje uspješnosti uklapanja melatonina u nanočestice

Sadržaj lijeka uklopljenog u nanočestice određen je metodom dijalize. Suspenzije nanočestica s melatoninom (4 ml) stavljene su u vrećicu za dijalizu od celuloza acetata (Spectra/Por®, MW cut-off 12000-14000 Da, Medicell International Ltd, UK). Napunjene vrećice za dijalizu uronjene su u receptorski medij (100 ml pročišćene vode) koji je neprekidno miješan na magnetskoj mješalici brzinom od 30 okr/min. Kroz vremenski period od 120 min svakih 10 min su iz receptorskog medija uzimani uzorci volumena 2 ml. Uzeti volumen nadoknađivan je pročišćenom vodom. Prije analize sadržaja melatonina, uzorci receptorskog medija razrijeđeni su s 1 ml pročišćene vode. Koncentracija melatonina određena je UV-Vis spektrofotometrom (λ=278 nm, Cary 50, Varian Inc., SAD).

Uzorkovanje je prekinuto kada su u uzastopnim uzorcima receptorske faze određene jednake koncentracije melatonina.

Uspješnost uklapanja lijeka (UU), sadržaj melatonina u nanočesticama [engl. *drug loading*, DL (%)] i sadržaj melatonina u suspenziji nanočestica (C_M) određeni su prema sljedećim jednadžbama:

$$\text{UU}(\%) = \frac{(\text{ukupni lijek}) - (\text{neuklopljeni lijek})}{\text{ukupni lijek}} \times 100$$

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

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

Dijalizirani uzorci suspenzija nanočestica korišteni su u 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) nakon odgovarajućeg razrjeđenja dijaliziranih suspenzija nanočestica pročišćenom vodom. Korišten je monokromatski koherentni 10 Mw He-Ne laser (λ=633 nm). Mjerenja su provedena pri temperaturi od 25°C. Kut detekcije raspršene svjetlosti iznosio je 90°.

3.2.4 Određivanje zeta-potencijala nanočestica

Zeta potencijal određen je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, UK) nakon odgovarajućeg razrjeđenja dijaliziranih suspenzija nanočestica 10 mM otopinom NaCl. U sustavu za mjerenje elektroforetske pokretljivosti čestica korišten je 10 mW He-Ne laser. Mjerenja su provedena pri 25°C.

3.2.5 Priprema inokuluma

Inokulum bakterija pripremljen je iz 24-satne kulture bakterija, uzgojene na hranjivoj podlozi Müller-Hinton agar pri temperaturi aerobne inkubacije 37°C. S podloge su kolonije bakterija zahvaćene sterilnom mikrobiološkom ušicom i suspendirane u fiziološkoj otopini (0,9% vodena otopina NaCl) do koncentracije stanica 0,5 MacFarlanda koja odgovara koncentraciji bakterijskih stanica od $1x10^8$ CFU/ml.

3.2.6 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) kitozana

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije kitozana u suspenzijama nanočestica (ekvivalenata kitozana) i samih otopina kitozana provedeno je metodom dvostruke mikrodilucije u skladu s CLSI smjernicama (CLSI, 2007) u Müller-Hinton bujonu. Za vizualizaciju se koristi reagens 2,3,5-trifeniltetrazolin klorid koji se dodaje u jažice (20 µl) na kraju inkubacijskog vremena. U svaku jažicu (osim u prvi stupac) je dodano po 100 µl Müller-Hinton bujona. Metodom dvostruke mikrodilucije dodane su antimikrobne tvari u različitom rasponu koncentracija za određivanje pojedinačnih vrijednosti MIK. Za određivanje MIK vrijednosti dodane su lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom (MLC113, MLC114, MLC213, MLC214) u rasponu koncentracija (ekvivalenata kitozana) od 0,0977 µg/ml do 50 µg/ml i lecitinsko-kitozanske (LC113, LC114, LC213, LC214, L) u rasponu koncentracija (ekvivalenata kitozana) od 0,0977 µg/ml do 50µg/ml. Također su dodane i otopine kitozana (C113, C114, C213, C214) u rasponu koncentracija od 0,0049 mg/ml do 2,5 mg/ml.

Iz prethodno pripremljenog inokuluma u fiziološkoj otopini uzeto je 100 µl i razrijeđeno u 9,9 ml Müller-Hinton bujona. Iz ovog pripremljenog inokuluma je u svaku jažicu dodano 100 µl suspenzije bakterije *S. aureus* tako da konačna koncentracija bakterijskih stanica bude $5x10^5$ CFU/ml. Pločice s uzorcima su inkubirane 24 sata na 35±2°C. Bujon s kulturom ispitivanih bakterija služio je kao pozitivna kontrola (kontrola rasta).

MIK je najmanja koncentracija kitozana koja je inhibirala vidljivi bakterijski rast nakon 24 sati inkubacije. Žive bakterijske stanice metabolziraju TTC reagens do crvenog produkta formazana pa uočavamo crvenu boju u jažicama u kojima postoji bakterijski rast. Crvena boja izostaje u jažicama u kojima nema bakterijskog rasta. TTC reagens je dodan u jažice na kraju inkubacijskog vremena.

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom pripravljene su procesom ionotropnog geliranja. Primijenjena je metoda injektiranja etanolne otopine lecitina i melatonina u vodenu otopinu kitozana. Ionotropno geliranje posljedica je ionske interakcije između negativno nabijenog lecitina i pozitivno nabijenog kitozana (Hafner, 2008).

