

Univerza v Ljubljani



UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARAH SIRI BLEJC

**VREDNOTENJE ALTERNATIVNIH METOD TESTU DRAIZE PRI
DOLOČANJU VPLIVA NANOMATERIALOV NA DRAŽENJE
OČESA**

**ASSESSMENT OF ALTERNATIVE METHODS TO THE DRAIZE
TEST BY DETERMINING THE EYE IRRITATION PROPERTIES OF
NANOMATERIALS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Ljubljana, 2016

Raziskovalni del magistrske naloge sem opravljala na Freie Universität Berlin na inštitutu za farmacijo pod somentorstvom prof. dr. Monike Schäfer-Korting, pisanje naloge pa sem nadaljevala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina.

Za strokovno pomoč, stalno pripravljenost za obrazložitve in usmerjenje pri izvedbi raziskovalnega dela ter pri izvedbi magistrske naloge se iskreno zahvaljujem doc. dr. Žigi Jakopinu, dr. Vivian Kral in prof. dr. Moniki Schäfer-Korting. Iskreno se zahvaljujem tudi ostalim članom inštituta za farmacijo v Berlinu za pomoč pri delu in predvsem prof. dr. Saši Baumgartner za odlično koordinacijo v času opravljanja raziskovalnega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina in somentorstvom prof. dr. Monike Schäfer-Korting.

Sarah Siri Blejc

Komisija za zagovor magistrske naloge:

Predsednica: prof. dr. Julijana Kristl

Mentor: doc. dr. Žiga Jakopin

Članica: asist. dr. Jasna Omersel

VSEBINA

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1 UVOD	1
1.1. TOKSIKOLOŠKO VREDNOTENJE	1
1.1.1. RAZVOJ TOKSIKOLOŠKEGA VREDNOTENJA	1
1.1.2. ZAKONI IN UREDBE ZA TOKSIKOLOŠKA TESTIRANJA	2
1.2. TOKSIKOLOŠKE RAZISKAVE	3
1.2.1. STRATEGIJE PRIZKUŠANJA TOKSIČNOSTI NA MESTU NANOSA SNOVI	4
1.2.3. RAZVOJ STRATEGIJ STOPENJSKEGA TESTIRANJA	10
1.3. DOSTAVNI SISTEMI UČINKOVIN IN NANOMATERIALI	11
1.3.1. TOKSIKOLOŠKA NEVARNOST NANOPRIPRAVKOV	12
2 NAMEN	13
3 MATERIALI, NAPRAVE IN MEDIJI ZA OBRAVNAVANE METODE	14
4 EKSPERIMENTALNI DEL	17
4.1. METODA PRIVZEMA NEVTRALNO RDEČE (NRU)	17
4.1.1. PRIPRAVA BIOLOŠKEGA MATERIALA IN VZORCEV	17
4.1.2. DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI IZBRANIH SPOJIN.....	20
4.2. METODA RDEČIH KRVNIČK (RBC)	23
4.2.1. PRIPRAVA BIOLOŠKEGA MATERIALA IN VZORCEV	23
4.2.2. DOLOČANJE HEMOLIZE IN DENATURACIJE CELIČNIH PROTEINOV	25
4.3. METODA ZA DOLOČANJE MOTNOSTI IN PERMEABILNOSTI ROŽENICE GOVEDA (BCOP)	28
4.3.1. PRIPRAVA BIOLOŠKEGA MATERIALA IN VZORCEV	28
4.3.2. DOLOČANJE MOTNOSTI IN PERMEABILNOSTI ROŽENICE.....	31
5 REZULTATI IN DISKUSIJA	33
5.1. METODA PRIVZEMA NEVTRALNO RDEČE (NRU)	33
5.2. METODA RDEČIH KRVNIČK (RBC)	43
5.3. METODA ZA DOLOČANJE MOTNOSTI IN PERMEABILNOSTI ROŽENICE GOVEDA (BCOP)	51
6 SKLEP	61
7 LITERATURA	63
8 PRILOGE	67

POVZETEK

Za preizkušanje akutnega potenciala draženja in korozivnosti kemikalij na oko se od leta 1981 uporablja Draizov test, ki temelji na uporabi albino zajcev. V zadnjih dveh desetletjih je zaradi pomanjkljivosti Draizovega testa tako iz znanstvenega kot tudi etičnega vidika ter tudi na podlagi prepovedi testiranja kozmetičnih izdelkov na živalih prišlo do povečanega povpraševanja po razvoju in validaciji alternativnih metod. Ker sta draženje in korozivnost kemikalij rezultat kompleksnih toksičnih reakcij v očesnem tkivu, je pri *in vitro* testiranju potrebno upoštevati različne mehanizme toksičnosti. Do danes še niso razvili in validirali samostojne alternativne metode, ki bi popolnoma nadomestila Draizov test, zato regulatorni organi predlagajo strategijo stopenjskega testiranja z združevanjem različnih *in vitro* metod. Namen našega dela je bil na podlagi validacije treh *in vitro* alternativnih metod Draizovemu testu določiti in ovrednotiti dražilni potencial etilceluloznega in večplastnega dendrimernega nanoprenašalca, ki ju raziskujejo kot dostavna sistema učinkovin za lokalno uporabo. Oba prenašalca, ki bi ju potencialno lahko uporabljali v klinične namene, smo preizkušali pri 0,050% in 0,005%-ni vsebnosti na fibroblastih Balb/c 3T3, izoliranih rdečih krvničkah in roženici goveda.

V naši raziskovalni nalogi smo ugotovili, da pri metodi privzema barvila nevtralnno rdeče, kjer smo kot testni sistem uporabljali fibroblaste celične linije Balb/c 3T3, nismo dokazali citotoksičnosti nanoprenašalcev. Pri metodi rdečih krvničk, nanoprenašalca prav tako nista izkazala ne hemolitičnega učinka niti nista povzročila denaturacije proteinov. Pri metodi določanja motnosti in permeabilnosti roženice goveda, ki je zakonsko validirana metoda (brez potrebnega nadaljnega testiranja) za določanje tako resnih dražilcev kot tudi snovi, ki ne povzročajo draženja, nanoprenašalca nista povzročila ne motnosti roženice kot tudi ne izgube vloge epitelija pri roženici.

Z rezultati meritev smo tako ugotovili, da etilcelulozni in večplastni dendrimeri nanoprenašalec v preizkušanih koncentracijah ne povzročata draženja očesa in bi se potencialno lahko uporabljala v nadaljnjih poskusih kot dostavna sistema učinkovin za lokalno uporabo.

Ključne besede: Draizov test, alternativne *in vitro* metode, draženje očesa, nanoprenašalci.

ABSTRACT

Since 1981 the Draize eye irritation test based on the use of albino rabbits has been used to test the acute potential of the irritation and corrosiveness of the chemicals in the eye. Due to deficiencies of this test pertaining to both the scientific and ethical points of view in the last two decades and also due to the ban on testing of cosmetic products on animals in 2013, an increased demand for the development and validation of alternative *in vitro* test methods to the Draize test has emerged. Irritation as well as corrosion potential of chemicals are a result of complex toxic reactions in the eye tissue, thus it is necessary to consider various toxic mechanisms while conducting the *in vitro* testing. To date, no developed and validated alternative test method is capable of fully replacing the *in vivo* Draize eye irritation test, for this reason the regulatory authorities suggest a tiered testing approach combining different *in vitro* methods.

The purpose of our work was to identify and evaluate the irritation and corrosion potential of the ethyl cellulose and dendritic core-multishell nanocarriers, that are investigated as drug delivery systems for local use, by the assessment of three *in vitro* methods to simulate the Draize eye test. Both nanocarriers, which could be potentially used for clinical purposes, were tested in 0.050% and 0.005% amount using fibroblasts Balb/c 3T3, isolated red blood cells and bovine corneas as test systems.

Nanocarriers did not cause any cytotoxic effects in the neutral red uptake test employing the fibroblast cell line Balb/c 3T3 system. Moreover, in the red blood cell test, in which case isolated red blood cells were used, nanocarriers did not show any haemolytic effect nor did they cause protein denaturation. Finally, the results of the bovine corneal opacity and permeability test, validated for determining serious eye irritants as well as for determining substances not causing irritation, without the need for further testing, showed that the nanocarriers did not cause corneal opacity and the integrity-loss of the corneal epithelium.

Based on the obtained results we concluded that both ethyl cellulose as well as the dendritic core-multishell nanocarriers do not cause eye irritation in the tested concentrations and could be potentially used in further evaluation as drug delivery systems for local use.

Keywords: Draize test, alternative *in vitro* methods, eye irritation, nanocarriers.

SEZNAM OKRAJŠAV

- 3R: Nadomeščanje, zmanjševanje, izpopolnitev (angl. Replacement, Reduction, Refinement)
- BCL: Benzalkonijev klorid
- BCOP: Metoda za določanje motnosti in permeabilnosti roženice goveda (angl. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test)
- CLP: Uredba o razvrščanju, pakiranju in označevanju snovi (angl. classification, labelling and packaging of chemicals)
- COLIPA: Evropsko združenje proizvajalcev kozmetičnih izdelkov, izdelkov za osebno nego in dišav (angl. European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association)
- DB-ALM: Podatkovna baza alternativnih metod testiranju na živalih (angl. DataBase service on Alternative Methods to animal testing)
- DI: denaturacijski indeks
- DMEM: Dullbeccov modificiran Eaglov medij (angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- DMSO: dimetil sulfoksid
- DP: denaturacija proteinov
- ECHA: Evropska agencija za kemikalije (angl. European CHemical Agency)
- ECHA-NMWG: Delovna skupina za nanomateriale Evropske agencije za kemikalije
- EPA: Agencija za varstvo okolja (angl. European Protection Agency)
- EURL-ECVAM: Referenčni laboratorij Evropske unije za alternative testiranju na živalih (angl. European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing)
- FDA: Urad za živila in zdravila (angl. Food and Drug Administration)
- FL: Metoda uhajanja fluoresceina (angl. Fluorescein Leakage Test)
- H₅₀: koncentracija testne snovi, ki povzroči lizo membrane 50% eritrocitov
- HBSS: Hanksova uravnotežena raztopina soli (angl. Hanks' Balanced Salt Solution)
- HTD: Najvišji toleriran odmerek (angl. Highest Tolerated Dosage)
- IC₅₀: koncentracija testne snovi, ki povzroči 50% inhibicijo biokemične reakcije
- ICE: Metoda izoliranega kokošjega očesa (angl. Isolated Chicken Eye Test)

- ICH: Mednarodna konferenca za harmonizacijo (angl. International Conference for Harmonization)
- IHCP: Inštitut za zdravje in varstvo potrošnikov (angl. Institute for Health and Consumer Protection)
- IND: Novo raziskovano zdravilo (angl. Investigational New Drug)
- IVIS: *in vitro* rezultat draženja (*in vitro* irritancy score)
- KB₅₀: koncentracija testne snovi, ki povzroči 50% vezavo kenacid modre na celične proteine
- LD₅₀: odmerek snovi, ki povzroči 50% smrtnost v populaciji v določenem času
- L/D: razmerje med hemolizo in denaturacijskim indeksom
- MEM: Minimalni esencialni medij (angl. Minimal Essential Medium)
- NBCS: Serum novorojenega teleta (angl. Newborn Calf Serum)
- NR: nilsko rdeče
- NRU: Metoda privzema nevtralnno rdečega (angl. Neutral Red Uptake Test)
- OECD: Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (angl. Organisation for Economic Co-operation and Development)
- PAS: površinsko aktivna snov
- PBS: Fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline)
- QSAR: Kvantitativni model razmerja med strukturo in aktivnostjo (angl. Quantitative Structure Activity Relationship)
- RBC: Metoda rdečih krvničk (Red Blood Cell Test)
- REACH: Uredba o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (angl. Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)
- SD: standardna deviacija
- SDS: Natrijev dodecil sulfat (angl. Sodium Dodecyl Sulphate)
- SEM: standardna napaka povprečja
- TER: Preskus transkutane električne upornosti (angl. Transcutaneous Electrical Resistance Test Method)
- UN GHS: Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (angl. United Nations' Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals)
- WHO: Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)

1 UVOD

1.1. TOKSIKOLOŠKO VREDNOTENJE

1.1.1. RAZVOJ TOKSIKOLOŠKEGA VREDNOTENJA

Toksikologija je veja znanosti, ki se ukvarja z neželenimi učinki snovi v živih organizmih. Toksikološke preiskave so pomembne pri razvijanju novih učinkovin, in sicer predvsem v predklinični fazi testiranja. Zgodovina toksikoloških raziskav se je začela s Paracelsusom (1493 – 1541), ki je trdil, da je odmerek tisti, ki določa razliko med terapevtskih in škodljivim učinkom kemikalije (1). Razmerje med strupi in njihovimi biološkimi značilnostmi je določil M. Orfila (1787 – 1853), ki je predstavil poškodbo specifičnih organov povzročeno s toksini. Uporaba živali v raziskavah toksičnosti se je začela 1920, ko je J. W. Trevan predlagal uporabo testa 50% letalnega odmerka (LD_{50}) za določanje letalnega odmerka kemikalij. Kmalu zatem je raziskovalec FDA (Food and Drug Administration) John Draize razvil metodo za testiranje dražilnega potenciala snovi za oči in kožo z uporabo albino zajcev, ki je bila nato splošno sprejeta za testiranje učinkov kemikalij in zdravilnih učinkovin na koži in očeh.

Na podlagi vse večje ozaveščenosti o škodljivih učinkih, ki jih lahko kemikalije povzročijo na ljudeh ali v okolju, so bili sprejeti različni zakoni in ustanovljene vladne agencije z namenom nadziranja proizvodnje in uporabe kemikalij. Škodljivi učinki sulfanilamida, protimikrobne učinkovine, ki se je uporabljal v raztopini etilenglikola, kar je povzročilo smrt velikega števila pacientov, so leta 1938 pripeljali do zaostritve zakonodaje in vpeljave nove uredbe - »U.S. Food and Drug Administration and Cosmetic Act« (2). Po letu 1960 so se zaradi povzročenih abnormalnosti pri rojstvu otrok zaradi uporabe talidomida, indiciranega med nosečnostjo proti jutranji slabosti, vse regulatorne agencije osredotočile na določanje toksikoloških profilov vseh farmacevtskih snovi. Uvedli so tudi obvezno vložitev toksikoloških profilov preiskovanih novih zdravil (IND). V poznih osemdesetih letih sta Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD) in Mednarodna konferenca za Harmonizacijo (ICH) objavili smernice za testiranje toksičnosti kemikalij (3), ki jih med drugim uporabljamo kot zdravila, industrijske kemikalije, fitofarmacevtska sredstva ter dodatke k živilom (4).

1.1.2. ZAKONI IN UREDBE ZA TOKSIKOLOŠKA TESTIRANJA

Leta 2007 je začela veljati REACH, uredba o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij, leto kasneje pa CLP, uredba o nevarnostih kemikalij na podlagi njihovega razvrščanja in označevanja. REACH so sprejeli z namenom izboljšanja varovanja človekovega zdravja in okolja pred tveganji, ki jih lahko povzročajo kemikalije ob naraščanju konkurenčnosti kemijske industrije v EU (4, 5). Od podjetij ali posameznikov, ki med svojimi industrijskimi ali poklicnimi dejavnostmi uporabljajo kemikalijo kot čisto snov ali v zmesi, zahteva, da informacije sporočajo Evropski agenciji za kemikalije (ECHA) ali proizvajalcem kemikalij (6). Z namenom zmanjšanja števila poskusov na živalih, uredba REACH spodbuja uporabo in razvoj alternativnih metod za oceno nevarnosti snovi (4).

Evropska komisija se je v dejavnosti, usmerjene v potrjevanje alternativnih pristopov k preizkusom na živalih vključila leta 1991, ko so ustanovili Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM), voden s strani Skupnega raziskovalnega središča, Inštituta za zdravje in varstvo potrošnikov (IHCP). Od leta 2011 so naloge dodelili referenčnemu laboratoriju Evropske unije za alternative testiranju na živalih (EURL-ECVAM). Njihova naloga je validacija metod, ki sledijo načelu 3R (replacement, reduction, refinement), torej zamenjave oziroma zmanjšanje števila živali ter izboljšanja pogojev testiranj za preizkušanje varnosti in testiranja učinkovitosti/jakosti kemikalij, bioloških zdravil in cepiv ter vodenje podatkovne baze alternativnih metod testiranju na živalih (DB-ALM). Spodbuja se razvoj in širjenje alternativnih metod in pristopov, njihova uporaba v industriji in sprejetje s strani regulativnih organov (7). Zunanji deležniki EURL-ECVAM so agencije in organizacije EU za dobrobit živali, organizacije potrošnikov in industrijskih združenj, med katere štejejo na primer ECHA, Evropsko kozmetično združenje (COLIPA), Svetovna zdravstvena organizacija (WHO), OECD v povezavi s smernicami za testiranje kemikalij in druge (8,9).

Marca 2013 je v EU vstopil v veljavo zakon za popolno prepoved testiranja kozmetičnih izdelkov na živalih, ki so ga pripravili pri EURL-ECVAM v sodelovanju z nekaterimi strokovnjaki že leta 2011 (8). Kljub temu da so uredbe in zakoni usmerjeni k minimizaciji uporabe živali in k nadomeščanju z alternativnimi preizkušnji, pa pri zdravilnih učinkovinah razmerje med koristjo in tveganjem še vedno zahteva preizkušanje na živalih z namenom ovrednotenja in razumevanja tveganja pred začetkom kliničnih raziskav na ljudeh.

1.2. TOKSIKOLOŠKE RAZISKAVE

Toksikološke raziskave izvajajo predvsem v predkliničnih raziskavah in jih načrtujejo z namenom vzpostavljanja vzročno-posledičnega razmerja med določeno snovjo in izmerjenim odzivom. V splošnem se te raziskave izvajajo v nadzorovanem okolju z uporabo specifičnega testnega sistema (*in vitro*, *in vivo*), kjer nato opazujejo in izmerijo učinek po izpostavljenosti razponu odmerkov kemične snovi. Toksikološke raziskave so lahko:

- kratkoročne (raziskave akutne toksičnosti), ki navadno trajajo manj kot 14 dni in ocenjujejo škodljive učinke, ki so lahko posledica enojne ali večkratne izpostavljenosti snovi v roku 24 ur in ki se lahko pojavijo po nezgodni ali namerni kratkotrajni izpostavljenosti, ali
- dolgoročne (raziskave kronične toksičnosti), kjer ocenjujejo potencial toksičnosti ponavljajočega odmerka, ki se pojavi kot posledica ponavljajoče dnevne izpostavljenosti snovi v delu pričakovane življenjske dobe (subakutna ali subkronična izpostavljenost) ali v večjem delu življenjske dobe (kronična izpostavljenost).

Pot izpostavljenosti je ponavadi dermalna, očesna, inhalacijska, peroralna ali intravenska. Med najpogostejše lokalne toksične učinke štejemo dermalno in očesno korozivnost in dražilnost, ki se določata po stopenjski ocenjevalni strategiji (OECD 404 in 405). Draženje in korozivnost spadata med lokalne učinke, pri katerih se sprememba pojavi na kraju ob prvem stiku snovi z očmi, kožo ali sluznico. Jedke snovi lahko ob stiku že ob prvi izpostavljenosti uničijo živo tkivo in povzročijo ireverzibilne učinke. Dražilne snovi uvrščamo med nejedke snovi, ki že ob prvi izpostavljenosti ob neposrednem stiku s tkivom povzročijo vnetje, a so povzročene spremembe reverzibilne (8).

Nekatere kemikalije povzročijo dražilni odziv šele po ponavljajoči izpostavljenosti (kumulativni dražilci), medtem ko druge povzročijo takojšnji dražilni odziv (akutni dražilci). Čeprav so kumulativni dražilci pogostejši od akutnih, se trenutni regulativni predpisi osredotočajo na oceno akutnega dražilnega potenciala kemikalij z namenom podpore pri obvladovanju tveganja, povezanega s proizvodnjo, obravnavo in transportom kemikalij in tudi možne izpostavljenosti akutnim dražilcem in korozivnim snovem v različnih izdelkih (9).

1.2.1. STRATEGIJE PRIZKUŠANJA TOKSIČNOSTI NA MESTU NANOSA SNOVI

Pred izvajanjem testiranja (*in vitro*, *in vivo*) za snovi, proizvedene v količini med 1 do 10 tonami letno, je glede na prilogo VII in VIII uredbe REACH potrebno izvesti korake, ki vsebujejo (4, 5):

- 1) Oceno vseh razpoložljivih podatkov, ki opisujejo vpliv snovi na ljudi in živali.
- 2) Oceno kislosti in bazičnosti. Opozoriti je treba, da lahko tudi druge značilnosti, kot so npr. pH, kažejo na dražilnost ali korozivnost snovi. Upoštevanje (Q)SAR ali primerjava s podobnimi poznanimi snovmi lahko služi v pomoč pri napovedi dražilnega potenciala na koži ali očesu (10).
- 3) *In vitro* in *in vivo* raziskave dražilnega potenciala na očeh ter *in vitro* in *in vivo* raziskave dražilnega in korozivnega potenciala na koži.

