Razvoj lipidno-alginatnih nanočestica za nazalnu primjenu lipofilnih lijekova

Gomboc, Iva

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:163:435683

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







Iva Gomboc

Razvoj lipidno-alginatnih nanočestica za nazalnu primjenu lipofilnih lijekova

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Najviše zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na stručnom vodstvu, uloženom trudu, savjetima, susretljivosti i potpori tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Nadalje, zahvaljujem Biseri Jurišić Dukovski, mag. pharm., Marini Juretić, mag. pharm. te kolegici Luciji Ćorić na pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Također hvala svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na ugodnom vremenu provedenom u prostorijama Zavoda.

I na kraju, hvala obitelji i prijateljima na podršci tijekom cijelog studiranja.

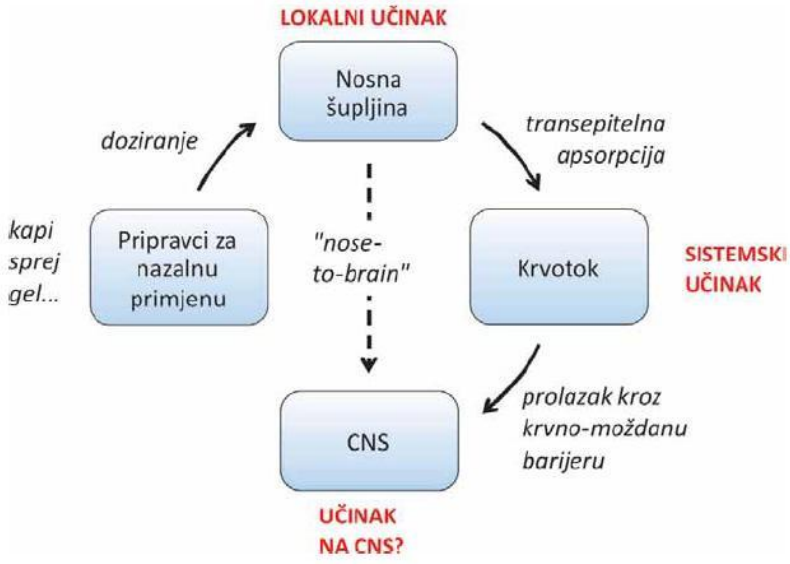
SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Nazalna primjena lijekova 1
1.2. Nanočestice kao terapijski sustavi za nazalnu primjenu 2
1.2.1. Materijali za izradu nanočestica za nazalnu primjenu 3
1.3. Antihistaminici 12
1.3.1. H_1- antihistaminici 12
1.3.2. Nazalna primjena H_1- antihistaminika 14
1.3.3. Loratadin 15
2. OBRAZLOŽENJE TEME 18
3. MATERIJALI I METODE 20
3.1. MATERIJALI 20
3.2. METODE 21
3.2.1. Razvoj i priprema nanočestica 21
3.2.2. Određivanje veličine i zeta-potencijala nanočestica 22
3.2.3. Uvjeti uzgoja stanične kulture 22
3.2.4. Ispitivanje vijabilnosti stanica 22
3.2.5. Određivanje sadržaja uklopljenog lijeka 23
4. REZULTATI I RASPRAVA 24
4.1. Razvoj nanočestica 24
4.2. Veličina i zeta-potencijal nanočestica s loratadinom 34
4.3. Uspješnost uklapanja loratadina u nanočestice 35
5. ZAKLJUČCI 38
6. LITERATURA 39
7. SAŽETAK/SUMMARY 45
Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

1. UVOD

1.1. Nazalna primjena lijekova

Nosna šupljina ima specifične anatomske, fiziološke i histološke značajke zahvaljujući kojima je nazalnom primjenom lijeka moguće postići lokalni ili sistemski učinak, ali i direktnu dostavu u središnji živčani sustav (Slika 1) (Hafner i sur., 2014). Većina registriranih nazalnih pripravaka koristi se za lokalno liječenje bolesti nosne sluznice, ali se sve više razvijaju pripravci s drugim namjenama.



Slika 1. Mogućnosti i ciljevi nazalne primjene lijekova (preuzeto iz Hafner i sur., 2014)

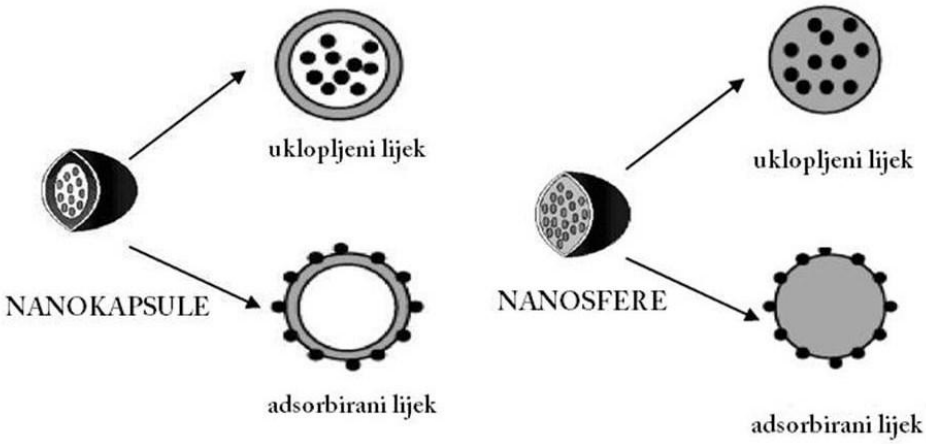
Nosna sluznica ima veliku površinu i dobro je prokrvljena što osigurava brzu apsorpciju i brz početak djelovanja lipofilnih lijekova. Proteolitička aktivnost u nosnoj šupljini je niža u odnosu na probavni sustav pa se nazalno primjenjuju i potentni peptidi i proteini (Pallagi i sur., 2015; Yu i sur., 2015). Zbog povezanosti epitelnih stanica s limfoidnim tkivom nazalnom primjenom cjepiva moguće je lako izazvati i lokalni i sistemski imunosni odgovor. Prednost nazalnih cjepiva nad intravenskim je i neinvazivnost primjene čime je poboljšana suradljivost pacijenta (Kammona i Kiparissides, 2012).

Uz brojne prednosti, najveći nedostatak nazalne primjene je mehanizam mukocilijarnog čišćenja kojim se kroz 30 minuta uklanja pripravak s nosne sluznice, čime je vrijeme na raspolaganju za djelovanje/apsorpciju nazalno primijenjenog lijeka ograničeno. Također, volumen pripravka koji se može primijeniti nazalno manji je od 0,2 ml. Primjenom većih volumena može doći do curenja pripravka iz nosa (Sherafudeen i Vasantha, 2015).

U svrhu postizanja lokalnog učinka u liječenju i prevenciji bolesti nosne sluznice, često se lijekovi primjenjuju nazalno. Prednosti takve primjene su: brzo djelovanje i otklanjanje simptoma, izbjegnut je prvi prolazak kroz jetru, potrebne su niže doze lijeka u odnosu na oralnu i parenteralnu primjenu pa je smanjen rizik od sistemskih nuspojava, a moguće je točno i precizno doziranje. Za postizanje sistemskog učinka kod lijekova nedovoljne bioraspoloživosti nakon oralne i parenteralne primjene (npr. peptidni lijekovi) te lijekova kod kojih je važno brzo postizanje terapijskog učinka (npr. opioidni analgetici, antimigrenici), nosna sluznica se nameće kao alternativni put primjene. Apsorpcija lijeka ovisi o svojstvima nosne sluznice te fizičko-kemijskim svojstvima lijeka i formulacije, a zbog brze apsorpcije lipofilnih lijekova terapijski učinak je postignut unutar 30 minuta od primjene. Zbog preciznog doziranja smanjen je rizik od predoziranja i omogućeno je samoliječenje. Još jedna velika prednost nazalne primjene je mogućnost direktne dostave lijeka do središnjeg živčanog sustava zaobilazeći krvno-moždanu barijeru. Točan mehanizam prijenosa iz nosne šupljine do mozga nije u potpunosti razjašnjen, ali poveznica su olfaktorni živac u njušnoj regiji te trigeminalni živac čiji se završeci protežu gotovo do površine epitela (Hafner i sur., 2014).

1.2. Nanočestice kao terapijski sustavi za nazalnu primjenu

Nanočestice su čvrste koloidne čestice veličine od 1 do 1000 nm. Građene su od polimernih ili lipidnih materijala, ili njihove kombinacije, u kojima je djelatna tvar uklopljena ili adsorbirana na površini. Ovisno o načinu pripreme, nanočestice se dijele na nanosfere i nanokapsule (Slika 2). Nanosfere su građene od matriksa u kojem je lijek otopljen ili dispergiran, ili on može biti adsorbiran na površini. Nanokapsule imaju polimernu ovojnicu, a lijek je smješten u unutrašnjosti čestice (Tiyaboonchai, 2003).



Slika 2. Tipovi nanočestica (preuzeto i prilagođeno prema Kumari i sur., 2010)

Nanočestice se primjenjuju kao nosači lijekova za neinvazivne puteve primjene, poput oralne, nazalne i oftalmičke primjene, ali i kao nosači cjepiva (Tiyaboonchai, 2003). Osiguravaju brojne prednosti u odnosu na konvencionalne ljekovite oblike. Uklapanjem lijeka u nanočestice moguće je zaštititi djelatnu tvar od razgradnje, ali i izbjeći njeno štetno djelovanje na organizam, te povećati topljivost slabo topljivim lijekovima. Izborom mukoadhezivnih polimera za pripremu nanočestica produljuje se vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu primjene čime je poboljšana apsorpcija i bioraspoloživost lijeka, a moguće je postići i kontrolirano i produljeno oslobađanje te ciljanu dostavu djelatne tvari (Pallagi i sur., 2015; Yu i sur., 2015).

1.2.1. Materijali za izradu nanočestica za nazalnu primjenu

U izradi nanočestica koriste se različiti prirodni i sintetski polimeri i lipidi. Odabiru se biokompatibilne mukoadhezivne tvari koje produljuju vrijeme zadržavanja nanočestica u nosnoj šupljini i osiguravaju bržu i opsežniju apsorpciju te bolji učinak (Kammona i Kiparissides, 2012). Oslobađanje lijeka iz nanočestica može biti kontrolirano difuzijom lijeka kroz polimerni/lipidni matriks, ali i brzinom razgradnje samog polimera (Yu i sur., 2015). Produljeno oslobađanje lijeka, uz produljeno zadržavanje na mjestu primjene, osigurava veću bioraspoloživost lijeka. Najčešće metode pripreme nanočestica su sušenje raspršivanjem, ionotropno geliranje, metoda dvostruke emulzije i odvajanje faza (Kammona i Kiparissides, 2012).

Alginat je prirodni polimer izoliran iz smeđih algi. To je nerazgranati anionski polisaharid građen od β-D-manuronske kiseline i α-L-glukuronske kiseline. Vodena otopina alginata može prelaziti iz sol u gel stanje ionotropnim geliranjem u prisustvu dvovalentnih kationa. Geliranje nastupa uslijed povezivanja kalcijevih iona ili drugih dvovalentnih iona s karboksilnim skupinama glukuronske kiseline. Zbog toga fizička stabilnost alginatnog gela ovisi o udjelu glukuronske kiseline u strukturi. Alginat se pokazao kao mukoadhezivni, biokompatibilni i neiritirajući polimer te se smatra sigurnim za primjenu (engl. *Generally Recognized As Safe*, GRAS) prema Agenciji za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) (Motwani i sur., 2008). Zbog sposobnosti formiranja gela koristi se za uklapanje lijekova i njihovo kontrolirano oslobađanje. Lijekovi topljivi u vodi uglavnom se oslobađaju difuzijom, a oni slabo topljivi erozijom matriksa. Alginat stvara nanogelove (veličine pora oko 5 nm) pa je oslobađanje malih molekula vrlo brzo, no fizičkim i kemijskim modifikacijama moguće je postići kontrolirano i produljeno oslobađanje lijeka (Sosnik i sur., 2014).

Kitozan je prirodni, linearni polisaharid koji se sastoji od D-glukozamina i N-acetilglukozamina. Izoliran je iz oklopa škampa i drugih morskih rakova. Biokompatibilan je i biorazgradljiv, a ima i antimikrobna svojstva. Pri pH vrijednosti nižoj od pK_a kitozana (pH < 6,5) pozitivno je nabijen pa uspostavlja ionske interakcije s negativno nabijenim skupinama sijalinske kiseline unutar mucina. Zbog toga ima jako izražena svojstva mukoadhezivnosti (Shah i sur., 2016; Gupta i sur., 2011). Kemijskim modifikacijama moguće mu je dodatno poboljšati mukoadhezivnost, ali i uklapanje različitih lijekova, proteina i gena. Jedna od najčešćih strategija poboljšanja svojstava kitozana je dodatak tiolnih skupina na kitozanske lance. Primjeri takvih tioliranih derivata su konjugat kitozana i tioglikolne kiseline (Tablica 1) te kitozana i cisteina. Kitozanske nanočestice mogu, uz kitozan, sadržavati i druge polisaharide i oligosaharide, na primjer hijaluronsku kiselinu te ciklodekstrin i njegove derivate. Takve nanočestice imaju poboljšana fizička svojstva i stabilnije su. Koriste se i različiti derivati kitozana kao što je trimetilirani kitozan ili mono-N-karboksimetil kitozan. Ti polimeri omogućuju reverzibilno otvaranje čvrstih veza između stanica (engl. *tight junctions*) u širem rasponu pH, pa time olakšavaju paracelularni transport i poboljšavaju permeabilnost lijeka. Najčešća metoda pripreme kitozanskih nanočestica je metoda ionotropnog geliranja, koje se odvija u vodenom mediju u prisustvu negativno nabijenog polianiona (Kammona i Kiparissides, 2012).

Polimer mliječne kiseline (engl. *polylactic acid*, PLA) i kopolimer mliječne i glikolne kiseline (engl. *poly(lactic-co-glycolic) acid*, PLGA) su sintetski, biokompatibilni i biorazgradljivi polimeri koji pružaju mogućnost kontroliranog i produljenog oslobađanja djelatne tvari kroz nekoliko dana, tjedana, pa čak i mjeseci. Najčešće se upotrebljavaju za uklapanje peptidnih lijekova i antigena (Tablica 1). PLA i PLGA nanočestice pripravljaju se metodom otparavanja otapala iz dvostruke emulzije, a koriste se još i nanoprecipitacija i jednostavno emulgiranje (Kammona i Kiparissides, 2012).

Polietilenglikol (PEG) je sintetski, izrazito biokompatibilni polimer. Zbog manjka funkcionalnih skupina bočnih strana lanca ne stupa u čvrste interakcije s mucinom. Međutim, lanci PEG-a brzo difundiraju unutar sloja sluzi pa su mu mukoadhezivna svojstva dobra. Postoji mogućnost povećanja adhezivnosti modifikacijom s poliakrilnom kiselinom (engl. *polyacrylic acid*, PAA) (Sosnik i sur., 2014). Njegova je najčešća funkcija modifikacija svojstava terapijskih sustava. Prisustvom na površini čestica poboljšava njihovu fizičku i biološku stabilnost, ali i difuziju kroz mukozu. Utvrđeno je da prisustvo PEG-a na površini čestica omogućuje blisku interakciju s epitelom. To svojstvo je važno kod razvoja nazalnih cjepiva zbog poticanja jačeg imunosnog odgovora. Kopolimer PEG-PLA boljih je svojstava u odnosu na sam PLA, odnosno osigurava povećanu stabilnost sustava i transport kroz mukozu, bolju imunogeničnost, kontrolirano i produljeno oslobađanje antigena kroz nekoliko mjeseci, te smanjenu agregaciju čestica (Csaba i sur., 2009).

