

# Razvoj lipidno-alginatnih nanočestica za topikalnu primjenu melatonina

---

Čunčić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:841265>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**



Repository / Repozitorij:

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



Ivan Čunčić

**Razvoj lipidno-alginatnih nanočestica za  
topikalnu primjenu melatonina**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

*Svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner, izrazito zahvaljujem na stručnom vodstvu, iznimnom strpljenju i susretljivosti, uloženom trudu i potpori.*

*Također zahvaljujem Marini Juretić, mag. pharm., Biseri Jurišić Dukovski, mag. pharm. i kolegici Ivani Plantić na pomoći u izradi eksperimentalnog dijela ovog rada, kao i svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.*

*Na kraju, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima, koji su mi bili velika potpora za vrijeme studija.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Melatonin .....	1
1.2. Terapijski sustavi s melatoninom .....	3
1.3. (Trans)dermalna primjena melatonina .....	3
1.4. Nazalna primjena melatonina .....	10
1.5. Okularna primjena melatonina .....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1. Materijali .....	14
3.2. Metode .....	14
3.2.1. Razvoj lipidno-alginatnih nanočestica .....	14
3.2.2. Karakterizacija nanočestica .....	15
3.2.3. Priprava lipidno-alginatnih nanočestica s melatoninom .....	16
3.2.4. Uspješnost uklapanja melatonina .....	16
3.2.5. <i>In vitro</i> oslobađanje melatonina iz lipidno-alginatnih nanočestica .....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	18
4.1. Priprava i karakterizacija nanočestica .....	18
4.1.1. Lecitinske nanočestice .....	18
4.1.2. Lipidne nanočestice .....	18
4.1.3. Lipidno-alginatne nanočestice .....	20
4.2. Priprava i karakterizacija lipidno-alginatnih nanočestica s melatoninom .....	22
4.3. Određivanje uspješnosti uklapanja melatonina u nanočestice .....	24
4.4. Profil <i>in vitro</i> oslobađanja melatonina .....	25
5. ZAKLJUČCI .....	27
6. LITERATURA .....	28
7. SAŽETAK .....	34

Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

# 1. UVOD

## 1.1 Melatonin

Melatonin (*N*-acetil-5-metoksitriptamin) je neurohormon kojega primarno sintetizira i izlučuje epifiza ovisno o ritmu izmjene svjetla i tame. Sintetizira se i izlučuje tijekom noći, dok su preko dana njegove koncentracije vrlo niske. Dugotrajna izloženost svjetlu za vrijeme noći može suprimirati njegovu sintezu i izlučivanje (Albertini i sur., 2014).

Sinteza melatonina u epifizi uključuje nekoliko koraka. Prvo se L-triptofan prevodi u serotonin. Serotonin se metabolizira *N*-acetiltransferazom u *N*-acetil-5-hidroksitriptamin, a zadnji korak je pretvorba *N*-acetil-5-hidroksitriptamina u melatonin pomoću enzima hidroksiindol-*o*-metiltransferaze (Ekmekcioglu, 2006). Nakon oslobađanja u sistemsku cirkulaciju, melatonin se raspodjeljuje u razne tekućine i tkiva (slina, urin, cerebrospinalna tekućina, plodna voda i mlijeko).

Budući da se melatonin ne pohranjuje u epifizi, nego se direktno izlučuje u sistemsku cirkulaciju, njegova koncentracija u plazmi pokazuje aktivnost epifize. Tijekom noći kod mladih osoba prosječna koncentracija melatonina u plazmi iznosi 50–70 pg/ml (216–302 pmol/l). Tijekom dana koncentracija melatonina u plazmi je uglavnom niža od 10 pg/ml (43 pmol/l). Oko 21 sat dolazi do porasta koncentracije melatonina, a vršna vrijednost postiže se između 2 i 4 sata, te vraća na bazalnu vrijednost ujutro oko 8 sati (Clustrat i sur., 2005).

Melatonin se većinom metabolizira u jetri. Na taj način se iz sistemske cirkulacije uklanja 90 % melatonina. Melaton se prvo hidroksilira, a zatim izlučuje urinom kao sulfat, ili u manjoj mjeri, kao glukuronid. Koncentracija 6-sulfatoksimelatonina u urinu u korelaciji je s njegovom koncentracijom u plazmi. Oko 1 % melatonina izlučuje se u nepromijenjenom obliku, dok 3-hidroksimelatonin, koji se također može detektirati u urinu, može predstavljati biomarker stvaranja hidroksilnih radikala u tijelu (Clustrat i sur., 2005).

Melatonin u organizmu svoje učinke postiže putem četiri različita mehanizma: vezanjem na melatoninske membranske receptore, vezanjem na nuklearne receptore, vezanjem na unutarstanične proteine (npr. kalmodulin) i antioksidativnim djelovanjem. Kao kronobiotik, egzogeni melatonin primjenjuje se u terapiji primarne nesanice i poteškoća usnivanja uslijed brze promjene vremenskih zona (engl. *jet-lag*) i rada u noćnoj smjeni.

Povećava pospanost, produljuje REM fazu, povećava sekreciju endogenog melatonina i snižava temperaturu, što uzrokuje pospanost. Svoje antioksidativno djelovanje melatonin postiže izravnim hvatanjem slobodnih radikala i poticanjem sinteze antioksidativnih enzima. Zbog toga, ali i drugih mehanizama poput djelovanja na ekspresiju pojedinih gena, melatoninu se pripisuje antitumorski i imunostimulativni učinak. Ispitivanja na životinjama pokazala su da, ukoliko se primjenjuje s glukokortikoidima, melatonin sprječava ili usporava glukokortikoidima uzrokovanu osteoporozu. Učinak ostvaruje i u probavnom sustavu, gdje poticanjem lučenja hidrogenkarbonata djeluje gastroprotektivno, a smanjenjem apsorpcije kolesterola sprječava nastanak žučnih kamenaca. Uz sve navedeno, istražuje se povezanost melatonina s neurološkim bolestima i psihičkim poremećajima, budući da su u pacijenata s takvim oboljenjima detektirane niže vrijednosti endogenog melatonina (Pavić i Zorc, 2013). Osim navedenog, ispitivano je i antibakterijsko djelovanje melatonina. Pretpostavljeni mehanizam takvog učinka je keliranje željeza i masnih kiselina, esencijalnih za rast i razvoj bakterija (Tekbas i sur., 2008).

U Republici Hrvatskoj je lijek Circadin, u obliku tableta s produljenim oslobađanjem u dozi od 2 mg, odobren za primjenu i indiciran za terapiju primarne nesаницe u osoba starijih od 55 godina. Preporučena doza je 2 mg jedanput dnevno, nakon obroka, 1 do 2 sata prije odlaska na spavanje. Ova doza se može uzimati do trinaest tjedana. Apsorpcija melatonina i vršna koncentracija nakon oralne primjene Circadina mijenjaju se pod utjecajem hrane. Prisutnost hrane odgađa apsorpciju melatonina, pa vršna koncentracija melatonina u plazmi u stanju sitosti nastupa kasnije ( $t_{max} = 3,0$  sata prema  $t_{max} = 0,75$  sati) i ima nižu vrijednost ( $C_{max} = 1020$  pg/ml prema  $C_{max} = 1176$  pg/ml) (<http://www.halmed.hr/>).

Mala i promjenjiva bioraspoloživost melatonina nakon oralne primjene (oko 3 %; Al-Omary, 2013) uslijed izraženog metabolizma prvim prolaskom kroz jetru, te brze eliminacije ( $t_{1/2} < 45$  min; Dubey i sur., 2006), razlozi su razvijanja novih terapijskih sustava modificiranog oslobađanja melatonina, prikladnih za druge puteve primjene. Nazalnom i transdermalnom primjenom melatonina moguće je osigurati sistemski učinak melatonina. Usto, melatonin se može primjenjivati topikalno na kožu s ciljem zaštite od štetnog UV zračenja. Optimiranjem depozicije nazalno primijenjenog terapijskog sustava u području olfaktorne regije nosne šupljine moguće je poboljšati direktnu dostavu melatonina u mozak, što je od posebnog interesa u liječenju neurodegenerativnih bolesti. Okularna se primjena melatonina istražuje zahvaljujući utvrđenom terapijskom učinku melatonina na povišeni

intraokularni tlak. Terapijski sustavi razvijani za navedene puteve primjene i indikacije detaljnije su predstavljeni u nastavku.

## **1.2. Terapijski sustavi s melatoninom**

Pregled terapijskih sustava za topikalnu primjenu melatonina s ciljem postizanja sistemskog ili lokalnog učinka dan je u Tablici 1. Terapijski sustavi dizajnirani su obzirom na mjesto primjene i željeni učinak, odnosno optimirani su obzirom na profil oslobađanja i/ili permeacije lijeka i biokompatibilnost. Razvijani su terapijski sustavi mikrometarskih i nanometarskih veličina različitog polimernog/lipidnog sastava i strukture.

## **1.3. (Trans)dermalna primjena melatonina**

Lijekovi se primjenjuju topikalno na kožu s ciljem postizanja lokalnog (dermalna primjena) ili sistemskog učinka (transdermalna primjena). U slučaju lijekova s lokalnim učinkom, topikalna primjena omogućuje dostavu lijeka na oboljelo mjesto uz primjenu značajno nižih doza lijeka od onih pri sistemskoj primjeni, čime se izbjegavaju sistemske nuspojave. S druge strane, glavni cilj transdermalne primjene lijeka je postizanje i održavanje učinkovite koncentracije lijeka u plazmi kroz dulje vrijeme, uz minimalne fluktuacije koncentracije, odnosno osiguranje sistemskog učinka topikalno primijenjenog lijeka u potrebnom trajanju, uz minimiziranje nuspojava (Guy, 2010).

Melatonin se može primjenjivati topikalno na kožu s ciljem zaštite kože od oksidativnih oštećenja prilikom izlaganja UV zračenju (Tursilli i sur., 2006), s ciljem antibakterijskog učinka (Romić i sur., 2016), ali i s ciljem osiguranja sistemskog učinka uz produljeno oslobađanje i simuliranje endogenog ritma izlučivanja (Andega i sur., 2001).

