

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko – biokemijski fakultet

Filip Blažević i Tamara Milekić

**Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom  
na cijeljenje rane *in vitro***

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Anite Hafner i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014./2015.

# Sadržaj

1.	Uvod .....	1
1.1.	Građa kože.....	1
1.1.1.	Epidermis.....	1
1.1.2.	Epidermokutana veza .....	3
1.1.3.	Dermis .....	3
1.2.	Cijeljenje rana.....	5
1.2.1.	Hemostaza .....	5
1.2.2.	Upala (inflamacija).....	6
1.2.3.	Proliferacija.....	7
1.2.4.	Maturacija .....	9
1.3.	Melatonin .....	10
1.3.1.	Utjecaj melatonina na cijeljenje rana.....	11
1.4.	Kitozan.....	13
1.4.1.	Utjecaj kitozana i njegovih derivata na cijeljenje rana.....	13
1.5.	Lecitin .....	17
1.6.	Nanotehnologija i nanočestice kao terapijski sustavi .....	18
1.6.1.	Nanotehnološki pristup u razvoju funkcionalnih obloga za rane.....	18
1.6.2.	Kitozanske nanočestice .....	20
1.6.3.	Metode pripreme nanočestica s kitozanom .....	21
2.	Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada.....	24
3.	Materijal i metode.....	26
3.1.	Materijal .....	26
3.2.	Metode .....	27
3.2.1.	Priprema nanočestica .....	27
3.2.2.	Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka u nanočestice.....	27
3.2.3.	Određivanje veličine nanočestica.....	28
3.2.4.	Određivanje zeta-potencijala nanočestica .....	28
3.2.5.	<i>In vitro</i> oslobađanje melatonina iz nanočestica .....	29
3.2.6.	Stanična linija i uvjeti uzgoja .....	30
3.2.7.	Ispitivanje citotoksičnosti <i>in vitro</i> - MTT test .....	30
3.2.8.	Praćenje dinamike prekrivanja praznina nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica – engl. <i>scratch test</i> .....	31
3.2.9.	Statistička analiza .....	32
4.	Rezultati.....	33

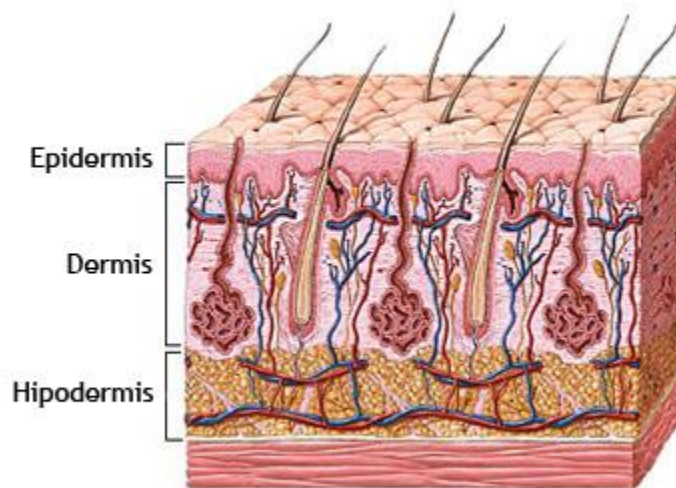
4.1.	Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom.....	33
4.2.	Karakterizacija nanočestica s melatoninom .....	33
4.2.1.	Uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice .....	33
4.2.2.	Veličina i zeta-potencijal nanočestica .....	34
4.3.	<i>In vitro</i> oslobađanje melatonina iz nanočestica .....	35
4.4.	Ispitivanje citotoksičnosti <i>in vitro</i> MTT testom .....	37
4.5.	Utjecaj nanočestica na proliferaciju i migraciju HaCaT stanica .....	40
5.	Rasprava .....	45
5.1.	Lecitinsko-kitozanske nanočestice sa melatoninom uspješno su pripravljene .....	45
5.2.	Uklapanje melatonina u nanočestice nije ovisilo o tipu kitozana .....	46
5.3.	Veličina i površinski naboj nanočestica ovise o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi kitozana .....	47
5.4.	Melatonin se produljeno oslobađa iz nanočestica.....	49
5.5.	Lecitinsko-kitozanske nanočestice manje utječu na vijabilnost stanica nego otopine kitozana .....	50
5.6.	Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom utječu na epitelizaciju rane <i>in vitro</i> .....	52
6.	Zaključci .....	55
7.	Zahvale .....	56
8.	Popis literature .....	57
9.	Sažetak.....	68
10.	Summary.....	69

# 1. Uvod

## 1.1. Građa kože

Koža je najveći organ ljudskog tijela, čini čak 16% tjelesne mase, a ukupna površina je oko 1,8 m<sup>2</sup>. Koža je fizička barijera prema okolini, a to joj je ujedno najvažnija funkcija. Na taj način sprječava gubitak vode, elektrolita i drugih tvari, a istovremeno štiti od fizičkih, kemijskih i mikrobioloških utjecaja. Koža također sudjeluje u regulaciji temperature.

Koža je složen organ građen od različitih staničnih tipova i struktura. Građena je od tri sloja: *epidermis*, *dermis* i *hipodermis* (potkožno masno tkivo) (Slika 1). U kožu se ubrajaju i kožni adneksi kao što su folikuli dlaka, nokti, žlijezde lojnice i znojnice.



Slika 1: Presjek kože [1]

Na površini kože nalazi se tanki hidrolipidni film (kiseli ili Marchioninijev plašt kože) koji štiti kožu od gubitka vlage i prodora stranih tvari, posebno mikroorganizama. Masne tvari u hidrolipidnom filmu odraslih ljudi potječu uglavnom iz žlijezda lojnica (sebacealni lipidi) i manjim dijelom iz epidermalnih stanica (epidermalni lipidi) [2].

### 1.1.1. Epidermis

Epidermis je površinski, tanji (debljine oko 100 µm) i avaskularan sloj kože. Keratinizirani je slojeviti epitel izgrađen od keratinocita koji čine gotovo 95% epidermalnih stanica. Ostale stanice čine melanociti, Langerhansove stanice i Merkelove stanice. Keratinociti u lamelarnim

granulama proizvode keratin i intercelularne lipide, melanociti stvaraju pigment melanin, Langerhansove stanice su najvažnije stanice imunološkog sustava kože, a Merkelove stanice imaju ulogu osjetnih mehanoreceptora. Epidermis ne sadrži krvne ni limfne žile, a transport tvari odvija se difuzijom iz dermisa u epidermis i obratno.

Epidermis je sastavljen od četiri - pet slojeva: *stratum corneum*, (*stratum lucidum*), *stratum granulosum*, *stratum spinosum* i *stratum basale*.

#### *Stratum corneum (rožnati sloj)*

Rožnati sloj je krajnji sloj maturacije keratinocita. Sastoji se od 10-30 slojeva spljoštenih, mrtvih keratinocita (korneocita) koji se kontinuirano ljušte i zamjenjuju novim stanicama iz dubljih slojeva epidermisa. Najviše slojeva korneocita nalazimo na dlanovima i petama, a najmanje na usnama. Korneociti su anuklearne stanice bez staničnih organela. Ispunjeni su keratinom, lipidima, masnim kiselinama i ceramidom, a okruženi su hidrofobnim lipidnim matriksom. Takva struktura omogućuje zadržavanje vode i prirodnu fizičku barijeru. Rožnati sloj može apsorbirati tri puta više vode od njegove mase ali ukoliko se razina vode smanji ispod 10% on prestaje biti savitljiv i dolazi do pucanja. Vrijeme potrebno da epidermalne stanice stignu od bazalnog do rožnatog sloja je obično 28 dana.

U nižim slojevima rožnatog sloja korneociti su povezani korneodezmosomima. Približavanjem površini dolazi do dezintegracije korneodezmosoma što rezultira deskvamacijom, odnosno ljuštenjem korneocita sa površine kože.

#### *Stratum lucidum (svijetli sloj)*

Svijetli sloj je sloj u kojem dolazi do potpune razgradnje jezgri i porasta keratinizacije stanica koji je popraćen daljnjim morfološkim promjenama [3]. Prisutan je samo u debljim dijelovima kože izloženim trenju.

#### *Stratum granulosum (zrnati sloj)*

Zrnati sloj se sastoji od jednog do tri sloja stanica. Keratinociti se i dalje diferenciraju te u ovom sloju započinje razgradnja stanične jezgre i organela. Keratin se nakuplja u keratinohijalinskim zrcima, a intercelularni lipidi se sintetiziraju u lamelarnim granulama [3].

### *Stratum spinosum (trnasti ili nazubljeni sloj)*

Trnasti sloj je dobio ime po dezmosomima (intercelularnim mostovima) koji spajaju keratinocite, a pod mikroskopom izgledaju kao trnovi. Sastoji se od dva do šest redova keratinocita koji se u ovom sloju počinju morfološki mijenjati, diferencirati i sintetizirati keratin koji se udružuje u tonofilamente. Imunološki aktivne Langerhansove stanice su od svih slojeva najzastupljenije u u trnastom sloju.

### *Stratum basale (bazalni sloj)*

Bazalni sloj se sastoji od jednog reda zametnih stanica koje se kontinuirano dijele. Stanice su povezane s bazalnom membranom hemidezmosomima. Nakon diobe keratinocita jedna stanica ostaje u bazalnom sloju dok druga migrira kroz epidermis do rožnatog sloja. Osim keratinocita tu su prisutne i Merkelove stanice (posebno u dijelovima kože osjetljivim na dodir poput jagodica i usna) te melanociti koji stvaraju pigment melanin. Melanin je zadužen za zaštitu od UV zračenja. Izlaganje sunčevom svjetlu rezultira povećanjem omjera melanocita u odnosu na keratinocite i zato „tamnimo“.

## **1.1.2. Epidermokatana veza**

Epidermis je povezan s dermisom preko bazalne membrane (epidermokatana veza). Epidermokatana veza smanjuje mogućnost odvajanja epidermisa od dermisa pri djelovanju sile naprezanja na kožu te istovremeno sprječava prodor tvari u oba smjera, a štiti kožu i organizam od mikroorganizama te od gubitka vode i elektrolita. Epidermokatana veza prati valovitu papilarnu liniju, a građena je od trilamelarnih bazalnih keratinocita i kolagenskih vlakana koja usidruju epidermis u dermis. U epidermisu su prisutni okrajci živaca dok krvne žile ne prelaze ovu granicu te hranjive tvari iz cirkulacije difuzijom prelaze u epidermis. Velika ukupna površina valovite i nabrane papilarne linije pridonosi ovakvom prijenosu tvari [2].

## **1.1.3. Dermis**

Dermis je unutarnji, deblji (1 do 2 mm) sloj vezivnog tkiva. Duž dermisa prolaze folikuli s dlakama i žlijezde znojnice. Dijeli se na papilarni sloj (lat. *stratum papillare*) i retikularni sloj (lat. *stratum reticulare*), a među njima nema oštre granice. Papilarni sloj je utisnut u epidermis, a osim vezivnog tkiva sadrži i kapilare, živčane završetke i osjetna tjelešca za dodir

(Meissnerova tjelešca). Ispod njega se nalazi retikularni sloj koji sadrži guste snopove kolagenskih vlakana upletenih u mrežu elastičnih vlakana, krvne i limfne žile, živce, receptore za hladnoću (Krauseovi klipovi), žlijezde lojnice, kostriješni mišić (lat. *m. arrector pili*) [4].

Kolagen čini 70-80% mase dermisa. Kolagenska vlakna prave raznosmjerne tračke (rombičke strukture) i mogu se dijagonalno razvlačiti, ali se ne mogu vratiti u prvotni položaj bez elastičnih vlakana. Elastična vlakna čine manje od 1-2% ukupne mase dermisa, ali imaju nezamjenjivu funkciju pri opiranju silama deformacije i vraćanju kože u prvotni oblik [2].

Dermis sadrži različite vrste stanica: fibroblaste, limfocite i makrofage. Fibroblasti su zaduženi za biosintezu kolagena, elastina, glikozaminoglikana, proteoglikana, fibronektina, laminina i drugih proteina izvanstaničnog matriksa koji koži daju potporu i elastičnost. Strukturni su proteini dermisa kolagen i elastin, a adhezivni laminin i fibronektin. Laminin povezuje epitelne stanice s bazalnom membranom, a fibronektin pričvršćuje fibroblaste [4].



## 1.2. Cijeljenje rana

Rana se definira kao oštećenje protektivne funkcije kože, gubitak kontinuiteta epitela, sa ili bez gubitka vezivnog tkiva (mišići, kosti, živci). Cijeljenje rana je biološki odgovor na ozljedu tkiva. Cijeljenje se sastoji od četiri faze koje se međusobno preklapaju: hemostaze, upale (inflamacije), proliferacije i maturacije.

### 1.2.1. Hemostaza

Hemostaza znači zaustavljanje krvarenja. Kada se žila presiječe ili rastrgne, hemostaza se postiže putem nekoliko mehanizama: 1) grčem žile, 2) stvaranjem trombocitnog čepa, 3) stvaranjem ugruška koji nastaje zgrušavanjem krvi i 4) konačno urastanjem vezivnog tkiva u ugrušak, što trajno zatvara otvor na žili.

#### *Grč žile*

Ozljeda krvne žile, odmah nakon presijecanja ili pucanja, uzrokuje kontrakciju žile čime se istovremeno smanjuje protjecanje krvi kroz ozljedu žile. Kontrakcija nastane zbog živčanih refleksa, lokalnog miogenog spazma i lokalnih humoralnih čimbenika iz oštećenog tkiva i trombocita. Za najveći dio kontrakcije manjih krvnih žila odgovorni su trombociti koji otpuštaju tromboksan A<sub>2</sub>, tvar koja djeluje konstriktorski.

#### *Stvaranje trombocitnog čepa*

Stanična membrana trombocita od velike je važnosti za hemostazu. Na njezinoj površini nalazi se glikoproteinski omotač koji sprječava prijanjanje membrane uz normalni endotel, ali uzrokuje njezino prijanjanje uz oštećena područja stijenke krvne žile. Prijanjanje uz oštećene endotelne stanice i, još više, uz kolagen iz dubljih dijelova žilne stijenke. Također, membrana trombocita sadrži i velike količine fosfolipida koji mogu djelovati aktivacijski na više mjesta u procesu zgrušavanja krvi.

Kada trombociti dođu u dodir s oštećenom površinom žile mijenjaju svoja svojstva. Počinju bubriti te poprimati nepravilne oblike, s brojnim zrakastim izdancima što strše iznad njihove površine. Postaju ljepljivi te prijanjaju za tkivni kolagen i von Willebrandov faktor (protein plazme). Luče velike količine ADP, a njihovi enzimi stvaraju tromboksan A<sub>2</sub>. ADP i tromboksan

A2 aktiviraju susjedne trombocite i čine ih ljepljivima, te oni prijanjaju uz prethodno aktivirane trombocite što u konačnici vodi do stvaranja trombocitnog čepa. Trombocitni čep može zaustaviti krvarenje ako je pukotina na žili malena, no, ukoliko je veliki otvor mora se stvoriti i krvni ugrušak.

### *Zgrušavanje krvi u ozlijeđenoj žili*

Ugrušak se pri velikoj ozljedi počne stvarati za 15 do 20 sekundi, a pri manjoj ozljedi za jednu do dvije minute. Proces zgrušavanja započinju aktivacijske tvari iz oštećene stijenke žile, iz trombocita te iz krvnih proteina koje prijanjaju uz oštećenu stijenku krvne žile. Ako otvor nije prevelik, tri do šest minuta poslije ozljede ugrušak ispuni cijeli presječni ili rastrgani kraj žile. Nakon 20 minuta do jednog sata ugrušak se počne stezati, zbog čega se žila još više zatvori [5]. Za stezanje su zaslužni trombociti.

Ugrušak je sastavljen od fibrinskih niti koje se protežu u svim smjerovima i zadržavaju krvne stanice, trombocite i plazmu. Fibrinske niti prijanjaju i za oštećene površine krvnih žila i sprječavaju krvarenje.

### **1.2.2. Upala (inflamacija)**

U koagulacijskoj kaskadi faktor Xa prevodi inaktivni protrombin u aktivni trombin. Trombin, povećavajući vaskularnu permeabilnost, potiče migraciju upalnih stanica na mjesto ozljede. Ovim mehanizmom svi faktori i stanice potrebni za cijeljenje rane prelaze iz intravaskularnog prostora u ekstravaskularni. Nakon početnog perioda vazokonstrukcije slijedi duži period vazodilatacije uzrokovane histaminom, prostaglandinima, kininima i leukotrienima. Vazodilatacija je važna kako bi do rane stigao veći protok krvi, zajedno sa upalnim stanicama i faktorima potrebnima za sprječavanje infekcije.

U fazi upale uključuju se polimorfonuklearni leukociti (PMN) (neutrofili), makrofagi i limfociti, a ona traje nekoliko sati nakon ozljede. Neutrofili su dominantne stanice u prvih 48 sati, međutim nisu esencijalne za proces cijeljenja rane. Oslobađajući medijatore upale i reaktivne oblike kisika (ROS) koji djeluju antibakterijski, neutrofili uklanjaju bakterije i nekrotizirano tkivo sa mjesta ozljede [6].

Za razliku od neutrofila, makrofagi su esencijalne i vjerojatno najvažnije stanice u ranoj fazi procesa cijeljenja rane. Makrofagi fagocitiraju bakterije i ostatke nekrotiziranih stanica, izlučuju kolagenazu i elastazu koje razgrađuju oštećeno tkivo zbog čega posljedično dolazi do

izlučivanja citokina (IL-1, TNF- $\alpha$ ) te oslobađanja transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , engl. *transforming growth factor- $\beta$* ), transformirajućeg čimbenika rasta  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ , engl. *transforming growth factor- $\alpha$* ) i trombocitnog čimbenika rasta (PDGF, engl. *platelet-derived growth factor*) [7]. PDGF je citokin koji stimulira kemotaksiju i proliferaciju fibroblasta i glatkih mišićnih stanica. Također, makrofagi izlučuju tvari koje privlače endotelne stanice prema rani i stimuliraju njihovu proliferaciju te promoviraju angiogenezu. T limfociti migriraju prema ozljedi tijekom faze upale zbog oslobođenog interleukina-1, koji nastaje zahvaljujući djelovanju kolagenaze. Limfociti izlučuju limfokine poput epitelnog čimbenika rasta koji izlučuje heparin (HB-EGF, engl. *heparin-binding epidermal growth factor*) i bazičnog čimbenika rasta fibroblasta (bFGF, engl. *basic fibroblast growth factor*) te su odgovorni za stvaranje aktiviranih limfocita koji omogućuju imunost posredovanu stanicama [6].

### 1.2.3. Proliferacija

Nakon tri do pet dana od ozljede počinje se stvarati granulacijsko tkivo. To je jedan od najvažnijih događaja tijekom proliferacijske faze, a preklapa se s fazom upale. Granulacijsko tkivo se sastoji od inflamatornih stanica, fibroblasta i novih krvnih žila u matriksu sastavljenom od fibronektina, kolagena, glikozaminoglikana i proteoglikana. Ova faza sastoji se od četiri podfaze: epitelizacije, fibroplazije, angiogeneze i kontrakcije.

#### *Epitelizacija*

Epitelizacija podrazumijeva stvaranje epitela iznad oštećenog tkiva. Ukoliko su rubovi rane na udaljenosti manjoj od 1 mm, stanice migriraju i stvara se epitelni sloj koji štiti ozljedu od okoline. Epidermalne stanice se u tom slučaju strukturalno mijenjaju, a zatim odvajaju od ostalih epidermalnih stanica i bazalne membrane te stvaraju intercelularne aktinske mikrofilamente koji im omogućuju migraciju. Izlučuju kolagenazu koja razgrađuje kolagen i aktivator plazminogena čime posljedično dolazi do stvaranja plazmina. Plazmin promovira otapanje ugrušaka duž puta kojim keratinociti migriraju, a oni ulaze u interakciju sa fibrinom koji je poprečno vezan na fibronektin i kolagen. Smatra se da fibronektin promovira adheziju keratinocita i na taj način vodi stanice duž ozljede.

Nakon procesa epitelizacije, epidermalne stanice poprimaju svoj uobičajeni oblik. Stvaraju nove dezmosome kojima su povezane s ostalim epitelnim stanicama i hemodezmosome kojima su vezane za bazalnu membranu.

## *Fibroplazija*

Fibroblasti su ključne stanice u granulacijskom tkivu. Oni su odgovorni za produkciju kolagena, elastina, fibronektina, glikozaminoglikana i proteaza. Broj fibroblasta se na mjestu ozljede povećava kako se broj inflamatornih stanica smanjuje. Fibroplazija započinje tri do pet dana nakon ozljede i može potrajati do čak 14 dana. Fibroblasti kože i stanice mezenhima diferenciraju čime stječu sposobnost migracije i kontrakcije. Fibronektin, PDGF, čimbenik rasta fibroblasta, (FGF, engl. *fibroblast growth factor*), TGF i C5a potiču fibroblaste na migraciju i proliferaciju. Fibronektin služi kao sidro za miofibroblaste koji migriraju prema ozljedi [6].

Sinteza kolagena je ključna u ovoj podfazi. Počinje otprilike tri dana nakon ozljede i može potrajati od dva do četiri tjedna. U početnoj fazi kolagen tipa III je dominantan, no kasnije ga zamjenjuje kolagen tipa I [7]. Kolagen treba biti bogat hidroksilizinom i hidroksiprolinom kako bi se stvarale snažne veze, a hidroksilacija prolina i lizina ovisna je o prisutnosti kisika, vitamina C, željeza i  $\alpha$ -ketoglutarata. Kolagen se zatim izlučuje u ekstracelularni prostor egzocitozom u obliku prokolagena, trostruke  $\alpha$ -heliks uzvojnice. Nakon uklanjanja terminalnih dijelova prokolagen peptidazom nastaje tropokolagen koji onda s drugim molekulama tropokolagena stvara kolagenske filamente. Stvaranje filamenata, fibrila i tkiva događa se u matriksu koji se sastoji od glukozaminoglikana, hijaluronske kiseline, hondroitin sulfata, dermatan sulfata i heparin sulfata za izlučivanje kojih su zaslužni fibroblasti.

## *Angiogeneza*

Kako bi novo formirano tkivo dobivalo dovoljno hranjivih tvari, bogat dotok krvi je od vitalne funkcije. Makrofagi su esencijalni za stimulaciju angiogeneze i produkciju makrofagnog čimbenika angiogeneze (MDAF, engl. *macrophage-derived angiogenesis factor*) kao odgovora na slabu oksigenaciju tkiva. Epitelne stanice izlučuju bFGF i vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) koji također utječu na angiogenezu [6].

Angiogeneza rezultira boljim protokom krvi prema ozljedi i većom perfuzijom faktora potrebnih za cijeljenje. Kada novonastale krvne žile prestanu biti potrebne one se uklanjaju apoptozom.

