Liofilizacija lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom

Habuš, Vedrana

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:163:340604

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Vedrana Habuš

Liofilizacija lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Veliko hvala mentorici, izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner, na pruženoj prilici, izuzetnoj predanosti, nesebičnim savjetima i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, ali i svim djelatnicima Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta koji su svojim radom doprinjeli stjecanju mog znanja u struci.

Zahvaljujem se obitelji i prijateljima koji su mi bili podrška tijekom mog cijelokupnog obrazovanja.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Nanočestice 1

1.1.1. Lipidno-polimerne hibridne nanočestice 1

1.1.2. Deksametazon 2

1.2. Liofilizacija 3

1.2.1. Povijesni pregled 3

1.2.2. Mehanizam liofilizacije i aparatura liofilizatora 3

1.2.3. Optimizacija liofilizacije 7

1.2.4. Prednosti i nedostaci liofilizacije koloidnih sustava 10

1.3. Krio/lioprotektori 10

1.3.1. Svrha korišetnja 10

1.3.2. Mehanizam djelovanja 11

1.3.3. Krio/lioprotektori u upotrebi 11

1.3.4. Faktori koji utječu na djelotvornost krio/lioprotektora 15

2. OBRAZLOŽENJE TEME 16

3. MATERIJALI I METODE 18

3.1. Materijali 18

3.2. Metode 18

3.2.1. Priprava nanočestica 18

3.2.2. Određivanje veličine nanočestica 20

3.2.3. Određivanje zeta-potencijala nanočestica 21

3.2.4. Priprema uzorka za liofilizaciju 21

3.2.5. Liofilizacija 21

3.2.6. Rekonstitucija liofiliziranog uzorka 22

3.2.7. Karatkerizacija rekonstituirane suspenzije nanočestica 22

4. REZULTATI I RASPRAVA 23

4.1. Priprava i karakterizacija lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom 23

4.2. Utjecaj vrste i koncentracije krio/lioprotektora na fizička svojstva nanočestica poslije liofilizacije 25

4.3. Utjecaj tipa lecitina na fizička svojstva nanočestica poslije liofilizacije 31

4.4. Utjecaj masenog omjera kationskog lipida i lecitina na fizička svojstva nanočestica poslije liofilizacije 32
5. ZAKLJUČCI 35
6. LITERATURA 36
7. SAŽETAK 42
Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card

1. UVOD

1.1. Nanočestice

Nanočestice su čestice s rasponom veličina od 10 do 1000 nm (Mohanraj i Chen, 2006). Posljednjih par desetljeća sve se intenzivnije istražuju kao nosači lijeka odnosno terapijski sustavi koji omogućuju ciljanu/lokaliziranu dostavu i kontrolirano oslobađanje lijeka (Mehnert i Mäder, 2001). Ciljanom dostavom povećava se terapijski učinak lijeka, a smanjuju se njegove nuspojave. Kontroliranim oslobađanjem lijeka optimira se farmakokinetički i sigurnosni profil lijeka i smanjuje učestalost doziranja. Kod dizajniranja nanočestica trebaju biti pomno razmotreni sljedeći parametri: veličina i svojstva površine nanočestica te oslobađanje lijeka iz nanočestica (Soppimath i sur., 2001).

Veličina i polidisperznost nanočestica najvažnija su svojstva takvih sustava. O njima ovise raspodjela, sudbina i toksičnost nanočestica te sposobnost ciljane dostave lijeka. Isto tako veličina i polidisperznost nanočestica utječu i na uklapanje, oslobađanje i stabilnost uklopljenog lijeka. Najvažnije svojstvo površine je naboj nanočestica, a najčešće se iskazuje zeta-potencijalom (ζ). To je električni potencijal koji je odraz sastava nanočestica i medija u kojemu su dispergirane. Kod niskog zeta-potencijala ($|\zeta| < 30$ mV) nanočestice su nestabilne te može doći do njihove agregacije (Mohanraj i Chen, 2006).

Uz višestruke prednosti nanočestica kao novih terapijskih sustava, najveće ograničenje primjene je njihova fizička i kemijska nestabilnost (primjerice, agregacija i hidroliza; Chacón i sur., 1999). Mala veličina nanočestica može biti ograničavajući čimbenik za uklapanje lijeka, a može dovesti i do naglog oslobađanja lijeka (Mohanraj i Chen, 2006). Različiti fizički i kemijski čimbenici mogu destabilizirati koloidni sustav pa tako nanočestice pokazuju slabu dugotrajnu stabilnost koja je bitna kod skladištenja, a naročito u vodenim suspenzijama. Iz navedenih razloga sušenjem se može postići veća stabilnost sustava. Kao jedna od najboljih tehnika sušenja suspenzija nanočestica pokazala se liofilizacija.

1.1.1. Lipidno-polimerne hibridne nanočestice

U novije vrijeme počele su se istraživati lipidno-polimerne hibridne nanočestice (LPN) koje imaju svojstva i liposoma (biokompatibilnost) i polimernih nanočestica (stabilnost tijekom skladištenja, kontrolirano oslobađanje te ciljana dostava lijeka) (Hadinoto i sur.,

2013). LPN su nanonosači lijekova sastavljeni od lipida i polimera. Postoje dva tipa LPN: monolitni matriks u kojem je kompleks lijeka i polimera dispergiran u lipidnoj fazi (engl. *monolithic matrix* PLN) i LPN s jezgrom obloženom ovojnicom (engl. *core-shell* LPN) (Zhang i sur., 2016). Upravo takva hibridna stuktura nanočestica omogućuje brojne pogodnosti - kontroliranu veličinu čestica, funkcionalnost površine, visok kapacitet uklapanja lijeka, uklapanje više djelatnih tvari, kontrolirano oslobađanje i dobru stabilnost u serumu (Mandal i sur., 2013).

Hibridne nanočestice istražuju se u genskoj terapiji, kemoterapiji i imunoterapiji (Mandal i sur, 2013). Primjerice, Zeng i suradnici su istraživali LPN s jezgrom od kolne kiseline i omotačem od lecitina s uklopljenim paklitakselom i celekoksibom da bi postigli sinergistički učinak navedenih lijekova s ciljem prevladavanja rezistencije karcinoma na terapiju (Zeng i sur., 2017). Također, Mandal i suradnici istraživali su LPN pripravljene od polikaprolaktona kao biorazgradljivog polimera koji je sačinjavao jezgru, i fosfolipidnog omotača, za dostavu erlotiniba u liječenju raka pluća ne-malih stanica (Mandal i sur., 2016).

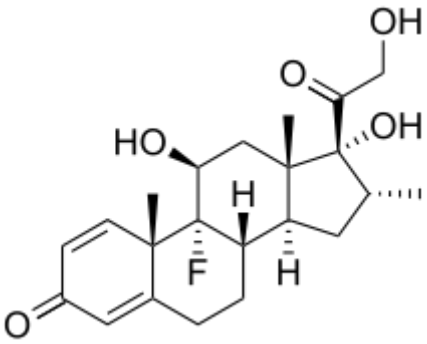
Rose i suradnici istraživali su novi oblik adjuvansa kod cjepiva da bi inducirali staničnu i humoralnu imunost. Pripravili su hibridne nanočestice iz lipida i poli(laktid-ko-glikolne) kiseline (PLGA) s kationskim surfaktantom dimetildioktadecilamonij-bromidom i imunopotencirajućom trehaloza-6,6'-dibehenatom (Rose i sur, 2015). Liu i suradnici su također pripravili hibridne nanočestice lipida i PLGA da bi istražili kako metoda uklapanja lijeka utječe na izloženost antigena imunosnom sustavu (Liu i sur., 2015).

Zbog potrebe za anestetikom s produljenim lokalnim djelovanjem, a malom sistemskom apsorpcijom, Ma i suradnici pripravili su i evaluirali LPN s bupivakainom sastavljene od PLGA, lecitina i 1,2-disteroli-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin (DSPE) – polietilen glikola 2000 (PEG_{2000}) (Ma i sur., 2017).

1.1.2. Deksametazon

Deksametazon (Slika 1.) je sintetski kortikosteroid koji oponaša djelovanje prirodnih glukokortikoida kore nadbubrežne žlijezde. U Republici Hrvatskoj trenutno postoji 17 gotovih lijekova s djelatnom tvari deksametazon u različitim farmaceutskim oblicima i dozama. Terapijske indikacije navedenog lijeka vrlo su široke, koristi se u dermatolgiji (*Pemphigus vulgaris*), imunologiji i reumatologiji (miozitis), hematologiji (idiopatska trombocitopenija

purpura), onkologiji (metastatska kompresija kralježnične moždine), neurologiji (moždani edem uzrokovan tumorom mozga), pulmologiji (akutne egzacebracije astme), infektologiji (tuberkulozni meningitis), endokrinologiji (subakutni tiroiditis), oftamologiji (akutni središnji korioretinitis) i u mnogim drugima (www.halmed.hr).



Slika 1. Struktura deksametazona

1.2. Liofilizacija

1.2.1. Povijesni pregled

Već su drevne civilizacije prepoznale značaj sušenja smrzavanjem. Inke su tu tehniku koristile za čuvanje mesa - smrznuto meso na rijetkom planinskom zraku (niski tlak) su otparavali (dehidratacija) pod utjecajem Sunčeva zračenja (izvor topline). Korist ove tehnike prepoznata je i koristi se i danas. Tehnika je prvi puta službeno opisana 1906. god., a 1935. god. dobiva naziv liofilizacija prema grčkom *lyophile* što znači "kao otopina" čime se htjela naglasiti mogućnost rehidratacije suhog uzorka. Tijekom Drugog svijetskog rata zbog potrebe za ljudskom plazmom na bojištima, liofilizacija je iz laboratorija prešla u masovnu upotrebu (Rey i May, 2010).

1.2.2. Mehanizam liofilizacije i aparatura liofilizatora

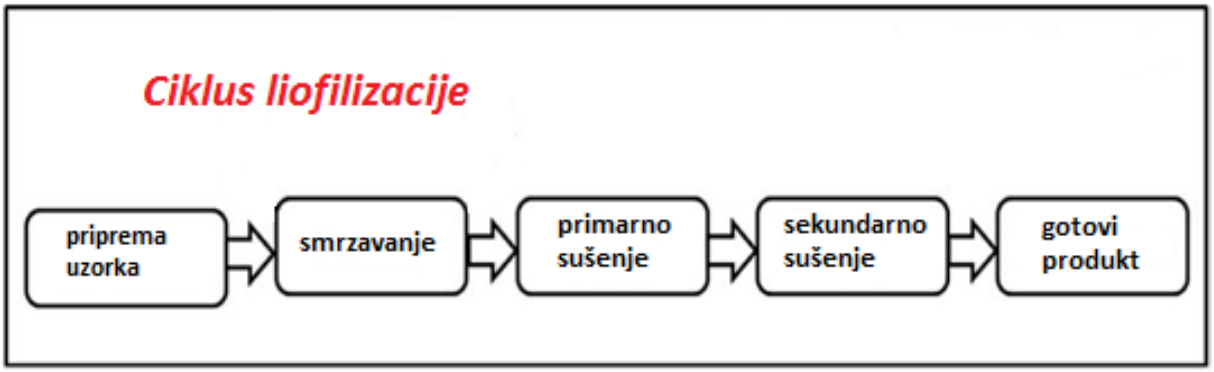
Liofilizacija je postupak sušenja materijala koji se provodi u tri faze: smrzavanje materijala, primarno sušenje (sublimacija) i sekundarno sušenje (desorpcija) (Slika 2.). Uklanjanjem vode iz uzorka mogu se poboljšati fizička i kemijska stabilnost uzorka (Abdelwahed i sur., 2006a). Postupak je primjenjiv pri sušenju uzoraka koji sadrže veliku količinu vode, kod uzoraka koji sadrže tvari podložne hidrolizi i/ili termolabilne tvari pa se

voda ne može ukloniti konvencionalnim metodama (Muzzio i Dini, 2011). Liofilizacija se primjenjuje u različitim granama industrije od kemijske, biotehnološke i prehrambene pa sve do farmaceutske industrije.

Proces liofilizacije nalazi široku primjenu pri proizvodnji/oblikovanju farmaceutika kao što su cjepiva, proteini, peptidi, virusi i koloidni nosači (Abdelwahed i sur., 2006a). Liofilizirani produkt odlikuje se većom i dugotrajnijom stabilnošću što omogućava njegovo skladištenje pri sobnoj temperaturi i/ili kroz dulji vremenski period.

Sam proces liofilizacije može biti vrlo stresan za uzorak te je stoga potrebno optimirati formulacijske i procesne parametre, kako bi se dobio liofilizat željenih svojstava.

Proces liofilizacije sastoji se od tri koraka. Prvi korak odnosi se na smrzavanje uzorka, najčešće pri temperaturi nižoj od -40 °C (Abdelwahed i sur., 2006a). Drugi korak je primarno sušenje zamrznutog uzorka koje se temelji na sublimaciji – prelasku leda u vodenu paru pri uvjetima sniženog tlaka i temperature. Naime, u komori za sušenje se snizi tlak skoro do vakuma i dovede tek toliko topline koliko je potrebno za sublimaciju leda. Nakon primarnog sušenja slijedi sekundarno sušenje, tj. desorpcija zaostale vode koja tijekom smrzavanja nije prešla u led. Sekundarno sušenje provodi se pri sobnoj ili povišenim temperaturama, dok se ne dobije produkt s prihvatljivim sadržajem ostatne vlage (Muzzio i Dini, 2011).