Koriste se i polimeri koji umjesto poliesterskog dijela sadrže polioksoetilenske derivate - poloksameri i poloksamini. To su neionski kopolimeri polietilen oksida i polipropilen oksida. Poloksameri su linearni, a poznati su pod trgovačkim imenom Pluronic®, dok se za poloksamine koristi naziv Tetronic® i oni su razgranati. U vodenoj otopini pri dovoljno velikoj koncentraciji formiraju gelove. Svojstva im ovise o molekulskoj masi i omjeru hidrofilnih i lipofilnih skupina (Csaba i sur., 2009). Nedostatna mukoadhezivnost, čvrstoća i fizička stabilnost tih gelova može se poboljšati dodatkom drugih polimera, primjerice kitozana, PAA i hidroksipropilmetil celuloze (HPMC) (Sosnik i sur., 2014).

Hijaluronska kiselina je glikozaminoglikan građen od D-glukuronske kiseline i N-acetil-D-glukozamina. Prirodni je anionski, biokompatibilan i biorazgradljiv polimer, te je sastavni dio ekstracelularne tekućine. U industriji se najčešće upotrebljava u obliku natrijeve soli - natrijev hijaluronat (hijaluronan). S mucinom se povezuje vodikovim vezama i elektrostatskim interakcijama. Mukoadhezivnost ovisi o pH medija i molekulskoj masi

hijaluronske kiseline; pH utječe na ionizaciju lanca, a veličina lanca treba biti optimalna za prodor u mukozu i uspostavljanje interakcija. Tiolirani derivati hijaluronske kiseline pokazuju bolja svojstva adhezivnosti (Tripodo i sur., 2015).

Želatina je linearni polipeptid koji se dobiva otapanjem i hidrolizom kolagena. Topljiva je u vodi i može formirati gelove osjetljive na promjenu temperature. Viskoznost ovisi o načinu pripreme i koncentraciji želatine. Zbog prisustva aminokiselinskih ostataka sadrži karboksilne i amino skupine. Interakcije uspostavlja pomoću peptidnih, vodikovih i van der Waalsovih veza. Ima dobra svojstva mukoadhezivnosti i biokompatibilnosti te sposobnost stvaranja filmova. Kemijskim modifikacijama moguće je poboljšati svojstva želatine (Duggan i sur., 2017).

Poliakrilna kiselina (PAA) je sintetski polimer velike molekulske mase. Koristi se za prilagođavanje viskoznosti polučvrstih oblika. Zbog dobrih svojstava biokompatibilnosti prikladna je za razvoj formulacija za neparenteralnu primjenu. Sadrži karboksilne skupine koje su ključne za uspostavljanje čvrstih interakcija sa sluznicom. Zbog njihovog velikog broja unutar strukture ima veću sposobnost formiranja vodikovih veza u usporedbi s drugim polimerima. Također PAA ima sposobnost kontroliranja oslobađanja djelatne tvari (Duggan i sur., 2017). Sintetiziran je kopolimer PEG-PAA gdje PEG ima funkciju promotora adhezije između PAA i mucina zbog svojstva lagane difuzije unutar mukoznog sloja (Serra i sur., 2006).

Celuloza je prirodni polisaharid građen od linearnih lanaca D-glukoze. Netopljiva je u vodi i većini organskih otapala. Razvijeni su njeni polusintetski derivati u obliku etera i estera. Najčešći derivati su metil celuloza (MC), etil celuloza (EC), hidroksietil celuloza (HEC), hidroksipropil celuloza (HPC), hidroksipropilmetil celuloza (HPMC), natrijeva i kalcijeva sol karboksimetil celuloze (NaCMC i CaCMC), celuloza acetat i celuloza acetat ftalat. Često su korišteni kao pomoćne tvari u izradi lijekova, najčešće za topikalnu primjenu. Smatraju se netoksičnim i neiritirajućim materijalima. Najbolja mukoadhezivna svojstva imaju HPC i HPMC čiji se lanci fizički zapliću s mukozom. Adhezija ovisi o tipu mukozne sluznice i o pH vrijednosti. NaCMC pokazuje slabiju mukoadhezivnost u čvrstom stanju, ali gelovi NaCMC uspostavljaju jače interakcije nego gelovi HPC i HPMC. Na njena svojstva utječe molekulska masa, pH (kada polimer postane negativno nabijen dolazi do odbijanja s lancima mucina), hidratacija (kraće vrijeme hidratacije pospješit će difuziju vode u suhi matriks pa će interakcije biti bolje), metoda pripreme (precipitacija se pokazala bolja nego

liofilizacija). Hidroksietil celuloza ima slaba adhezivna svojstva pa se dodatkom pozitivno nabijenih skupina mogu pojačati interakcije s mucinom. Uvođenjem tiolnih skupina također se može povećati vrijeme zadržavanja polimera na sluznici (Sosnik i sur., 2014; Mazoniene i sur., 2011).

Nanočestice mogu biti građene od različitih lipida, na primjer triglicerida, masnih kiselina, monoglicerida, kationskih lipida, te ovisno o strukturi mogu biti sigurni nosači lipofilnih i hidrofilnih lijekova. Lipidne nanočestice mogu biti pripremljene visokotlačnom homogenizacijom, precipitacijom, te metodom dvostruke emulzije. Imaju mogućnost kontroliranog oslobađanja djelatne tvari. U ispitivanjima gdje su korištene kao nosači antigena pokazano je kako imaju sposobnost izazivanja jakog imunosnog odgovora, kako lokalnog, tako i sistemskog. U dodiru s biološkim tekućinama ograničena im je stabilnost te imaju nedovoljnu sposobnost interakcije s epitelom. Zato se dizajniraju lipidne nanočestice prekrivene hidrofilnim polimerima koje će imati bolja svojstva (Kammona i Kiparissides, 2012; Csaba i sur., 2009).

U Tablici 1 prikazani su primjeri nanočestica razvijenih za nazalnu primjenu lijekova.

Tablica 1. Primjeri nanočestica razvijenih za nazalnu primjenu lijekova

Polimeri i lipidi korišteni u izradi nanočestica	Djelatna tvar	Metoda priprave	Cilj uklapanja lijeka u nanočestice	Komentar	Literatura
Maltodekstrin, anionski lipid 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DPPG)	Ovalbumin	Ionotropno geliranje, liofilizacija	Razvoj nazalnog cjepiva	Lipidne nanočestice poboljšale su dostavu proteina u stanice ne uzrokujući toksične učinke *in vitro*	Bernocchi i sur., 2016
Kitozan klorid/glikol kitozan, natrij sulfobutileter-β-ciklodekstrin (SBE-β-CD)	Dopamin	Ionotropno geliranje	Dostava dopamina do mozga nazalnom primjenom	Novi pristup u liječenju Parkinsonove bolesti	Di Gioia i sur., 2015
Polivinilpirolidon C30 (PVP), natrijev hijaluronat	Meloksikam	Nanoniziranje mljevenjem	Poboljšanje topljivosti i permeabilnosti slabo topljivog lijeka	Farmakokinetički parametri su značajno poboljšani kada je meloksikam primijenjen u obliku nanočestica oralno ili nazalno, u usporedbi s fizičkom smjesom lijeka i pomoćnih tvari. Nazalnom primjenom nanočestica osigurana je brza apsorpcija te je postignuta velika koncentracija lijeka u plazmi	Kürti i sur., 2013
PLA, Polisorbat-80	Neurotoksin-1	Metoda otparavanja otapala iz V/U/V	Procjena potencijala nanočestica kao nosača	Primjenom nanočestica obloženih polisorbatom-80	Ruan i sur., 2011

		emulzije, liofilizacija, oblaganje nanočestica polisorbatom-80	za nazalnu primjenu neurotoksina	povećana je koncentracija lijeka u mozgu. Značajno veće koncentracije zabilježene su kod nazalne primjene nanočestica u odnosu na intravensku primjenu otopine lijeka	
N-trimetil kitozan (TMC)	Ovalbumin + adjuvans	Dispergiranje proteina u otopini TMC-a	Povećanje imunogeničnosti TMC nanočestica s ovalbuminom dodatkom adjuvansa (razvoj nazalnog i dermalnog cjepiva)	Dodatak adjuvansa TMC nanočesticama s antigenom može povećati imunogeničnost, ali ona ovisi o adjuvansu i načinu primjene	Bal i sur., 2012
Kitozan, Poloksamer 188	Piperin	Ionotropno geliranje	Poboljšanje učinkovitosti i sigurnosti primjene lijeka (hidrofobnost, metabolizam prvog prolaska kroz jetru; iritacija nosne sluznice, toksičnost za mozak)	Nazalnom primjenom manje doze lijeka uklopljenog u nanočestice postiže se veća učinkovitost u odnosu na nazalnu primjenu suspenzije lijeka	Elnaggar i sur., 2015
Krumpirov škrob (Tween 80, Span 80)	Inzulin	Geliranje, precipitacija/metoda otparavanja otapala iz U/V emulzije Sušenje raspršivanjem	Povećanje bioraspoloživosti proteinskih lijekova upotrebom mukoadhezivnog nosača lijeka	Oslobađanje i učinak lijeka ovise o veličini nanočestica, stupnju umreženja polisaharida, pospješivačima permeabilnosti	Jain i sur., 2008

		Inkubacija pripremljenih škrobnih nanočestica s otopinom inzulina i pospješivača permeabilnosti, liofilizacija			
Goveđi serumski albumin, β-ciklodekstrin/ hidroksipropil β-ciklodekstrin/ sulfobutileter β-ciklodekstrin	Takrin hidroklorid	Koacervacija, otparavanje otapala, liofilizacija Uklapanje lijeka u albuminske nanočestice, liofilizacija	Poboljšanje farmakokinetičkih svojstava lijeka (niska bioraspoloživost zbog intenzivnog metabolizama prvim prolaskom i kratkog poluvremena eliminacije, hepatotoksičnost)	Mukoadhezivnost albuminskih nanočestica s ciklodekstrinom i permeabilnost lijeka ovise o svojstvima ciklodekstrina	Luppi i sur., 2011
PLGA, Pluronic F-68 Gliceril monostearat, stearinska kiselina, sojin lecitin, Tween 20	Tarenflurbil	Emulgiranje i metoda difuzije otapala Emulgiranje i metoda otparavanja otapala	Poboljšanje dostave lijeka do mozga	Nazalnom primjenom polimernih i lipidnih nanočestica postignute su terapijske koncentracije lijeka za liječenje Alzheimerove bolesti	Muntimadugu i sur., 2016
PLGA, Poloxamer 407	Olanzapin	Nanoprecipitacija Liofilizacija	Ciljano djelovanje lijeka na mozak i produljeno oslobađanje	PLGA nanočestice primijenjene nazalno omogućuju direktnu dostavu lijeka do mozga, uz veću koncentraciju u usporedbi s nazalno i intravenski primijenjenom	Seju i sur., 2011

				otopinom lijeka	
Kitozan Kitozan modificiran tioglikolnom kiselinom (engl. *chitosan-thioglycolic acid*, C-TGA)	Leuprolid	Ionotropno geliranje, liofilizacija	Povećanje bioraspoloživosti leuprolida	C-TGA nanočestice osigurale su bolju bioraspoloživost, permeabilnost i produljeno oslobađanje u usporedbi s nemodificiranim kitozanskim nanočesticama	Shahnaz i sur., 2012
Kitozan	Estradiol	Ionotropno geliranje	Poboljšanje nazalne apsorpcije lijeka i ciljana dostava do mozga	Kitozanske nanočestice uspješno su dostavile lijek do mozga. Kitozan poboljšava adheziju formulacije na nosnoj sluznici i paracelularni transport	Wang i sur., 2008
Kitozan modificiran PEG-om	Inzulin	Ionotropno geliranje	Poboljšanje apsorpcije nazalno primijenjenog inzulina	Nanočestice pripravljene PEG-kitozanom osigurale su bolju nazalnu apsorpciju inzulina u usporedbi sa suspenzijom inzulina i PEG-kitozana te otopinom inzulina	Zhang i sur., 2008

1.3. Antihistaminici

Histamin je važan posrednik u upalnim i alergijskim reakcijama, a sudjeluje i u regulaciji izlučivanja želučane kiseline te djeluje kao neurotransmitor. Sintetizira se u organizmu, a po kemijskoj strukturi je amin. U tkivima je pohranjen u mastocitima i bazofilima, iz kojih se izlučuje nakon susreta s antigenom i potiče daljnji imunosni odgovor. Svoje učinke ostvaruje putem specifičnih histaminskih receptora (H_1, H_2, H_3 i H_4- podtipovi receptora). Na glatke mišiće bronha djeluje putem H_1- histaminskih receptora i uzrokuje bronhokonstrikciju. Antagonisti H_1- receptora za histamin upotrebljavaju se u liječenju alergijskih stanja (Katzung i sur., 2011).

1.3.1. H_1- antihistaminici

H_1- antihistaminici su inverzni agonisti, vežu se za receptor i stabiliziraju njegovo inaktivno stanje. Tako kompetitivnim antagonizmom sprječavaju interakciju receptora i histamina te njegove učinke. H_1- antihistaminici inhibiraju konstrikciju glatkih mišića respiratornog trakta. Također djelovanjem na endotelne stanice sprječavaju vazokonstrikciju i vazodilataciju uzrokovanu histaminom. Blokiraju povećanu propusnost kapilara i stvaranje edema i oteklina. Učinkom na živčanim završecima sprječavaju svrbež, peckanje i kihanje. Sprječavaju i sekreciju tekućine u dišnom sustavu ili suzne tekućine. Djeluju na mastocite i inhibiraju oslobađanje medijatora upale (Brunton i sur., ured., 2011).

H_1- antihistaminici dijele se u dvije skupine. Prva generacija antihistaminika dobro prolazi krvno-moždanu barijeru zbog čega ima izražene učinke na središnji živčani sustav i brojne nuspojave. Nazivaju se još i sedirajući antihistaminici. Djeluju i na muskarinske kolinergične receptore, α-adrenergične receptore, serotonin i naponske kanale za natrij. Druga generacija ili nesedirajući antihistaminici ne prolaze krvno-moždanu barijeru i nemaju sedirajuće učinke. Imaju dobar sigurnosni profil i zbog toga se često koriste. Obje skupine su visokoselektivne za H_1- receptore, ali imaju i slab utjecaj na H_2 i H_3- podtipove histaminskih receptora (Katzung i sur., 2011).

Indikacije

Antagonisti histaminskih H_1- receptora indicirani su za prevenciju ili liječenje simptoma alergijskih reakcija. Učinkoviti su u onim reakcijama preosjetljivosti gdje je histamin glavni posrednik (alergijski rinitis, konjunktivitis, urtikarija), za razliku od astme koja uključuje nekoliko posrednika pa su tu uglavnom nedjelotvorni. Olakšavaju i preveniraju kihanje,

svrbež i curenje iz nosa kod alergijskog rinitisa; svrbež, crvenilo i suzenje očiju kod konjunktivitisa te stvaranje oteklina i peckanje kod urtikarije. Učinak im je bolji kod ranog odgovora na alergen, a kasni odgovor karakterizira nazalna kongestija gdje su slabo djelotvorni. Upotrebljavaju se i kao pomoćna terapija kod angioedema, atopijskog i kontaktnog dermatitisa te uboda insekata (Brunton i sur., ured., 2011; Simons i Simons, 2011).