## *Kontrakcija*

Gotovo usporedno za sintezom kolagena započinje i kontrakcija rane. Kontrakcija podrazumijeva centripetalne pokrete rubova rane koji olakšavaju zatvaranje rane, a maksimalno je izražena od 5. do 15. dana nakon ozljede. Kontrakcija rane ovisi o obliku rane i o čvrstoći rubova te o periferno lociranim miofibroblastima, njihovoj vezi sa izvanstaničnim matriksom i proliferaciji miofibroblasta.

### **1.2.4. Maturacija**

Remodeliranje kolagena tijekom faze maturacije ovisi o kontinuiranoj sintezi novog kolagena i razgradnji starog kolagena. Zapčinje oko 21. dana nakon ozljede, a može se nastaviti godinama. Kolagenaze i metaloproteinaze matriksa pomažu u uklanjanju starog kolagena na mjestu ozljede. Tkivni inhibitori metaloproteinaza ograničavaju utjecaj kolagenolitičkih enzima, pa se uspostavlja ravnoteža između sinteze i razgradnje. Tijekom remodeliranja, kolagen tipa III zamjenjuje kolagen tipa I, fibronektin polako nestaje, proteoglikani zamjenjuju hijaluronsku kiselinu i glikozaminoglikane, a voda se resorbira iz rane. Navedeni događaji omogućuju kolagenskim vlaknima da se maksimalno približe i tvore poprečne veze koje povećavaju mehaničku otpornost rane.

Snaga otpora na istezanje rane podrazumijeva silu koja je potrebna da rana pukne neovisno o njezinim dimenzijama. Zacjeljena rana može dosegnuti samo oko 80% mehaničke otpornosti neranjene kože.

### 1.3. Melatonin

Melatonin je neurohormon, strukturno indolni amid, široko je rasprostranjen u prirodi pa ga možemo pronaći u kralježnjaka, beskralježnjaka, biljaka, algi pa čak i bakterija. U čovjeka se većinom sintetizira u epifizi (pinealnoj žlijezdi) pod izravnim utjecajem ritma izmjene dana i noći. Naime, pinealna žlijezda reagira na svjetlo, odnosno tamu i ovisno o tome stvara kemijske signale. Svjetlo blokira sekreciju melatonina pa se njegova koncentracija tijekom dana smanjuje ispod 30 pM dok noću dostiže vrijednost od 100-400 pM. Iz aminokiseline triptofan prvo se sintetizira serotonin, a zatim djelovanjem N-acetiltransferaze i hidroksiindol-O-metiltransferaze nastaje melatonin. Jednoliko je rasprostranjen u organizmu zbog male molekulske mase i amfifilnog karaktera molekule koji mu omogućuju pasivnu difuziju kroz staničnu membranu [8]. Vrijeme poluživota melatonina je 30 minuta. Metabolizira se u jetri citokrom-P450 monooksigenazama (CYP1A2, CYP1A1, CYP1B1) u 6-hidroksimelatonin te konjugira sulfotransferazom u 6-sulfatoksimeatonin i izlučuje urinom [9]. Koncentracija tog metabolita je veća noću nego danju, što reflektira cirkadijani ritam sinteze i sekrecije melatonina [10].

Melatonin ima pleiotropne bioučinke kao neurotransmitor, hormon, citokin i modulator biološkog odgovora [11]. U tijelu ima ključnu ulogu u cirkadijanom ritmu fizioloških funkcija poput spavanja i regulacije krvnog tlaka te kod sezonskih promjena. Opisana su dva melatoninska receptora preko kojih djeluje, MT1 i MT2. Djelujući preko melatoninskih receptora lociranih u mozgu i perifernom tkivu ima ulogu u spolnoj maturaciji, potrošnji energije i regulaciji tjelesne mase. Može imati utjecaja na mozak, imunološku, gastrointestinalnu, kardiovaskularnu, renalnu, koštanu i endokrinu funkciju te može djelovati onkostatski [12]. Također je poznato da melatonin djeluje imunostimulativno i citoprotektivno [13].

Funkcije melatonina i njegovih metabolita neovisne o vezanju na receptore obuhvaćaju detoksikaciju i antioksidativno djelovanje, zatim antiapoptotski, antigenotoksični i antimutageni učinak te mitohondrijsku regulaciju. Melatonin smanjuje oštećenja tkiva uzrokovana reaktivnim oblicima kisika (ROS) i dušika (RNS) djelujući kao hvatač slobodnih radikala. Povećava aktivnost antioksidativnih enzima poput superoksid dizmutaze i peroksidaze, a smanjuje aktivnost prooksidativnih enzima [14]. Potiče sintezu glutationa i obnavljanje njegovog reduciranog oblika unutar stanica. Zabilježeni su primjeri smanjenja ishemičnog oštećenja srčanog tkiva *in vivo* u štakora [15] te oštećenja nastalih ionizirajućim zračenjem [16].

Primijenjen topikalno melatonin ima fotoprotektivni učinak te smanjuje eriteme uzrokovane UV zračenjem. Prevenirira fotostarenje, fotokarcinogenezu i druga oštećenja kože izazvana UV zračenjem [3].

### **1.3.1. Utjecaj melatonina na cijeljenje rana**

Melatonin utječe na brojne procese uključene u cijeljenje rane kao što su oslobađanje medijatora upale, proliferacija i migracija stanica, angiogeneza i akumulacija kolagena i glikozaminoglikana u miljeu rane [8]. Učinak melatonina je ovisan o dozi, vremenu primjene i ciljanoj tkivu. Međutim, u literaturi se mogu pronaći oprečna mišljenja o tome ima li melatonin pozitivan [17, 18] ili negativan [19, 20] učinak na cijeljenje rana, odnosno na proliferaciju fibroblasta i akumulaciju kolagena. Oprečna mišljenja djelomično mogu biti objašnjena razlikom između učinka melatonina kada je primijenjen topikalno na milje rane i indirektnog učinka preko različitih regulatornih mehanizama pri sistemske primjeni [21, 22]. Iz navedenog razloga čini se opravdanim razvijati terapijske sustave s uklopljenim melatoninom za lokalnu primjenu kojima se zaobilaze sistemski učinci.

Ispitivanja su pokazala da melatonin utječe na stvaranje kolagena ovisno o dobu dana kada je primijenjen. Primjena ujutro povećava razinu kolagena na mjestu rane, dok ju primjena navečer smanjuje [23]. Bulbuler i suradnici [19] pokazali su da melatonin primijenjen navečer ima negativan učinak na sintezu hidroksiprolina u intestinalnim anastomoznim ranama štakora što rezultira smanjenom mehaničkom otpornošću rana. Odstranjivanje pinealne žlijezde dovelo je do povećanja razine hidroksiprolina, dok je primjena melatonina kod štakora bez pinealne žlijezde smanjila razinu hidroksiprolina.

Melatonin regulira inducibilnu sintazu dušikova oksida (iNOS) tijekom procesa cijeljenja. Za vrijeme faze upale smanjuje njezinu aktivnost, dok ima suprotan učinak tijekom proliferativne faze. Smatra se da aktivnost iNOS i dušikovog oksida ima utjecaja na angiogenezu i granulaciju tkiva [8]. Pugazhenti i suradnici [24] su kao model rane u štakora napravili inciziju. Primjena melatonina poboljšala je maturaciju i orijentaciju kolagenskih vlakana, a time i kvalitetu ožiljka. Ubrzala je angiogenezu i stvaranje novih krvnih žila i povećala razinu VEGF tijekom faze granulacije.

Melatonin ima velikog utjecaja na imunološki sustav, a utjecaj je ovisan o dozi. U koncentracijama iznad fizioloških inducira proliferaciju T-limfocita i proinflammatoryh citokina. Egzogeno primijenjen melatonin povećava proliferaciju limfocita štakora, povećava broj NK stanica, stimulira stvaranje proinflammatoryh citokina IL-1 i TNF- $\alpha$  i pojačava fagocitozu [25].

Gómez-Florit i suradnici [26] su u ispitivanju provedenom na fibroblastima gingive pokazali da melatonin povećava ekspresiju kolagena, dekorina (proteoglikana prisutnog u humanoj gingivi koji regulira organizaciju kolagena) i interleukina-10, a smanjuje omjer MMP1/TIMP1 (metaloproteinaza matriksa-1 / tkivni inhibitor metaloproteinaze-1) i promovira zarastanje rane bez ožiljka. U kombinaciji sa antioksidativnim svojstvima koje posjeduje, smatra se da može imati protektivni i obnavljajući učinak na integritet tkiva gingive.

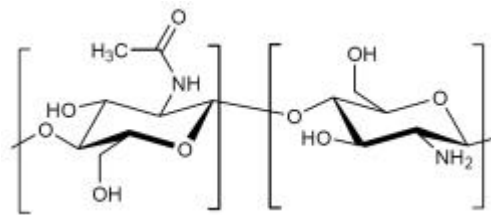
Primijenjen topikalno i intraperitonealno melatonin može smanjiti razvoj ulkusa i/ili ubrzati cijeljenje [27]. Ispitivanja u štakora pokazala su da ima povoljan učinak pri liječenju akutnog pankreatitisa te da potiče spontanu regeneraciju tkiva gušterače [28].

Za uspješno cijeljenje rane sprječavanje infekcije je od velikog značaja. Infekcija, osim što može dovesti do sepse, može inhibirati brojne procese uključene u cijeljenje rane. Tekbas i suradnici [29] pokazali su da melatonin ima antibakterijski učinak na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije *in vitro*, a djelovanje je potentnije za gram-negativne bakterije. Učinak se pripisuje njegovom svojstvu vezanja intracelularnih supstrata kao što su slobodno željezo i masne kiseline.



## 1.4. Kitozan

Kitozan je prirodni polimer koji se priprema alkalnom N-deacetilacijom hitina, visokomolekularnog polisaharida sastavljenog od  $\beta$ -(1,4)-D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina (Slika 2) [30]. Hitin je glavni sastojak egzoskeleta člankonožaca (rak, škamp, jastog) i čini staničnu stijenku nekih gljiva (*Aspergillus* i *Mucor*) [31]. N-deacetilacijom hitina amino skupine glukozamina postaju slobodne. S obzirom da je kitozan slaba baza ( $pK_a=6,5$ ) u kiselom mediju dolazi do protonacije amino skupina, a kitozan postaje pozitivno nabijena molekula topljiva u vodenom mediju.



Slika 2: Struktura kitozana

Kitozan je biokompatibilan, biorazgradiv i netoksičan polikationski polimer bez alergeni svojstava [32]. Različiti tipovi kitozana međusobno se razlikuju u molekularnoj masi i stupnju deacetilacije, a posljedično i u topljivosti, te viskoznosti i površinskoj napetosti otopina [33]. Komercijalno dostupni kitozani su molekularne mase između 10 i 1000 kDa, a stupnja deacetilacije između 70% i 95% [34]. Biokompatibilnost kitozana također ovisi o stupnju deacetilacije i molekularnoj masi. Kod kitozana većeg stupnja deacetilacije toksičnost ovisi o molekularnoj masi i o koncentraciji, a kod kitozana manjeg stupnja deacetilacije toksičnost je manje izražena i manje ovisna o molekularnoj masi. Zanimljivo je da su kitozan i njegovi derivati toksični za neke bakterije (*Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*) [35], gljivice (*Candida albicans* i *Aspergillus niger*) [36] i parazite (*Leishmania infantum*) [37] što bi moglo poslužiti kao pomoć u kontroli infektivnih bolesti [38].

### 1.4.1. Utjecaj kitozana i njegovih derivata na cijeljenje rana

Kitozan i derivati kitozana ubrzavaju cijeljenje rana i pridonose smanjenju ožiljaka [39]. Kitozan ima sposobnost vezanja na eritrocite čime ubrzava stvaranje krvnog ugruška. Na temelju tog djelovanja dobio je odobrenje od FDA za upotrebu u flasterima i drugim

hemostatskim sredstvima [40]. Ako se primjenjuje kao semipermeabilni gel, kitozan sprječava dehidraciju i kontaminaciju rane, osiguravajući optimalne uvjete za cijeljenje rane.

Histološkim ispitivanjima utvrđeno je da hitin i kitozan ubrzavaju reformaciju vezivnog tkiva i angiogenezu [41]. Induciraju oslobađanje interleukina-8 iz fibroblasta, a on je važan za migraciju i proliferaciju fibroblasta i vaskularnih endotelnih stanica [42]. Peluso i suradnici [43] pokazali su da kitozan *in vitro* ima stimulativni učinak na produkciju dušikovog oksida i kemotaksiju makrofaga.

U tijelu se hitin i kitozan razgrađuju enzimima poput hitinaze i kitozanaze te posljedično nastaju oligomeri i monomeri. Minagawa i suradnici [39] su *in vivo* ispitivanjem u štakora pokazali da osim hitina i kitozana i oligomeri i monomeri utječu na cijeljenje rana. U spomenutom ispitivanju kao modelna rana napravljena je linearna incizija, a nakon cijeljenja je ispitana snaga ožiljaka i aktivnost kolagenaze. Ispitivanjem je utvrđeno ubrzano cijeljenje i povećanje kolagenazne aktivnosti kod rana tretiranih otopinom kitozana ili hitina u koncentracijama od 0,1 do 10 mgml<sup>-1</sup>. Snaga ožiljaka i kolagenazna aktivnost su bili više povećani kod rana tretiranih kitozanom ili derivatima kitozana (D-glukozamin, kitozan-oligosaharid, kitozan) nego kod rana tretiranih hitinom ili derivatima hitina (N-acetil-D-glukozamin, hitin-oligosaharid, hitin), a najveći učinak primijećen je kod rana tretiranih oligomerima kitozana i hitina. S porastom stupnja deacetilacije (od 14% do 96%) uočena je povećana snaga ožiljaka i aktivnost fibroblasta.

Howling i suradnici [44] ispitivali su utjecaj hitina i kitozana različitog stupnja deacetilacije, ali slične molekulske mase, na proliferaciju humanih fibroblasta kože i keratinocita *in vitro*. Zapaženo je da kitozani sa relativno visokim stupnjem deacetilacije snažno stimuliraju proliferaciju fibroblasta, dok kitozani sa nižim stupnjem deacetilacije pokazuju slabiji učinak. Stimulativni učinak na proliferaciju fibroblasta zahtijevao je prisutnost seruma u mediju. Moguće objašnjenje je da se kitozan veže za komponente seruma poput heparina i faktora rasta pa ima indirektan učinak na cijeljenje rana. Kitozan je na humane keratinocite imao inhibitorni učinak.

Santos i suradnici [45] istraživali su utjecaj kitozana na aktivaciju polimorfonuklearnih stanica (PMN). Učinak su mjerili kvantifikacijom lizozima i reaktivnih oblika kisika (ROS). PMN u prisutnosti kitozana izlučuju približno jednaku količinu lizozima i ROS u odnosu na kontrolne stanice (PMN bez prisutnosti kitozana) što potvrđuje da je kitozan prikladan za cijeljenje rana. Naime, ROS se izlučuju iz leukocita koji migriraju prema rani, a epitelne stanice na rubovima rane izlučuju vodikov peroksid koji onda privlači leukocite [46]. ROS su esencijalni za ubijanje bakterija i oni potiču djelovanje citokina preko aktivacije neuklearnog faktora- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [47].

Vodikov peroksid inducira reepitelizaciju, stimulira sintezu kolagena i utječe na diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste. Poznato je da ROS mogu promovirati preživljavanje stanica, njihovu proliferaciju i diferencijaciju ukoliko su prisutni u fiziološkim koncentracijama, međutim, pri višim koncentracijama mogu uzrokovati apoptozu i nekrozu stanica [48]. Okidativni stres u prevelikoj mjeri inducira starenje fibroblasta i oslabljuje njihovu kontrakciju te još više oštećuje ranu, umjesto da pomaže u cijeljenju [8].

Ueno i suradnici [49] ispitivali su produkciju osteopontina iz humanih PMN tretiranih kitozanom. Osteopontin je fosfoprotein kojeg sintetiziraju različite stanice i izlučuju u izvanstanični matriks. Ima sposobnost stimuliranja aktivnosti stanica kroz brojne receptore na staničnoj površini koji su povezani s nekoliko različitih signalnih puteva. To mu omogućuje različite funkcije, a jedna od njih je učinak na cijeljenje rana [50]. *In vitro* ispitivanjem pokazano je da PMN stimulirani sa čimbenikom stimulacije granulocitnih kolonija (G-CSF, engl. *granulocyte-colony stimulating factor*) i kitozanom akumuliraju mRNA osteopontina i oslobađaju osteopontin u stanični medij. Time je pokazano da migrirajući PMN sintetiziraju osteopontin, a da kitozan ima ulogu u ranoj fazi cijeljenja rane.

Kitozan je poznat i po svom antimikrobnom učinku [51]. Formuliran u nanočestice može imati i veću antimikrobnu aktivnost u odnosu na otopinu zahvaljujući velikoj ukupnoj površini i naboju nanočestica [52, 53]. Nanočestice pripravljene s kitozanom velike molekulske mase imaju veći učinak na gram-pozitivne bakterije, dok su one s kitozanom manje molekulske mase učinkovitije kod gram-negativnih bakterija [54].

Točan mehanizam antimikrobnog djelovanja kitozanskih nanočestica nije u potpunosti jasan. Međutim, smatra se da interakcija između pozitivno nabijenog kitozana i negativno nabijenog staničnog zida bakterije vodi do promjene permeabilnosti te pucanja staničnog zida i curenja intracelularnog sadržaja [55]. Bakterije evolucijski imaju negativno nabijenu površinu pa nije vjerojatno da će razviti rezistenciju na kitozanske nanočestice što im daje veliku prednost u antimikrobnoj terapiji [56].

Vanjska membrana staničnog zida gram-negativnih bakterija sastoji se isključivo od lipopolisaharida koji sadrže fosfatne i pirofosfatne skupine. Kako su te skupine negativno nabijene gram-negativne bakterije imaju veći negativni naboj od gram-pozitivnih bakterija čija se membrana sastoji od peptidoglikana i vezanih polisaharida i teikoične kiseline. To je moguće objašnjenje zašto je primjenom kitozana primijećeno veće curenje intracelularnog sadržaja kod gram-negativnih nego kod gram-pozitivnih bakterija. Povećanjem negativnog naboja povećava se i interakcija s kitozanom što rezultira većim promjenama u strukturi i permeabilnosti staničnog zida.

Osim vezanja na stanični zid, predložena su su još dva mehanizma. Prvi podrazumijeva da kitozan može proći kroz stanični zid bakterije i penetrirati u jezgru gdje se veže za bakterijsku DNA te tako inhibira sintezu mRNA i proteina. Drugi mehanizam bazira se na keliranju metala koji su esencijalni nutrijenti za rast bakterija [57].

## 1.5. Lecitin

Lecitin je prirodna smjesa fosfolipida netopljivih u acetonu (fosfatidilkolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina i fosfatidilinozitola) te ostalih komponenti poput triglicerida, masnih kiselina i ugljikohidrata. Lecitin se nalazi u membranama stanica pa se svakodnevno unosi prehranom.

Lecitini se najčešće dobivaju iz jajeta i ulja soje te ulja kikirikija, pamuka, suncokreta, kukuruza i uljane repice. Sastav lecitina značajno varira ovisno o izvoru i stupnju čistoće. Lecitin iz jajeta sadrži 69% fosfatidilkolina i 24% fosfatidiletanolamina, dok lecitin iz soje sadrži 21% fosfatidilkolina, 22% fosfatidiletanolamina i 19% fosfatidilinozitola, uz ostale komponente. Boja lecitina varira od smeđe do svijetlo žute ovisno o tome je li bio podvrgnut izbjeljivanju te o stupnju čistoće. Također, izlaganje zraku vodi do brze oksidacije što rezultira tamnijom bojom lecitina [58].

Lecitin se široko primjenjuje u farmaceutskim oblicima poput aerosolnih inhalata, intramuskularnih injekcija i oralnih suspenzija, te u kozmetičkim i prehrambenim proizvodima, kao emolijens, emulgator i/ili solubilizator. Najčešće se koristi kao surfaktant u pripravcima za intramuskularnu i intravensku primjenu, pripravcima za parenteralnu prehranu i topikalnim pripravcima poput masti i krema [58]. Primijenjen topikalno ne uzrokuje iritaciju ni senzibilizaciju. Sastavnica je pripravaka za enteralnu i parenteralnu prehranu, a fosfatidilkolin je prepoznat kao važan nutrijent u razvoju fetusa i novorođenčeta te je nužna komponenta formulacija za novorođenčad odobrenih od strane FDA (Food and Drug Administration) [59]. U vodenim otopinama fosfolipidi lecitina tvore liposome, lipidne dvosloje, micle i lamelarne strukture, ovisno o hidrataciji i temperaturi. Iz tog razloga lecitin se često koristi za pripravu istih [60, 61, 62, 63].

Lecitin može djelovati protektivno kod alkoholom izazvane ciroze jetre, smanjiti razinu kolesterola te imati pozitvni učinak na mentalnu i fizičku sposobnost bolesnika [58]. Vrlo je dobar izvor kolina koji je prekursor u sintezi acetilkolina. Acetilkolin je važan za mnoge funkcije mozga uključujući pamćenje pa se smatra da povećana koncentracija ovog neurotransmitora može rezultirati poboljšanjem pamćenja [64]. Lecitin i njegovi derivati koriste se kao pulmonalni surfaktanti u liječenju neonatalnog respiratornog distresa [58], a sam lecitin je indiciran u liječenju tardivne diskineze u dozi do 80 g za oralnu primjenu [65].

## **1.6. Nanotehnologija i nanočestice kao terapijski sustavi**

Nanotehnologija se može definirati kao znanost i inženjerstvo koji se bave dizajnom, sintezom, karakterizacijom i primjenom materijala čija je najmanja funkcionalna jedinica barem po jednoj dimenziji nanometarske veličine [3]. Danas je nanotehnologija široko rasprostranjena u svim granama industrije. Njezina primjena u biomedicini je od posebne važnosti, štoviše, nanotehnologija se smatra početkom novog razdoblja u području primjene lijeka [66].

Nanočestice kao terapijski sustavi su čvrsti koloidni nosači djelatne tvari veličine od 10-1000 nm građeni od prirodnih, polusintetskih ili sintetskih polimera te imaju mogućnost mijenjati farmakokinetička i farmakodinamička svojstva uklopljene djelatne tvari. Polimerni nosači bi trebali biti jednostavni za sintezu, jeftini, biokompatibilni i biorazgradivi, netoksični i topljivi u vodi [66]. Brojna suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj nanočestica i mogućnosti njihove primjene u području dijagnostike, ciljane dostave lijeka i kontroliranog oslobađanja. Nakupljanjem lijeka u ciljnom tkivu smanjuje se njegova koncentracija u zdravom tkivu, a time i potencijalni toksični učinci [3]. Primjena nanočestica u dijagnostici može povećati osjetljivost i granicu detekcije pa se biološke molekule mogu dokazati pri vrlo niskim koncentracijama [67]. Korištenjem pripravaka kontroliranog oslobađanja smanjuje se učestalost doziranja lijeka što vodi povećanoj suradljivosti pacijenata te se smanjuje profil nuspojava, posebno kod lijekova kod kojih dolazi do naglog porasta koncentracije u krvi [68].