Slika 2. Shematski prikaz liofilizacijskog ciklusa (Prilagođeno iz Nireesha i sur., 2013)

Smrzavanje

Snižavanjem temperature tekući uzorak prelazi u kruto stanje, bilo kristalno, amorfno ili kombinaciju kristalnog i amorfnog stanja, a voda iz uzorka prelazi u led. Temperatura smrzavanja treba biti jednaka ili niža od eutektične točke uzorka. Uzorak smrzavanjem gubi vodu jer ona prelazi u led te postaje sve više koncentriran i viskozan (Abdelwahed i sur., 2006a; Kasper i Friess, 2011). Ekspanzija volumena koja nastaje smrzavanjem zbog anomalije vode uzrokuje mehaničko naprezanje. Također se javlja i osmotsko naprezanje zbog naglog povećanja koncentracije uzorka. Dio vode ipak se ne zaledi te ostane u porama uzorka. Postupak smrzavanja odvija se pri atmosferskom tlaku (Rey i May, 2010).

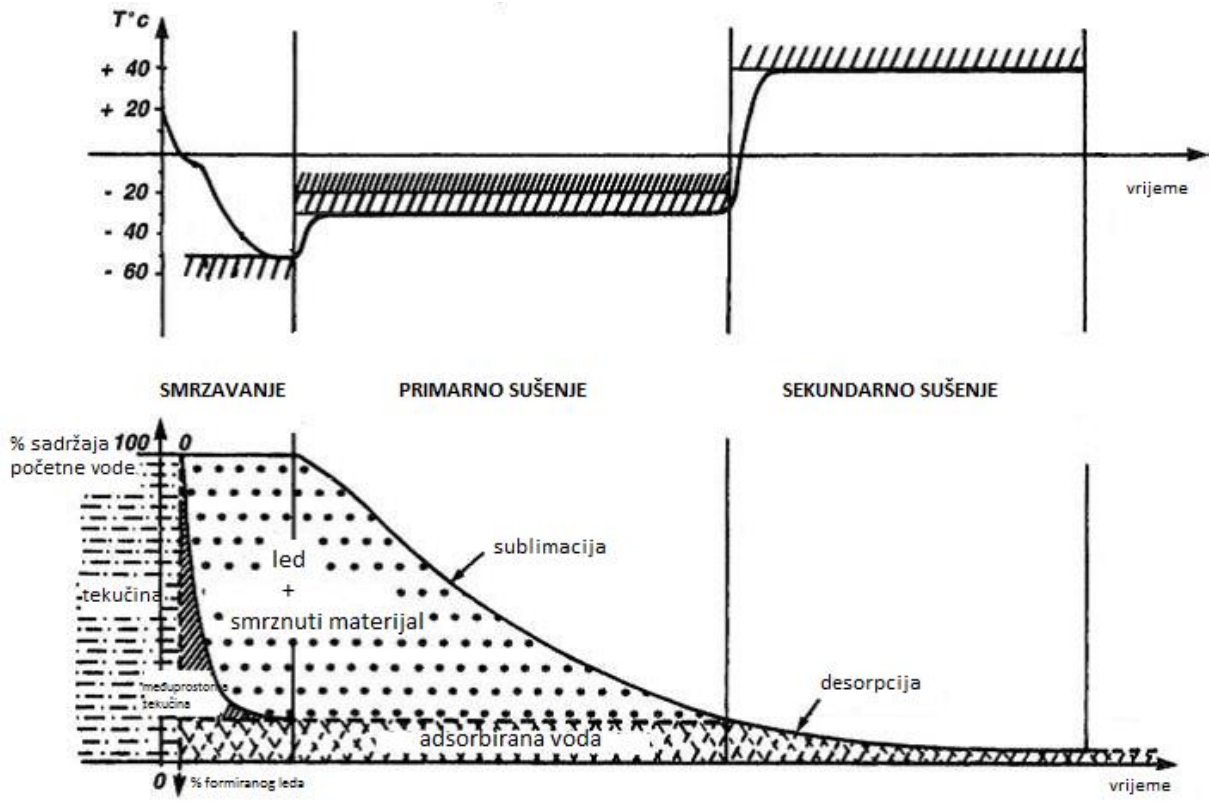
Primarno sušenje

Za razliku od predhodnog koraka, primarno sušenje se odvija pod vakumom. Dovođenjem topline potiče se sublimacija leda, to jest prijelaz leda u vodenu paru. S obzirom da se tijekom primarnog sušenja iz uzorka može ukloniti samo voda koja je zaleđena, bitno je da se smrzavanje uzorka u prvom koraku provede pri temperaturi nižoj od eutektične točke. Primarno sušenje također predstavlja kritičan korak liofilizacije. Naime, potrebno je dobro izbalansirati prijenos mase (sublimaciju leda) i prijenos topline (povećavanje temperature) da ne bi došlo do neželjenih promjena smrznutog uzorka prekomjernim dovođenjem topline, npr. taljenja, ekspanzije ili urušavanja (Rey i May, 2010). Led sublimira najprije sa površine uzorka, a zatim i iz dubljih dijelova pri čemu vodena para prolazi kroz uzorak do njegove površine, otkud dalje odlazi do kondenzora gdje se vodena para kondenzira natrag u vodu (Abdelwahed i sur., 2006a). Vodenu paru je potrebno odvoditi jer bi inače rastao tlak u komori. Smrznuti produkt se suši bez zamjetnije promjene volumena i oblika. Na mjestima gdje su se nalazili kristali leda ostaju pore.

Sekundarno sušenje

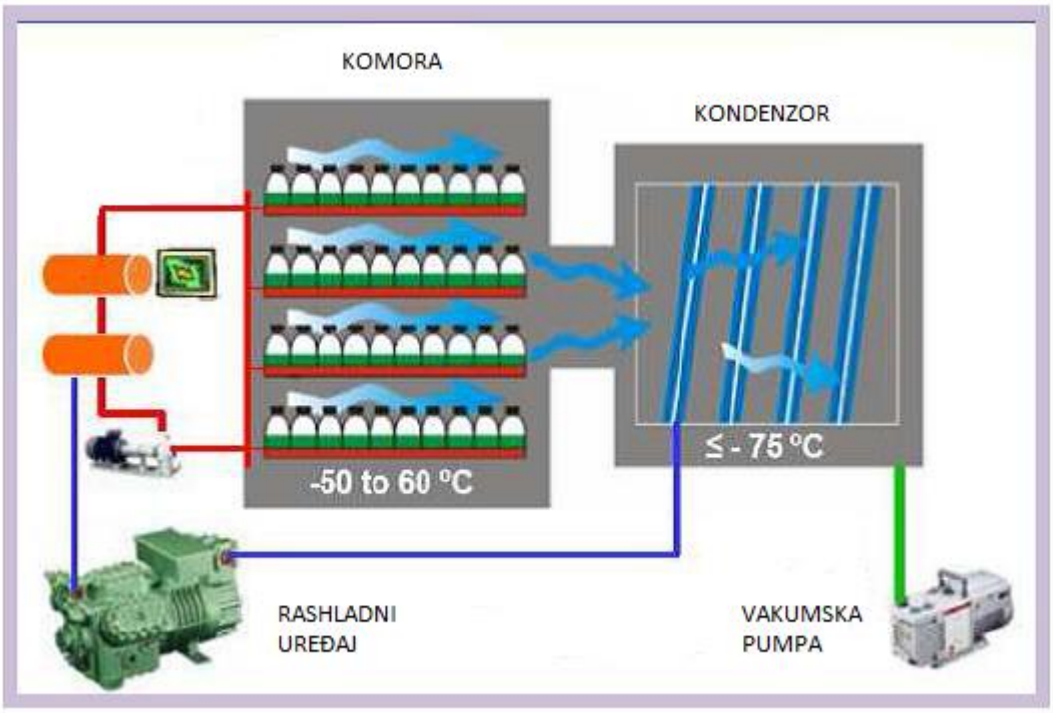
Voda koja se u prvom koraku ne smrzne, ne može ni sublimirati. Zato tijekom sušenja nakon brzog smanjenja udjela vode slijedi plato faza (Slika 3.), gdje je zaostala voda u ravnoteži sa tlakom vodene pare u komori. Dovođenjem topline, udio vode u uzorku se smanjuje, a brzina sušenja povećava se proporcionalno s povećanjem površine sušenog

produkta (Pikal i sur., 1990). To je faza desorpcije, a odvija se pod visokim vakumom uz povećanje temperature na oko 20-50 °C (Abdelwahed i sur., 2006a; Rey i May, 2010).



Slika 3. Promjena temperature i sadržaja vode tijekom pojedinih koraka liofilizacije (Prilagođeno iz Rey i May, 2010)

Liofilizator se sastoji od komore za sušenje s policama ili držačima za tikvice/bočice sa smrznutim uzorcima, vakumske pumpe koja uklanja zrak i tako osigurava niski tlak u komori za sušenje te od kondenzora koji uklanja vlagu kondenzacijom na hladnoj površini (Slika 4.) (Nireesha i sur., 2013).

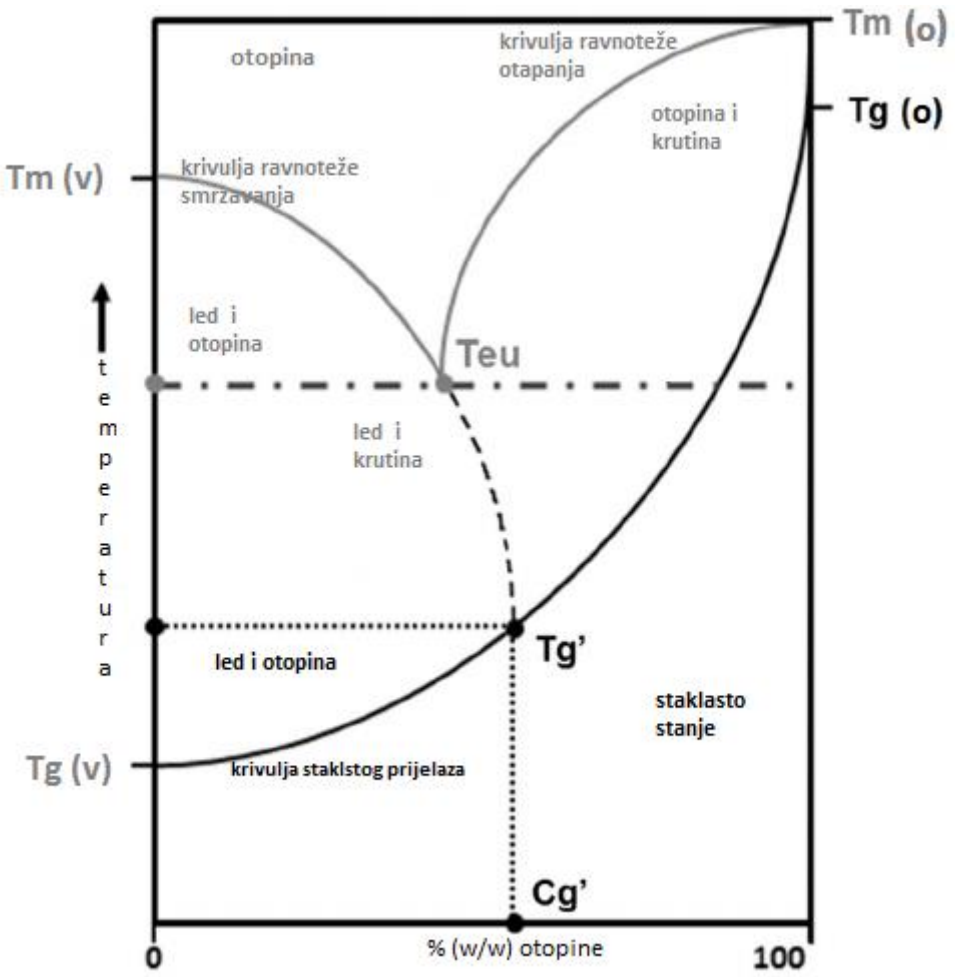


Slika 4. Shematski prikaz liofilizatora (Prilagođeno iz Nireesha i sur., 2013)

1.2.3. Optimizacija liofilizacije

Glavni cilj liofilizacije je postići dugotrajnu stabilnost nanočestica. Kako su suspenzije nanočestica često fizički i kemijski nastabilni sustavi, uklanjanjem vode iz sustava nastoji se doskočiti tom problemu. U farmaceutskoj industriji kao jedna od najučinkovitijih metoda sušenja pokazala se liofilizacija.

Liofilizacija je složen tehnološki proces u kojem dobro treba poznavati svaki korak procesa. Prije samog početka procesa potrebno je napraviti termalnu analizu samog uzorka kako bi se odredila kritična svojstva formulacije: temperatura staklastog prijelaza smrznutog uzorka (Tg') i temperatura kristalizacije eutektika (Teu). Poznavanje navedenih parametara neophodno je za optimiranje samog procesa liofilizacije. Tg' se određuje kod amorfnih uzoraka, dok se Teu određuje kod uzoraka koji kristaliziraju (Slika 5.).



Slika 5. Fazni diagram vode(v)/otopine(o)

Tm: temperatura taljenja, Teu: temperatura kristalizacije eutektika, Tg: temperatura staklastog prijelaza, Tg': temperatura staklastog prijelaza smrznutog uzorka, Cg': koncentracija kriokoncentrirane otopine (Prilagođeno iz Kasper i Friess, 2011)

Smrzavanje uzorka provodi se dovoljno dugim hlađenjem uzorka pri temperaturi nižoj od Tg' koko bi se osigurao prijelaz cijele suspenzije u čvrsto stanje i omogućilo uspješno uklanjanje leda sublimacijom (Abdelwahed, 2006a).

Postoje različite metode smrzavanja, a o njima će ovisiti veličina kristala leda. Što su kristali leda manji, njihova specifična površina je veća, a mehaničko naprezanje koje pri tome nastaje bit će manje. Dakle, što su kristali leda manji, manja je mogućnost agregacije nanočestica koja se može dogoditi tijekom mehaničkog naprezanja. Na kasniju agregaciju nanočestica utječe i brzina samog smrzavanja (Abdelwahed, 2006a).