Koraka 3) ni potrebno izvajati, če:

- razpoložljivi podatki kažejo, da so izpolnjeni kriteriji za klasifikacijo snovi kot korozivne za kožo ali dražilne za oči, ali
- snov je spontano vnetljiva na zraku na sobni temperaturi, ali
- snov je klasificirana kot zelo toksična v kontaktu s kožo, ali
- raziskava akutne dermalne toksičnosti (OECD TG402) ne indicira draženja kože do mejnega odmerka (2000 mg/kg telesne teže).

1.2.1.1. IN VITRO STRATEGIJE PREIZKUŠANJA TOKSIČNOSTI NA MESTU NANOSA SNOVI

Draženje povzročeno na koži ali očesu je zelo poznana nevarnost kemikalij (11). Testiranje draženja kože in oči je pomembno pri pripravkih za lokalno uporabo. Že leta 1944 je Draize razvil in objavil standardizirane metode za oceno dražilnega/korozivnega potenciala kemičnih snovi (12). Tako še danes dermalne in oftalmološke pripravke testirajo z uporabo Draizovega testa.

Živali, ki kažejo trajne znake močnega trpljenja in/ali bolečine v katerikoli stopnji testa, se mora humano usmrtiti, testne snovi pa ustrezno oceniti (13).

1.2.1.1.1. In vivo Draizov test za preizkušanje korozivnosti/draženja kože

Test izvajajo na podlagi OECD smernice TG404 na zdravih mladih albino zajcih, nameščenih v laboratoriju pri 20 ± 3 °C z relativno vlago 50-60%, v katerem je izmenično 12 ur svetlo in 12 ur temno, z neprekinjeno oskrbo z vodo in standardno laboratorijsko dieto. Zajcem 24 ur pred izvajanjem testa na hrbtni strani trupa odstranijo kožuh in pri tem pazijo, da ne pride do drgnjenja in poškodbe kože. Testno kemikalijo nanesejo v enkratnem odmerku 0,5 mL tekočine ali 0,5 g trdne kemikalije na zdravo in nepoškodovano kožo (6 cm²), pri čemer netretiran del kože testne živali služi kot kontrola. Tekočine nanašajo nerazredčene, medtem ko je trdne snovi (lahko so uprašene) potrebno pred nanosom navlažiti z vodo ali drugo primerno tekočino, da omogočijo dober stik s kožo. Po času izpostavljenosti, ki normalno traja 4 ure, odstranijo preostalo snov in nato ocenijo učinek. Stopnjo draženja/korozije ocenijo in zabeležijo ob specifičnih časovnih intervalih in jo dodatno opišejo, da omogočijo natančno vrednotenje končnega učinka. Za oceno (i)reverzibilnosti učinka žival opazujejo še 14 dni po odstranitvi preveze. V primeru da reverzibilnost opazijo že prej, v tisti točki končajo s preizkusom. Ocena nastanka rdečine, razjed in otekline je predstavljena v preglednici I.

Končni točki:

Dermalno draženje: tvorba reverzibilne poškodbe kože v roku 14 dni, ki se kaže po nanašanju testne kemikalije po do 4 urah.

Dermalna korozija: ireverzibilna poškodba kože; vidna nekroza skozi vrhnjico v usnjico, ki se kaže po nanosu testne kemikalije po do 4 urah. Za korozivno reakcijo so značilne razjede, krvavitev, krvave rane, in po koncu opazovanja na 14. dan, razbarvanje kože, alopecija po celotni površini in brazgotina. Za oceno nejasnih lezij opazovano področje kože nato tudi histopatološko obravnavajo.

Preglednica I: Ocena nastanka rdečine, razjed in otekline (OECDTG 404 2015)

Nastanek rdečine in razjed		Nastanek otekline	
Brez rdečine	0	Brez otekline	0
Zelo rahla rdečina (komaj zaznavna)	1	Zelo rahla oteklina (komaj zaznavna)	1
Dobro definirana rdečina	2	Rahla oteklina (robovi predela otekline dobro definirani z določeno nabreklostjo)	2
Zmerna do močna rdečina	3	Zmerna oteklina (nabreklost cca 1 mm)	3
Močna rdečina (»beef redness«) do nastanka razjed, ki preprečujejo oceno rdečine	4	Močna oteklina (nabreklost večja od 1 mm in razširjanje otekline čez izpostavljeno površino)	4
Maksimalni izid: 4		Maksimalni izid: 4	

1.2.1.1.2. In vivo Draizov test za preizkušanje korozivnosti/draženja oči

Test izvajajo na podlagi OECD smernice TG405 prav tako na zdravih mladih albino zajcih, ki jih vzdržujejo v laboratoriju pri enakih pogojih kot pri preizkušanju korozivnosti/draženja kože. Po nanosu sistemskega analgetika in primerne lokalnega anestetika testirano kemikalijo v enkratnem odmerku nanesejo v eno izmed oči eksperimentalne živali, pri čemer netretirano oko služi kot kontrola. Pri testiranju tekočin nanašajo 0,1 mL odmerka, pri testiranju trdnih snovi pa 0,1 mL ali 100 mg uprašene snovi. Stopnjo korozije/draženja očesa ocenijo na podlagi vrednotenja lezije veznice, roženice in šarenice v specifičnih časovnih intervalih. Prav tako zabeležijo tudi ostale učinke v očesu in neželene sistemske vplive, da omogočijo lažje celostno vrednotenje končnih učinkov. Trajanje raziskave mora biti zadostno, da lahko ocenijo (i)reverzibilnost učinkov. Če se pri živali pojavijo trajni znaki trpljenja in/ali bolečine, je potrebno poskus nemudoma končati. Za oceno (i)reverzibilnosti žival opazujejo še 21 dni po nanosu testne snovi. V primeru da reverzibilnost nastopi prej kot v 21 dneh, poskus takrat končajo (14). Ocena poškodbe očesnega tkiva je predstavljena v preglednici II.

Končne točke:

Nedražilci: Snovi, ki niso razvrščene med EPA Kategorijo I, II ali III očesnih dražilcev; ali GHS dražilci oči 1, 2, 2A ali 2B; ali EU Kategorija 1 (15, 16, 17).

Dražilci: (a) Snov, ki povzroči reverzibilno spremembo v očesu; (b) snovi, ki so klasificirane v EPA Kategorijo II ali III očesnih dražilcev; ali GHS Kategorijo 2, 2A ali 2B; ali EU Kategorija 2 (15, 16, 17).

Močni dražilci: (a) Snov, ki povzroči poškodbo očesnega tkiva, ki ni odpravljena v 21 dneh po nanosu kemikalije ali povzroči resno poškodbo vida; (b) Snovi, ki so klasificirane v GHS Kategorijo 1; ali EPA Kategorijo 1; ali EU Kategorijo 1 (15, 16, 17).

Korozivne snovi: (a) Snov, ki povzroči ireverzibilno poškodbo tkiva; (b) snov, ki je po GHS klasificirana kot dražilec oči v Kategorijo 1, ali EPA Kategorijo 1, ali EU Kategorijo 1 (15, 16, 17).

Preglednica II: Ocena poškodbe očesnega tkiva (OECD TG 405 2012)

Roženica	
Motnost: stopnja gostote (beležimo odčitek iz najbolj zgoščene površine)*	
Brez razjede ali motnosti	0
Razpršena ali difuzna območja motnosti (razen rahlega običajnega leska); dobro vidne podrobnosti šarenice	1
Dobro razpoznavne prosojne površine; rahlo zamegljene podrobnosti šarenice	2
Nekrotična površina; brez vidnih podrobnosti šarenice; komaj zaznavna velikost zenice	3
Motna roženica: zaradi motnosti ni mogoče zaznati šarenice	4
*zabeležiti moramo površino motnosti	
Maksimalni izid: 4	
Šarenica	
Normalno stanje	0
Izrazito poglobljena guba, otekanje, zmerna hiperemija okoli roženice; šarenica se odziva na svetlobo (šibek odziv je znak za učinek)	1
Krvavitev, huda poškodba ali brez odziva na svetlobo	2
Maksimalni izid: 2	
Veznica	
Rdečica (nanaša se na veznico; izključuje roženico in šarenico)	
Normalno stanje	0
Nekaj hiperemičnih žilic	1
Difuzno, temno rdeče obarvanje; individualne žilice komaj razpoznavne	2
Difuzno ("beefy") rdeče obarvanje	3
Maksimalni izid: 3	
Oteklina	
Otekanje (nanaša se na veke in/ali na žmurko)	
Normalno stanje	0
Otekanje nad normalno ravnjo	1
Vidno otekanje z delnim izvihanjem vek	2
Otekanje z napol zaprtimi vekami	3
Otekanje z več kot polovično zaprtimi vekami	4
Maksimalni izid: 4	

V zadnjih dvajsetih letih je bil Draizov test deležen veliko kritik tako iz znanstvene strani kot tudi iz vidika etičnosti. Pri testu velikokrat opazajo tudi pomanjkanje ponovljivosti (12, 18). Kritika se nanaša tudi na subjektivno določanje in interpretacijo rezultatov na podlagi vizualnih opazanj. Metoda lahko zaradi uporabe velikih odmerkov in samega mesta nanosa (spodnja veka) preceni dejanski odziv v primerjavi s človeškim. Poleg tega pa je uporaba živali za testiranje postala glavna kritika organizacij za dobrobit živali in na podlagi že omenjene prepovedi testiranja kozmetičnih izdelkov na živalih prihaja do povečane uporabe alternativnih metod testiranja na živalih (13).

1.2.1.2. IN VITRO STRATEGIJE PREIZKUŠANJA TOKSIČNOSTI NA MESTU NANOSA SNOVI

V letu 2001 je Evropska komisija objavila dokument »White Paper« o politiki bodoče strategije testiranja kemikalij, ki je povsem spremenil tedanji režim: testiranje na živalih za oceno akutne toksičnosti kemikalij je bilo nadomeščeno z metodami, ki ne vključujejo živali (19, 20). Od leta 1991 do danes so validirali več alternativnih testnih metod za določanje korozivnega/dražilnega potenciala na kožo in oči, ki so bile validirane v okviru ECVAM in nato integrirane v uradne smernice.

1.2.1.2.1. PRIMERI IN VITRO TESTNIH STRATEGIJ

i) **Preglednica III: In vitro metode kot alternative Draize-ovemu testu za preizkušanje korozivnosti/draženja kože**

Metoda	Testni sistem	Končna točka	Klasifikacija GHS kategorije	Uporabnost in omejitve
Korozivnost kože				
OECDTG 431 (2004) - EPISKIN™ - EpiDerm™ - SkinEthic™ - epiCS®	Rekonstruirana človeška povrhnjica	Viabilnost celic (MTT test)	Korozivna ali nekorozivna snov Poleg tega EPISKIN™ zmožen ločiti med korozivi 1A in 1B	Ni uporaben za pline in aerosole. Pozornost pri testiranju močno obarvanih in/ali reaktivnih kemikalij zaradi potencialne interference z meritvami celične viabilnosti.
OECDTG 430 (2004) - Transkutani test električne upornosti (TER)	Izrezana koža podga-ne	Električna upornost	Korozivna ali nekorozivna snov	
OECDTG 435 (2006) - Corrositex®	Rekonstruiran kolagenski matriks	Barvna ali fizična sprememba indikatorja »sistem kemične detekcije«	Koroziv 1A, 1B ali 1C ali nekorozivna snov	Validiran za kisline, baze in njihovih derivatov. Vodne snovi, s pH vrednostjo med 4,5 in 8,5 niso klasificirane za testiranje.
Draženje kože				
OECDTG 439 (2010) - EPISKINTM SIT - EpiDerm™ EPI-200-SIT - SkinEthic™ SIT-42bis	Rekonstruirana človeška povrhnjica		Brez klasifikacije ali dražilec kože, Kat 2	Ni uporaben za pline in aerosole. Pozornost pri testiranju močno obarvanih in/ali reaktivnih kemikalij zaradi potencialne interference z meritvami viabilnosti.

ii) **Preglednica IV: In vitro metode kot alternative Draize-ovemu testu za preizkušanje draženja oči**

Metoda	Testni sistem	Končna točka	Klasifikacija GHS kategorije	Uporabnost in omejitve
Določanje resnih dražilcev oči				
OECDTG 437 (2009) - Metoda za določanje motnosti in permeabilnosti roženice goveda (BCOP)	Izolirana roženica kravjega očesa	Motnost in permeabilnost roženice	Pozitivni rezultati kažejo na resno poškodbo oči, klasifikacija Kat 1 Negativni rezultati zahtevajo nadaljnje testiranje	BCOP: Pozitivni rezultati pri testiranju alkoholov in ketonov morajo biti pazljivo interpretirani zaradi visoke lažne negativne stopnje. ICE: Pozitivni rezultati pri testiranju alkoholov morajo biti pazljivo interpretirani zaradi tveganja »overprediction« Visoka lažno negativna stopnja.
OECDTG 438 (2009) - Metoda z izoliranim kokošjim očesom (ICE)	Izolirano kokošje oko	Otekanje roženice, motnost roženice in retencija fluoresceina		FL: Uporabna za vodotopne snovi in zmesi. Visoka lažno negativna stopnja.
OECDTG 460 - Metoda prepustnosti fluoresceina (FL)	MDCK celice	Poškodba tesnih stikov MDCK celic		
Določanje nedražilnih snovi				
OECDTG 437 - BCOP	Izolirana roženica kravjega očesa	Motnost in permeabilnost roženice	BCOP: Negativni rezultati uvršajo snov v neklasificirano (GHS neklasificirano)	BCOP: Visoka lažno pozitivna stopnja.
DB-ALM Protokol N°46 Metoda Privzema Nevtralnno Rdeče (NRU)	Balb/c 3T3 celice	Celična viabilnost	Pozitivni rezultati zahtevajo nadaljnje testiranje NRU in RBC: Uporabljeni v sklopu stopenjskega testiranja	NRU: Neprimerna za snovi, nestabilne v vodi; odstopanja pri snoveh, ki specifično napadejo deljenje celic ali imajo lokaliziran učinek na lizosome/endosome. RBC: Uporabna za surfaktante in zmesi, ki jih vsebujejo.
DB-ALM Protokol No37 Metoda Rdečih Krvničk (RBC)	Izolirane rdeče krvničke iz goveje krvi	Hemoliza v kombinaciji z denaturacijo proteinov		

1.2.3. RAZVOJ STRATEGIJ STOPENJSKEGA TESTIRANJA

Medtem ko so do sedaj validirane testne *in vitro* metode za preizkušanje korozivnega potenciala na koži odobrili kot popolno nadomestitev testiranja na živalih, pa je situacija pri preizkušanju dražilnega potenciala na koži in očeh bolj kompleksna. Obstajajo validirane metode, ki so odobrene za napoved resnih dražilnih snovi (GHS Kat. 1) in metode, ki zaznajo snovi brez dražilnega potenciala (nekategorizirano po GHS). Vseeno pa še niso uspeli razviti samostojne validirane *in vitro* metode, ki bi lahko popolnoma nadomestila določanje dražilnega potenciala (GHS Kat. 2). Zato so leta 2005 pri EURL ECVAM predlagali stopenjsko strategijo testiranja za zmanjšanje ali nadomestitev Draizovega testa. Predlagani okvir (slika 1) temelji na alternativnih metodah za določanje dražilnega potenciala za oči, ki se razlikujejo v svoji kapaciteti/zmožnosti pri določanju bodisi resnih dražilnih kemikalij (GHS Kat. 1) ali kemikalij, ki nimajo dražilnega potenciala (GHS Brez kategorije). V kolikor se na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti ali drugih obstoječih informacij predpostavlja, da testirana kemikalija nima dražilnega potenciala ali je le-ta blag, testna shema predlaga tako imenovani »**bottom-up**« pristop, pri katerem se začne s testno metodo, ki lahko pravilno napove nedražilce, pri čemer se upošteva njeno lažno pozitivno ali negativno stopnjo. V primeru testne kemikalije za katero se upravičeno pričakuje, da ima resni dražilni potencial, pa se uporablja »**top-down**« pristop, ki se začne z metodo, ki pravilno napove resne dražilce oči (21, 22).



Slika 1: *In vitro* stopenjska strategija preizkušanja dražilnega potenciala snovi na očeh (Scot et al., 2010).

1.3. DOSTAVNI SISTEMI UČINKOVIN IN NANOMATERIALI

Dostavni sistemi učinkovin, ki se nanašajo na nanomedicino v farmacevtskem razvoju, so kompleksni sistemi v velikosti 10-1000 nm, sestavljeni iz najmanj dveh komponent, izmed katerih je ena farmacevtsko aktivna snov, čeprav so lahko možne že formulacije nanodelcev samih učinkovin (23, 24). Celoten sistem vodi v posebno funkcijo obravnave, preventive in diagnoze bolezni, pri katerem je primarni cilj raziskav:

- bolj specifično ciljanje in dostava učinkovine,
- zmanjšanje toksičnosti ob ohranjanju terapevtskega učinka,
- večja varnost in biokompatibilnost,
- hitrejši razvoj novih varnih zdravil (24, 25).

Glavni problem pri iskanju učinkovitih prenašalcev kot dostavnih sistemov učinkovin se nanaša na (i) vključevanje učinkovine in njenega sproščanja, (ii) doseganje stabilnosti in roka uporabnosti, (iii) biokompatibilnost, (iv) biodistribucijo in ciljanje ter (v) funkcionalnost. Nanodelci imajo specifične lastnosti, ki zadostujejo opisanim zahtevam, saj jim visoko razmerje med površino in maso omogoča vezavo, adsorpcijo in prenos učinkovin. Liposomi so klasični primeri nanoprenašalcev, ki so fleksibilni, biokompatibilni in lahko inkapsulirajo ter prenašajo tako hidrofobne kot tudi hidrofilne učinkovine. Novi materiali, ki vsebujejo različne polimere, v našem primeru etil celulozni nanoprenašalci, in dendrimeri v nanometrskih velikostih, se tudi uporabljajo pri inkapsuliranju in vezavi učinkovin (26, 27).

V primeru etilceluloznih nanoprenašalcev, ki smo jih uporabljali v velikosti 108 nm, je pri sintezi šlo za emulzijsko – difuzijsko metodo, pri kateri so kot polimer uporabili etilcelulozo, kot medij pa 2,5 % vodno raztopino polivinilalkohola. V primeru večplastnih dendrimernih nanoprenašalcev so pri sintezi kot glavne gradnike uporabili polietilenimin, dikarboksilno kislino in monometilni polietilenglikol. Preizkušani nanoprenašalci v velikosti 16 nm, s polarnim jedrom, nepolarno notranjo in hidrofilno zunanjo plastjo predstavljajo možnost inkapsuliranja velikega spektra učinkovin, od nepolarnih do ionskih in transporta le-teh tako v (ne)polarne organske medije kot tudi v vodne raztopine (27, 28). Vseeno je bilo do nedavnega na farmacevtskem trgu predstavljenih zgolj malo učinkovin vključenih v nanoprenašalne sisteme, kar se pripisuje omejeni stabilnosti in varnostnim razlogom omenjenih formulacij (28).

1.3.1. TOKSIKOLOŠKA NEVARNOST NANOPRIPRAVKOV

Kljub temu da nanomateriali zagotavljajo tehnične in komercialne priložnosti, pa lahko zaradi svojih edinstvenih značilnosti, ki so bolj poudarjene kot pri enakem materialu, ki ni nanometrskih velikosti, in vse večje uporabe v potrošniških izdelkih, predstavljajo tveganje za okolje ter vzbujajo zaskrbljenost v zvezi z zdravjem ljudi in živali (29, 30, 31). Številne raziskave opozarjajo na njihovo potencialno nevarnost zaradi njihovih unikatnih lastnosti, kot so izjemno velika površina in povečana reaktivnost (kemijska, električna, magnetna) (32). Zaradi njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti lahko nanomateriali spreminjajo celični privzem, vezavo proteinov, translokacijo do ciljne tarče in lahko potencialno povzročijo poškodbo tkiva (33).

Leta 2012 je agencija ECHA oblikovala delovno skupino za nanomateriale (ECHA-NMWG), ki je zadolžena za obravnavo znanstvenih in tehničnih vprašanj, povezanih s postopki iz uredb REACH in CLP, katere cilj je dialog z industrijo, kjer obravnavajo izkušnje, ki so jih pridobili pri dokumentaciji lastnosti nanooblik z uporabo najnovejših metod in obveznosti, ki jih mora izpolnjevati industrija v skladu z REACH (34).

Sicer REACH in CLP ne določata posebnih zahtev za nanomateriale, vendar pa so ti skladni z opredelitvijo snovi, zato zanje veljajo določbe obeh uredb. Tako, da je za razvoj novih nanomaterialov potrebno izvajati širok spekter *in vitro* in *in vivo* raziskav, da se lahko oceni potencialne toksične učinke po peroralni, topikalni ali inhalacijski izpostavljenosti (35).

2 NAMEN

Pri preizkušanju dražilnega potenciala kemikalij, zdravilnih učinkovin in drugih snovi za lokalno uporabo se v praksi vedno bolj uveljavljajo alternativne metode testiranja na živalih. Namen magistrske naloge bo z uporabo treh alternativnih metod Draizovemu testu določiti vpliv preizkušanih nanoprenašalcev na draženje očesa.