### **1.6.1. Nanotehnološki pristup u razvoju funkcionalnih obloga za rane**

Obloge za rane razlikuju se prema kompleksnosti učinka na cijeljenje rane. Gaze i zavoji predstavljaju pasivne obloge koje apsorbiraju eksudat rane i pružaju fizičku zaštitu, vrlo malo pridonoseći samom cijeljenju, te se smatraju zasterjelim. Suvremene funkcionalne obloge osiguravaju uvjete neophodne za optimalno cijeljenje rane kao što su odgovarajuća vlažnost rane, toplina, pH, mogućnost izmjene plinova (permeabilnost vodene pare i kisika), te prevencija/suzbijanje infekcije. Suvremene obloge osiguravaju učinkovitije čišćenje rana, jednostavnije postavljanje obloga, smanjeno sljepljivanje s površinom rane, povećan kapacitet upijanja eksudata iz rane te ubrzano cijeljenje [69].

Najnovija istraživanja u okviru razvoja funkcionalnih obloga temelje se na primjeni (bio)polimera s učinkom na cijeljenje rana, primjerice kroz utjecaj na migraciju i proliferaciju stanica kože, antimikrobni učinak te hemostatsko djelovanje. Razvijaju se polimerni terapijski nanosustavi koji mogu doprinijeti procesu cijeljenja. Djelatne tvari koje se uklapaju u takve

nanosustave s ciljem što bržeg uspostavljanja strukturalnih i fizioloških značajki ozlijeđenog tkiva obuhvaćaju antibiotike, protuupalne tvari, antioksidanse, antiseptike i antitijela. Uz mogućnost uklapanja djelatnih tvari, terapijski nanosustavi mogu utjecati na proces cijeljenja mijenjanjem mikrookolišnih uvjeta rane, a ovisno o polimernom sastavu i specifičnim fizičko-kemijskim svojstvima kao što su veličina, naboj, reološka svojstva te sposobnost bubrenja. Pri razvoju takvih sustava prikladniji su biorazgradljivi polimeri poput kolagena, proteoglikana, hijaluronske kiseline, kitozana i alginata, čijom se uporabom može izbjeći uklanjanje obloge i mogućnost opetovanog ozljeđivanja površine rane [70].

Nanotehnološke platforme s najvećim potencijalom u razvoju funkcionalnih obloga za rane su polimerna nanovlakna i nanočestice [70].

Smanjenjem promjera vlakna na nanometarsku skalu značajno se povećava omjer površine prema volumenu, što čini nanovlakna prikladnim za izradu obloga za rane. Nanovlakna imaju bolja mehanička svojstva (čvrstoću, tvrdoću i fleksibilnost) u usporedbi s bilo kojim drugim oblikom istog materijala. Stoga se intenzivno razvijaju funkcionalne obloge i umjetna tkiva pripravljena iz nanovlakana [71]. Zahvaljujući morfološkoj sličnosti s izvanstaničnim matriksom, te strukture mogu poticati cijeljenje rana uključujući adheziju, migraciju i proliferaciju stanica [72].

Nanočestice se odlikuju iznimno velikim omjerom površine prema volumenu, iz čega je razvidna važnost površinskih svojstava nanočestica za njihovu biofarmaceutsku aktivnost. Uvođenjem odgovarajućih funkcionalnih skupina na površinu nanočestica mogu se modelirati interakcije s biološkim sustavima i prilagođavati njihov učinak u biološkom okruženju [70]. S ciljem ubrzanja procesa cijeljenja rana, nanočestice se uglavnom koriste kao nosači djelatnih tvari. Terapijski nanosustavi pospješuju topljivost teško topljivih lijekova, produljuju vrijeme zadržavanja na mjestu djelovanja te omogućuju ciljano i kontrolirano oslobađanje djelatne tvari [73]. Istovremeno, zbog jedinstvenih fizičko-kemijskih svojstava kao što su mala i kontrolirana veličina čestica, velika površina u odnosu na volumen, visoka reaktivnost i funkcionalna struktura mogu prevladati ograničenja klasičnih lijekova, prvenstveno antibiotika [74]. Naime, za dobro zacjeljivanje rana bez komplikacija i ožiljaka vrlo je važno da ne dođe do infekcije. Povećano bakterijsko opterećenje unutar rane može dovesti do reduciranog stvaranja granulacijskog tkiva i reepitelizacije. Postoje različiti pripravci za topikalnu primjenu s antibakterijskim djelovanjem koji sprječavaju pojavu i širenje infekcije te pospješuju cijeljenje rane. Međutim, učinkovitost klasičnih antibiotika je smanjena zbog učestale pojave antibakterijske rezistencije. Jedan od uzroka razvoja rezistencije je nastanak bakterijskog biofilma. Biofilm je nakupina bakterijskih stanica uklopljenih u izvanstanični matriks - sluzavi omotač od polisaharida, proteina i nukleinskih kiselina, vezanih na čvrstu površinu. Osim što

služi za adheziju bakterijskih populacija za površinu, on je i zaštita od vanjskih nepovoljnih čimbenika (npr. fagocitoze, utjecaja antibiotika i drugih signalnih molekula iz okoliša) te ima važnu ulogu u komunikaciji između bakterija [75]. Kako bakterijski biofilmovi ne odgovaraju na konvencionalnu antibakterijsku terapiju često uzrokuju ponavljajuće infekcije.

Istraživanja temeljena na nekonvencionalnom pristupu liječenju bakterijskih infekcija vrlo su aktualna [76]. Nanočestice s antimikrobnim djelovanjem pokazuju različita nespecifična antibakterijska svojstva i učinak na biofilm, dok istovremeno mogu služiti i kao nosači konvencionalnih ili nekonvencionalnih lijekova s antimikrobnim djelovanjem [77, 78].

Prednost nanočestica u antimikrobnoj terapiji je da se unutar nanočestice može nalaziti više lijekova s antimikrobnim djelovanjem. U bakterije bi onda istovremeno trebalo doći do višestrukih mutacija gena kako bi razvile rezistenciju za svaki lijek što je malo vjerojatno [79]. Tako pripremljene nanočestice smatraju se visoko potentnima i učinkovitima u borbi protiv već rezistentnih sojeva bakterija kao što su meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomicin-rezistentan *Staphylococcus aureus*, penicilin-rezistentan *Streptococcus pneumoniae*, rezistentan soj *Mycobacterium tuberculosis* i mnogi drugi [56]. Metali i njihovi oksidi u formi nanomaterijala iskazuju potentnije antimikrobno djelovanje bez razvoja rezistencije. Nanočestice srebra se već klinički primjenjuju u oblogama za rane, a vrlo su aktualna istraživanja nanočestica zlata, bizmuta, aluminijevog oksida, cinkovog oksida i titanijevog dioksida. Terapijski nanosustavi kao što su liposomi, čestice pripravljene od čvrstih lipida ili polimera te dendrimeri kao nosači klasičnih antibakterijskih lijekovima pokazuju obećavajuće, sinergijsko ili aditivno antimikrobno djelovanje [8].

### **1.6.2. Kitozanske nanočestice**

Kitozanske nanočestice se često razvijaju kao nosači djelatne tvari zahvaljujući iznimnim fizičko-kemijskim svojstvima, biorazgradivosti i biokompatibilnosti kitozana [80].

Literaturni pregled ukazuje na kontinuirani porast broja znanstvenih istraživanja u čijem su fokusu kitozanske nanočestice kao terapijski sustavi namijenjeni različitim putovima primjene lijeka. Oralno primjenjene nanočestice mogu zaštititi lijek od razgradnje u probavnom sustavu i poboljšati apsorpciju lijeka [81, 82, 83]. Nazalno primjenjene kitozanske nanočestice, zahvaljujući pozitivnom naboju, međudjeluju sa negativno nabijenom površinom sluznice. Na taj način produljuju zadržavanje lijeka na mjestu apsorpcije i poboljšavaju bioraspodjelivost nazalno primjenjenog lijeka [84]. Nova ispitivanja istražuju mogućnosti primjene kitozanskih nanočestica kao nosača za nazalna cjepiva [85].



Kitozanske nanočestice također se koriste za okularnu primjenu lijekova, a njihov učinak se očituje povećanom bioraspoloživošću lijeka i produljenim zadržavanjem u prekorealnom području [86, 87]. Topikalno primjenjene nanočestice [88, 89] i nanoobloge [90, 91] kitozana koriste se za pospješivanje cijeljenja rana, a najnovija ispitivanja pokazuju potencijal kitozanskih nanočestica za topikalno liječenje alopecije ciljanim oslobađanjem minoksidil sulfata u folikule dlaka [92].

### **1.6.3. Metode pripreme nanočestica s kitozanom**

U literaturi su opisane različite metode pripreme kitozanskih nanočestica, a odabir metode ovisi o svojstvima nanočestica koje želimo dobiti.

#### *Ionotropno geliranje*

Kitozanske nanočestice nastaju elektrostatskom interakcijom između amino skupina kitozana i negativno nabijenih polianiona. Reverzibilno umrežavanje elektrostatskom interakcijom pokazalo se prihvatljivijim od kemijskog umrežavanja jer se prije svega izbjegava upotreba toksičnih reagensa [3]. Veliki utjecaj na uspješnost pripravljanja nanočestica tom metodom i uklapanje djelatne tvari ima stupanj deacetilacije kitozana jer jedino protonirane amino skupine mogu stupiti u interakciju s polianionima.

Prednosti metode su njezina jednostavnost i mogućnost pripreme nanočestica u vodenom mediju te blagi uvjeti pri kojima nastaju nanočestice [66].

#### *Umrežavanje emulzija*

Metoda umrežavanja emulzija podrazumijeva pripremu V/U emulzije s kitozanom otopljenim u vodenoj fazi, te umrežavanje reaktivnih funkcionalnih amino skupina kitozana s aldehidnim skupinama umrežavajućeg sredstva (glutaraldehida) [3]. Organsko otapalo se zatim uparuje pod niskim tlakom, a ostatak surfaktanta se uklanja precipitacijom sa  $\text{CaCl}_2$ , nakon čega slijede centrifugiranje, dijaliza i liofilizacija [66].

Prednost metode je što se može postići vrlo uska raspodjela veličine čestica srednjeg promjera manjeg od 100 nm, dok su njezini nedostaci što je vremenski zahtjevna, zahtjeva korištenje organskih otapala te prilično složene postupke ispiranja nanočestica [66].

### *Metoda desolvacije/precipitacije*

U vodenu otopinu kitozana dodaje se flokulant (najčešće natrijev sulfat) nakon čega se smanjuje topljivost kitozana povećanjem omjera natrijeva sulfata prema vodi. Rezultat je precipitacija nanočestica koje nastaju uslijed stvaranja vodikovih veza među molekulama kitozana [93].

### *Metoda koacervacije/precipitacije*

Metoda se temelji na činjenici da je kitozan netopljiv u alkalnom mediju. Nanočestice nastaju raspršivanjem otopine kitozana u alkalnoj otopini (NaOH, NaOH-metanol, etandiamin) uslijed čega nastaju koacervatne kapljice u kojima kitozan precipitira u doticaju s alkalnim medijem. Nastale čestice se odvajaju filtracijom ili centrifugiranjem, nakon čega se ispiru i suše [94].

### *Emulzijska metoda koalescencije kapljica*

Metoda se temelji na principima umrežavanja emulzija i precipitacije. Pripravi se stabilna V/U emulzija s kitozansom i djelatnom tvari otopljenima u vodenoj fazi, te druga V/U emulzija s NaOH u vodenoj fazi. Miješanjem dviju emulzija dolazi do koalescencije kapljica kitozana i NaOH što rezultira precipitacijom kitozana. Pripravljene čestice se odijele centrifugiranjem ili filtriranjem, te ispiru i osuše [3].

### *Vezikule i nanočestice nastale samoorganiziranjem kemijski modificiranog kitozana*

Kitozan je naprije potrebno kemijski modificirati kako bi se dobio amfifilni polimer. Amfifilni polimeri dispergirani u vodi mogu samoorganiziranjem tvoriti nanoagregate [93], a u njih je moguće istovremeno uklopiti i hidrofilne i hidrofobne spojeve.

Nanočestice pripravljene na ovaj način imaju značajan potencijal u specifičnoj dostavi lijeka. Naime, uz mogućnost uklapanja različitih hidrofobnih lijekova i povećanja njihove biorasploživosti takve nanočestice ostaju neprepoznate tijekom cirkulacije u krvi [3], te imaju sposobnost nakupljanja u čvrstim tumorskim tkivima [95].

### *Sušenje raspršivanjem*

Sušenje raspršivanjem uključuje sljedeće korake: atomizaciju (raspršivanje otopine) kroz sapnicu, kontakt raspršivač-zrak, sušenje raspršenih čestica i sakupljanje dobivenog produkta. Nakon raspršivanja uzorka kapljice dolaze u kontakt s vrućim zrakom što rezultira isparavanjem otapala sa površine kapljica. Zbog velike specifične površine i postojećeg gradijenta temperature i vlažnosti, dolazi do brzog sušenja. Prednost metode je njezina prikladnost za termolabilne tvari [3].

### *Metoda s inverznim micelama*

Inverzne micelle pripravlja se otapanjem surfaktanta u organskom otapalu te se uz stalno miješanje dodaje otopina kitozana i ljekovite tvari. U nastalu mikroemulziju dodaje se sredstvo za umrežavanje te slijedi otparavanje organskih otapala i izolacija dobivenih nanočestica [94]. Maksimalna količina lijeka koja se može otopiti u inverznim micelama određuje se postupkom povećavanja sadržaja lijeka sve dok transparentna mikroemulzija ne prijeđe u lagano opalescirajuću [3].

## 2. Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada

### *Hipoteza*

Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom pripravljene metodom ionotropnog geliranja pozitivno utječu na cijeljenje rane *in vitro*. Njihov učinak ovisi o sadržaju uklopljenog melatonina te stupnju deacetilacije i molekulskoj masi korištenog kitozana.

### *Opći i specifični ciljevi rada*

Cijeljenje rane je dinamičan biološki proces koji uključuje interakcije stanica, izvanstaničnog matriksa i signalnih molekula. Kronične i akutne inficirane rane mogu uslijed komplikacija i sporog cijeljenja predstavljati veliki klinički problem [69].

Suvremene funkcionalne obloge osiguravaju uvjete neophodne za optimalno cijeljenje rane kao što su odgovarajuća vlažnost rane, toplina, pH, permeabilnost vodene pare i kisika, te prevencija/suzbijanje infekcije. Najnovija istraživanja u okviru razvoja funkcionalnih obloga temelje se na primjeni (bio)polimera s učinkom na cijeljenje rana, primjerice kroz utjecaj na migraciju i proliferaciju stanica kože, antimikrobni učinak te hemostatsko djelovanje. Razvijaju se polimerni terapijski nanosustavi koji mogu doprinijeti procesu cijeljenja. Djelatne tvari koje se uklapaju u takve nanosustave s ciljem što bržeg uspostavljanja strukturnih i fizioloških značajki ozlijeđenog tkiva obuhvaćaju antibiotike, protuupalne tvari, antioksidanse, antiseptike i antitijela. Uz mogućnost uklapanja djelatnih tvari, terapijski nanosustavi mogu utjecati na proces cijeljenja mijenjanjem mikrookolišnih uvjeta rane, a ovisno o polimernom sastavu i specifičnim fizičko-kemijskim svojstvima kao što su veličina, naboj, reološka svojstva te sposobnost bubrenja. Pri razvoju takvih sustava prikladniji su biorazgradljivi polimeri čijom se uporabom može izbjeći uklanjanje obloge i mogućnost opetovanog ozljeđivanja površine rane [71].

Kitozan je biokompatibilni i biorazgradljivi prirodni poliaminosaharid s utvrđenim antimikrobnim učinkom koji ovisi o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi kitozana kao i građi staničnog zida ciljane bakterije. Također, dobro je poznat kao promotor cijeljenja rana. Pretklinička i klinička ispitivanja su pokazala da kitozan pospješuje funkciju granulocita i ubrzava proliferaciju fibroblasta. Uz antimikrobno djelovanje, promoviranjem granulacije i stanične organizacije kitozan osigurava i ubrzava uspješno cijeljenje različitih vrsta rana [51].

Melatonin je jedan od evolucijski najstarijih, najkonzerviranijih i najsvestranijih hormona prisutnih u ljudskom tijelu. Izlučuje ga epifiza (pinealna žlijezda), ovisno o prisutnosti svjetla i tame u okolini. Najpoznatiji je kao regulator cirkadijanog i sezonskog bioritma, no ima ulogu i u djelovanju imunološkog i reproduktivnog sustava, regulaciji tjelesne mase i inhibiciji rasta tumora. Direktno djeluje i kao antioksidans, smanjuje utjecaj kemotoksičnog zračenja te usporava proces starenja. Potencijalni učinak melatonina kao promotora cijeljenja u fokusu je mnogih istraživanja [96, 8]. Melatonin utječe na brojne procese uključene u cijeljenje rane kao što su oslobađanje medijatora upale, proliferacija i migracija stanica, angiogeneza i akumulacija kolagena i glikozaminoglikana u području rane [7]. Učinak melatonina je ovisan o dozi, vremenu primjene i ciljanom tkivu. Suprotna mišljenja o tome ima li melatonin pozitivan [16, 17] ili negativan [18, 19] učinak na cijeljenje rana, odnosno na proliferaciju fibroblasta i akumulaciju kolagena, mogu se dijelom objasniti razlikom između učinka topikalno primijenjenog melatonina i indirektnog učinka preko različitih regulatornih mehanizama pri sistemske primjeni [20, 21]. Iz navedenog razloga proizlazi potreba za razvojem terapijskih sustava s uklopljenim melatoninom za lokalnu primjenu kojima se zaobilaze sistemski učinci.

Cilj ovog istraživanja je pripremiti nanočestice kitozana i melatonina za topikalnu primjenu korištenjem kitozana različitog stupnja deacetilacije i/ili molekulske mase, te evaluirati njihov učinak na cijeljenje rane *in vitro* u ovisnosti o sadržaju uklopljenog melatonina i svojstvima kitozana.

### *Specifični ciljevi*

- Pripremiti lecitinsko-kitozanske nanočestice dostatnog uklapanja melatonina
- Odrediti fizičko-kemijska svojstva pripremljenih čestica
  - veličinu i raspodjelu veličina čestica
  - površinski naboj
  - sadržaj uklopljenog lijeka
- Ispitati utjecaj molekulske mase i stupnja deacetilacije kitozana na
  - fizičko-kemijska svojstva priređenih terapijskih sustava
  - profil oslobađanja melatonina *in vitro*
- Ispitati biokompatibilnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom *in vitro* praćenjem metaboličke aktivnosti keratinocita nakon izlaganja suspenziji nanočestica
- Ispitati učinak lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na proliferaciju i migraciju keratinocita *in vitro*

### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Materijal

U izradi ovog rada za rektorovu nagradu za pripravu nanočestica korišteni su lecitin S45 (Lipoid GmbH, Njemačka), melatonin (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) te četiri tipa kitozana (ProtosanUP CI 113,114, 213, 214, NovaMatrix, Norveška). Stupanj deacetilacije i molekulska masa korištenih kitozana prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1: Svojstva pojedinog tipa kitozana

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

Hranidbeni medij DMEM, PBS (fosfatni pufer bez Ca i Mg), smjesa antibiotika (penicilin, streptomycin i amfotericin B), tripsin 2,5% i EDTA nabavljeni su od Lonze (Švicarska), a posude za uzgoj stanica od TPP (Švicarska) i Falcona (SAD). Kalcijev klorid dihidrat nabavljen je od Sigma-Aldricha, 37% klorovodična kiselina od Carlo Erbe (Italija), HEPES od AppliChem/Panreac (Njemačka), a kalijev dihidrogenfosfat i natrijev acetat trihidrat od Kemike (Hrvatska). Dinatrijev hidrogen fosfat je proizveden od Fluke (Švicarska), magnezijev klorid heksahidrat od Mercka (Njemačka), fetalni teleći serum (FBS) od Biosere (Francuska) dok su ostale korištene kemikalije od proizvođača Kemig (Hrvatska).

Ispitivanja toksičnosti provedena su korištenjem pufera balansiranog Hankovim solima (engl. *Hank's balanced salt solution*) pH 6,0, pripremljenog otapanjem bezvodnog kalcijevog klorida ( $\text{CaCl}_2$  bezvodni;  $140 \text{ mg l}^{-1}$ ), magnezijevog klorida ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), magnezijevog sulfata ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), kalijevog klorida (KCl;  $400 \text{ mg l}^{-1}$ ), kalijevog dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $60 \text{ mg l}^{-1}$ ), natrijevog bikarbonata ( $\text{NaHCO}_3$ ;  $350 \text{ mg l}^{-1}$ ), natrijevog klorida (NaCl;  $8000 \text{ mg l}^{-1}$ ); dinatrijevog hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhydr;  $48 \text{ mg l}^{-1}$ ), D-glukoze ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ) i 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonske kiseline (HEPES; 30 mM) u pročišćenju vodi.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprava nanočestica

Pripravljene su otopine četiri tipa kitozana (C113, C114, C213 i C214; Tablica 1) koncentracije  $10 \text{ mgml}^{-1}$  u pročišćenoj vodi. Otopina lecitina koncentracije  $25 \text{ mgml}^{-1}$  pripravljena je u 96% etanolu. Za pripravu lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom, melatonin je otopljen u etanolnoj otopini lecitina u koncentraciji od  $5 \text{ mgml}^{-1}$  odnosno u masenom omjeru prema lecitinu od 1:5.

Otopine kitozana (0,25 ml) razrijeđene su pročišćenom vodom do volumena od 23 ml. Suspenzije nanočestica s melatoninom pripravljene su injektiranjem 2 ml etanolne otopine lecitina i melatonina kroz iglu unutarnjeg promjera 0,75 mm, u 23 ml razrijeđene otopine kitozana uz miješanje na magnetskoj miješalici (900 okr/min). U pripravljenim suspenzijama nanočestica koncentracija kitozana iznosi  $100 \text{ } \mu\text{gml}^{-1}$ , a maseni omjer lecitina i kitozana 20:1. Usporedbe radi, pripravljene su i lecitinske nanočestice s melatoninom, injektiranjem 2 ml etanolne otopine lecitina i melatonina u 23 ml pročišćene vode. Lecitinsko-kitozanske i lecitinske nanočestice bez melatonina (prazne nanočestice) pripravljene su opisanim postupcima uz izostavljanje melatonina.