Za pripravu lecitinsko-kitozanskih nanočestica korištena su četiri tipa kitozana koji se međusobno razlikuju prema molekulskoj masi i stupnju deacetilacije (Tabilca 1). Nanočestice s melatoninom, redom MLC113, MLC114, MLC213, MLC214, pripravljene su iz kitozana C113, C114, C213, C214. Maseni omjer melatonina i lecitina iznosio je 1:5, a lecitina i kitozana 20:1. Kao kontrolni uzorci pripravljene su suspenzije praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica (LC113, LC114, LC213, LC214).

Odabir kitozana u pripravi nanočestica kao nosača melatonina s potencijalnim antimikrobnim učinkom proizlazi iz njegovih iznimnih svojstava biokompatibilnosti, biorazgradljivosti, te poznatog antimikrobnog učinka. S obzirom da antimikrobno djelovanje kitozana ovisi o molekulskoj masi i stupnju deacetilacije, nanočestice su pripravljene s četiri tipa kitozana koji se razlikuju u navedenim svojstvima. Navedena svojstva kitozana mogu i indirektno utjecati na antimikrobni učinak lecitinsko-kitozanskih nanočestica, utječući na njihovu veličinu i površinski naboj, a moguće i na sadržaj uklopljenog melatonina.

Lecitin je prirodna smjesa fosfolipida koja se često koristi u pripravi nanosustava. Razlog tome je njegova netoksičnost i biokompatibilnost, mogućnost uklapanja lipofilnih lijekova te produljeno oslobađanje uklopljenog lijeka. Sastav lecitina Lipoid S45 korištenog u ovom radu je sljedeći: fosfatidilkolin (54,9%), fosfatidiletanolamin (16,9%), lizofosfatidilkolin (1,0%), masne kiseline (sadržaj masnih kiselina izražen je u postotku u odnosu na ukupnu količinu masnih kiselina): palmitinska (18%), stearinska (3%), oleinska (10%), linoleinska (60%), linolenska (5%); te manji sadržaj triglicerida i DL-R tokoferola (0,8%).

Lecitinsko-kitozanske nanočestice pokazale su se prikladnim nosačem melatonina iz kojeg se melatonin produljeno oslobađa (Hafner i sur., 2009, 2015). Dosadašnjim istraživanjima ispitana je mogućnost primjene melatonina razvijenim terapijskim sustavom

putem različitih sluznica/bioloških barijera korištenjem prikladnih *in vitro* modela (nazalna, okularna, (trans)dermalna primjena) s ciljem postizanja različitog terapijskog učinka (sistemski učinak – reguliranje cirkadijanog ritma, snižavanje povišenog intraokularnog tlaka, antioksidativni učinak i sprječavanje starenja kože). (Hafner i sur., 2009, 2011, 2015). Utvrđena je biokompatibilnost s različitim tipovima stanica na kojima su temeljeni *in vitro* modeli (Caco-2, HaCaT, fibroblasti kože, HCE-T), te poboljšana permeabilnost preko različitih barijera u usporedbi s otopinom melatonina (Hafner i sur., 2009, 2011). Zahvaljujući bioadhezivnosti razvijenih nanočestica, očekuje se i dulje zadržavanje na mjestu primjene u odnosu na samu otopinu lijeka, što u konačnici može reultirati većom bioraspoloživošću (Hafner i sur., 2015).

S obzirom na poznati antimikrobni učinak kitozana i melatonina, lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom pripravljene su u ovom radu s ciljem ispitivanja njihovog antimikrobnog učinka.

4.2 Karakterizacija nanočestica s melatoninom

Lecitinsko-kitozanske nanočestice karakterizirane su s obzirom na veličinu, površinski naboj i sadržaj melatonina. Navedena svojstva mogu uvelike utjecati na antimikrobnu aktivnost nanočestica. Glavna svojstva lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom i praznih nanočestica prikazana su u Tablici 2. Uspješnost uklapanja melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice kretala se između 26,6±1,4 i 31,1±0,9%, a sadržaj melatonina između 106,3±5,4 i 124,5±3,4 μg/ml. Srednji promjeri praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica kretali su se od 239,0±2,1 do 247,4±3,3 nm. Srednji promjeri lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom kretali su se u sličnom rasponu (od 237,8±3,1 do 240,5±0,5 nm). Raspodjela veličina pripravljenih nanočestica prikazana je indeksom polidisperznosti (PDI; Tablica 2) koji se može kretati od 0 (monodisperzni sustav) do 1 (heterodisperzni sustav). Za sve tipove korištenih kitozana, nanočestice su bile relativno široke raspodjele veličine čestica, što odgovara polidisperznosti molekulske mase polimernih lanaca korištenih kitozana (Hafner, 2008).

Tablica 2:Glavna svojstva lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

Nanočestice	Srednji promjer(nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)	UU (%)	DL (%)	C_M (µg/ml)
MLC113 (LC113)	237,8±3,1 245,7±1,8	0,29±0,05 0,31±0,02	23,0±0,5 24,7±0,4	27,2±4,8	4,9±0,8	108,7±19,2
MLC114 (LC114)	240,4±3,8 239,0±2,1	0,35±0,02 0,34±0,03	24,7±0,4 26,4±0,8	30,5±2,8	5,5±0,5	121,9±11,2
MLC213 (LC213)	238,1±4,0 242,2±10,6	0,33±0,00 0,38±0,12	26,9±1,5 25,8±0,8	26,6±1,4	4,8±0,2	106,3±5,4
MLC214 (LC214)	240,5±0,5 247,4±3,3	0,29±0,03 0,45±0,06	31,4±0,3 30,3±1,5	31,1±0,9	5,6±0,1	124,5±3,4

Vrijednosti u zagradama odnose se na prazne nanočestice.

Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n = 3).

PDI, indeks polidisperznosti

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

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

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

Površinski naboj nanočestica svojstvo je o kojem najviše ovisi elektrostatska interakcija nanočestica s negativno nabijenom površinom stanice mikroba. Pozitivni zeta potencijal (u rasponu od 23,0±0,5 do 31,4±0,3 mV) zajedničko je svojstvo svih pripravljenih nanočestica (sa i bez uklopljenog melatonina). Zeta potencijal je pozitivan, jer su amino skupine kitozana na površini nanočestica pozitivno nabijene pri pH < 6,5. Sličnost veličine te zeta potencijala nanočestica s melatoninom i odgovarajućih praznih nanočestica ukazuje na uspješno uklapanje melatonina unutar lipofilnih domena nanočestica. Stoga se očekuje da uklapanje melatonina neće utjecati na interakciju nanočestica s površinom stanice mikroba.

Površinski naboj nanočestica ovisio je o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi korištenog kitozana (Tablica 2). Nanočestice pripravljene iz kitozana C114 i C214 (stupanj deacetilacije > 90%) imale su veći zeta potencijal od nanočestica koje su pripravljene iz kitozana C113 i C213 (stupanj deacetilacije 75-90%). Dobiveni rezultati u skladu su s očekivanjima, s obzirom da kitozani većeg stupnja deacetilacije imaju veći broj slobodnih

amino skupina koje mogu biti nositelji pozitivnog naboja pri pH < 6,5. S porastom molekulske mase kitozana blago je rastao i površinski naboj nanočestica. Utjecaj molekulske mase na površinski naboj nanočestica obično je manje izražen od utjecaja stupnja deacetilacije, a može biti posljedica utjecaja na hidrofilnost i hidrofobnost polimernih lanaca, fleksibilnost i prostornu organizaciju lanaca na površini čestice te interakciju lecitina i kitozana (Novoa-Carballal i sur., 2013).

Rezultati prikazani u ovom radu, vezani uz karakterizaciju nanočestica, u skladu su s prethodno ostvarenim rezultatima (Blažević i Milekić, 2015), te ukazuju na ponovljivost i reproducibilnost priprave lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom metodom ionotropnog geliranja.

4.3 Ispitivanje antimikrobnog učinka nanočestica s melatoninom

Suvremeni pristup rješavanju problema rezistencije bakterija na klasične antibiotike uključuje razvoj nanoantibiotika – nanočestica koje, zbog jedinstvenih fizičko-kemijskih svojstava kao što su mala i kontrolirana veličina čestica, velika površina u odnosu na volumen te visoka reaktivnost, mogu prevladati ograničenja klasičnih antibiotika (Zhang i sur., 2010). Nanočestice s antimikrobnim djelovanjem pokazuju različita nespecifična antibakterijska svojstva i i učinak na biofilm, dok istodobno mogu služiti i kao nosači konvencionalnih ili nekonvencionalnih lijekova s antimikrobnim djelovanjem (Cevher i sur., 2006; Pelgrift i sur., 2013).

Nanočestice najčešće objedinjuju više mehanizama antimikrobnog djelovanja, čime dodatno sprječavaju razvoj rezistencije. Među takve nanočestice ubrajaju se i kitozanske nanočestice. Antimikrobna aktivnost kitozana opsežno je revidirana u literaturi (Goy i sur., 2009). Novija istraživanja sugeriraju da se antimikrobna aktivnost kitozana može povećati oblikovanjem u nanočestice, čime se postiže velik omjer površine prema volumenu kao i velika gustoća pozitivnog naboja na površini čestica. To osigurava intenzivnije vezanje za stanični zid i membranu mikroba i posljedično veću antimikrobnu aktivnost (Pelgrift i sur., 2013).

Cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobnu aktivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom, pripravljenih iz kitozana koji su se međusobno razlikovali po molekulskoj masi i stupnju deacetilacije. Svim nanočesticama je utvrđen pozitivni površinski naboj, čime je potvrđena prisutnost pozitivno nabijenih amino skupina kitozana na površini nanočestica. To

svojstvo nanočestica uvjet je za antimikrobni učinak temeljen na elektrostatskoj interakciji pozitivno nabijenih amino skupina kitozana i negativno nabijene stanične membrane mikroba (Guy i sur., 2009). Pretpostavka je da bi antimikrobni učinak pripravljenih pozitivno nabijenih nanočestica, trebao biti povećan uklapanjem melatonina za kojeg se smatra da intracelularnim vezanjem iona željeza i masnih kiselina može spriječiti rast bakterija (Tekbas i sur., 2008).

Antimikrobni učinak lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom ispitan je metodom dvostruke mikrodilucije u skladu s CLSI smjernicama (CLSI, 2007) u Müller-Hinton bujonu. Ispitivanje je provedeno na soju ATCC29213 bakterije *Staphylococcus aureus* koja je jedan od najčešćih uzročnika infekcija kože i kroničnog rinosinusitisa. Ta vrsta lako razvija rezistenciju na antibiotike pa se infekcije navedenom bakterijom teško liječe (Kifer i Mužinić, 2013).

Antimikrobni učinak suspenzija lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom (MLC113, MLC114, MLC213, MLC214) ispitivan je u rasponu koncentracija kitozana od 0,0977 μg/ml do 50 μg/ml. Suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica bez melatonina (LC113, LC114, LC213, LC214), u istom rasponu koncentracija kitozana, služile su kao kontrolni uzorci. Ispitan je i antimikrobni učinak otopina kitozana (C113, C114, C213, C214) u rasponu koncentracija od 0,0049 mg/ml do 2,5 mg/ml.