Zbog djelovanja na središnji živčani sustav koriste se kao sredstva za prevenciju bolesti kretanja. Za ovu indikaciju najučinkovitiji su difenhidramin i prometazin. Prometazin je učinkovit i kod terapije mučnine i povraćanja nakon kemoterapije. Također su korisni u liječenju Menierove bolesti i drugih poremećaja vestibularnog aparata. Zbog učinka sedacije upotrebljavaju se kao hipnotici kod nesanice (Katzung i sur., 2011).

Farmakokinetika

Ovi lijekovi se dobro apsorbiraju nakon oralne primjene. Vršna koncentracija u krvi postiže se 1-3 sata nakon primjene. Lijekovi prve generacije široko se raspodjeljuju u tkivima, uključujući i središnji živčani sustav. Druga generacija lijekova je manje liposolubilna i supstrati su P-glikoproteina na krvno-moždanoj barijeri pa teško prodiru ili ne prodiru u središnji živčani sustav. Dobro se vežu za proteine plazme, 78-99%. Metaboliziraju se prvim prolaskom kroz jetru pomoću sustava citokroma P450 pa se izlučuju urinom u obliku metabolita. Neke lijekove druge generacije metabolizira CYP3A4 zbog čega su podložni brojnim interakcijama s drugim lijekovima. Loratadin, terfenadin i hidroksizin imaju aktivne metabolite te oni postoje kao zasebni lijekovi (desloratadin, feksofenadin, cetirizin). Većini učinak traje 4-6 sati, ali neki imaju i dulje djelovanje, na primjer 12-24 sata. Vrijeme polueliminacije im iznosi otprilike 9-28 sati (Katzung i sur., 2011; Berardi i sur., 2009).

Nuspojave

Prva generacija antihistaminika ima brojne neželjene učinke. Najčešći su sedacija i antimuskarinski učinci. Sedacija utječe na smanjenje dnevnih aktivnosti i motoričkih sposobnosti, koje mogu biti dodatno narušene u kombinaciji s drugim depresorima središnjeg živčanog sustava i alkoholom. Sedacija može biti i pozitivna, na primjer smanjuje svijest o svrbežu ili se koristi u terapijske svrhe. Drugi učinak na središnji živčani sustav je njegova stimulacija, izazivanje halucinacija, anksioznost, euforija, tremor, nesanica. Antikolinergički učinci uključuju suha usta i oči, zamagljen vid, zadržavanje urina, konstipaciju, tahikardiju.

Antiserotoninski učinci se odnose na povećan apetit i debljanje. Blokada α-adrenergičkih receptora dovodi do vrtoglavice i ortostatske hipotenzije. Mogu loše utjecati na probavni sustav uzrokujući gubitak apetita, mučninu, povraćanje, zatvor i dijareju. Javljaju se i alergijske reakcije na lijek koje su češće nakon lokalne primjene. Hematološke komplikacije, kao što su leukopenija, agranulocitoza i hemolitička anemija, su rijetke. Terfenadin i astemizol mogu izazvati srčane aritmije kod predoziranja ili zbog interakcije s inhibitorima CYP enzima. H_1-antihistaminici prolaze placentu i izlučuju se u majčino mlijeko, a neki su pokazali teratogen učinak. U djece i starijih osoba preporučuje se upotreba druge generacije antihistaminika (Brunton i sur., ured., 2011; Berardi i sur., 2009).

Kombinirani pripravci

Postoje pripravci u kojima antihistaminici dolaze u kombinaciji s dekongestivima, antitusicima, ekspektoransima, analgeticima ili kortikosteroidima. Pokazalo se da tako ostvaruju bolji učinak, odnosno djeluju na širi spektar simptoma. Sami antihistaminici nisu učinkoviti u sprječavanju nazalne kongestije, dok u kombinaciji s dekongestivima jesu. Sigurnost i rizik od neželjenih učinaka ovakvih pripravaka je jednak onome svake komponente zasebno (Nathan, 2008). Takve kombinacije se koriste kod prehlade i alergijskog rinitisa. Ipak ne preporučuju se u djece mlađe od 2 godine zbog ozbiljnih nuspojava. Provedeno je ispitivanje u kojem je alergijski rinitis tretiran kombinacijom antihistaminika i montelukasta (inhibitor leukotrienskih receptora) i dobiven je bolji učinak na nazalnu kongestiju, curenje iz nosa, svrbež i kihanje u odnosu na svaki lijek zasebno i placebo (Nathan, 2008).

1.3.2. Nazalna primjena H_1- antihistaminika

Nazalna primjena antihistaminika podrazumijeva dostavu lijeka direktno u ciljni organ. Time je postignut brži početak djelovanja lijeka (u roku od nekoliko minuta), smanjen je rizik od neželjenih sistemskih učinaka, moguća je primjena manjih doza lijeka. Pokazalo se kako je nazalna primjena antihistaminika učinkovitija od oralne te da djeluje i na nazalnu kongestiju (Simons i Simons, 2011). Također nazalno primijenjeni antihistaminici poboljšavaju simptome u bolesnika u kojih oralna terapija nije djelotvorna ili ju nije moguće primijeniti. Nedostatak koji može utjecati na suradljivost bolesnika je gorak okus, ali on se može spriječiti tako da se nakon primjene doze glava nagne prema naprijed (Kaliner, 2007).

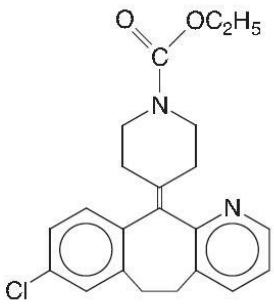
1.3.3. Loratadin

Loratadin je antagonist H_1-receptora druge generacije. Prema kemijskoj strukturi spada u skupinu piperidina (Slika 3). Visoko je selektivan za H_1-receptore, nema značajnog utjecaja na muskarinske receptore i slabo prodire u središnji živčani sustav pa postoji mali rizik od izazivanja nuspojava (Brunton i sur., ured., 2011). Farmakokinetička svojstva prikazana su u Tablici 2.

Tablica 2. Farmakokinetička svojstva loratadina (Halmed, 2016)

Apsorpcija	brza i dobra	
Biotransformacija	izražen metabolizam prvog prolaska kroz jetru pomoću enzima CYP3A4 i CYP2D6 → aktivan metabolit desloratadin	
	loratadin	desloratadin
Vezanje za proteine plazme	97-99%	73-76%
t_{max}	1-1,5 h	1,5-3,7 h
$t_{1/2}$ (vrijeme polueliminacije)	8,4 h	28 h
Izlučivanje	urinom ili fecesom u obliku konjugiranih metabolita, manje od 1% doze nepromijenjeno	

Postoji mogućnost stupanja u interakciju s inhibitorima enzima CYP3A4 i CYP2D6 što dovodi do povećanja koncentracije loratadina i povećanog rizika od nuspojava. Preporučena doza je 10 mg jedanput na dan u odraslih i djece starije od 12 godina, a u djece u dobi od 2 do 12 godina doza se određuje prema tjelesnoj težini (Halmed, 2016).



Slika 3. Strukturna formula loratadina (preuzeto iz Brunton i sur., ured., 2011)

Registrirani pripravci

Tablica 3. Registrirani pripravci na hrvatskom tržištu (Halmed, 2017)

Naziv	Djelatna tvar	Farmaceutski oblik	Proizvođač
Belodin 10 mg tablete	loratadin	tableta	Belupo lijekovi i kozmetika d.d., Koprivnica, Republika Hrvatska
Rinolan 1 mg/ml sirup	loratadin	sirup	Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Republika Hrvatska
Rinolan 10 mg tablete	loratadin	tableta	Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Republika Hrvatska
Alerdin 0,5 mg/ml oralna otopina	desloratadin	oralna otopina	Belupo lijekovi i kozmetika d.d., Koprivnica, Republika Hrvatska
Alerdin 2,5 mg raspadljive tablete za usta	desloratadin	raspadljiva tableta za usta	Belupo lijekovi i kozmetika d.d., Koprivnica, Republika Hrvatska
Alerdin 5 mg raspadljive tablete za usta	desloratadin	raspadljiva tableta za usta	Belupo lijekovi i kozmetika d.d., Koprivnica, Republika Hrvatska
Escontral 0,5 mg/ml oralna otopina	desloratadin	oralna otopina	Jadran Galenski laboratorij d.d., Rijeka, Republika Hrvatska
Escontral direkt 2,5 mg raspadljiva tableta za usta	desloratadin	raspadljiva tableta za usta	Jadran Galenski laboratorij d.d., Rijeka, Republika Hrvatska
Escontral direkt 5 mg raspadljiva tableta za usta	desloratadin	raspadljiva tableta za usta	Jadran Galenski laboratorij d.d., Rijeka, Republika Hrvatska
Contral 10 mg tablete	loratadin	tableta	Jadran Galenski laboratorij d.d., Rijeka, Republika Hrvatska
Belodin A 10 mg tablete	loratadin	tableta	Belupo lijekovi i kozmetika d.d., Koprivnica, Republika Hrvatska
Aerinaze*	desloratadin/ pseudoefedrin sulfat	tableta s prilagođenim oslobađanjem	Schering-Plough Labo N.V., Heist-op-den-Berg, Belgija
Aerius*	desloratadin	filmom obložena tableta / raspadljiva tableta za usta / oralna otopina	Schering-Plough Labo N.V., Heist-op-den-Berg, Belgija
Azomyr*	desloratadin	filmom obložena tableta / raspadljiva tableta za usta / oralna otopina	Schering-Plough Labo N.V., Heist-op-den-Berg, Belgija
Dasselta*	desloratadin	filmom obložena tableta	KRKA, d.d., Novo mesto, Slovenija; TAD Pharma GmbH, Cuxhaven, Njemačka
Desloratadine Actavis*	desloratadin	filmom obložena tableta	Actavis Ltd., Zejtun, Malta
Desloratadine ratiopharm*	desloratadin	filmom obložena tableta	Merckle GmbH, Blaubeuren, Njemačka; TEVA Pharmaceutical Works Private Limited Company, Debrecen, Mađarska; TEVA UK Ltd.,

			Eastbourne, Ujedinjeno Kraljevstvo; Pharmachemie B.V., Haarlem, Nizozemska; Teva Czech Industries s.r.o, Opava-Komarov, Češka; Teva Operations Poland Sp. Z o.o., Krakow, Poljska
Desloratadine Teva*	desloratadin	filmom obložena tableta	TEVA Pharmaceutical Works Private Limited Company, Debrecen, Mađarska; TEVA UK Ltd., Eastbourne, Ujedinjeno Kraljevstvo; Pharmachemie B.V., Haarlem, Nizozemska; Merckle GmbH, Blaubeuren, Njemačka
Neoclarityn*	desloratadin	filmom obložena tableta / raspadljiva tableta za usta / oralna otopina	Schering-Plough Labo N.V., Heist-op-den-Berg, Belgija
Flonidan direkt 10 mg raspadljive tablete za usta	loratadin	raspadljiva tableta za usta	Lek Pharmaceuticals d.d., Ljubljana, Slovenija
Flonidan 10 mg tablete	loratadin	tableta	Lek Pharmaceuticals d.d., Ljubljana, Slovenija
Deslordis 5 mg filmom obložene tablete	desloratadin	filmom obložena tableta	Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Republika Hrvatska
Escontral 5 mg filmom obložene tablete	desloratadin	filmom obložena tableta	Jadran Galenski laboratorij d.d., Rijeka, Republika Hrvatska
Claritine Alergija 10 mg tablete	loratadin	tableta	Schering-Plough Labo N.V., Heist-Op-Den-Berg, Belgija
Claritine 1 mg/ml sirup	loratadin	sirup	Schering-Plough Labo N.V., Heist-Op-Den-Berg, Belgija
Claritine 10 mg tablete	loratadin	tableta	Schering-Plough Labo N.V., Heist-Op-Den-Berg, Belgija
Rinolan Alerg 10 mg tablete	loratadin	tableta	Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Republika Hrvatska

*Lijek je odobren centraliziranim postupkom davanja odobrenja za stavljanje u promet lijeka (dodatno EMA, engl. *European Medicines Agency*, 2017).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nazalna primjena lijekova osigurava brojne prednosti u odnosu na oralnu i parenteralnu primjenu. Zbog velike površine nosne sluznice, dobre prokrvljenosti i permeabilnosti postiže se brz učinak djelatne tvari, a zbog slabije aktivnosti enzimskih sustava smanjena je razgradnja lijeka. Za postizanje lokalnog učinka primjenjuju se manje doze lijeka čime je smanjen broj neželjenih sistemskih nuspojava. Također nazalna primjena omogućuje direktnu dostavu lijeka do mozga te postizanje sistemskog učinka za lijekove nedovoljne bioraspoloživosti nakon oralne ili intravenske primjene (Hafner i sur., 2014).

Nanočestice kao terapijski sustavi nude mogućnost poboljšanja bioraspoloživosti i učinkovitosti lijeka, ali i povećanja njegove topljivosti i stabilnosti. Za njihovu izradu odabiru se različiti polimerni i lipidni materijali koju su biokompatibilni i sigurni za primjenu te zbog svojih svojstava mogu osigurati dulje zadržavanje pripravka na sluznici, produljeno oslobađanje i ciljanu dostavu djelatne tvari. Uklapanjem lijeka u nanočestice moguće je prevladati prepreke nazalnoj apsorpciji poput enzimske razgradnje lijeka i mehanizma mukocilijarnog čišćenja koji dovodi do brze eliminacije ljekovitog pripravka iz nosne šupljine (Yu i sur., 2015; Sherafudeen i Vasantha, 2015).

U ovom radu razvijene su lipidno-alginatne nanočestice za nazalnu primjenu u koje je potom kao modelni lijek uklopljen loratadin.

Za razvoj nanočestica korištene su dvije lipidne komponente, lecitin S45 i dimetil dioktadecil amonijev bromid (engl. *dimethyldioctadecylammonium bromide*, DDAB), te polimer natrijev alginat.

Lecitin je smjesa različitih fosfolipida, biokompatibilan je i siguran te prikladan za pripremu nanosustava lipofilnih lijekova poput loratadina s ciljem postizanja produljenog oslobađanja (El-Nabarawi i sur., 2013; Bhatta i sur., 2012; Senyigit i sur., 2010; Hafner i sur., 2009; Yanasarn i sur., 2009). Dimetil dioktadecil amonijev bromid je kationski lipid kojim je moguće optimirati ukupni naboj lipidne smjese i interakciju s natrijevim alginatom. Alginat je kao biokompatibilni, biorazgradljivi i mukoadhezivni anionski polimer, često polimer izbora u izradi terapijskih sustava za topikalnu primjenu lijeka. Prisustvo alginata na površini čestica osigurava dulje zadržavanje na mjestu primjene i posljedično veću bioraspoloživost lijeka (Motwani i sur., 2008).

Loratadin je antihistaminik druge generacije koji se najčešće koristi u simptomatskom liječenju alergijskog rinitisa. Loratadin sprječava pokretanje alergijske reakcije blokirajući oslobađanje histamina preko H_1- histaminskih receptora. Lijek se brzo apsorbira u probavnom sustavu i postiže vršnu koncentraciju u plazmi za 1-1,5 h. Međutim zbog brzog metabolizma prvim prolaskom kroz jetru bioraspoloživost nakon oralne primjene mu je oko 40% (Singh i sur, 2013). Zbog toga se kao rješenje nude drugi putevi primjene lijeka, poput nazalne koja se pokazala učinkovitijom u liječenju alergijskog rinitisa u usporedbi s primjenom *per os* (Sherafudeen i Vasantha, 2015).