### 3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka u nanočestice

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

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

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

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

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

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

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

Dijalizirani uzorci suspenzija nanočestica korišteni su u svim daljnjim ispitivanjima.

### 3.2.3. Određivanje veličine nanočestica

Veličina nanočestica određena je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*, PCS) (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, UK). PCS metodom se određuje veličina dispergiranih čestica u području od 2 nm do 3  $\mu\text{m}$ . Mjerenje se provodi polariziranom laserskom zrakom kojom su obasjane sve čestice nakon čega dolazi do difrakcije svjetlosti. Bilježi se intenzitet svjetlosti raspršene na česticama pod određenim kutom pri konstantnoj temperaturi. Promjer čestica dobiven PCS metodom naziva se i hidrodinamičkim promjerom ( $R_h$ ).

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

### 3.2.4. Određivanje zeta-potencijala nanočestica

Zeta-potencijal određen je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (PCS) (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, UK). Zeta-potencijal je elektrokinetički potencijal u koloidnim disperzijama. Vrijednost zeta-potencijala određuje se indirektno mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica. Na površini dispergiranih čestica razlikuju se dva sloja: Sternov sloj i difuzijski sloj. Sternov sloj je sloj slabo pokretnih iona uz samu površinu čestice, a difuzijski sloj je sloj pokretnih iona suprotnog naboja iz otapala. Nabijene dispergirane čestice se nalaze u električnom polju i putuju prema suprotno nabijenoj elektrodi, a zajedno s njima se giba Sternov sloj i dio vezanih molekula otapala. Vezane molekule su od ostalih molekula otapala odijeljene



plohom smicanja, a potencijal na udaljenosti od plohe smicanja je mjereni elektrokinetički zeta-potencijal ( $\zeta$ ). U sustavu za mjerenje elektroforetske pokretljivosti čestica korišten je 10 mW He-Ne laser. Elektroforetska pokretljivost izračunava se iz spektra frekvencija koje proizlaze iz detektiranih fotona svjetlosti. S obzirom da se nabijene čestice nalaze u promjenjivom električnom polju, one se gibaju i raspršuju svjetlost. Ovisno o brzini gibanja mijenja se i frekvencija svjetlosti. Mjerenja su provedena pri 25 °C. Zeta-potencijal nanočestica mjereno je nakon odgovarajućeg razrjeđivanja s 10 mM otopinom NaCl.

### 3.2.5. *In vitro* oslobađanje melatonina iz nanočestica

Ispitivanje oslobađanja melatonina iz pripremljenih nanočestica provedeno je metodom dijalize. Odgovarajući volumen suspenzije nanočestica s uklopljenim melatoninom (250  $\mu$ g) stavljen je u vrećicu za dijalizu od celuloza acetata (Spectra/Por® , MW cut-off 12 000 - 14 000 Da, Medicell International Ltd, UK). Potom je vrećica za dijalizu uronjena u receptorski medij (30 ml acetatnog pufera, pH 5,8). Eksperiment je vođen uz osigurane uvjete topljivosti za melatonin. Uz neprekidno miješanje na magnetskoj miješalici (30 okr/min), iz receptorskog medija uzimani su uzorci (1 ml) u određenim vremenskim intervalima (svakih 15 minuta kroz prva 2 sata i svakih 20 minuta kroz naredna 3 sata). Uzeti volumen nadoknađivan je svježim acetatnim puferom. Uzorci su zatim razrijeđeni s 2 ml acetatnog pufera te je koncentracija oslobođenog melatonina mjerena UV-Vis spektrofotometrom ( $\lambda=278$  nm) (Cary 50, Varian Inc., SAD).

Profili oslobađanja melatonina iz nanočestica pripremljenih s različitim tipovima kitozana uspoređeni su upotrebom faktora sličnosti (engl. *similarity factor*,  $f_2$ ) koji određuje bliskost dvaju profila:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left[ \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [\bar{R}(t) - \bar{T}(t)]^2}{n}}} \right]$$

gdje je  $n$  = broj eksperimentalnih točaka,  $R(t)$  = srednji postotni udio oslobođenog lijeka iz referentnog pripravka u vremenu  $t$ ,  $T(t)$  = srednji postotni udio oslobođenog lijeka iz ispitivanog pripravka u vremenu  $t$ .

### 3.2.6. Stanična linija i uvjeti uzgoja

U ovom radu korištena je humana stanična linija HaCaT (keratinociti kože; Cell Line Services, Germany). Stanice su uzgajane u skladu s protokolom kojeg preporučuje proizvođač. Stanice su nasađene u sterilnim uvjetima u posudama za uzgoj od 25, 75 i 150 cm<sup>2</sup>, ili na pločama sa 24 jažice, te su uzgajane u inkubatoru pri 37°C, 5% CO<sub>2</sub> i 95% relativne vlažnosti. Konfluentnost je kontrolirana invertnim mikroskopom (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka). Za uzgoj HaCaT stanica kao hranidbeni medij korišten je DMEM koji je sadržavao penicilin, streptomycin i amfotericin uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma.

Nakon postizanja 80-90% konfluentnosti, stanice su presađivane u novu tikvicu. Prilikom presađivanja medij je odsisan te su stanice isprane sa PBS-om koji je potom uklonjen, zatim su stanice inkubirane s otopinom EDTA (0,02 % *m/V*) pri 37°C u periodu od 2,5 minute. Stanice su tripsinizirane otopinom tripsina (0,125 % *m/V*), a nakon odvajanja stanica od podloge učinak tripsina je inhibiran dodatkom medija (DMEM/10% FBS) u volumnom omjeru prema tripsinu 3:2. Stanični medij je mijenjan svaka dva dana.

### 3.2.7. Ispitivanje citotoksičnosti *in vitro* - MTT test

U svrhu određivanja potencijalne citotoksičnosti ispitivanih nanočestica HaCaT stanice nasađene su na ploče s 24 jažice (TPP, Švicarska) pri gustoći od 10<sup>5</sup> stanica/jažici nakon čega im je bilo potrebno 2 dana do postizanja odgovarajuće konfluentnosti. Suspenzije nanočestica razrijeđene su HBSS puferom (pH 6,0) kako bi se dobio raspon (relevantnih) koncentracija kitozana od 1,25 – 20 µgml<sup>-1</sup>. Stanice su tretirane pripremljenim suspenzijama nanočestica i inkubirane u trajanju od 2 sata nakon čega su suspenzije nanočestica odsisane i stanicama je vraćen svježi medij. Stanice inkubirane u HBSS-u u trajanju od 2 sata korištene su kao negativna kontrola. Citotoksičnost je određivana nakon 24 sata MTT testom.

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid] (Sigma, Njemačka) test je kolorimetrijski test za ispitivanje metaboličke aktivnosti stanica. Otopina MTT je žute boje, a stanice pomoću NAD(P)H – ovisne oksidoreduktaze imaju sposobnost prevoditi MTT u u vodi netopljivi formazan koji je ljubičaste boje. Nastali ljubičasti kristali formazana topljivi su u organskim otapalima. Intenzitet boje mjeri se spektrofotometrijski, a izmjerena apsorbancija izravno je proporcionalna koncentraciji formazana, odnosno metaboličkoj aktivnosti stanica.

Otopina MTT-a (5 mgml<sup>-1</sup>) priređena u HBSS puferu (pH 6,0) dodana je u medij u omjeru 10 µl prema 100 µl medija. Tako tretirane stanice inkubirane su sat vremena pri 37°C nakon

čega im je odsisan medij i dodan kiseli izopropanol koji je pripremljen dodatkom 100  $\mu$ l koncentrirane klorovodične kiseline na 30 mL izopropanola. Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 570 nm (Victor<sup>3</sup>, PerkinElmer, SAD). Metabolička aktivnost izražena je kao relativna u odnosu na kontrolne, netretirane stanice inkubirane u HBSS puferu. Sva mjerenja rađena su u triplikatu.

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

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

HaCaT stanice nasađene su pri gustoći od  $10^5$  stanica/jažici na ploče s 24 jažice (TPP, Švicarska) nakon čega im je bilo potrebno 24 sata za postizanje odgovarajuće konfluentnosti u mediju s 10% FBS-a.

Nakon postizanja konfluentnosti, stanicama je uklonjen medij i zamijenjen s medijem bez seruma. Nakon 24 h sloj stanica je po sredini jažice zagreban vrhom pipete od 10  $\mu$ l kako bi se stvorila modelna rana. Monosloj je potom ispran HBSS-om (pH 6,0) kako bi se uklonile odvojene stanice. Modelne rane tretirane su priređenim suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom te praznim lecitinsko-kitozanskim nanočesticama pri koncentraciji kitozana od 5  $\mu$ gml<sup>-1</sup>. Kao kontrole korištene su otopine melatonina (5  $\mu$ gml<sup>-1</sup>) i kitozana (5  $\mu$ gml<sup>-1</sup>), te lecitinske nanočestice (100  $\mu$ gml<sup>-1</sup>). Stanice su tretirane 2 sata nakon čega su suspenzije, odnosno otopine odsisane, a zatim isprane s HBSS-om te im je vraćen svježi medij bez seruma. Dinamika prekrivanja praznina praćena je invertnim mikroskopom (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka) spregnutim s kamerom (Samsung, 5 pixel) tijekom 48 sati nakon tretiranja. Za obradu slika korišten je program ImageJ (National Institute of Health, SAD).

### **3.2.9. Statistička analiza**

Za statističku analizu podataka korišten je 1-way ANOVA test nadopunjen multiparametarskim Tukey's post-hoc testom (granica značajnosti  $P < 0,05$ ). Računanje je provedeno pomoću GraphPad Prism programa (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA; [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 4. Rezultati

### 4.1. Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

Pripravljene su lecitinsko-kitozanske nanočestice s uklopljenim melatoninom. Metoda pripreme uključivala je injektiranje etanolne otopine lecitina i melatonina u vodenu otopinu kitozana uz miješanje, pri čemu su, uslijed ionske interakcije između negativno nabijenog lecitina i pozitivno nabijenog kitozana spontano nastale nanočestice (ionotropno geliranje).

U pripravi lecitinsko-kitozanskih nanočestica korištena su četiri tipa kitozana koja se međusobno razlikuju po molekulskoj masi i stupnju deacetilacije (Tablica 1). Tako su iz kitozana C113, C114, C213 i C214 pripravljene lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom označene redom kao MLC113, MLC114, MLC213 i MLC214. Maseni omjer lecitina i kitozana u svim pripravcima iznosio je 20:1, dok je maseni omjer između melatonina i lecitina iznosio 1:5.

Usporedbe radi, pripravljene su i lecitinske nanočestice s melatoninom (ML).

Nanočestice bez melatonina (prazne nanočestice) pripravljene su opisanim postupkom uz izostavljanje melatonina. Prazne lecitinsko-kitozanske nanočestice označene su kao LC113, LC114, LC213, LC214, ovisno o tipu kitozana korištenom u njihovoj pripravi. Prazne lecitinske nanočestice označene su oznakom L.

U pripremljenim suspenzijama nanočestica vrijednosti pH iznosile su između 4,9 i 5,0.

### 4.2. Karakterizacija nanočestica s melatoninom

#### 4.2.1. Uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice

Uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice određena je metodom dijalize koja omogućava odjeljivanje neuklopljenog lijeka od nanočestica s uklopljenim lijekom.

Postignuta uklapanja melatonina u nanočestice odnosno sadržaj melatonina u suspenzijama nanočestica prikazani su u Tablici 2. Uspješnost uklapanja melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice i sadržaj melatonina u odgovarajućim suspenzijama kretali su se redom između  $23,0 \pm 1,7$  i  $27,0 \pm 2,5$  %, te  $95,7 \pm 7,1$  i  $109,2 \pm 9,9$   $\mu\text{gml}^{-1}$ . Uspješnost uklapanja melatonina u lecitinske nanočestice iznosila je  $19,4 \pm 2,0$  %, što odgovara sadržaju melatonina u suspenziji lecitinskih nanočestica od  $79,9 \pm 8,3$   $\mu\text{gml}^{-1}$  te upućuje na bolje

uklapanje melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice u odnosu na lecitinske nanočestice, za sve tipove korištenih kitozana. Najbolje uklapanje melatonina postignuto je kod čestica u čijoj pripravi je korišten kitozan C213, dok se melatonin najslabije uklopio u nanočestice pripravljene s kitozansom C214.

#### 4.2.2. Veličina i zeta-potencijal nanočestica

Veličina i površinski naboj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom određeni su u dijaliziranim sustavima nakon razrjeđenja s vodom odnosno 10 mM otopinom NaCl. U pripremljenim sustavima nakon dijalize vrijednosti pH povećale su se na 5,6-5,7, a nakon razrjeđenja s vodom ili otopinom NaCl na 5,8-6,0. Veličina i polidisperznost te zeta-potencijal nanočestica određeni pri tim uvjetima prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2: Glavna svojstva lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

	Srednji promjer (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)	UU (%)	DL (%)	C <sub>M</sub> (µgml <sup>-1</sup> )
<b>ML</b>	96,8±2,1 (78,8±0,4)	0,35±0,01 (0,39±0,01)	-34,3±3,5 (-33,7±2,8)	19,4±2,0	3,8±0,4	79,9±8,3
<b>MLC113</b>	245,2±2,8 (233,4±3,6)	0,35±0,04 (0,16±0,02)	23,4±0,9 (25,7±0,7)	25,8±0,2	4,2±0,02	106,4±0,7
<b>MLC114</b>	255,0±7,7 (242,3±2,8)	0,38±0,07 (0,39±0,12)	24,5±0,6 (26,1±1,1)	26,1±2,5	4,1±0,4	103,3±9,8
<b>MLC213</b>	256,1±1,5 (247,1±5,9)	0,29±0,01 (0,22±0,01)	29,3±1,7 (28,4±0,9)	27,0±2,5	4,3±0,4	109,2±9,9
<b>MLC214</b>	277,1±7,6 (257,5±3,7)	0,45±0,03 (0,38±0,08)	32,5±1,2 (29,0±1,9)	23,0±1,7	3,8±0,3	95,7±7,1

Vrijednosti u zagradama odnose se na prazne nanočestice. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n = 3).

PDI, indeks polidisperznosti

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

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

C<sub>M</sub> (µgml<sup>-1</sup>), sadržaj lijeka/volumen suspenzije nanočestica

Veličina i polidisperznost nanočestica određeni su fotonskom korelacijskom spektroskopijom. Srednji promjeri praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica bili su u rasponu

od  $233,4 \pm 3,6$  do  $257,5 \pm 3,7$  nm. Srednji promjeri odgovarajućih lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom kretali su se između  $245,2 \pm 2,8$  i  $277,1 \pm 7,6$  nm, iz čega se može zaključiti da je uklapanje melatonina rezultiralo porastom promjera lecitinsko-kitozanskih nanočestica. Usporedbe radi, lecitinske nanočestice s melatoninom (ML) pripravljene bez kitozana imale su srednji promjer  $96,8 \pm 2,1$  nm.

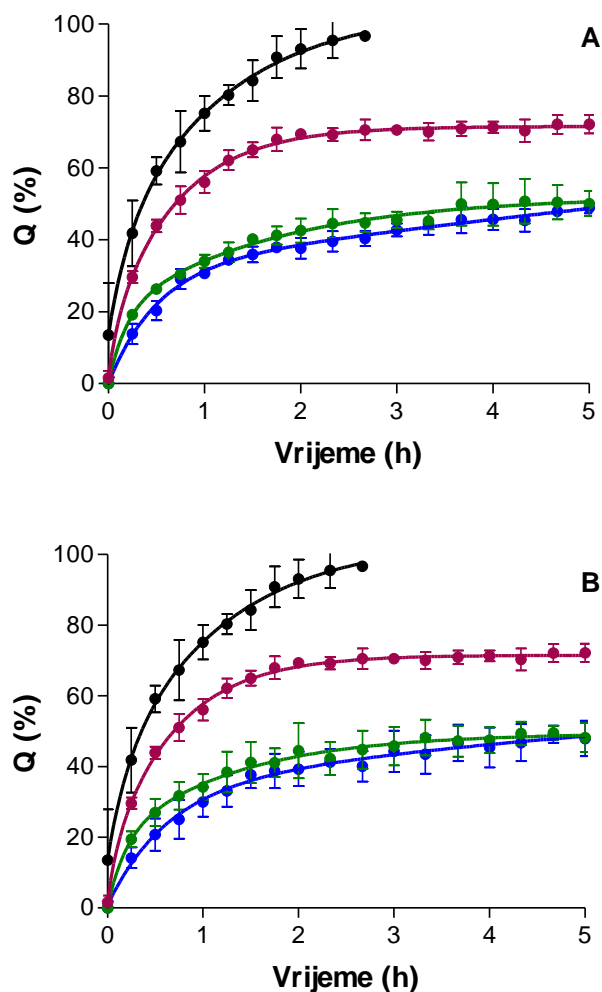
Veličina lecitinsko-kitozanskih nanočestica ovisila je o molekularnoj masi (50-150 kDa ili 150-400 kDa) i stupnju deacetilacije (75-90% ili > 90%) kitozana u pripravku. Tako su nanočestice najvećeg srednjeg promjera pripravljene s kitozonom većeg stupnja deacetilacije i veće molekulske mase (C214), dok su nanočestice najmanjeg srednjeg promjera pripravljene s kitozonom manjeg stupnja deacetilacije i manje molekulske mase (C113).

Većina uzoraka karakterizirana je relativno širokom raspodjelom veličina čestica na što ukazuju vrijednosti indeksa polidisperznosti prikazane u Tablici 2.

Vrijednosti zeta-potencijala promijenile su se od negativne za koloidnu suspenziju lecitina ( $-34,3 \pm 3,5$  i  $-33,7 \pm 2,8$  mV redom za ML i L nanočestice) u pozitivne, za sve ispitivane lecitinsko-kitozanske nanočestice. Zeta-potencijal lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom nije se značajnije razlikovao od zeta-potencijala odgovarajućih praznih nanočestica, iz čega se može zaključiti da uklapanje melatonina nije utjecalo na površinski naboj nanočestica. Jednako kao i veličina lecitinsko-kitozanskih nanočestica, i zeta-potencijal je ovisilo o molekularnoj masi i stupnju deacetilacije kitozana u pripravku. Tako su nanočestice najvećeg zeta-potencijala ( $32,5 \pm 1,2$  mV) pripravljene s kitozonom većeg stupnja deacetilacije i veće molekulske mase (C214), dok su nanočestice najmanjeg zeta-potencijala ( $23,4 \pm 0,9$  mV) pripravljene s kitozonom manjeg stupnja deacetilacije i manje molekulske mase (C113).

### **4.3. *In vitro* oslobađanje melatonina iz nanočestica**

Ispitivanje oslobađanja melatonina iz pripremljenih nanočestica provedeno je metodom dijalize uz acetatni pufer (pH 5,8) kao receptorski medij. Profili oslobađanja melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica prikazani su na Slici 3.



Slika 3: Profil oslobađanja melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica pripremljenih s kitozanom stupnja deacetilacije 75-90% (●) i >90% (●) molekulske mase 50-150 kDa (A) i 150-400 kDa (B). Ispitivanje je provedeno metodom dijalize uz acetatni pufer (pH 5,8) kao receptorski medij. Prikazan je i profil difuzije melatonina iz otopine odgovarajuće koncentracije kroz dijalizacijsku membranu (●) te profil oslobađanja melatonina iz lecitinskih nanočestica (●). Prikazane su srednje vrijednosti kumulativnog udjela oslobođenog melatonina (Q) ± SD (n = 3).

Za sve ispitivane lecitinsko-kitozanske nanočestice dobiveni su slični bifazični profili produljenog oslobađanja melatonina ( $t_{50\%}$  4-5 h) neovisno o tipu korištenog kitozana. Tako je u prvih sat vremena oslobođeno 30,0 - 34,2 % melatonina iz nanočestica, nakon čega je uslijedila faza sporijeg oslobađanja te je unutar 5 sati ispitivanja oslobođeno ukupno 48,0 - 50,1 % uklopljenog lijeka. Faktori sličnosti pri usporedbi profila oslobađanja melatonina iz nanočestica pripremljenih s različitim tipovima kitozana kretali su se između 69,8 i 87,7 potvrđujući sličnosti svih uspoređivanih profila oslobađanja melatonina, neovisno o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi kitozana u pripravku (Tablica 3).



Oslobađanje melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica bilo je sporije od oslobađanja melatonina iz lecitinskih nanočestica ( $t_{50\%}$  0,75 h).

Difuzija melatonina kroz dijalizacijsku membranu u slučaju vodene otopine melatonina značajno je brža ( $t_{50\%}$  0,25 h) nego u slučaju ispitivanih nanočestica. Naime, u prvih sat vremena kroz dijalizacijsku membranu difundiralo je 75,2 % melatonina iz otopine, a u nepuna tri sata dijaliza otopine melatonina je završena (količina lijeka u receptorskom mediju iznosila je 94,6 %). Stoga se može zaključiti da je, u slučaju nanočestica, profil oslobađanja melatonina određen oslobađanjem melatonina iz nanočestica u kontinuiranu fazu, a ne difuzijom kroz dijalizacijsku membranu.