Smrzavanjem dolazi do odvanja vodene faze od faze nanočestica i ekscipijensa, te se u tom koraku liofilizacije nanočestice oslobađaju najvećeg dijela vode. To dovodi do povećavanja koncentracije i destabilizirajućih naprezanja među nanočesticama. Povećana interakcija među nanočesticama također može dovesti do njihove agregacije ili fuzije (Abdelwahed, 2006a).

Agregacija nanočestica pri smrzavanju uzorka utječe na uspješnost resuspendiranja nanočestica nakon liofilizacije, odnosno veličinu i polidisperznost nanočestica u rekonstituiranoj suspenziji nanočestica.

Smrzavanje utječe i na morfološke osobine liofilizata. Naime, brzina smrzavanja utječe na veličinu kristala leda pa tako i na konačnu poroznost liofilizata. Što je smrzavanje brže, kristali leda su manji, a njihova ukupna površina veća, jednako kao i poroznost liofilizata. Usto, o uspješnosti provođenja prvog koraka liofilizacije ovisit će i efikasnost sušenja. Naime, veličina kristala leda, definirana u koraku smrzavanja, određuje brzinu sublimacije. Što su kristali leda manji i specifična površina veća, sublimacija će biti brža. Primarno sušenje je najduži korak procesa te je cilj optimizacije liofilizacije skratiti ga (Abdelwahed, 2006a).

Sublimacijom leda u uzorku ostaju pore koja predstavljaju put za slobodan prolaz vodene pare nastale liofilizacijom. Temperatura se mora držati ispod temperature kolapsa, Tc da se uzorak ne otopi i da ne dođe do gubitka strukture, ali s druge strane treba biti dovoljno visoka da se osigura energija za sublimaciju leda. Posljedica kolapsa uzorka je liofilizat sa većom količinom vode i otežanim rekonstituiranjem što je posljedica nedostatne poroznosti liofilizata (Konan i sur., 2002).

Zadnjim korakom, sekundarnim sušenjem, određuje se konačni sadržaj vode u pripravku.

U literaturi se nerijetko nailazi na optimiranje procesa liofilizacije metodom pokušaja i pogreške; tek nakon provedenog procesa vidi se je li postupak uspio ili ne. Međutim, svaki se korak procesa temelji na čvrstim fizičkim, kemijskim i inžinjerskim principima te je ishod procesa liofilizacije moguće predvidjeti (Abdelwahed i sur., 2006a). Liofilizacija, dakle, zahtjeva vrsnog stručnjaka i dobro poznavanje procesa.

1.2.4. Prednosti i nedostaci liofilizacije koloidnih sustava

Cilj lioflizacije je produljiti vrijeme skladištenja ljekovitog pripravka, uklanjanjem vode/otapala/medija u kojem su nanočestice suspendirane. U okviru razvoja inovativnih terapijskih sustava, osim za produljenje stabilnosti koloidnih sustava, liofilizacija se koristi i za uklapanje lijeka u nanočestice, pripravu ovojnice/jezgre nanočestica, pri analitičkoj karakterizaciji koloidnih sustava i proizvodnji čvrstih dozirnih oblika. Prednosti prevođenja koloidnih nanosuspenzija u čvrsti dozirni oblik su višestruke: sprječavanje agregacije nanočestica, razgradnje lijeka i/ili polimera, curenja lijeka te omogućavanje različitih putova primjene nanočestica (parenteralna, oralna, nazalna, pulmonalna...) (Abdelwahed i sur., 2006a; Rey i May, 2010; Nireesha i sur., 2013).

Nedostaci liofilizacije su dugo vrijeme trajanja procesa (par dana), potreba za optimiranjem većeg broja parametara – temperature i tlaka tijekom svakog koraka procesa, mogućnost uklanjanja hlapljivih komponenti vakumskom pumpom te potreba za korištenjem sterilnih tekućina za rekonstituciju (u slučaju parenteralne primjene) (Nireesha i sur., 2013).

1.3. Krio/lioprotektori

1.3.1. Svrha korišetnja

Procesi smrzavanja i sušenja tijekom liofilizacije uzrokuju naprezanja koja mogu destabilizirati koloidnu suspenziju nanočestica (Abdelwahed i sur., 2006b). Tijekom liofilizacije zbog odvajanja vode smrzavanjem dolazi do povećanja koncentracije nanočestica što može dovesti do njihove agregacije ili čak i do ireverzibilne fuzije, a stvaranje kristala izaziva dodatan mehanički stres koji dovodi do destabilizacije nanočestica (Fonte i sur., 2012; Abdelwahed i sur., 2006b).

Da bi se nanočestice zaštitile od stresa uzrokovanog liofilizacijom koriste se različiti ekscipijensi i to u svojstvu krio/lioprotektora. Krioprotektori se dodaju da bi zaštitili uzorak od naprezanja tijekom smrzavanja, a lioprotektori tijekom sušenja. Uglavnom kritprotektori mogu djelovati i kao lioprotektori, ali i *vice-versa*. Ponekad to nije slučaj pa je uzorku prije liofilizacije potrebno dodati i krioprotektor i lioprotektor (Wang, 2000).

1.3.2. Mehanizam djelovanja

Postoji nekoliko hipoteza koje objašnjavaju mehanizam djelovanja krioprotektora i lioprotektora. Krioprotektori mogu stvoriti staklasti matriks u kojem su nanočestice imobilizirane te tako sprječavaju njihovu agregaciju i osiguravaju zaštitu od mehaničkog naprezanja tijekom nastajanja kristala leda. Krioprotektori imaju specifičnu temperaturu Tg' pa, da bi se osigurao potpuni prijelaz uzorka u čvrsto stanje, smrzavanje se mora provesti ispod Tg' ako je smrznuti uzorak amorfan, ili spod Teu (temperatura kristalizacije eutektika) ako uzorak kristalizira (Tang i Pikal, 2004).

Druga teorija stabilizacije nanočestica objašnjava da krioprotektori izoliraju nanočestice i tako ih odvajaju u tekućoj fazi, čime se sprječava agregacija pri smrzavanju iznad Tg' (Allison i sur., 2000).

Tijekom sušenja nanočestice stabiliziraju lioprotektori. Teorija zamjene vode pretpostavlja da se potkraj sušenja stvaraju vodikove veze između hidroksilnih skupina lioprotektora i polarnih grupa na površini nanočestica. Lioprotektor tako djeluje kao zamjena za vodu. Maksimalno stvaranje vodikovih veza omogućeno je kad lioprotektor i nanočestica oboje prijeđu u amorfno stanje, dok kristalizacija lioprotektora može spriječiti stvaranje navedenih vodikovih veza (Abdelwahed i sur., 2006c).

1.3.3. Krio/lioprotektori u upotrebi

Kao ekscipijensi koji štite nanočestice od stresa pri liofilizaciji najčešće se koriste različiti monosaharidi, disaharidi, oligosaharidi i polisaharidi, ali se mogu koristiti i stabilizatori kao što su surfaktanti, modificirani polimeri i kopolimeri (Abdelwahed i sur., 2006a). Seijo i suradnici dokazali su da je moguće provesti liofilizaciju i odgovarajuću rekonstituciju suspenzije nanočestica pripravljenih od poliizobutilcijanoakrilata i poliizoheksilcijanoakrilata bez primjene krioprotektora ili lioprotektora već samo uz prisustvo površinski aktivne tvari poloksamera (2 %, *m/V*) (Seijo i sur., 1990). U Tablici 1. nalazi se pregled krio/lioprotektora korištenih u različitim istaraživanjima pri liofilizaciji terapijskih nanosustava.

Tablica 1. Pregled istraživanja učinkovitosti različitih krio/lioprotektora pri liofilizaciji terapijskih nanosustava

Terapijski nanosustav	**Polimerni i/ili lipidni sustav**	**Djelatna tvar**	**Ispitivani krio/lioprotektori**	**Najbolji krio/lioprotektor**	**Literatura**
nanosferse	PCL	itrakonazol	glukoza, saharoza, trehaloza, dekstran, manitol	glukoza i saharoza	De Chasteigner i sur., 1996
SLN	Dynasan	tetrakain, etomidat	trehaloza, glukoza, maltoza, manoza, laktoza, manitol, sorbitol, glicerin, PVP, PVA, želatina	trehaloza, glukoza, maltoza, manoza	Schwarz i Mehnert, 1997
nanočestice	PLGA	ciklosporin	glukoza, trehaloza, manitol, sorbitol	glukoza i trehaloza	Chacón i sur., 1999
nanočestice	PCL i PLGA	ciklosporin	glukoza, saharoza, trehaloza, laktoza, manitol, dekstran, želatina, sorbitol	glukoza i saharoza	Saez i sur., 2000
nanočestice	silikati	DNA	glukoza, trehaloza, manitol, sorbitol, acetatna kiselina, glicerol	trehaloza, glicerol	Sameti i sur., 2003
SLN	kaliksaren	/	glukoza, fruktoza, manoza, maltoza	svi	Shahgaldian i sur., 2003
nanočestice	PLGA	ciprofloksacin	manitol, trehaloza, glukoza, dekstran	manitol	Bozdag i sur., 2005
nanokapsule	PCL	/	glukoza, saharoza, PVP, manitol, hidroksipropil β-ciklodekstrin	glukoza, saharoza i PVP	Abdelwahed i sur., 2006c

SLN	triplamin, fosfatidilkolin	paklitaksel	trehaloza	trehaloza	Cavalli i sur., 2010
nanočestice	lecitin	melatonin	glukoza, trehaloza	trehaloza	Hafner i sur., 2011
nanočestice	PLGA	inzulin	trehaloza, saharoza, fruktoza, glukoza, sorbitol	trehaloza i glukoza	Fonte i sur., 2012
nanočestice	kitozan	/	saharoza, glukoza, trehaloza, polietilenglikol, PEG 2000, PEG 10000	saharoza, trehaloza	Almalik i sur., 2017

DNA: deoksiribonukleinska kiselina, PCL: poli(ε-kaprolakton), PEG: polietilenglikol, PLA: polilaktična kiselina, PLGA: poli(laktid-ko-glikolna) kiselina, PVA: polivinilalkohol, PVP: polivinilprolidon, SLN: čvrste lipidne nanočestice

1.3.3.1. Šećeri

Šećeri su često korišteni krio/lioprotektori, a razlog tome jest što su kemijski inertni, lako mogu prijeći u staklasto amorfno stanje tijekom smrzavanja, a mogu se i lako dispergirati (Franks, 1998; Fonte i sur., 2012). Imaju prihvatljiv sadržaj ostatne vlage i mogu dobro stabilizirati proteine tijekom skladištenja. Također utječu na temperaturu staklastog prijelaza formulacije, a to je važno za očuvanje stabilne amorfne strukture kolača liofilizata (Fonte i sur., 2012).

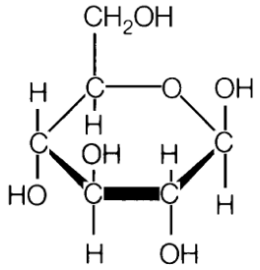
1.3.3.2. Razlika disaharida, oligosaharida i polisaharida

Hinrichs i suradnici u istraživanju najprikladnijeg krio/lioprotektora za pegilirani lipopleks objasnili su zašto su oligosaharidi najbolji za sprječavanje agregacije tijekom duljeg skladištenja nakon liofilizacije. Prednost oligosaharida (u navedenome istraživanju su to bili inulin i dextran) je viša Tg' nego kod disaharida (sukroza i trehaloza) pa se smrznuta

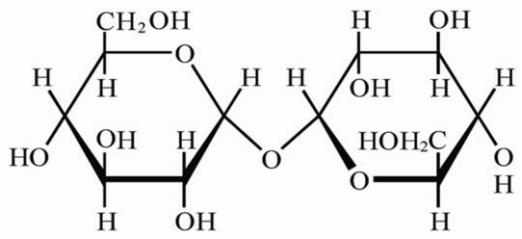
disperzija može skladištiti pri višoj temperaturi dulji vremenski period. Također je predloženo da su oligosaharidi višestruko upotrebljiviji lioprotektori nego disaharidi jer mogu biti izloženi većoj relativnoj vlažnosti bez da prijeđu Tg' (Hinrichs i sur., 2005).

Prednost polisaharida je visoka Tg' i Tg (temperatura staklastog prijelaza) te mala tendencija kristalizaciji u odnosu na disaharide (Hiniricks i sur., 2001), ali su preveliki da bi se priljubili uz površinu lipopleksa i stvorili čvrsti sloj. Upravo oligosaharidi objedinjuju povoljna svojstva disaharida i polisaharida – imaju visoku Tg' i Tg, malu tendenciju kristalizaciji, ali su dovoljno fleksibilni da se učinkovito mogu proljubiti uz nanočestice lipopleksa (Hiniricks i sur., 2005).

1.3.3.3. Glukoza *vs*. trehaloza



Slika 6. Glukoza



Slika 7. Trehaloza

Glukoza (Slika 6.) i trehaloza (Slika 7.) su vrlo učinkoviti ekscipijensi za prevenciju agregacije čestica i sprječavanje curenja lijeka za vrijeme liofilizacije (Zhang i sur., 2008). U određenim ispitivanjima prikazanim u Tablici 1. oba ekscipijensa zadovoljavaju tražene uvijete, no ipak se može primijetiti da je trehaloza češće ekscipijens izbora.