Nije utvrđen antimikrobni učinak ni praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica ni lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na bakteriju *S. aureus* u ispitivanom rasponu koncentracija kitozana. Najveća koncentracija kitozana u suspenzijama nanočestica (0,05 mg/ml) pokazala se manjom od minimalne inhibitorne koncentracije za ATCC29213 soj *S. aureus*. U različitim literaturnim navodima, minimalne inhibitorne koncentracije otopine kitozana kreću se u rasponu od 0,1 do 10,0 mg/ml za gram-negativne bakterije te od 0,1 do 1,25 mg/ml za gram-pozitivne bakterije (Tao i sur., 2011). Razlike u minimalnim inhibitornim koncentracijama kitozana prijavljenim u različitim istraživanjima posljedica su utjecaja brojnih čimbenika na antibakterijsku aktivnost kitozana kao što su bakterijska vrsta, molekulska masa i stupanj deacetilacije kitozana, pH, temperatura, te sastav medija (Chen i sur., 2005; Chung i sur., 2003).

Lecitinsko-kitozanske nanočestice pripravljene su metodom ionotropnog geliranja u vrlo razrijeđenim sustavima. Stoga je koncentracija kitozana u suspenzijama nanočestica bila relativno mala (100 μg/ml). S obzirom da je antimikrobni učinak lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom ispitan metodom dvostruke mikrodilucije, najveća koncentracija

kitozana pri kojoj je ispitivan antimikrobni učinak nanočestica iznosila je 50 μg/ml. Navedeno ograničenje sustava može se nadvladati liofilizacijom nanočestica i naknadnim resuspendiranjem u manjem volumenu čime bi se osigurala veća početna koncentracija nanočestica i kitozana u sustavu. Jednako tako, prisustvo melatonina u suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica u koncentracijama približno jednakim koncentraciji kitozana nije osiguralo antimikrobni učinak sustava (C_M u suspenzijama nanočestica bila je u rasponu od 106,3 do 124,5 μg/ml; Tablica 2; najveće koncentracije melatonina u suspenzijama nanočestica pri određivanju antimikrobnog učinka bile su u rasponu od 53,2 do 62,3 μg/ml). Tekbas i suradnici (2008) su u ispitivanju antimikrobnog učinka melatonina na meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), karbapenem rezistentni *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter Baumannii,* odredili MIK melatonina od 250 μg/ml za gram-pozitivne bakterije, i 125 μg/ml za gram negativne bakterije, nakon 24 sata inkubacije. Navedene minimalne inhibitorne koncentracije melatonina značajno su veće od koncentracija melatonina u ispitivanim suspenzijama nanočestica pri određivanju antimikrobnog učinka. Liofilizacijom nanočestica i naknadnim resuspendiranjem u manjem volumenu osigurala bi se i veća početna koncentracija melatonina u sustavu. Mogućnost liofilizacije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom i uloga krioprotektora u očuvanju fizičko-kemijskih svojstava nanočestica nakon resuspendiranja liofilizata već su istraženi (Hafner i sur., 2011). Kao potencijalni krioprotektori korišteni su jednostavni šećeri kao što su glukoza i trehaloza. Očuvanje fizičko-kemijskih svojstava nanočestica s melatoninom postignuto je kad je pri procesu liofilizacije kao krioprotektor korištena trehaloza. S obzirom da bi trehaloza mogla pozitivno utjecati na rast bakterija, protebno je ispitati mogućnost korištenja drugih krioprotektora kao što su aerosil, PEG4000, AvicelRC591 (Emami i sur., 2012).

Antimikrobni učinak otopina kitozana (C113, C114, C213 i C214) ispitan je pri značajno većim koncentracijama kitozana (0,0049 mg/ml do 2,5 mg/ml) nego u slučaju suspenzija lecitinsko-kitozanskih nanočestica (0,0977 μg/ml do 50 μg/ml). Za svaki tip kitozana, određena je minimalna koncentracija kitozana u otopini pri kojoj je inhibiran rast *S. Aureus* (Tablica 3). Nije uočena jasna ovisnost antimikrobnog učinka ispitivanih tipova kitozana o njihovoj molekulskoj masi i stupnju deacetilacije.

Tablica 3:Vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) otopina različitih tipova kitozana za *S. aureus* ATCC29213

Tip kitozana	MW (kDa)	DD (%)	MIK (mg/ml)
C113	50-150	75-90	0,625
C114	50-150	> 90	1,25
C213	150-400	75-90	1,25
C214	150-400	> 90	1,25

Minimalne inhibitorne koncentracije kitozana bile su značajno veće od najveće ispitivane koncentracije kitozana u suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica (0,05 mg/ml). Dobiveni rezultati mogu poslužiti za definiranje okvirnih koncentracija kitozana u suspenzijama nanočestica za koje se može očekivati antimikrobni učinak, odnosno za definiranje postupka liofilizacije suspenzija nanočestica i rekonstituiranja liofilizata u manjem volumenu medija, s ciljem njihovog ukoncentriravanja.