Tablica 3: Faktori sličnosti ( $f_2$ ) pri usporedbi profila oslobađanja melatonina iz nanočestica pripremljenih s različitim tipovima kitozana

	MLC113	MLC114	MLC213
MLC214	69,8	86,6	70,2
MLC213	87,7	71,7	
MLC114	70,3		

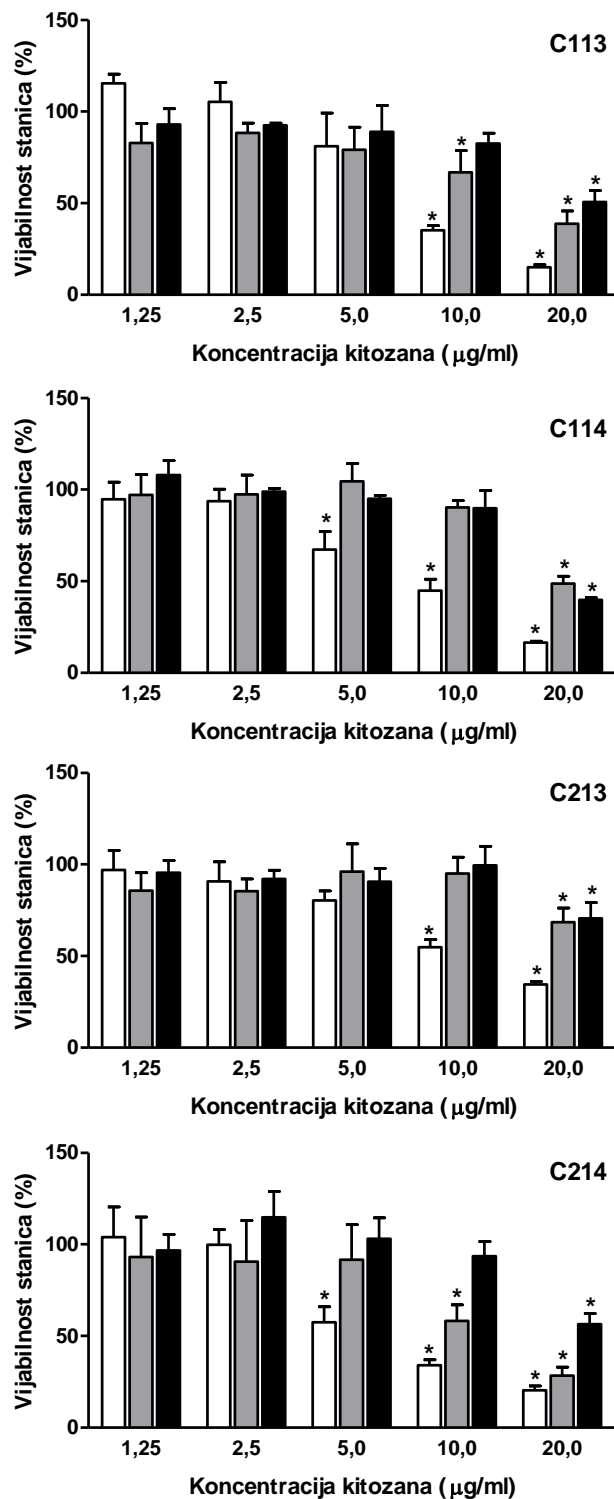
#### 4.4. Ispitivanje citotoksičnosti *in vitro* MTT testom

Metabolička aktivnost HaCaT stanica nakon dvosatnog izlaganja suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica i otopinama kitozana razrijeđenim HBSS-om (pH 6,0) prikazana je na Slici 4. Izlaganje stanica suspenzijama nanočestica s melatoninom pri koncentraciji kitozana u rasponu od 1,25 do 10  $\mu\text{gml}^{-1}$  nije značajnije utjecalo na vijabilnost stanica, neovisno o tipu korištenog kitozana ( $P > 0,05$ ). Značajno smanjenje vijabilnosti stanica uočeno je tek pri izlaganju stanica suspenzijama nanočestica pri koncentraciji kitozana od 20  $\mu\text{gml}^{-1}$ . Suprotno tome, vijabilnost stanica tretiranih otopinama kitozana smanjivala se je pri manjim koncentracijama, i to ovisno o stupnju deacetilacije kitozana. Tako je pri tretiranju stanica otopinama kitozana manjeg stupnja deacetilacije (75-90%; C113 i C213) značajno smanjenje vijabilnosti stanica uočeno pri koncentracijama kitozana od 10 i 20  $\mu\text{gml}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ), dok je u slučaju kitozana većeg stupnja deacetilacije

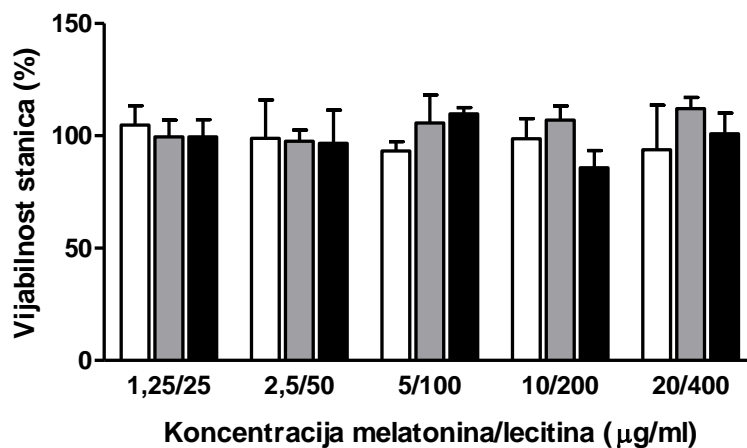
(>90%; C114 i C214) vijabilnost stanica značajno smanjena već pri koncentraciji kitozana od  $5 \mu\text{gml}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ). Nije uočena ovisnost vijabilnosti stanica o molekulskoj masi kitozana.

Vijabilnost stanica izloženih lecitinsko-kitozanskim nanočesticama s melatoninom, nije se značajnije razlikovala od vijabilnosti stanica izloženih odgovarajućim praznim nanočesticama, osim kada je u pripravi nanočestica korišten kitozan C214. U tom su slučaju lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom pri koncentracijama kitozana od 10 i  $20 \mu\text{gml}^{-1}$  manje utjecale na vijabilnost stanica od odgovarajućih praznih nanočestica (Slika 4).

Otopina melatonina, lecitinske nanočestice i lecitinske nanočestice s melatoninom (kontrola) nisu utjecali na vijabilnost HaCaT stanica u ispitivanom rasponu koncentracija (koncentracije melatonina  $1,25 - 20 \mu\text{gml}^{-1}$ , koncentracije lecitina  $25 - 400 \mu\text{gml}^{-1}$ ; Slika 5).



Slika 4: Utjecaj otopine kitozana (□), lecitinsko-kitozanskih nanočestica (▣) i lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom (■) na vijabilnost HaCaT stanica (MTT test). Otopine kitozana i suspenzije nanočestica razrijeđene su HBSS-om (pH 6,0). Koncentracija kitozana u razrijeđenim sustavima bila je u rasponu od 1,25 do 20 µml<sup>-1</sup>. Stanice su tretirane 2 sata. Vijabilnost stanica izražena je u odnosu na netretirane stanice inkubirane u HBSS-u (pH 6,0). Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n=3). \*Razlikuju se od netretiranih stanica inkubiranih u HBSS-u (P<0,05).



Slika 5: Utjecaj otopine melatonina (□), lecitinskih nanočestica (■) i lecitinskih nanočestica s melatoninom (■) na vijabilnost HaCaT stanica (MTT test). Otopina melatonina i suspenzije nanočestica razrijeđene su HBSS-om (pH 6,0). Stanice su tretirane 2 sata. Vijabilnost stanica izražena je u odnosu na netretirane stanice inkubirane u HBSS-u (pH 6,0). Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n=3).

#### 4.5. Utjecaj nanočestica na proliferaciju i migraciju HaCaT stanica

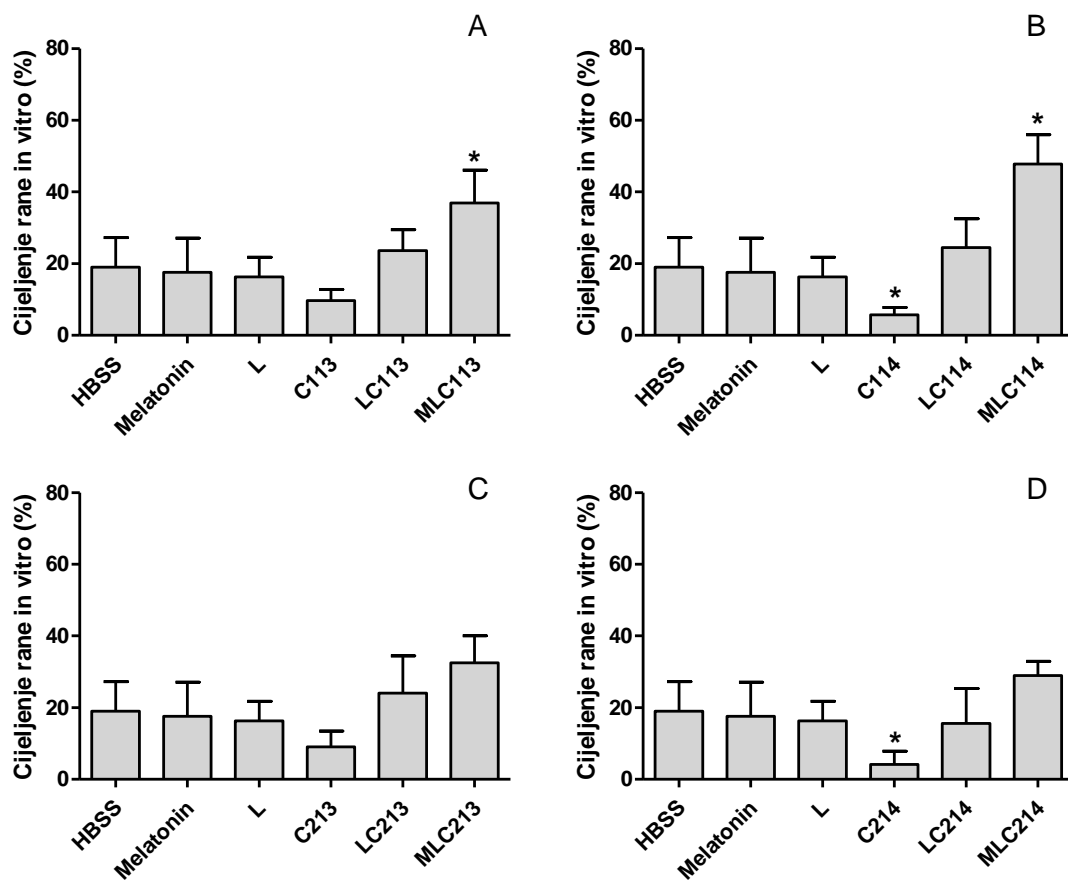
Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na proliferaciju i migraciju keratinocita *in vitro* ispitivan je pri pH 6,0 koji je osiguran razrjeđivanjem suspenzija nanočestica (pH 5,8-6,0) HBSS puferom navedene pH vrijednosti.

Modelne rane tretirane su pripremljenim suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom te praznim lecitinsko-kitozanskim nanočesticama pri koncentraciji kitozana od 5 µgml<sup>-1</sup>. Kao kontrole korištene su otopine melatonina (5 µgml<sup>-1</sup>) i kitozana (5 µgml<sup>-1</sup>), te lecitinske nanočestice (100 µgml<sup>-1</sup>).

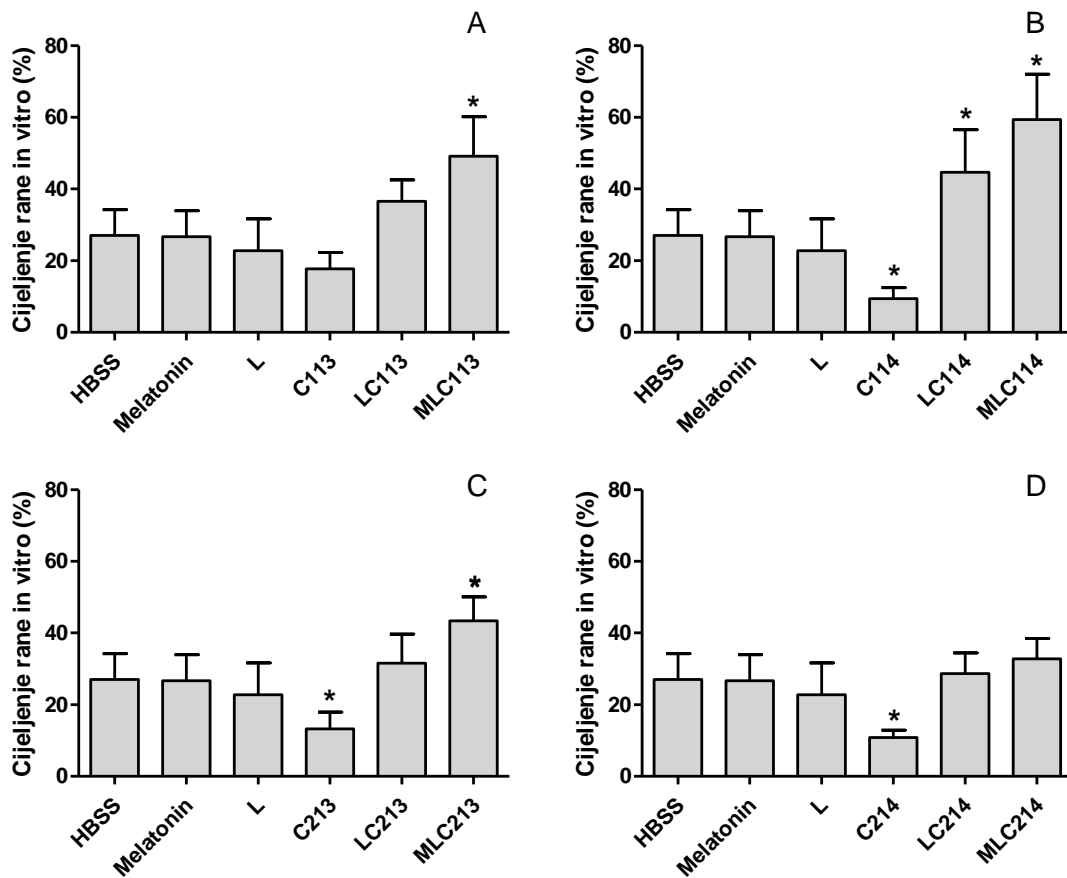
Proliferacija/migracija stanica (cijeljenje rane *in vitro*) izražena je smanjenjem površine praznine nastale namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica tj. postotkom prekrivenosti prvotno formirane praznine, 24 i 48 sati nakon dvosatnog tretiranja stanica (Slike 6 i 7).

Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom pripravljene s kitozanima manje molekulske mase (MLC113 i MLC114) značajno su ubrzale proces cijeljenja rane *in vitro* u odnosu na kontrolu (postotak cijeljenja rane *in vitro* iznosio je redom 36,9 ± 9,2 i 47,8 ± 8,2 % za MLC113 i MLC114 nanočestice te 19,0 ± 8,2 % za stanice inkubirane s HBSS-om) već u 24-satnom periodu nakon tretiranja (P < 0,05; Slika 6). Nakon 48 sati od tretiranja stanica

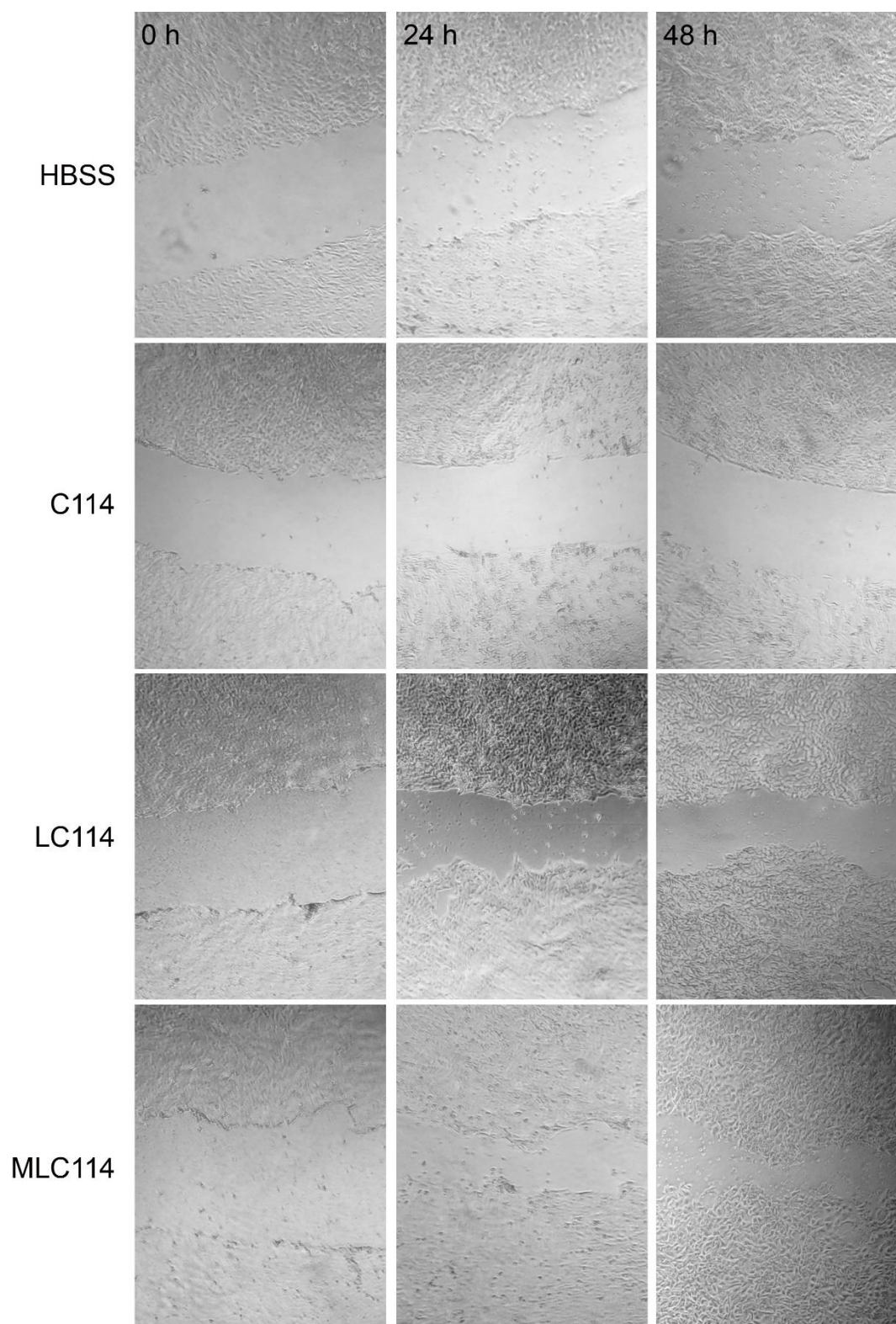
nanočesticama MLC113 i MLC114 pokrivenost praznine nastale namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica iznosila je redom  $49,16 \pm 10,9$  i  $59,4 \pm 12,5$  %, a vidljiv je značajan učinak i MLC213 nanočestica ( $43,4 \pm 6,7$  %) u odnosu na kontrolu (stanice inkubirane s HBSS-om;  $27,0 \pm 7,2$  %). Iz navedenih rezultata razvidan je najveći utjecaj MLC114 nanočestica na cijeljenje rane *in vitro* (Slika 8). Od praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica, jedino su LC114 nanočestice značajno ubrzale proces cijeljenja rane *in vitro* u odnosu na stanice inkubirane s HBSS-om (postotak cijeljenja rane *in vitro*  $44,7 \pm 11,8$  %) i to u periodu od 48 sati nakon tretiranja. Iz tih rezultata je razvidan pozitivan utjecaj melatonina uklopljenog u nanočestice na proces proliferacije i migracije HaCaT stanica.



Slika 6: Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom i praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica pripremljenih s kitozansom C113 (A), C114 (B), C213 (C) i C214 (D) na cijeljenje rane *in vitro* u 24-satnom periodu. Cijeljenje rane *in vitro* izraženo je postotkom pokrivenosti površine praznine nastale namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica 24 sata nakon dvosatnog tretiranja stanica. Modelne rane tretirane su priređenim suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana od  $5 \mu\text{gml}^{-1}$ . Kao kontrole korištene su otopine melatonina ( $5 \mu\text{gml}^{-1}$ ) i kitozana ( $5 \mu\text{gml}^{-1}$ ), te lecitinske nanočestice ( $100 \mu\text{gml}^{-1}$ ). Otopina melatonina i kitozana te suspenzije nanočestica razrijeđene su HBSS-om (pH 6,0). Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=6). \*Razlikuju se od netretiranih stanica inkubiranih u HBSS-u ( $P < 0,05$ ).

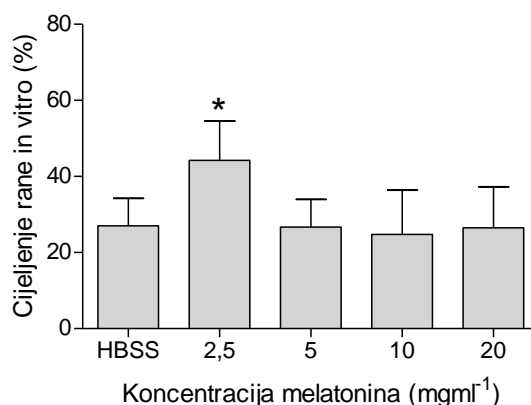


Slika 7: Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom i praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica pripremljenih s kitozansom C113 (A), C114 (B), C213 (C) i C214 (D) na cijeljenje rane in vitro u 48-satnom periodu. Cijeljenje rane in vitro izraženo je postotkom prekrivenosti površine praznine nastale namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica 48 sata nakon dvosatnog tretiranja stanica. Modelne rane tretirane su priređenim suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana od  $5 \mu\text{gml}^{-1}$ . Kao kontrole korištene su otopine melatonina ( $5 \mu\text{gml}^{-1}$ ) i kitozana ( $5 \mu\text{gml}^{-1}$ ), te lecitinske nanočestice ( $100 \mu\text{gml}^{-1}$ ). Otopina melatonina i kitozana te suspenzije nanočestica razrijeđene su HBSS-om (pH 6,0). Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=6). \*Razlikuju se od netretiranih stanica inkubiranih u HBSS-u ( $P < 0,05$ ).



Slika 8: Brzina cijeljenja modelnih rana nastalih namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja HaCaT stanica te izloženih otopini kitozana C114, lecitinsko-kitozanskim nanočesticama pripravljenim s kitozansom C114 (LC114) te lecitinsko-kitozanskim nanočesticama s melatoninom pripravljenim s kitozansom C114 (MLC114) u usporedbi sa stanicama inkubiranim u HBSS-u (pH 6,0). Modelne rane tretirane su otopinom kitozana i suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana od  $5 \mu\text{gml}^{-1}$ . Otopina kitozana te suspenzije nanočestica razrijeđene su HBSS-om (pH 6,0).

Utjecaj otopine melatonina na proliferaciju i migraciju HaCaT stanica ispitivan je pri koncentracijama melatonina od 2,5 do 20  $\mu\text{gml}^{-1}$ . Brže cijeljenje modelne rane u odnosu na kontrolu zabilježeno je jedino pri koncentraciji melatonina od 2,5  $\mu\text{gml}^{-1}$  (postotak cijeljenja rane *in vitro* nakon 48 h iznosio je  $44,2 \pm 10,4$  %; Slika 9). Sadržaj melatonina u suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica kojima su stanice tretirane iznosio je približno 5  $\mu\text{gml}^{-1}$ . Pri toj koncentraciji melatonina u otopini nije uočen utjecaj na cijeljenje rane *in vitro* u odnosu na stanice inkubirane s HBSS-om.



Slika 9: Utjecaj otopine melatonina na cijeljenje rane (migraciju i proliferaciju HaCaT stanica) *in vitro*. Cijeljenje rane *in vitro* izraženo je postotkom prekrivenosti površine praznine nastale namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica 48 sati nakon dvosatnog tretiranja stanica. Otopina melatonina razrijeđena je HBSS-om (pH 6,0). Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=6). \*Razlikuje se od netretiranih stanica inkubiranih u HBSS-u ( $P < 0,05$ ).