Prvi cilj naloge bo:

- Validacija metode privzema barvila nevtralnno rdeče (NRU) z določitvijo citotoksičnosti kemikalij SDS (natrijev dodecil sulfat), BCL (benzalkonijev klorid) in DMSO (dimetilsulfoksid), na podlagi določanja stopnje viabilnosti Balb/c 3T3 celic z merjenjem privzema barvila nevtralnno rdeče v žive celice in vsebnosti proteinov v celicah Balb/c 3T3 po vezavi raztopine barvila kenacid modro z mikrotitrskim čitalcem.
- Validacija metode rdečih krvničk (RBC) z uporabo kemikalij SDS in BCL, kjer bomo določali stopnjo hemolize in denaturacije proteinov z UV/VIS spektrofotometrom.
- Validacija metode za določanje motnosti in permeabilnosti roženice goveda (BCOP) z etanolom, raztopino NaCl, trikloroocetno kislino, etil 2-metilacetoacetatom, amonijevim nitratom in fenilbutazonom, kjer bomo z opacitometrom določali motnost ter z UV/VIS spektrofotometrom permeabilnost roženic.
- Rezultate bomo primerjali z vrednostmi, dobljenimi pri izvajanju Draizovega testa.

Drugi cilj naloge bo:

- Preizkušanje etilceluloznih nanoprenašalcev EC4CP z in brez vezanega lipofilnega barvila nilsko rdečega z uporabo vseh treh zgoraj omenjenih alternativnih metod (NRU, RBC, BCOP) Draizovemu testu.
- Preizkušanje večplastnih dendrimernih nanoprenašalcev C18 z vezanim lipofilnim barvilom nilsko rdeče z uporabo vseh treh zgoraj omenjenih alternativnih metod (NRU, RBC, BCOP) Draizovemu testu.

Tretji cilj naloge bo:

- Ovrednotenje dobljenih rezultatov in določanje dražilnega potenciala preizkušanih nanoprenašalcev.

3 MATERIALI, NAPRAVE IN MEDIJI ZA OBRAVNAVANE METODE

MATERIALI ZA OBRAVNAVANE METODE

- Dulbeccov modificiran Eaglov medij (DMEM, Sigma Aldrich, Nemčija)
- Glutamin (Biochrom, Nemčija)
- Serum novorojenega teleta (NBCS) (Biochrom, Berlin)
- Rastopina tripsin-EDTA (Flow Meckenheim, Nemčija)
- Rastopina 100I.U./ml penicilin/100μg/ml streptomycin (Flow Meckenheim, Nemčija)
- Barvilo nevtralnno rdeče (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Barvilo brilijantno modro R (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Etanol (VWR, Nemčija)
- Brezvodna očetna kislina (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Destilirana voda (Inštitut za farmacijo, Berlin)
- Dimetilsulfoksid (DMSO, čistota $\geq 99,9\%$, Carl Roth GmbH, Nemčija)
- Kalijev acetat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Natrijev dodecil sulfat (SDS) (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Benzalkonijev klorid (BCL) (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Barvilo nilsko rdeče (0,004% ABCR, Karlsruhe, Germany)
- Etilcelulozni nanoprenašalci EC4CP (ABCR, Karlsruhe, Germany)
- večplastni dendrimerni nanoprenašalci C18 $((PG_{10000}(NH_2)_{0.7}(C_{18}mPEG_6)_{1.0})$ (ABCR, Germany)
- Fosfatni pufer (PBS) s Ca^{2+} in Mg^{2+} (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Sestavine za izdelavo fosfatnega pufera s pH 7,4: NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Glukoza (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Hanksova uravnovežena raztopina soli (HBSS – Gibco by Life TechnologiesTM, USA)
- Minimalni esencialni medij (MEM - Gibco by Life TechnologiesTM, USA)
- MEM z indikatorjem fenol rdeče (Gibco by Life TechnologiesTM, USA)
- Natrijev fluorescein (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemčija)
- Trikloroocetna kislina (Sigma-Aldrich, Nemčija)

- Etil 2-metilacetoacetat (čistota 90%, Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Amonijev nitrat (Bernd Kraft, Nemčija)
- Fenilbutazon (Caesar&Loretz GmbH, Nemčija)
- Človeška kri (Rdeči Križ, Berlin, Nemčija)
- 3T3 Balb/c celice fibroblastov (Sigma-Aldrich, Taufenkirchen, Nemčija)
- Goveje oči (Klavnicca Rostock, Nemčija)

MEDIJI ZA TEST S PRIVZEMOM NEVTRALNO RDEČE IN VEZAVO KENACID MODRE

- **Medij za rutinsko gojenje celic:** 10% NBCS, 4 mM glutamin, 100 IU penicilin/100µg/mL streptomycin (440 ml DMEM, 50 ml NBCS, 5 ml penicilin/streptomycin, 5 ml glutamin)
- **Medij za tretiranje celic:** 5% NBCS, 4mM glutamin, 100 IU penicilin/100 µg/mL streptomycin (465 ml DMEM, 25 ml NBCS, 5 ml penicilin/streptomycin, 5 ml glutamin)
- **Medij za zamrzovanje celic:** 20% NBCS, 7-10% DMSO
- **Osnovna raztopina nevtralnno rdeče:** 0,05 g nevtralnno rdeče, 12,5 mL PBS s Ca^{2+} in Mg^{2+}
- **Medij za nevtralnno rdeče** (priprava neposredno pred izvajanjem metode in predhodno centrifugiranje 600×g 10 min pred nanosom na celice): 1 ml osnovne raztopine nevtralnno rdeče, 79 ml medija za tretiranje celic
- **Raztopina za desorpcijo nevtralnno rdečega:** 1 ml brezvodne oetne kisline, 50 ml etanola, 49 ml destilirane vode
- **Osnovna raztopina kenacid modro** (priprava neposredno pred izvajanjem metode): 0,05 g brilijantno modro R, 31,25 ml brezvodne oetne kisline, 78,75 ml destilirane vode
- **Raztopina kenacid modrega:** 88ml osnovne raztopine kenacid modro, 12 ml brezvodne oetne kisline
- **Raztopina za spiranje kenacid modrega:** 10% etanola, 5% brezvodne oetne kisline, 85% destilirane vode
- **Raztopina za desorpcijo kenacid modregega:** 98,15 g $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, 700 mL etanola, 300 mL destilirane vode

NAPRAVE ZA OBRAVNAVANE METODE

- Zračni inkubator za celične kulture (Unity Lab Services, Thermo Fisher, Nemčija)
- Faznokontrastni mikroskop (CK Olympus Tokyo)
- Čitalec mikrotitrskih ploščic (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Nemčija)
- Mešalnik za mikrotitrške plošče (Heidolph Titramax 100, Nemčija)
- Celični števec ali hemocitometer (VWR, Nemčija)
- Eppendorf pipete (1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl) (VWR, Nemčija)
- Posode za celične kulture (25 cm², 50 cm², 75 cm²) (VWR, Nemčija)
- Petrijevke (VWR, Nemčija)
- 96-kanalska mikrotitrška plošča za gojenje celic (TPP, Švica)
- Polietilenske vialne (1,5 ml) (VWR, Nemčija)
- Heraeus centrifuga (Omnifuge 2.0 RS, Heraeus instruments, Nemčija)
- Eppendorf centrifuga (Tip 5415 – Eppendorf instruments, Nemčija)
- UV/VIS spektrofotometer (WPA Biowave, Biochrom, Cambridge, UK)
- Kivete (VWR, Nemčija)
- Polikarbonatne centrifuge (10 ml) (VWR, Nemčija)
- Opacitometer (Kit, BASF-OP 3.0, Nemčija)
- Držalo za roženice (Kit, BASF-OP 3.0, Nemčija)

DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI

Citotoksični učinek nanoprenašalcev smo določali z metodo privzema barvila nevtralnno rdeče in vezave raztopine barvila kenacid modro po protokolu DB-ALM N°46, s katero smo ugotavljali viabilnost celic in celotno vsebnost proteinov celic 3T3 Balb/c. Metoda je podrobneje opisana v poglavju 4.1.

DOLOČANJE DRAŽILNEGA POTENCIALA

Za klasifikacijo dražilnega potenciala oči smo uporabili metodo za določanje motnosti in permeabilnosti roženice goveda (BCOP), ki smo jo izvajali po OECD smernici 437. Za kvantitativno določanje dražilnega potenciala smo uporabili testno metodo rdečih krvničk (RBC), ki smo jo izvajali po DB-ALM protokolu N°37. Metodi sta podrobneje opisani v poglavjih 4.2. in 4.3.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. METODA PRIVZEMA NEUTRALNO RDEČE (NRU)

4.1.1. PRIPRAVA BIOLOŠKEGA MATERIALA IN VZORCEV

GOJENJE CELIC Balb/c 3T3

Uporabili smo zamrznjene fibroblaste Balb/c 3T3 v zamrzovalnih vsebnikih, shranjenih v tekočem dušiku. Celice smo odtajali v vodni kopeli (37 °C) 3-5 minut. Ko so se celice odtalile, smo jih resuspendirali, prenesli v posodo za gojenje celic (uporabljali smo 3 različne velikosti posod: 25; 50; 75 cm²), dodali 10 mL medija za rutinsko gojenje (10% NBCS) in inkubirali v zračnem inkubatorju za celične kulture pri 37 °C in 5% CO₂ (po protokolu DB-ALM N°46 bi morali inkubacijo izvajati pri 37,5 °C in 7,5% CO₂, vendar je naš laboratorij zaradi preostalih istočasno izvajanih testov omogočal samo takšne pogoje). Ko so se celice pritrdile na dno (po približno 4 urah), kar smo preverjali s faznokontrastnim mikroskopom, smo supernatant odlili in ga nadomestili z 10 mL svežega medija (10% NBCS). Preden smo izvajali test citotoksičnosti smo celice dvakrat presejali v novo posodo za gojenje celic in dnevno pregledovali preraščenost celic pod faznokontrastnim mikroskopom.

PRESEJEVANJE CELIC Balb/c 3T3

Celice Balb/c 3T3 rutinsko rastejo v monosloju. Ko so se celice približevale preraščenosti, smo jih s tripsinizacijo odstranili iz posode. Postopek smo izvajali v aseptični komori z laminarnim pretokom zraka. Najprej smo odstranili medij in celično kulturo sprali s 7,5 mL PBS (brez Ca²⁺ in Mg²⁺) z nežnim stresanjem posode, da smo odstranili preostali serum, ki bi sicer lahko zaviral delovanje tripsina. Na celični monosloj smo dodali 2 mL raztopine tripsin-EDTA in celice inkubirali v zračnem inkubatorju 2 min pri 37 °C in 5% CO₂. Po protokolu bi morali zgolj 1 minuto, vendar se v tem času naše celice niso odcepile od podlage. Po inkubaciji smo posodo rahlo stresali po robovih, da so se celice uspešno ločile od posode in se dispergirale v suspenzijo, kar smo preverili s faznokontrastnim mikroskopom. Postopek smo nadaljevali v aseptični komori, kjer smo v posodo dodali 7,5 mL medija za rutinsko gojenje (10% NBCS), da smo deaktivirali tripsin (po protokolu bi ga morali dodati 5 mL, vendar smo mi dodali več raztopine tripsin-EDTA) in celotno

suspenzijo prenesli v 25 mL centrifugirko. Posodo smo sprali s 7,5 mL PBS (da smo pridobili še preostale celice) in suspenzijo dodali v centrifugirko. Celični monosloj smo z nežno tritracijo razpršili – pridobiti smo morali celično suspenzijo posameznih celic za točno celično štetje (glej štetje celic), kar je bilo potrebno za naslednji korak, kjer smo celice presajali v drugo posodo. Nastalo suspenzijo smo centrifugirali 5 min pri 200×g. Supernatant smo pazljivo odstranili in nato celični sediment resuspendirali v ustreznem volumnu svežega medija za gojenje celic, da smo dobili celično suspenzijo s koncentracijo 10⁵ celic/mL (opisano pri štetju celic). Celično suspenzijo smo nato prenesli v sveže gojitvene posode, v katere smo predhodno že odpipetirali ustrezen volumen svežega medija, tako da je bila končna koncentracija celic približno 10⁴-10⁵ celic/mL. Posode smo inkubirali pri 37 °C in 5% CO₂ in jih dnevno pregledovali s faznokontrastnim mikroskopom.

ŠTETJE CELIC

Po tripsinizaciji celic (opisano pri presejevanju celic) in dodatku medija ter spiranju s PBS in tritraciji smo iz dobljene homogene suspenzije odpipetirali 10 µL in vzorec nanegli na hemocitometer ter z uporabo faznokontrastnega mikroskopa prešteli celice. Nato smo z Enačbo 1 izračunali koncentracijo celic v vzorcu.

$$N = \frac{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4)}{4} \times F \quad \text{Enačba 1}$$

N.....število celic na mL vzorca

n_i.....število celic v posameznem kvadrantu hemocitometra

F.....faktor redčenja (10⁴)

Naš primer:

Volumen po tripsinizaciji (tripsin-EDTA, medij, PBS, celice) pred centrifugiranjem in odlitjem supernatanta = 20 mL → Odvzeli smo 10 µL in prešteli celice:

$$N = \frac{(24 + 20 + 29 + 20)}{4} \times 10^4 = 23,5 \times 10^4 \text{ celic/mL} \rightarrow \text{v } 20 \text{ mL} \rightarrow 4,70 \times 10^6 \text{ celic}$$

Po centrifugiranju in odstranitvi supernatanta smo celični suspenziji dodali 47 mL medija (10% NBCS), da smo dobili koncentracijo celic 10⁵ celic/mL, kar smo v naslednjem koraku uporabili za sejanje 96-kanalskih plošč in za presejevanje celic v nove posode za gojenje celic.

PRIPRAVA PROUČEVANIH RAZTOPIN

Pri metodi privzema nevtralnno rdeče smo poleg 0,05% in 0,005% nanoprenašalce testirali tudi pri 0,10%, in sicer z namenom proučevanja v večjem koncentracijskem območju.

SDS: 1) Osnovna raztopina: 4,15 mg SDS + 2,231 mL PBS → 0,16 % SDS
Priprava: faktor redčenja 1,6 z medijem (5% NBCS) : 0,1%, 0,063%, 0,039%, 0,024%, 0,015%, 0,01%, 0,006%, 0,004%)

2) Osnovna raztopina: 2,50 mg SDS + 2,156 mL PBS → 0,116% SDS
Priprava: faktor redčenja 1,65 z medijem (5% NBCS) : 0,070%, 0,042%, 0,026%, 0,0156%, 0,0094%, 0,0057%, 0,0035%)

BCL: 1) Osnovna raztopina: 90,82 mg BCL + 7,266 mL PBS → 1,23% BCL
Priprava: faktor redčenja 2,5 z medijem (5% NBCS): 0,5%, 0,2%, 0,08%, 0,032%, 0,0128%, 0,005%, 0,002%, 0,0008%)

2) Osnovna raztopina: 2,01 mg BCL + 8,133 mL PBS → 0,0248% BCL
Priprava: faktor redčenja 1,65 z medijem (5% NBCS) : 0,0150%, 0,0091%, 0,0055%, 0,0033%, 0,0020%, 0,0012%, 0,0007%, 0,0004%)

DMSO: 1) Osnovna raztopina: 1,7 mL 100% DMSO + 8,30 mL PBS → 17,0% DMSO
Priprava: faktor redčenja 1,70 z medijem (5% NBCS): 10,0%, 5,90%, 3,50%, 2,04%, 1,20%, 0,70%, 0,40%, 0,24%)

2) Osnovna raztopina: 2,475 mL 100% DMSO + 7,525 mL PBS → 24,75% DMSO
Priprava: faktor redčenja 1,65 z medijem (5% NBCS): 15,0%, 9,09%, 5,51%, 3,34%, 2,02%, 1,23%, 0,74%, 0,45%)

EC4CP: 1) 20 µL 5% EC4CP + 980 µL medija (5% NBCS) → 0,1% EC4CP
2) 10 µL 5% EC4CP + 990 µL medija (5% NBCS) → 0,05% EC4CP
3) 1 µL 5% EC4CP + 999 µL medija (5% NBCS) → 0,005% EC4CP

EC4CP-NR: 1) 20 µL 5% EC4CP + 980 µL medija (5% NBCS) → 0,1% EC4CP-NR
2) 10 µL 5% EC4CP + 990 µL medija (5% NBCS) → 0,05% EC4CP-NR
3) 1 µL 5% EC4CP + 999 µL medija (5% NBCS) → 0,005% EC4CP-NR

C18-NR: 1) 20 µL 5% C18-NR + 980 µL medija (5% NBCS) → 0,1% C18-NR
2) 10 µL 5% C18-NR + 990 µL medija (5% NBCS) → 0,05% C18-NR
3) 1 µL 5% C18-NR + 999 µL medija (5% NBCS) → 0,005% C18-NR

4.1.2. DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI IZBRANIH SPOJIN

Celicam v gojišču (1×10^5 celic/mL) smo dodali proučevano ratopino v naraščajočih koncentracijah (preglednica V) in po 24-urni inkubaciji izvedli najprej določanje privzema barvila nevtralnno rdeče v žive celice in neposredno za tem nadaljevali z določanjem vezave barvila kenacid modro na proteine celic Balb/c 3T3.

Torej, po štetju celic in dodatku ustrezne količine medija smo pripravili celično suspenzijo z gostoto 1×10^5 celic/mL v mediju za tretiranje celic (10% NBCS). Z uporabo multikanalnih pipet smo razdelili medij zgolj v obrobne vdolbine mikrotitrne plošče s 96 vdolbinami. V preostale vdolbine smo odmerili po 100 μ L celične suspenzije v celični koncentraciji (1×10^4 celic/mL). Ploščo smo nato inkubirali 24 ur pri 37 °C in 5% CO₂ do ~ 50% preraščenosti. Po 24-urni inkubaciji smo iz vdolbin odstranili medij in z uporabo multikanalnih pipet dodali v obrobne kanalčke po 100 μ L medija za tretiranje celic (5% NBCS) in v preostale vdolbine po 100 μ L medija (5% NBCS) z ustreznimi koncentracijami testne spojine. Pri nanosu testnih spojin smo uporabili 5% NBCS in ne 10% NBCS, saj je lahko toksičnost snovi prikrita s strani serumskih proteinov. Seruma pa ne smemo izključiti, saj je v njegovi odsotnosti celična rast močno zmanjšana ali je ni. Nato smo ploščo ponovno inkubirali 24 ur. Po 24 urah smo ocenili celice s faznokontrastnim mikroskopom in zabeležili vse spremembe v rasti celic na podlagi citotoksičnega učinka preizkušanih snovi in ocenili HTD (najvišji toleriran odmerek).

DOLOČANJE PRIVZEMA BARVILA NEVTRALNO RDEČE V ŽIVE CELICE Balb/c 3T3

Po 24-urni inkubaciji s proučevanimi raztopinami smo celice in obrobne vdolbine sprali s 100 μ L predhodno segretega (37 °C) PBS (s Ca²⁺ in Mg²⁺) in ga nato odstranili z rahlim udarjanjem ob pult. Potem smo dodali 100 μ L medija barvila nevtralnno rdeče in inkubirali 3 ure. Po inkubaciji smo odstranili medij in celice sprali s 100 μ L PBS (s Ca²⁺ in Mg²⁺). Nato smo dodali 150 μ L medija za desorpcijo barvila nevtralnno rdeče iz živih celic in ploščo stresali na mikrotitrskem mešalu 10 min, da se je barvilo nevtralnno rdeče ekstrahiralo. Sledila je meritev absorbance pri 540 nm na mikrotitrskem čitalcu (slika 2). Referenčni vzorec so predstavljale celice, ki niso bili tretirane s preizkušanimi snovmi. Priprava plošče je prikazana na preglednici V.

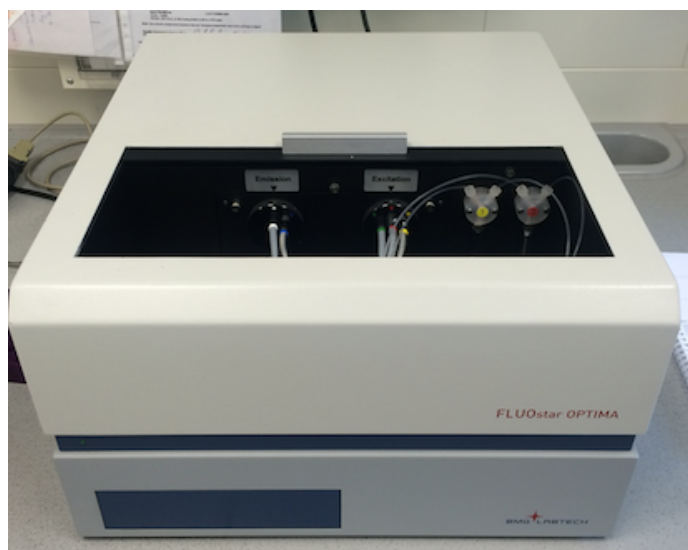
DOLOČANJE VEZAVE BARVILA KENACID MODRO NA PROTEINE CELIC Balb/c 3T3

Po merjenju vsebnosti privzema barvila nevtralnno rdeče smo odstranili desorpcijski medij in celice sprali s 100 μ L tega medija, ki smo ga nato odstranili. V naslednjem koraku smo dodali 100 μ L raztopine barvila kenacid modro in ploščo mešali na mikrotitrskem mešalu 10 min. Nato smo nevezano barvilo odstranili z dvakratnim spiranjem s 150 μ L raztopine za spiranje kenacid modro. Po drugem spiranju smo ploščo stresali na mikrotitrskem mešalu 10 min in jo nato 5 min s pospeškom 600 \times g centrifugirali, s čimer smo odstranili celoten ostanek raztopine za spiranje. Potem smo dodali 150 μ L raztopine za desorpcijo kenacid modrega in stresali 10 min, dokler se barvilo ni popolnoma ekstrahiralo iz celic in je prišlo do nastanka homogene raztopine. Vsebnost barvila smo nato izmerili na mikrotitrskem čitalcu pri 570 nm in kot referenco uporabili referenčni vzorec.