Green i Angell (1989) u svom su istraživanju prikazali fazni dijagram na kojem se vidi da je krivulja trehaloze nešto viša od krivulje glukoze. Na tome faznome dijagramu moguće je predvidjeti koja će biti temperatura staklastog prijelaza Tg' šećera pri određenom masenom udjelu vode (Crowe i sur., 1996). Prednost trehaloze također je i niska higroskopnost i slaba kemijska reaktivnost. Trehaloza ne stvara interne vodikove veze, a ima visok afinitet za stvaranje vodikovih veza s drugim tvarima pa tako može nadomjestiti molekule vode koje su uklonjene liofilizacijom.

1.3.4. Faktori koji utječu na djelotvornost krio/lioprotektora

Stupanj stabilizacije tijekom liofilizacije osim o tipu šećera ovisi i o njegovoj koncentraciji i molekulskoj masi, o omjeru mase šećera i nanočestica, ali i o koncentraciji nanočestica (Abdelwahed i sur., 2006a; Bejrapha i sur., 2011). Prema Tablici 1. zamijećeno je da su najčešće korištene koncentracije šećera u rasponu od 1 do 20 % (*m/V*). Općenito, sposobnost krio/lioprotekcije raste s porastom koncentracije šećera. Primjerice, trehaloza se pokazala kao dobar krio/lioprotektor pri liofilizaciji lecitinsko-kitozanskih nanočestica u koncentraciji od 2,5 % dok je niža koncentracije imala slabiji protektivni učinak (Hafner i sur., 2011).

Ipak prevelika koncentracija šećera u nekim slučajevima može imati destabilizirajući učinak na nanočestice. Zabilježena je povećana agregacija silikatnih nanočestica nakon liofilizacije, i to proporcionalno povećanju koncentracije glukoze (Sameti i sur., 2003). Maseni omjer trehaloze i nanočestica pripravljenih iz poli(laktat-ko-etilenoksid)-a 1:1 bio je potreban da se dobije liofilizat zadovoljavajuće redisperzibilnosti (De Jaeghere i sur., 1999); zaključuje Abdelwahed u svome preglednom radu (Abdelwahed i sur., 2006a).

Abdelwahed navodi i primjer prema kojem je bolji lioprotektivni učinak postignut pri većoj koncentraciji nanočestica, bez obzira na količinu dodanog šećera. Liofilizacijom suspenzije nanočestica u koncentraciji od 0,2 % (*m/m*) uz dodatak trehaloze u masenom omjeru prema nanočesticama od 10:1, dobiven je liofilizat koji se nije mogao zadovoljavajuće redispergirati nakon liofilizacije. Suprotno tome, liofilizacijom suspenzije nanočestica u koncentraciji od 0,8 % (*m/m*) uz dodatak trehaloze u masenom omjeru prema nanočesticama od 2:1, dobiven je liofilizat zadovoljavajuće redisperzibilnosti (Abdelwahed i sur., 2006a).

Molekulska masa krio/lioprotektora također može biti važna u sprječavanju agregacije nanočestica (Abdelwahed i sur., 2006a).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nanočestice kao nosači lijekova novi su terapijski sustavi koji se posljednjih par desetljeća istražuju u svrhu ciljane/lokalizirane dostave i kontroliranog oslobađanja lijeka. Uklapanjem lijeka u nanočestice može se povećati terapijski učinak lijeka, optimirati farmakokinetički profil, a smanjiti nuspojave i učestalost doziranja (Mohanraj i Chen, 2006). U najnovije vrijeme u tu stvrhu počele su se razvijati lipidno-polimerne hibridne nanočestice (Hadinoto i sur., 2013).

U ovome radu pripravljene su lipidno-alginatne nanočestice s uklopljenim deksametazonom. Alginat je polimer izbora jer je biokompatibilan, biorazgradljiv, mukoadhezivan, niske toksičnosti, relativno lako dobavljiv i niske cijene (Lee i Mooney, 2012). Lipidnu komponentu nanočestica čine lecitin i kationski lipid. Lecitin je smjesa lipida i to uglavnom fosfatidilkolina. Koristi se za pripravu nanočestica jer omogućuje uklapanje lipidnih lijekova, kao što je deksametazon, siguran je i biokompatibilan (Rowe i sur, 2006). Kao kationski lipid upotrebljen je dimetildioktadecilamonij-bromid, kvaterni amonijev spoj s dugim alkilnim lancem koji mu daje lipofilna svojstva i omogućuje stupanje u elektrostatsku interakciju s negativno nabijenim strukturama/površinama (www.sigmaaldrich.com).

Ograničavajući čimbenik primjene suspenzije nanočestica jest njihova slaba fizička i kemijska stabilnost te su zbog toga podložne agregaciji, hidrolizi, razgradnji lijeka i/ili polimera, curenju lijeka te preranom i/ili naglom oslobađanju lijeka (Chacón i sur., 1999; Abdelwahed i sur., 2006a). Da bi se poboljšala stabilnost sustava provodi se sušenje. Kao jedna od najučinkovitinijih metoda sušenja u farmaceutskoj industriji pokazala se liofilizacija.

Proces liofilizacije koloidnih terapijskih sustava potrebno je optimirati. Naime, tijekom smrzavanja i sušenja dolazi do naprezanja sustava, pa da bi se nanočestice zaštitile od stresa tijekom liofilizacije, koriste se različiti ekscipijensi. Kao najčešći eksipijensi sa svrhom krio/lioprotekcije koriste se šećeri (Abdelwahed i sur., 2006a).

Cilj ovog rada bio je ispitati krio/lioprotektivni učinak glukoze i trehaloze pri liofilizaciji suspenzije lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom. Ti šećeri odabrani su zbog ranijih dokaza u uspješnosti očuvanja fizičkih svojstva nanočestica nakon liofilizacije. Kao parametri uspješnosti očuvanja fizičkih svojstava mjereni su veličina, indeks polidisperznosti te zeta-potencijal nanočestica.

Specifični ciljevi:

- pripraviti lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom metodom ionotropnog geliranja korištenjem lecitina S45 ili lecitina S100 kao glavne lipidne sastavnice, i kationskog lipida u različitim masenim omjerima prema lecitinu
- odrediti fizička svojstva nanočestica prije liofilizacije
- odrediti utjecaj tipa i koncentracije šećera na fizička svojstva nanočestica poslije liofilizacije
- odrediti utjecaj tipa lecitina na fizička svojstva nanočestica poslije liofilizacije
- odrediti utjecaj masenog omjera kationskog lipida i lecitina na fizička svojstva nanočestica poslije liofilizacije

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za pripravu nanočestica korišteni su:

- dimetildioktadecilamonijev-bromid (DMDO-Br, ≥ 98,0 %, MW 630.95; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka)
- lecitin S45 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- lecitin S100 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- natrijev alginat (Pronova Lv G-sodium alginat; Protan, Drammen, Norveška)
- deksametazon (mikronizirani, T=107,316; Sanofi, Pariz, Francuska)
- etanol (96 %, Kemig, Donja Zelina, Hrvatska)

Za mjerenje veličine i naboja nanočestica korišteni su:

- redestilirana voda
- 10mM otopina NaCl

Za krio/lioprotekciju korišteni su:

- glukoza (*Glucosum monohydricum*; Kemig, Donja Zelina, Hrvatska)
- trehaloza (*D(+)-Trehalose dihydrate*; Prolabo, Lutterworth, Engleska)

3.2. Metode

3.2.1. Priprava nanočestica

U 96 % etanolu pripravljena je otopina DMDO-Br koncentracije 10 mg/ml. Također je pripravljena i otopina lecitina, otapanjem 50 mg lecitina u odgovarajućem volumenu 96 % etanola (1,10 – 1,93 ml; Tablica 2.). Etanolna otopina DMDO-Br promiješana je s etanolnom otopinom lecitina. Koncentracija lecitina u smjesi etanolnih otopina iznosila je 25 mg/ml. Volumen smjese etanolnih otopina DMDO-Br i lecitina je konstantan (2 ml; Tablica 2.). Variranjem volumnog omjera etanolnih otopina DMDO-Br i lecitina postignuti su različiti maseni omjeri DMDO-Br i lecitina u smjesi etanolnih otopina (Tablica 3.).

Vodena faza pripravljena je otapanjem natrijevog alginata u redestiliranoj vodi u koncentraciji od 10 mg/ml. Alikvot od 0,5 ml takve otopine natrijevog alginata razrijeđen je destiliranom vodom do 23 ml.

Deksametazon (10 mg) je otopljen u etanolnoj otopini lecitina i DMDO-Br. Dobivena etanolna faza (2 ml) pomoću igle (unutarnjeg polumjera 0,75 mm) polako je injektirana u vodenu fazu (23 ml) na magnetskoj mješalici (900 okr/min). Tim postupkom su pripravljene suspenzije lipidno-alginatnih nanočestica s različitim udjelima kationskog lipida i s dva različita lecitina (Lec S100 i Lec S45) (Ćorić, 2017; Plantić, 2017).

Tablica 2. Odnos volumena etanolne otopine DMDO-Br (10 mg/ml) i etanolne otopine lecitina (50 mg) koje su pomiješane u jedinstvenu etanolnu fazu pri izradi lipidno-alginatnih nanočestica

uzorak	**tip lecitina**	**etanolna otopina DMDO-Br** (ml)	**etanolna otopina lecitina** (ml)
Dex1	Lec S45	0,50	1,50
Dex2	Lec S45	0,70	1,30
Dex3	Lec S45	0,80	1,20
Dex4	Lec S45	0,90	1,10
Dex5	Lec S100	0,07	1,93
Dex6	Lec S100	0,10	1,90
Dex7	Lec S100	0,30	1,70
Dex8	Lec S100	0,50	1,50

Tablica 3. Odnos masa ishodnih tvari korištenih u pripravi nanočestica

uzorak	**tip lecitina**	**DMDO-Br** (mg)	**lecitin** (mg)	**deksametazon** (mg)	**natrijev alginat** (mg)
Dex1	Lec S45	5,0	50	10	5
Dex2	Lec S45	7,0	50	10	5
Dex3	Lec S45	8,0	50	10	5
Dex4	Lec S45	9,0	50	10	5
Dex5	Lec S100	0,7	50	10	5
Dex6	Lec S100	1,0	50	10	5
Dex7	Lec S100	3,0	50	10	5
Dex8	Lec S100	5,0	50	10	5
		Etanolna faza			Vodena faza

3.2.2. Određivanje veličine nanočestica

Veličina nanočestica mjerena je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*; PCS) (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija). Ova tehnika temelji se na mjerenju intenziteta raspršenja snopa svijetlosti na suspendiranim česticama. Iz funkcije intenziteta raspršene svjetlosti ovisno o vremenu može se izračunati veličina i stupanj disperznosti čestica. Funkcija ovisi o temperaturi i viskoznosti suspenzijskog sredstva pa se mjerenje provodi pri konstantnoj temperaturi T=25 °C i istom suspenzijskom sredstvu (pročišćenoj vodi). Promjenu funkcije intenziteta ovisno o vremenu uzrokuje Brownovo gibanje čestica, a ovisno o veličini čestica. Manje čestice se gibaju brže nego veće.

Uzorak je obasjan koherentnim monokromatskim svijetlom He-Ne laserske zrake (λ = 633 nm) od 10 mW te je pod kutom od 90° mjeren stupanj raspršenja. Suspenzije nanočestica su prije mjerenja razrijeđene pročišćenom vodom u volumnom omjeru 1:5.

3.2.3. Određivanje zeta-potencijala nanočestica

Zeta-potencijal također je mjeren na PCS-u (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija). Mjerenje zeta-potencijala je indirektno, tj. doznaje se iz elektroforetske pokretljivosti suspendiranih čestica uz pomoć teorije elektrokinetike. Laserska zraka (10 mW He-Ne) za pobuđivanje je snop koherentnog monokromatskog svjetla. Električno polje u kojem se čestice gibaju je promjenjivo električno polje, pa se tako smjer gibanja čestica tijekom mjerenja periodično mijenja. O brzini gibanja čestica proporcionalno ovisi frekvencija raspršenja zrake. Mjerenja su provedena pri 25 °C. Uzorak je razrijeđen 10mM otopinom NaCl u volumnom omjeru 1:5.

3.2.4. Priprema uzorka za liofilizaciju

Prije samog procesa liofilizacije suspenziji nanočestica dodan je krio/lioprotektor. U tu svrhu su korišteni glukoza i trehaloza. Alikvotu (1,3 ml) uzorka (filtriranom kroz filter veličine pora 0,45 μm) je dodana određena količina glukoze, odnosno trehaloze tako da koncentracija šećera u uzorcima pripremljenim za liofilizaciju iznosi 1, 2,5, 5 i 10 % (*m/V*). Pripremljen je i referentni uzorak bez šećera.

Uzorci su zatim preneseni u staklene bočice za liofilizaciju i poklopljeni gumenim čepom za liofilizaciju, tako da vodena para tijekom liofilizacije može izaći iz bočica. Uzorci su nakon pripreme smrznuti pri -70 °C (Ultra-Low Temperature Freezer, Climas, Barcelona, Španjolska).

3.2.5. Liofilizacija

Zamrznuti uzorci liofilizirani su korištenjem liofilizatora Alpha 1-4 (Martin Christ, Osterode am Harz, Njemačka) pri temperaturi komore liofilizatora od -50 °C i tlaku od 0,2 mbar. Proces liofilizacije trajao je 24 sata. Liofilizati su do daljnje obrade čuvani u eksikatoru pri 8 °C.

3.2.6. Rekonstitucija liofiliziranog uzorka

Liofilizirani uzorci resuspendirani su u filtriranoj pročišćenoj vodi, odnosno filtriranoj 10 mM otopini NaCl – volumena jednakog volumenu suspenzije nanočestica prije liofilizacije (1,3 ml). Najprije je dodana polovica volumena tekućine za rekonstituciju, uzorak je nekoliko sekundi soniciran na ultrazvučnoj kupelji (Bransonic, Danbury, USA), te potom razrijeđen preostalim volumenom tekućine za rekonstituciju.