**Tablica 1:** Sažeti prikaz razvijenih terapijskih sustava s melatoninom

Terapijski sustav	Polimeri i lipidi	Put primjene	Karakterizacija sustava	Ostvareni rezultati	Literatura
Mikrosfere	Stearilni alkohol Kitozan Natrijev alginat	Oralna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja u umjetnom želučanom i crijevnom soku	Postignuto produljeno oslobađanje	Lee i sur., 1998
Mikrokapsule	Kitozan	Oralna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja	Pripremljene plutajuće mikrokapsule s produljenim oslobađanjem u umjetnom želučanom soku (pH 1,2)	El-Gibaly i sur., 2002
Mikrokapsule	Kitozan	Oralna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja <i>In vivo</i> ispitivanje protektivnog učinka mikrokapsula s melatoninom kod apoptoze stanica jetre štakora uzrokovane aflatoksinom B1	Produljeno oslobađanje Mikrokapsule s melatoninom su pokazale veću učinkovitost u smanjenju apoptoze stanica jetre u odnosu na otopinu melatonina	El-Gibaly i sur., 2003
Mikrosfere	Škrob	Nazalna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja <i>In vivo</i> farmakokinetička ispitivanja na zečevima	Postignuto produljeno oslobađanje Produljeno zadržavanje škrobnih mikrosfera na nosnoj sluznici u odnosu na otopinu melatonina Visoka apsolutna bioraspoloživost Dobra korelacija između <i>in vitro</i> oslobađanja i <i>in vivo</i> apsorpcije	Mao i sur., 2004
Transdermalni matriksni sustav	Eudragit® E100	Transdermalna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja <i>Ex vivo</i> ispitivanje permeabilnosti na koži štakora	Transdermalni flasteri s mentolom kao pospješivačem apsorpcije karakterizirani su najvećim fluksom kroz kožu štakora	Kanikkannan i sur., 2004
Nanosfere Nanokapsule	Smjesa triglicerida kaprilične i kaprične kiseline Eudragit® S100 Span 80®		<i>In vitro</i> ispitivanje antioksidativnog učinka melatonina protiv peroksidacije lipida	Uklapanjem u nanočestice pojačan je antioksidativni učinak melatonina u odnosu na vodenu otopinu melatonina	Schaffazick i sur., 2005
Elastični liposomi	Fosfatidilkolin Natrijev deoksikolat Span® 80 Natrijev kolat Natrijev dodecil sulfat	Transdermalna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje permeabilnosti melatonina na ljudskoj koži	Poboljšana permeabilnost, transdermalni fluks i smanjeno zastojno vrijeme u odnosu na konvencionalne liposome i otopinu melatonina Povećano zadržavanje melatonina u koži	Dubey i sur., 2006, 2008



Mikrosfere	Tristearin Tripalmitin	Dermalna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje fotodegradacije	Povećanje fotostabilnosti melatonina uklapanjem u lipidne mikrosfere	Tursilli i sur., 2006
Elastični liposomi	Fosfatidilkolin	Transdermalna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje permeabilnosti melatonina na ljudskoj koži <i>In vivo</i> ispitivanje iritabilnosti kod zečeva	Poboljšana permeabilnost, transdermalni fluks i smanjeno zastojno vrijeme u odnosu na konvencionalne liposome i otopinu Povećano zadržavanje melatonina u koži Niska iritabilnost	Dubey i sur., 2007
Čvrste lipidne nanočestice	Stearinska kiselina Fosfatidilkolin Natrijev taurokolat	Oralna i transdermalna primjena	Farmakokinetička ispitivanja na dobrovoljcima	Odgođeni $t_{max}$ , povišeni AUC i produljeno vrijeme polueliminacije nakon oralne primjene u odnosu na standardnu formulaciju Razina melatonina u plazmi održana je iznad 50 pg/ml kroz 24 h nakon transdermalne primjene	Priano i sur., 2007
Ciklodekstrinski kompleks	Hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin Nasumično metilirani ciklodekstrin	Nazalna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje permeabilnosti kroz trodimenzionalni tkivni model EpiAirway™	Povećana permeabilnost melatonina iz inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinom u odnosu na mikronizirani melatonin	Babu i sur., 2008
Nanokapsule	Smjesa triglicerida kaprilične i kaprične kiseline Eudragit® S100 Span 80®	Intraperitonealna primjena	<i>In vivo</i> ispitivanje antioksidativnog učinka melatonina u mozgu i jetri miša	Uklapanjem u nanočestice pojačan je antioksidativni učinak melatonina	Schaffazick i sur., 2008
Nanočestice	Lecitin Kitozan	Transmukozna primjena	Ispitivanje permeabilnosti na stanicama karcinoma debelog crijeva (Caco-2) i ispitivanje biokompatibilnosti	Poboljšana permeabilnost melatonina iz nanočestica u odnosu na otopinu melatonina Nema oštećenja stanične membrane niti smanjenja vijabilnosti Caco-2 stanica izloženih nanočesticama pri koncentraciji < 400 $\mu$ g/ml	Hafner i sur., 2009
Nanočestice	Lecitin Kitozan		Ispitivanje stabilnosti liofiliziranog produkta	Liofilizat nanočestica s trehalozom, skladišten pri 4°C, kroz 7 mjeseci zadržava fizičko-kemijska svojstva nanočestica i sadržaj uklopljenog lijeka	Hafner i sur., 2009
Nanočestice	Lecitin Kitozan	Transdermalna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje permeabilnosti kroz kožu i biokompatibilnosti na stanicama keratinocita i fibroblasta	Poboljšana transdermalna dostava melatonina Nema oštećenja stanične membrane niti smanjenja vijabilnosti humanih keratinocita i fibroblasta izloženih nanočesticama pri koncentraciji do 200 $\mu$ g/ml	Hafner i sur., 2011
Gel	Carbopol 9345® CMC	Nazalna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje permeabilnosti kroz trodimenzionalni tkivni model EpiAirway™	Suspenzija melatonina u Carbopol i CMC gelovima ima višu permeabilnost preko EpiAirway™ modela u odnosu na PEG400	Babu i sur., 2011

	PEG 400		Farmakokinetička ispitivanja na štakorima	Veće razine melatonina u mozgu štakora nakon nazalne primjene u odnosu na intravensku primjenu	
Nanočestice	PLGA PEG		<i>In vitro</i> ispitivanje antioksidativnog djelovanja melatonina na eksperimentalnom animalnom modelu sepse	Poboljšano antioksidativno djelovanje melatonina	Volti et al., 2012
Nanokapsule (u gelu)	Smjesa triglicerida kapriličnei kapričnekiseline Eudragit® S100 Span 80® Carbopol®940	Transdermalna primjena	<i>In vitro</i> oslobađanje i permeabilnost kroz kožu	Kontrolirano <i>in vitro</i> oslobađanje Značajna modulacija transdermalne permeacije melatonina za gelove s uklopljenim nanokapsulama	Hoffmeister i sur., 2012
Nanočestice	PLGA PEG	Okularna primjena	Ispitivanje okularne podnošljivosti i sniženja intraokularnog tlaka u zečeva	Dobra okularna podnošljivost PLGA-PEG nanočestice s melatoninom snižavaju intraokularni tlak do 8 h (najviše sniženje: 5 mm Hg)	Musumeci i sur., 2013
Mikrosfere	PLGA		<i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja <i>In vitro</i> ispitivanje genske ekspresije markera osteogeneze	Postignuto produženo oslobađanje melatonina (do 28 dana) Dokazana učinkovitost melatonina uklopljenog u mikrosfere na pojačanu gensku ekspresiju markera osteogeneze	Zhang i sur., 2013
Niosomi	Span 60 PCL Kolesterol Natrijev deoksikolat	Oralna primjena	<i>In vitro</i> oslobađanje u slini i umjetnoj slini	Niosomi osiguravaju usporeno oslobađanje melatonina, koje je dodatno produženo u formulaciji s polikaprolaktonom	Nukulkit i sur., 2014
Niosomi u gelu	Span 60 PCL Kolesterol Natrijev deoksikolat	Dermalna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanja permeabilnosti na svinjskoj koži  <i>In vivo</i> ispitivanje protuupalnog djelovanja na miševima	Melatonin uklopljen u niosome sporije prolazi kroz kožu i osigurava produženi protuupalni učinak u koži	Priprem i sur., 2014
Čvrste lipidne nanočestice	Gelucire1® 50/13 Flowlac1® 100 Aerosil® 200 Stearinska kiselina Alginska kiselina Karnauba vosak	Oralna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja Ispitivanje kratkoročne stabilnosti u mlijeku i jogurtu	Kombinacija nanočestica različitog sastava za postizanje pulsog oslobađanja melatonina Nanočestice stabilne i prikladne za oralnu primjenu s mlijekom ili jogurtom	Albertini i sur., 2014
Čvrste lipidne nanočestice	Softisan® 100 Stearinska kiselina Palmitinska kiselina	Okularna primjena	Ispitivanje okularne podnošljivosti i sniženja intraokularnog tlaka u zečeva	Kationske čvrste lipidne nanočestice ne izazivaju iritaciju ni toksične učinke Kationske čvrste lipidne nanočestice pokazuju jače i dugotrajnije sniženje očnog tlaka u odnosu na otopinu	Leonardi i sur., 2015

	Didecil-dimetil-amonijev bromid			melatonina Najveće sniženje očnog tlaka od 7 mm Hg nakon 7 h i učinkom do 24 h pokazale su nanočestice s dodatkom palmitinske kiseline	
Nanokapsule s lipidnom jezgrom	PCL Sorbitan monostearat Trigliceridi srednje dugačkih lanaca Polisorbat 80		<i>In vitro</i> ispitivanja na staničnoj liniji alveolarnih epitelnih stanica A549	Poboljšana antioksidativna svojstva melatonina uklopljenog u nanokapsule u odnosu na otopinu melatonina	Charão i sur., 2015
Nanočestice Micele	Lecitin Kitozan  Pluronic®F127 Kitozan	Okularna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanja oslobađanja <i>In vitro</i> ispitivanje biokompatibilnosti <i>In vitro</i> ispitivanje permeabilnosti Ispitivanje mukoadhezivnosti	Postignuto produljeno oslobađanje melatonina iz nanočestica i micela u odnosu na vodenu otopinu Nanočestice i micelle su biokompatibilne Micele imaju veću permeabilnost u odnosu na nanočestice Prisutnost kitozana u formulaciji snižava permeaciju	Hafner i sur., 2015
Nanočestice	Lecitin Kitozan	Dermalna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja <i>In vitro</i> ispitivanje vijabilnosti i cijeljenja modelne rane korištenjem stanične linije humanih keratinocita	Nanočestice osiguravaju produljeno oslobađanje melatonina u odnosu na otopinu, ne utječu na vijabilnost keratinocita Nanočestice s uklopljenim melatoninom pospješuju cijeljenje rane <i>in vitro</i>	Blažević i sur., 2016
Nanospužve	β-ciklodekstrin	Transdermalna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja	Uspješno uklapanje nanospužvi s melatoninom u pamučna vlakna Postignuto oslobađanje kinetikom nultog reda	Mihailiasa i sur., 2016
Mikrosfere	Kitozan Pluronic® F127	Dermalna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja Ispitivanje bubrenja Ispitivanje biokompatibilnosti i antibakterijskog učinka na <i>S. aureus</i>	Mikrosfere su biokompatibilne s ljudskim keratinocitima i fibroblastima Uklapanje melatonina potencira antibakterijski učinak kitozana Mikrosfere pokazuju dobru moć upijanja eksudata	Romić i sur., 2016
Nanostrukturirani lipidni nosači	Mygliol®812 Glicerildistearat Poloksamer 407		<i>In vitro</i> ispitivanja na Mcf-7 stanicama karcinoma dojke	Nanostrukturirani lipidni nosači s melatoninom pojačavaju citotoksični učinak tamoksifena	Sabzichi i sur., 2016
Nanočestice s lipidnom jezgrom	Smjesa triglicerida kaprilične i kaprične kiseline Sorbitan monostearat PCL Polisorbat 80		<i>In vitro</i> ispitivanja utjecaja uklopljenog melatonina na razinu ROS-a na goveđim jajnim stanicama	Nanočestice s lipidnom jezgrom i uklopljenim melatoninom smanjuju razinu ROS-a u stanicama Povećan broj i kvaliteta razvijenih blastocista u odnosu na otopinu melatonina	Remiao i sur., 2016
U/V emulzija Gel Gel	Montanov m68® Carbopol® 940 PLO Na-CMC	Transdermalna i bukalna primjena	Ispitivanje stabilnosti tijekom skladištenja Ispitivanje fotostabilnosti na koži <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja <i>Ex vivo</i> ispitivanja permeabilnosti na ljudskoj	Nije zabilježena fizičko-kemijska nestabilnost nanosustava s melatoninom Smanjena fotoosjetljivost u odnosu na vodenu otopinu melatonina	Flo i sur., 2016

	Orabase <sup>®</sup>		koži i svinjskoj bukalnoj sluznici	Bolja permeabilnost melatonina uklopljenog u nanosustave u odnosu na vodenu otopinu	
Nanočestice silicija obložene HPMCF-om	HPMCP	Oralna primjena	<i>In vitro</i> ipitivanje oslobađanja u umjetnom želučanom i crijevnom soku <i>In vivo</i> ispitivanja na štakorima	Povećana bioraspoloživost, $t_{max}$ i $c_{max}$ u odnosu na otopinu melatonina	Li i sur., 2017
Polimerne nanočestice	NIPAM, PEG-DA		<i>In vitro</i> ispitivanje uklapanja i oslobađanja melatonina Ispitivanje antioksidativnog učinka nanočestica s melatoninom na staničnoj kulturi RAW264.7	Uspješno pripravljene čestice s temperaturno ovisnim oslobađanjem Snižavaju razinu ROS i produkciju TNF- $\alpha$	Zhang i sur., 2017.
Liposomi	Kolesterol Fosfatidilkolin	Oralna primjena	<i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja u umjetnom želučanom i crijevnom soku Određivanje količine ostatnih otapala Ispitivanje stabilnosti	Liposomi su rezistentni na razgradnju u želučanom soku i osiguravaju usporeno oslobađanje melatonina u crijevnom soku Liposomi pripremljeni pomoću superkritičnog ugljikovog dioksida ne sadrže ostatna otapala, stabilniji su	Situ i sur., 2017

Pregled terapijskih sustava s melatoninom razvijenih zaključno do 2008., dostupan u literaturi (Hafner, 2008), nadograđen je terapijskim sustavima razvijenim novijim istraživanjima.