5 ZAKLJUČCI

- Lecitinsko-kitozanske nanočestice srednjeg promjera od 239,0±2,1 do 297,4±3,3 nm, pozitivnog zeta potencijala od 23,0±0,5 do 31,4±0,3 mV, te sadržaja melatonina od 4,8±0,2 do 5,6±0,1 %, uspješno su pripravljene ionskom interakcijom lecitina i kitozana.
- Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom nisu inhibirale rast bakterije *S. Aureus* pri koncentraciji kitozana u rasponu od 0,0977 μg/ml do 50 μg/ml. Najveće koncentracije melatonina u suspenzijama nanočestica pri određivanju antimikrobnog učinka bile su u rasponu od 53,2 do 62,3 μg/ml.
- Minimalna inhibitorna koncentracija otopine kitozana molekulske mase 50-150 kDa i stupnja deacetilacije 75-90% za *S. aureus* iznosila je 0,625 mg/ml.
- Minimalna inhibitorna koncentracija otopine kitozana molekulske mase 50-150 kDa i stupnja deacetilacije > 90% te kitozana molekulske mase 150-400 kDa i stupnja deacetilacije 75-90% ili >90% za *S. aureus* iznosila je 1,25 mg/ml.
- Nije uočena jasna ovisnost antimikrobnog učinka ispitivanih tipova kitozana o njihovoj molekulskoj masi i stupnju deacetilacije.
- Lecitinsko-kitozanske nanočestice pripravljene su metodom ionotropnog geliranja u vrlo razrijeđenim sustavima. Stoga su koncentracije kitozana (100 μg/ml) i melatonina (106,3 do 124,5 μg/ml) u suspenzijama nanočestica bile relativno male. Ograničenje sustava može se prevladati liofilizacijom nanočestica i naknadnim resuspendiranjem u manjem volumenu čime bi se osigurala veća početna koncentracija kitozana i melatonina u sustavu.

6 LITERATURA

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

Bonferoni MC, Sandri G, Dellera E, Rossi S, Ferrari F, Mori M, Caramella C. Ionic polymeric micelles based on chitosan and fatty acids and intended for wound healing. Comparison of linoleic and oleic acid. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 87 (1), 101-106.

Bonilla E, Valero N, Chacin-Bonilla L, Medina-Leendertz S. Melatonin and viral infections. *J Pineal Res*, 2004, 36, 73-79.

Britto D, Forato LA, Assis OBG. Determination of the average degree of quartenization of N, N, N trimethylchitosan by solid state 13 C NMR. *Carbohyd Polym*, 2008, 74, 86-91.

Cevher E, Orhan Z, Mülazimoğlu L, Sensoy D, Alper M, Yildiz A, Ozsoy Y. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant Stapyloccocus aureus with prepared miccrospheres. *Int J Pharm*, 2006, 317 (2), 127-35.

Chen YL, Chou CC. Factors affecting the susceptibility of Staphylococcus aureus CCRC 12657 to water soluble lactose chitosan derivative. *Food Microbiol*, 2005, 22 (1), 29-35.

Chonker YS, Prasad YD, Chandasana H, Vishvkarma A, Shukla MPKP, Bhatta RS. Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72, 1451-1458.

Chowdhury I, Sengupta A, Maitra SK, Indian J. Melatonin Synthesis. *Biochem Biophys*, 2008, 45, 289.

Chung YC. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresour Technol*, 2003, 88 (3), 179-184.

Chung YC, Chen CY. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour Technol*, 2008, 99, 2806-2814.

Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JCG, Lin JG. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25, 932-936.

Coma V, Deschamps A, Martial-Gros A. Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer-Antimicrobial activity assessment on dairy-related contaminants. *J Food Sci*, 2003, 68, 2788-2792.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistant infections. *Science*, 1999, 284 (5418), 1318-22.

Dufresne MH, Garrec DL, Sant V, Leroux JC, Ranger M. Preparation and characterization of water-soluble pH-sensitive nanocarriers for drug delivery. *Int J Pharm*, 2004, 277, 81-90.

Dutta PK, Dutta J, Tripathi VS. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *J Sci Ind Res*, 2004, 63, 20-31.

Dutta PK, Tripath S, Mehrotra GK, Dutta J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem*, 2009, 114, 1173-1182.

Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Malcata FX. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Ultramicroscopy*, 2008, 108, 1128-1134.

Emami J, Rezazadeh M, Varshosaz J, Tabbakhian M, Aslani A. Formulation of LDL Targeted Nanostructured Lipid Carriers loaded with Paclitaxel: A Detailed Study of Preparation, Freeze Drying Condition, and In Vitro Cytotoxicity. *J Nanomater*, Volume 2012.

Forier K, Raemdonck K, De Smedt SC, Demeester J, Coenye T, Braeckmans K. Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. *J Control Release*, 2014, 190, 607-23.

Gratieri T, Gelfuso GM, de Freitas O, Rocha EM, Lopez RF. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 79 (2), 320-327.

Gitto E,Karbownik M, Reitter RJ. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res*, 2001, 50, 756-760.

Gopal A, Kant V, Gopalakrishnan A, Tandan SK, Kumar D. Chitosan-based copper nanocomposite accelerates healing in excision wound model in rats. *Eur J Pharmacol*, 2014, 731, 8-19.

Goy RC, de Britto D, Odilio B. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 2009, 19 (3), 241-247.

Grottkau BE, Cai X, Wang J, Jang X, Lin Y. Polymeric nanoparticles for a drug delivery system. *Curr Drug Metab*, 2013 14 (8), 6-840.

Guibal E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. *Sep Purif Technol*, 2004, 38, 43-74.

Hafner A. Kitozansko-lecitinske nanočestice za nazalnu i (trans)dermalnu primjenu melatonina. Doktorski rad, Zagreb, 2008.

Hafner A, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Lecithin/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.

Hajipour MJ, Fromm KM, AkbarAshkarran A, Jimenez de Aberasturi D, Larramendi IRD, Rojo T, Serpooshan V, Parak WJ, Mahmoudi M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol*, 2012, 30 (10), 499-511.

Hamidi M, Azadi A, Rafiei P, Ashrafi H. A pharmacokinetic overview of nanotechnology-based drug delivery systems: an ADME-oriented approach. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2013, 30 (5), 67-435.