3.2.7. Karatkerizacija rekonstituirane suspenzije nanočestica

Rekonstituirana suspenzija nanočestica karakterizirana je s obzirom na veličinu, polidisperznost i zeta-potencijal nanočestica kako je opisano u odjeljcima 3.2.2. i 3.2.3.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava i karakterizacija lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom

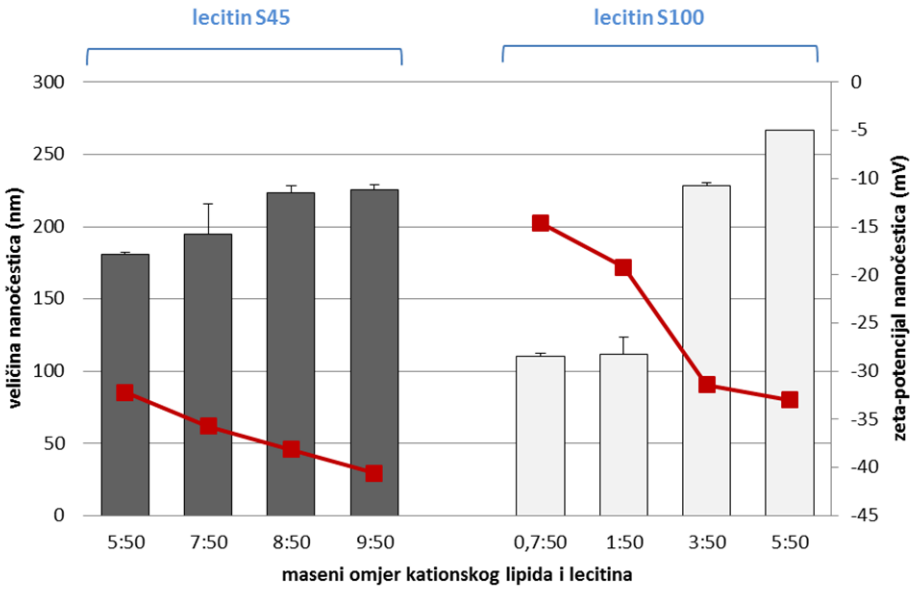
Posljednjih desetljeća sve je veći interes za istraživanjem nanočestica kao nosača lijekova. Polimerne nanočestice, kao i dendrimeri, liposomi, nanoemulzije i micele, novi su terapijski sustavi koji se koriste u svrhu poboljšanja farmakokinetičkih svojstava lijeka (Jeevanandam i sur., 2016; Mohanraj i Chen, 2006). Lijek može biti otopljen, uklopljen, inkapsuliran ili adsorbiran na matriks nanočestice. Ovisno o metodi pripreme, nanočestice mogu biti nanosfere ili nanokapsule. Nanokapsule su vezikularni sustavi kod kojih je lijek u jezgri nanočestice obavijen polimernom ovojnicom, dok su nanosfere matriksni sustavi u kojima je lijek jednoliko dispergiran (Mohanraj i Chen, 2006).

U ovom radu nanočestice su pripravljene tehnikom injektiranja etanolne otpine lipida (lecitina i kationskog lipida) u vodenu otopinu polimera (alginata) (Ćorić, 2017; Plantić, 2017). Ta tehnika je jednostavna i reproducibilna, a uvjeti priprave nanočestica su blagi. Otapanje deksametazona zajedno s lipidima u etanolnoj fazi omogućilo je uklapanje deksametazona u nanočestice pripravljene opisanom tehnikom.

Pripravljene su nanočestice s lecitinom S45 i s lecitinom S100. Ovisno o tipu lecitina, variran je maseni omjer lecitina i kationskog lipida, kako bi se pripravila lipidna smjesa ukupnog pozitivnog naboja i omogućila interakcija s negativno nabijenim karboksilnim skupinama alginata (Ćorić, 2017; Plantić, 2017). Formirane nanočestice ukupno su negativno nabijene zbog prisustva alginata na njihovoj površini.

Slika 8. prikazuje veličinu i naboj lipidno-alginatnih nanočestica pripravljenih u ovom radu. Indeks polidisperznosti za nanočestice pripravljene s lecitinom S45 iznosio je od 0,24 ± 0,01 do 0,39 ± 0,15, dok je za nanočestice pripravljene s lecitinom S100 iznosio od 0,26 ± 0,04 do 0,60 ± 0,20. Dobiveni rezultati u skladu su s vrijednostima prethodnih istraživanja lipidno-alginatnih nanočestica. Plantić je u istraživanju koristila lecitin S100 te je veličina dobivenih nanočestica iznosila od 109,1 ± 3,1 nm do 258,6 ± 4,2 nm, indeks polidisperznosti iznosio je od 0,24 ± 0,01 do 0,54 ± 0,17 te zeta-potencijal od -14,2 ± 0,3 mV do -31,7 ± 1,0 mV (Plantić, 2017). Ćorić je u istraživanju za pripravu nanočestica koristila lecitin S45, a dobivene nanočestice bile su karakterizirane veličinom od 191,6 ± 1,3 nm do 200,3 ± 3,7 nm, indeksom polidisperznosti od 0,24 ± 0,01 do 0,32 ± 0,03 te zeta-potencijalom od -35,1 ± 0,7 mV do -42,0 ± 0,6 mV (Ćorić, 2017).

Kao i u prethodnim istraživanjima, i u ovom radu je omjer lecitina i kationskog lipida značajnije utjecao na veličinu nanočestica pripravljenih s lecitinom S100, a u oba slučaja, s porastom sadržaja kationskog lipida, u interakciji s alginatom dobivene su nanočestice negativnijeg površinskog naboja (Ćorić, 2017; Plantić, 2017).



Slika 8. Utjecaj masenog omjera kationskog lipida i lecitina na veličinu (stupići) i naboj nanočestica (■) pripravljenih s lecitinom S45 (lijevo) i lecitinom S100 (desno). Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3).

Priprema uzorka za liofilizaciju

Prije početka procesa liofilizacije nanočestice je potrebno zaštititi od fizičkih i kemijskih naprezanja. U tu svrhu upotrebljena su dva različita krio/lioprotektora, glukoza i trehaloza. Navedeni krio/lioprotektori odabrani su prema predhodnim istraživanjima o uspješnosti očuvanja fizičkih svojstva koloidnih sustava nakon liofilizacije uz dodatak glukoze i trehaloze (Schwarz i Mehnert, 1997; Chacón i sur., 1999; Sameti i sur., 2003; Hafner i sur., 2011; Fonte i sur., 2012).

Glukoza i trehaloza su sličnih kemijskih svojstava, ali se razlikuju prema učinkovitosti zaštite nanočestica tijekom liofilizacije. Očuvanje fizičkih svojstava nanočestica nakon liofilizacije značajno ovisi o ponašanju krioprotektora tijekom smrzavanja – amorfni

krioprotektori su bolji nego oni koji kristaliziraju (Abdelwahed i sur., 2006c i Zhang i sur., 2008). Zhang i suradnici objasnili su staklasto stanje glukoze i trehaloze tijekom smrzavanja gustim povezivanjem šećera vodikovim vezama s polarnim glavama lecitina, čime je kristalizacija šećera inhibirana (Zhang i sur., 2008).

4.2. Utjecaj vrste i koncentracije krio/lioprotektora na fizička svojstva nanočestica poslije liofilizacije

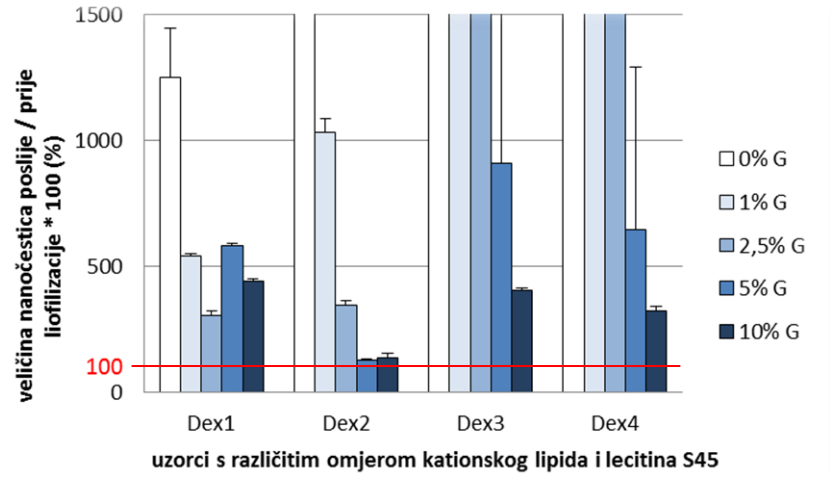
U ispitivanju su korištena dva različita krio/lioprotektora u svrhu očuvanja veličine i naboja lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom te sprječavanja agregacije i lakše rekonstitucije liofiliziranog uzorka.

Prije liofilizacije uzorcima je dodana trehaloza ili glukoza pri koncentraciji u rasponu od 1 do 10 %, *m/V*. Također je za svaki uzorak pripremljen i kontrolni uzorak, bez dodatka šećera. Navedene koncentracije odabrane su temeljem prijašnjih ispitivanja u kojima su, pri liofilizaciji koloidnih sustava, krio/lioprotektori najčešće korišteni u koncentracijama od 1 do 20 % (*m/V*) (Tablica 1.). Hafner i suradnici (2011) su u svrhu optimiranja procesa liofilizacije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom koristili glukozu i trehalozu kao krio/lioprotektore u koncentraciji od 1 do 10 % (*m/V*).

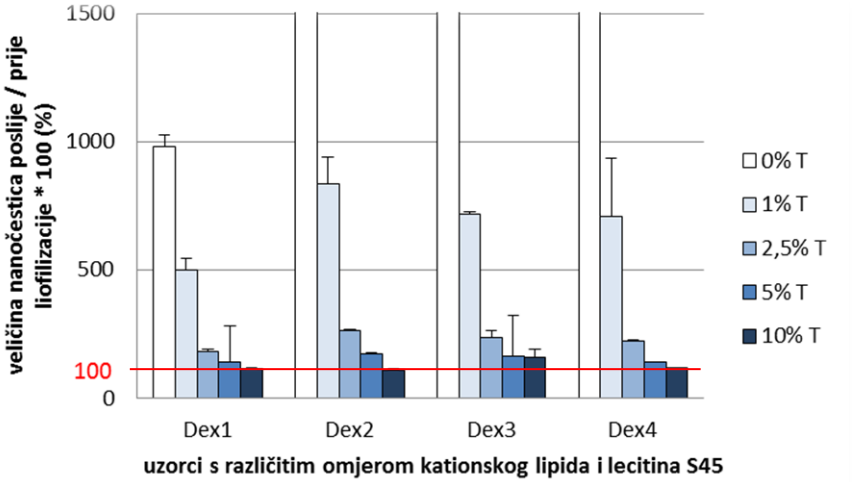
Liofilizacija suspenzije lipidno-alginatnih nanočestica bez dodatka glukoze ili trehaloze rezultirala je velikim povećanjem veličine promjera nanočestica, odnosno došlo je do agregacije te drastičnog povećanja indeksa polidisperznosti. Dodatkom šećera u suspenziju nanočestica prije liofilizacije, olakšana je rekonstitucija liofilizata; Svi liofilizirani uzorci mogli su se lako redispergirati.

Uspješnost očuvanja veličine nanočestica nakon liofilizacije u prisustvu krioprotektora (glukoze ili trehaloze) i rehidracije u ishodnom volumenu suspenzije prikazana je na Slici 9. i Slici 10. Primjena glukoze kao krio/lioprotektora osigurala je prihvatljive veličine nanočestica nakon liofilizacije jedino u slučaju lipidno-alginatnih nanočestica pripravljenih s lecitinom S45, pri masenom omjeru kationskog lipida i lecitina od 7:50, te pri koncentraciji glukoze od 5 i 10 % (*m/V*) (Slika 9 (a) i Slika 10 (a)). Indeks polidisperznosti kod navedenih uzoraka također je bio zadovoljavajući te je iznosio redom 0,29 ± 0,02 i 0,29 ± 0,04.

U slučaju primjene trehaloze kao krio/lioprotektora, može se uočiti pravilnost u stupnju očuvanja veličine nanočestica - s porastom koncentracije trehaloze nanočestice u rekonstituiranim uzorcima su manje, a time i bliže veličini prije liofilizacije (Slika 9 (b) i Slika 10 (b)). Zadovoljavajuće odstupanje veličine nanočestica i indeksa polidisperznosti postignuto je kod rekonstitucije svih uzoraka liofiliziranih uz dodatak trehaloze u koncentraciji od 10 % (*m/V*), ali najinteresantnije rješenje je ono postignuto s najmanjom koncentracijom trehaloze, 2,5 % (*m/V*: Dex7).