PCL- polikaprolakton; PLGA- kopolimer mliječne i glikolne kiseline; CMC-karboksimetil celuloza; PLO- poloksamersko-lecitinski gel, HMPCF-hidroksipropilmetilceluloza-ftalat; NIPAM-*N*-izopropilakrilamid; PEG – polietilenglikol; PEG-DA- Polietilenglikol diakrilat; TNF- $\alpha$ -faktor tumorske nekroze alfa (engl. *Tumor necrosis factor  $\alpha$* ); ROS-reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

U novije vrijeme razvijani su različiti terapijski nanosustavi za transdermalnu primjenu melatonina te istraživani razni pospješivači apsorpcije, s ciljem poboljšanja transdermalne permeabilnosti lijeka uslijed labavljenja strukture, promjene polarnosti, fluidizacije te izmjene lipida u međustaničnim lipidnim domenama. U svojem radu, Kanikkannan i suradnici (2004) razvili su transdermalni terapijski sustav melatonina pripremljen od Eudragita E100, te su ispitali utjecaj različitih pospješivača apsorpcije na transdermalnu permeabilnost melatonina. Oktanol, dekanol, nonanol, miristolni alkohol, nonanska kiselina, undekanoatna kiselina, miristinska kiselina, limonen i mentol dodani su u masenom udjelu od 2,5 % i 5%. Najbolji učinak pokazao je mentol u masenom udjelu 5 %, osiguravajući 2,1 puta veći transdermalni fluks melatonina u odnosu na terapijski sustav bez pospješivača apsorpcije. Utjecaj ispitivanih pospješivača na apsorpciju melatonina iz otopine je mnogo veći (4 do 10 puta), iz čega se može zaključiti da samo oslobađanje pospješivača iz formulacije i prodiranje do rožnatog sloja imaju važnu ulogu u konačnom učinku na transdermalnu permeabilnost lijeka (Kanikkannan i sur., 2004). Budući da mijenjaju strukturni integritet kože, pospješivači apsorpcije mogu negativno utjecati na barijernu funkciju kože i sklonost infekcijama. Stoga su potrebna dodatna istraživanja kojima je cilj potvrditi biokompatibilnost i sigurnost primjene takvih sustava.

U zadnjih desetak godina razvijeno je nekoliko koloidnih terapijskih sustava za transdermalnu primjenu melatonina, kao što su konvencionalni liposomi (Dubey i sur., 2006), elastični liposomi (Dubey i sur., 2006; Dubey i sur., 2008), etosomi (Dubey i sur., 2007) te lecitinsko-kitozanske nanočestice (Hafner i sur., 2011). Dubey i suradnici ispitali su transdermalnu permeabilnost melatonina koristeći ljudsku kožu, a Hafner i suradnici kožu svinje s područja uha, te dobili usporediv transdermalni fluks za otopinu melatonina. Za spomenute koloidne sustave transdermalni fluks melatonina rastao je kako slijedi: lecitinsko-kitozanske nanočestice ( $9,0 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )  $\approx$  konvencionalni liposomi ( $10,9 \pm 1,65 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) < elastični liposomi ( $51,2 \pm 2,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) < etosomi ( $59,2 \pm 1,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ). Sigurnu i učinkovitu transdermalnu primjenu melatonina pokazuju lecitinsko-kitozanske nanočestice. U odnosu na otopinu melatonina osiguravaju 2,3 puta veći fluks melatonina, te su biokompatibilne s keratinocitima i fibroblastima u koncentraciji do 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Hafner i sur., 2011). Kitozan u formulaciji pospješuje permeabilnost melatonina povećanjem hidratacije kože, utjecajem na sekundarnu strukturu keratina, udio vode u rožnatom sloju te potencijal i fluidnost stanične membrane. Povećanje transdermalnog fluksa melatonina uklopljenog u elastične liposome u odnosu na konvencionalne liposome objašnjeno je izraženom

deformabilnošću elastičnih liposoma (Dubey i sur., 2006). Najveći transdermalni fluks melatonina uklopljenog u etosome posljedica je visokog udjela etanola (30 %) u formulaciji, koji utječe na organizaciju i fluidnost lipida kože. Iako su ispitivanja na zečevima i ljudima pokazala da ne uzrokuju eriteme na koži (Dubey i sur., 2007), potrebna su ispitivanja učinka dugotrajne primjene takvih formulacija na kožu.

Za razliku od transdermalne primjene, pri dermalnoj primjeni cilj je postizanje sporije permeacije kroz kožu, kako bi se lijek čim dulje u njoj zadržao i djelovao. Niosomi kao nosači melatonina koje su razvili Priprem i suradnici (2014), rezultirali su 2,5 puta manjim fluksom melatonina kroz kožu i produljenim protuupalnim učinkom. Flo i suradnici (2016) ispitali su fotostabilnost melatonina u različitim pripravcima i došli do zaključka da je razgradnja proporcionalna zadržavanju u gornjim slojevima kože i većoj izloženosti radijaciji. Ipak, za poloksamersko-lecitinski gel pretpostavljeno je da se fotoprotektivni učinak temelji na organiziranju sufraktanata i fosfolipida u vezikule u kojima je lijek bio uklopljen te time i zaštićen od razgradnje (Flo i sur., 2016).

#### **1.4. Nazalna primjena melatonina**

Lijekovi se nazalnim putem primjenjuju radi postizanja lokalnog ili sistemskog učinka. Većinu lijekova koji se primjenjuju nazalno čine antihistaminici, dekonjestivi i kortikosteroidi koji su indicirani za liječenje oboljenja nazalne sluznice. Lijekovi koji se primjenjuju nazalno s ciljem postizanja sistemskog učinka uglavnom su male nepolarne molekule i peptidi. U slučaju nepolarnih molekula kao što su analgetici, nazalnom primjenom postiže se brza apsorpcija, zaobilazi metabolizam prvim prolaskom kroz jetru te postiže farmakokinetički profil sličan onom nakon intravenske primjene, što osigurava brz početak djelovanja lijeka, odnosno brzo suzbijanje boli. Nazalna primjena peptida zamjenjuje njihovu invazivnu primjenu, osiguravajući apsorpciju u obimu dostatnom za postizanje sistemskog učinka, što nije moguće postići oralnom primjenom peptida. Ipak, nazalno se za sada primjenjuju samo vrlo potentni peptidi, s obzirom na njihovu još uvijek malu nazalnu bioraspoloživost (Hafner i sur., 2014). Direktna veza nosne šupljine i središnjeg živčanog sustava putem olfaktornog i trigeminalnog živca mogući je put direktne dostave nazalno primijenjenog lijeka u mozak zaobilazeći krvno-moždanu barijeru (Pardeshi i sur., 2013).

Jedan od prvih pripravaka melatonina za nazalnu primjenu bila je otopina u 40%-tnom polietilenglikolu pripravljena sa ili bez dodatka natrijevog glikokolata (Bechgaard i sur.,

1999). Nazalna primjena tih otopina rezultirala je redom 94 % i 55 %-tnom bioraspoloživošću melatonina u zečeva, pri čemu je vršna koncentracija postignuta oko 5 minuta nakon primjene. Rezultati pokazuju pozitivni učinak natrijevog glikokolata na apsorpciju melatonina. Međutim, nazalna primjena pripravka bez natrijevog glikokolata također je rezultirala klinički značajnom apsorpcijom melatonina.

Stvaranje inkluzijskih kompleksa između melatonina i modificiranog ciklodekstrina (hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin i nasumično metilirani  $\beta$ - ciklodekstrin) proučavano je u svrhu povećanja topljivosti i nazalne apsorpcije melatonina (Babu, 2008). Utvrđeno je da je topljivost melatonina rasla linearno u ovisnosti o koncentraciji ciklodekstrina, što je pozitivno utjecalo i na nazalnu apsorpciju melatonina iz HPMC gela. Ispitivanje je provedeno *in vitro* na trodimenzionalnom tkivnom modelu EpiAirway<sup>TM</sup>.

S ciljem osiguranja brzog početka djelovanja i kontroliranog oslobađanja, a bez toksičnih učinaka na nazalnu sluznicu, Mao i suradnici (2004) razvili su škrobne mikrosfere. Brza apsorpcija ( $t_{max}$  7,8 min) i velika bioraspoloživost melatonina (84 %) zabilježeni su u zečeva nakon nazalne primjene. Usto, potvrđeno je produljeno zadržavanje čestica na nazalnoj sluznici (80 % čestica bilo je prisutno u nosnoj šupljini nakon dva sata), kao i produljeno oslobađanje *in vitro* (Mao i sur., 2004).

Proučavana je i direktna dostava melatonina iz nosne šupljine u mozak nakon nazalne primjene suspenzije mikroniziranog melatonina u gelu pripremljenom pomoću bioadhezivnih polimera (Carbopol, karboksimetilceluloza, polietilenglikol). Omogućeno je produljeno zadržavanje formulacije u nosnoj šupljini i bolja apsorpcija. U *in vitro* ispitivanju na trodimenzionalnom tkivnom modelu EpiAirway<sup>TM</sup> potvrđena je dobra permeabilnost melatonina, dok je u ispitivanju na štakorima dobivena 9 puta veća koncentracija melatonina u mozgu u odnosu na njegovu intravensku primjenu (Babu i sur., 2011).

## **1.5. Okularna primjena melatonina**

Od terapijskih nanosustava za okularnu primjenu melatonina, do sada su razvijene nanočestice pripravljene od kopolimera mliječne i glikolne kiseline te polietilenglikola (PLGA-PEG nanočestice; Musumeci i sur., 2013), čvrste lipidne nanočestice (Leonardi i sur., 2015), lecitinsko-kitozanske nanočestice i poloksamerske micele (Hafner i sur., 2015). Cilj razvoja takvih sustava je premostiti prepreke okularne primjene lijekova kao što su kratko

zadržavanje na površini oka uslijed treptanja, suzenja i nazolakrimalne drenaže te ograničena permeabilnost uslijed složene građe oka (Gaudana i sur., 2010).