Helander IM, Nurmiaho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*, 2001, 30, 235-44.

Hetrick EM, Shin JH, Stasko NA, Johnson CB, Wespe DA, Holmuhamedov E, Schoenfisch MH. Bactericidal efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *ACS Nano*, 2008, 2 (2), 235-246.

Huang CM, Chen CH, Pornpattananangkul, Zhang L, Chan M, Hsieh MF, Zhang L. Eradication of drug resistant Staphylococcus aureus by liposomal oleic acids. *Biomaterials*, 2011, 32 (1), 214-221.

Huh AJ, Kwon YJ. Nanoantibiotics:a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release*, 2011, 156 (2), 128-145.

Hu YL, Gao JQ. Potential neurotoxicity of nanoparticles. *Int J Pharm*, 2010, 394 (1-2), 115-121.

Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62 (1), 3-11.

Kifer D, Mužinić V. Antimikrobno djelovanje mupirocina, mentola, timola i 1,8-cineola na planktonske stanice i biofilm bakterije *Staphylococcus aureus*. Studentski rad, Zagreb, 2015.

Knetsch ML, Koole LH. New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*, 2011, 3 (1), 340-366.

Konar VV, Yilmaz O, Ozturk AL. Antimicrobial and biological effects of bomphos and phomphos on bacterial and yeast cells. *Bio-Organic Chem*, 2000, 28, 214-225.

Kumar ABV, Varadaraj MC, Gowda LR, Tharanathan RN. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against Bacillus cereus and Escherichia coli. *Biochem J*, 2005, 391, 167-175.

Leid JG, Ditto AJ, Knapp A, Shah PN, Wright BD, Blust R, Christensen L, Clemons CB, Wilber JP, Young GW, Kang AG, Panzner MJ, Cannon CL, Yun YH, Youngs WJ, Seckinger NM, Cope EK. In vitro antimicrobial studies of silver carbene complexes: activity of free and nanoparticle carbene formulations against clinical isolates of pathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(1), 138-148.

Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 65(3), 259-69.

Liu XF, Guan YL, Yang DZ, Li Z, Yao KD. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci*, 2001, 79, 1324-1335.

Lopez Gonzalez MA, Gubrrero JM, Cuballo Pudraja JM, Delgado Moreno F. Melatonin in palate tonsils with recurent acute tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 1998, 49, 625-628.

Martinac A, Filipović-Grčić J. Kitozan-biopolimer 21. stoljeća. *Farm Glas*, 2002, 58, 1-10.

Másson M, Holappa J, Hjálmarsdóttir M, Rúnarsson ÖV, Nevalainen T, Järvinen T. Antimicrobial activity of piperazine derivatives of chitosan. *Carbohyd Polym*, 2008, 74, 566-571.

Melatonin in Parkinson's Disease, http://www.intechopen.com, pristupljeno 26.03.2014.

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J*, 2005, 19 (3), 311-330.

Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Chitosan nanoparticles:a promising system in novel drug delivery. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2010, 58 (11), 1423-30.

Novoa-Caballal R, Riguera R, Fernandez-Megia E. Chitosan hydrophobic domains are favoured at low degree of acetylation and molecular weight. *Polymer*, 2013, 54, 2081-2087.

Nunnari G, Nigro L, Palermo F. Reduction of serum melatonin levels in Hiv-1-infected individuals' parallel disease progression: correlation with serum interleukin-12 levels. *Infection*, 2003, 31, 379-382.

Ozturk AL, Yilmaz O, Kirbag S, Arslan M. Antimicrobial and biological effects of ipemphos and amphos on bacterial and yeast strains. *Cell Biochem Funct*, 2000, 18, 117-126.

Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal. *FEBS J*, 2006, 273, 2813.

Pavić K, Zorc B. Melatonin, *Farm Glas*, 2013, 69, 249-265.

Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65 (13-14), 1803-1815.

Reynolds FD, Dauchy R, Blask D. The pineal gland hormone melatonin improves survival in a rat model of sepsis/shock induced by zymosan A. *Surgery*, 2003, 134, 474-479.

Riley MA, Robinson SM, Roy CM, Dennis M, Liu V, Dorit RL. Resistance is futile: the bacteriocin model for addresing the antibiotic resistance challenge. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(6), 1438-1442.

Sadeghi AMM, Amini M, Avadi MR, Siedi F, Rafiee-Tehrani M, Junginger HE. Synthesis, characterization, and antibacterial effects of trimethylated and triethylated 6-Nh_2-6-deoxy chitosan. *J Bioactive Compatible Polym*, 2008, 23, 262-275.

Samstein R, Perica K, Balderrama F, Look M, Fahmy T. The use of deoxycholic acid to enhance the oral biovailability of biodegradable nanoparticles. *Biomaterials*, 2008, 29 (6), 703-708.

Sandhiya S, Dkhar SA, Surendiran A. Emerging trends of nanomedicine-an overview. *Fundam Clin Pharmacol*, 2009, 23(3), 263-269.

Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*, 2012, 3 (3), 0-1.

Shepherd R, Reader S, Falshaw A. Chitosan functional properties. *Glycoconjugate J*., 1997, 14, 535-542.

Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects -- an update. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53 (8), 1047-67.

Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz RM, Mayo JC, Fuentes-Brptp L, Reiter RJ. The chaning biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev*, 2010, 85, 607.

Tao Y, Qian LH, Xie J. Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of Pseudomonas aeruginosa and Staphyloccocus aureus. *Carbohydr Polym*, 2011, 86(2), 969-974.

Taubes G. The bacteria fight back. *Science*, 2008, 321, 356-361.