Preglednica V: Priprava mikrotitrške plošče; RV (referenčni vzorec-netretirane celice), Medij (10% NBCS pri prvi inkubaciji, 5% NBCS pri drugi), C1-C8 (celice, tretirane z različnimi koncentracijami)

Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij
Medij	RV	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	RV	Medij
Medij	RV	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	RV	Medij
Medij	RV	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	RV	Medij
Medij	RV	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	RV	Medij
Medij	RV	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	RV	Medij
Medij	RV	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	RV	Medij
Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij

Dobljene rezultate meritev smo primerjali z uporabljenim referenčnim vzorcem in jih podali kot relativni delež v procentih. Na podlagi grafa izdelanega s programom Graphpad Prism 5.0 smo določili končno točko IC₅₀ (koncentracija testne snovi, ki povzroči 50% inhibicijo privzema nevtralnno rdeče) in KB₅₀ (koncentracija testne snovi, pri kateri pride do 50% vezave raztopine barvila kenacid modro na celične proteine). Vse rezultate smo podali kot povprečja \pm standardne deviacije (SD). V obeh primerih testov, privzem nevtralnno rdečega in vezava kenacid modrega, smo uporabili rezultate dveh meritev na dveh različnih celičnih pasajah.



Slika 2: Čitalec mikrotitrskih ploščic (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Nemčija)

4.2. METODA RDEČIH KRVNIČK (RBC)

4.2.1. PRIPRAVA BIOLOŠKEGA MATERIALA IN VZORCEV

IZOLACIJA IN SHRANJEVANJE RDEČIH KRVNIČK

Kri, ki smo jo iz Rdečega križa (Berlin, Nemčija) prejeli v laboratorij, je bila že pripravljena v citratnem pufru (citratni pufer : kri = 1 : 10). Uporabljali smo človeško kri in ne goveje, kot sicer narekuje protokol N°37, saj je bila človeška kri potrebna tudi za druge poskuse izvajane v našem laboratoriju in je to omogočilo lažjo primerjavo in načeloma tudi bolj verodostojne rezultate. Najprej smo kri v centrifugirki centrifugirali 15 min pri 1500×g pri sobni temperaturi z namenom odstranitve pufra in plazme, ki smo jo pazljivo odstranili iz površine. Nato je sledilo 4-kratno spiranje s PBS, da smo odstranili preostanke plazme, belih krvničk in levkocitnega koncentrata («buffy coat»). Na koncu smo 10 mL alikvota rdečih krvničk shranili v polikarbonatnih vsebnikih, kamor smo dodali še 10 mM raztopino glukoze z namenom vzdrževanja rdečih krvničk in dobljeno suspenzijo RBC hranili v hladilniku pri 4 °C največ 4 tedne, saj naj bi po daljšem času prišlo do povečane osmotske nestabilnosti in odstopanj v meritvah.

OCENA CELOVITOSTI RDEČIH KRVNIČK

Pred vsakih testom smo preverili celovitost izoliranih RBC s tem, da smo testirali hemolizo, povzročeno s SDS, ki mora za sveže izolirane RBC na podlagi protokola DB-ALM N°37 znašati $29,4 \pm 3,7$ mg/mL.

PRIPRAVA PROUČEVANIH RAZTOPIN IN SUSPENZIJE RDEČIH KRVNIČK

Testne snovi smo raztopili, razredčili v PBS in jih za določanje hemolize pripravili v razponu 8 različnih koncentracij. V primeru določanja proteinske denaturacije smo osnovne raztopine pripravili v koncentraciji 1%.

SDS in BCL smo imeli na voljo kot trdno snov (100%), nanoprenašalce pa smo imeli na voljo v obliki 5% raztopin. Na podlagi protokola smo pri določanju stopnje hemolize uporabili testne snovi pri začetni koncentraciji 0,1%, pri določanju proteinske denaturacije pa pri začetni koncentraciji 1%. Priprava je prikazana na preglednici VI.

Preglednica VI: Priprava testnih snovi za metodo RBC

	Določanje proteinske denaturacije	Določanje hemolize
SDS	47,21 mg SDS + 4,7210 mL PBS	0,5 mL 1% SDS + 4,5 mL PBS
BCL	60,15 mg BCL + 6,015 mL PBS	0,5 mL 1% BCL + 4,5 mL PBS
EC4CP	0,5 mL 5% EC4CP + 2,5 mL PBS	0,5 mL 1% EC4CP + 4,5 mL PBS
EC4CP-NR	0,5 mL 5% EC4CP-NR + 2,5 mL PBS	0,5 mL 1% EC4CP-NR + 4,5 mL PBS
C18-NR	0,5 mL 5% C18-NR + 2,5 mL PBS	0,5 mL 1% C18-NR + 4,5 mL PBS

Priprava krvi:

Na podlagi protokola smo morali pripraviti ustrezno koncentracijo suspenzije RBC, ki bi naj znašala približno 8×10^9 celic/mL. Iz polikarbonatnega vsebnika, kamor smo shranili suspenzijo izoliranih RBC, smo odpipetirali 1 μ L v drugi vsebnik in dodali še 9999 μ L PBS. Dobljeno suspenzijo smo rahlo stresali, da je postala homogena, nato smo odpipetirali 10 μ L, vzorec nanесли na hemocitometer ter s faznokontrastnim mikroskopom prešteli celice. Nato smo z uporabo Enačbe 2 izračunali koncentracijo celic v vzorcu.

$$N = \frac{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4)}{4} \times F \times 10^4$$

Enačba 2

N.....število celic na mL vzorca

n_ištevilo celic v posameznem kvadrantu hemocitometra

F.....faktor redčenja (10^4)

Naš primer celičnega štetja:

1 μ L izoliranih rdečih krvničk + 9999 μ L PBS ($F = 10^4$)

Štetje celic:

$$N = \frac{(87 + 80 + 90 + 91)}{4} \times 10^4 \times 10^4 = 8,713 \times 10^9 / \text{mL}$$

Potrebno redčenje z 10 mM raztopino glukoze: 1:1,1

4mL izoliranih RBC + 0,4 mL raztopine glukoze $\rightarrow 8 \times 10^9$ rdečih krvničk/mL

4.2.2. DOLOČANJE HEMOLIZE IN DENATURACIJE CELIČNIH PROTEINOV

Po oceni celovitosti rdečih krvničk smo najprej izvajali določanje hemolize rdečih krvničk z nanosom 8 različnih naračajočih koncentracij testnih snovi v PBS (preglednica VII), nato smo nadaljevali z določanjem denaturacijskega indeksa povzročene s proučevano snovjo.

DOLOČANJE HEMOLIZE RDEČIH KRVNIČK

Pri metodi določanja hemolize smo testirali 8 različnih koncentracij testne snovi, in sicer v dveh poskusih v triplikatih ter s krvjo dveh različnih darovalcev (donor 1, donor 2). Na koncu smo določili koncentracijo testirane snovi, ki povzroči lizo 50% rdečih krvničk v vzorcu (H_{50}) z merjenjem absorbance sproščenega oksihemoglobina.

Najprej smo alikvotirali različne volumne testne snovi raztopljene v PBS v že vnaprej pripravljenih 9 reakcijskih vial (1,5 mL): 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 μL in vsako vialo dopolnili do 975 μL s PBS. V naslednjem koraku smo v vsako vialo hitro alikvotirali po 25 μL suspenzije rdečih krvničk, ki je vsebovala približno 8×10^9 celic/ml. Postopek je ponazorjen na preglednici VII. Pripravili smo tudi vzorca za prikaz 100% in ničelne vrednosti hemolize (slednji je služil tudi kot kontrola). Pripravljene viale smo inkubirali 10 min pri sobni temperaturi in jih medtem pustili mešati na mikrotitrskem mešalcu. Inkubacijo smo nato prekinili s centrifugiranjem vial pri 10000 rotacij/min. Nastali supernatant smo iz vsake viale posebej dekantirali v posamezne kivete in izmerili absorbanco pri 560 nm proti kontroli.

- kontrola in ničelna vrednost hemolize: 25 μL RBC + 975 μL PBS
- 100 % vrednost hemolize: 25 μL RBC + 975 μL destilirane vode

Preglednica VII: Priprava testnih snovi za določanje hemolize

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
0,1% testna snov v PBS (μL)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
PBS (μL)	975	965	955	945	935	925	915	905	895
RBC (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25

DOLOČANJE DENATURACIJSKEGA INDEKSA RDEČIH KRVNIČK

Pri metodi določanja denaturacijskega indeksa (DI) smo stopnjo denaturacije proteinov, povzročeno s testirano snovjo, določali v triplikatih v dveh poskusih s krvjo dveh različnih darovalcev (donor 1, donor 2). Na koncu smo izračunali denaturacijski indeks testirane snovi z merjenjem absorbance denaturiranega oksihemoglobina.

Najprej smo alikvotirali 100 μL testirane snovi v 1,5 mL vialo in dodali 975 μL PBS. V naslednjem koraku smo hitro alikvotirali 25 μL suspenzije RBC v kateri je bilo približno 8×10^9 celic/mL. Pripravljene viale smo inkubirali 10 min pri sobni temperaturi in jih medtem pustili mešati na mikrotitrskem mešalcu. Inkubacijo smo nato prekinili s centrifugiranjem vial pri 10000 rotacij/min. Nastali supernatant smo dekantirali v posamezne kivete in izmerili absorbanco pri 540 in 575 nm proti kontroli (enaka kot pri testu hemolize), kar smo morali izvesti hitro zaradi možnosti upočasnitve reakcije. Izmerjeni absorbanci smo med seboj delili z namenom izračuna razmerja alfa/beta (z uporabo Enačbe 3), ki karakterizira denaturacijski indeks hemoglobina.

$$DI (\%) = 100 \times \frac{(R_1 - R_i)}{(R_1 - R_2)} \quad \text{Enačba 3}$$

DI...denaturacijski indeks

R_1 ...razmerje A_{575}/A_{540} značilno za oksihemoglobin ($1,05 \pm 0,001$)

R_2 ... razmerje A_{575}/A_{540} značilno za razmerje za interni standard SDS

R_i ...razmerje A_{575}/A_{540} testirane snovi

Po končanem določanju hemolize smo na podlagi grafa izdelanega s programom Graphpad Prism 5.0 izračunali H_{50} in rezultat podali kot povprečje dveh meritev \pm standardne deviacije (SD). Po končanem določanju denaturacije proteinov smo izračunali DI, ki smo ga uporabili za primerjavo z dražilnim potencialom oči pridobljenim z *in vivo* testom. Na koncu smo izračunali razmerje med H_{50} in DI, ki smo ga definirali kot razmerje liza/denaturacija (L/D), in smo ga uporabljali za primerjavo z *in vivo* podatki ter z njim ovrednotili dražilni potencial testirane snovi na podlagi preglednice VIII.

$$L/D = \frac{H_{50}}{DI} \quad \text{Enačba 4}$$

Preglednica VIII: Primerjava podatkov *in vivo* in razmerja L/D

<i>In vivo</i> draženje oči	<i>In vitro</i> razmerje L/D
Nedražilec	> 100
Rahel dražilec	> 10
Zmeren dražilec	> 1
Dražilec	> 0,1
Močan dražilec	< 0,1

4.3. METODA ZA DOLOČANJE MOTNOSTI IN PERMEABILNOSTI ROŽENICE GOVEDA (BCOP)

4.3.1. PRIPRAVA BIOLOŠKEGA MATERIALA IN VZORCEV

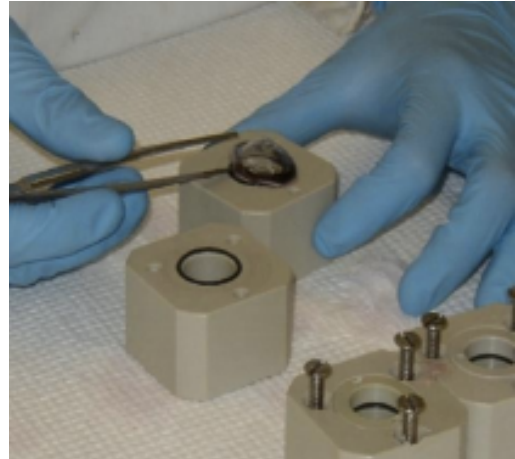
Biološki material (oči goveda) je bil zbran v klavnici Rostock in med transportom do našega inštituta (Inštitut za farmacijo FU Berlin) shranjen v ohlajeni Hanksovi uravnoveženi raztopini soli (HBSS), kamor smo dodali penicilin in streptomycin z namenom zmanjšanja možnosti kontaminacije. Ves biološki material je bil zbran na isti dan. Pred uporabo smo oči pazljivo ocenili in zavrgli tiste, ki so imele na roženici vidne napake, kot so: praske, neovaskularizacija in povečana motnost. Za vsako testno skupino (testirana snov, pozitivna in negativna kontrola) smo potrebovali po 3 oči.

IZOLACIJA ROŽENICE

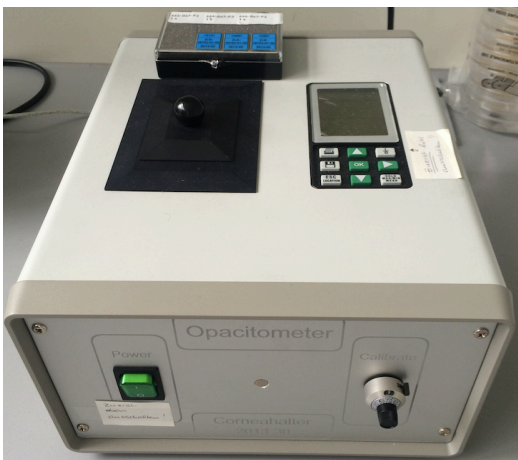
Roženice, pri katerih nismo opazili površinskih napak, smo izolirali z uporabo škarij, skalpela in pincete, in sicer tako, da smo roženico izrezali in pri tem zraven pustili še 2-3 mm beločnice (slika 3). Izolirane roženice smo pazljivo sprali z raztopino HBSS, v kateri smo jih do naslednjega koraka testa tudi shranili. V naslednjem koraku smo roženice namestili v držalo za roženice – s stranjo z epitelijem obrnjeno proti sprednjemu prekatu in endotelijsko stran proti zadnjemu prekatu (slika 4). Prekata držala smo zaprli in z vijaki pričvrstili. Oba prekata (najprej zadnjega) smo nato napolnili z brizgo s predhodno segretim (37 °C) Eaglovim minimalnim esencialnim medijem (EMEM) in pri tem pazili, da se v notranjost prekatov niso ujeli mehurčki. Tako pripravljena držala z izoliranimi roženicami smo 1 uro inkubirali v zračnem inkubatorju pri 32 ± 1 °C (temperatura na površini roženice je približno 32 °C), da so se roženice uravnovesile z medijem in dosegle normalno metabolično aktivnost. Med časom inkubacije smo kalibrirali opacitometer (slika 5), s katerim smo v naslednjih korakih merili motnost roženic.



Slika 3: Izolacija roženice (36)



Slika 4: Nameščanje roženice v držalo (36)



Slika 5: Opacitometer Kit BASF-OP3.0 (Inštitut za farmacijo, FU Berlin)

Opacitometer smo kalibrirali z uporabo treh overjenih steklenih filtrov (Duratec, Nemčija), ki imajo uravnovešene, dobro definirane in overjene absorpcijske lastnosti. Naš primer kalibracije opacitometra:

Preglednica IX: Kalibracija opacitometra

Stekleni filtri	Sprejemljivo območje meritev (15.04.2015)	Motnost	
		Začetna	Končna
Prazen	990 - 1100	1003	1001
F2	540 - 560	546	547
F3	300 - 310	304	304
F4	95 - 105	95	95

Po končani inkubaciji smo iz prekatov držala odstranili medij (najprej iz sprednjega) in ga nadomestili s svežim ter nato z opacitometrom izmerili motnost roženic. Vse roženice,

katerih izmerjena motnost je presegala 7 enot motnosti, smo zavrgli. Roženice, ki so glede na meritve motnosti ustrezale, smo ločili na skupine po 3 oči – za proučevano snov, pozitivno in negativno kontrolo – ter jih ustrezno označili za boljšo preglednost. Pred nanosom testnih snovi smo odstranili medij iz sprednjega prekata držala.

PRIPRAVA PROUČEVANIH SPOJIN

Etanol: 100% etanol

Trikloroocetna kislina: 15 mg smo raztopili v 5 mL destilirane vode

Etil 2-metilacetoacetat: 90% raztopina

Fenilbutazon: uporabljali smo v trdni obliki (prah)

Amonijev nitrat: uporabljali smo v trdni obliki (prah)

EC4CP: 1) 50 μ L osnovne 5% raztopine + 5 mL PBS \rightarrow 0,05% EC4CP

2) 10 μ L 0,5% EC4CP + 4,5 mL PBS \rightarrow 0,005% EC4CP

EC4CP-NR: 1) 50 μ L osnovne 5% raztopine + 5 mL PBS \rightarrow 0,05% EC4CP-NR

2) 10 μ L 0,5% EC4CP-NR + 4,5 mL PBS \rightarrow 0,005% EC4CP-NR

C18-NR: 1) 50 μ L osnovne 5% raztopine + 5 mL PBS \rightarrow 0,05% C18-NR

NANOS PROUČEVANIH SPOJIN

Uporabljali smo dva različna postopka, in sicer enega za tekočine in površinsko aktivne snovi (PAS) (trdne in tekoče), drugega pa za trdne snovi, ki niso PAS.

- Tekočine (tudi kreme, voski) smo testirali nerazredčene, PAS pa v koncentraciji 10% w/v v 0,9% raztopini NaCl ali v destilirani vodi. V sprednji prekat smo nanašali po 750 μ L raztopine in inkubirali 10 min v zračnem inkubatorju pri 32 °C. Držala smo med inkubacijo obrnili horizontalno, tako da smo omogočili stik proučevane snovi z roženico. Pri preizkusu tekočin ali PAS smo kot pozitivno kontrolo uporabili 100% etanol in kot negativno destilirano vodo ali 0,9% raztopino NaCl.
- Trdne snovi (ne PAS) smo testirali v 20% w/v raztopini razredčene v destilirani vodi ali 0,9% NaCl. Pri tem postopku smo se posluževali metode »odprtega prekata«, kar pomeni, da smo pri nanosu testne snovi (750 μ l oz. dovolj, da pokrijemo roženico) odstranili stekelce iz zgornjega prekata in nanесли snov neposredno na roženico. Po nanosu smo prekat pokrili s stekelcem in obnovili metodo »zaprtega prekata« (kot pri tekočinah in PAS) in v zračnem inkubatorju pri 32 °C inkubirali 4 ure.

4.3.2. DOLOČANJE MOTNOSTI IN PERMEABILNOSTI ROŽENICE

Po nanosu proučevanih spojin in ustrezni inkubaciji (10min za tekočine in 4 ure za trdne snovi) smo nadaljevali z določevanjem motnosti roženic z opacitometrom. Neposredno po tem smo dodali Na-fluoresceinat in po 90-minutni inkubaciji določili permeabilnost roženic z UV/VIS spektrofotometrom.

POSTOPEK PO INKUBACIJI

Po določenem času inkubacije smo proučevane snovi, pozitivno (etanol) in negativno (destilirana voda) kontrolo odstranili iz sprednjega prekata, čemur je sledilo trikratno spiranje epitelija z EMEM (slika 6), ki je vseboval indikator fenol rdeče, ki nam je pomagal pri določanju učinkovitosti spiranja – če je indikator po treh spiranjih ostal razbarvan (rumen v kislini, vijoličen v bazi), smo roženico spirali več kot trikrat. V primeru trikloroocetne kisline je ostal indikator po trikratnem spiranju še vedno obarvan rahlo rumeno, zato smo morali epitelij spirati štirikrat. Ko v indikatorju nismo več opazili barvne spremembe, smo roženice še enkrat sprali z EMEM, ki ni vseboval indikatorja in nato sprednji prekat ponovno napolnili z EMEM brez indikatorja.