Obzirom da je površina oka negativno nabijena, koloidni sustavi s pozitivno nabijenim česticama pokazuju bolju mukoadhezivnost i dulje zadržavanje na mjestu primjene (De Campos i sur., 2003; Rabinovich-Guilatt i sur., 2004). Musumeci i suradnici (2013) razvili su PLGA i PLGA-PEG nanočestice negativnog površinskog naboja (redom od -35 mV i -8,5 mV). Navedene nanočestice osigurale su produljeno oslobađanje i dugotrajniji učinak na povišeni intraokularni tlak u odnosu na otopinu melatonina, što se posebno odnosi na PLGA-PEG nanočestice. Hafner i suradnici (2015) razvili su lecitinsko-kitozanske nanočestice pozitivnog zeta-potencijala (22,5 mV). Proveli su i *in vitro* ispitivanje mukoadhezivnosti pripremljenih nanočestica. Usporedivši lecitinsko-kitozanske nanočestice s lecitinskim, potvrdili su pozitivan učinak kitozana na povećanje zeta-potencijala i poboljšanje mukoadhezivnih svojstava. Lecitinsko kitozanske nanočestice karakterizirane su sporijim oslobađanjem melatonina u odnosu na lecitinske nanočestice (Hafner i sur., 2015). S druge strane, kod poloksamerskih micela, dodatak kitozana ubrzao je oslobađanje. Autori su navedeno zapažanje objasnili drugačijim smještajem melatonina unutar micela i utjecajem kitozana na termodinamičku stabilnost micela. Permeabilnost melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica i micela poloksamera i kitozana preko staničnog modela epitela rožnice, bila je manja od permeabilnosti melatonina iz jednostavnih lecitinskih nanočestica i poloksamerskih micela. Ipak, lecitinsko-kitozanske nanočestice pokazale su potencijal za povećanje okularne bioraspoloživosti melatonina i produljenog učinka na povišeni očni tlak zahvaljujući mukoadhezivnosti i produljenom oslobađanju uklopljenog lijeka, koje je korelirano s profilom permeacije melatonina preko biološke barijere *in vitro* (Hafner i sur., 2015).

Čvrste lipidne nanočestice koje su razvili Leonardi i suradnici (2015) također su karakterizirane pozitivnim zeta-potencijalom (58 mV) osiguranim dodatkom kationskog lipida. S ciljem optimiranja svojstava lipidnih nanočestica, u njihovoj izradi korištene su i palmitinska ili stearinska kiselina. Naime, lipidne nanočestice s dodanim masnim kiselinama pokazale su sporije oslobađanje lijeka u odnosu na lipidne nanočestice bez masnih kiselina. Takav rezultat može se objasniti učinkom masnih kiselina na strukturu lipidnog matriksa nanočestica. U *in vivo* ispitivanju snižavanja očnog tlaka u zečeva, čvrste lipidne nanočestice s dodatkom palmitinske kiseline pokazale su najjači učinak (-7 mm Hg), 2 sata nakon primjene i s produljenim djelovanjem do 24 h.



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Melatonin je biogeni amin koji se nalazi u biljkama i životinjama. Kod sisavaca nastaje u epifizi, a na njegovu sintezu i sekreciju utječe količina svjetlosti. Tema je brojnih znanstvenih istraživanja jer utječe na cirkadijani ritam i san, pokazuje izražena antioksidativna svojstva, antitumorsko te imunostimulativno djelovanje. U literaturi se navodi njegova primjenjivost u liječenju kardiovaskularnih bolesti, gastroprotektivni učinak, utjecaj na izlučivanje hormona i reprodukciju, primjenjivost u liječenju neuroloških i psihičkih poremećaja te regulaciji tjelesne težine (Pavić i Zorc, 2013).

Melatonin se trenutno primjenjuje oralnim putem. No, bioraspoloživost oralno primijenjenog melatonina mala je i promjenjiva, zahvaljujući izraženom metabolizmu prvim prolaskom kroz jetru. Usto, melatonin se brzo izlučuje iz organizma ( $t_{1/2} < 45$  min) (Al-Omary, 2013, Dubey i sur., 2006). Stoga su suvremena istraživanja fokusirana na razvoj terapijskih sustava prikladnih za primjenu melatonina putem različitih sluznica i kože, s ciljem poboljšanja njegovih farmakokinetičkih svojstava i optimiranja njegovog sistemskog ili lokalnog učinka.

Cilj ovog rada bio je pripremiti nanočestice za topikalnu primjenu melatonina, sa zadovoljavajućim postotkom uklapanja melatonina i produljenim oslobađanjem. Za njihovu pripremu korišteni su lecitin s više od 94 % fosfatidilkolina, kationski lipid dimetil-dioktadecil-amonijev bromid i natrijev alginat.

Specifični ciljevi:

- Odrediti pravilan omjer sastavnica za pripremu lipidno-alginatnih nanočestica željenih svojstava
- Uspješno pripremiti nanočestice s uklopljenim melatoninom
- Odrediti veličinu, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal dobivenih nanočestica
- Odrediti uspješnost uklapanja melatonina
- Odrediti profil oslobađanja melatonina *in vitro*

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

- lecitin S100 (> 94 % fosfatidilkolina; Lipoid GmbH, Njemačka)
- dimetil-dioktadecil-amonijev bromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- natrijev alginat (NovaMatrix, Norveška)
- melatonin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- etanol 96 % (Kemig d.o.o., Hrvatska)
- natrijev klorid (Kemig d.o.o., Hrvatska)

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Razvoj lipidno-alginatnih nanočestica

##### *Priprava lecitinskih nanočestica*

Lectinske nanočestice dobivene su injektiranjem etanolne otopine lecitina u vodu. Etanolna otopina lecitina pripravljena je otapanjem 50 mg lecitina u 2 ml 96% etanola. Tako dobivena otopina injektirana je kroz iglu unutarnjeg promjera 0,75 mm u 23 ml pročišćene vode. Brzina injektiranja iznosila je dvije kapi u sekundi, a brzina magnetskog mješača 900 okretaja u minuti (najveća brzina pri kojoj ne dolazi do pjenjenja).

##### *Priprava pozitivno nabijenih lipidnih nanočestica*

Lipidne nanočestice dobivene su injektiranjem etanolne otopine lecitina i dimetil-dioktadecil-amonijevog bromida u vodu. Etanolna otopina kationskog lipida dimetil-dioktadecil-amonijevog bromida (DDAB) pripremljena je otapanjem 10 mg DDAB u 1 ml 96% etanola. Ovisno o željenoj količini kationskog lipida u lipidnim nanočesticama, različiti volumeni tako dobivene otopine sjedinjeni su s odgovarajućim volumenom etanolne otopine lecitina dobivene otapanjem 50 ml lecitina u 96% etanolu, tako da ukupni volumen etanolne otopine iznosi 2 ml (Tablica 2). Dobivena etanolna otopina lipida injektirana je kroz iglu unutarnjeg promjera 0,75 mm brzinom od dvije kapi u sekundi u 23 ml pročišćene vode, uz miješanje magnetskim mješačem (900 okr/min).

**Tablica 2:** Sastav etanolnih otopina lipida (količina lecitina i DDAB u 2 ml 96% etanola) korištenih za izradu lipidnih nanočestica

Uzorak	LK1	LK2	LK3	LK4	LK5	LK6	LK7	LK8
Lecitin (mg)	50	50	50	50	50	50	50	50
DDAB (mg)	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	3	5

#### *Priprava lipidno-alginatnih nanočestica*

Lipidno-alginatne nanočestice pripravljene su injektiranjem etanolne otopine lecitina i DDAB u vodenu otopinu natrijevog alginata. Ishodna otopina natrijevog alginata pripravljena je otapanjem 10 mg natrijevog alginata u 1 ml pročišćene vode. Ovisno o ciljnoj koncentraciji alginata u razrijeđenoj vodenoj otopini, različiti alikvoti ishodne otopine dopunjeni su pročišćenom vodom do 23 ml. U tako razrijeđenu vodenu otopinu natrijevog alginata injektirana je etanolna otopina lecitina i DDAB, kroz iglu unutarnjeg promjera 0,75 mm, brzinom od dvije kapi u sekundi, uz miješanje magnetskim mješačem (900 okr/min). Sastav otopina korištenih za izradu lipidno-alginatnih nanočestica prikazan je u Tablici 3.

**Tablica 3:** Sastav otopina korištenih za izradu lipidno-alginatnih nanočestica

	Uzorak	LAK1	LAK2	LAK3	LAK4	LAK5	LAK6
Etanolna otopina (2 ml)	Lecitin (mg)	50	50	50	50	50	50
	DDAB (mg)	0,7	0,7	0,7	1	3	5
Vodena otopina (23 ml)	Natrijev alginat (mg)	1	3	5	5	5	5

#### **3.2.2. Karakterizacija nanočestica**

Nanočestice su okarakterizirane veličinom, raspodjelom veličina i nabojem. Navedena svojstva određena su fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*; PCS) korištenjem uređaja Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Velika Britanija).

Mjerenja veličine i polidisperznosti nanočestica provedena su pri temperaturi od 25°C. Neposredno prije mjerenja, suspenzije nanočestica razrijeđene su pročišćenom vodom u

omjeru 1:4, a prilikom injektiranja u uređaj bilo je potrebno obratiti pozornost da ne dođe do nastanka mjehurića zraka. Određivanje veličine temeljeno je na mjerenju intenziteta svjetlosti raspršene na česticama. Čestice su obasjane monokromatskom koherentnom 10 mW He-Ne laserskom zrakom ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ), a intenzitet raspršene svjetlosti mjeren je pod kutom od  $90^\circ$ .

Mjerenja zeta-potencijala provedena su pri temperaturi od  $25^\circ\text{C}$ , a prije mjerenja suspenzija nanočestica je razrijeđena vodenom otopinom natrijevog klorida (10 mM) u omjeru 1:4. Određivanje zeta-potencijala temeljeno je na indirektnom mjerenju elektroforetske pokretljivosti čestica korištenjem 10 mW He-Ne lasera.

### 3.2.3. Priprava lipidno-alginatnih nanočestica s melatoninom

Etanolna otopina lecitina i DDAB pripremljena je kao što je opisano u odlomku 3.2.1. U njoj je otopljen melatonin, te je dobivena otopina injektirana kroz iglu unutarnjeg promjera 0,75 mm u vodenu otopinu natrijevog alginata brzinom od dvije kapi u sekundi, uz miješanje magnetskim mješačem (900 okr/min). Sastav otopina upotrebljenih za izradu lipidno-alginatnih nanočestica s melatoninom prikazan je u Tablici 4.

**Tablica 4.** Sastav otopina korištenih za izradu lipidno-alginatnih nanočestica s melatoninom

	Uzorak	MLAK1	MLAK2	MLAK3	MLAK4
Etanolna otopina (2ml)	Lecitin (mg)	50	50	50	50
	DDAB (mg)	0,7	1	3	5
	Melatonin (mg)	10	10	10	10
Vodena otopina (23 ml)	Natrijev alginat (mg)	5	5	5	5

### 3.2.4. Uspješnost uklapanja melatonina

Uspješnost uklapanja melatonina određena je metodom dijalize. Dijalizom se odvaja neuklopljena frakcija lijeka od uklopljene. Alikvot od 4 ml suspenzije nanočestica unesen je u dijalizacijsku vrećicu od celuloza acetata (Spectra/Por®, MW cut-off 12000-14000 Da, Medicell International Ltd, Velika Britanija), prethodno namočenu u pročišćenoj vodi. Prilikom zatvaranja vrećice, bilo je potrebno obratiti pozornost da ne dođe do ulaska zraka, kako dijalizacijska vrećica ne bi plutala u čaši. Napunjena vrećica uronjena je u 100 ml receptorskog medija (pročišćene vode) miješanog na magnetskom mješaču pri brzini od

150 okretaja u minuti. Za vrijeme dijalize čaša je prekrivena aluminijskom folijom zbog fotoosjetljivosti melatonina. U nultom vremenu i svakih sljedećih 10 minuta iz receptorskog medija uzet je uzorak volumena 2 ml, a receptorski medij nadopunjen s 2 ml pročišćene vode. Uzeti uzorci razrijeđeni su s 1 ml pročišćene vode, te im je izmjerena apsorbancija pri 278 nm UV-Vis spektrofotometrom (Cary 50, Varian Inc., SAD). Iz dobivenih podataka izračunata je koncentracija melatonina u uzorku. Postupak je ponavljan dok u uzastopnim uzorcima receptorske faze nisu izmjerene jednake koncentracije lijeka.