Cilj rada je razviti lipidno-alginatne nanočestice željene veličine, površinskih svojstava i biokompatibilnosti, prikladne za uklapanje i nazalnu primjenu lipofilnih lijekova, korištenjem metode ionotropnog geliranja.

Specifični ciljevi:

- Ispitati utjecaj masenog omjera lecitina S45 i kationskog lipida u etanolnoj otopini te koncentracije natrijevog alginata u vodenoj otopini pri pripravi lipidno-alginatnih nanočestica na veličinu, polidisperznost i zeta-potencijal nanočestica.
- Temeljem provedene karakterizacije svih pripravljenih nanočestica izvršiti primarni probir, odnosno identificirati nanočestice s najvećim potencijalom za razvoj terapijskog nanosustava.
- Ispitati biokompatibilnost odabranih lipidno-alginatnih nanočestica *in vitro* praćenjem metaboličke aktivnosti Caco-2 stanica nakon izlaganja suspenzijama nanočestica.
- Uklopiti modelni lijek loratadin u pripravljene lipidno-alginatne nanočestice.
- Odrediti fizičko-kemijska svojstva lipidno-alginatnih nanočestica s loratadinom:
    - veličinu i polidisperznost nanočestica
    - zeta-potencijal nanočestica
    - sadržaj uklopljenog lijeka

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U izradi ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći reagensi i kemikalije:

- za razvoj i pripremu nanočestica: lecitin S45 (Lipoid S45, Lipoid GmbH, Njemačka), kationski lipid dimetil dioktadecil amonijev bromid (engl. *dimethyldioctadecylammonium bromide*, DDAB; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Švicarska), natrijev alginat (Pronova LV G, Protan, Norveška), loratadin (Pliva Hrvatska d.o.o., Hrvatska), 96%-tni etanol (Kemig, Hrvatska), natrijev klorid (Kemig, Hrvatska)
- za rad sa staničnim kulturama: stanice Caco-2 (American Type Culture Collection, SAD); hranidbeni medij DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Švicarska) kojem je dodan fetalni telećI serum (engl. *fetal bovine serum, Heat Inactivated*, FBS, Biosera, Francuska), smjesa antibiotika (penicilin, streptomicin, amfotericin B, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Švicarska) i neesencijalne aminokiseline (Lonza, Belgija); fosfatni pufer bez Ca i Mg (engl. *phosphate buffered saline without Ca and Mg*, PBS, Lonza, Belgija); otopina EDTA (Versene) (Lonza, Belgija); tripsin (Lonza, Belgija); pufer balansiran Hankovim solima (engl. *Hank's balanced Salt Solution*, HBSS pufer) pripravljen otapanjem kalcijevog klorida (0,185 mg ml^{-1} $CaCl_2 \times 2H_2O$), magnezijevog klorida (0,1 mg ml^{-1} $MgCl_2 \times 6H_2O$), magnezijevog sulfata (0,1 mg ml^{-1} $MgSO_4 \times 7H_2O$), kalijevog klorida (0,4 mg ml^{-1} KCl), kalijevog dihidrogenfosfata (0,06 mg ml^{-1} KH_2PO_4), natrijevog hidrogenkarbonata (0,350 mg ml^{-1} $NaHCO_3$), natrijevog klorida (8 mg ml^{-1} NaCl), natrijevog hidrogenfosfata (0,06 mg ml^{-1} $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$), glukoze (1,1 mg ml^{-1} D-glukoze $\times H_2O$) i 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonske kiseline (HEPES; 30 mM, 7,15 mg ml^{-1}) u pročišćenoj vodi; [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-25-difeniltetrazol bromid] (MTT; Biochemica, Aplichem GmbH, Njemačka); izopropanol (VWR Chemicals, Francuska); NaOH (T.T.T., Hrvatska).

3.2. METODE

3.2.1. Razvoj i priprema nanočestica

Pripravljene su otopine lecitina S45 i kationskog lipida DDAB u 96%-tnom etanolu pri različitim masenim omjerima lipidnih sastavnica (Tablica 4). Koncentracija lecitina u svim pripravljenim otopinama iznosila je 25 mg ml^{-1}. Injektiranjem 2 ml etanolne otopine lipida u 23 ml pročišćene vode, kroz iglu unutarnjeg promjera 0,75 mm, uz miješanje na magnetskoj miješalici (890 okretaja/min), dobivene su lipidne nanočestice.

Za pripravu lipidno-alginatnih nanočestica, natrijev alginat je otopljen u pročišćenoj vodi u koncentraciji od 10 mg ml^{-1}. Uzeti su različiti volumeni otopine alginata (0,5 i 0,7 ml) koji su razrijeđeni pročišćenom vodom do volumena od 23 ml. Injektiranjem 2 ml etanolne otopine lipida (Tablica 4), odnosno loratadina i lipida (koncentracija loratadina u etanolnoj otopini iznosila je 5 mg ml^{-1}, a maseni omjer lecitina i loratadina iznosio je 5:1), u 23 ml razrijeđene vodene otopine alginata, dobivene su prazne lipidno-alginatne nanočestice, odnosno lipidno-alginatne nanočestice s loratadinom. Konačna koncentracija natrijevog alginata u sustavu iznosila je 200 odnosno 280 μg ml^{-1}.

Pripravljene nanočestice s loratadinom filtrirane su kroz filtar veličine pora 0,45 μm (PES Syringe-Filter, TPP, Švicarska) kako bi se uklonio neukloplјeni (precipitirani) loratadin. Filtrirane suspenzije nanočestica korištene su u svim daljnjim ispitivanjima.

Tablica 4. Maseni omjer lecitina i DDAB u etanolnoj otopini korištenoj u izradi nanočestica

Lipidne nanočestice	Lipidno-alginatne nanočestice	Lecitin:DDAB (*m*/*m*)
LN_1	LAN_1	50:1
LN_3	LAN_3	50:3
LN_4	/	50:4
LN_5	LAN_5	50:5
$LN_{5,5}$	/	50:5,5
LN_6	/	50:6
LN_7	LAN_7	50:7
LN_8	LAN_8	50:8
LN_9	LAN_9	50:9
LN_{10}	LAN_{10} / LA_7N_{10}	50:10

3.2.2. Određivanje veličine i zeta-potencijala nanočestica

Veličina, polidisperznost i zeta-potencijal nanočestica određeni su fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *Photon Correlation Spectroscopy,* PCS) pomoću uređaja Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, UK). Za određivanje veličine i polidisperznosti nanočestica, suspenzije nanočestica su razrijeđene pročišćenom vodom, a za mjerenje zeta-potencijala razrijeđene su 10 mM otopinom NaCl. Mjerenja su provedena pri 25˚C uz korištenje monokromatskog koherentnog 10 mW He-Ne lasera (λ=633 nm).

3.2.3. Uvjeti uzgoja stanične kulture

U ovom ispitivanju korištene su epitelne stanice karcinoma debelog crijeva (Caco-2 stanice; American Type Culture Collection [ATCC], SAD). Stanice su uzgajane u tikvicama od 150 cm^2 u 24 ml hranidbenog medija. Korišteni medij je DMEM koji sadrži i fetalni goveđi serum, smjesu antibiotika penicilin/streptomicin/amfotericin B i neesencijalne aminokiseline. Inkubacija se odvijala u inkubatoru pri 37 ˚C, 5% CO_2 i 95% relativne vlažnosti. Kada bi stanice postigle konfluentnost od 80-90%, presađivane su u nove tikvice ili na ploče s jažicama (za ispitivanje vijabilnosti). Nakon uklanjanja medija ostaci su isprani 2 puta sa po 10 ml PBS-a. Dodatkom 8 ml tripsina koji je 10 × razrijeđen otopinom EDTA (Versene) postignuto je odvajanje stanica, uz inkubaciju oko 5 minuta. Tripsinizacija je zaustavljena dodatkom 12 ml medija. Nakon centrifugiranja suspenzije stanica, supernatant iznad taloga je uklonjen, a stanicama je dodan hranidbeni medij (Plantić, 2017).

3.2.4. Ispitivanje vijabilnosti stanica

Kako bi ispitali biokompatibilnost razvijenih nanočestica, Caco-2 stanice nasađene su na ploče s 96 jažica, pri gustoći od 4000 stanica/jažici. Nakon nekoliko dana, kada su stanice postigle odgovarajuću konfluentnost (80-90%), tretirane su ispitivanim uzorcima. Suspenzije nanočestica razrijeđene su HBSS-om do koncentracije nanočestica od 50, 100, 200 i 400 μg ml^{-1} (izražene koncentracijom lecitina u sustavu). pH vrijednost otopine pufera HBSS je podešena na 7,4 dodatkom NaOH (10 mM). Prije tretiranja stanica iz jažica je uklonjen medij. Naneseni su uzorci razrijeđenih suspenzija nanočestica volumena 100 μl, nakon čega je uslijedila inkubacija od 2 h. Stanice tretirane samo HBSS-om služile su kao negativna kontrola. Po završetku inkubacije, uzorci su uklonjeni, stanice su isprane PBS-om i dodan im je medij (100 μl).

Nakon 24 h određivana je vijabilnost tretiranih stanica. Pripremljena je otopina MTT-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) koncentracije 5 mg ml^{-1} (žute boje) i u svaku jažicu je dodano po 10 µl otopine. Uslijedila je inkubacija pri 37 ˚C u trajanju od 45 minuta. Stanice pomoću mitohondrijskog enzima oksidoreduktaze prevode MTT u formazan koji je netopljiv u vodi, a topljiv u organskim otapalima. Vidljivi su ljubičasti kristalići formazana. Nakon uklanjanja medija, u svaku jažicu je dodano po 100 µl izopropanola. Dobivenim izopropanolnim otopinama formazana izmjerena je apsorbancija na UV-Vis spektrofotometru (Victor^3, PerkinElmer, SAD) pri valnoj duljini od 570 nm. Metabolička aktivnost stanica proporcionalna je izmjerenoj apsorbanciji odnosno koncentraciji formazana u mjerenim izopropanolnim otopinama.

3.2.5. Određivanje sadržaja uklopljenog lijeka

Uzorak nanočestica je filtriran (veličina pora 0,45 µm) (PES Syringe-Filter, TPP, Švicarska) čime je iz suspenzije uklonjen dio lijeka koji je neuklopljen. Nanočestice s uklopljenim lijekom (0,5 ml filtrata) razorene su/otopljene u smjesi etanola i pročišćene vode (4 ml etanola + 0,5 ml pročišćene vode). Koncentracija loratadina u pripravljenim uzorcima određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 241 nm, koristeći UV-Vis spektrofotometar (UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Probe, Varian, CA, SAD). Mjerenje je rađeno u duplikatu. Kao slijepa proba korištena je smjesa etanola i pročišćene vode u volumnom omjeru 4:1. Za izradu baždarnog dijagrama pripravljene su otopine loratadina u 0,8%-tnom etanolu pri koncentracijama od 5, 10, 15, 20, 25 µg ml^{-1} te im je izmjerena apsorbancija pri 241 nm. Iz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji loratadina u mjerenim otopinama dobiven je baždarni pravac. Koncentracija loratadina u uzorcima razorenih nanočestica izračunata je iz izmjerene apsorbancije i nagiba baždarnog pravca. Uspješnost uklapanja loratadina izračunata je prema jednadžbi:

$$\%\ uspješnost\ uklapanja = \frac{izmjerena\ koncentracija\ lijeka}{teorijska\ koncentracija\ lijeka} \cdot 100$$

Sadržaj loratadina u pripravljenim nanočesticama izračunat je prema formuli:

$$\%\ sadržaj\ loratadina = \frac{masa\ uklopljenog\ loratadina}{masa\ nanočestica\ s\ loratadinom} \cdot 100$$

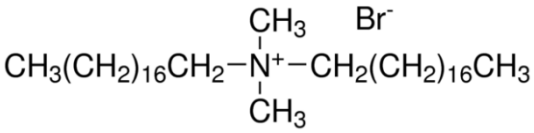
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Razvoj nanočestica

U razvoju nanočestica korištene su lipidne komponente - lecitin S45 i kationski lipid dimetil dioktadecil amonijev bromid (DDAB) te polimer natrijev alginat. Nanočestice su razvijene po istom principu kao i lecitinsko-kitozanske nanočestice (Hafner i sur., 2009).

Lecitin je smjesa fosfolipida, a sastoji se i od triglicerida, masnih kiselina, sterola i glikolipida. Prisutan je u stanicama. Za njegovu proizvodnju najčešće se koriste jaja i biljna ulja (sojino, suncokretovo i ulje uljane repice). Postoje različiti tipovi lecitina koji se razlikuju u sadržaju polarnih lipida i sastavu fosfolipida (www.lipoid.com). Lecitin S45 sastoji se od lipidnih komponenti: fosfatidilkolina (54,9%), fosfatidiletanolamina (16,9%), lizofosfatidilkolina (1%); masnih kiselina (sadržaj je izražen u postotku prema ukupnoj količini masnih kiselina): palmitinske kiseline (18%), stearinske kiseline (3%), oleinske kiseline (10%), linolne kiseline (60%), linolenske kiseline (5%); te drugih komponenti: triglicerida (0,8%) i DL-R-tokoferola (Hafner i sur., 2011). Često se upotrebljava za pripremu nanosustava zbog toga što je siguran i biokompatibilan, a zbog svoje lipofilne prirode omogućuje dobro uklapanje lipofilnih lijekova i njihovo kontrolirano oslobađanje (Bhatta i sur., 2012; Hafner i sur., 2009).

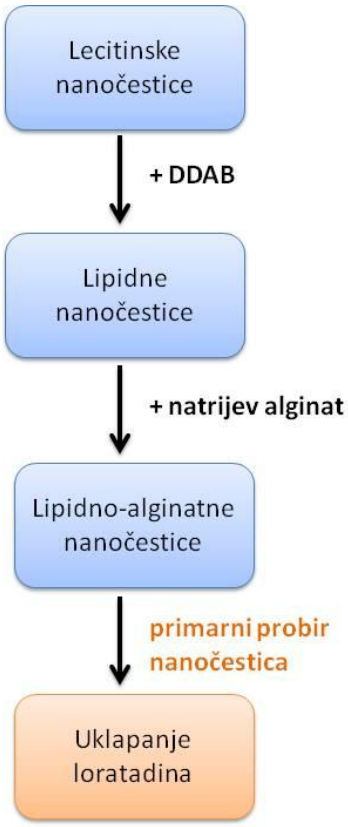
Dimetil dioktadecil amonijev bromid (DDAB) je kvarterna amonijeva sol s dugim alkilnim lancima koji joj daju lipofilna svojstva (Slika 4). U vodenom okruženju alkilni lanci formiraju strukturu sličnu liposomima koja može služiti kao nosač lijekova ili DNA (www.sigmaaldrich.com). DDAB je korišten u razvoju nanokapsula s hidrofilnom jezgrom i nanostrukturiranih lipidnih nosača za dostavu derivata alfa-lipoične kiseline do mozga, pri čemu je osigurao pozitivan naboj oba nanosustava te pridonio poboljšanju njihovih fizičko-kemijskih, tehnoloških i bioloških svojstava (Carbone i sur., 2017). Kationski lipid može dovesti do reakcije kasne preosjetljivosti zbog čega je u velikim količinama toksičan (Smith Korsholm i sur., 2007).