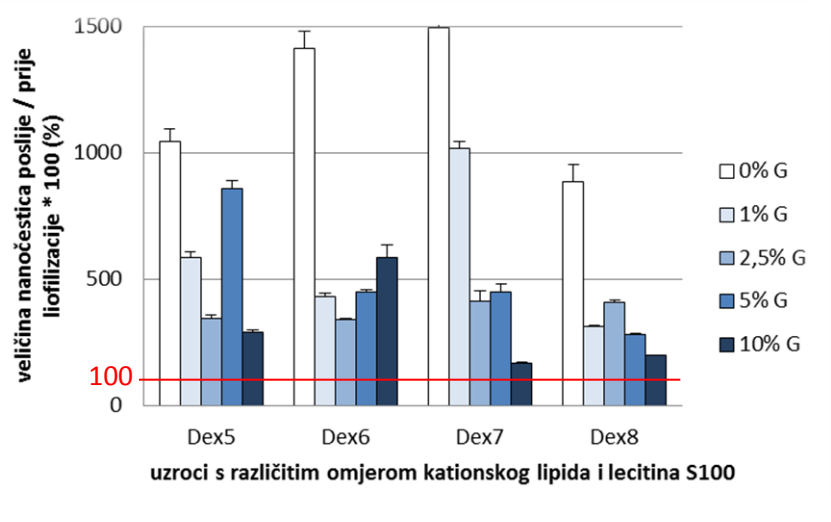


(a)

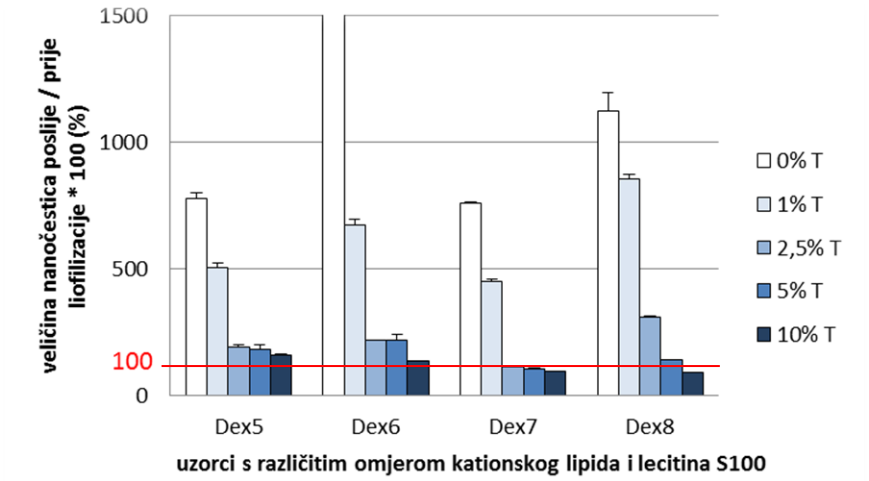


(b)

Slika 9. Stupanj očuvanja veličine lipidno-alginatnih nanočestica pripravljenih s lecitinom S45 liofiliziranih u prisustvu glukoze (**a**) ili trehaloze (**b**) u koncentraciji od 1, 2,5, 5 i 10 % (*m/V*).
Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3) do vrijednosti 1500 %.



(a)



(b)

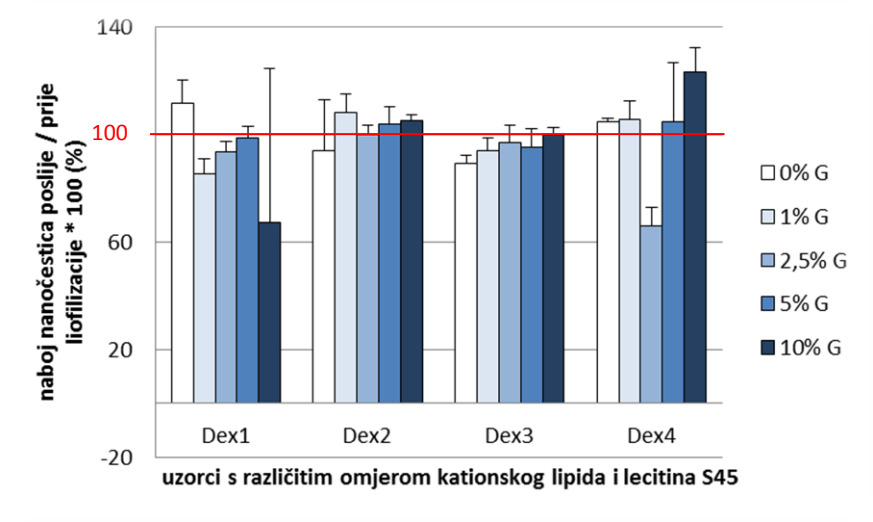
Slika 10. Stupanj očuvanja veličine lipidno-alginatnih nanočestica pripravljenih s lecitinom S100 liofiliziranih u prisustvu glukoze (**a**) ili trehaloze (**b**) u koncentraciji od 1, 2,5, 5 i 10 % (*m/V*).
Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3) do vrijednosti 1500 %.

Slični rezultati dobiveni su i u slučaju optimiranja procesa liofilizacije lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom, pri kojem se također trehaloza pokazala boljim krio/lioprotektorom od glukoze, a očuvanje svojstava nanočestica nakon liofilizacije postignuto je u prisustvu trehaloze u koncentraciji od 2,5 % (*m/V*) (Hafner i sur., 2011). Već su navedena svojstva trehaloze kojima se može objasniti njena efikasnost kao krio/lioprotektora. Prednost trehaloze su njezina niska higroskopnost, slaba kemijska reaktivnost, visoka temperatura staklastog prijelaza, svojstvo ne stvaranja internih vodikovih

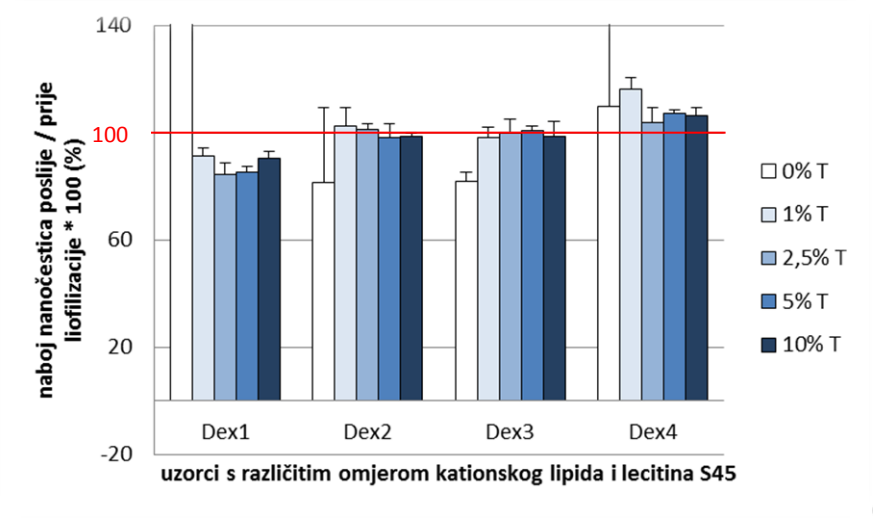
veza, a stvaranje fleksibilnijih vodikovih veza s nanočesticama tijekom liofilizacije (Crowe i sur., 1996; Abdelwahed i sur., 2006a; Hafner i sur., 2011).

Mjerenjem zeta-potencijala fotonskom korelacijskom spektroskopijom može se procijeniti je li došlo do promjene na površini nanočestica tijekom liofilizacije. Također se može procijeniti i interakcija između nanočestica i ekscipijensa (Fonte, 2016.). Tako su primjerice, De Chasteigner i suradnici, stvaranjem vodikovih veza između površine nanočestica i ekscipijensa objasnili promjenu zeta potencijala sa −40,9 mV na −20,4 mV nakon dodatka saharoze u koncentraciji od 10 % (*m/V*) (De Chasteigner i sur., 1996).

Uspješnost očuvanja zeta-potencijala nanočestica nakon liofilizacije u prisustvu krioprotektora (glukoze ili trehaloze) i rehidracije u ishodnom volumenu suspenzije prikazana je na Slici 11. i Slici 12. U slučaju nanočestica pripremljenih s lecitinom S45, odstupanje zeta-potencijala nakon liofilizacije i rekonstitucije u odnosu na zeta-potencijal prije liofilizacije iznosi do 34,2 % kod uzoraka s glukozom, odnosno do 16,0 % kod uzoraka s trehalozom. U slučaju nanočestica pripremljenih s lecitinom S100, odstupanje iznosi redom do 45,8 %, odnosno do 48,6 %. Iz navedenog se može zaključiti da je najbolje očuvanje zeta-potencijala postignuto u slučaju liofilizacije nanočestica pripravljenih s lecitinom S45, u prisustvu trehaloze kao krioprotektora.

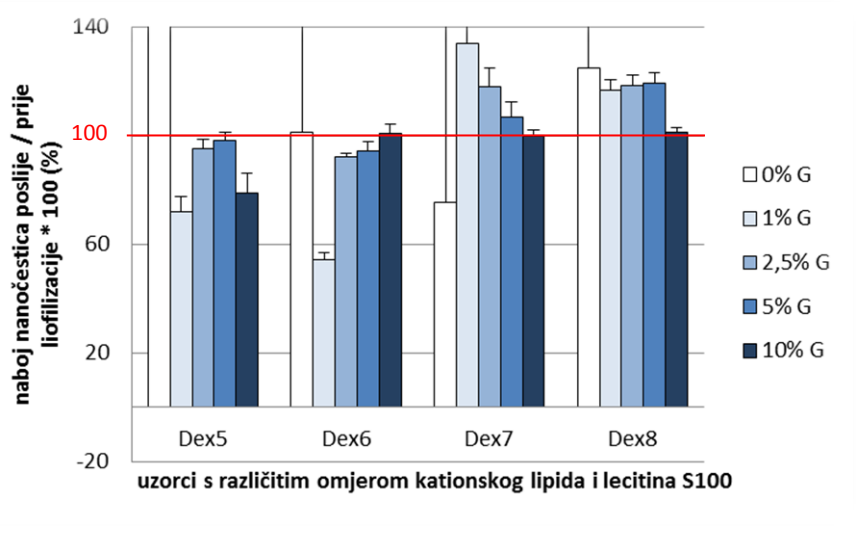


(**a**)

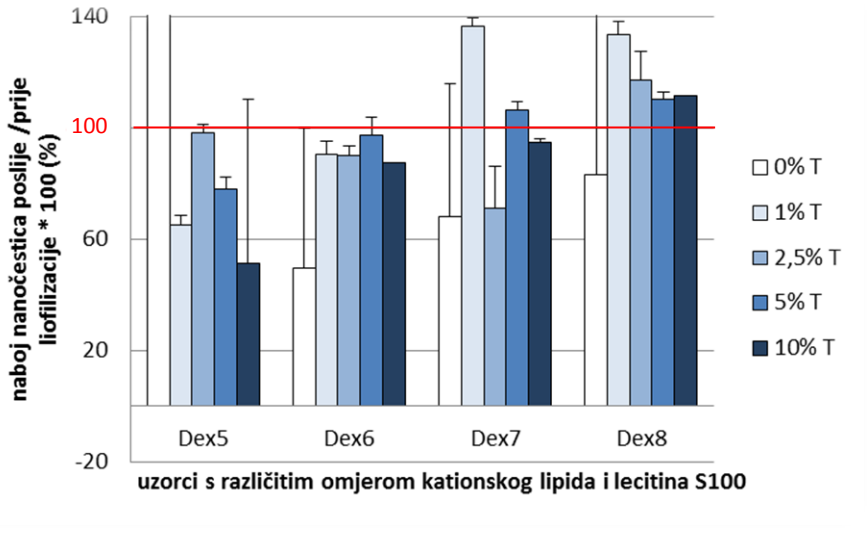


(**b**)

Slika 11. Stupanj očuvanja zeta-potencijala lipidno-alginatnih nanočestica pripravljenih s lecitinom S45 liofiliziranih u prisustvu glukoze (**a**) ili trehaloze (**b**) u koncentraciji od 1, 2,5, 5 i 10 % (*m/V*). Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3) do vrijednosti 140 %.



(**a**)



(**b**)

Slika 12. Stupanj očuvanja zeta-potencijala lipidno-alginatnih nanočestica pripravljenih s lecitinom S100 liofiliziranih u prisustvu glukoze (**a**) ili trehaloze (**b**) u koncentraciji od 1, 2,5, 5 i 10 % (*m/V*). Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3) do vrijednosti 140 %.

Uloga krio/lioprotektora tijekom liofilizacije je i očuvanje strukture liofilizata te sprječavanje njegovog kolapsa. Nakon desolvatacije liofilizirani uzorak, odnosno kolač, trebao bi zauzimati jednaki volumen kao i uzorak prije liofilizacije. No, iz izgleda liofilizata ne može se procijeniti sveukupni krio/lioprotektivni učinak, odnosno očuvanje svojstava nanočestica. Tako je primjerice manitol, koji je često upotrebljavani ekscipijens u liofilizaciji, prikladan za očuvanje strukture liofilizata, ali je slab lioprotektor (Huang, 2002).

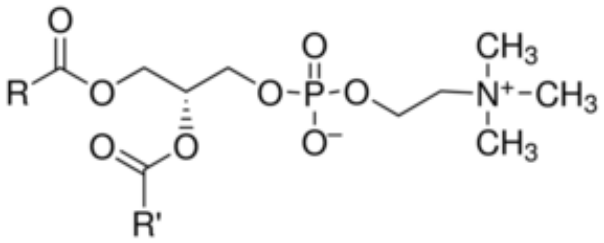
Na Slici 13. prikazani su reprezentativni liofilizati suspenzije nanočestica liofilizirane uz dodatak glukoze, odnosno trehaloze. Vidljivo je da je u prisustvu glukoze struktura kolača narušena te je došlo do kolapsa, za razliku od liofilizata s trehalozom koji zauzima pravilan volumen i jednak volumen kao i suspenzija nanočestica prije liofilizacije. Jednako zapažanje izneseno je u istraživanju Hafner i suradnika (Hafner i sur., 2011). Liofilizati s narušenom strukturom u pravilu sadržavaju veću količinu ostatne vlage te se teže rekonstituiraju (Konan i sur., 2002).