Za razliku od lecitinsko-kitozanskih nanočestica, otopine kitozana odgovarajuće koncentracije usporile su proces cijeljenja rane *in vitro* u odnosu na stanice inkubirane s HBSS-om (Slike 6, 7 i 8). Tako je 24 sata nakon tretiranja stanica otopinama kitozana C114 i C214 prekrivenost praznine nastale namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica iznosila redom  $5,7 \pm 2,0$  i  $4,1 \pm 3,7$  %, što je značajno manje u odnosu na stanice inkubirane s HBSS-om ( $19,0 \pm 8,2$  %). Nadalje, 48 sati nakon tretiranja stanica otopinama kitozana C114, C214 i C213 postotak cijeljenja rane *in vitro* iznosio je redom  $9,4 \pm 3,0$ ,  $10,8 \pm 2,1$  %, i  $13,2 \pm 4,8$  % što je i dalje značajno manje u odnosu na stanice inkubirane s HBSS-om ( $27,0 \pm 7,2$  %).



## 5. Rasprava

### 5.1. Lecitinsko-kitozanske nanočestice sa melatoninom uspješno su pripravljene

Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom uspješno su pripravljene metodom ionotropnog geliranja kitozana i lecitina. Odabrana metoda pripreme nanočestica pokazala se primjenjivom u izradi nanočestica na bazi kitozana s mogućnošću uklapanja lipofilnih lijekova poput melatonina [97]. Prednost je i u jednostavnosti i reproducibilnosti metode, a lecitin i kitozan kao prirodne, biokompatibilne i biorazgradljive tvari, prikladni su za razvijanje terapijskih sustava za sigurnu i ciljanu primjenu lijekova.

Kitozan je netopljiv u alkalnom i neutralnom mediju ali čini soli s organskim i anorganskim kiselinama, primjerice s glutaminskom, kloridnom, octenom i mliječnom kiselinom. Soli kitozana topljive su u vodi a topljivost im ovisi o stupnju deacetilacije (a time i o  $pK_a$  vrijednosti kitozana), i pH vrijednosti medija. Kitozani relativno niskog stupnja deacetilacije topljivi su pri pH vrijednostima do 9, dok su kitozani sa stupnjem deacetilacije oko 85 % topljivi samo do pH vrijednosti medija od 6,5. Topljivost kitozana također je uvjetovana koncentracijom soli u otopini. Što je veća ionska jakost otopine to je topljivost kitozana manja [98].

Viskoznost kitozanskih otopina usko je povezana s molekulskom masom kitozana ali i sa stupnjem deacetilacije. Što je veća molekulska masa kitozana, veća je i viskoznost otopine kitozana. Usto, što je više slobodnih amino skupina u polimernom lancu kitozana, veća je i mogućnost nastajanja vodikovih veza, a kao posljedica promjene u konformaciji molekule povećava se viskoznost kitozanske otopine [98].

U pripravi lecitinsko-kitozanskih nanočestica korištena su četiri tipa kitozana (C113, C114, C213 i C214) koji se međusobno razlikuju prema stupnju deacetilacije (75-90% ili > 90%; o kojem, kao i o pH medija, ovisi gustoća naboja na polimernom lancu) i molekulskoj masi (50 do 150 kDa ili 150 do 400 kDa; Tablica 1), svojstvima koja uvelike određuju njihova biofarmaceutska svojstva.

Lecitin je smjesa prirodnih fosfolipida koji se često koristi u pripravi različitih terapijskih nanosustava te se smatra sigurnim i biokompatibilnim ekscipijensom [97]. Kao lipofilni nosač, omogućuje dobro uklapanje lipofilnih lijekova te njihovo produljeno oslobađanje [99].

Za pripravu lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom odabran je lecitin Lipoid S45 koji sadrži fosfatidilkolin (54,9%), fosfatidiletanolamin (16,9%), lizofosfatidilkolin (1,0%) te masne kiseline čiji je sadržaj izražen u postotku u odnosu na ukupnu količinu masnih kiselina:

palmitinsku (18%), stearinsku (3%), oleinsku (10%), linoleinsku (60%), linolensku (5%); te manji sadržaj triglicerida i DL-R-tokoferola (0,8%). Injektiranjem etanolne otopine lecitina Lipoid S45 u vodeni medij nastaju lecitinske nanočestice negativnog površinskog naboja, dok injektiranjem u vodenu otopinu kitozana nastaju lecitinsko-kitozanske nanočestice zahvaljujući ionskoj interakciji između pozitivno nabijenih amino skupina kitozana i negativno nabijenih sastavnica lecitina [97].

## 5.2. Uklapanje melatonina u nanočestice nije ovisilo o tipu kitozana

Uspješnost uklapanja lijeka odnosi se na sadržaj lijeka uklopljenog u nanočestice, izražen u postotku prema ukupnoj količini lijeka u pripravku. Uspješnost uklapanja ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima lijeka (topljivost, hidrofilnost i kristaličnost), fizičko-kemijskim svojstvima polimera (molekulska masa, hidrofobnost, interakcija s lijekom, topljivost), metodi pripreme nanočestica, masenom omjeru polimera i lijeka i korištenom otapalu [100].

Kako bi se odredila uspješnost uklapanja potrebno je odijeliti neuklopljeni lijek od nanočestica s uklopljenim lijekom što se najčešće provodi ultracentrifugiranjem. Ta metoda pokazala se neprimjenjivom za odjeljivanje neuklopljenog melatonina od lecitinsko-kitozanskih nanočestica jer je uslijed djelovanja centrifugalne sile na pripravljene nanočestice došlo do izraženog istjecanja uklopljenog melatonina [3]. Iz tog razloga u ovom radu odjeljivanje nanočestica s uklopljenim lijekom provedeno je metodom dijalize.

Sadržaj uklopljenog lijeka može se izraziti kao postotni udio uklopljenog lijeka u odnosu na ispitivanu količinu nanočestica (DL; Tablica 2), odnosno količinom uklopljenog lijeka sadržanom u jediničnom volumenu suspenzije nanočestica (koncentracija melatonina u suspenziji nanočestica,  $C_M$ ; Tablica 2).

S obzirom na tip ispitivanog terapijskog sustava, postignut je relativno velik sadržaj lijeka u lecitinsko-kitozanskim nanočesticama ( $3,8 \pm 0,3$  % do  $4,3 \pm 0,4$  %), koji odgovara koncentraciji melatonina u suspenziji nanočestica u rasponu od  $95,7 \pm 7,1$  do  $109,2 \pm 9,9$   $\mu\text{gml}^{-1}$ . Usporedbom uspješnosti uklapanja melatonina u lecitinske i lecitinsko-kitozanske nanočestice (Tablica 2) može se zaključiti da je uvođenje kitozana u sustav pospiješilo uklapanje melatonina u nanočestice, neovisno o tipu kitozana u sustavu. Takvo opažanje već je zabilježeno za nanočestice pripravljene s različitim tipovima lecitina i kitozanom C113 [97].

Odjeljivanjem neuklopljenog lijeka od nanočestica s uklopljenim lijekom pripremljeni su uzorci koji su korišteni u svim drugim ispitivanjima. Prije daljnje karakterizacije nanočestica (određivanje veličine i površinskog naboja) dijalizirane suspenzije nanočestica su razrijeđene vodom ili 10 mM otopinom NaCl. Vrijednosti pH u razrijeđenim dijaliziranim sustavima kretale su se između 5,8-6,0. Poznavanje pH vrijednosti u mjerenim sustavima od velike je važnosti, s obzirom da naboj i topljivost kitozana, a time i svojstva nanočestica, ovise o pH vrijednosti medija u kojem su suspendirane [3].

### **5.3. Veličina i površinski naboj nanočestica ovise o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi kitozana**

#### *Veličina i polidisperznost nanočestica*

Određivanje veličine čestica neizostavan je vid karakterizacije koloidnih disperzija. Uz srednji promjer čestica neophodno je poznavati i indeks polidisperznosti koji predstavlja mjeru širine raspodjele veličina čestica. Vrijednosti indeksa polidisperznosti kreću se od 0 za monodisperzan sustav do 1 za potpuno heterodisperzan sustav. Koloidni sustavi s indeksom polidisperznosti iznad 0,7 karakterizirani su vrlo širokom raspodjelom veličina čestica [101].

Veličina nanočestica mjerena je nakon odgovarajućeg razrjeđivanja suspenzija pročišćenom vodom kako bi se izbjeglo višestruko raspršivanje svjetlosti uzrokovano velikom koncentracijom nanočestica u uzorku [3]. Srednji promjeri lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom kretali su se između  $245,2 \pm 2,8$  i  $277,1 \pm 7,6$  nm. Lecitinske nanočestice s melatoninom bile su srednjeg promjera od  $96,8 \pm 2,1$  nm. Značajno veće vrijednosti srednjih promjera čestica u sustavima pripremljenim s lecitinom i kitozonom u usporedbi s lecitinskim nanočesticama upućuju na nastanak lecitinsko-kitozanskih nanočestica u svim miješanim sustavima [97].

Usporedbom srednjih promjera praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom i odgovarajućih praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica može se zaključiti da je uklapanje melatonina rezultiralo porastom promjera lecitinsko-kitozanskih nanočestica. Isto opažanje objavljeno je već u literaturi za nanočestice s melatoninom pripravljene s lecitinom Lipoid S45 i kitozonom tipa C113 [97].

Veličina lecitinsko-kitozanskih nanočestica ovisila je o molekulskoj masi (50-150 kDa ili 150-400 kDa) i stupnju deacetilacije (75-90% ili > 90%) kitozana u pripravku. Tako su

nanočestice najvećeg srednjeg promjera pripravljene s kitozanom većeg stupnja deacetilacije i veće molekulske mase (C214), dok su nanočestice najmanjeg srednjeg promjera pripravljene s kitozanom manjeg stupnja deacetilacije i manje molekulske mase (C113). Ovisnost veličine kitozanskih nanočestica pripremljenih metodom ionotropnog geliranja o molekulskoj masi i stupnju deacetilacije već je opisana u literaturi [102, 103].

Većina uzoraka karakterizirana je relativno širokom raspodjelom veličina čestica na što ukazuju vrijednosti indeksa polidisperznosti prikazane u Tablici 2. Slična polidisperznost nanočestica pripremljenih s kitozanom ili derivatima kitozana česta je u literaturi te vjerojatno proizlazi iz činjenice da je kitozan, kao prirodni polimer, smjesa lanaca različite molekulske mase iz kojih nastaju nanočestice šireg raspona veličina [3].

### *Zeta-potencijal nanočestica*

Površinski naboj nanočestica važno je svojstvo o kojem ovisi biokompatibilnost odnosno biofarmaceutska aktivnost nanočestica u biološkom okruženju.

Slično kao i kod određivanja veličine nanočestica, zeta-potencijal je mjereno nakon odgovarajućeg razrjeđivanja s 10 mM otopinom NaCl kako bi se izbjeglo višestruko raspršivanje svjetlosti uzrokovano velikom koncentracijom nanočestica u uzorku [3].

Promjena vrijednosti zeta-potencijala od negativne za koloidnu suspenziju lecitina ( $-34,3 \pm 3,5$  i  $33,7 \pm 2,8$  mV redom za ML i L nanočestice) u pozitivne, za sve ispitivane lecitinsko-kitozanske nanočestice (Tablica 2), upućuje na prisustvo pozitivno nabijenih amino skupina kitozana na njihovoj površini. Naime, kitozan je pozitivno nabijen u otopinama pri pH vrijednostima ispod pKa kitozana ( $\sim 6,5$ ). Kako se pH sustava približava pKa vrijednosti kitozana, smanjuje se broj ioniziranih amino skupina kitozana [104].

Razlika u površinskom naboju sustava pripremljenih s različitim tipovima kitozana može se pripisati različitim stupnjevima deacetilacije. Naime, pri većem stupnju deacetilacije, više je slobodnih amino skupina koje se protoniraju u kiselim uvjetima [105, 106]. Tako su lecitinsko-kitozanske nanočestice pripravljene s kitozanim C114 i C214 (stupanj deacetilacije > 90%) bile pozitivnije nabijene od lecitinsko-kitozanskih nanočestica pripremljenih s kitozanim iste molekulske mase ali manjeg stupnja deacetilacije (C113 i C213, stupanj deacetilacije 75-90%).

Najveći zeta-potencijal zabilježen je kod nanočestica pripremljenih s kitozanom većeg stupnja deacetilacije i veće molekulske mase (C214; Tablica 2). Sličan lagani porast

zeta-potencijala pri povećanju molekulske mase kitozana zabilježen je u slučaju kitozanskih nanočestica kao nosača siRNA nastalih ionskom interakcijom između pozitivno nabijenih amino skupina kitozana i negativno nabijene siRNA [106]. Molekulska masa ne utječe izravno na površinski naboj nanočestica kao što utječe stupanj deacetilacije kitozana, ali može utjecati na hidrofилnost/hidrofobnost polimernog lanca, interakciju između lecitina i kitozana, fleksibilnost i prostornu organizaciju lanaca na površini čestica, a time i na gustoću naboja na površini čestica [107].

Pripravljene lecitinsko-kitozanske nanočestice karakterizirane su relativno velikim površinskim nabojem, što je od posebne važnosti za stabilnost pripremljenih suspenzija jer vrlo nabijene čestice ne podliježu agregaciji zbog izraženog električnog odbijanja [108].

Uklanjanje melatonina nije značajnije utjecalo na zeta-potencijal lecitinsko-kitozanskih nanočestica, iz čega se može zaključiti da je melatonin uklopljen u lecitinsku jezgru nanočestica.

#### **5.4. Melatonin se produljeno oslobađa iz nanočestica**

Određivanje kinetike oslobađanja lijeka *in vitro* predstavlja važan korak u razvoju i kontroli kvalitete koloidnih terapijskih sustava. Kinetika oslobađanja lijeka *in vitro* reflektira fizičko-kemijska svojstva terapijskog sustava, moguće interakcije molekula lijeka i molekula nosača te njihov utjecaj na brzinu i mehanizam oslobađanja lijeka [109].

Ispitivanje oslobađanja melatonina iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica provedeno je metodom dijalize uz acetatni pufer (pH 5,8) kao receptorski medij. Odabrana pH vrijednost medija odgovarajuća je s obzirom na pH vrijednosti (5,8-6,0) pri kojima su određeni veličina i površinski naboj nanočestica. Metode membranske difuzije smatraju se najprikladnijima za određivanje kinetike oslobađanja lijeka *in vitro* iz nosača nanometarskih veličina. Ipak, drugi uvjeti korištene metode neovisni su o stvarnoj primjeni sustava. Stoga na temelju dobivenih rezultata nije bilo moguće predvidjeti profil oslobađanja lijeka *in vivo*. Metoda je prikladna za provođenje ispitivanja koje ima za cilj usporediti pripravljene lecitinsko-kitozanske nanočestice i utvrditi postoji li utjecaj tipa kitozana u pripravku na profil oslobađanja melatonina iz pripremljenih nanočestica [3].

Za sve ispitivane lecitinsko-kitozanske nanočestice dobiven je sličan bifazični profil produljenog oslobađanja melatonina koji je karakterističan za nosače nanometarskih veličina: početno naglo oslobađanje (koje je posljedica velikog omjera ukupne površine prema

volumenu nanočestica) praćeno je sporijim (kontroliranim) oslobađanjem (Slika 3). Produljeno oslobađanje lijeka osnovni je preduvjet za postizanje produljenog učinka lijeka. Pripravci s produljenim oslobađanjem lijeka odlikuju se postizanjem jednolićnije koncentracije lijeka na mjestu djelovanja, smanjenjem toksićnosti i nuspojava lijeka [109].

Kako je, pri postupku dijalize, pojava lijeka u receptorskom mediju posljedica dvaju procesa: (a) oslobađanja lijeka iz nosaća u kontinuiranu fazu u donorskom odjeljku i (b) difuzije lijeka kroz dijalizacijsku membranu iz donorskog u receptorski odjeljak, svaki od ta dva procesa moće ogranićavati brzinu dijalizacijskog procesa. S obzirom da je difuzija melatonina kroz dijalizacijsku membranu u slućaju vodene otopine melatonina bila znaćajno brća nego u slućaju ispitivanih nanoćestica (Slika 3), moće se zakljućiti da je, u slućaju nanoćestica, profil oslobađanja melatonina određen oslobađanjem melatonina iz nanoćestica u kontinuiranu fazu a ne difuzijom kroz dijalizacijsku membranu.

Profili oslobađanja melatonina iz nanoćestica pripremljenih s razlićitim tipovima kitozana uspoređeni su upotrebom faktora slićnosti (engl. *similarity factor*,  $f_2$ ) koji odrećuje bliskost dvaju profila. Ako vrijedi da je  $50 < f_2 < 100$ , uspoređeni profili smatraju se slićnim. Faktori slićnosti pri usporedbi profila oslobađanja melatonina iz nanoćestica pripremljenih s razlićitim tipovima kitozana kretali su se izmeću 69,8 i 87,7 potvrćujući slićnosti svih uspoređivanih profila oslobađanja melatonina, neovisno o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi kitozana u pripravku (Tablica 3). Ovo zapaćanje u skladu je s pretpostavkom da je melatonin uklopljen u lecitinskoj jezgri nanoćestica.

## **5.5. Lecitinsko-kitozanske nanoćestice manje utjeću na vijabilnost stanica nego otopine kitozana**

Pri razvoju terapijskog sustava s potencijalnim učinkom na cijeljenje rana neophodno je procijeniti njegovu biokompatibilnost sa humanim stanicama koće *in vitro*.

Kitozan prianja na negativno nabijene površine pri pH vrijednostima manjim od 6,5, pri kojima su amino skupine kitozana protonirane. Interakcije izmeću polikationskog polimera kitozana i negativno nabijene stanićne površine mogu rezultirati promjenama u integritetu stanićne membrane i posljedićno u permeabilnosti [79]. Iako se kitozan i njegovi derivati smatraju manje toksićnim od drugih kationskih polimera kao što je polietilenimin [110], njegov sigurnosni profil ovisi o tipu stanica korišćenih pri ispitivanju biokompatibilnosti, stupnju deacetilacije, molekulskoj masi, tipu soli i derivata [111, 112, 113, 114, 115].

U ovom radu za utvrđivanje potencijalnih negativnih učinaka lecitinsko-kitozanskih nanočestica na vijabilnost stanica kože *in vitro* korištena je stanična linija humanih keratinocita (HaCaT).

*In vitro* citotoksičnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica ispitivana je praćenjem metaboličke aktivnosti modelnih stanica nakon tretiranja suspenzijom nanočestica. Metabolička aktivnost stanica mjerena je MTT testom i izražena je kao relativna u odnosu na netretirane stanice inkubirane u HBSS-u (pH 6,0).

Ispitivanja citotoksičnosti provedena su ne samo zbog procjene biokompatibilnosti pripremljenih lecitinsko-kitozanskih nanočestica sa stanicama kože nego i s ciljem određivanja koncentracija nanočestica pri kojima ima smisla ispitivati učinak nanočestica na cijeljenje rane *in vitro*.

Pri ispitivanju citotoksičnosti lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom, HaCaT stanice tretirane su suspenzijama nanočestica razrijeđenim u HBSS-u, pri koncentraciji kitozana u rasponu od 1,25 do 20  $\mu\text{gml}^{-1}$ , u trajanju od 2 sata. Uzimajući u obzir uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice, isti raspon koncentracija odgovara i koncentracijama melatonina u razrijeđenim suspenzijama nanočestica. S obzirom na maseni omjer lecitina i kitozana od 20:1, koncentracija lecitina u pripremljenim sustavima bila je u rasponu od 25 – 400  $\mu\text{gml}^{-1}$ .

Kitozan je istaknut kao ključna sastavnica sustava, s obzirom da o njegovim svojstvima ovise površinska svojstva nanočestica, a posljedično i interakcija sa površinom stanica. Usto, uzorci koji su korišteni kao kontrolni (otopina melatonina, lecitinske nanočestice, lecitinske nanočestice s melatoninom) nisu utjecali na vijabilnost stanica (Slika 5).

Izlaganje stanica suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica pri koncentraciji kitozana u rasponu od 1,25 do 10  $\mu\text{gml}^{-1}$  nije značajnije utjecalo na vijabilnost stanica, neovisno o tipu korištenog kitozana (Slika 4;  $P > 0,05$ ). Značajno smanjenje vijabilnosti stanica uočeno je tek pri tretiranju stanica suspenzijama nanočestica pri koncentraciji kitozana od 20  $\mu\text{gml}^{-1}$ . Suprotno tome, značajno smanjenje vijabilnosti stanica tretiranih otopinama kitozana uočeno je i pri manjim koncentracijama, i to ovisno o stupnju deacetilacije kitozana. Tako je pri tretiranju stanica otopinama kitozana manjeg stupnja deacetilacije (75-90%; C113 i C213) značajno smanjenje vijabilnosti stanica uočeno pri koncentracijama kitozana od 10 i 20  $\mu\text{gml}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ), dok je u slučaju kitozana većeg stupnja deacetilacije ( $> 90\%$ ; C114 i C214) vijabilnost stanica značajno smanjena već pri koncentraciji kitozana od 5  $\mu\text{gml}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ). Veća toksičnost kitozana u otopini u odnosu na onaj inkorporiran u nanosustav već je uočena na primjeru epitelnih stanica rožnice HCE-T [116]. Smanjenje

vijabilnosti stanica kao posljedica povećanja stupnja deacetilacije kitozana može se objasniti većom gustoćom pozitivno nabijenih amino skupina i naglašenijom interakcijom sa staničnom membranom [117]. Nije uočena ovisnost vijabilnosti stanica o molekulskoj masi kitozana.

Vijabilnost stanica izloženih lecitinsko-kitozanskim nanočesticama s melatoninom nije se značajnije razlikovala od vijabilnosti stanica izloženih odgovarajućim praznim nanočesticama, osim kada je u pripravi nanočestica korišten kitozan C214 (Slika 4). U tom slučaju, lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom pri koncentracijama kitozana od 10 i 20  $\mu\text{gml}^{-1}$  manje su utjecale na vijabilnost stanica od odgovarajućih praznih nanočestica (Slika 4). S obzirom da otopina melatonina u ispitivanom rasponu koncentracija nije utjecala na vijabilnost stanica, to opažanje se djelomično može objasniti razlikom u veličini odgovarajućih praznih nanočestica i nanočestica s melatoninom.