Slika 4. Struktura dimetil dioktadecil amonijevog bromida (preuzeto s www.sigmaaldrich.com)

Natrijev alginat je prirodni (lako dostupni), biokompatibilni i mukoadhezivni polimer. Ima sposobnost formiranja gelova pa omogućuje kontrolirano oslobađanje djelatne tvari. Zbog navedenih povoljnih svojstava nalazi široku primjenu u izradi terapijskih sustava za uklapanje i dostavu lijekova (Motwani i sur., 2008). Često se koristi u kombinaciji s kitozanom za pripravu nanočestica; primjerice, razvijene su mukoadhezivne kitozansko-alginatne nanočestice za oftalmičku primjenu antibiotika (Motwani i sur., 2008) te nanočestice s venlafaksinom za nazalnu primjenu i direktnu dostavu do mozga (Haque i sur., 2014). U oba slučaja nanočestice su pripravljene interakcijom između negativno nabijenih karboksilnih skupina alginata i pozitivnih amino skupina kitozana, pri čemu pH medija ima značajan utjecaj. Maseni omjer alginata i kitozana utjecao je na površinska svojstva i veličinu nanočestica te na uspješnost uklapanja lijeka.

Tijek razvoja lipidno-alginatnih nanočestica u ovom radu prikazan je na Shemi 1.



Shema 1. Razvoj lipidno-alginatnih nanočestica

Tablica 5. Sastav i osnovne karakteristike lipidnih nanočestica (LN), praznih lipidno-alginatnih nanočestica (LAN) te lipidno-alginatnih nanočestica s loratadinom (LLAN).

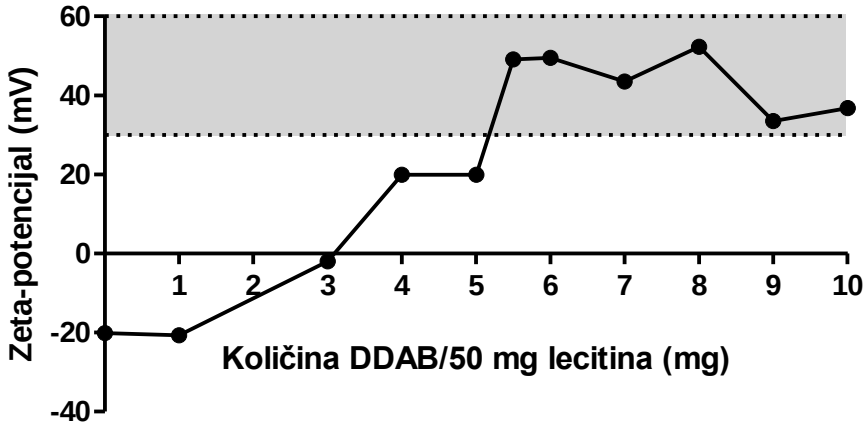
Uzorak	Lecitin* (mg)	DDAB* (mg)	Alginat** (mg)	Loratadin (mg)	Veličina (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)
LN	50	/	/	/	85,4±3,0	0,488±0,111	-20,1±8,7
LN_1	50	1	/	/	77,8±1,2	0,379±0,059	-20,7±3,5
LN_3	50	3	/	/	87,3±0,7	0,256±0,006	-2,0±1,2
LN_4	50	4	/	/	87,8±0,7	0,273±0,005	19,9±2,4
LN_5	50	5	/	/	104,1±3,1	0,273±0,020	19,9±1,9
$LN_{5,5}$	50	5,5	/	/	100,2±1,0	0,294±0,006	49,1±6,0
LN_6	50	6	/	/	103,0±2,5	0,427±0,109	49,5±1,4
LN_7	50	7	/	/	100,1±2,3	0,323±0,094	43,5±1,2
LN_8	50	8	/	/	110,2±1,0	0,286±0,020	52,3±3,1
LN_9	50	9	/	/	111,2±0,5	0,288±0,081	33,5±4,8
LN_{10}	50	10	/	/	98,8±1,9	0,314±0,025	36,8±1,9
LAN_1	50	1	5	/	99,5±0,5	0,329±0,001	-25,2±7,0
LAN_3	50	3	5	/	131,3±2,8	0,339±0,007	-15,7±0,4
LAN_5	50	5	5	/	201,9±4,9	0,316±0,050	-32,4±1,4
LAN_7	50	7	5	/	208,9±7,5	0,241±0,063	-37,6±2,3
LAN_8	50	8	5	/	208,4±2,3	0,233±0,021	-37,0±0,9
LAN_9	50	9	5	/	195,1±3,4	0,241±0,011	-39,7±1,5
LAN_{10}	50	10	5	/	211,4±1,6	0,271±0,042	-42,7±1,3
LA_7N_{10}	50	10	7	/	201,0±1,5	0,273±0,023	-41,0±1,5
$LLAN_5$	50	5	5	10	221,2±2,7	0,294±0,010	-25,1±0,8
$LLAN_7$	50	7	5	10	215,4±2,3	0,245±0,028	-30,1±0,6
$LLAN_8$	50	8	5	10	213,5±6,1	0,260±0,015	-34,6±0,5
$LLAN_{10}$	50	9	5	10	234,1±3,2	0,211±0,024	-36,4±0,8

*količina lipidnih sastavnica u 2 ml etanolne otopine korištene pri izradi lipidnih i lipidno-alginatnih nanočestica

**količina alginata u 23 ml vodene otopine korištene pri izradi lipidno-alginatnih nanočestica

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

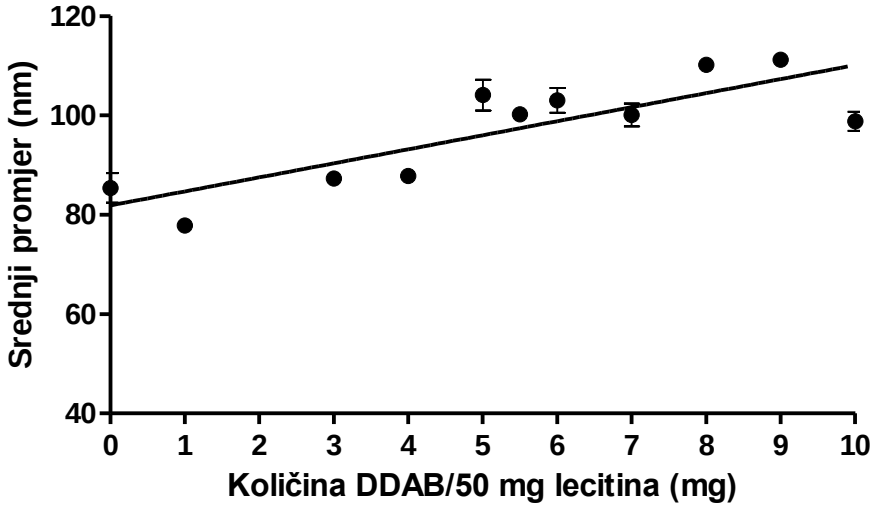
Injektiranjem etanolne otopine negativno nabijenog lecitina S45 u pročišćenu vodu formirane su lecitinske nanočestice (LN) negativnog zeta-potencijala (-20,1±8,7 mV). Kada je u etanolnoj otopini, uz lecitin, otopljen i kationski lipid DDAB, opisanim postupkom pripravljene su lipidne nanočestice manje negativnog odnosno pozitivnog površinskog naboja (LN_1-LN_{10}), a ovisno o masenom omjeru lecitina i kationskog lipida (Tablica 5). Pri masenom omjeru kationskog lipida i lecitina manjem od 3:50, pripravljene lipidne nanočestice bile su negativnog naboja. Maseni omjer kationskog lipida i lecitina veći od 3:50 rezultirao je nanočesticama pozitivnog naboja. Zeta-potencijal nanočestica veći od +30 mV zabilježen je kod nanočestica pripravljenih iz smjese kationskog lipida i lecitina masenog omjera od 5,5:50 do 10:50 (Slika 5). Navedeni iznos zeta-potencijala važan je s aspekta fizičke stabilnosti suspenzija pripravljenih nanočestica.



Slika 5. Ovisnost zeta-potencijala lipidnih nanočestica o masenom omjeru kationskog lipida DDAB i lecitina

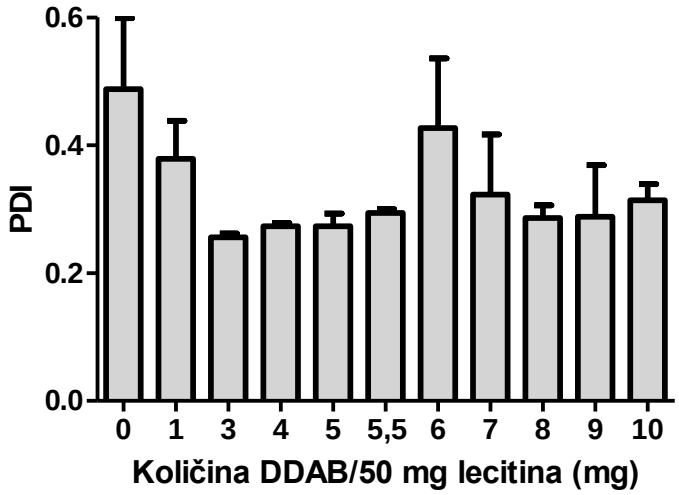
Slične lipidne nanočestice s istim kationskim lipidom i lecitinom S45 istodobno su razvijali Pereira i suradnici. Koncentracija DDAB u 8 ml etanolne otopine lecitina iznosila je 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 i 2% *m*/*V*, odnosno korišteni su sljedeći maseni omjeri lecitina i kationskog lipida: 200:2, 200:4, 200:8, 200:20, 200:40, 200:80 i 200:160. Različite količine DDAB utjecale su na promjenu površinskih svojstava i veličine nanočestica, a njegov pozitivan naboj omogućio je interakciju s hijaluronskom kiselinom (Pereira i sur., 2016).

Srednji promjer lipidnih nanočestica pripravljenih s različitim masenim omjerom kationskog lipida i lecitina (LN_1-LN_{10}) kretao se od 77,8±1,2 nm do 111,2±0,5 nm. Uočen je trend blagog porasta veličine nanočestica s povećanjem količine kationskog lipida u smjesi lipidnih sastavnica (Slika 6).



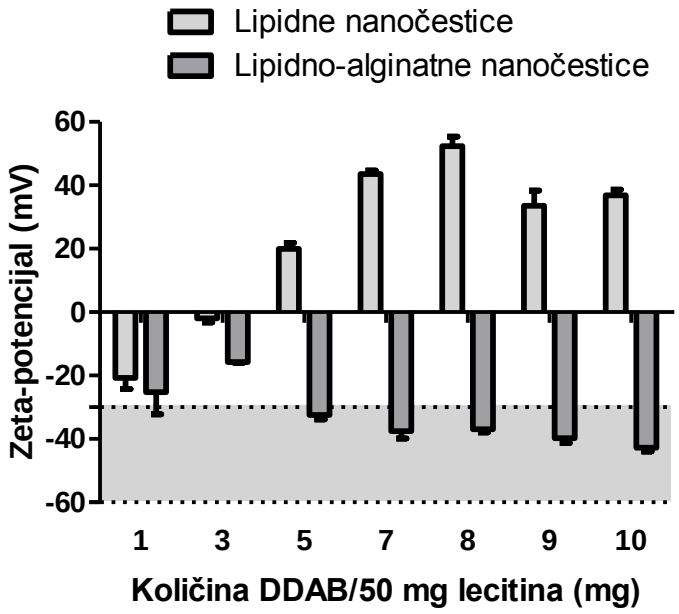
Slika 6. Ovisnost srednjeg promjera lipidnih nanočestica o masenom omjeru kationskog lipida DDAB i lecitina

U većini slučajeva, polidisperznost nanočestica pripravljenih iz kationskog lipida i lecitina kretala se između 0,25 i 0,29, te je bila značajno manja u odnosu na polidisperznost nanočestica pripravljenih samo iz lecitina (LN; 0,488; Slika 7). Kao iznimke potrebno je istaknuti nanočestice pripravljene iz kationskog lipida i lecitina pri masenom omjeru od 1:50 i 6:50 (LN_1 i LN_6) kod kojih je zabilježen indeks polidisperznosti redom od 0,379 i 0,427.



Slika 7. Ovisnost indeksa polidisperznosti lipidnih nanočestica o masenom omjeru kationskog lipida DDAB i lecitina

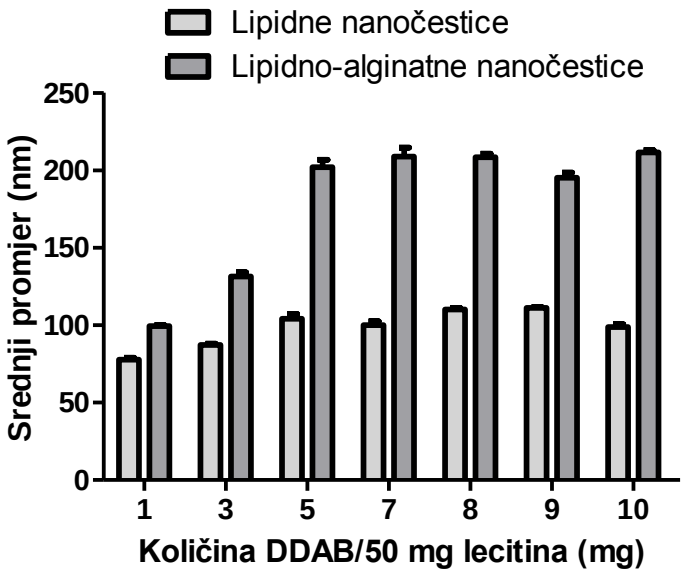
Idući korak u razvoju nanočestica odnosio se na uvođenje alginata u vodenu fazu sustava s ciljem priprave lipidno-alginatnih nanočestica čija će površinska svojstva ovisiti o svojstvima alginata. U pripravi lipidno-alginatnih nanočestica korištena je metoda ionotropnog geliranja, a temelji se na elektrostatskoj interakciji između sastavnica različitog naboja; pozitivan naboj smjese lipidnih komponenti omogućuje interakciju s negativno nabijenim natrijevim alginatom. U konačnici, nanočestice nastale injektiranjem etanolne otopine lipidnih sastavnica u vodenu otopinu alginata imaju negativan zeta-potencijal (LAN_1-LAN_{10}; Slika 8). Lipidno-alginatne nanočestice pripravljene s masenim omjerom kationskog lipida i lecitina većim od 3:50 karakterizirane su zeta-potencijalom u okviru vrijednosti koje osiguravaju fizičku stabilnost suspenzije nanočestica (negativnijim od -30 mV). Također, zeta-potencijal navedenih nanočestica bio je to negativniji što je količina kationskog lipida u njihovoj pripravi bila veća. Navedeno zapažanje može se objasniti intenzivnijom interakcijom s alginatom u slučaju veće količine katinskog lipida u lipidnoj smjesi.