Uspješnost uklapanja lijeka izračunata je prema jednadžbi:

$$UU = ([\text{ukupni lijek}] - [\text{neuklopljeni lijek}]) / [\text{ukupni lijek}] \times 100$$

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

$$CM [\mu\text{gml}^{-1}] = ([\text{ukupni lijek}] - [\text{neuklopljeni lijek}]) / [\text{volumen suspenzije nanočestica}]$$

### **3.2.5. *In vitro* oslobađanje melatonina iz lipidno-alginatnih nanočestica**

Ispitivanje profila oslobađanja uklopljenog melatonina iz lipidno-alginatnih čestica provedeno je metodom dijalize. U postupak je uzeta suspenzija nanočestica koja je prethodno dijalizirana kako bi se odstranila neuklopljena frakcija lijeka. Alikvot od 2 ml suspenzije stavljen je u dijalizacijsku vrećicu od celuloza acetata (Spectra/Por® , MW cut-off 12 000 - 14 000 Da, Medicell International Ltd, Velika Britanija). Napunjena dijalizacijska vrećica stavljena je u 30 ml receptorskog medija (pročišćene vode) miješanog na magnetskom mješaču pri brzini od 150 okr/min. U određenim vremenskim intervalima iz receptorske faze uzimani su uzorci od 2 ml i nadomješteni s 2 ml pročišćene vode. Uzeti uzorci razrijeđeni su s 1 ml pročišćene vode, te im je izmjerena apsorbancija pri 278 nm UV-Vis spektrofotometrom. Iz dobivenih podataka izračunata je koncentracija melatonina u receptorskoj fazi u određenom trenutku, a grafičkim prikazom prikazan je profil oslobađanja lijeka iz nanočestica.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Priprava i karakterizacija nanočestica

#### 4.1.1. Lecitinske nanočestice

Lecitin je smjesa fosfolipida, triglicerida, masnih kiselina, ugljikohidrata i pigmenata. Konstituens je životinjskih i biljnih membrana, a njegov sastav ovisi o izvoru dobivanja i metodi ekstrakcije. Među njegovim sastavnicama najzastupljeniji su fosfolipidi, prvenstveno fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin i fosfatidilinozitol. Zbog svojih svojstava, koristi se kao emulgator, antioksidans, stabilizator, sredstvo za močenje i dodatak prehrani (Xu i sur., 2011). U ovom radu je korišten lecitin S100, dobiven iz soje, s udjelom fosfatidilkolina većim od 94 %.

Otapanjem 50 mg lecitina u 2 ml etanola, a zatim injektiranjem etanolne otopine u vodu, pripravljene su lecitinske nanočestice. Izmjerena im je veličina, a srednji promjer iznosi  $72,1 \pm 0,2$  nm. Isto tako, izmjeren je naboj čestica i on iznosi  $-5,0 \pm 2,7$  mV. Budući da su fosfatidilkolin i fosfatidiletanolamin bez naboja pri neutralnom pH, negativni naboj nanočestica pripisuje se fosfatidilinozitolu i ostalim anionskim komponentama (Xu i sur., 2011).

Slične nanočestice pripravljene su u drugom radu upotrebom lecitina S45 (Gomboc, 2017). Nanočestice su pripravljene istim postupkom i pri istoj koncentraciji lecitina u etanolnoj otopini (25 mg/ml). U odnosu na nanočestice pripravljene s lecitinom S100 u ovom radu, ove nanočestice bile su negativnijeg naboja ( $-20,1 \pm 8,7$  mV). Značajna razlika u naboju temelji se na različitom sastavu lecitina, prvenstveno udjelu anionskih komponenata.

#### 4.1.2. Lipidne nanočestice

Dimetil-dioktadecil-amonijev bromid (DDAB) je tetraalkil-amonijev spoj molekularne formule  $C_{38}H_{80}NBr$  i molekularne mase 630,95 g/mol. Sadrži dugi alkilni lanac koji mu daje lipofilna svojstva. Alkilni lanac omogućuje pripremu kationskih liposoma kao nosača lijekova koji mogu stupiti u elektrostatsku interakciju s negativno nabijenim strukturama/površinama. ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)). DDAB ima ulogu nositelja naboja. Dodaje se liposomima pripremljenima od fosfolipida s ciljem povećanja zeta-potencijala (Armaki i sur., 2016).

Lipidne nanočestice pripravljene su postupkom navedenim u prethodnom poglavlju. Stvaranje nanočestica omogućava lipofilnost DDAB i interakcija njegovog lipofilnog alkilnog lanca s lipofilnim segmentima fosfolipida. Nanočesticama su izmjerene veličina, polidisperznost i zeta-potencijal, a dobivene vrijednosti priložene su u Tablici 5.

**Tablica 5:** Veličina (srednji promjer), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta-potencijal lipidnih nanočestica.

Uzorak	DDAB:lecitin (m/m)	Srednji promjer (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)
LK1	0,5:50	60,6±0,8	0,800±0,019	9,1±1,0
LK2	0,6:50	68,8±1,9	0,440±0,045	9,1±1,2
LK3	0,7:50	49,2±2	0,506±0,034	11,5±1,8
LK4	0,8:50	44,5±2,7	0,468±0,025	11,0±2,3
LK5	0,9:50	40,4±2,1	0,521±0,048	8,6±1,8
LK6	1:50	38,9±1,4	0,502±0,016	22,8±1,8
LK7	3:50	47,1±9,8	0,477±0,080	31,9±1,9
LK8	5:50	237,5±169,1	0,990±0,018	55,0±4,4

Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3).

Iz dobivenih podataka vidljivo je da se dodatkom kationskog lipida formiraju nanočestice pozitivnijeg zeta-potencijala u odnosu na lecitinske nanočestice. Vrijednosti zeta-potencijala najviše su za LK7 i LK8 čestice koje imaju najveći omjer DDAB i lecitina (3:50 i 5:50).

Budući da su čestice pripravljene od lecitina S100 inicijalno imale manje negativan naboj u odnosu na nanočestice pripravljene od lecitina S45, potrebno je manje DDAB da dođe do konverzije naboja iz negativnog u pozitivni. Kod nanočestica s lecitinom S100, omjer DDAB i lecitina potreban za formiranje pozitivno nabijenih čestica iznosio je 0,5:50, dok je kod lecitina S45 omjer morao biti veći od 3:50 (Gomboc, 2017). Istraživanje koje su proveli Aramaki i suradnici (2016) ukazuje na pozitivan učinak kolesterola na povećanje zeta-potencijala nanočestica pripremljenih od lecitina i DDAB. U slučaju dodatka kolesterola u iznosu od 4 % mase svih lipidnih komponenata, bila je potrebna manja količina kationskog lipida za formiranje pozitivno nabijenih čestica (Aramaki i sur, 2016).

### 4.1.3. Lipidno-alginatne nanočestice

Alginat je anionski polimer prirodnog porijekla. Dobiva se ekstrakcijom iz smeđih algi *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* i *Macrocystis pyrifera*. Građen je kao linearni blok kopolimer sastavljen od  $\beta$ -D-manuronske i  $\alpha$ -L-guluronske kiseline međusobno povezanih (1-4) glikozidnom vezom. Zbog svoje biokompatibilnosti, niske toksičnosti, relativno jeftine proizvodnje i jednostavnih uvjeta geliranja, vrlo je zastupljen u istraživanju i proizvodnji biomedicinskih proizvoda (Lee i Mooney, 2012).

Injektiranjem etanolne otopine lecitina i DDAB u vodenu otopinu alginata dolazi do formiranja negativno nabijenih lipidno-alginatnih nanočestica. Taj postupak se zove ionotropno geliranje, a temelji se na elektrostatskoj interakciji između različito nabijenih iona. Ovisno o tome nalazi li se ion koji stvara vezu s polimerom izvan otopine polimera ili unutar otopine u inaktiviranom obliku, govorimo o vanjskom ili unutarnjem ionotropnom geliranju (Ahirrao i sur; 2013). U slučaju lipidno-alginatnih nanočestica, radi se o vanjskom inotropnom geliranju, gdje je polianion natrijev alginat u vodenoj otopini, a kation DDAB u lipidnoj smjesi.

Opsežno istraživani terapijski sustav pripremljen ionotropnim geliranjem su lecitinsko-kitozanske nanočestice kod kojih polikation kitozan stupa u elektrostatsku interakciju s negativnim komponentama lecitina. Nanočestice pripravljene pri malom omjeru kitozana i lecitina (1:80) imaju šuplju unutrašnjost veličine oko 70 nm, okruženu fosfolipidnim dvoslojem. S porastom omjera kitozana i lecitina (1:20) dolazi do formiranja većih čestica (od 110 do 220 nm) koje su karakterizirane višeslojnom strukturom građenom od fosfolipidnih dvoslojeva odvojenih vodom i kitozanom (Gerelli i sur; 2008). Obzirom da se formiranje lipidno-alginatnih nanočestica temelji na istom mehanizmu, i da su lecitinske i lipidno-alginatne nanočestice sličnih veličina kao i lecitinske odnosno lecitinsko-kitozanske nanočestice pripravljene u navedenom radu, može se pretpostaviti da je upravo takva višeslojna struktura zastupljena i kod lipidno-alginatnih nanočestica.

Lipidno-alginatne nanočestice uspješno su pripravljene, te su im izmjerene veličina, polidisperznost i zeta-potencijal, a dobivene vrijednosti priložene su u Tablici 6. Nanočestice LAK1, LAK2 i LAK3, pripremljene su pri konstantnom masenom omjeru DDAB i lecitina (0,7: 50), uz porast sadržaja alginata (maseni omjer lecitina i alginata iznosio je redom 50:1, 50:3, i 50:5). Veličina tako pripremljenih nanočestica kretala se u rasponu od  $108,3 \pm 1,5$  nm do



172,4±5,2 nm. S porastom sadržaja natrijevog alginata pojavljuje se trend snižavanja PDI koji je redom iznosio 0,836, 0,547 i 0,531. Zeta-potencijal nanočestica LAK2 i LAK3 bio je negativniji od zeta-potencijala nanočestica LAK1, što se može pripisati većem sadržaju alginata u sustavu. Kako se zeta-potencijal nanočestica LAK2 nije značajnije razlikovao od zeta-potencijala nanočestica LAK3, utjecaj daljnjeg povećanja sadržaja alginata na svojstva nanočestica nije ispitivan.

Nanočestice LAK3, LAK4, LAK5 i LAK6 pripravljene su pri jednakom masenom omjeru lecitina i alginata (50:5), ali različitim masenom omjeru DDAB i lecitina (0,7:50, 1:50, 3:50, 5:50). Značajni porast veličine nanočestica zabilježen je za uzorke pripravljene s većim sadržajem kationskog lipida (LAK5 i LAK6, redom 295,0±5,4 nm i 277,1±4,8 nm). Porast sadržaja kationskog lipida rezultirao je i smanjenjem naboja nanočestica, što se može objasniti intenzivnijom interakcijom smjese lipida s negativno nabijenim alginatom. Uzorak pripremljen s najvećim udjelom kationskog lipida i pri najvećem sadržaju alginata, LAK6, karakteriziran je najnegativnijim zeta-potencijalom (-30,6±1,0 mV) te najmanjim indeksom polidisperznosti (0,406).

**Tablica 6:** Veličina (srednji promjer), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta-potencijal lipidno-alginatnih nanočestica

Uzorak	DDAB:lecitin: alginat (m/m/m)	Srednji promjer (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)
LAK1	0,7:50:1	172,4±5,2	0,836±0,142	-0,2±1,4
LAK2	0,7:50:3	108,3±1,5	0,547±0,042	-15,6±0,2
LAK3	0,7:50:5	129,7±1,2	0,531±0,011	-16,0±0,4
LAK4	1:50:5	114,9±4,4	0,810±0,206	-19,5±0,3
LAK5	3:50:5	295,0±5,4	0,521±0,083	-24,9±0,6
LAK6	5:50:5	277,1±4,8	0,406±0,036	-30,6±1,0

Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3).