Po spiranju in končnemu dodatku EMEM smo roženice, na katerih smo preizkušali tekočine ali PAS, inkubirali 2 uri v zračnem inkubatorju pri 32 °C. Roženice, ki smo jih obravnavali s trdnimi snovmi (ne PAS), pa po spiranju in končnem dodatku EMEM niso več potrebovale dodatne inkubacije.

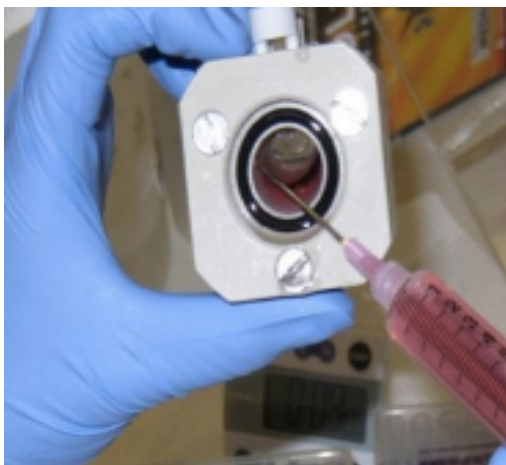
DOLOČANJE MOTNOSTI ROŽENICE

Po koncu dodatne inkubacije za tekočine in PAS in prvotne inkubacije za trdne snovi (ne PAS) smo z opacitometrom izmerili motnost roženic, ki se določa s količino svetlobe, ki prehaja skozi roženico, in podaja v enotah motnosti.

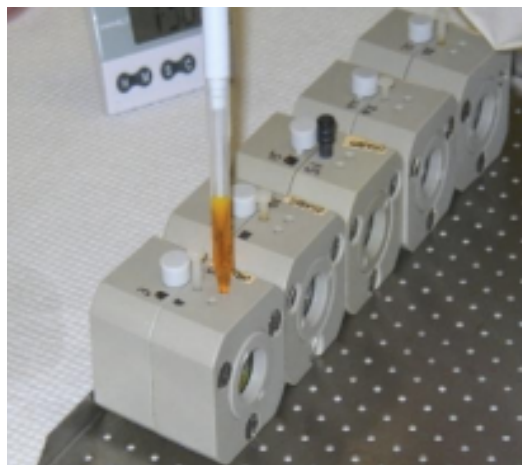
DOLOČANJE PERMEABILNOSTI

Po opravljenem merjenju motnosti roženic smo odstranili medij iz obeh prekatov (najprej iz sprednjega) in nato ponovno napolnili zadnji prekat s svežim EMEM. Sprednji prekat smo napolnili z 1 mL raztopine Na-fluoresceinata (4 mg/mL v primeru tekočih/PAS testnih snovi ali 5 mg/mL v primeru trdnih snovi) (slika 7). Tako pripravljena držala roženic smo ponovno inkubirali za 90 min v zračnem inkubatorju pri 32 °C, pri čemer smo držala

ponovno obrnili horizontalno, da smo omogočili stik z roženico in potencialno prehajanje Na-fluoresceinata skozi epitelij roženice. Po inkubaciji, smo izmerili permeabilnost, ki je določena s količino Na-fluoresceinata, ki prehaja skozi epitelij roženice, kar smo izmerili z UV/VIS spektrofotometrom pri 540 nm.



Slika 6: Spiranje testnih snovi z EMEM, ki je vseboval indikator fenol rdeče (36)



Slika 7: Nanos raztopine Na-fluoresceinata (36)

Po izmerjeni motnosti in permeabilnosti roženic smo s programom Graphpad Prism 5.0 in z uporabo Enačbe 5 izračunali *in vitro* izid motnosti in permeabilnosti IVIS in ga podali kot povprečje vseh meritev \pm standardne deviacije (SD).

$$\text{IVIS} = \text{povprečna vrednost motnosti} + (15 \times \text{povprečna OD490vrednost}) \quad \text{Enačba 5}$$

Na podlagi izračunane vrednosti IVIS smo testirano snov klasificirali po GHS kategorijah na podlagi preglednice X.

Preglednica X: Primerjava vrednosti IVIS in enot UN GHS

IVIS	UN GHS
≤ 3	Nekategorizirano
$> 3; \leq 55$	Brez sklepa
> 55	Kategorija 1

5 REZULTATI IN DISKUSIJA

5.1. METODA PRIVZEMA NEVTRALNO RDEČE (NRU)

a) VALIDACIJA METODE NRU

Poškodbo roženice, vezivnega epitelija in endotelija, ki je posledica kemikalij, ki povzročajo draženje oči, lahko napovemo tudi z merjenjem sprememb v celični aktivnosti (21). V tem primeru smo uporabili metodo privzema barvila nevtralnno rdeče z namenom preizkušanja citotoksičnosti nanoprenašalcev. Uporabljen testni sistem Balb/c 3T3 celice (fibroblasti) se v normalnih pogojih, vzdrževane v kulturi, neprekinjeno delijo in razmnožujejo. Osnovni princip testa NRU je, da bodo citotoksične kemikalije na glede na mesto in mehanizem delovanja motile ta proces in posledično vodile v zmanjšano stopnjo rasti, kar se kaže v zmanjšanem številu celic. Do privzema barvila nevtralnno rdeče v lizosome kot posledica razlike v pH med lizosomom in citoplazmo je prišlo zgolj v živih celicah, kar predstavlja kvantitativno določitev celičnega števila in viabilnosti celic. V naslednjem koraku testa smo na podlagi vezave raztopine barvila kenacid modro ocenjevali celotno vsebnost celičnih proteinov, kar je služilo za kvantitativno določitev števila celic v celični kulturi. Prednost metode je, ker smo lahko izvajali test privzema nevtralnno rdečega in test vezave kenacid modrega na istem vzorcu celic, in sicer kar enega za drugim, kar nam je omogočalo lažjo in verodostojnejšo primerjavo obeh končnih točk. Metoda omogoča hitro testiranje kemikalij na rutinski bazi z visoko ponovljivostjo in ima visoko intra- ter interlaboratorjsko reproducibilnost (37). Rezultati lahko variirajo pri nestabilnih ali hlapljivih kemikalijah, kar smo poskušali rešiti z uporabo 96-kanalske plošče, saj manjša površina vdolbinice zmanjša obseg evaporacije. Upoštevati smo morali, da metoda ni primerna za snovi, ki so eksplozivne v vodi, in da lahko sistem vodi do varljivih rezultatov pri snoveh, ki specifično napadejo deljenje celic ali imajo lokaliziran učinek na lizosome. Pri testiranju smo morali biti pozorni na možnost ireverzibilne precipitacije nevtralnno rdečega, kar smo rešili s centrifugiranjem medija za nevtralnno rdeče tik pred opravljanjem poskusa. V primeru kenacid modrega smo se posluževali konstantnega mešanja, da bi preprečili njegovo reverzibilno precipitacijo, ki bi prav tako lahko motila končne meritve.

• DOLOČANJE VPLIVA IZBRANIH SNOVI NA VIABILNOST CELIC

S čitalcem mikrotitrskih plošč (FLUOstar Optima) smo izmerili privzem barvila nevtralnno rdeče pri 540 nm, kjer barvilo izkazuje svoj absorpcijski maksimum. V koraku validacije metode smo v sklopu dveh meritev na dveh različnih pasažah celic Balb/c 3T3 uporabljali SDS, DMSO in BCL. Pri merjenju stopnje inhibicije rasti Balb/c 3T3 celic z SDS, merjenega na dveh različnih pasažah v razponu 8 različnih koncentracij v šestih ponovitvah (replikatih):

1) 0,004%, 0,006%, 0,01%, 0,015%, 0,024%, 0,039%, 0,063%, 0,100%;

2) 0,002%, 0,0035%, 0,0057%, 0,0094%, 0,0156%, 0,0260%, 0,0420%, 0,070%,

smo določili vrednosti IC_{50} pri 1) 0,00616% in 2) 0,00687%.

V primeru DMSO:

1) 0,24%, 0,40%, 0,70%, 1,20%, 2,04%, 3,50%, 5,90%, 10,0%;

2) 0,45%, 0,74%, 1,23%, 2,02%, 3,34%, 5,51%, 9,09%, 15,0%,

smo določili vrednosti IC_{50} pri 1) 7,75% in 2) 5,52%.

Pri določanju citotoksičnosti DMSO na prvi pasaži celic je zaradi povečane viabilnosti celic (>100%) prišlo do odstopanj pri določanju IC_{50} s programom Graphpad Prism, zato smo vrednost lahko le približno ocenili. V primerih, ko je prišlo do relativnega povišanja viabilnosti celic (>100%), smo si pojav razlagali tako, da je tretiranje celic s preizkušano snovjo imelo vpliv na povečano aktivnost celičnih encimov, brez dejanskega vpliva na celično viabilnost. Pri testiranju BCL smo pri preizkušanju na prvi pasaži celic Balb/c 3T3 v koncentracijskem razponu 8 koncentracij:

1) 0,0008%, 0,0020%, 0,0050%, 0,0128%, 0,0320%, 0,080%, 0,200%, 0,500%;

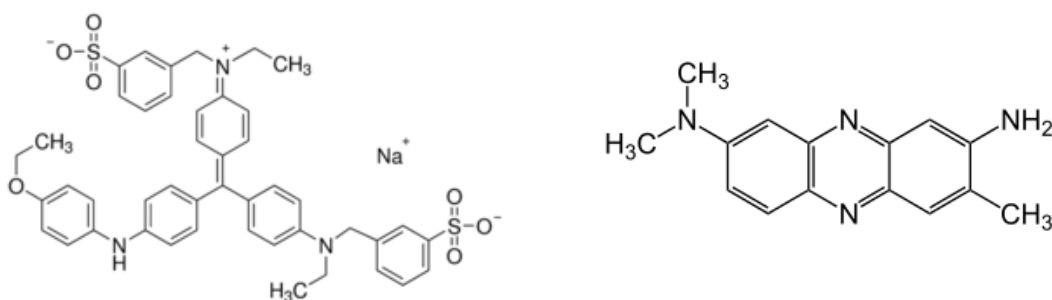
2) 0,0004%, 0,0007%, 0,0012%, 0,0020%, 0,0033%, 0,0055%, 0,0091%, 0,0150%,

določili IC_{50} pri 1) 0,00336%, pri merjenju na drugi pasaži 2), pa smo določili precej nižjo IC_{50} 0,000831% in opazili izrazito odstopanje pri koncentraciji 0,50%, ki je kazala na 908% viabilnost. Sklepali smo, da je verjetno prišlo do ireverzibilne precipitacije barvila nevtralnno rdeče, kar smo potrdili z oceno pod mikroskopom.

• DOLOČANJE VPLIVA IZBRANIH SNOVI NA VSEBNOST CELIČNIH PROTEINOV

Vsebnost proteinov smo določali s stopnjo vezave raztopine barvila kenacid modro, katerega absorbanco smo merili z mikrotitrskim čitalcem pri 570 nm. V primeru SDS smo določili vrednost KB_{50} pri 1) 0,00920% in 2) 0,00812%, pri merjenju KB_{50} za snov DMSO

pa pri 1) 7,75% in 2) 5,73. Pri določanju vsebnosti proteinov pri BCL smo naleteli v primeru obeh pasaž na nepričakovan rezultat meritev. V primeru prve pasaže je stopnja vezave kenacid modrega na celične proteine do koncentracije 0,0128% padala, nato pa spet začela naraščati. To smo prav tako opazili tudi v drugi pasaži celic, kjer je absorbanca padala do koncentracije 0,0012%, nato pa je koncentracija spet pričela naraščati, kar je načeloma nasprotovalo smiselnosti določanja. V kolikor smo upoštevali v prvem primeru zgolj vrednosti do koncentracije 0,0128%, je bila ocenjena KB_{50} pri 0,00351% in v drugem primeru do vrednosti 0,0012%, je bila KB_{50} 0,000772%.

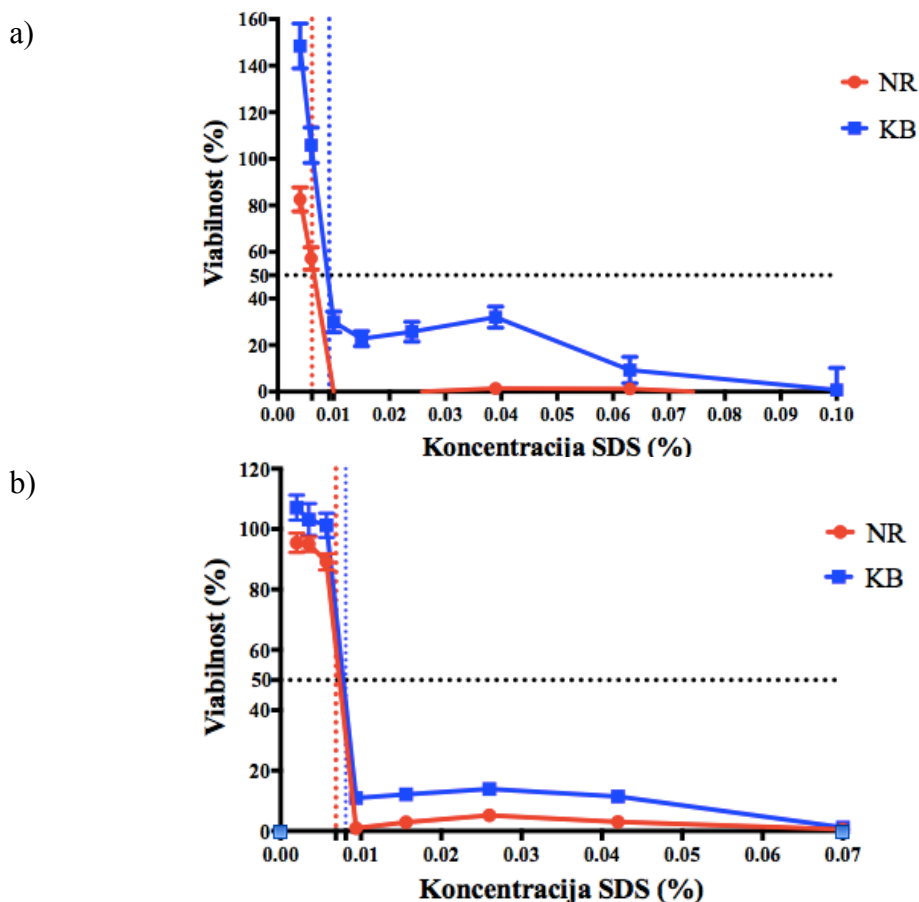


Slika 8: Struktura brilijantno modrega (levo) in nevtralnno rdečega (desno) (Sigma-Aldrich)

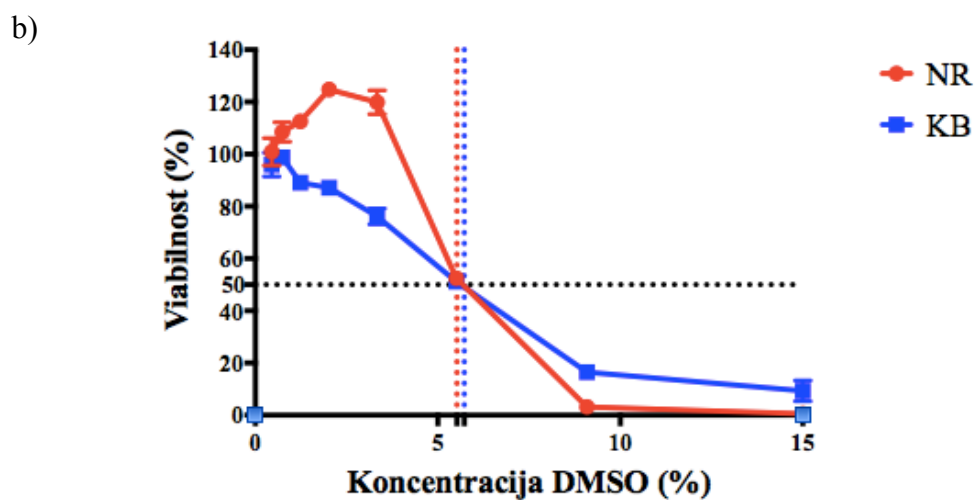
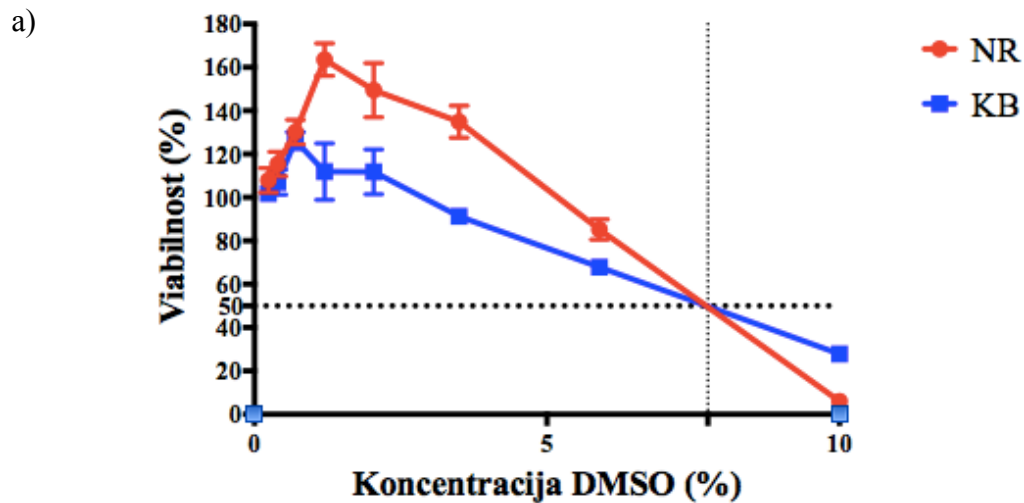
• RAZPRAVA DOBLJENIH REZULTATOV

Pri določanju stopnje citotoksičnosti SDS, kateri smo izmerili vrednost IC_{50} $0,00649 \pm 0,000535\%$ (slika 9), le-ta sovпада z referenčnimi meritvami, ki so jih pridobili pri preizkušanju testne metode NRU v Nemčiji v 12 različnih laboratorijih (38). V primeru DMSO je izračunana IC_{50} ($IC_{50} = 6,636 \pm 1,575 \%$) prav tako sovpadala z referenčnimi vrednostmi (slika 10). Pri BCL smo pri določanju na prvi pasaži izmerili koncentracijo, ki je bila precej višja, kot jo podajajo v literaturi, korelirala pa je vrednost druge meritve ($IC_{50} = 0,00210 \pm 0,00179 \%$) (slika 11). Zaradi močnega odstopanja pri zadnji koncentraciji prve meritve, kot posledica precipitacije nevtralnno rdečega, rezultata meritve na grafu nismo upoštevali. Vrednosti pri določanju vezave kenacid modrega na celične proteine bi morale na podlagi referenčnih vrednosti (38) sovpadati z izmerjeno stopnjo citotoksičnosti preizkušanih snovi. V našem primeru smo tako pri SDS ($KB_{50} = 0,00866 \pm 0,000760 \%$) kot tudi pri DMSO ($KB_{50} = 6,738 \pm 1,431\%$) izmerili nekoliko višjo vrednost KB_{50} v primerjavi z IC_{50} . Pojav smo si razlagali z dejstvom, da barvilo nevtralnno rdeče določa zgolj žive celice, raztopina barvila kenacid modro pa se lahko veže tudi na proteine nekrotičnih celic, ki ostanejo vezane na dno, kar bi lahko v našem primeru privedlo do podcenjenja toksičnosti. Obe meritvi KB_{50} pri BCL sta dali rezultate, ki so nasprotovali smiselnosti določanja, zaradi česar smo KB_{50} lahko le približno ocenili (slika 12). Tekom

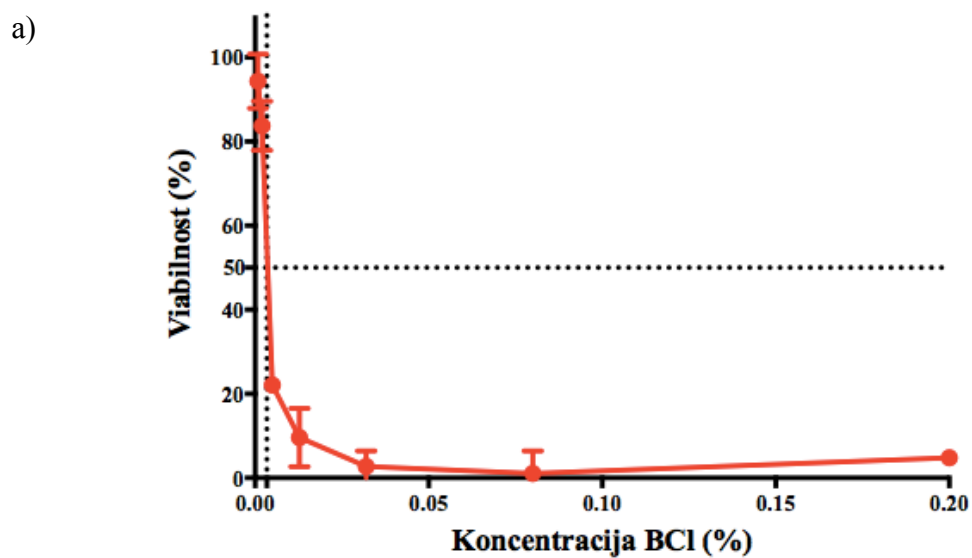
naših meritev smo našli zanimivo raziskavo, kjer so izmerili znižano citotoksičnost BCL ob dodatku barvila brilijantno modro (osnovno barvilo raztopine barvila kenacid modro), ki pa kljub temu ni znižal bakteriostatičnega učinka BCL v oftalmičnih pripravkih (39). Vendar pa smo pri našem testiranju za razliko od omenjene raziskave, nanesli barvilo po 24-urni inkubaciji z BCL in ne sočasno tako kot v objavljeni raziskavi, kar je pomenilo, da znižana citotoksičnost zaradi barvila ni mogla priti v poštev. Na podlagi razlage protokola (DB ALM N°46) smo sklepali, da je lahko prišlo do pojava, ki so ga v protokolu omenili za nekatere organske kisline ali alkohole in sicer, da so le-ti povzročili pritrditev tretiranih celic na dno vdolbinic plošče. Posledično je prišlo do padca vsebnosti proteina pri nizkih koncentracijah in dviga vsebnosti pri višjih koncentracijah. V našem primeru je prišlo v vdolbinicah, kjer smo izmerili povišano absorbanco, do pojava motnosti, pri čemer smo sklepali, da je lahko prišlo do proteinske denaturacije in posledične koagulacije celičnih proteinov. Opažena motnost je naraščala s količino dodanega BCL, kar smo si lahko razlagali tudi z možnostjo interakcije med BCL in brilijantno modrim – oba namreč sodita med površinsko aktivne snovi.