Slika 8. Ovisnost zeta-potencijala lipidnih i lipidno-alginatnih nanočestica o masenom omjeru kationskog lipida DDAB i lecitina

Slika 9 prikazuje znatan porast veličine lipidno-alginatnih nanočestica u odnosu na same lipidne nanočestice, i to za nanočestice pripravljene iz smjese kationskog lipida i lecitina masenog omjera većeg od 3:50. To zapažanje u skladu je s prethodno diskutiranim zeta-potencijalom lipidnih nanočestica. Naime, pri pripravi lipidnih nanočestica, maseni omjer kationskog lipida i lecitina veći od 3:50 rezultirao je nanočesticama pozitivnog naboja (Slika

5), što je preduvjet za interakciju s negativno nabijenim alginatom. Srednji promjer lipidno-alginatnih nanočestica rastao je s porastom količine kationskog lipida u njihovom sastavu, sve do masenog omjera prema lecitinu od 5:50. Navedeno zapažanje može se objasniti intenzivnijom interakcijom lipidne smjese i alginata pri većoj količini kationskog lipida u sastavu nanočestica. Daljnji porast količine kationskog lipida u sastavu lipidno-alginatnih nanočestica nije rezultirao značajnijom promjenom veličine nanočestica (LAN_7-LAN_{10}). Naime, srednji promjer nanočestica pripravljenih s kationskim lipidom i lecitinom masenog omjera od 7:50 do 10:50 kretao se u rasponu od 195,1±3,4 do 211,4±1,6 nm.



Slika 9. Ovisnost srednjeg promjera lipidnih i lipidno-alginatnih nanočestica o masenom omjeru kationskog lipida DDAB i lecitina

Sve lipidno-alginatne nanočestice (LAN_1-LAN_{10}) pripravljene su injektiranjem etanolne otopine smjese lipida u vodenu otopinu natrijevog alginata koncentracije 200 µg/ml. Da bi se ispitao utjecaj koncentracije alginata u vodenoj otopini na svojstva lipidno-alginatnih nanočestica, nanočestice s najvećim sadržajem kationskog lipida (DDAB:lecitin 10:50, *m*/*m*) pripravljene su i korištenjem vodene otopine natrijevog alginata koncentracije 280 µg/ml (LA_7N_{10}). Dobivene nanočestice bile su srednjeg promjera od 201,0±1,5 nm, indeksa polidisperznosti od 0,273±0,023, te zeta-potencijala od -41,0±1,5 mV. Navedena svojstva bila su identična svojstvima lipidno-alginatnih nanočestica pripravljenih pri istom masenom omjeru kationskog lipida i lecitina, te korištenjem vodene otopine natrijevog alginata koncentracije 200 µg/ml (LAN_{10}; srednji promjer 211,4±1,6 nm, indeks polidisperznosti 0,271±0,042, te zeta-potencijal -42,7±1,3 mV). Iz navedenog zapažanja izveden je zaključak

da povećanje koncentracije natrijevog alginata iznad 200 μg/ml ne utječe na svojstva nastalih lipidno-alginatnih nanočestica, već generira suvišak alginata u sustavu.

Primarni probir nanočestica

Temeljem provedene karakterizacije svih pripravljenih nanočestica izvršen je primarni probir te su identificirane nanočestice s najvećim potencijalom za razvoj terapijskog nanosustava, odnosno uklapanje djelatne tvari.

Lipidno-alginatne nanočestice pripravljene pri masenom omjeru kationskog lipida i lecitina većem od 3:50 veličinom (oko 200 nm) su odgovarajuće za primjenu na nazalnu sluznicu. Naime, čestice s promjerom većim od 1000 nm neće prodirati kroz sloj sluzi koja prekriva respiratorni epitel, nego će se zadržavati na površini sluzi te, ovisno o strukturnim svojstvima, odnosno adhezivnosti, mogu stupiti u interakciju s mucinom. Nanočestice veličine od 200 do 500 nm difundirat će unutar mukoznog sloja. Ovisno o adhezivnosti i veličini, one mogu prodrijeti i do površine epitelnih stanica. Nanočestice manje od 100 nm će se zadržavati u uskim prostorima između lanaca mukoze. Difuzija čestica ovisi i o vrsti i građi sluzi, pa će tako sluz s gustom mukoznom mrežom smanjiti kretanje nanočestica veličine oko 500 nm. Mehanizmom mukocilijarnog čišćenja čestice prisutne u gornjim slojevima mukoze će se ukloniti, dok će se one uz površinu epitelnih stanica zadržati (das Neves i sur., 2011).

Drugo važno svojstvo za probir nanočestica je površinski naboj. Odabrane su nanočestice s vrijednostima zeta-potencijala negativnijim od -30 mV, zbog dobre stabilnosti takvih sustava (Hafner i sur., 2009; Motwani i sur., 2008).

Iz svega proizlazi odabir lipidno-alginatnih nanočestica s masenim omjerom kationskog lipida i lecitina od 5:50, 7:50, 8:50 i 9:50 (LAN_5, LAN_7, LAN_8, LAN_9) kao nanočestica s najvećim potencijalom za razvoj terapijskog sustava za nazalnu primjenu. Definiran je i maseni omjer lecitina i alginata (10:1), tj. koncentracija otopine natrijevog alginata od 200 μg/ml.

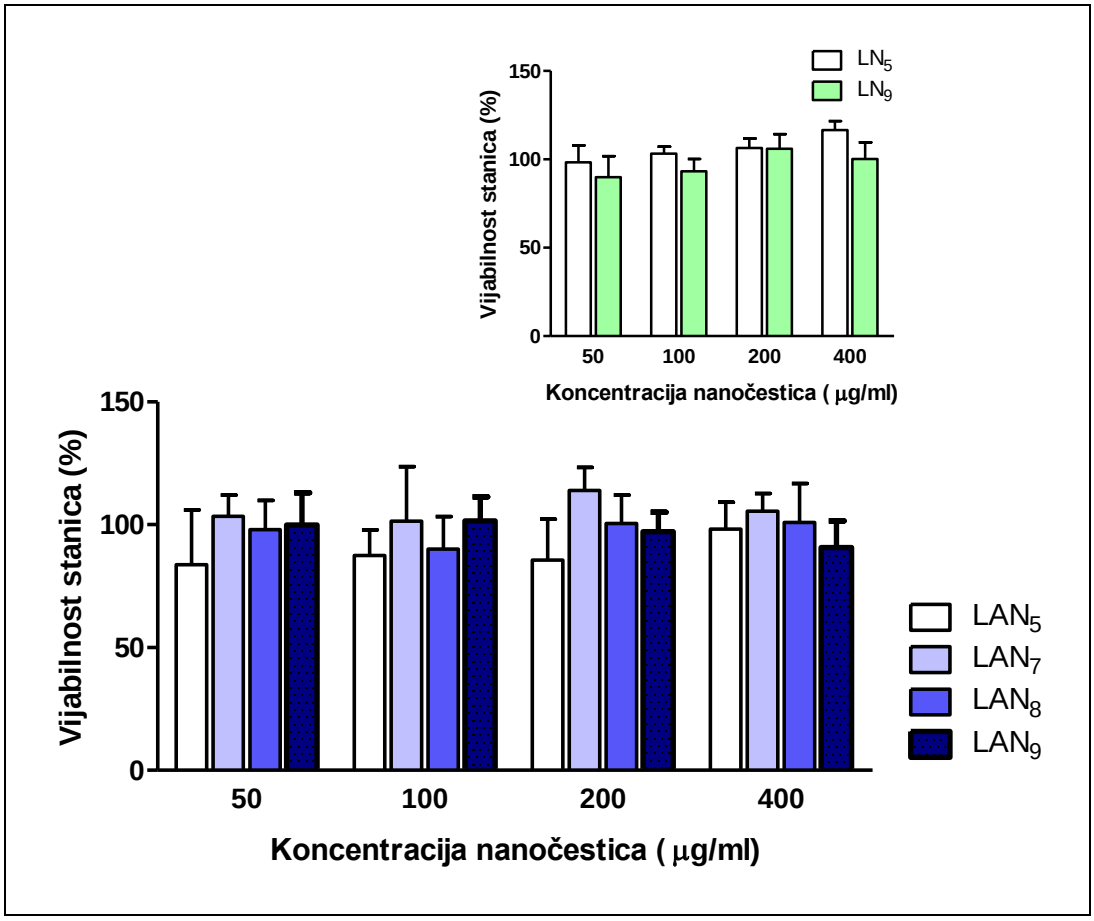
Ispitivanje biokompatibilnosti nanočestica *in vitro*

Razmatranje biokompatibilnosti pripravka važan je korak u procesu razvoja formulacije. Kod nazalno primijenjenog ljekovitog oblika štetno djelovanje ponajprije se odnosi na ciliotoksičnost, odnosno sprječavanje pokretljivosti cilija, ili oštećenje cilijarnog epitela, zbog čega primjena pripravka može biti ograničena (Hafner i sur., 2014).

Citotoksičnost primarnim probirom odabranih lipidno-alginatnih nanočestica ispitana je *in vitro* praćenjem metaboličke aktivnosti Caco-2 stanica nakon izlaganja suspenziji nanočestica u trajanju od 2 h. Metabolička aktivnost stanica mjerena je MTT testom. Caco-2 stanice su epitelne stanice karcinoma debelog crijeva. Iako su intestinalnog porijekla, često se koriste u procjeni biokompatibilnosti sustava za nazalnu primjenu. *In vitro* model Caco-2 stanica je jednostavan i dobrih svojstava, a upotrebljava se za ispitivanje permeabilnosti lijekova i citotoksičnosti pomoćnih tvari (Hafner i sur., 2009; Ekelund i sur., 2005).

Prije ispitivanja citotoksičnosti suspenzije nanočestica su razrijeđene otopinom HBSS-a (pH 7,4) do koncentracije nanočestica od 50, 100, 200 i 400 μg ml^{-1} (izražene koncentracijom lecitina u sustavu). Stanice su izložene razrijeđenim suspenzijama lipidno-alginatnih nanočestica te lipidnih nanočestica. Otopina HBSS-a služila je kao negativna kontrola. Suspenzije lipidnih nanočestica predstavljale su pozitivnu kontrolu zbog najvećeg mogućeg toksičnog utjecaja na stanice, uslijed njihovog pozitivnog površinskog naboja te veće vjerojatnosti za interakciju i narušavanje integriteta stanične membrane.

Tretiranje Caco-2 stanica suspenzijama lipidno-alginatnih nanočestica u ispitivanom rasponu koncentracija i trajanju od 2 h nije utjecalo na vijabilnost stanica (Slika 10). Stoga dobiveni rezultati upućuju na netoksičnost pripremljenih lipidno-alginatnih nanočestica. Lipidne nanočestice koje su služile kao kontrola nisu imale negativan utjecaj na vijabilnost stanica.



Slika 10. Utjecaj odabranih lipidno-alginatnih nanočestica (LAN_5, LAN_7, LAN_8, LAN_9) i lipidnih nanočestica s masenim omjerom lecitina i DDAB od 50:5 i 50:9 (LN_5 i LN_9) na vijabilnost Caco-2 stanica ispitan MTT testom. Suspenzije nanočestica su razrijeđene otopinom HBSS-a (pH 7,4) do koncentracije nanočestica od 50, 100, 200, 400 μg/ml. Stanice su tretirane 2 h. Vijabilnost stanica izražena je u odnosu na netretirane stanice inkubirane u HBSS-u (pH 7,4). Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3).

Uklapanje loratadina kao modelnog lijeka

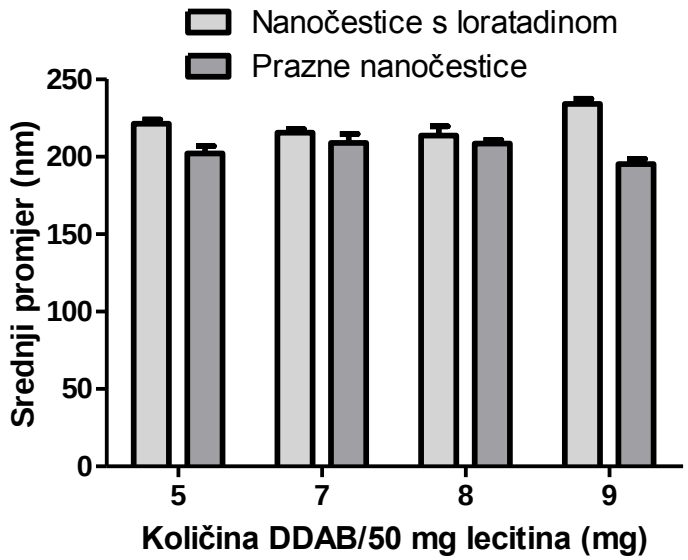
U odabrane nanočestice kao modelni lijek uklapan je loratadin, pri masenom omjeru prema lecitinu od 1:5. Loratadin je antihistaminik druge generacije koji se najčešće koristi u simptomatskom liječenju alergijskog rinitisa. Bioraspoloživost nakon oralne primjene mu je oko 40% (Singh i sur., 2013). Nazalnom primjenom zaobilazi se metabolizam prvim prolaskom kroz jetru, te omogućuje brzo otklanjanje simptoma. Svojstvo lipofilnosti loratadina omogućit će uklapanje lijeka unutar lipofilne jezgre razvijenih nanočestica.

Lipidno-alginatne nanočestice s loratadinom pripravljene su injektiranjem etanolne otopine loratadina i lipida u vodenu otopinu alginata. Lipidno-alginatne nanočestice s loratadinom pripravljene s masenim omjerom kationskog lipida i lecitina od 5:50, 7:50, 8:50 i 9:50 označeni su redom kao $LLAN_5$, $LLAN_7$, $LLAN_8$, $LLAN_9$. Za usporedbu su korištene odgovarajuće prazne lipidno-alginatne nanočestice LAN_5, LAN_7, LAN_8, LAN_9.

4.2. Veličina i zeta-potencijal nanočestica s loratadinom

Kako je već diskutirano, zadržavanje nanočestica u nosnoj šupljini i interakcije sa sluznicom ovise o veličini i zeta-potencijalu nanočestica. Svojstva lipidno-alginatnih nanočestica s loratadinom određena su nakon filtriranja suspenzija pripremljenih uzoraka, čime je uklonjen neuklopljeni lijek.

Srednji promjer lipidno-alginatnih nanočestica s loratadinom je u rasponu od 213,5 do 234,1 nm (Slika 11). Takav promjer je odgovarajući jer omogućuje difuziju čestica kroz sloj sluzi. Alginat prisutan na površini nanočestica zbog svojih svojstava mukoadhezivnosti pridonosi njihovom zadržavanju na nosnoj sluznici. Veličina lipidno-alginatnih nanočestica s loratadinom nešto je veća u odnosu na prazne lipidno-alginatne nanočestice (Slika 11).

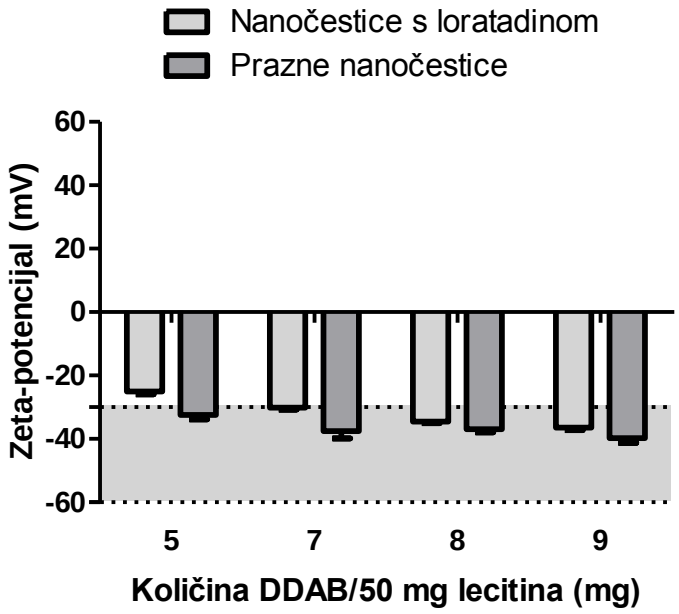


Slika 11. Ovisnost srednjeg promjera lipidno-alginatnih nanočestica s loratadinom i praznih lipidno-alginatnih nanočestica o masenom omjeru kationskog lipida DDAB i lecitina

Indeks polidisperznosti lipidno-alginatnih nanočestica s loratadinom kretao se između 0,21 i 0,29, što ukazuje na njihovu relativno ujednačenu veličinu (Tablica 5).