## 4.2. Priprava i karakterizacija lipidno-alginatnih nanočestica s melatoninom

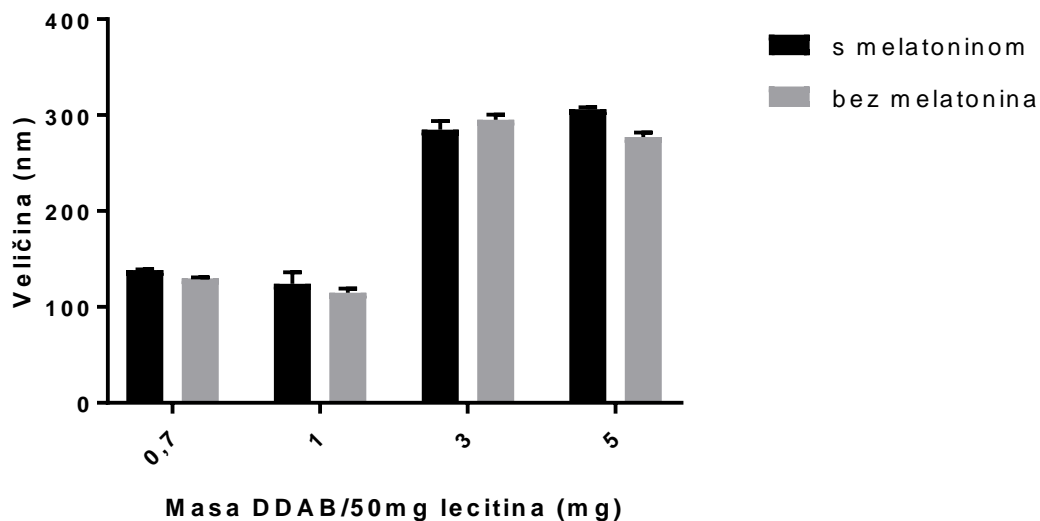
Melatonin je biogeni amin koji se nalazi u biljkama i životinjama. Kod sisavaca nastaje u epifizi, a na njegovu sintezu i sekreciju utječe količina svjetlosti. Tema je brojnih znanstvenih istraživanja jer utječe na cirkadijani ritam, pokazuje izražena antioksidativna svojstva, ispitivanja na stanicama pokazuju antitumorsko djelovanje te ima imunostimulativno djelovanje (Al-Omary, 2013). Suvremena istraživanja fokusirana su na razvoj raznovrsnih inovativnih terapijskih sustava prikladnih za uklapanje i primjenu melatonina putem različitih sluznica i kože, s ciljem poboljšanja njegovih farmakokinetičkih svojstava i optimiranja njegovog sistemskog ili lokalnog učinka. Jedan od ciljeva ovog diplomskog rada bio je ispitati prikladnost razvijenih lipidno-alginatnih nanočestica za uklapanje melatonina.

Na temelju rezultata iz prethodnih koraka razvoja sustava, za uklapanje melatonina odabrane su nanočestice LAK3, LAK4, LAK5 i LAK6, s masenim omjerom DDAB i lecitina od 0,7:50, 1:50, 3:50 i 5:50 te masenim omjerom lecitina i alginata 50:5. Odabrane nanočestice karakterizirane su zeta-potencijalom negativnijim od -16 mV, što doprinosi stabilnosti sustava. Sve nanočestice s uklopljenim melatoninom pripravljene su pri masenom omjeru melatonina i lecitina 1:5. Nanočestice su sastavljene od DDAB, lecitina, melatonina i alginata. Izmjereni su im veličina, polidisperznost i zeta-potencijal, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 7.

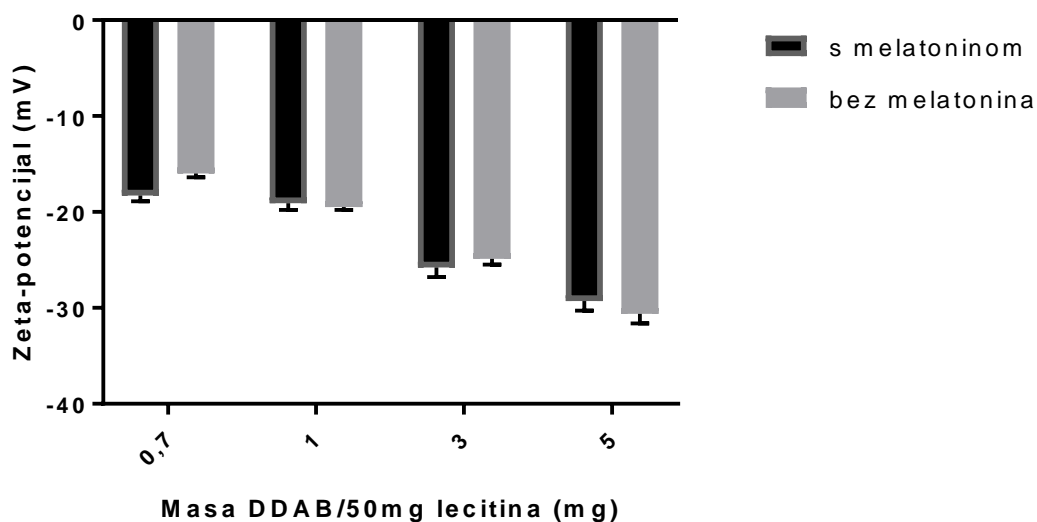
**Tablica 7:** Veličina (srednji promjer), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta-potencijal lipidno-alginatnih nanočestica s uklopljenim melatoninom (MLAK).

Uzorak	DDAB:lecitin (m/m)	Srednji promjer (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)
MLAK1	0,7:50	138,5 ± 0,5	0,617 ± 0,011	-18,3 ± 0,6
MLAK2	1:50	124,0 ± 12,2	0,765 ± 0,199	-19,1 ± 0,7
MLAK3	3:50	284,7 ± 9,2	0,550 ± 0,11	-25,8 ± 1,0
MLAK4	5:50	306,2 ± 2,0	0,386 ± 0,027	-29,3 ± 1,0

Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3).



**Slika 1:** Utjecaj uklapanja melatonina na veličinu lipidno-alginatnih nanočestica



**Slika 2:** Utjecaj uklapanja melatonina na zeta-potencijal lipidno-alginatnih nanočestica

Uklapanje melatonina u lipidno-alginatne nanočestice ne dovodi do značajnih promjena u veličini i naboju nanočestica, niti prisutne promjene pokazuju vidljivi trend (Slika 1 i 2).

### 4.3. Određivanje uspješnosti uklapanja melatonina u nanočestice

Uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice određena je nakon postupka dijalize. Dijalizom se osigurava da se neuklopljena frakcija lijeka odvoji od uklopljene. U slučaju da se u ovakav sustav želi uklopiti neki drugi lijek, postupak odvajanja može biti drugi; npr. filtriranje u slučaju da neuklopljeni lijek precipitira (Plantić, 2017).

Izračunom prethodno opisanim u odlomku 3.2.4. dobiveni su rezultati uspješnosti uklapanja i prikazani u Tablici 8.

**Tablica 8:** Uspješnost uklapanja i koncentracija uklopljenog melatonina u suspenziji nanočestica

Uzorak	DDAB:lecitin (m/m)	UU (%)	C (µg/ml)
MLAK1	0,7:50	23,0±2,0	92,0±8,1
MLAK2	1:50	28,2±1,3	112,8±5,3
MLAK3	3:50	28,1±2,2	108,3±7,0
MLAK4	5:50	32,1±1,0	129,7±4,7

UU- uspješnost uklapanja lijeka; C-koncentracija lijeka u suspenziji nanočestica.

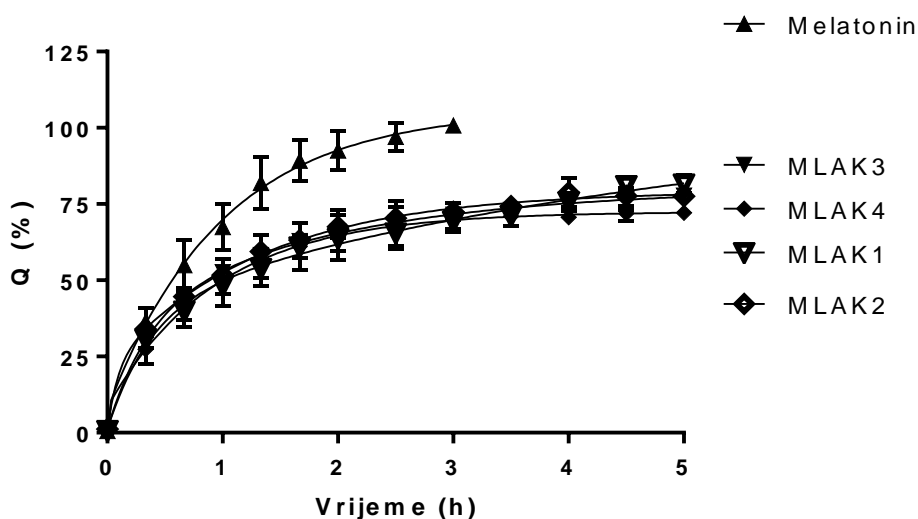
Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3).

Postignuto je zadovoljavajuće uklapanje melatonina u nanočestice. Najveći postotak uspješnosti uklapanja iznosi 32,1±1,0 % i vrijedi za MLAK4 nanočestice koji imaju najveći maseni omjer DDAB i lecitina (5:50). Koncentracija melatonina u toj suspenziji iznosila je 129,7±4,7 µg/ml. Dobivena vrijednost usporediva je s onom u lecitinsko-kitozanskim nanočesticama gdje je uspješnost uklapanja iznosila i 32,8 ± 4,8 %. (Belanović, 2015). Lecitinsko-alginatne nanočestice pripravljene istim postupkom u koje je uklapan deksametazon imale su veću uspješnost uklapanja (do 63,8 ± 1,6 %), što se pripisuje njegovoj većoj lipofilnosti u odnosu na melatonin (Plantić, 2017). Čestice koje imaju najveći postotak uklapanja su ujedno i najveće, što je u skladu s literaturnim navodima da veće čestice imaju multilamelarnu strukturu i ujedno veću sposobnost uklapanja lijeka (Gerelli i sur; 2008).

#### 4.4. Profil *in vitro* oslobađanja melatonina

Profil oslobađanja melatonina iz nanočestica određen je pomoću metode dijalize. Ta metoda se navodi kao najprikladnija za određivanje profila oslobađanja lijeka iz koloidnih terapijskih sustava (Modi i Anderson, 2013). Međutim, prikladna je samo za usporedbu profila oslobađanja *in vitro*, a ne i za predviđanje profila oslobađanja *in vivo*, s obzirom da ne simulira stvarne uvjete *in vivo* primjene.

Sve pripravljene nanočestice imaju približno jednak profil oslobađanja, a karakterizirane su produljenim oslobađanjem melatonina u odnosu na vodenu otopinu melatonina ( $t_{50\%}$  MLAK nanočestica iznosi 1 h, dok  $t_{50\%}$  vodene otopine 0,5 h). Profil oslobađanja uklopljenog lijeka prikazan je na Slici 3.



**Slika 3:** Profili *in vitro* oslobađanja melatonina iz lipidno-alginatnih nanočestica, određeni metodom dijalize. Usporedbe radi, prikazan je i profil difuzije melatonina iz otopine u receptorski medij. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija ( $n=3$ ).

Brzina oslobađanja melatonina iz lipidno-alginatnih nanočestica manja je od brzine oslobađanja melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica. Naime, lecitinsko-kitozanske nanočestice s uklopljenim melatoninom pripravljene s lecitinom S45 i kitozanom stupnja deacetilacije 86 % imaju  $t_{50\%}$  1,75 h (Belanović, 2015), dok kod nanočestica pripremljenih s

drugim vrstama kitozana različitog stupnja deacetilacije  $t_{50\%}$  iznosi 4-5 h (Blažević i Milekić, 2015). *In vitro* oslobađanje je u oba navedena rada provedeno s acetatnim puferom (pH 5,8) kao receptorskim medijem. Razlika u brzini oslobađanja može se objasniti razlikom u tipu lecitina i polimera korištenih u pripravi uspoređenih sustava, ali i razlikom u receptorskom mediju.