Slika 13. Reprezentativni liofilizirani uzorci lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom masenog omjera kationskog lipida i lecitina 1:50, pripremljeni s lecitinom S100 (uzorak Dex7) i liofilizirani s glukozom (desno) i trehalozom (lijevo), 2,5 % (*m/V*).

4.3. Utjecaj tipa lecitina na fizička svojstva nanočestica poslije liofilizacije

Lecitin je smjesa lipida i to uglavnom fosfolipida (Slika 14.), dok ostatak smjese čine masne kiseline, trigliceridi i ugljikohidrati. Sastav lecitina ovisi o izvoru iz kojeg je izoliran (većinom je to soja ili jaje), te o stupnju pročišćavanja. Lecitin se primjuje u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. U farmaceutici nalazi upotrebu kao emulgator, disperzijsko i solubilizacijsko sredstvo u ljekovitim pripravcima za parenteralnu primjenu, parenteralnim nutritivnim pripravcima i u oblicima za topikalnu primjenu (Rowe i sur, 2006).



Slika 14. Struktura L-α-fosfatidilkolina (Preuzeto sa www.sigmaaldrich.com)

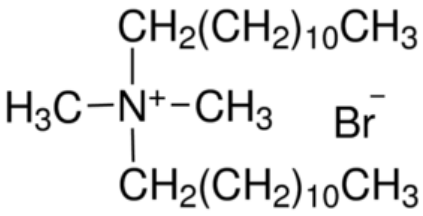
U pripremi lipidno-alginatnih nanočestica korištena su dva tipa lecitina – lecitin S45 i lecitin S100. Slovo "S" označava izvor iz kojeg je lecitin dobiven, u ovome slučaju to je soja. Broj nakon slova govori o udjelu fosfatidilkolina u smjesi lipida: lecitin S45 sadrži oko 45 % fosfatidilkolina, dok lecitin S100 sadrži više od 94 % fosfatidilkolina (www.lipoid.com). Navedeni lecitini razlikuju se i u sadržaju sastavnica o kojima ovisi naboj. Fosfatidilkolin je neutralan pa negativnom naboju smjese lecitina doprinose negativno nabijene slobodne masne kiseline. Tako je lecitin S45 ukupnog negativnog naboja, dok je lecitin S100 neutralniji. U istraživanju lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom Hafner i suradnici koristili su različite tipove lecitina u njihovoj izradi: lecitin S100, lecitin S75 i lecitin S45. Zeta-potencijal lipidnih nanočestica pripravljenih injektiranjem etanolne otopine lecitina S100 i etanolne otopine lecitina S45 u pročišćenu vodu iznosio je redom -12,4 ± 2,8 mV i -33,3 ± 1,5 mV (Hafner i sur., 2009).

Očuvanje veličine nanočestica nakon liofilizacije nije ovisilo o tipu lecitina korištenom u pripravi nanočestica (Slika 9. i Slika 10). Međutim, bolje očuvanje zeta-potencijala nakon liofilizacije postignuto je kod nanočestica pripravljenih s lecitinom S45 u odnosu na nanočestice pripravljene s lecitinom S100, posebice kada je kao krio/lioprotektor korištena trehaloza (Slika 11. i Slika 12.).

4.4. Utjecaj masenog omjera kationskog lipida i lecitina na fizička svojstva nanočestica poslije liofilizacije

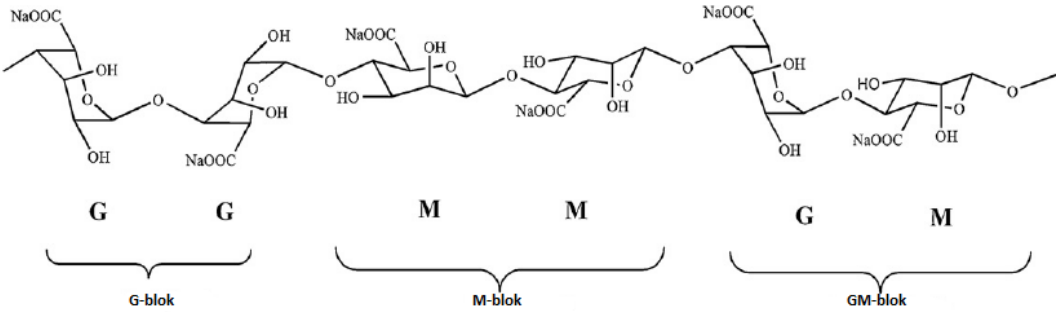
Kationski lipid DMDO-Br (Slika 15.) korišten je da bi se omogućila elektrostatska interakcija između lecitina i alginata. DMDO-Br je kvaterni amonijev spoj s dugim alkilnim

lancem 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).



Slika 15. Struktura dimetildioktadecilamonij-bromida (Preuzeto sa www.sigmaaldrich.com)

Alginat je linearni koplimer blokova β-D-manuronata (M) i α-L-glukuronata (G) povezanih 1,4-vezama (Slika 16.). U farmaceutskoj industriji koristi se kao stabilizirajuće i suspendirajuće sredstvo, punilo u tabletama, sredstvo za povećanje viskoznosti te za postizanje kontroliranog oslobađanja, a u oblicima za oralnu i topikalnu primjenu (Rowe i sur, 2006). Zbog svoje biokompatibilnosti, male toksičnosti, relativno lake dobavljivosti, niske cijene i svojstva geliranja, intenzivno se istražuje za biomedicinsku upotrebu. Pogotovo je atraktivna upotreba alginatnih hidrogelova kao nosača lijekova (Lee i Mooney, 2012).



Slika 16. Struktura alginata (Prilagođeno iz Daemi i sur., 2013)

U prethodnim istraživanjima pokazano je da je naboj lipidnih nanočestica pripravljenih samo od lecitina negativan (Hafner i sur., 2009), a lipidnih nanočestica od

lecitina i kationskog lipida pripravljenih u odgovarajućem omjeru pozitivan (Ćorić, 2017; Plantić, 2017). Dakle, dodatak kationskog lipida je neophodan za omogućavanje ionske interakcije između lipidne smjese i polimera alginata koja rezultira nastajanjem lipidno-alginatnih nanočestica. Povećanjem masenog omjera kationskog lipida i lecitina zamijećeno je povećanje veličine nanočestica i negativnog zeta-potencijala (Slika 8.), što je u skladu s već prethodno provedenim istraživanjima (Ćorić, 2017; Plantić, 2017). U pravilu, očuvanje veličine i zeta-potencijala nanočestica nakon liofilizacije nije ovisilo o masenom omjeru kationskog lipida i lecitina korištenom u pripravi nanočestica (Slika 9. - 12.). Iznimka je primjer očuvanja veličine lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom nakon liofilizacije u prisustvu glukoze u slučaju nanočestica pripravljenih s lecitinom S45, jedino pri masenom omjeru lecitina i kationskog lipida od 7:50, i pri koncentraciji glukoze od 5 i 10 % (*m/V*).

5. ZAKLJUČCI

- Očuvanje veličine lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom nakon liofilizacije u prisustvu trehaloze postignuto je pri koncentraciji trehaloze od 10 % (*m/V*), neovisno o tipu lecitina i omjeru lecitina i kationskog lipida korištenim u pripravi nanočestica.

- Očuvanje veličine lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom nakon liofilizacije u prisustvu glukoze postignuto je samo u slučaju nanočestica pripravljenih s lecitinom S45 pri masenom omjeru lecitina i kationskog lipida od 7:50, i to pri koncentraciji glukoze od 5 i 10 % (*m/V*).

- Najbolje očuvanje zeta-potencijala nanočestica postignuto je u slučaju liofilizacije nanočestica pripravljenih s lecitinom S45 i uz dodatak trehaloze kao krio/lioprotektora.

- Liofilizacija suspenzije nanočestica uz dodatak trehaloze kao krio/lioprotektora rezultirala je lofilizatom koji je zauzimao volumen jednak volumenu suspenzije prije liofilizacije. U slučaju liofilizacije uz dodatak glukoze kao krio/lioprotektora, zabilježen je kolaps strukture liofilizata.

6. LITERATURA

Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H. A pilot study of freeze drying of poly(epsiloncaprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization. *Int J Pharm*, 2006b, 17, 178–188.

Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006c, 63, 87–94.

Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying od nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Ad Drug Deliver Rev*, 2006a, 58, 1688-1713.

Allison SD, Molina MDC, Anchordoquy TJ. Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the praticle isolation hypothesis. *Biochem Biophys Acta*, 2000, 1468, 127-138.

Almalika A, Alradwana I, Kalamb MA, Alshamsan A. Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating. *Saudi Pharm J*, 2017., u tisku, DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2016.12.008

Batzri S, Korn ED. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim Biophys Acta*, 1973, 298, 1015–1019.

Bejraphaa P, Surassmoa S, Choib MJ, Nakagawac K, Mina SG. Studies on the role of gelatin as a cryo- and lyo-protectant in the stability of capsicum oleoresin nanocapsules in gelatin matrix. *J Food Eng, 2011, 105, 320-331.*

Bozdag S, Dillen K, Vandervoort J, Ludwig A. The effect of freeze-drying with different cryoprotectants and gamma-irradiation sterilization on the characteristics of ciprofloxacin HCl-loaded poly(D,L-lactide-glycolide) nanoparticles. *J Pharmacy Pharmacology*, 2005, 57, 699-707.

Cavalli R, Caputo O, Gasco MR. Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 10, 305-309.

Chacón M, Molpeceres J, Berges L, Guzmán M, Aberturas MR. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(d,l lactide–glycolide) carriers. *Int J Phar Scie*, 1999, 8, 99-107.

Chen H, Chang X, Du D, Liu W, Liu J, Weng T, Yang Y, Xu H, Yang X. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *J Control Release*, 2006, 296–306.

Crowe LM, Reid DS, Crowe JH. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophis J*, 1996, 71, 2087-2093.

Cui Z, Hsu CH, Mumper RJ. Physical characterization and macrophage cell uptake of mannan-coated nanoparticles. *Drug Dev Ind Pharm*, 2003, 29, 689–700.

Ćorić L, Biokompatibilne lipidno-alginatne nanočestice s velikom uspješnošću uklapanja deksametazona. Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017.

Daemi H, Barikani M, Barmar M. Compatible compositions based on aqueous polyurethane dispersions and sodium alginate. *Carbo Pol*, 2013, 92, 490-496.

De Chasteigner S, Cavé G, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F. Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: a feasibility study. *Drug Dev Res*, 1996, 38, 116-124.

De Jaeghere F, Allémann E, Leroux JC, Stevels W, Feijen J, Doelker E, Gumy R. Formulation and lyoprotectant of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake. *Pharm Research*, 1999, 16, 859–866.

Dexamethasonum, 2016., http://www.halmed.hr/, pristupljeno 26.11.2016.

Fonte P, Reis S, Sarmento B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *J Control Release*, 2016, 225, 75-86.

Fonte P, Soares S, Costa A, Andrade JC, Seabra V, Reis S, Sarmento B. Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying. *Biomatter*, 2012, 2, 329-339.

Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998, 45, 221-229.

Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85, 427-443.

Hafner A, Dűrrigl M, Pepić I, Filipović-Grčić J. Short- and Long-Term Stability of Lyophilised Melatonin-Loaded Lecithin/Chitosan Nanoparticles. *Chem Pharm*, 2011, 59, 1117—1123.

Hinirichs WLJ, Prinsen MG, Frijlink HW. Inulin glasses for the stabilization of therapeuti proteins. *Int J Pharm*, 2001, 215, 163-174.

Hinirichs WLJ, Sandersb NN, De Smedtb SC, Demeesterb J, Frijlinka HW. Inulin is a promising cryo- and lyoprotectant for PEGylated lipoplexes. *J Contr Rel*, 2005, 103, 465-479.

Huang SL, Hamilton A, Pozharski E, Naharaj A, Klegerman M, McPherson D, MacDonald R. Physical correlates of the ultrasonic reflectivity of lipid dispersions as diagnostic contrast agents. *Ultrasound Med Bio*, 2002, 28, 339-348.

Jeevanandam J, Chan YS, Danquah MK. Nano-formulations of drugs: Recent developments, impact and challenges. *Biochimie*, 2016, 128-129, 99-112.

Kasper JC, Friess W. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biophar*, 2011, 78, 248-263.

Konan YN, Gurny R, Allémann E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *Int J Pharm*, 2002, 233, 239–252.

Lecithin, http://www.lipoid.com, pristupljeno 16.3.2017.

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

Liu L, Ma P, Wang H, Zhang H, Sun H, Wang C, Song C, Leng X, Kong D, Ma G. Immune responses to vaccines delivered by encapsulation into and/or adsorption onto cationic lipid-PLGA hybrid nanoparticles. *J Cont Rel*, 2015, 225, 230-239.

Ma P, Li T, Xing H, Wang H, Sun Y, Sheng X, Wang K. Local anesthetic effects of bupivacaine loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Bio Pharm*, 2017, 89, 689-695.

Mandal B, Bhattacharjee H, Mittal N, Sah H, Balabathula P, Thoma LA, Wood GC. Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomed Nanoteh Bio Med*, 2013, 9, 474-491.

Mandal B, Mittal NK, Balabathula P, Thoma LA, Wood GC. Development and in vitro evaluation of core–shell type lipid–polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib in non-small cell lung cancer. *Eur J Phar Sci*, 2016, 81, 162-171.

Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Del Rew*, 2001, 47, 165-196.

Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles – A Review. *Tropical J Pharma Res*, 2006, 5, 561-573.

Muzzio CR, Dini GD. Simulation of freezing step in vial lyophilization using finite element method. *Comp Chem Eng*, 2011, 35, 2274-2283.

Nireesha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, Niranjan Babu M, Lavakumar V. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *Inter J Nove Tren Pharm Sci*, 2013, 3, 87-98.