Zeta-potencijal je elektrokinetički potencijal difuznog sloja iona koji okružuju površinu čestice dispergirane faze. O njemu ovisi stabilnost disperzija (Jalšenjak i sur., 1998). Također je važan zbog interakcija s negativno nabijenim skupinama unutar lanaca mucina.

Vrijednosti zeta-potencijala pripremljenih suspenzija lipidno-alginatnih nanočestica s loratadinom kreću se u rasponu od -25,1 do -36,4 mV (Slika 12). Zeta-potencijal od približno -30 mV osigurava stabilnost suspenzija. Uklapanje lipofilnog loratadina dovelo je do blagog smanjenja negativnog zeta-potencijala nanočestica (Slika 12), što je vjerojatno posljedica utjecaja na strukturiranje nanočestica.

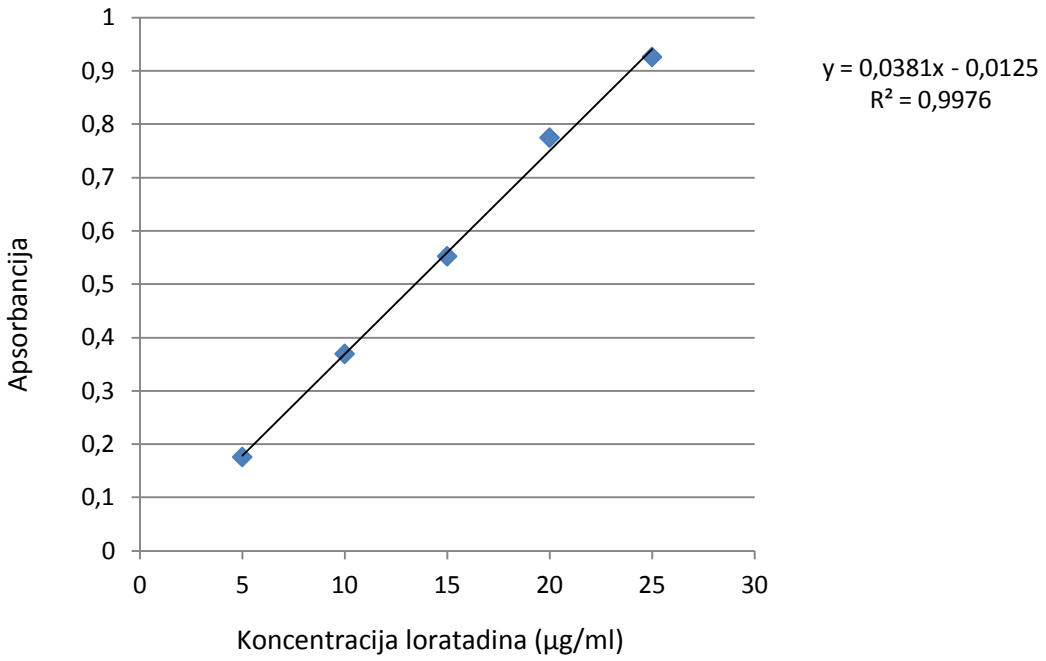


Slika 12. Ovisnost zeta-potencijala lipidno-alginatnih nanočestica s loratadinom i praznih lipidno-alginatnih nanočestica o masenom omjeru kationskog lipida DDAB i lecitina

4.3. Uspješnost uklapanja loratadina u nanočestice

Sadržaj loratadina u lipidno-alginatnim nanočesticama određen je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije. Uzorci su prije mjerenja filtrirani čime je uklonjen neukloplјeni dio lijeka. Koncentracija loratadina u ispitivanim uzorcima nanočestica ($LLAN_5$, $LLAN_7$, $LLAN_8$, $LLAN_9$) izračunata je iz izmjerene apsorbancije i nagiba pravca pripadajućeg

baždarnog dijagrama (Slika 13). Baždarni pravac dobiven je mjerenjem apsorbancija otopina loratadina poznatih koncentracija.



Slika 13. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji loratadina

Uspješnost uklapanja lijeka (UU) je sadržaj lijeka uklopljenog u nanočestice izražen u postotku prema ukupnoj količini lijeka u pripravku. Izračunat je i sadržaj uklopljenog lijeka, odnosno postotni udio uklopljenog lijeka u odnosu na ispitivanu količinu nanočestica (DL). Također određena je količina uklopljenog lijeka sadržana u jediničnom volumenu suspenzije nanočestica (koncentracija loratadina u suspenziji nanočestica, C). Svi izračunati podaci prikazani su u tablici (Tablica 6).

Tablica 6. Uspješnost uklapanja loratadina u lipidno-alginatnim nanočesticama.

	UU (%)	DL (%)	C (µg/ml)
$LLAN_5$	17,92	2,56	71,68
$LLAN_7$	17,19	2,39	68,78
$LLAN_8$	16,41	2,25	65,64
$LLAN_9$	14,08	1,90	56,30

UU (%), uspješnost uklapanja = izmjerena koncentracija lijeka / teorijska koncentracija lijeka × 100
DL (%), sadržaj loratadina = masa uklopljenog loratadina / masa nanočestica s loratadinom × 100
C (µg/ml) = masa uklopljenog lijeka / volumen suspenzije nanočestica

Uspješnost uklapanja loratadina u lipidno-alginatne nanočestice smanjivala se s porastom količine kationskog lipida u sustavu. Isto zapažanje uočeno je kod lipidno-alginatnih nanočestica u koje je uklopljen deksametazon (Ćorić, 2017). Najuspješnije uklapanje postignuto je kod nanočestica s najmanjim omjerom kationskog lipida i lecitina (5:50, *m/m;* $LLAN_5$). Uklapanje iznosi 17,92%, a pripadajuća koncentracija loratadina u navedenoj suspenziji nanočestica je 71,68 μg/ml.

5. ZAKLJUČCI

- Razvijene su lipidno-alginatne nanočestice u čijoj su pripravi, uz natrijev alginat, korišteni lecitin S45 te kationski lipid dimetil dioktadecil amonijev bromid (DDAB).
- Svojstva razvijenih nanočestica (veličina, polidisperznost i zeta-potencijal) ovisila su o masenom omjeru lecitina S45 i kationskog lipida.
- Pri izradi lipidnih nanočestica, maseni omjer kationskog lipida i lecitina veći od 3:50 rezultirao je nanočesticama pozitivnog naboja.
- Indeks polidisperznosti lipidnih nanočestica smanjen je dodatkom DDAB.
- Lipidno-alginatne nanočestice negativno su nabijene.
- Lipidno-alginatne nanočestice pripravljene s masenim omjerom kationskog lipida i lecitina većim od 3:50 karakterizirane su zeta-potencijalom koji osigurava fizičku stabilnost suspenzije nanočestica (negativniji od -30 mV) te značajnim povećanjem veličine u odnosu na same lipidne nanočestice.
- Povećanje koncentracije natrijevog alginata iznad 200 μg/ml u vodenoj otopini korištenoj u izradi lipidno-alginatnih nanočestica nije utjecalo na svojstva nastalih nanočestica.
- Nanočestice s najvećim potencijalom za razvoj terapijskog sustava za nazalnu primjenu su one s masenim omjerom kationskog lipida i lecitina od 5:50, 7:50, 8:50 i 9:50; maseni omjer lecitina i alginata iznosi 10:1, odnosno odgovarajuća koncentracija vodene otopine natrijevog alginata je 200 μg/ml.
- Suspenzije lipidno-alginatnih nanočestica u ispitivanim koncentracijama (50-400 μg/ml) nisu utjecale na vijabilnost Caco-2 stanica.
- Lipofilni lijek loratadin uspješno je uklopljen u odabrane nanočestice. Srednji promjer lipidno-alginatnih nanočestica s loratadinom kreće se od 213,5 do 234,1 nm; indeks polidisperznosti je između 0,21 i 0,29; dok zeta-potencijal iznosi od -25,1 do -36,4 mV.
- Loratadin uzrokuje blago povećanje srednjeg promjera lipidno-alginatnih nanočestica te smanjenje negativnog zeta-potencijala.
- Uspješnost uklapanja loratadina u lipidno-alginatne nanočestice je 14,1-17,9%, a najuspješnije uklapanje postignuto je kod nanočestica s najmanjim omjerom kationskog lipida i lecitina (5:50, *m/m*).

6. LITERATURA

Bal SM, Slütter B, Verheul R, Bouwstra JA, Jiskoot W. Adjuvanted, antigen loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles for nasal and intradermal vaccination: Adjuvant- and site-dependent immunogenicity in mice. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 45, 475-481.

Baza lijekova, http://www.halmed.hr, pristupljeno 21.04.2017.

Berardi RR, Ferreri SP, Hume AL, Kroon LA, Newton GD, Popovich NG, Remington TL, Rollins CJ, Shimp LA, Tietze KJ. Handbook of Nonprescription Drugs, An Interactive Approach to Self-Care. Washington, American Pharmacist Association, 16th edition, 2009, str. 192-196, 199, 200.

Bernocchi B, Carpentier R, Lantier I, Ducournau C, Dimier-Poisson I, Betbeder D. Mechanisms allowing protein delivery in nasal mucosa using NPL nanoparticles. *J Control Release*, 2016, 232, 42-50.

Bhatta RS, Chandasana H, Chhonker YS, Rathi C, Kumar D, Mitra K, Shukla PK. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: *In vitro* and pharmacokinetics studies. *Int J Pharm*, 2012, 432, 105-112.

Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC, urednici. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York, McGraw-Hill, 12th edition, 2011, str. 918-926, 1815, 1816.

Carbone C, Arena E, Pepe V, Prezzavento O, Cacciatore I, Turkez H, Marrazzo A, Di Stefano A, Puglisi G. Nanoencapsulation strategies for the delivery of novel bifunctional antioxidant/σ1 selective ligands. *Colloids Surf, B*, 2017, 155, 238-247.

Csaba N, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61, 140-157.

Ćorić L. Biokompatibilne lipidno-alginatne nanočestice s velikom uspješnošću uklapanja deksametazona. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2017, 1-44.

Das Neves J, Bahia MF, Amiji MM, Sarmento B. Mucoadhesive nanomedicines: characterization and modulation of mucoadhesion at the nanoscale. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, 8, 1085-1104.

Di Gioia S, Trapani A, Mandracchia D, De Giglio E, Cometa S, Mangini V, Arnesano F, Belgiovine G, Castellani S, Pace L, Lavecchia MA, Trapani G, Conese M, Puglisi G, Cassano T. Intranasal delivery of dopamine to the striatum using glycol chitosan/sulfobutylether-β-cyclodextrin based nanoparticles. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2015, 94, 180-193.

Duggan S, Cummins W, O'Donovan O, Hughes H, Owens E. Thiolated polymers as mucoadhesive drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 100, 64-78.

Ekelund K, Östh K, Påhlstorp C, Björk E, Ulvenlund S, Johansson F. Correlation between Epithelial Toxicity and Surfactant Structure as Derived from the Effects of Polyethyleneoxide Surfactants on Caco-2 Cell Monolayers and Pig Nasal Mucosa. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 94, 730-744.

El-Nabarawi MA, Bendas ER, El Rehem RTA, Abary MYS. Transdermal drug delivery of paroxetine through lipid-vesicular formulation to augment its bioavailability. *Int J Pharm*, 2013, 443, 307-317.

Elnaggar YSR, Etman SM, Abdelmonsif DA, Abdallah OY. Intranasal Piperine-loaded Chitosan Nanoparticles as Brain-Targeted Therapy in Alzheimer's Disease: Optimization, Biological Efficacy, and Potential Toxicity. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 104, 3544-3556.

Gupta NK, Tomar P, Sharma V, Dixit VK. Development and characterization of chitosan coated poly-(ε-caprolactone) nanoparticulate system for effective immunization against influenza. *Vaccine*, 2011, 29, 9026-9037.

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, Škrinjar D, Filipović-Grčić J. Mogućnosti nazalne primjene lijekova. Farmaceutski glasnik, 2014, 70, 303-321.

Haque S, Md S, Sahni JK, Ali J, Baboota S. Development and evaluation of brain targeted intranasal alginate nanoparticles for treatment of depression. *J Psychiatr Res*, 2014, 48, 1-12.

Jain AK, Khar RK, Ahmed FJ, Diwan PV. Effective insulin delivery using starch nanoparticles as a potential trans-nasal mucoadhesive carrier. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2008, 69, 426-435.

Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. Farmaceutika. Zagreb, Školska knjiga, 1998, str. 30.

Kaliner MA. A novel and effective approach to treating rhinitis with nasal antihistamines. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2007, 99, 383-391.

Kammona O, Kiparissides C. Recent advances in nanocarrier-based mucosal delivery of biomolecules. *J Control Release*, 2012, 161, 781-794.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, 11. izdanje, 2011, str. 272-279, 290,291.

Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf, B*, 2010, 75, 1-18.

Kürti L, Gáspár R, Márki Á, Kápolna E, Bocsik A, Veszelka S, Bartos C, Ambrus R, Vastag M, Deli MA, Szabó-Révész P. *In vitro* and *in vivo* characterization of meloxicam nanoparticles designed for nasal administration. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 50, 86-92.

Lecithin, http://www.lipoid.com, pristupljeno 02.03.2017.

Luppi B, Bigucci F, Corace G, Delucca A, Cerchiara T, Sorrenti M, Catenacci L, Di Pietra AM, Zecchi V. Albumin nanoparticles carrying cyclodextrins for nasal delivery of the anti-Alzheimer drug tacrine. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 44, 559-565.

Mazoniene E, Joceviciute S, Kazlauske J, Niemeyer B, Liesiene J. Interaction of cellulose-based cationic polyelectrolites with mucin. *Colloids Surf, B*, 2011, 83, 160-164.

Motwani SK, Chopra S, Talegaonkar S, Kohli K, Ahmad FJ, Khar RK. Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and *in vitro* characterisation. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2008, 68, 513-525.

Muntimadugu E, Dhommati R, Jain A, Challa WGS, Shaheen M, Khan W. Intranasal delivery of nanoparticle encapsulated tarenflurbil: A potential brain targeting strategy for Alzheimer's disease. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 92, 224-234.

Nathan RA. The Pathophysiology, Clinical Impact, and Management of Nasal Congestion in Allergic Rhinitis. *Clin Ther*, 2008, 30, 573-586.

Pallagi E, Ambrus R, Szabó-Révész P, Csóka I. Adaptation of the Quality by Design concept in early pharmaceutical development of an intranasal nanosized formulation. *Int J Pharm*, 2015, 491, 384-392.

Pereira GG, Detoni CB, Balducci AG, Rondelli V, Colombo P, Guterres SS, Sonvico F. Hyaluronate nanoparticles included in polymer films for the prolonged release of vitamin E for the management of skin wounds. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 83, 203-211.

Plantić I. Lipidno-alginatne nanočestice za nazalnu primjenu deksametazona. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2017, 1-45.