## 5. ZAKLJUČCI

- Uspješno su razvijene lipidno-alginatne nanočestice pripravljene od lecitina S100, kationskog lipida DDAB i natrijevog alginata.
- Lecitinske nanočestice pripravljene od lecitina S100 karakterizirane su negativnim zeta-potencijalom koji iznosi  $-5,0 \pm 2,7$  mV i veličinom od  $72,1 \pm 0,2$  nm.
- Maseni omjer DDAB i lecitina S100 potreban za formiranje pozitivno nabijenih lipidnih nanočestica iznosi 0,5:50.
- Lipidno-alginatne nanočestice karakterizirane su negativnim zeta-potencijalom koji se kreće od  $-0,2 \pm 1,4$  do  $-30,6 \pm 1,0$  mV, te veličinom od  $108,3 \pm 1,5$  do  $295,0 \pm 5,4$  nm.
- Omjer DDAB, lecitina i alginata utječe na veličinu i zeta-potencijal lipidno-alginatnih nanočestica.
- Za uklapanje melatonina odabrane su lipidno-alginatne nanočestice s masenim omjerom DDAB i lecitina od 0,7:50, 1:50, 3:50 i 5:50 te masenim omjerom lecitina i alginata 50:5. Odabrane nanočestice karakterizirane su zeta-potencijalom negativnijim od -16 mV.
- Uspješnost uklapanja melatonina u lipidno-alginatne nanočestice iznosila je od 23,8 % do 32,1 %.
- Nanočestice s najvećim omjerom DDAB i lecitina (5:50) karakterizirane su najvećom uspješnošću uklapanja, koja je rezultirala koncentracijom melatonina u suspenziji nanočestica od  $129,7 \pm 4,7$   $\mu\text{g/ml}$ .
- Lipidno-alginatne nanočestice karakterizirane su produljenim oslobađanjem melatonina.

## 6. LITERATURA

Ahirrao SP, Gide PS, Shrivastav B, Sharma P. Iontropic Gelation: A Promising Cross Linking Technique for Hydrogels. *Res Rev J Pharm Nanotechnol*, 2013, 2, [6 str].

Albertini B, di Sabatino M, Melegari C, Passerini N. Formulating SLMs as oral pulsatile system for potential delivery of melatonin to pediatric population. *Int J Pharmaceut*, 2014, 469, 67-79.

Al-Omary FAM. Melatonin: Comprehensive Profile. U: Profiles of Drug substances, Excipients and Related Methodology. Brittain HG, urednik, Amsteram, Elsevier, 2013, str. 159-226.

Andega S, Kanikkannan N, Singh M. Comparison of the effect of fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. *J Controlled Release*, 2001, 77, 17-25.

Aramaki K, Watanabe Y, Takahashi J, Tsuji Y, Ogata A, Konno Y. Charge boosting effect of cholesterol on cationic liposomes. *Colloid Surface A*, 2016, 506, 732–738.

Babu R, Dayal PP, Pawar K, Singh M. Nose-to-brain transport of melatonin from polymer gel suspensions: a microdialysis study in rats. *J Drug Target*, 2011, 9, 731-740

Babu R, Dayal P, Singh M. Effect of cyclodextrins on the complexation and nasal permeation of melatonin. *Drug Deliv*, 2008, 15, 381-388.

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

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

Blažević F, Milekić T. Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na cijeljenje rane *in vitro*. Studentski rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2015.

Blažević F, Milekić T, Romić MD, Juretić M, Pepić I, Filipović-Grčić J, Lovrić J, Hafner A. Nanoparticle-mediated interplay of chitosan and melatonin for improved wound epithelialisation. *Carbohydr Polym*, 2016, 146, 445-454.



Charão MF, Baierle M, Gauer B, Goethel G, Fracasso R, Paese K, Brucker N, Moro AM, Bubols GB, Dias BB, Matte US, Guterres SS, Pohlmann AR, Garcia SC. Protective effects of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat-induced cytotoxicity and genotoxicity in a pulmonary cell line. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015, 784, 1-9.

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

De Campos AM, Sanchez A, Gref R, Calvo P, Alonso MJ, The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. *Eur J Pharm Sci*, 2003, 20, 73–81.

Dubey V, Mishra D, Asthana A, Jain NK. Transdermal delivery of a pineal hormone: melatonin via elastic liposomes. *Biomaterials*, 2006, 27, 3491-3496.

Dubey V, Mishra D, Nahar M, Jain NK. Elastic liposomes mediated transdermal delivery of an anti-jet lag agent: preparation, characterization and *in vitro* human skin transport study. *Curr Drug Deliv*, 2008, 5, 199-206.

Dubey V, Mishra D, Jain NK. Melatonin loaded ethanolic liposomes: physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 67, 398-405.

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

El-Gibaly I. Development and *in vitro* evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. *Int J Pharm*, 2002, 249, 7–21.

El-Gibaly I, Meki AM, Abdel-Ghaffar SK. Novel B melatonin-loaded chitosan microcapsules: *in vitro* characterization and antiapoptosis efficacy for aflatoxin B1-induced apoptosis in rat liver. *Int J Pharm*, 2003, 260, 5-11.

Flo A, Calpena AC, Halbaut L, Araya EI, Fernández F, Clares B. Melatonin Delivery: Transdermal and Transbuccal Evaluation in Different Vehicles. *Pharm Res*, 2016, 33, 1615-1627.

Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. Ocular Drug Delivery. *AAPS J*, 2010, 12, 348-360.

Gerelli Y, Barbieri S, Di Bari MT, Deriu A, Cantu L, Brocca P, Sonvico F, Colombo P, May R, Motta S. Structure of self-organized multilayer nanoparticles for drug delivery. *Langmuir*, 2008, 24, 11378–11384.

Gomboc I. Razvoj lipidno-alginatnih nanočestica za nazalnu primjenu lipofilnih lijekova. Diplomski rad. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2017.

Guy RH. Transdermally Delivered Drugs. U: Drug delivery, Schäfer-Korting M, urednica, Berlin, Springer-Verlag, 2010, str. 399-410.

Hafner A, Dürriegl M, Pepić I, Filipović-Grčić J. Short- and long-term stability of lyophilised melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles. *Chem Pharm Bull*, 2011, 59, 1117-1123.

Hafner A, Lovrić J, Pepić I, Filipović-Grčić J, Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. *J Microencapsul*, 2011, 28, 807-815.

Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grčić J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm*, 2009, 381, 205-213.

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, Škrinjar D, Filipović-Grčić J. Mogućnosti nazalne primjene lijekova. *Farm glas*, 2014, 70, 303-321.

Hoffmeister RDC, Durli TL, Schaffazick SR, Raffin RP, Bender EA, Beck RCR, Pohlmann AR, Guterres SS. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. *Nanoscale Res Lett*, 2012, 7, 251-263.

Kanikkannan N, Andega S, Burton S, Babu RJ, Singh M. Formulation and *in vitro* evaluation of transdermal patches of melatonin. *Drug Dev Ind Pharm*, 2004, 30, 205-212.

Lee BJ, Choe JS, Kim CK. Preparation and characterization of melatonin-loaded stearyl alcohol microspheres. *J Microencapsul*, 1998, 15, 775-787.

Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*, 2012, 37, 106–126.

Leonardi A, Bucolo C, Drago F, Salomone S, Pignatello R. Cationic solid lipid nanoparticles enhance ocular hypotensive effect of melatonin in rabbit. *Int J Pharm*, 2015, 478, 180–186.

Li Y, Zhao X, Zu Y, Wang L, Wu W, Deng Y, Zu C, Liu Y. Melatonin-loaded silica coated with hydroxypropyl methylcellulose phthalate for enhanced oral bioavailability: Preparation, and *in vitro-in vivo* evaluation. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 112, 58-66.

Mao S, Chen J, Wei Z, Liu H, Bi D. Intranasal administration of melatonin starch microspheres. *Int J Pharm*, 2004, 272, 37-43.

Mihailiasa M, Caldera F, Li J, Peila R, Ferri A, Trotta F. Preparation of functionalized cotton fabrics by means of melatonin loaded  $\beta$ -cyclodextrin nanosponges. *Carbohydr Polym*. 2016, 142, 24-30.

Modi S, Anderson BD. Determination of drug release kinetics from nanoparticles: overcoming pitfalls of the dynamic dialysis method. *Mol Pharm*, 2013, 10, 3076–3089.

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

Nukulkit C, Priprem A, Damrongrungruang T, Benjavongkulchai E, Pratheepawanit N. Effect of polycaprolactone on *in vitro* release of melatonin encapsulated niosomes in artificial and whole saliva. *J Drug Delivery Sci Technol*, 2014, 24, 153-158.

Pardeshi CV, Belgamwar VS. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opin Drug Deliv*, 2013, 10, 957-972.

Pavić K, Zorc B. Melatonin. *Farm glas*, 2013, 4, 249-265.

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

Priano L, Esposti D, Esposti R, Castagna G, De Medici C, Fraschini F, Gasco MR, Mauro A. Solid lipid nanoparticles incorporating melatonin as new model for sustained oral and transdermal delivery systems. *J Nanosci Nanotechnol*, 2007, 10, 3596-3601.

Priprem A, Netweera V, Mahakunakorn P, Pratheepawanit NJ, Johns JR. Prolonged Anti-inflammatory Activity of Topical Melatonin by Niosomal Encapsulation. *Adv Mater Res*, 2014, 902, 70-75.

Product information, Dimethyldioctadecylammonium bromide, <http://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno 13.5.2017.

Rabinovich-Guilatt L, Couvreur P, Lambert G, Dubernet C. Cationic vectors in ocular drug delivery. *J Drug Target*, 2004, 12, 623–633.

Remiao MH, Lucas CG, Domingues WB, Silveira T, Barther NN, Komninou ER, Basso AC, Jornada DS, Beck RC, Pohlmann AR, Junior AS, Seixas FK, Campos VF, Guterres SS, Collares T. Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Repr Toxicol*, 2016, 63, 77-81.

Romić MD, Klarić MŠ, Lovrić J, Pepić I, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J, Hafner A. Melatonin-loaded chitosan/Pluronic® F127 microspheres as *in situ* forming hydrogel: An innovative antimicrobial wound dressing. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 107, 67-79.

Sabzichi M, Samadi N, Mohammadian J, Hamishehkar H, Akbarzadeh M, Molavi O. Sustained release of melatonin: A novel approach in elevating efficacy of tamoxifen in breast cancer treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 145, 64-71.

Sažetak opisa svojstava lijeka - Circadin 2 mg tablete s produljenim oslobađanjem <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 30.06.2017.

Schaffazick SR, Pohlmann AR, de Cordova CA, Creczynski-Pasa TB, Guterres SS. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. *Int J Pharm*, 2005, 289, 209-213.

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

Situ W, Song X, Luo S, Liang Y A nano-delivery system for bioactive ingredients using supercritical carbon dioxide and its release behaviors. *Food Chem*, 2017, 228, 219-225.

Tekbas OF, Ogur R, Korkmaz A, Kilic A, Reiter R, Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule. *J Pineal Res*, 2008, 44, 222-226.

Tursilli R, Casolari A, Iannuccelli V, Scalia S. Enhancement of melatonin photostability by encapsulation in lipospheres. *Pharm Biomed Anal*, 2006, 40, 910-914.

Volti LG, Musumeci T, Pignatello R, Murabito P, Barbagallo I, Carbone C, Gullo A, Puglisi G. Antioxidant potential of different melatonin-loaded nanomedicines in an experimental model of sepsis. *Exp Biol Med*, 2012, 237, 670-677.

Xu Q, Nakajima M, Liu Z, Shiina T. Biosurfactants for Microbubble Preparation and Application. *Int J Mol Sci*, 2011, 12, 472-474.