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 (2), 222-6.

Wang HX, Liu F, NG TB. Examination of pineal indoles and 6-methoxy-2-benzoxazolinone for antioxidant and antimicrobial effects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001, 130, 379-388.

Wang X, Du Y, Fan L, Liu H, Hu Y. Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: synthesis, characterization and structure-activity study. *Polym Bull*, 2005, 55, 105-113.

Xie W, Xu P, Wang W. Liu Q. Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. *Carbohyd Polym*, 2002, 50, 35-40.

Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther*, 2008, 83 (5), 761-9.

Zhang L, Pornpattananangkul, Hu CM, Huang CM. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Curr Med Chem*, 2010, 17 (6), 585-94.

7 SAŽETAK

Rezistencija mikroorganizama na antimikrobne lijekove danas je vrlo raširen problem koji dovodi do primjene većih doza lijekova i posljedično veće toksičnosti, neuspješnog liječenja i duljeg zadržavanja u bolnici te, na kraju, povećanog mortaliteta. Stoga se sve više istražuju terapijski nanosustavi nespecifičnog antimikrobnog djelovanja, na koje patogeni ne mogu razviti rezistenciju.

Cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobnu aktivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na bakteriju *S. aureus* ATCC 29213. Kitozan kao polimer izbora ima antimikrobni učinak na široki spektar mikroorganizama, temeljen na nekoliko različitih mehanizama (elektrostatska interakcija s površinom mikroba, vezanje oligomera na DNK, keliranje metala) koji osiguravaju učinak bez mogućnosti razvoja rezistencije. Antimikrobni učinak melatonina pripisuje se njegovom svojstvu vezanja intracelularnih supstrata kao što su slobodno željezo i masne kiseline.

Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom pripravljene su ionotropnim geliranjem kitozana i lecitina. 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 %). Srednji promjer i zeta-potencijal nanočestica kretali su se u rasponu od 239,0 do 297,4 nm, odnosno od 23,0 do 31,4 mV. Sadržaj melatonina iznosio je do 5,6 %. Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom nisu inhibirale rast bakterije *S. aureus* pri koncentraciji kitozana u rasponu od 0,0977 µg/ml do 50 µg/ml. Najveće koncentracije melatonina u suspenzijama nanočestica pri određivanju antimikrobnog učinka bile su u rasponu od 53,2 do 62,3 µg/ml.

Otopine kitozana inhibirale su rast bakterije *S. aureus* pri koncentracijama značajno većim od 50 µg/ml (0,625 mg/ml za otopinu kitozana molekulske mase 50-150 kDa i stupnja deacetilacije 75-90%; 1,25 mg/ml za otopine kitozana molekulske mase 50-150 kDa i stupnja deacetilacije > 90% te kitozana molekulske mase 150-400 kDa i stupnja deacetilacije 75-90% ili > 90%). Lecitinsko-kitozanske nanočestice pripravljene su metodom ionotropnog geliranja u vrlo razrijeđenim sustavima. Stoga su koncentracije kitozana (100 µg/ml) i melatonina (106,3 do 124,5 µg/ml) u suspenzijama nanočestica bile relativno male. Daljnja procjena terapijskog potencijala nanosustava uključivat će liofilizaciju nanočestica i naknadno resuspendiranje u manjem volumenu čime će se osigurati veća početna koncentracija kitozana i melatonina u sustavu.

8 SUMMARY

Antimicrobial resistance is currently widespread problem resulting in administration of higher doses of drugs, addition of treatments with higher toxicity, longer hospital stays, and increased mortality. Therefore, drug delivery nanosystems with non-specific antimicrobial activity are rapidly gaining attention of scientific community, as they reduce the chance for antimicrobial resistance development.

The aim of this work was to investigate the antimicrobial activity of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles against *S. aureus* ATCC 29213. Chitosan as a polymer of choice shows antimicrobial activity against wide spectar of microorganisms, based on several different mechanisms (i.e. electrostatic interaction with microbial surface, oligomers DNA binding, metal chelating effect), preventing resistance development. Melatonin reduces lipid levels in microorganisms, and has a high metal binding capacity resulting in antimicrobial activity.

Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles were prepared by ionotropic gelation of lecithin and chitosan. Four types of chitosan used differed in molecular weight (50-150 kDa or 150-400 kDa) and/or deacetylation degree (75-90 % or > 90 %). Mean diameter and zeta potential of nanoparticles ranged between 239.0 and 297,4 nm and 23.0 and 31.4 mV, respectively. Melatonin loadings were up to 5.6%. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles did not inhibit *S. aureus* growth at chitosan concentration ranging from 0.0977 μg/ml to 50 μg/ml. The highest melatonin concentrations in the nanoparticle suspensions ranged between 53.2 and 62.3 μg/ml.

Chitosan solutions inhibited *S. aureus* growth at chitosan concentrations that were signifficantly higher than 50 μg/ml (0.625 mg/ml for solution of chitosan with molecular weight of 50-150 kDa and deacetylation degree of 75-90%; 1.25 mg/ml for solution of chitosan with molecular weight of 50-150 kDa and deacetylation degree > 90% and solution of chitosan with molecular weight of 150-400 kDa and deacetylation degree of 75-90% or > 90%). Lecithin/chitosan nanoparticles were prepared by ionotropic gelation of lecithin and chitosan in very diluted systems. Thus, chitosan (100 μg/ml) and melatonin concentrations (106.3 to 124.5 μg/ml) in nanoparticle suspensions were rather low. Further assessment of therapeutic potential of nanosystem will include nanosuspension lyophilisation and resuspension in lower volume of suspending medium to obtain systems with higher chitosan and melatonin concentration.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Ispitivanje antimikrobnog učinka lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