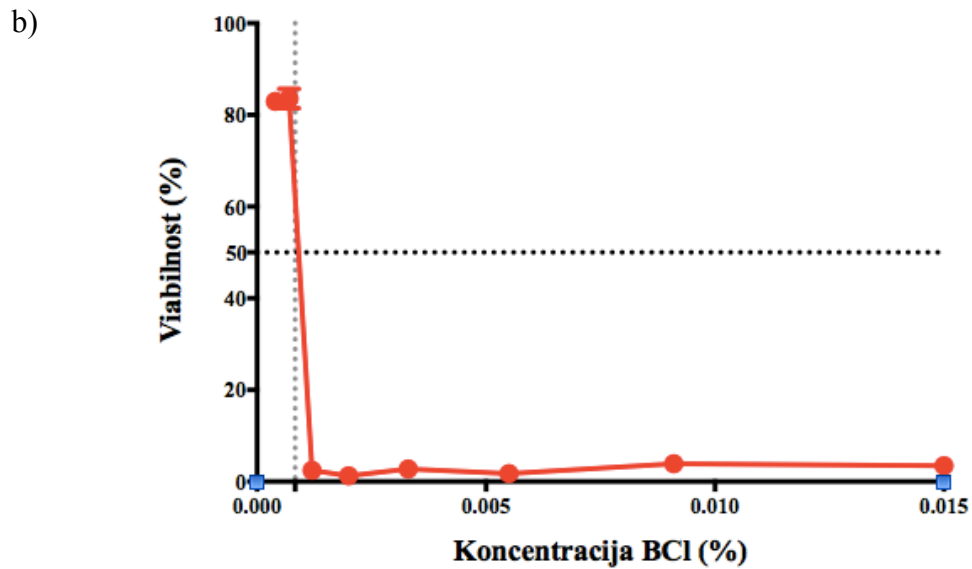


Slika 9: Vpliv SDS na viabilnost (rdeče) in vsebnost celičnih proteinov (modro) celic Balb/c 3T3 (a) prva pasaža Balb/c 3T3; b) druga pasaža Balb/c 3T3)

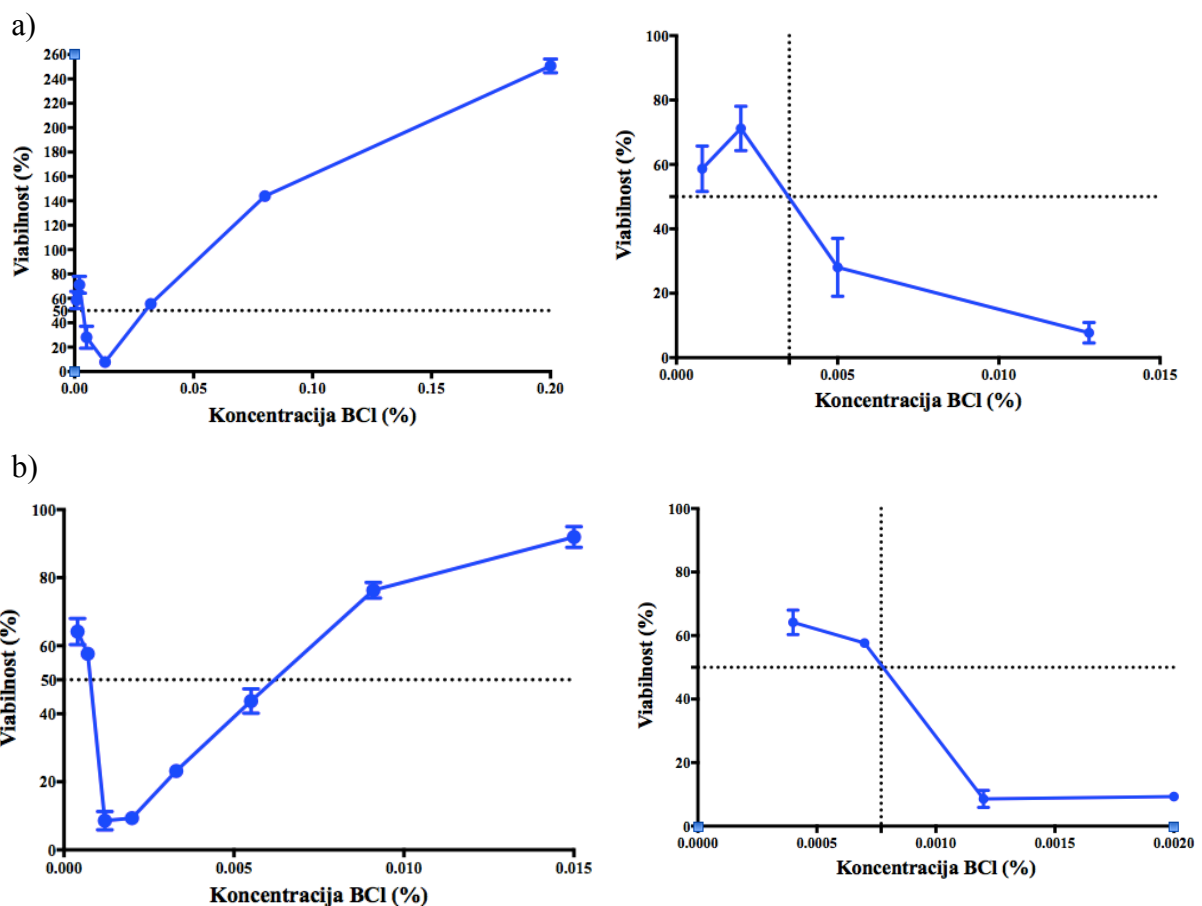


Slika 10: Vpliv DMSO na viabilnost (rdeče) in vsebnost celičnih proteinov (modro) celic Balb/c 3T3 (a) prva pasaža Balb/c 3T3; b) druga pasaža Balb/c 3T3)





Slika 11: Vpliv BCL na viabilnost celic Balb/c 3T3 (a) prva pasaža Balb/c 3T3; b) druga pasaža Balb/c 3T3)



Slika 12: Vpliv BCL na vsebnost celičnih proteinov celic Balb/c 3T3 (a) prva pasaža Balb/c 3T3; b) druga pasaža Balb/c 3T3)

b) PREIZKUŠANJE NANOPRENAŠALCEV

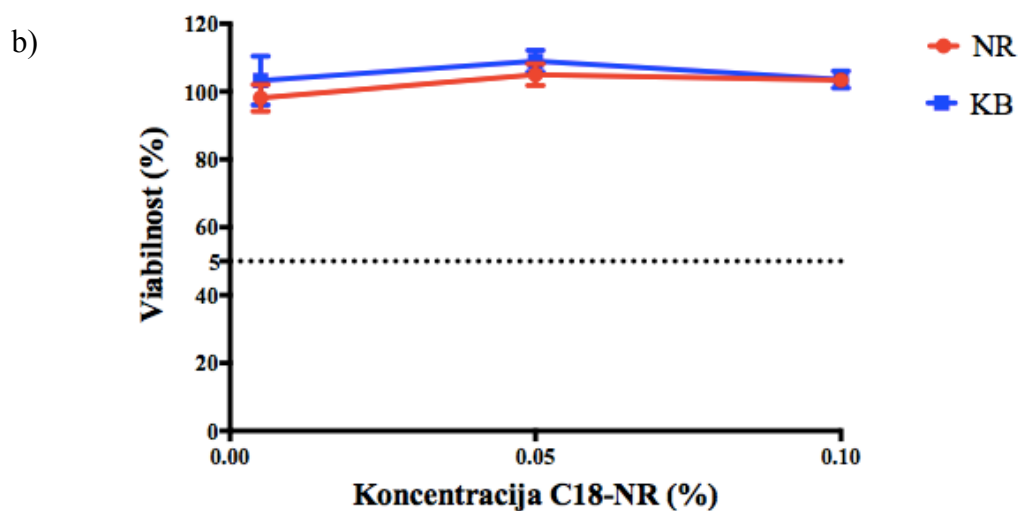
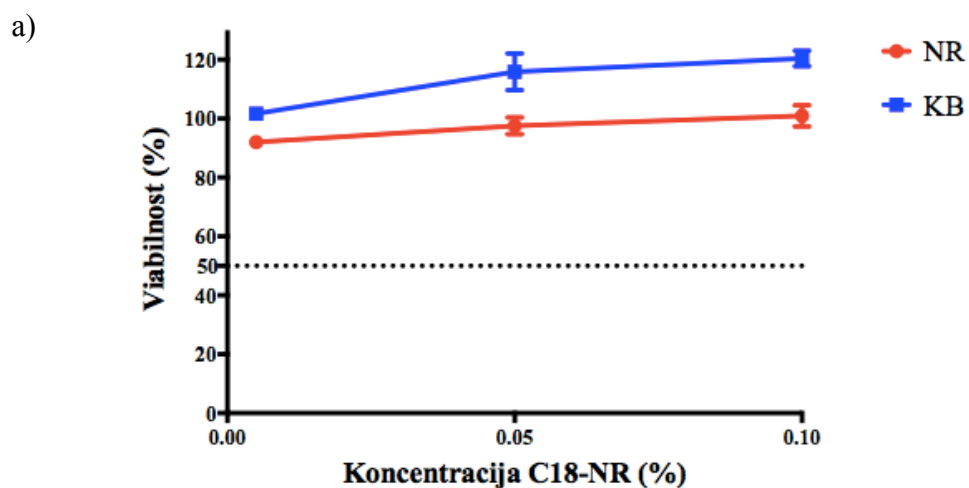
• DOLOČANJE VPLIVA PREIZKUŠANIH KONCENTRACIJ NANOPRENAŠALCEV NA VIABILNOST CELIC

Po koraku validacije metode smo nadaljevali s preizkušanjem dveh etilceluloznih nanoprenašalcev EC4CP in EC4CP-NR, pri čemer je slednji vključeval lipofilno barvilo nilsko rdeče v koncentraciji 0,004%. Barvilo smo uporabljali na Inštitutu za farmacijo (FU Berlin) za lažjo detekcijo penetracije nanoprenašalcev skozi poroženelo plast kože. Za oceno dražilnega potenciala barvila smo tako preizkušali nanoprenašalce, ki le-tega niso vsebovali in na koncu primerjali vrednosti obeh. Testirali smo tudi večplastni dendrimerni nanoprenašalec C18 (PEG₁₀₀₀₀(NH₂)_{0,7}(C₁₈mPEG₆)_{1,0} z vezanim barvilom nilsko rdeče. C18 je amfifilna molekula, ki vsebuje aminske skupine, ki imajo sicer ključni pomen pri inkapsuliranju učinkovin, vendar lahko izkazujejo citotoksično delovanje (40). Vse nanoprenašalce smo preizkušali pri koncentracijah 0,005%, 0,05% in 0,10% v šestih ponovitvah (replikatih) na dveh različnih pasajah celic Balb/c 3T3. Kot pozitivno kontrolo smo vzporedno testirali SDS, medtem ko so kot referenčni vzorec služile celice, ki so bile tretirane po enakem postopku, vendar brez dodanih nanoprenašalcev.

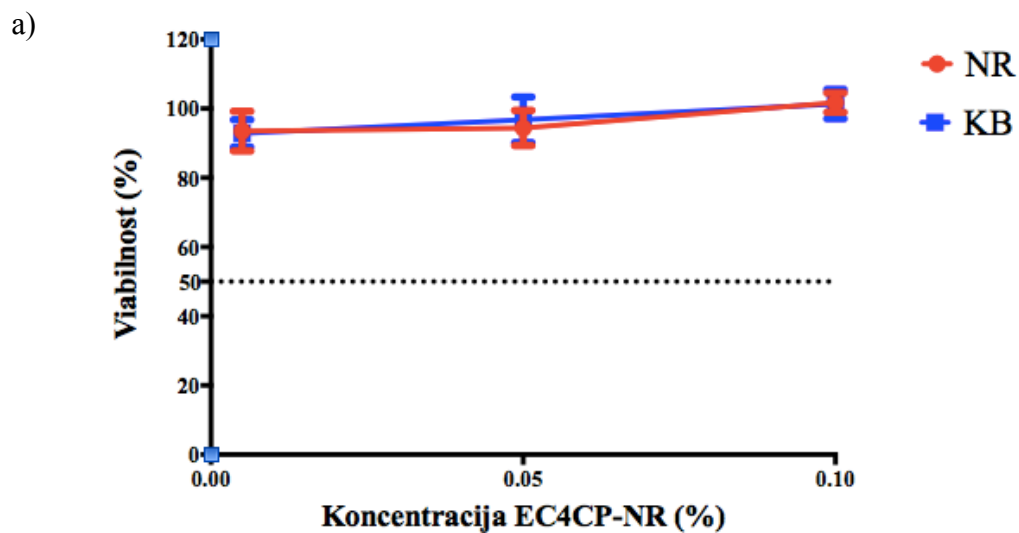
V primeru testiranja nanoprenašalcev na prvi celični pasaji je v primeru vseh treh preizkušanih nanoprenašalcev (0,1%, 0,05% in 0,005%) prišlo do rahlega citotoksičnega učinka pri nižji koncentraciji 0,005%, pri koncentraciji 0,05% pa so meritve sovpadale z meritvami referenčnega vzorca. V vseh primerih nanoprenašalcev pri preizkušanih koncentracijah je bila viabilnost celic močno nad 50%, kar pomeni, da nismo mogli izmeriti IC₅₀. V primeru testiranja na drugi celični pasaji pa noben od preizkušanih nanoprenašalcev ni povzročil padca v viabilnosti celic, tako da tudi v tem primeru nismo mogli izmeriti IC₅₀ (slike 13-15).

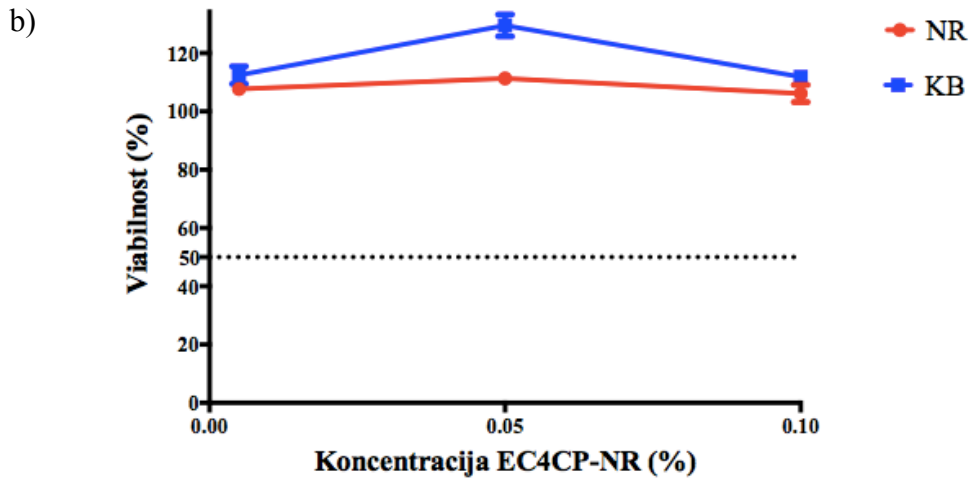
• DOLOČANJE VPLIVA PREIZKUŠANIH KONCENTRACIJ NANOPRENAŠALCEV NA VSEBNOST CELIČNIH PROTEINOV

Določanje vsebnosti celičnih proteinov smo nadaljevali neposredno za določanjem citotoksičnosti, kot je to opisano v postopku določanja privzema barvila kenacid modro (stran 21). Izmerjeni rezultati, ki so prikazani na slikah 13-15, prikazujejo vpliv koncentracij preizkušanih nanoprenašalcev na vsebnost celičnih proteinov celic Balb/c 3T3.

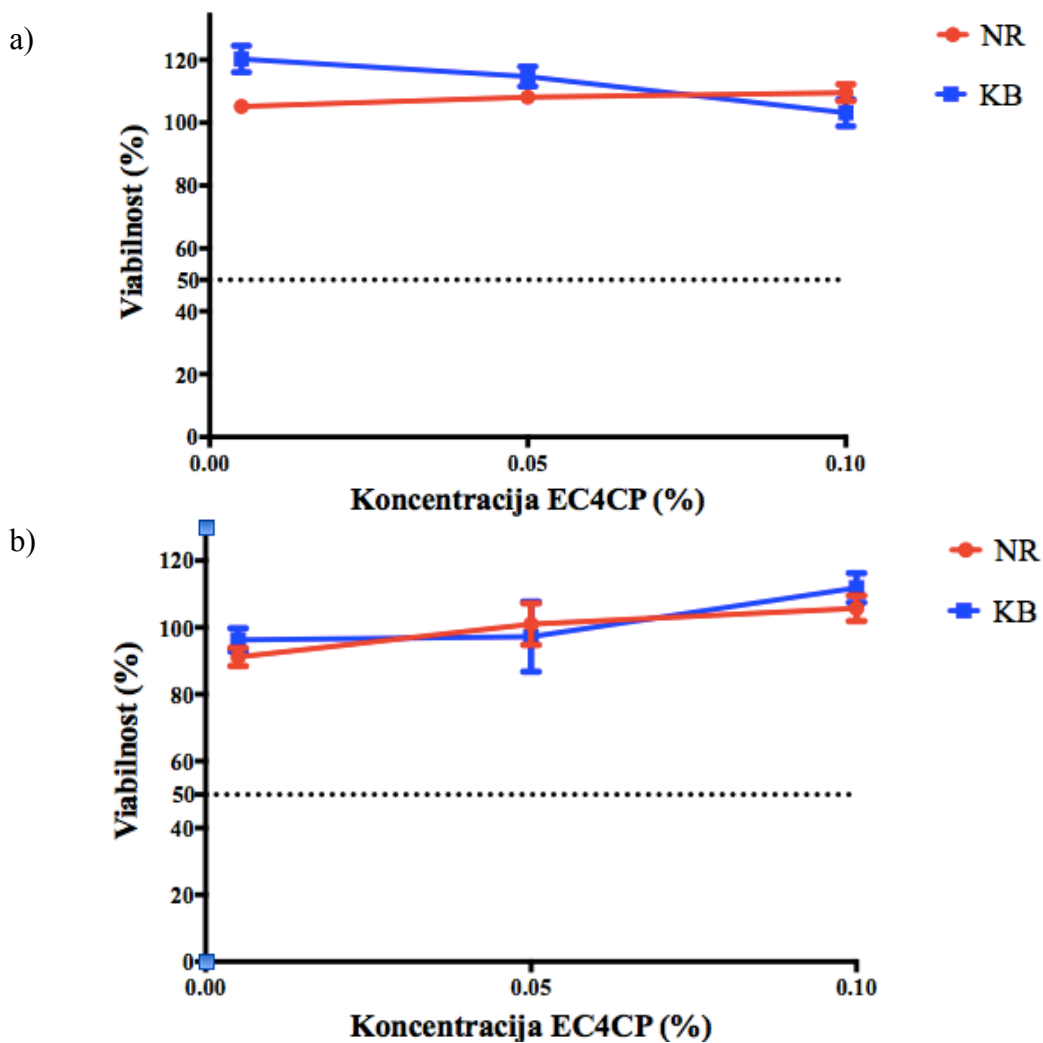


Slika 13: Vpliv C18-NR na viabilnost (rdeče) in vsebnost celičnih proteinov (modro) celic Balb/c 3T3 (a) prva pasaža Balb/c 3T3; b) druga pasaža Balb/c 3T3)





Slika 14: Vpliv EC4CP-NR na viabilnost (rdeče) in vsebnost celičnih proteinov (modro) celic Balb/c 3T3 (a) prva pasaža Balb/c 3T3; b) druga pasaža Balb/c 3T3)



Slika 15: Vpliv EC4CP na viabilnost (rdeče) in vsebnost celičnih proteinov (modro) celic Balb/c 3T3 (a) prva pasaža Balb/c 3T3; b) druga pasaža Balb/c 3T3)

- **RAZPRAVA DOBLJENIH REZULTATOV**

Na podlagi dobljenih rezultatov vidnih na slikah 13-15, pri določanju citotoksičnosti in vsebnosti celičnih proteinov v primeru EC4CP in EC4CP-NR rezultati sovpadajo, na podlagi česar lahko sklepamo, da vezano barvilo nilsko rdeče nima inhibitornega vpliva na celično rast. Pri merjenju obeh končnih točk so bile vse vrednosti viabilnosti višje od 50% v primerjavi z referenčnim vzorcem, kjer celic nismo tretirali s preizkušanimi snovmi, na podlagi česar lahko sklepamo, da preizkušani nanoprenašalci z ali brez vezanega lipofilnega barvila nilsko rdeče ne izkazujejo citotoksičnega učinka.