Pikal MJ, Shah S, Roy ML, Putman R. The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *Int J Pharm*, 1990, 60, 203-207.

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

Product information, Dimethyldioctadecylammonium bromide, http://www.sigmaaldrich.com, pristupljeno 16.3.2017.

Rey L, May JC. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products, 3rd Edt. U: Glimpses into the realm of freeze-drying: Classical issues and new ventures. Zug, Švicarska, Informa, 2010, str. 1-28.

Rose F, Wern JE, Ingvarsson PT, Weet M, Andersen P, Follmann F, Foged C. Engineering of a novel adjuvant based on lipid-polymer hybrid nanoparticles: A quality-by-design approach. J Cont Rel, 2015, 210, 48-57.

Rowe RC, Sheshey PJ, Owen SC. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th Edt. U: Monographs. London, Pharmaceutical Press, Eashington DC, American Pharmacists Association, 2006, str. 21-23. i 409-411.

Saez A, Guzman M, Molpeceres J, Aberturas MR. Freeze-drying of polycaprolactone and poly (d,l-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50, 379–387

Sameti M, Bohr G, Ravi Kumar MNV, Kneuer C, Bakowsky U, Nacken M, Schmidt H, Lehr CM. Stabilization by freeze-drying of cationically modified silica nanoparticles for gene delivery. *Int J Pharm*, 2003, 266, 51–60.

Schwarz C, Mehnert W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm*, 1997, 157, 171–179.

Seijo B, Fattal E, Robloto-Treupel L, Couvreur P. Design of nanoparticles of less than 50nm diameter: preparatio, characterization and drug loading. *Int J Pharm* 1990, 61, 1-7.

Shahgaldian P, Gualbert J, Aïssa K, Coleman AW. A study of the freeze-drying conditions of calixarene based solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 55, 181-184.

Shahgaldian P, Gualbert J, Aïssa K, Coleman AW. A study of the freeze-drying conditions of calixarene based solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Bioopharm*, 2003, 5, 181-184.

Sonvico F, Cagnani A, Rossi A, Motta S, Di Bari MT, Cavatorta F, Alonso MJ, Deriu A, Colombo P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *Int J Phar*, 2006, 324, 67-73.

Soppimath KS, Aminabhavi TM, R Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Contr Rel*, 2001, 70, 1-21.

Tang X, Pikal M, Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm Res*, 2004, 21, 191-200.

Varshoosaz J, Eskandari S, Tabbakhian M. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants. *Carbo Polymers*, 2012, 88, 1157-1163.

Wagner A, Vorauer-Uhl K, Katinger H. Liposome produced in a pilot scale: prodution, purification and effciency aspects. *Eur J Pharm Biopharm*, 2002, 54, 213-219.

Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 2000, 203, 1-60.

Williams NA i Polli GP. The Liophilization of Pharmaceuticals: A Literature Review. *J Pharm Scie Teh*, 1984, 38, 48-60.

Zeng SQ, Chen YZ, Chen Y, Liu H. Lipid–polymer hybrid nanoparticles for synergistic drug delivery to overcome cancer drug resistance. *New J Chem*, 2017, 41, 1518-1525.

Zhang L, Liu L, Qian Y, Chen Y. The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM*). Eur J Phar Bio,* 2008, 69, 750–759.

Zhang RX, Ahmed T, Li LY, Li J, Abbasi AZ, Wu XY. Design of nanocarriers for nanoscale drug delivery to enhance cancer treatment using hybrid polymer and lipid building blocks. *Nanoscale*, 2016, 9, 1334-1355.

7. SAŽETAK

Nanočestice kao nosači lijekova predstavljaju nove terapijske sustave kojima se može osigurati ciljana/lokalizirana dostava i kontrolirano oslobađanje lijeka, no također nailaze na ograničenja zbog fizičke i kemijske nestabilnosti. Da bi se poboljšala stabilnost suspenzija nanočestica provodi se sušenje. Kao jedna od najučinkovitijih metoda sušenja koloidnih sustava pokazala se liofilizacija. Proces liofilizacije koloidnih terapijskih sustava potrebno je optimirati kako bi se nanočestice zaštitile od stresa tijekom liofilizacije. U tu svrhu koriste se različiti krio/lioprotektori.

Cilj ovog rada bio je ispitati krio/lioprotektivni učinak glukoze i trehaloze (1 – 10 %, *m*/*V*) pri liofilizaciji suspenzije lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom. Kao parametri uspješnosti očuvanja fizičkih svojstava mjereni su veličina, indeks polidisperznosti te zeta-potencijal nanočestica.

Pripremljene su lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom temeljem ionske interakcije lipidne (lecitin i kationski lipid) smjese i alginata. Nanočestice su pripremljene s dva različita tipa lecitina (lecitin S45 i lecitin S100) i s različitim masenim omjerima kationskog lipida i lecitina (od 0,7:50 do 9:50) te su karakterizirane s obzirom na veličinu, polidisperznost i zeta-potencijal. Veličina nanočestica ostala je očuvana nakon liofilizacije u prisustvu trehaloze pri koncentraciji od 10 % (*m/V*), neovisno o tipu lecitina i masenom omjeru lectina i kationskog lipida. U prisustvu glukoze veličina nanočestica ostala je očuvana samo u slučaju liofilizacije nanočestica pripravljenih s lecitinom S45 pri masenom omjeru lecitina i kationskog lipida od 7:50, i to pri koncentraciji glukoze od 5 i 10 % (*m/V*). Najbolje očuvanje zeta-potencijala nanočestica postignuto je u slučaju liofilizacije nanočestica pripravljenih s lecitinom S45 i uz dodatak trehaloze kao krio/lioprotektora. Liofilizacija suspenzije nanočestica uz dodatak trehaloze kao krio/lioprotektora rezultirala je lofilizatom koji je zauzimao volumen jednak volumenu suspenzije prije liofilizacije. U slučaju liofilizacije uz dodatak glukoze kao krio/lioprotektora, zabilježen je kolaps strukture liofilizata. Provedena preliminarna ispitivanja upućuju na zaključak da je trehaloza bolji krio/lioprotektor od glukoze u procesu liofilizacije lipidno-alginatnih nanočestica.

8. SUMMARY

Nanoparticles as drug carriers can provide targeted/localized delivery and controlled drug release, but also encounter limitations due to physical and chemical instability. To improve the stability of suspension of nanoparticles, drying procedures are carried out. Freeze-drying has been shown as one of the most efficient methods of colloidal system drying. The process of freeze-drying of colloidal drug delivery system needs to be optimized in order to protect nanoparticles from stress generated during freezing and drying steps. For this purpose, different cryo/lyoprotectants are used.

The aim of this work was to investigate the cryo/lyoprotective effect of glucose and trehalose (1-10 %, *w/V*) during freeze-drying of dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles suspension. In order to evaluate the effectiveness of selected cryo/lyoprotectants, nanoparticles were characterised in terms of size, polydispersity index and zeta-potential before and after the freeze-drying.

Dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles were prepared by ionic interaction of lipid (lecithin and cationic lipid) mixture and alginate. Nanoparticles were prepared using two different types of lecithin (lecithin S45 or lecithin S100) and at different cationic lipid-to-lecithin weight ratios (from 0,7:50 to 9:50). Size of nanoparticles remained preserved after freeze-drying in the presence of trehalose at the concentration of 10 % (*w/V*), for both lecithin types and all cationic lipid-to-lecithin weight ratios used. In the presence of glucose, nanoparticles size remained preserved only in the case of freeze-drying of nanoparticles prepared with lecithin S45 at cationic lipid-to-lecithin weight ratio of 7:50, and glucose at the concentration of 5 and 10% (*w/V*). The best preservation of zeta-potential of nanoparticles was achieved in the case of freeze-drying of nanoparticles prepared with lecithin S45 and with the addition of trehalose as a cryo/lioprotectant. Freeze-drying of suspension of nanoparticles in the presence of trehalose as a cryo/lioprotectant resulted in lyopilisate which occupied a volume equal to the volume of the suspension prior to freeze-drying. In the case of freeze-drying in the presence of glucose as a cryo/lioprotectant, collapse of the lyophilisate structure was observed. Conducted preliminary studies suggested that trehalose was better cryo/lyoprotectant than glucose in the freeze-drying process of dexamethasone-loaded lipid/ alginate nanoparticles.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

LIOFILIZACIJA LIPIDNO-ALGINATNIH NANOČESTICA S DEKSAMETAZONOM

Vedrana Habuš

SAŽETAK

Nanočestice kao nosači lijekova predstavljaju nove terapijske sustave kojima se može osigurati ciljana/lokalizirana dostava i kontrolirano oslobađanje lijeka, no također nailaze na ograničenja zbog fizičke i kemijske nestabilnosti. Da bi se poboljšala stabilnost suspenzija nanočestica provodi se sušenje. Kao jedna od najučinkovitijih metoda sušenja koloidnih sustava pokazala se liofilizacija. Proces liofilizacije koloidnih terapijskih sustava potrebno je optimirati kako bi se nanočestice zaštitile od stresa tijekom liofilizacije. U tu svrhu koriste se različiti krio/lioprotektori.
Cilj ovog rada bio je ispitati krio/lioprotektivni učinak glukoze i trehaloze (1 – 10 %, *m/V*) pri liofilizaciji suspenzije lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom. Kao parametri uspješnosti očuvanja fizičkih svojstava mjereni su veličina, indeks polidisperznosti te zeta-potencijal nanočestica.
Pripremljene su lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom temeljem ionske interakcije lipidne (lecitin i kationski lipid) smjese i alginata. Nanočestice su pripremljene s dva različita tipa lecitina (lecitin S45 i lecitin S100) i s različitim masenim omjerima kationskog lipida i lecitina (od 0,7:50 do 9:50) te su karakterizirane s obzirom na veličinu, polidisperznost i zeta-potencijal. Veličina nanočestica ostala je očuvana nakon liofilizacije u prisustvu trehaloze pri koncentraciji od 10 % (*m/V*), neovisno o tipu lecitina i masenom omjeru lectina i kationskog lipida. U prisustvu glukoze veličina nanočestica ostala je očuvana samo u slučaju liofilizacije nanočestica pripravljenih s lecitinom S45 pri masenom omjeru lecitina i kationskog lipida od 7:50, i to pri koncentraciji glukoze od 5 i 10 % (*m/V*). Najbolje očuvanje zeta-potencijala nanočestica postignuto je u slučaju liofilizacije nanočestica pripravljenih s lecitinom S45 i uz dodatak trehaloze kao krio/lioprotektora. Liofilizacija suspenzije nanočestica uz dodatak trehaloze kao krio/lioprotektora rezultirala je lofilizatom koji je zauzimao volumen jednak volumenu suspenzije prije liofilizacije. U slučaju liofilizacije uz dodatak glukoze kao krio/lioprotektora, zabilježen je kolaps strukture liofilizata. Provedena preliminarna ispitivanja upućuju na zaključak da je trehaloza bolji krio/lioprotektor od glukoze u procesu liofilizacije lipidno-alginatnih nanočestica.

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

Rad sadrži: 43 stranica, 16 grafičkih prikaza, 3 tablice i 61 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Liofilizacija; Krioprotektor; Lioprotektor; Nanočestice; Lecitin; Alginat; Glukoza; Trehaloza.

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. Sandra Šupraha Goreta, *docentica* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: travanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

FREEZE-DRYING OF DEXAMETHASONE-LOADED LIPID/ALGINATE NANOPARTICLES

Vedrana Habuš

SUMMARY

Nanoparticles as drug carriers can provide targeted/localized delivery and controlled drug release, but also encounter limitations due to physical and chemical instability. To improve the stability of suspension of nanoparticles, drying procedures are carried out. Freeze-drying is one of the most efficient methods of colloidal system drying. The process of freeze-drying of colloidal drug delivery system needs to be optimized in order to protect nanoparticles from stress generated during freezing and drying steps. For this purpose, different cryo/lyoprotectants are used.
The aim of this work was to investigate the cryo/lyoprotective effect of glucose and trehalose (1-10 %, *w/V*) during freeze-drying of dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles suspension. In order to evaluate the effectiveness of selected cryo/lyoprotectants, nanoparticles were characterised in terms of size, polydispersity and zeta-potential before and after the freeze-drying.
Dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles were prepared by ionic interaction of lipid (lecithin and cationic lipid) mixture and alginate. Nanoparticles were prepared using two different types of lecithin (lecithin S45 or lecithin S100) and at different cationic lipid-to-lecithin weight ratios (from 0,7:50 to 9:50). Size of nanoparticles remained preserved after freeze-drying in the presence of trehalose at the concentration of 10% (*w/V*), for both lecithin types and all cationic lipid-to-lecithin weight ratios used. In the presence of glucose, nanoparticles size remained preserved only in the case of freeze-drying of nanoparticles prepared with lecithin S45 at cationic lipid-to-lecithin weight ratio of 7:50, and glucose at the concentration of 5 and 10% (*w/V*). The best preservation of zeta-potential of nanoparticles was achieved in the case of freeze-drying of nanoparticles prepared with lecithin S45 and with the addition of trehalose as a cryo/lioprotectant. Freeze-drying of suspension of nanoparticles in the presence of trehalose as a cryo/lioprotectant resulted in lyophilisate which occupied a volume equal to the volume of the suspension prior to freeze-drying. In the case of freeze-drying in the presence of glucose as a cryo/lioprotectant, collapse of the lyophilisate structure was observed. Conducted preliminary studies suggested that trehalose was better cryo/lyoprotectant than glucose in the freeze-drying process of dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles.

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

Thesis includes: 43 pages, 16 figures, 3 tables and 61 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Freeze-drying; Cryoprotectant; Lyoprotectant; Nanoparticles; Lecitine; Alginate; Glucose; Trehalose.

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
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2017.