Paula Tomljanović

SAŽETAK

Rezistencija mikroorganizama na antimikrobne lijekove danas je vrlo raširen problem koji dovodi do primjene većih doza lijekova i posljedično veće toksičnosti, neuspješnog liječenja i duljeg zadržavanja u bolnici te, na kraju, povećanog mortaliteta. Stoga se sve više istražuju terapijski nanosustavi nespecifičnog antimikrobnog djelovanja, na koje patogeni ne mogu razviti rezistenciju. Cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobnu aktivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na bakteriju *S. aureus* ATCC 29213. Kitozan kao polimer izbora ima antimikrobni učinak na široki spektar mikroorganizama, temeljen na nekoliko različitih mehanizama (elektrostatska interakcija s površinom mikroba, vezanje oligomera na DNK, keliranje metala) koji osiguravaju učinak bez mogućnosti razvoja rezistencije. Antimikrobni učinak melatonina pripisuje se njegovom svojstvu vezanja intracelularnih supstrata kao što su slobodno željezo i masne kiseline. Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom pripravljene su ionotropnim geliranjem kitozana i lecitina. 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 %). Srednji promjer i zeta-potencijal nanočestica kretali su se u rasponu od 239,0 do 297,4 nm, odnosno od 23,0 do 31,4 mV. Sadržaj melatonina iznosio je do 5,6 %. Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom nisu inhibirale rast bakterije *S. aureus* pri koncentraciji kitozana u rasponu od 0,0977 µg/ml do 50 µg/ml. Najveće koncentracije melatonina u suspenzijama nanočestica pri određivanju antimikrobnog učinka bile su u rasponu od 53,2 do 62,3 µg/ml.Otopine kitozana inhibirale su rast bakterije *S. aureus* pri koncentracijama značajno većim od 50 µg/ml (0,625 mg/ml za otopinu kitozana molekulske mase 50-150 kDa i stupnja deacetilacije 75-90%; 1,25 mg/ml za otopine kitozana molekulske mase 50-150 kDa i stupnja deacetilacije > 90% te kitozana molekulske mase 150-400 kDa i stupnja deacetilacije 75-90% ili > 90%). Lecitinsko-kitozanske nanočestice pripravljene su metodom ionotropnog geliranja u vrlo razrijeđenim sustavima. Stoga su koncentracije kitozana (100 µg/ml) i melatonina (106,3 do 124,5 µg/ml) u suspenzijama nanočestica bile relativno male. Daljnja procjena terapijskog potencijala nanosustava uključivat će liofilizaciju nanočestica i naknadno resuspendiranje u manjem volumenu čime će se osigurati veća početna koncentracija kitozana i melatonina u sustavu.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 3 grafička prikaza, 3 tablice i 73 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kitozan, melatonin, lecitin, suspenzije nanočestica, antimikrobni učinak

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

Komentor: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Jasmina Lovrić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: travanj, 2016.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Evaluation of antimicrobial effect of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles

Paula Tomljanović

SUMMARY

Antimicrobial resistance is currently widespread problem resulting in administration of higher doses of drugs, addition of treatments with higher toxicity, longer hospital stays, and increased mortality. Therefore, drug delivery nanosystems with non-specific antimicrobial activity are rapidly gaining attention of scientific community, as they reduce the chance for antimicrobial resistance development.The aim of this work was to investigate the antimicrobial activity of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles against *S. aureus* ATCC 29213. Chitosan as a polymer of choice shows antimicrobial activity against wide spectar of microorganisms, based on several different mechanisms (i.e. electrostatic interaction with microbial surface, oligomers DNA binding, metal chelating effect), preventing resistance development. Melatonin reduces lipid levels in microorganisms, and has a high metal binding capacity resulting in antimicrobial activity.Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles were prepared by ionotropic gelation of lecithin and chitosan. Four types of chitosan used differed in molecular weight (50-150 kDa or 150-400 kDa) and/or deacetylation degree (75-90 % or > 90 %). Mean diameter and zeta potential of nanoparticles ranged between 239.0 and 297,4 nm and 23.0 and 31.4 mV, respectively. Melatonin loadings were up to 5.6%. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles did not inhibit *S. aureus* growth at chitosan concentration ranging from 0.0977 µg/ml to 50 µg/ml. The highest melatonin concentrations in the nanoparticle suspensions ranged between 53.2 and 62.3 µg/ml. Chitosan solutions inhibited *S. aureus* growth at chitosan concentrations that were signifficantly higher than 50 µg/ml (0.625 mg/ml for solution of chitosan with molecular weight of 50-150 kDa and deacetylation degree of 75-90%; 1.25 mg/ml for solution of chitosan with molecular weight of 50-150 kDa and deacetylation degree > 90% and solution of chitosan with molecular weight of 150-400 kDa and deacetylation degree of 75-90% or > 90%). Lecithin/chitosan nanoparticles were prepared by ionotropic gelation of lecithin and chitosan in very diluted systems. Thus, chitosan (100 µg/ml) and melatonin concentrations (106.3 to 124.5 µg/ml) in nanoparticle suspensions were rather low. Further assessment of therapeutic potential of nanosystem will include nanosuspension lyophilisation and resuspension in lower volume of suspending medium to obtain systems with higher chitosan and melatonin concentration.

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

Thesis includes: 36 pages, 3 figures, 3 tables, and 73 references. Original is in Croatian language.

Keywords: chitosan, lecithin, melatonin, suspension of nanoparticles, antimicrobial effect

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

Komentor: **Maja Šegvić Klarić**, **Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

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

The thesis was accepted: April, 2016.