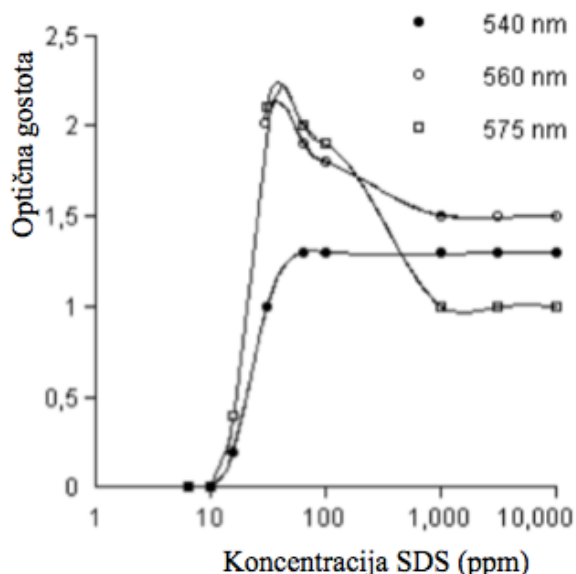
Kljub temu da je *in vitro* metoda NRU ocenjena z visoko inter- in intralaboratorijsko reproducibilnostjo, pa ni uveljavljena kot metoda, ki bi lahko v celoti nadomestila *in vivo* Draizov test. Za razširitev njene uporabe raziskovalci predlagajo preizkušanje večjega nabora snovi in več interlaboratorijskih primerjav (37, 38). V validaciji metode, ki je potekala med letoma 1991 in 1997 v Nemčiji v okviru German Department of Research and Technology (BMBF) so ugotovili, da bi lahko metodo NRU uporabljali v kombinaciji s HET-CAM testom in s skupno oceno končnih točk razlikovali med dražilci in nedražilci (23). Na podlagi zbranih podatkov iz raziskav etilceluloznih in večplastni dendrimernih nanoprenašalcev, ki so kazali na nizek dražilni potencial, smo metodo NRU izvajali v prvem koraku »bottom-up« pristopa in se nato posluževali metod RBC in BCOP za nadaljnje določanje dražilnega potenciala nanoprenašalcev.

5.2. METODA RDEČIH KRVNIČK (RBC)

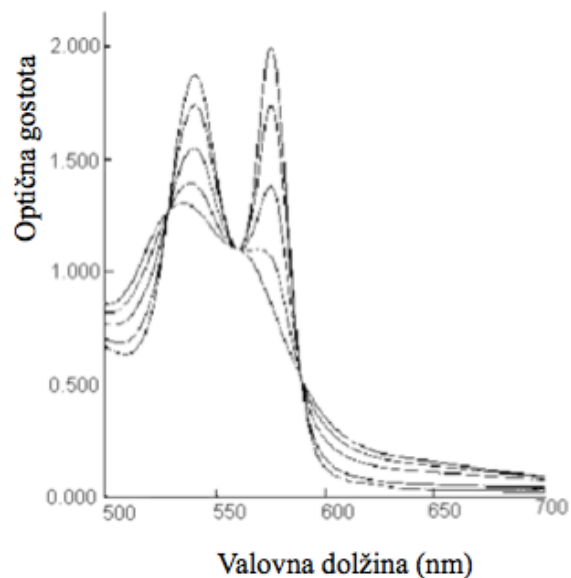
Za kvantifikacijo dražilnega potenciala preizkušanih nanoprenašalcev smo izvajali tudi testno metodo rdečih krvničk, kjer smo na podlagi stopnje hemolize in proteinske denaturacije, povzročene s testiranimi snovmi, določali dražilni potencial le-teh. V obeh primerih določanja je kot indikator služil oksihemoglobin, ki predstavlja obliko hemoglobina z vezanim kisikom, ki ga po krvi prenaša do tkiv. Za to metodo so v različnih raziskavah potrdili, da izkazuje dobro inter- in intralaboratorijsko ponovljivost in predstavlja dobro *in vitro* alternativo pri napovedovanju akutnega draženja oči, povzročene s PAS ali njihovimi formulacijami (21, 41). Kljub temu da ni predlagana kot splošna alternativna metoda Draizovemu testu, pa je potrjena za uporabo v prvem koraku *in vitro* stopenjskega testiranja pri oceni akutnega dražilnega potenciala oči. Je enostavna in hitra metoda z določenimi in objektivnimi končnimi točkami. Na podlagi ugotovitev različnih raziskav je to testno metodo priporočljivo uporabljati za kemikalije, ki imajo predviden nizek dražilni potencial (42).

a) VALIDACIJA METODE RDEČIH KRVNIČK

Pred začetkom preizkušanja dražilnega potenciala nanoprenašalcev smo z namenom validacije metode testirali stopnjo hemolize in denaturacijo proteinov kemikalij SDS in BCL. Stopnjo hemolize smo izmerili z UV/VIS spektrofotometrom pri 560 nm, stopnjo denaturacije proteinov in oksihemoglobina pa pri 540 nm in 575 nm. Referenčne meritve za SDS na podlagi protokola DB-ALM N°37 so prikazane na slikah 16 in 17. Pri koncentracijah do 10 ppm pri SDS nismo opazili hemolitičnega učinka na membrane rdečih krvničk. Med 10 in 60 ppm prihaja do povečanja optične gostote, kar je posledica sproščenega oksihemoglobina zaradi povzročene hemolize. Nad koncentracijo 100 ppm pa pride do padca optične gostote, kar je posledica denaturacije oksihemoglobina. Ker se krivulja sproščenega oksihemoglobina zaradi hemolize prekriva z začetkom padca krivulje zaradi proteinske denaturacije, smo posneli 2 vzorca optične gostote pri 540 nm in 575 nm, kjer pride do absorpcijskega maksimuma pri oksihemoglobinu. Njuno razmerje predstavlja denaturacijski indeks (43, 44).



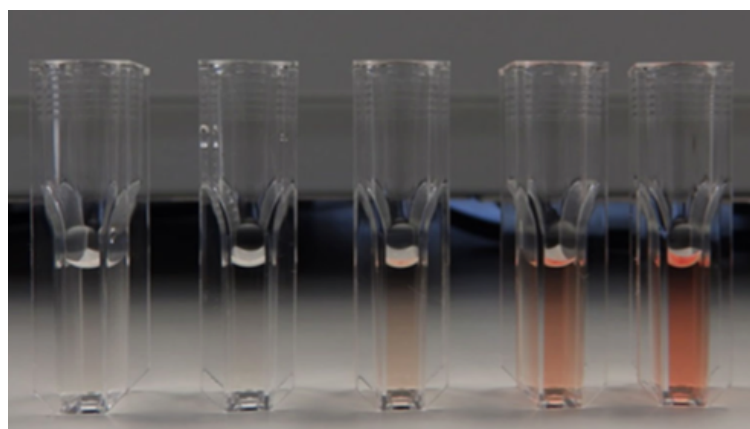
Slika 16: Optična gostota v odvisnosti naraščajoče koncentracije SDS (43)



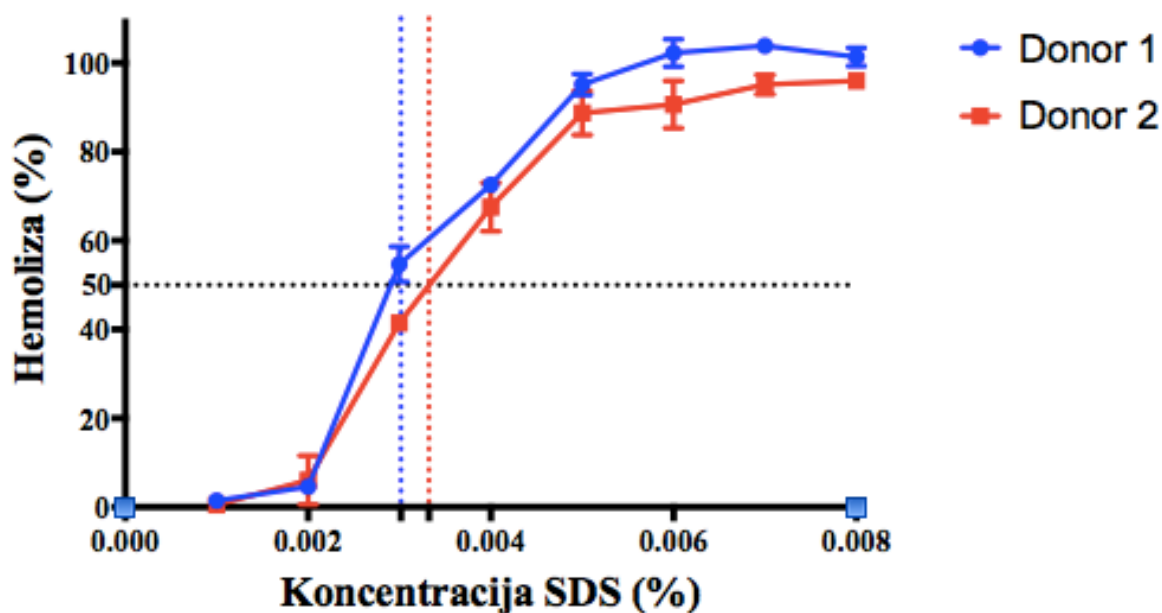
Slika 17: Spekter absorpcije intaktnega in denaturiranega oksihemoglobina pri različnih koncentracijah SDS (250, 500, 700, 1000 ppm) (43)

• DOLOČANJE HEMOLIZE RDEČIH KRVNIČK

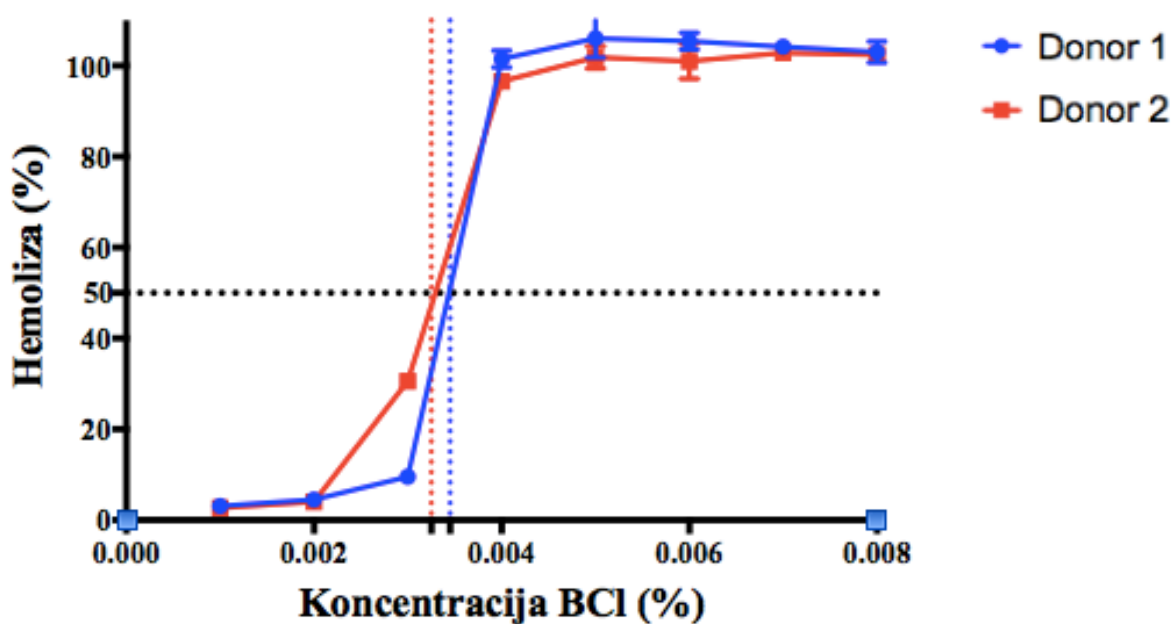
Določanje stopnje hemolize je pomemben del testa, saj ga lahko povezujemo z začetkom vnetnega odziva v očesu (42). Z UV/VIS spektrofotometrom smo pri 560 nm valovne dolžine merili stopnjo hemolize dveh površinsko aktivnih snovi, SDS in BCL. Obe v določenih koncentracijah povzročata uničenje celičnega membranskega dvosloja, kar privede do hemolize celice (45). Začetno validacijo metode smo izvajali s preizkušanjem obeh PAS na dveh vzorcih krvi različnih donorjev, v koncentracijah: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 in 80 ppm. Pri določanju H_{50} je pozitivno kontrolo, ki je podajala 100% vrednost hemolize, predstavljala destilirana voda, negativno pa PBS.



Slika 18: Različne stopnje sproščenega oksihemoglobina kot posledica hemolize RBC (42)



Slika 19: Vpliv SDS na hemolizo RBC obeh darovalcev



Slika 20: Vpliv BCl na hemolizo RBC obeh darovalcev

Pri preizkušanju stopnje hemolize SDS smo ugotovili, da pri koncentraciji do 10 ppm ne opazimo hemolitičnega učinka tako kot je podano v protokolu (44). Do povečane absorpcije je prišlo med 10 – 60 ppm zaradi povzročene hemolize in posledično sproščenega oksihemoglobina. Med 70 in 80 ppm smo pri obeh meritvah opazili rahel padec v izmerjeni optični gostoti, zaradi česar smo sklepali, da je prišlo do denaturacije

oksihemoglobina zaradi proteinske interakcije med SDS in proteinom. Izračunana koncentracija SDS, ki povzroči 50% (H_{50}) lizo RBC je bila pri donorju 1 0,00302% (30,2 ppm) in pri donorju 2 0,00332% (33,2 ppm) (Slika 19). Pri BCL klorida smo opazili povečano absorbanco že pri začetnih koncentracijah (10 ppm) in povečan porast v absorpciji med 20 in 50 ppm. Med koncentracijama 70 in 80 ppm je prišlo do komaj zaznavnega padca v absorpciji. Izračunana H_{50} za BCL je bila pri donorju 1 0,00325% (32,5 ppm) in pri donorju 2 0,00345% (34,5 ppm) (Slika 20).

• DOLOČANJE DENATURACIJSKEGA INDEKSA

Sprostitev proteina oksihemoglobina kot posledica hemolize je zelo dober indikator porušanja celovitosti membrane. Vendar moramo upoštevati, da so sproščeni celični proteini lahko deaktivirani zaradi interakcij z ionskimi PAS. To proteinsko reakcijo smo merili na podlagi določanja proteinske denaturacije preizkušanih ionskih PAS, SDS in BCL. Proteinske interakcije lahko povežemo s spremembo konformacije proteinov, ki nastanejo pri motnosti očesa (42). Denaturacijo oksihemoglobina smo določali spektrofotometrično pri 575 (α) in 540 (β) nm. Razmerje α/β (R) karakterizira denaturacijo proteina in smo ga uporabili za izračun denaturacijskega indeksa (DI). Za oksihemoglobin je razmerje R_1 definirano z $1,05 \pm 0,001$ ($x \pm SEM$; $n=200$). Za SDS, ki predstavlja interni standard pri preizkusu, pa računamo razmerje R_2 . Razlika med R_2 in R_1 je enaka 100% denaturaciji, ki jo uporabljamo v Enačbi 6 pri izračunu individualnega denaturacijskega potenciala pri preizkušanih kemikalijah.

$$DI (\%) = 100 \times \frac{(R_1 - R_i)}{(R_1 - R_2)}$$

Enačba 6

Tako kot pri določanju stopnje hemolize smo tudi pri testiranju proteinske denaturacije uporabili dva vzorca krvi dveh različnih donorjev.

Pri donorju 1 so dobljeni rezultati sovpadali z referenčnimi. Na podlagi izračuna dobljen DI pri SDS je znašal 100 % in pri BCL 118,6 % (referenčna vrednost v protokolu: >100 %), kar je dobro sovpadalo z referenčnimi vrednostmi (44). Pri drugem vzorcu krvi drugega donorja pa smo naleteli na veliko odstopanje pri določanju DI BCL, ki je znašal 41,6 %.

• **RAZPRAVA DOBLJENIH REZULTATOV**

Pri merjenju hemolize sta bili tako vrednosti za SDS ($31,7 \pm 2,17$ ppm) kot tudi za BCL ($33,5 \pm 1,41$ ppm) nekoliko višji, kot ju sicer podaja referenčna literatura ($29,4 \pm 3,7$ ppm za SDS in 32 ppm za BCL) (DB ALM N°37). Razlog za to bi lahko bila uporaba človeške krvi (v protokolu uporabljajo govejo), ki smo jo uporabljali zaradi lažje intralaboratorijske primerljivosti z drugimi opravljanimi poskusi. V literaturi so namreč ugotovili, da je absorpcijski spekter govejega oksihemoglobina v minimumu pri 560 nm nekoliko nižji, kot je ta pri človeškem oksihemoglobinu (42). Razlog bi lahko bil tudi v večji rezistenci človeške krvi napram goveji. V eni izmed raziskav so pri testu RBC prav tako uporabljali človeško kri in pri določanju H_{50} za SDS dobili višjo vrednost (42 ppm) kot je referenčna (39). Pri merjenju hemolize smo pri vzorcu krvi drugega donorja naleteli na veliko odstopanje pri določanju DI za BCL, saj je le-ta znašal 41,6 % (referenčna vrednost >100 %). Odstopanje si lahko razlagamo z upočasnitvijo reakcije, o kateri poročajo v protokolu, zaradi česar bi morali meritve izvajati zelo hitro z uporabo dualnega UV/VIS spektrofotometra. Mi smo opravljali meritve z UV/VIS spektrofotometrom, ki ni omogočal vzporednih meritev.