## **5.6. Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom utječu na epitelizaciju rane *in vitro***

Cijeljene rane je kompleksan proces koji uključuje interakcije različitih tipova stanica, izvanstaničnog matriksa i različitih faktora rasta. Tijekom inflamatorne faze fibroblasti kemotaksijom migriraju u područje rane gdje sintetiziraju i kasnije remodeliraju novi izvanstanični matriks, u kojem je kolagen glavna sastavnica. Događaji u dermisu predstavljaju samo jedan vid cijeljenja rane. Također i epidermis, površinski zaštitni sloj kože sastavljen od nekoliko slojeva keratinocita, mora zacijeliti. Keratinociti iz bazalnog sloja migriraju iz područja rubova rane i ozlijeđenih epidermalnih adneksa (folikula dlaka i žlijezda znojnice) u područje rane, preko novonastalog dermalnog tkiva. Keratinociti zatim proliferiraju, raslojavaju se i diferenciraju stvarajući novi epidermis koji prekriva ranu čime se obnavlja zaštitna funkcija kože [44].

Stanične kulture fibroblasta i keratinocita koriste se kao *in vitro* modeli rane u preliminarnim ispitivanjima biokompatibilnosti i potencijalnog učinka različitih tvari i inovativnih terapijskih sustava na cijeljenje rane kroz učinak na proliferaciju i migraciju stanica [44, 118].

U ovom radu utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na proliferaciju i migraciju keratinocita *in vitro* ispitan je pri pH 6,0 koji je osiguran razrjeđivanjem suspenzija nanočestica (pH 5,8-6,0) HBSS puferom navedene pH vrijednosti. Pri tim je uvjetima kitozan pozitivno nabijen, a lecitinsko-kitozanske nanočestice, nastale uslijed ionske interakcije kitozana s negativno nabijenim sastavnicama lecitina, stabilne. Istodobno, blago kiseli uvjeti u području rane pogoduju cijeljenju rane sprječavajući/kontrolirajući infekciju rane, mijenjajući



aktivnost proteaza, utječući na oslobađanje kisika, smanjujući toksičnost razgradnih produkata bakterija te potičući epitelizaciju i angiogenezu [119]. Također je utvrđeno da rane alkalnog pH sporije cijele od rana čiji je pH bliži neutralnom.

Modelne rane tretirane su priređenim suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom te praznim lecitinsko-kitozanskim nanočesticama pri koncentraciji kitozana od  $5 \mu\text{gml}^{-1}$ . Kao kontrole korištene su otopine melatonina ( $5 \mu\text{gml}^{-1}$ ) i kitozana ( $5 \mu\text{gml}^{-1}$ ), te lecitinske nanočestice ( $100 \mu\text{gml}^{-1}$ ).

Proliferacija/migracija stanica (cijeljenje rana) izražena je smanjenjem površine praznine nastale namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica tj. postotkom prekrivenosti prvotno formirane praznine, 24 i 48 sati nakon dvosatnog tretiranja stanica (Slike 6 i 7).

Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica na cijeljenje rane *in vitro* ovisio je o molekulskoj masi i stupnju deacetilacije kitozana u pripravku. Tako su veći učinak na cijeljenje rane *in vitro* imale nanočestice pripravljene s kitozanima manje molekulske mase (MLC113 i MLC114). Najbrže cijeljenje rane zapaženo je kod stanica tretiranih lecitinsko-kitozanskim nanočesticama pripremljenim s kitozansom C114 koji osim manje molekulske mase, ima i veći stupanj deacetilacije (Slika 8). Porast aktivnosti kitozana u biološkom okruženju pri većem stupnju deacetilacije već je opažena [106, 107]. No, prema literaturnim navodima, najveći učinak kitozana na cijeljenje rana *in vivo* zabilježen kod kitozana velikog stupnja deacetilacije i velike molekulske mase [120]. Nedavnim istraživanjem učinka tioliranih kvaternih amonijevih soli kitozana na cijeljenje rane *in vitro* također je utvrđen bolji učinak kitozana veće molekulske mase, no to ispitivanje provedeno je na stanicama dermalnih fibroblasta [121]. Ispitivanja utjecaja kitozana različite molekulske mase na proliferaciju i migraciju keratinocita nisu dostupna u literaturi.

Od praznih lecitinsko-kitozanskih nanočestica, jedino su LC114 nanočestice značajno ubrzale proces cijeljenja rane *in vitro* u odnosu na stanice inkubirane s HBSS-om i to u periodu od 48 sati nakon tretiranja (Slike 7 i 8). Iz tih rezultata je razvidan pozitivan utjecaj melatonina uklopljenog u nanočestice na proces proliferacije i migracije HaCaT stanica. Utjecaj otopine melatonina na proliferaciju i migraciju HaCaT stanica ispitivan je pri koncentracijama melatonina od  $2,5$  do  $20 \mu\text{gml}^{-1}$  (Slika 9). Brže cijeljenje modelne rane u odnosu na kontrolu zabilježeno je jedino pri koncentraciji melatonina od  $2,5 \mu\text{gml}^{-1}$ . Sadržaj melatonina u suspenzijama lecitinsko-kitozanskih nanočestica kojima su stanice tretirane iznosio je približno  $5 \mu\text{gml}^{-1}$ . Bolji učinak lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom u odnosu na odgovarajuće prazne nanočestice ukazuje na sinergijski učinak kitozana i melatonina. Usto, produljeno oslobađanje melatonina iz nanočestica rezultiralo je postupnim porastom

koncentracije oslobođenog melatonina u mediju. Uzimajući u obzir rezultate ispitivanja *in vitro* oslobađanja melatonina (Slika 3), za očekivati je da se tijekom dvosatnog tretiranja modelne rane melatonin iz lecitinsko-kitozanskih nanočestica nije u potpunosti oslobodio.

Za razliku od lecitinsko-kitozanskih nanočestica, otopine kitozana odgovarajuće koncentracije usporile su proces cijeljenja rane *in vitro* u odnosu na kontrolu (stanice inkubirane s HBSS-om). Razlog tome vjerojatno je veća citotoksičnost kitozana u otopini u odnosu na onaj inkorporiran u nanosustav [116]. Usto, ispitivanja su provedena pri pH 6,0 koji odstupa od pH staničnog medija (7,4) što također pridonosi osjetljivosti tretiranih stanica. Felice i suradnici [121] utvrdili su pozitivan učinak otopina tioliranih kvaternih amonijevih soli kitozana (pri koncentraciji od  $10 \mu\text{gml}^{-1}$ ) na proliferaciju i migraciju fibroblasta tijekom 24 satnog ispitivanja. Korišteni derivati kitozana topljivi su u vodenom mediju pri većem rasponu pH, tako da su otopine pripravljene u samom staničnom mediju. Također, pri tim ispitivanjima serum nije u potpunosti uskraćen stanicama što također može utjecati na dobivene rezultate [44].

Howling i suradnici [42] ispitivali su utjecaj hitina i kitozana različitog stupnja deacetilacije, ali slične molekulske mase, na proliferaciju humanih fibroblasta kože i keratinocita *in vitro*. Zapaženo je da kitozani sa relativno visokim stupnjem deacetilacije snažno stimuliraju proliferaciju fibroblasta, dok kitozani sa nižim stupnjem deacetilacije pokazuju slabiji učinak. Stimulativni učinak na proliferaciju fibroblasta zahtijevao je prisutnost seruma u mediju. Moguće objašnjenje je da se kitozan veže za komponente seruma poput heparina i faktora rasta pa ima indirektan učinak na cijeljenje rana. Otopina kitozana je na humane keratinocite imala inhibitorni učinak.

## 6. Zaključci

- U ovom radu lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom uspješno su pripravljene ionskom interakcijom između lecitina i kitozana. U pripravi nanočestica korištena su četiri tipa kitozana koja se međusobno razlikuju po molekulskoj masi (50-150 kDa ili 150-400 kDa) i/ili stupnju deacetilacije (75-90 % ili >90 %).
- Pripravljene su nanočestice srednjeg promjera od  $245,2 \pm 2,8$  do  $277,1 \pm 7,6$  nm, pozitivnog zeta-potencijala ( $23,4 \pm 0,9$  do  $32,5 \pm 1,2$  mV) te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina ( $3,8 \pm 0,3$  do  $4,3 \pm 0,4$  %).
- Veličina i površinski naboj nanočestica ovisili su o molekulskoj masi i stupnju deacetilacije kitozana.
- Za sve ispitivane lecitinsko-kitozanske nanočestice dobiveni su slični bifazični profili produljenog oslobađanja melatonina.
- Izlaganje HaCaT stanica suspenzijama nanočestica s melatoninom pri koncentraciji kitozana manjoj od  $20 \mu\text{gml}^{-1}$  nije značajnije utjecalo na vijabilnost stanica, neovisno o tipu korištenog kitozana. Pri tretiranju stanica otopinama kitozana manjeg stupnja deacetilacije značajno smanjenje vijabilnosti stanica uočeno pri koncentracijama kitozana od 10 i  $20 \mu\text{gml}^{-1}$ , dok je u slučaju kitozana većeg stupnja deacetilacije vijabilnost stanica značajno smanjena već pri koncentraciji kitozana od  $5 \mu\text{gml}^{-1}$ .
- Za razliku od otopina kitozana koje su usporavale cijeljenje (epitelizaciju) rane *in vitro*, suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica odgovarajuće koncentracije kitozana ubrzavale su navedeni proces. Učinak nanočestica na cijeljenje rane *in vitro* ovisio je o sadržaju melatonina u nanočesticama i tipu kitozana korištenom u njihovoj pripravi.
- Najbrže cijeljenje rane *in vitro* zabilježeno je kod modelne rane izložene nanočesticama s melatoninom pripremljenima s kitozonom manje molekulske mase (50-150 kDa) i većeg stupnja deacetilacije (>90 %).
- Primjenom *in vitro* modela rane omogućena je procjena i odabir nanočestica s najvećim potencijalnim učinkom na cijeljenje (epitelizaciju) rane, što predstavlja znanstveno vrijedan rezultat u području razvoja funkcionalnih obloga za rane. Daljnja procjena terapijskog potencijala nanosustava uključivat će ispitivanje učinka na migraciju i proliferaciju fibroblasta te ispitivanje antimikrobnog djelovanja.

## 7. Zahvale

*Neizmjerne hvala našoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na pruženoj prilici, znanju i brojnim savjetima te potpori i strpljenju prilikom izrade i pisanja ovog rada.*

*Veliko hvala doc. dr. sc. Jasmini Lovrić na strpljenju, savjetima i nesebičnoj pomoći koju nam je pružila.*

*Hvala Marini Juretić, mag. pharm. na velikoj podršci, pomoći i savjetima.*

*Hvala Biseri Jurišić, mag. pharm. i kolegicama Mariji Matičević i Mateji Ljubičić na pruženoj pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala svim članovima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.*

*Hvala našim bližnjima na bezuvjetnoj podršci.*

## 8. Popis literature

- [1] P. Sánchez i M. J. Segundo, »Omega 7«, *Nutrición*, svez. 26, br. 7, pp. 58-64, 2007.
- [2] I. Pepić, T. Sinovčić i J. Filipović-Grčić, "Hormonsko starenje kože," *Farmaceutski glasnik*, br. 67, pp. 11-26, 2011.
- [3] A. Hafner, Kitozansko-lecitinske nanočestice za nazalnu i (trans)dermalnu primjenu melatonina, Doktorski rad, Zagreb, 2008.
- [4] M. Čajkovac, *Kozmetologija*, 2. izdanje, Jastrebarsko: Naklada Slap, 2005.
- [5] A. C. Guyton i J. E. Hall, *Medicinska fiziologija*, 10. izdanje, Zagreb: Medicinska naklada, 2003.
- [6] P. E. Simon i A. D. Meyers, »Medscape.com«, 17 4 2014. [Mrežno]. Available: <http://emedicine.medscape.com/article/884594-overview>. [Pokušaj pristupa 13 3 2015].
- [7] M. Mercandetti i J. A. Molnar, »Medscape.com«, 12 3 2015. [Mrežno]. Available: <http://emedicine.medscape.com/article/1298129-overview#aw2aab6b6>. [Pokušaj pristupa 13 3 2015].
- [8] J. Drobnik, »Wound healing and the effect of pineal gland and melatonin«, *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, svez. 2, br. 1, pp. 3-14, 2012.
- [9] R. Hardeland, »Melatonin Metabolism in the Central Nervous System«, *Curr Neuropharmacol*, svez. 8, br. 3, p. 168–181, 2010.
- [10] R. Hardeland, S. R. Pandi-Perumal i D. P. Cardinali, »Melatonin«, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, svez. 38, pp. 313-316, 2006.
- [11] D. X. Tan, L. C. Manchester, M. P. Terron, L. J. Flores i R. J. Reiter, »One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?«, *J. Pineal Res.*, br. 42, pp. 28-42, 2007.
- [12] S. R. Pandi-Perumal, V. Srinivasan, G. J. Maestroni, D. P. Cardinali, B. Poeggeler i R. Hardeland, »Melatonin: Nature's most versatile biological signal?«, *FEBS J.*, br. 273, pp. 2813-2838, 2006.
- [13] S. Mao, J. Chen, Z. Wei, H. Liu i D. Bi, »Intranasal administration of melatonin starch microspheres«, br. 272, pp. 37-43, 2004.
- [14] R. Hardeland, »Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance«, *Endocrine*, svez. 27, br. 2, pp. 119-130, 2005.
- [15] Z. Chen, C. Chau, J. Gao, K. Chua, Y. Ho, R. Hamdy i B. Chua, »Prevention of ischemia/reperfusion induced cardiac apoptosis and injury by melatonin is independent of glutathione peroxidase 1«, *J Pineal Res*, br. 46, pp. 235-41, 2009.
- [16] M. Karbownik i R. Reiter, »Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation«, *Proc Soc Exp Biol Med*, br. 225, pp. 9-22, 2005.

- [17] M. Ozler, K. Simsek, C. Ozkan, E. O. Akgul, T. Topal, S. Oter i A. Korkmaz, »Comparison of the effect of topical and systemic melatonin administration on delayed wound healing in rats that underwent pinealectomy.,« *Scand J Clin Lab Invest.*, svez. 70, br. 6, pp. 447-52, 2010.
- [18] G. Soybir, C. Topuzlu, O. Odabaş, K. Dolay, A. Bilir i F. Köksoy, »The effect of melatonin on angiogenesis and wound healing,« *Surg. Today*, br. 33, pp. 896-901, 2003.
- [19] N. Bulbuller, O. Dogru, H. Yekeler, Z. Cetinkaya, N. Ilhan i C. Kirkil, »Effect of melatonin on wound healing in normal and pinealectomized rats,« *Journal of Surgical Research*, svez. 123, br. 1, pp. 3-7, 2005.
- [20] J. Drobniak i R. Dabrowski, »Melatonin suppresses the pinealectomy-induced elevation of collagen content in a wound.,« *Cytobios*, svez. 85, br. 340, pp. 51-8, 1996.
- [21] J. Drobniak, K. Owczarek, L. Piera, D. Tosik, S. Olczak, J. Ciosek i E. Hrabec, »Melatonin-induced augmentation of collagen deposition in cultures of fibroblasts and myofibroblasts is blocked by luzindole – a melatonin membrane receptors inhibitor,« *Pharmacological Reports*, svez. 65, br. 3, p. 642–649, 2013.
- [22] A. Carossino, A. Lombardi, M. Matucci-Cerinic, A. Pignone i M. Cagnoni, »Effect of melatonin on normal and sclerodermic skin fibroblast proliferation.,« *Clin Exp Rheumatol.*, svez. 14, br. 5, pp. 493-8, 1996.
- [23] J. Drobniak i R. Dabrowski, »The opposite effect of morning or afternoon application of melatonin on collagen accumulation in the sponge-induced granuloma.,« *Neuro Endocrinol Lett.*, svez. 21, br. 3, pp. 209-212, 2000.
- [24] K. Pugazhenthii i suradnici, »Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds,« *J Pineal Res.*, svez. 44, br. 4, pp. 387-396, 2008.
- [25] F. Radogna, M. Diederich i L. Ghibelli, »Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation,« *Biochemical Pharmacology*, svez. 80, br. 12, pp. 1844-1852, 2010.
- [26] M. Gómez-Florit, J. M. Ramis i M. Monjo, »Anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of melatonin on human,« *Biochemical Pharmacology*, svez. 86, br. 12, p. 1784–1790, 2013.
- [27] G. Sener, G. Sert, S. A. Ozer, S. Arbak, N. Gedik i G. Ayanoğlu-Dülger, »Melatonin protects against pressure ulcer-induced oxidative injury of the skin and remote organ in rats,« *J. Pineal Res.*, br. 40, pp. 280-287, 2006.
- [28] S. Sidhu, P. Pandhi, S. Malhotra, K. Vaiphei i K. L. Khanduja, »Melatonin treatment is beneficial in pancreatic repair process after experimental acute pancreatitis,« *European Journal of Pharmacology*, svez. 628, br. 1-3, p. 282–289, 2010.
- [29] O. F. Tekbas, R. Ogur, A. Korkmaz, A. Kilic i R. J. Reiter, »Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule.,« *J Pineal Res*, svez. 44, br. 2, pp. 222-6, 2008.

- [30] M. Rinaudo, »Chitin and chitosan: Properties and applications,« *Progress in Polymer Science*, svez. 31, br. 7, p. 603–632, 2006.
- [31] M. Saehum, E. A. Decker i J. McClements, »Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant–chitosan membranes,« *Journal of Colloid and Interface Science*, br. 296, pp. 581-590, 2006.
- [32] P. B. Malafaya, »Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications,« *Advanced Drug Delivery Reviews*, svez. 59, br. 4-5, pp. 207-233, 2007.
- [33] M. Saehum, E. A. Decker i J. McClements, »Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant–chitosan membranes,« *Journal of Colloid and Interface Science*, br. 296, pp. 581-590, 2006.
- [34] G. Meera i E. Abraham, »Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review,« *Journal of Controlled Release*, svez. 114, br. 1, pp. 1-14, 2006.
- [35] M. Juma, F. H. Furkertb i B. W. Müller, »A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan,« *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, svez. 53, br. 1, pp. 115-123, 2002.
- [36] G. Zhanyong i suradnici, »Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities in vitro,« *Carbohydrate Research*, svez. 341, br. 3, pp. 351-354, 2006.
- [37] G. Pujals i suradnici, »In vitro evaluation of the effectiveness and cytotoxicity of meglumine antimoniate microspheres produced by spray drying against *Leishmania infantum*,« *Parasitology Research*, svez. 102, br. 6, pp. 1243-1247, 2008.
- [38] T. Keana i M. Thanou, »Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan,« *Advanced Drug Delivery Reviews*, svez. 62, br. 1, pp. 3-11, 2010.
- [39] T. Minagawa, Y. Okamura, Y. Shigemasa, S. Minami i Y. Okamoto, »Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing,« *Carbohydrate Polymers*, svez. 67, br. 4, pp. 640-644, 2007.
- [40] R. W. Millner, A. S. Lockhart, H. Bird i A. C, »A new hemostatic agent: initial life-saving experience with Celox (chitosan) in cardiothoracic surgery,« *Ann Thorac Surg*, svez. 87, br. 2, pp. e13-e14, 2009.
- [41] S. Minami, Y. Okamoto i S. Tanioka, »Effects of chitosan on wound healing. In Carbohydrates and Carbohydrate Polymer,«, u *ATL Press*, Illinois, 1993.
- [42] T. Mori, M. Okumura, M. Matsuura, K. Ueno, S. Tokura, Y. Okamoto, S. Minami i T. Fujinaga, »Effect of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro,« *Biomaterials*, svez. 18, br. 13, pp. 947-51, 1997.

- [43] G. Peluso i suradnici, »Chitosan-mediated stimulation of macrophage function,« *Biomaterials*, svez. 15, br. 15, pp. 1215-1220, 1994.
- [44] G. I. Howling, P. W. Dettmar, P. A. Goddard, F. C. Hampson, M. Dornish i E. J. Wood, »The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin,« *Biomaterials*, svez. 22, pp. 2959-2966, 2001.
- [45] T. C. Santos, A. P. Marques, S. S. Silva, J. M. Oliveira, J. F. Mano, A. G. Castro i R. L. Reis, »In vitro evaluation of the behaviour of human polymorphonuclear neutrophils in direct contact with chitosan-based membranes,« *J Biotechnol.*, svez. 132, br. 2, pp. 218-226, 2007.
- [46] P. Niethammer, C. Grabher, T. A. Look i T. J. Mitchison, »A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish,« *Nature*, svez. 459, br. 7249, pp. 996-999, 2009.
- [47] K. Hensley, K. A. Robinson, S. P. Gabbita, S. Salsman i R. A. Floyd, »Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury,« *Free Radical Biology and Medicine*, svez. 28, br. 10, p. 1456–1462, 2000.
- [48] H. Yao, L. Guo, B. H. Jiang, J. Luo i X. Shi, »Oxidative stress and chromium(VI) carcinogenesis,« *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, svez. 27, br. 2, pp. 77-88, 2008.
- [49] H. Ueno, M. Murakami, M. Okumura, T. Kadosawa, T. Uede i T. Fujinaga, »Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes,« *Biomaterials*, svez. 22, br. 12, p. 1667–1673, 2001.
- [50] J. Sodek, B. Ganss i M. D. McKee, »Osteopontin,« *Crit Rev Oral Biol Med*, svez. 11, br. 3, pp. 279-303, 2000.
- [51] T. Dai, M. Tanaka, Y. Y. Huang i M. R. Hamblin, »Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects,« *Expert Rev Anti Infect Ther.*, svez. 9, br. 7, pp. 857-79, 2011.
- [52] L. Qi, »Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles,« *Carbohydrate Research*, svez. 339, br. 16, p. 2693–2700, 2004.
- [53] K. Xing, X. G. Chen, C. S. Liu, D. S. Cha i H. J. Park, »Oleoyl-chitosan nanoparticles inhibits *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane and putative binding to extracellular or intracellular targets,« *International Journal of Food Microbiology*, svez. 132, br. 2-3, pp. 127-133, 2009.
- [54] A. J. Huh i Y. J. Kwon, »"Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era,« *Journal of Controlled Release*, svez. 156, br. 2, p. 128–145, 2011.
- [55] H. Tang, P. Zhang, T. L. Kieft, S. J. Ryan, S. M. Baker, W. P. Wiesmann i S. Rogelj, »Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria,« *Acta Biomaterialia*, svez. 6, br. 7, p. 2562–2571, 2010.