Product information, Aerinaze, http://www.ema.europa.eu, pristupljeno 21.04.2017.

Product information, Aerius, http://www.ema.europa.eu, pristupljeno 21.04.2017.

Product information, Azomyr, http://www.ema.europa.eu, pristupljeno 21.04.2017.

Product information, Dasselta, http://www.ema.europa.eu, pristupljeno 21.04.2017.

Product information, Desloratadine Actavis, http://www.ema.europa.eu, pristupljeno 21.04.2017..

Product information, Desloratadine ratiopharm, http://www.ema.europa.eu, pristupljeno 21.04.2017..

Product information, Desloratadine Teva, http://www.ema.europa.eu, pristupljeno 21.04.2017.

Product Information, Dimethyldioctadecylammonium bromide, http://www.sigmaaldrich.com, pristupljeno 04.03.2017.

Product information, Neoclarytin, http://www.ema.europa.eu, pristupljeno 21.04.2017.

Ruan Y, Yao L, Zhang B, Zhang S, Guo J. Antinociceptive properties of nasal delivery of Neurotoxin-loaded nanoparticles coated with polysorbate-80. *Peptides*, 2011, 32, 1526-1529.

Sažetak opisa svojstava lijeka, Flonidan direkt 10 mg raspadljive tablete za usta, http://www.halmed.hr, pristupljeno 04.12.2016.

Seju U, Kumar A, Sawant KK. Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: *In vitro* and *in vivo* studies. *Acta Biomater*, 2011, 7, 4169-4176.

Senyigit T, Sonvico F, Barbieri S, Özer Ö, Santi P, Colombo P. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. *J Control Release*, 2010, 142, 368-373.

Serra L, Doménech J, Peppas JA. Design of poly(ethylene glycol)-tethered copolymers as novel mucoadhesive drug delivery systems. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2006, 63, 11-18.

Shah B, Khunt D, Misra M, Padh H. Application of Box-Behnken design for optimization and development of quetiapine fumarate loaded chitosan nanoparticles for brain delivery via intranasal route. *Int J Biol Macromolec*, 2016, 89, 206-218.

Shahnaz G, Vetter A, Barthelmes J, Rahmat D, Laffleur F, Iqbal J, Perera G, Schlocker W, Dünnhaupt S, Augustijns P, Bernkop-Schnürch A. Thiolated chitosan nanoparticles for the nasal administration of leuprolide: Bioavailability and pharmacokinetic characterization. *Int J Pharm*, 2012, 428, 164-170.

Sherafudeen SP, Vasantha PV. Development and evaluation of *in situ* nasal gel formulations of loratadine. *Res Pharm Sci*, 2015, 10, 466-476.

Simons FER, Simons KJ. Histamine and H_1-antihistamines: Celebrating a century of progress. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 1139-1150.

Singh RMP, Kumar A, Pathak K. Thermally Triggered Mucoadhesive In Situ Gel of Loratadine: β-Cyclodextrin Complex for Nasal Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 2013, 14, 412-424.

Smith Korsholm K, Agger EL, Foged C, Christensen D, Dietrich J, Swetman Andersen C, Geisler C, Andersen P. The adjuvant mechanism of cationic dimethyldioctadecylammonium liposomes. *Immunology*, 2007, 121, 216-226.

Sosnik A, das Neves J, Sarmento B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. *Prog Polym Sci*, 2014, 39, 2030-2075.

Tiyaboonchai W. Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University J*, 2003, 11, 51-66.

Tripodo G, Trapani A, Torre ML, Giammona G, Trapani G, Mandracchia D. Hyaluronic acid and its derivates in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2015, 97, 400-416.

Wang X, Chi N, Tang X. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2008, 70, 735-740.

Yanasarn N, Sloat BR, Cui Z. Nanoparticles engineered from lecithin-in-water emulsions as a potential delivery system for docetaxel. *Int J Pharm*, 2009, 379, 174-180.

Yu M, Wu J, Shi J, Farokhzad OC. Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives. *J Control Release*, 2015, 240, 24-37.

Zhang X, Zhang H, Wu Z, Wang Z, Niu H, Li C. Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2008, 68, 526-534.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Specifične anatomske, fiziološke i histološke karakteristike nosne šupljine osiguravaju brojne prednosti nazalne primjene lijekova u odnosu na oralnu ili parenteralnu primjenu. Nazalnom primjenom postiže se brz lokalni učinak uz primjenu manjih doza djelatne tvari, a moguća je i direktna dostava lijeka do mozga te sistemski učinak za lijekove nedovoljne oralne bioraspoloživosti. Kako bi se prevladale prepreke nazalnoj apsorpciji, ali i povećala stabilnost, bioraspoloživost i učinkovitost djelatne tvari, razvijaju se novi terapijski sustavi poput nanočestica.

Cilj ovog rada bio je razviti lipidno-alginatne nanočestice željene veličine, površinskih svojstava i biokompatibilnosti, prikladne za uklapanje i nazalnu primjenu lipofilnih lijekova, korištenjem metode ionotropnog geliranja.

U pripravi lipidno-alginatnih nanočestica, uz natrijev alginat, korišteni su lecitin S45 te kationski lipid dimetil dioktadecil amonijev bromid (DDAB). Svojstva razvijenih nanočestica ovisila su o masenom omjeru kationskog lipida i lecitina S45. Pri izradi lipidnih nanočestica, maseni omjer kationskog lipida i lecitina veći od 3:50 rezultirao je nanočesticama pozitivnog naboja. Indeks polidisperznosti lipidnih nanočestica smanjen je dodatkom DDAB. Lipidno-alginatne nanočestice negativno su nabijene, a one pripravljene s masenim omjerom kationskog lipida i lecitina većim od 3:50 karakterizirane su zeta-potencijalom koji osigurava fizičku stabilnost suspenzije nanočestica (negativniji od -30 mV). Pri istim masenim omjerima uočeno je značajno povećanje veličine lipidno-alginatnih nanočestica u odnosu na same lipidne nanočestice. Povećanje koncentracije natrijevog alginata iznad 200 μg/ml u vodenoj otopini korištenoj u izradi lipidno-alginatnih nanočestica nije utjecalo na svojstva nastalih nanočestica.

Nanočestice s najvećim potencijalom za razvoj terapijskog sustava za nazalnu primjenu su one s masenim omjerom kationskog lipida i lecitina od 5:50, 7:50, 8:50 i 9:50; maseni omjer lecitina i alginata iznosio je 10:1. Suspenzije lipidno-alginatnih nanočestica u ispitivanim koncentracijama (50-400 μg/ml) nisu utjecale na vijabilnost Caco-2 stanica. U odabrane nanočestice uspješno je uklopljen lijek loratadin te su im određena fizičko-kemijska svojstva: srednji promjer kretao se od 213,5 do 234,1 nm; indeks polidisperznosti između 0,21 i 0,29; zeta-potencijal od -25,1 do -36,4 mV; uspješnost uklapanja loratadina od 14,1 do 17,9%. Najuspješnije uklapanje postignuto je kod nanočestica s najmanjim omjerom kationskog lipida i lecitina (5:50, *m/m*).

Specific anatomical, physiological and histological characteristics of the nasal cavity provide a lot of advantages of nasal drug delivery, comparing with the oral or parenteral application. Nasal delivery can provide fast local action with lower doses of drugs as well as a direct delivery to the brain and a systemic activity of drugs with poor oral bioavailability. To overcome barriers for nasal absorption, but also to enhance stability, bioavailability and efficacy of the drug, new drug delivery systems such as nanoparticles are being developed.

The aim of this work was to develop lipid/alginate nanoparticles of desirable size, surface characteristics and biocompatibility, appropriate for encapsulation and nasal delivery of lipophilic drugs, employing ionic gelation method.

In the preparation of the lipid/alginate nanoparticles, apart from sodium alginate, lecithin S45 and cationic lipid dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB) were used. Properties of the developed nanoparticles depended on the cationic lipid-to-lecithin weight ratio. In the preparation of lipid nanoparticles, a cationic lipid-to-lecithin weight ratio higher than 3:50 resulted in positively charged nanoparticles. The polydispersity index was decreased by adding DDAB. The lipid/alginate nanoparticles were negatively charged, while nanoparticles prepared with cationic lipid-to-lecithin weight ratio higher than 3:50 were characterized by zeta-potential that ensures physical stability of nanoparticle suspensions (less than -30 mV). A significant enhancement in the size of lipid/alginate nanoparticles, in comparison with the lipid nanoparticles, was noticed at the same weight ratios. Increase in sodium alginate concentration above 200 μg/ml in aqueous solution used in the preparation of lipid/alginate nanoparticles did not influence properties of the prepared nanoparticles.

Nanoparticles with the greatest potential for development of a drug delivery system for nasal application are nanoparticles with cationic lipid-to-lecithin weight ratio of 5:50, 7:50, 8:50 and 9:50; the weight ratio of lecithin and alginate was 10:1. Lipid/alginate nanoparticle suspensions in the tested concentrations (50-400 μg/ml) did not influence the viability of Caco-2 cells. Loratadine was successfully incorporated into the selected nanoparticles gaining the nanoparticle physiochemical properties as follows: mean diameter from 213.5 to 234.1 nm; polydispersity index from 0.21 to 0.29; zeta potential from -25.1 to -36.4 mV; entrapment efficacy of loratadine from 14.1 to 17.9%. The highest entrapment efficacy was achieved for nanoparticles with the lowest cationic lipid-to-lecithin weight ratio (5:50, *w*/*w*).

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 NAZALNU PRIMJENU LIPOFILNIH LIJEKOVA

Iva Gomboc

SAŽETAK

Specifične anatomske, fiziološke i histološke karakteristike nosne šupljine osiguravaju brojne prednosti nazalne primjene lijekova u odnosu na oralnu ili parenteralnu primjenu. Nazalnom primjenom postiže se brz lokalni učinak uz primjenu manjih doza djelatne tvari, a moguća je i direktna dostava lijeka do mozga te sistemski učinak za lijekove nedovoljne oralne bioraspoloživosti. Kako bi se prevladale prepreke nazalnoj apsorpciji, ali i povećala stabilnost, bioraspoloživost i učinkovitost djelatne tvari, razvijaju se novi terapijski sustavi poput nanočestica.
Cilj ovog rada bio je razviti lipidno-alginatne nanočestice željene veličine, površinskih svojstava i biokompatibilnosti, prikladne za uklapanje i nazalnu primjenu lipofilnih lijekova, korištenjem metode ionotropnog geliranja.
U pripravi lipidno-alginatnih nanočestica, uz natrijev alginat, korišteni su lecitin S45 te kationski lipid dimetil dioktadecil amonijev bromid (DDAB). Svojstva razvijenih nanočestica ovisila su o masenom omjeru kationskog lipida i lecitina S45. Pri izradi lipidnih nanočestica, maseni omjer kationskog lipida i lecitina veći od 3:50 rezultirao je nanočesticama pozitivnog naboja. Indeks polidisperznosti lipidnih nanočestica smanjen je dodatkom DDAB. Lipidno-alginatne nanočestice negativno su nabijene, a one pripravljene s masenim omjerom kationskog lipida i lecitina većim od 3:50 karakterizirane su zeta-potencijalom koji osigurava fizičku stabilnost suspenzije nanočestica (negativniji od -30 mV). Pri istim masenim omjerima uočeno je značajno povećanje veličine lipidno-alginatnih nanočestica u odnosu na same lipidne nanočestice. Povećanje koncentracije natrijevog alginata iznad 200 μg/ml u vodenoj otopini korištenoj u izradi lipidno-alginatnih nanočestica nije utjecalo na svojstva nastalih nanočestica.
Nanočestice s najvećim potencijalom za razvoj terapijskog sustava za nazalnu primjenu su one s masenim omjerom kationskog lipida i lecitina od 5:50, 7:50, 8:50 i 9:50; maseni omjer lecitina i alginata iznosio je 10:1. Suspenzije lipidno-alginatnih nanočestica u ispitivanim koncentracijama (50-400 μg/ml) nisu utjecale na vijabilnost Caco-2 stanica. U odabrane nanočestice uspješno je uklopljen lijek loratadin te su im određena fizičko-kemijska svojstva: srednji promjer kretao se od 213,5 do 234,1 nm; indeks polidisperznosti između 0,21 i 0,29; zeta-potencijal od -25,1 do -36,4 mV; uspješnost uklapanja loratadina od 14,1 do 17,9%. Najuspješnije uklapanje postignuto je kod nanočestica s najmanjim omjerom kationskog lipida i lecitina (5:50, *m*/*m*).

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

Rad sadrži: 46 stranica, 14 grafičkih prikaza, 6 tablica i 63 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Lecitin S45; Dimetil dioktadecil amonijev bromid (DDAB); Alginat; Nanočestice; Nazalna primjena

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Jasmina Lovrić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 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 NASAL DELIVERY OF LIPOPHILIC DRUGS

Iva Gomboc

SUMMARY

Specific anatomical, physiological and histological characteristics of the nasal cavity provide a lot of advantages of nasal drug delivery, comparing with the oral or parenteral application. Nasal delivery can provide fast local action with lower doses of drugs as well as a direct delivery to the brain and a systemic activity of drugs with poor oral bioavailability. To overcome barriers for nasal absorption, but also to enhance stability, bioavailability and efficacy of the drug, new drug delivery systems such as nanoparticles are being developed.

The aim of this work was to develop lipid/alginate nanoparticles of desirable size, surface characteristics and biocompatibility, appropriate for encapsulation and nasal delivery of lipophilic drugs, employing ionic gelation method. In the preparation of the lipid/alginate nanoparticles, apart from sodium alginate, lecithin S45 and cationic lipid dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB) were used. Properties of the developed nanoparticles depended on the cationic lipid-to-lecithin weight ratio. In the preparation of lipid nanoparticles, a cationic lipid-to-lecithin weight ratio higher than 3:50 resulted in positively charged nanoparticles. The polydispersity index was decreased by adding DDAB. The lipid/alginate nanoparticles were negatively charged, while nanoparticles prepared with cationic lipid-to-lecithin weight ratio higher than 3:50 were characterized by zeta-potential that ensures physical stability of nanoparticle suspensions (less than -30 mV). A significant enhancement in the size of lipid/alginate nanoparticles, in comparison with the lipid nanoparticles, was noticed at the same weight ratios. Increase in sodium alginate concentration above 200 μg/ml in aqueous solution used in the preparation of lipid/alginate nanoparticles did not influence properties of the prepared nanoparticles. Nanoparticles with the greatest potential for development of a drug delivery system for nasal application are nanoparticles with cationic lipid-to-lecithin weight ratio of 5:50, 7:50, 8:50 and 9:50; the weight ratio of lecithin and alginate was 10:1. Lipid/alginate nanoparticle suspensions in the tested concentrations (50-400 μg/ml) did not influence the viability of Caco-2 cells. Loratadine was successfully incorporated into the selected nanoparticles gaining the nanoparticle physiochemical properties as follows: mean diameter from 213.5 to 234.1 nm; polydispersity index from 0.21 to 0.29; zeta potential from -25.1 to -36.4 mV; entrapment efficacy of loratadine from 14.1 to 17.9%. The highest entrapment efficacy was achieved for nanoparticles with the lowest cationic lipid-to-lecithin weight ratio (5:50, *w*/*w*).

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

Thesis includes: 46 pages, 14 figures, 6 tables and 63 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Lecithin S45; Dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB), Alginate, Nanoparticles; Nasal delivery

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: May 2017.