Zhang L, Zhang J, Ling Y, Chen C, Liang A, Peng Y, Chang H, Su P, Huang D. Sustained release of melatonin from poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres to induce osteogenesis of human mesenchymal stem cells in vitro. *J Pineal Res*, 2013, 54, 24-32.

Zhang W, Jiang P, Chen J, Zhu C, Mao Z, Gao C. Application of melatonin-loaded poly (N-isopropylacrylamide) hydrogel particles to reduce the toxicity of airborne pollutants to RAW264.7 cells. *J Colloid Interface Sci*, 2017, 490, 181-189.

## 7. SAŽETAK

Melatonin je hormon epifize s primarnom ulogom regulacije cirkadijanog ritma organizma. Usto, pokazuje izražena antioksidativna svojstva, antitumorsko te imunostimulativno djelovanje. Bioraspoloživost oralno primijenjenog melatonina mala je i promjenjiva, zahvaljujući izraženom metabolizmu prvim prolaskom kroz jetru. Usto, melatonin se brzo izlučuje iz organizma. Stoga su suvremena istraživanja fokusirana na razvoj terapijskih sustava prikladnih za primjenu melatonina putem različitih sluznica i kože, s ciljem poboljšanja njegovih farmakokinetičkih svojstava i optimiranja njegovog sistemskog ili lokalnog učinka.

Cilj ovog rada bio je pripremiti nanočestice za topikalnu primjenu melatonina, sa zadovoljavajućim postotkom uklapanja melatonina i produljenim oslobađanjem. Za njihovu pripremu korišteni su lecitin S100 (>94 % fosfatidilkolina), kationski lipid dimetil-dioktadecil-amonijev bromid (DDAB) i natrijev alginat.

Lipidno-alginatne nanočestice pripravljene su ionskom interakcijom negativno nabijenog natrijevog alginata i pozitivno nabijene smjese lecitina i DDAB. S ciljem optimiranja svojstava nanočestica, variran je maseni omjer DDAB, lecitina i natrijevog alginata u pripravi nanočestica. Lecitinske nanočestice pripravljene od lecitina S100 karakterizirane su negativnim zeta-potencijalom koji iznosi  $-5,0 \pm 2,7$  mV, te veličinom od  $72,1 \pm 0,2$  nm. Dodatak kationskog lipida DDAB u masenom omjeru prema lecitinu 0,5:50 rezultirao je formiranjem nanočestica pozitivnog naboja. Lipidno-alginatne nanočestice karakterizirane su negativnim zeta-potencijalom u rasponu od  $-0,2 \pm 1,4$  do  $-30,6 \pm 1,0$  mV, te veličinom od  $108,3 \pm 1,5$  do  $295,0 \pm 5,4$  nm. Na njihovu veličinu i zeta-potencijal utjecao je maseni omjer DDAB, lecitina i natrijevog alginata. Za uklapanje melatonina odabrane su lipidno-alginatne nanočestice s omjerom DDAB i lecitina od 0,7:50, 1:50, 3:50 i 5:50 te masenim omjerom lecitina i alginata 50:5. Odabrane nanočestice karakterizirane su zeta-potencijalom negativnijim od -16 mV. Uspješnost uklapanja melatonina iznosila je od 23,8 do 32,1 %. Nanočestice s najvećim omjerom DDAB i lecitina (5:50) karakterizirane su najvećom uspješnošću uklapanja, koja je rezultirala koncentracijom melatonina u suspenziji nanočestica od  $129,7 \pm 4,7$  µg/ml. Lipidno-alginatne nanočestice karakterizirane su produljenim oslobađanjem melatonina.

## SUMMARY

Melatonin is a pineal gland neurohormone, with primary role in regulation of circadian rhythm. In addition, it has prominent antioxidative, anticancer and immunostimulative properties. Melatonin oral bioavailability is low and variable, owing to excessive first pass metabolism. Moreover, it is rapidly eliminated from the body. Therefore, current investigations are focused on development of drug delivery systems suitable for topical melatonin application on mucosa and skin, with the aim to enhance its pharmacokinetic properties and optimize its systemic or local effect.

The aim of this study was to prepare nanoparticles for topical melatonin delivery, with sufficient melatonin entrapment and prolonged release. In their preparation, lecithin (>94% phosphatidylcholine), cationic lipid dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB) and sodium alginate were used.

Lipid/alginate nanoparticles were prepared by ionic interaction between negatively charged alginate and positively charged lipid mixture of lecithin and DDAB. With the aim to optimize the properties of nanoparticles, the weight ratios of DDAB and sodium alginate to lecithin were varied. Lecithin nanoparticles prepared with lecithin S100 were characterized by negative zeta-potential ( $-5.0 \pm 2.7$  mV) and mean diameter of  $72.1 \pm 0.2$  nm. The addition of cationic lipid DDAB in weight ratio to lecithin of 0.5:50 resulted in the formation of positively charged nanoparticles. Lipid-alginate nanoparticles were characterized by negative zeta-potential ranging between  $-0.2 \pm 1.4$  and  $-30.6 \pm 1.0$  mV, and mean diameter in range of  $108.3 \pm 1.5$  -  $295.0 \pm 5.4$  nm. Nanoparticle size and zeta-potential were influenced by DDAB and alginate to lecithin weight ratios. Lipid-alginate nanoparticles prepared with DDAB to lecithin weight ratio of 0.7:50, 1:50, 3:50 and 5:50, and lecithin to alginate weight ratio of 50:5, were selected for the entrapment of melatonin. The selected nanoparticles were characterized by the zeta-potential  $< -16$  mV. Melatonin entrapment efficiency ranged between 23.8 and 32.1%. The highest entrapment efficiency was observed for the nanoparticles prepared with the highest DDAB to lecithin weight ratio (5:50), that resulted in melatonin concentration within the suspension of nanoparticles of  $129.7 \pm 4.7$   $\mu\text{g/ml}$ . Lipid/alginate nanoparticles were characterized by prolonged melatonin release.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### RAZVOJ LIPIDNO-ALGINATNIH NANOČESTICA ZA TOPIKALNU PRIMJENU MELATONINA

Ivan Čunčić

#### SAŽETAK

Melatonin je hormon epifize s primarnom ulogom regulacije cirkadijanog ritma organizma. Usto, pokazuje izražena antioksidativna svojstva, antitumorsko te imunostimulativno djelovanje. Bioraspoloživost oralno primijenjenog melatonina mala je i promjenjiva, zahvaljujući izraženom metabolizmu prvim prolaskom kroz jetru. Usto, melatonin se brzo izlučuje iz organizma. Stoga su suvremena istraživanja fokusirana na razvoj terapijskih sustava prikladnih za primjenu melatonina putem različitih sluznica i kože, s ciljem poboljšanja njegovih farmakokinetičkih svojstava i optimiranja njegovog sistemskog ili lokalnog učinka.

Cilj ovog rada bio je pripremiti nanočestice za topikalnu primjenu melatonina, sa zadovoljavajućim postotkom uklapanja melatonina i produljenim oslobađanjem. Za njihovu pripremu korišteni su lecitin S100 (>94 % fosfatidilkolina), kationski lipid dimetil-dioktadecil-amonijev bromid (DDAB) i natrijev alginat.

Lipidno-alginatne nanočestice pripravljene su ionskom interakcijom negativno nabijenog natrijevog alginata i pozitivno nabijene smjese lecitina i DDAB. S ciljem optimiranja svojstava nanočestica, variran je maseni omjer DDAB, lecitina i natrijevog alginata u pripravi nanočestica. Lecitinske nanočestice pripravljene od lecitina S100 karakterizirane su negativnim zeta-potencijalom koji iznosi  $-5,0 \pm 2,7$  mV, te veličinom od  $72,1 \pm 0,2$  nm. Dodatak kationskog lipida DDAB u masenom omjeru prema lecitinu 0,5:50 rezultirao je formiranjem nanočestica pozitivnog naboja. Lipidno-alginatne nanočestice karakterizirane su negativnim zeta-potencijalom u rasponu od  $-0,2 \pm 1,4$  do  $-30,6 \pm 1,0$  mV, te veličinom od  $108,3 \pm 1,5$  do  $295,0 \pm 5,4$  nm. Na njihovu veličinu i zeta-potencijal utjecao je maseni omjer DDAB, lecitina i natrijevog alginata. Za uklapanje melatonina odabrane su lipidno-alginatne nanočestice s omjerom DDAB i lecitina od 0,7:50, 1:50, 3:50 i 5:50 te masenim omjerom lecitina i alginata 50:5. Odabrane nanočestice karakterizirane su zeta-potencijalom negativnijim od -16 mV. Uspješnost uklapanja melatonina iznosila je od 23,8 do 32,1 %. Nanočestice s najvećim omjerom DDAB i lecitina (5:50) karakterizirane su najvećom uspješnošću uklapanja, koja je rezultirala koncentracijom melatonina u suspenziji nanočestica od  $129,7 \pm 4,7$  µg/ml. Lipidno-alginatne nanočestice karakterizirane su produljenim oslobađanjem melatonina.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 3 grafička prikaza, 8 tablica i 61 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Lecitin; Alginat; Melatonin; Nanočestice; Produljeno oslobađanje

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

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

**Dr. sc. Jasmina Lovrić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2017.



## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### DEVELOPMENT OF LIPID/ALGINATE NANOPARTICLES FOR TOPICAL MELATONIN DELIVERY

Ivan Čunčić

#### SUMMARY

Melatonin is a pineal gland neurohormone, with primary role in regulation of circadian rhythm. In addition, it has prominent antioxidative, anticancer and immunostimulative properties. Melatonin oral bioavailability is low and variable, owing to excessive first pass metabolism. Moreover, it is rapidly eliminated from the body. Therefore, current investigations are focused on development of drug delivery systems suitable for topical melatonin application on mucosa and skin, with the aim to enhance its pharmacokinetic properties and optimize its systemic or local effect.

The aim of this study was to prepare nanoparticles for topical melatonin delivery, with sufficient melatonin entrapment and prolonged release. In their preparation, lecithin (>94% phosphatidylcholine), cationic lipid dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB) and sodium alginate were used.

Lipid/alginate nanoparticles were prepared by ionic interaction between negatively charged alginate and positively charged lipid mixture of lecithin and DDAB. With the aim to optimize the properties of nanoparticles, the weight ratios of DDAB and sodium alginate to lecithin were varied. Lecithin nanoparticles prepared with lecithin S100 were characterized by negative zeta-potential ( $-5.0 \pm 2.7$  mV) and mean diameter of  $72.1 \pm 0.2$  nm. The addition of cationic lipid DDAB in weight ratio to lecithin of 0.5:50 resulted in the formation of positively charged nanoparticles. Lipid-alginate nanoparticles were characterized by negative zeta-potential ranging between  $-0.2 \pm 1.4$  and  $-30.6 \pm 1.0$  mV, and mean diameter in range of  $108.3 \pm 1.5$  -  $295.0 \pm 5.4$  nm. Nanoparticle size and zeta-potential were influenced by DDAB and alginate to lecithin weight ratios. Lipid-alginate nanoparticles prepared with DDAB to lecithin weight ratio of 0.7:50, 1:50, 3:50 and 5:50, and lecithin to alginate weight ratio of 50:5, were selected for the entrapment of melatonin. The selected nanoparticles were characterized by the zeta-potential  $< -16$  mV. Melatonin entrapment efficiency ranged between 23.8 and 32.1%. The highest entrapment efficiency was observed for the nanoparticles prepared with the highest DDAB to lecithin weight ratio (5:50), that resulted in melatonin concentration within the suspension of nanoparticles of  $129.7 \pm 4.7$   $\mu\text{g/ml}$ . Lipid/alginate nanoparticles were characterized by prolonged melatonin release.

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

Thesis includes: 35 pages, 3 figures, 8 tables and 61 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Lecithin; Alginate; Melatonin; Nanoparticles; Prolonged release

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

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

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

The thesis was accepted: July 2017.