- [56] R. Y. Pelgrift i A. J. Friedman, »Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance,« *Advanced Drug Delivery Reviews*, svez. 65, br. 13-14, p. 1803–1815, 2013.
- [57] R. C. Goy, D. de Britto i B. Odilio, »A review of the antimicrobial activity of chitosan,« *Polímeros*, svez. 19, br. 3, pp. 241-247, 2009.
- [58] R. C. Rowe, P. J. Sheskey i S. C. Owen, »Lecithin,« u *Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th edition*, London, Chicago, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2006, pp. 409-412.
- [59] U. Congress, »Infant formula act of 1980,« Public Law 96-359, 1980.
- [60] M. Imran, A.-M. Revol-Junelles, C. Paris, E. Guedon, M. Linder i S. Desobry, »Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin,« *LWT - Food Science and Technology*, svez. 62, br. 1, p. 341–349, 2015.
- [61] B. Mysliwa-Kurdziel, J. Kruk i K. Strzałka, »Protochlorophyllide and protochlorophyll in model membranes — An influence of hydrophobic side chain moiety,« *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, svez. 1828, br. 3, p. 1075–1082, 2013.
- [62] A. I. Pérez-Molina i suradnici, »Thermodynamics of laminarinase partitioning in soya lecithin liposomes and their storage stability,« *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, svez. 72, br. 1, p. 65–72, 2011.
- [63] Y. Tan, J. Qi, Y. Lu, F. Hu, Z. Yin i W. Wu, »Lecithin in mixed micelles attenuates the cytotoxicity of bile salts in Caco-2 cells,« *Toxicology in Vitro*, svez. 27, br. 2, p. 714–720, 2013.
- [64] »Drugs.com,« [Mrežno]. Available: <http://www.drugs.com/npc/lecithin.html>. [Pokušaj pristupa 8 4 2015].
- [65] J. H. Growdon, A. J. Gelenberg, J. Doller, M. J. Hirsch i W. R. J, »Lecithin can suppress tardive dyskinesia,« *N Engl J Med*, svez. 298, br. 18, pp. 1029-30, 1978.
- [66] K. Nagpal, S. K. Singh i D. N. Mishra, »Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery,« *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, svez. 58, br. 11, pp. 1423-30, 2010.
- [67] P. V. Baptista, G. Doria, P. Quaresma, M. Cavadas, C. Neves, I. Gomes, P. Eaton, E. Pereira i R. Franco, »Chapter 11 – Nanoparticles in Molecular Diagnostics,« *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, svez. 104, p. 427–488, 2011.
- [68] P. Talapan-Manikoth, T. E. Tungaraza i R. Jenkins, »The Role of Oral Controlled-Release Formulations in the Passage of Empty Intact Shells in Faeces,« *Ther Adv in Drug Safe*, svez. 4, br. 2, pp. 63-71, 2013.
- [69] C. Triller, D. Huljev i D. M. Smrke, »Primjena suvremenih obloga u liječenju kroničnih rana,« *Acta medica Croatica*, svez. 66, br. 1, pp. 65-70, 2012.

- [70] N. Mayet, Y. E. Choonara, P. Kumar, L. K. Tomar, C. Tyagi, L. C. Du Toit i V. Pillay, »A Comprehensive Review of Advanced Biopolymeric Wound Healing Systems,« *Journal of Pharmaceutical Sciences*, svez. 103, br. 8, pp. 2211-2230, 2014.
- [71] J. Bertoncelj, J. Pelipenko, J. Kristl, M. Jeras, M. Cukjati i P. Kocbek, »Development and bioevaluation of nanofibers with blood-derived growth factors for dermal wound healing,« *Eur J Pharm Biopharm*, svez. 88, br. 1, pp. 64-74, 2014.
- [72] J. Pelipenko, P. Kocbek, B. Govedarica, R. Rošic, S. Baumgartner i J. Kristl, »The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes,« *Eur J Pharm Biopharm*, svez. 84, br. 2, pp. 401-11, 2013.
- [73] L. Zhang, F. X. Gu, J. M. Chan, A. Z. Wang, R. S. Langer i O. C. Farokhzad, »Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments.,« *Clin Pharmacol Ther*, svez. 83, br. 5, pp. 761-9, 2008.
- [74] L. Zhang, D. Pornpattananangku, C. M. Hu i C. M. Huang, »Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery.,« *Curr Med Chem*, svez. 17, br. 6, pp. 585-94, 2010.
- [75] J. W. Costerton, P. S. Stewart i E. P. Greenberg, »Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.,« *Science*, svez. 284, br. 5418, pp. 1318-22, 1999.
- [76] K. Forier, K. Raemdonck, S. C. De Smedt, J. Demeester, T. Coenye i K. Braeckmans, »Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms.,« *J Control Release*, svez. 190, pp. 607-23, 2014.
- [77] E. Cevher, Z. Orhan, L. Mülazimoğlu, D. Sensoy, M. Alper, A. Yildiz i Y. Ozsoy, »Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres.,« *Int J Pharm*, svez. 317, br. 2, pp. 127-35, 2006.
- [78] R. Y. Pelgrift i A. J. Friedman, »Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance,« *Advanced Drug Delivery Reviews*, svez. 65, br. 13-14, p. 1803–1815, 2013.
- [79] A. J. Friedman, J. Phan, D. O. Schairer, J. Champer, M. Qin, A. Pirouz, K. Blecher-Paz, A. Oren, P. T. Liu, R. L. Modlin i J. Kim, »Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan-alginate nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens,« *J Invest Dermatol*, svez. 133, br. 5, pp. 1231-9, 2013.
- [80] J. Antonioua, F. Liua, H. Majeeda, J. Qia, W. Yokoyamab i F. Zhong, »Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan–tripolyphosphate nanoparticles,« *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, svez. 465, pp. 137-146, 2015.
- [81] L. Yin, D. J. C. He, L. Cui, C. Tang i C. Yin, »Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery,« *Biomaterials*, svez. 30, br. 29, p. 5691–5700, 2009.

- [82] A. Dube, J. A. Nicolazzo i I. Larson, »Chitosan nanoparticles enhance the intestinal absorption of the green tea catechins (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate,« *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, svez. 41, br. 2, pp. 219-225, 2010.
- [83] Y. Luo, Z. Teng, Y. Lib i Q. Wang, »Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake,« *Carbohydrate Polymers*, svez. 122, pp. 221-229, 2015.
- [84] A. K. Singla i M. Chawla, »Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update.,« *J Pharm Pharmacol.*, svez. 53, br. 8, pp. 1047-67, 2001.
- [85] D. Bento, H. F. Staats, T. Gonçalves i O. Borges, »Development of a novel adjuvanted nasal vaccine: C48/80 associated with chitosan nanoparticles as a path to enhanced mucosal immunity,« *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015.
- [86] Y. S. Chhonker, Y. D. Prasad, H. Chandasana, A. Vishvkarma, M. K. P. K. Shukla i R. S. Bhatta, »Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application,« *International Journal of Biological Macromolecules*, svez. 72, p. 1451-1458, 2015.
- [87] T. Gratieri, G. M. Gelfuso, O. de Freitas, E. M. Rocha i R. F. Lopez, »Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel,« *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, svez. 79, br. 2, p. 320-327, 2011.
- [88] M. C. Bonferoni, G. Sandri, E. Dellera, S. Rossi, F. Ferrari, M. Mori i C. Caramella, »Ionic polymeric micelles based on chitosan and fatty acids and intended for wound healing. Comparison of linoleic and oleic acid,« *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, svez. 87, br. 1, p. 101-106, 2014.
- [89] A. Gopal, V. Kant, A. Gopalakrishnan, S. K. Tandan i D. Kumar, »Chitosan-based copper nanocomposite accelerates healing in excision wound model in rats,« *European Journal of Pharmacology*, svez. 731, p. 8-19, 2014.
- [90] D. Archanaa, J. Dutta i P. K. Dutta, »Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies,« *International Journal of Biological Macromolecules*, svez. 57, p. 193-203, 2013.
- [91] D. Archana, B. K. Singh, J. Dutta i P. K. Dutta, »Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: In vitro and in vivo evaluation,« *International Journal of Biological Macromolecules*, svez. 73, p. 49-57, 2015.
- [92] M. B. N, R. T. A, G. T i G. M. Gelfuso, »Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles,« *Macromolecules*, svez. 75, p. 225-229, 2015.
- [93] J. J. Wang, Z. W. Zeng, R. Z. Xiao, T. Xie, G. L. Zhou, X. R. Zhan i S. L. Wang, »Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers,« *International Journal of Nanomedicine*, svez. 6, p. 765-774, 2011.

- [94] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna i T. M. Aminabhavi, »Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery,« *Journal of Controlled Release*, svez. 100, br. 1, p. 5–28, 2004.
- [95] J. H. Park i suradnici, »Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing hydrophobic moieties as carriers for doxorubicin: In vivo biodistribution and anti-tumor activity,« *Biomaterials*, svez. 27, br. 1, p. 119–126, 2006.
- [96] R. Hardeland, D. R. Cardinali, V. Srinivasan, D. W. Spence, G. M. Brown i S. R. Pandi-Perumal, »Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule,« *Progress in Neurobiology*, svez. 93, br. 3, p. 350–384, 2011.
- [97] A. Hafner, J. Lovrić, D. Voinovich i J. Filipović-Grčić, »Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers,« *International Journal of Pharmaceutics*, svez. 381, br. 2, p. 205–213, 2009.
- [98] L. Illum, »Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient,« *Pharm Res.*, svez. 15, br. 9, pp. 1326-31, 1998.
- [99] R. S. Bhatta, H. Chandasana, Y. S. Chhonker, C. Rathi, D. Kumar, K. Mitra i P. K. Shukla, »Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: In vitro and pharmacokinetics studies,« *Int J Pharm*, svez. 432, br. 1-2, pp. 105-12, 2012.
- [100] S. S. Chakravarthi i D. H. Robinson, »Biodegradable Nanoparticles,« *Pharmaceutical Manufacturing: Production and Processes*, pp. 535-564, 2008.
- [101] P. W. Lee, S. F. Peng, C. J. Su, F. L. Mi, H. L. Chen, M. C. Wei, H. J. Lin i H. W. Sung, »The use of biodegradable polymeric nanoparticles in combination with a low-pressure gene gun for transdermal DNA delivery,« *Biomaterials*, svez. 29, br. 6, pp. 742-751, 2008.
- [102] M. Luangtana-anan, P. Opanasopit, T. Ngawhirunpat, J. Nunthanid, P. Sriamornsak, S. Limmatvapirat i L. Y. Lim, »Effect of chitosan salts and molecular weight on a nanoparticulate carrier for therapeutic protein,« *Pharm Dev Technol*, svez. 10, br. 2, pp. 189-96, 2005.
- [103] A. Sarwar, H. Katas i N. M. Zin, »Antibacterial effects of chitosan–tripolyphosphate nanoparticles: impact of particle size molecular weight,« *Journal of Nanoparticle Research*, svez. 16, br. 7, p. 2517, 2014.
- [104] F. Sonvico, A. Cagnani, A. Rossi, S. Motta, M. T. Di Bari, F. Cavatorta, M. J. Alonso, A. Deriu i P. Colombo, »Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction,« *International Journal of Pharmaceutics*, svez. 324, br. 1, pp. 67-73, 2006.
- [105] C. Schatz, C. Pichot, T. Delair, C. Viton i A. Domard, »Static Light Scattering Studies on Chitosan Solutions: From Macromolecular Chains to Colloidal Dispersions,« *Langmuir*, svez. 19, br. 23, p. 9896–9903, 2003.
- [106] X. Liu, K. A. Howard, M. Dong, M. Ø. Andersen, U. L. Rahbek, M. G. Johnsen, O. C. Hansen, F. Besenbacher i J. Kjems, »The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing,« *Biomaterials*, svez. 28, br. 6, pp. 1280-8, 2007.

- [107] R. Novoa-Carballal, R. Riguera i E. Fernandez-Megia, »Chitosan hydrophobic domains are favoured at low degree of acetylation and molecular weight,« *Polymer*, svez. 54, br. 8, p. 2081–2087, 2013.
- [108] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J. E. Proust i J. P. Benoi, »Physico-chemical stability of colloidal lipid particles,« *Biomaterials*, svez. 24, br. 23, pp. 4283-300, 2003.
- [109] A. Hafner, A. Karković Marković, N. Ferić i J. Filipović-Grčić, »Oslobađanje lijekova iz koloidnih terapijskih sustava in vitro,« *Farmaceutski glasnik*, svez. 69, pp. 603-614, 2013.
- [110] M. Amidi, S. G. Romeijn, G. Borchard, H. E. Junginger i W. E. Hennink, »Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system,« *J Control Release*, svez. 111, br. 1-2, pp. 107-16, 2006.
- [111] P. Baldrick, »The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient,« *Regul Toxicol Pharmacol*, svez. 56, br. 3, pp. 290-9, 2010.
- [112] B. Carreño-Gómez i R. Duncan, »Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres,« *International Journal of Pharmaceutics*, svez. 148, br. 2, pp. 231-240, 1997.
- [113] S. Y. Chae, M. K. Jang i J. W. Nah, »Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans,« *J Control Release*, svez. 102, br. 2, pp. 283-94, 2005.
- [114] P. Opanasopit, P. Aumklad, J. Kowapradit, T. Ngawhiranpat, A. Apirakaramwong, T. Rojanarata i S. Puttipatkhachorn, »Effect of salt forms and molecular weight of chitosans on in vitro permeability enhancement in intestinal epithelial cells (Caco-2),« *Pharm Dev Technol*, svez. 12, br. 5, pp. 447-55, 2007.
- [115] C. Wiegand, D. Winter i U. C. Hipler, »Molecular-weight-dependent toxic effects of chitosans on the human keratinocyte cell line HaCaT,« *Skin Pharmacol Physiol*, svez. 23, br. 3, pp. 164-70, 2010.
- [116] A. Hafner, J. Lovrić, M. Duvnjak Romić, M. Juretić, I. Pepić, B. Cetina-Čižmek i J. Filipović-Grčić, »Evaluation of cationic nanosystems with melatonin using an eye-related bioavailability prediction model,« *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015.
- [117] M. Huang, E. Khor i L.-Y. Lim, »Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation,« *Pharmaceutical Research*, svez. 21, br. 2, pp. 344-353, 2004.
- [118] M. Shrimanker, Patel, N, H. Modi i R. Dave, »A review: Screening Models for Wound Healing Activity in Animals,« *American Journal of PharmTech Research*, svez. 3, br. 3, pp. 237-251, 203.
- [119] B. S. Nagoba, N. M. Suryawanshi, B. Wadher i S. Selkar, »Acidic Environment and Wound Healing: A Review,« *WOUNDS*, svez. 27, br. 1, pp. 5-11, 2015.

- [120] I. A. Alsarra, »Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds,« *Int J Biol Macromol*, svez. 45, br. 1, pp. 16-21, 2009.
- [121] F. Felice, Y. Zambito, E. Belardinelli, A. Fabiano, T. Santoni i R. Di Stefano, »Effect of different chitosan derivatives on in vitro scratch wound assay: A comparative study,« *International Journal of Biological Macromolecules*, svez. 76, pp. 236-241, 2015.
- [122] M. H. El-Shabouri, »Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A,« *Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A*, svez. 249, br. 1-2, p. 101–108, 2002.
- [123] R. Jayaraman, »Antibiotic resistance: An overview of mechanisms and a paradigm shift,« *Curr. Sci.*, svez. 96, br. 11, pp. 1475-1484, 2009.
- [124] K. Blecher, A. Nasir i A. Friedman, »The growing role of nanotechnology in combating infectious disease,« *Virulence*, svez. 2, br. 5, pp. 395-401, 2011.
- [125] A. J. Friedman, G. Han, M. S. Navati, M. Chacko, L. Gunther, A. Alfieri i J. M. Friedman, »Sustained release nitric oxide releasing nanoparticles: Characterization of a novel delivery platform based on nitrite containing hydrogel/glass composites,« *Nitric Oxide*, svez. 19, br. 1, pp. 12-20, 2008.
- [126] M. Juma, F. H. Furkertb i B. W. Müller, »A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan,« *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, svez. 53, br. 1, pp. 115-123, 2002.
- [127] M. L. W. Knetsch i L. H. Koole, »New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles,« *Polymers*, svez. 3, br. 1, pp. 340-366, 2011.
- [128] H. Kobayashi, A. Kromminga, T. W. Dunlop, B. Tychsen, F. Conrad, N. Suzuki, A. Memezawa, A. Bettermann, S. Aiba, C. Carlberg i R. Paus, »A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors,« *FASEB J.*, br. 19, pp. 1710-1712, 2005.
- [129] C. M. Lotufo, C. E. Yamashita, S. H. Farsky i R. P. Markus, »Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4,« *Eur. J. Pharmacol.*, br. 534, pp. 258-263, 2006.
- [130] P. B. Malafaya, »Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications,« *Advanced Drug Delivery Reviews*, svez. 59, br. 4-5, pp. 207-233, 2007.
- [131] G. Meera i E. Abraham, »Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review,« *Journal of Controlled Release*, svez. 114, br. 1, pp. 1-14, 2006.
- [132] D. O. Schairer, J. S. Chouake, J. D. Nosanchuk i A. J. Friedman, »The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents,« *Virulence*, svez. 3, br. 3, p. 271–279, 2012.

- [133] M. Tetsuo, S. P. Markey i I. J. Kopin, »Measurement of 6-hydroxymelatonin in human urine and its diurnal variations,« *Life Sciences*, svez. 27, br. 2, pp. 105-109, 1980.
- [134] Z. Guo, R. Chen, R. Xing, S. Liu, H. Yu, P. Wang, C. Li i P. Li, »Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities in vitro,« *Carbohydrate Research*, svez. 341, br. 3, pp. 351-354, 2006.

## 9. Sažetak

### Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na cijeljenje rane *in vitro*

Filip Blažević, Tamara Milekić, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ključne riječi: kitozan, melatonin, lecitin, nanočestice, cijeljenje rane *in vitro*

Cilj ovog istraživanja je priprava nanočestica kitozana i melatonina za topikalnu primjenu te evaluacija njihovog učinka na cijeljenje (epitelizaciju) rane *in vitro* u ovisnosti o sadržaju uklopljenog melatonina i svojstvima kitozana. Najnovija istraživanja u okviru razvoja funkcionalnih obloga temelje se na primjeni (bio)polimera s učinkom na cijeljenje rana, primjerice kroz utjecaj na migraciju i proliferaciju stanica kože, antimikrobni učinak te hemostatsko djelovanje. Razvijaju se polimerni terapijski nanosustavi koji mogu pridonijeti procesu cijeljenja ovisno o sadržaju djelatne tvari, polimernom sastavu i specifičnim fizičko-kemijskim svojstvima.

U ovom radu lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom uspješno su pripravljene ionskom interakcijom između lecitina i kitozana. U pripravi nanočestica korištena su četiri tipa kitozana koja se međusobno razlikuju po molekulskoj masi (50-150 kDa ili 150-400 kDa) i/ili stupnju deacetilacije (75-90 % ili >90 %). Pripravljene su nanočestice srednjeg promjera od  $245,2 \pm 2,8$  do  $277,1 \pm 7,6$  nm, pozitivnog zeta-potencijala ( $23,4 \pm 0,9$  do  $32,5 \pm 1,2$  mV) te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina ( $3,8 \pm 0,3$  do  $4,3 \pm 0,4$  %). Veličina i površinski naboj nanočestica ovisili su o molekulskoj masi i stupnju deacetilacije kitozana. Za sve ispitivane lecitinsko-kitozanske nanočestice dobiveni su slični bifazični profili produljenog oslobađanja melatonina. Izlaganje stanica suspenzijama nanočestica s melatoninom pri koncentraciji kitozana manjoj od  $20 \mu\text{gml}^{-1}$  nije značajnije utjecalo na vijabilnost stanica, neovisno o tipu korištenog kitozana. Pri ispitivanju cijeljenja (epitelizacije) rane *in vitro*, modelna rana predstavljena je oštećenjem konfluentnog sloja HaCaT stanica, a cijeljenje rane proliferacijom i migracijom stanica. Za razliku od otopina kitozana koje su usporavale cijeljenje (epitelizaciju) rane *in vitro*, suspenzije lecitinsko-kitozanskih nanočestica odgovarajuće koncentracije kitozana ubrzavale su navedeni proces. Učinak nanočestica na cijeljenje rane *in vitro* ovisio je o sadržaju melatonina u nanočesticama i tipu kitozana korištenom u njihovoj pripravi. Najbrže cijeljenje rane *in vitro* zabilježeno je kod modelne rane izložene nanočesticama s melatoninom pripremljenima s kitozansom manje molekulske mase (50-150 kDa) i većeg stupnja deacetilacije (>90 %). Primjenom *in vitro* modela rane izvršen je probir sustava s najvećim potencijalnim učinkom na epitelizaciju rane. Daljnja procjena terapijskog potencijala nanosustava uključivat će ispitivanje učinka na migraciju i proliferaciju fibroblasta te ispitivanje antimikrobnog djelovanja.



## 10. Summary

### **Influence of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles on wound healing *in vitro***

Filip Blažević, Tamara Milekić, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Key words: chitosan, melatonin, lecithin, nanoparticles, wound healing *in vitro*

The aim of this study was to prepare chitosan based nanoparticles suitable for topical melatonin delivery and to evaluate their influence on wound healing (epithelisation) *in vitro* in relation to melatonin content and chitosan properties. The latest trends in functional wound dressings development are focused on (bio)polymers with the potential to improve wound healing, influencing migration and proliferation of skin cells, having antimicrobial or haemostatic activity. Innovative delivery nanosystems can improve wound healing process depending on the content of the active compound, polymeric composition and physico-chemical properties.

Melatonin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles were successfully prepared by ionic interaction between lecithin and chitosan. Four types of chitosan used differed in molecular weight (50-150 kDa or 150-400 kDa) and/or deacetylation degree (75-90 % or >90 %). Nanoparticles had mean diameter ranging between  $245,2 \pm 2,8$  -  $277,1 \pm 7,6$  nm, positive zeta-potential ( $23,4 \pm 0,9$  do  $32,5 \pm 1,2$  mV) and sufficient melatonin entrapment ( $3,8 \pm 0,3$  do  $4,3 \pm 0,4$  %). Size and surface charge depended on molecular weight and deacetylation degree of chitosan. For all lecithin/chitosan nanoparticles prepared similar biphasic prolonged release profiles were obtained. Cells treatment with melatonin-loaded nanoparticles at chitosan concentration lower than  $20 \mu\text{gml}^{-1}$  induced no decrease in cell viability, regardless of the type of chitosan used. In wound healing (epithelisation) studies, *in vitro* scratch test was employed. Wound healing was assayed through cell proliferation and migration. Opposite to chitosan solutions which impaired wound healing process *in vitro*, lecithin/chitosan nanoparticles suspension of corresponding chitosan concentration improved the mentioned process. Influence of nanoparticles on wound healing *in vitro* depended on melatonin content and type of chitosan used in the nanoparticles preparation. The fastest wound healing was observed in case of model wound treated with melatonin-loaded nanoparticles prepared with chitosan of lower molecular weight (50-150 kDa) and higher deacetylation degree (>90 %). *In vitro* wound model allowed the selection of the nanoparticles with the highest therapeutic potential in relation with wound epithelisation. Further evaluation of nanosystems therapeutic potential will include investigation of their effect on fibroblast migration/proliferation and antimicrobial activity.