Na podlagi dobljenega razmerja med hemolizo in denaturacijskim indeksom, ki ga definira enačba 7 in z upoštevanjem preglednice XI, smo določili dražilni potencial preizkušanih PAS.

$$L/D = \frac{H_{50}}{DI}$$

Enačba 7

Preglednica XI: Primerjava podatkov *in vivo* in razmerja L/D

<i>In vivo</i> draženje oči	<i>In vitro</i> razmerje H_{50}/DI
Nedražilec	> 100
Rahel dražilec	> 10
Zmeren dražilec	> 1
Dražilec	> 0,1
Močan dražilec	< 0,1

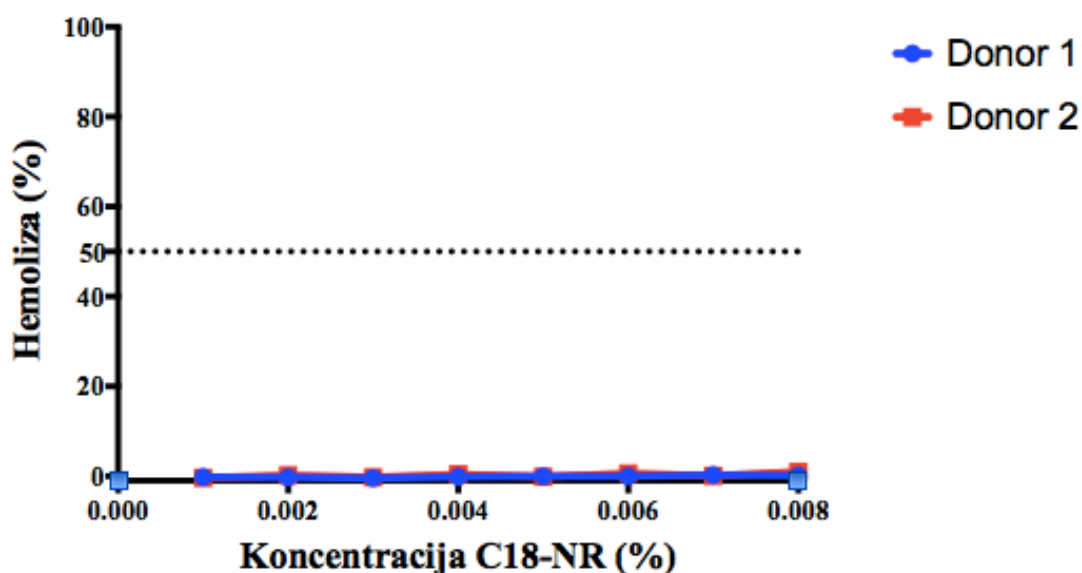
Razmerje za SDS je znašalo $0,317 \pm 0,0217$ %, na podlagi česar smo SDS lahko uvrstili med dražilce. Razmerje za BCL v protokolu ni definirano, vendar smo ga lahko na podlagi referenčnih meritev uvrstili med močne dražilce.

b) PREIZKUŠANJE NANOPRENAŠALCEV

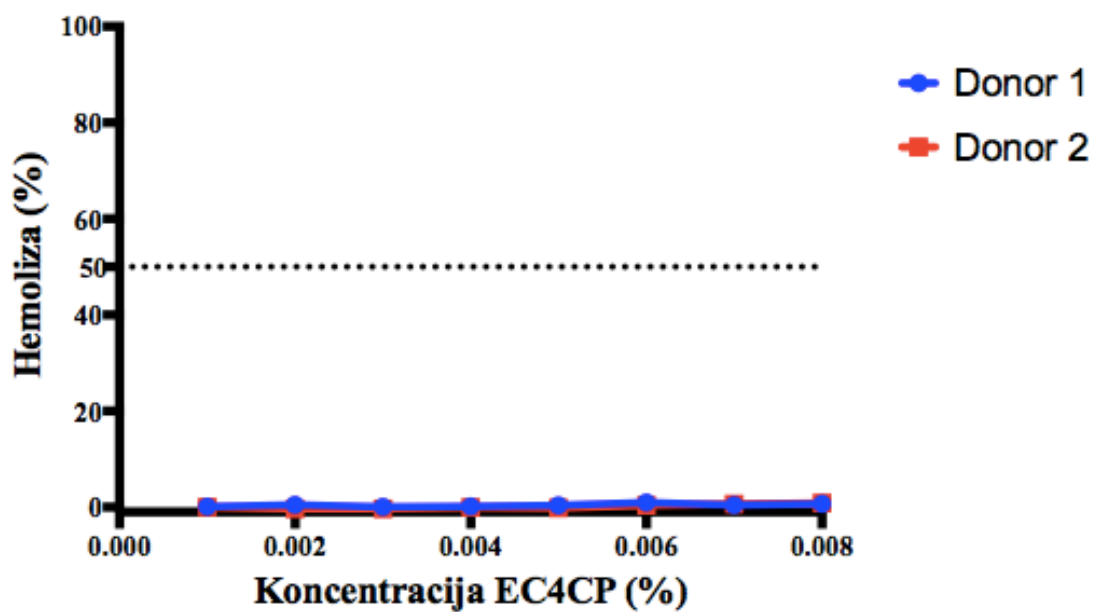
• DOLOČANJE VPLIVA PREIZKUŠANIH KONCENTRACIJ NANOPRENAŠALCEV NA HEMOLIZO RDEČIH KRVNIČK

Pri določanju stopnje hemolize nanoprenašalcev smo pri vseh treh uporabljali razpon 8 različnih koncentracij (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ppm) v triplikatih, na vzorcih krvi dveh različnih donorjev. Pri tej testni metodi smo v omenjenem koncentracijskem območju na podlagi protokola zajeli zgolj koncentracijo 0,005 % (50 ppm). Ker so bile osnovne raztopine nanoprenašalcev dostopne zgolj v 5 % in zaradi postopka priprave vzorcev za testiranje, ki ga narekuje protokol, koncentracije 0,05 % nismo mogli doseči.

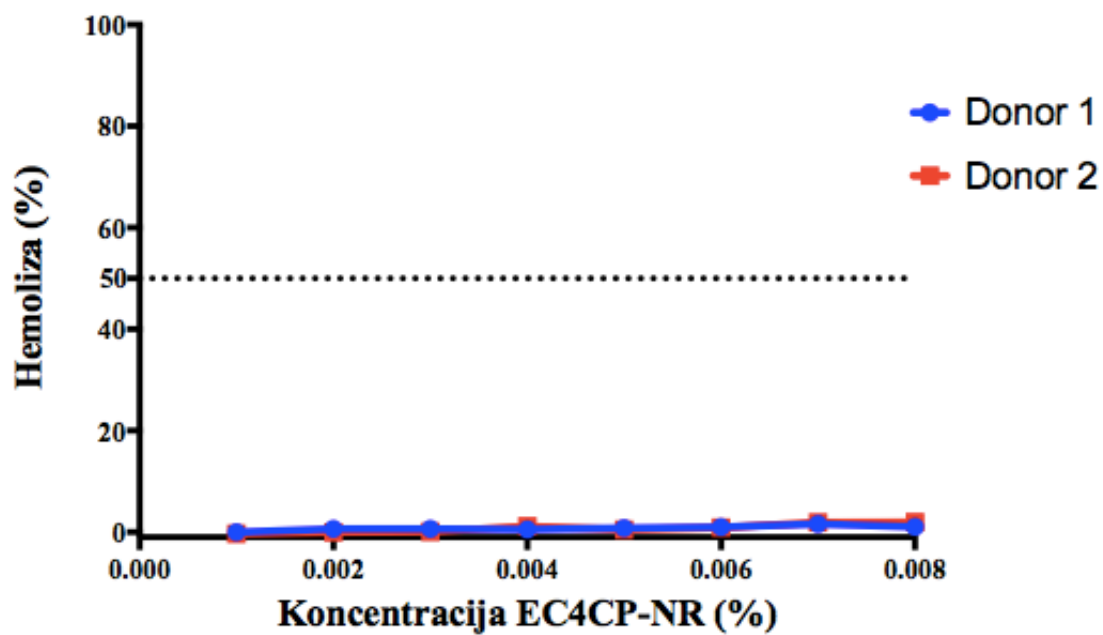
Pri določanju stopnje hemolize ni v nobenem primeru nanoprenašalcev prišlo do učinka hemolize in tako nismo uspeli določiti H_{50} (slike 21-23), kar so v primeru nanoprenašalca C18-NR ugotovili tudi drugi raziskovalci, čeprav le-ta predstavlja amfifilno molekulo, ki bi lahko vplivala na celovitost membrane (40, 46). V primerjavi z rezultati SDS in BCL lahko sklepamo, da preizkušani nanoprenašalci in prav tako barvilo nilsko rdeče v vezani obliki v koncentracijah za potencialno klinično uporabo ne izkazujejo dražilnega potenciala in izražajo dobro biokompatibilnost.



Slika 21: Vpliv C18-NR na hemolizo RBC obeh darovalcev



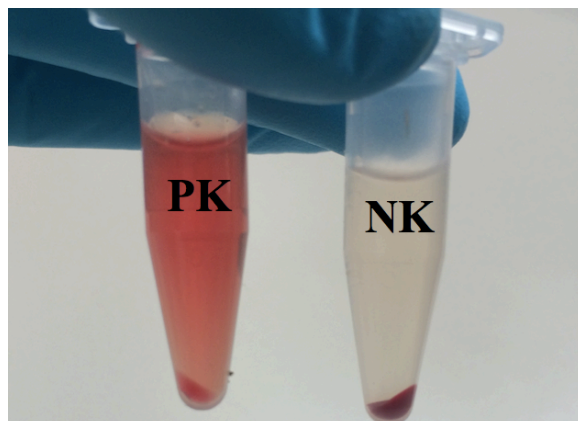
Slika 22: Vpliv EC4CP na hemolizo RBC obeh darovalcev



Slika 23: Vpliv EC4CP-NR na hemolizo RBC obeh darovalcev

- **DOLOČANJE VPLIVA PREIZKUŠANIH KONCENTRACIJ NANOPRENAŠALCEV NA PROTEINSKO DENATURACIJO**

Kot v primeru določanja hemolize tudi pri določanju proteinske denaturacije do slednje pri nanoprenašalcih ni prišlo, kar pomeni, da je vrednost absorbance sovpadala z vrednostjo negativne kontrole. Na sliki 24 je prikazana razlika med povzročeno hemolizo s pozitivno (destilirana voda) in negativno (PBS) kontrolo. V primeru preizkušanih nanoprenašalcev je prišlo do enakega rezultata kot pri negativni kontroli.



Slika 24: Primerjava povzročene hemolize med negativno (NK) in pozitivno kontrolo (PK)

- **RAZPRAVA DOBLJENIH REZULTATOV**

Pri merjenju hemolize v nobenem primeru nanoprenašalcev nismo uspeli določiti vrednosti H_{50} , saj do slednje v preizkušanih koncentracijah ni prišlo. Tudi v primeru določanja proteinske denaturacije do le-te ni prišlo, kar pomeni, da nismo mogli izračunati DI. Pri končnem vrednotenju *in vitro* razmerja L/D ni bilo mogoče določiti. V primerjavi z rezultati SDS in BCL lahko sklepamo, da preizkušani nanoprenašalci in barvilo nilsko rdeče v koncentracijah za klinično uporabo ne izkazujejo dražilnega potenciala in izražajo dobro biokompatibilnost. Kljub temu da C18-NR predstavlja amfifilno molekulo, pa ima za razliko od preizkušanih ionskih PAS (SDS, BCL) nevtralni naboj, kar tudi lahko predstavlja razlog njene netoksičnosti.

Metoda RBC ni validirana kot samostojen *in vitro* test pri določanju dražilnega potenciala kemikalij na oči, vendar se rutinsko uporablja pri *in vitro* stopenjskem testiranju pri oceni akutnega dražilnega potenciala oči. Na podlagi raziskav jo je priporočeno uporabljati v začetnih korakih »bottom-up« pristopa, za kemikalije s predvidenim nizkim dražilnim potencialom (42).

5.3. METODA ZA DOLOČANJE MOTNOSTI IN PERMEABILNOSTI ROŽENICE GOVEDA (BCOP)

a) VALIDACIJA METODE BCOP

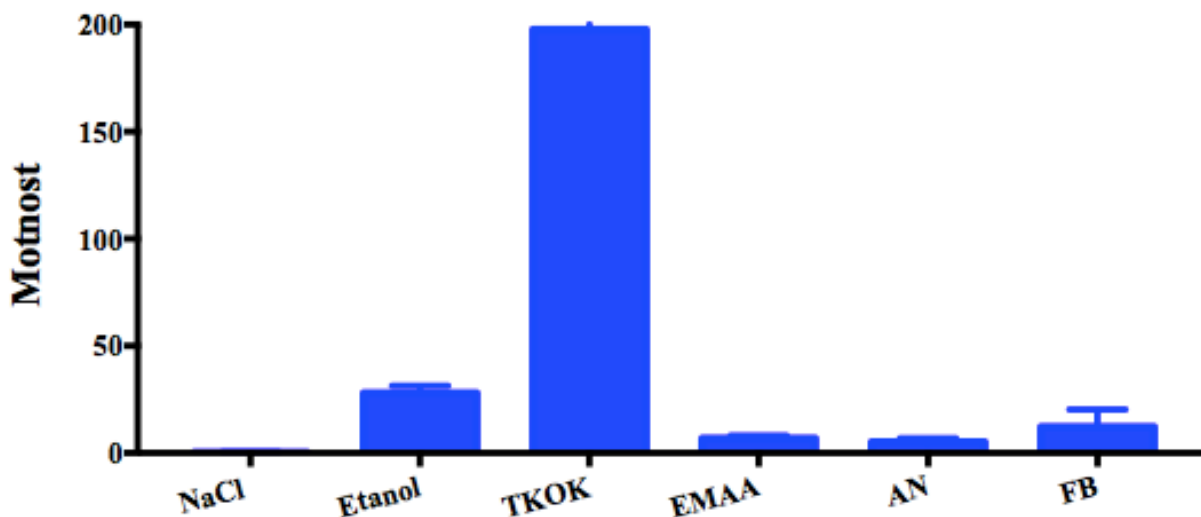
Tretja metoda s katero smo določali dražilni potencial preizkušanih nanoprenašalcev na oči je organotipski model BCOP. Na podlagi Draizovega testa, ki daje največjo težo poškodbi roženice (46), predpostavljamo, da je uporabljeni testni sistem izoliranih roženic metode BCOP zelo primeren za oceno dražilnega potenciala. S strani UN GHS je metoda potrjena za identifikacijo kemikalij, ki povzročajo resne očesne težave (poškodba tkiva ni reverzibilna v roku 21 dni), ki spadajo po UN GHS v kategorijo 1 in za identifikacijo kemikalij, ki ne povzročajo draženja oči in spadajo po UN GHS pod nekategorizirano skupino, brez nadaljnjih testiranj. Kadar BCOP uporabljamo za identifikacijo resnih dražilcev oči (kat. 1), statistične primerjave z Draizovim testom kažejo na 85% stopnjo ujemanja, 20% lažno pozitivno in 8% lažno negativno stopnjo, pri čemer iz meritev izključujejo kemikalije, ki lahko povzročajo visoko lažno pozitivno stopnjo (alkoholi, ketoni, estri) in trdne snovi, ki povzročajo visoko lažno negativno stopnjo. V primeru alkoholov, estrov in ketonov predvidevajo, da je rezultat posledica nestabilnosti in tudi predolge izpostavljenosti, kar so poskušali izboljšati z uporabo modificiranega protokola krajše izpostavljenosti (3 in 10 minut) (48). Pri trdnih snoveh pri Draizovem testu prihaja do spremenljivih in ekstremnih stanj izpostavljenosti, kar lahko pripelje do napačnih predpostavk njihovega resničnega dražilnega potenciala (OECD TG437). Pri identifikaciji snovi, ki ne povzročajo draženja (nekategorizirano), z metodo BCOP statistične primerjave z Draizovim testom kažejo na 69% stopnjo ujemanja, 69% lažno pozitivno in 0% lažno negativno stopnjo. Lažno negativni rezultati v primeru določanja dražilcev in lažno pozitivni rezultati v primeru določanja nedražilcev niso kritični, saj v vseh primerih podajajo vrednost $3 < IVIS \leq 55$, kar pomeni, da so potrebna nadaljnja testiranja z drugo potrjeno *in vitro* metodo ali Draizovim testom. Ker metoda BCOP pri določanju nedražilcev pravilno identificira zgolj 31% primerov, ta metoda ni primerna kot prvi korak v »bottom-up« pristopu testiranja, ki smo se ga posluževali, saj smo na podlagi zbranih podatkov sklepali, da preizkušani nanoprenašalci ne povzročajo draženja, ali je le-to blago. Zato smo metodo izvajali v drugi stopnji po določanju draženja z metodama RBC in NRU. Naslednja omejitev metode BCOP je nezmožnost napovedi reverzibilnosti poškodbe in napovedi dražilnosti snovi, ki povzročajo zakasnelo draženje na podlagi interakcije z

nukleinskimi kislinami in mitohondrijskimi proteini in ne takojšnje poškodbe celovitosti epitelija (46). Z razvojem novih metod, ki se jih poslužujejo raziskovalci, kot so ocenjevanje globine poškodbe roženice in histopatološke ocene roženice (OECD 106), bi lahko izboljšali ali odpravili omejitve pri napovedovanju z metodo BCOP (47).

Pri izvajanju metode smo morali motnost in permeabilnost ocenjevati ločeno, da smo lahko določili, če je bilo draženje povzročeno na podlagi ene ali obeh končnih točk (OECD TG437).

• DOLOČANJE MOTNOSTI ROŽENICE

Po načelu smernice OECD TG437 smo pred testiranjem nanoprenašalcev najprej preizkusili dražilni potencial 100% etanola, raztopine 0,9% NaCl, 30% trikloroocetne kisline, 20% fenilbutazona, 20% etilacetata in 20% amonijevega nitrata, katerih referenčne vrednosti so podane v smernici. Izmerjene rezultate smo primerjali z rezultati izmerjene motnosti pred inkubacijo s testirano snovjo. V primeru raztopine NaCl, ki se sicer smatra kot nedražilec in se jo uporablja kot negativno kontrolo, ni prišlo do spremembe v motnosti, oziroma je bila ta komaj zaznavna ($0,2 \pm 0,4$), pri čemer lahko sklepamo, da ni prišlo do proteinske interakcije. V primerih fenilbutazona ($12,1 \pm 8,2$), etilacetata ($6,7 \pm 1,5$) in amonijevega nitrata ($5,1 \pm 1,8$) je bila opažena sprememba v motnosti zaznavna, kar kaže na stopnjo interakcije s proteini in posledično nastanek motnosti roženice. Precejšnja razlika v izmerjeni motnosti je nastala v primeru etanola ($28,0 \pm 3,5$) in trikloroocetne kisline ($197,6 \pm 4,7$), kar pomeni, da lahko sklepamo, da je v tem primeru, sploh pri trikloroocetni kislini prišlo do močnih proteinskih interakcij. Na podlagi izmerjenih rezultatov lahko sklepamo, da je bila pri testiranih snoveh, razen pri raztopini NaCl, poškodba povzročena že pri določanju prve končne točke, vendar pa podatki ne zadostujejo za napoved IVIS in s tem dražilnega potenciala kemikalij. Rezultati stopnje motnosti so prikazani na sliki 25.

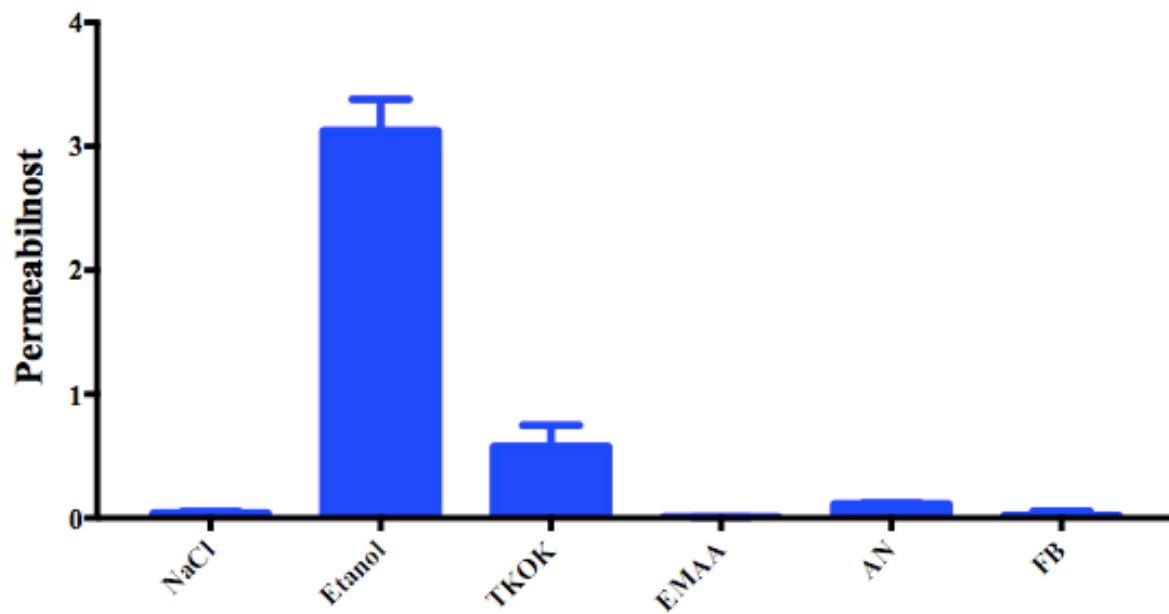


Slika 25: Prikaz vpliva preizkušanih snovi na motnost roženice

• DOLOČANJE PERMEABILNOSTI ROŽENICE

Permeabilnost roženice smo merili s kvantitativnim določanjem vsebnosti Na-fluoresceina, ki je prešel skozi epitelij, stromo in endotelij roženice. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 490 nm, pri kateri ima Na-fluorescein v obliki dianiona svoj maksimum (49).

Roženica, ki ima zaščitno funkcijo, je v normalnem stanju zaradi izjemno tesnih celičnih stikov v epiteliju, popolnoma neprehodna za fluorescein. Pri tej končni točki smo torej merili stopnjo poškodbe epitelija, ki nastane kot posledice erozije epitelija ali oteklina roženice. Pri merjenju permeabilnosti po inkubaciji s fluoresceinom za raztopino NaCl ($0,034 \pm 0,020$), fenilbutazona ($0,015 \pm 0,041$) in etilacetat ($0,003 \pm 0,005$), do permeabilnosti ni prišlo, oziroma je bila le-ta komaj zaznavna. Na podlagi teh rezultatov smo lahko sklepali, da preizkušane kemikalije niso povzročile poškodbe epitelija. Do vidne in tudi izmerjene permeabilnosti pa je prišlo v primeru etanola ($3,120 \pm 0,260$) in trikloroocetne kisline ($0,573 \pm 0,175$), kar pomeni, da sta kemikaliji povzročili poškodbo epitelija in izgubo njegove celovitosti. Izmerjene permeabilnosti snovi so prikazane na sliki 26.



Slika 26: Prikaz vpliva preizkušanih snovi na permeabilnost roženice

• RAZPRAVA DOBLJENIH REZULTATOV

Na podlagi kvantitativne določitve stopnje motnosti in permeabilnosti roženice preizkušanih snovi smo z enačbo 8 in preglednico XII določili dražilni potencial kemikalij in jih na koncu validacije primerjali z referenčnimi vrednostmi (OECD TG437 Annex 4). Med postopkom določanja obeh končnih točk smo lahko opazovali različen vpliv preizkušanih kemikalij na roženico.

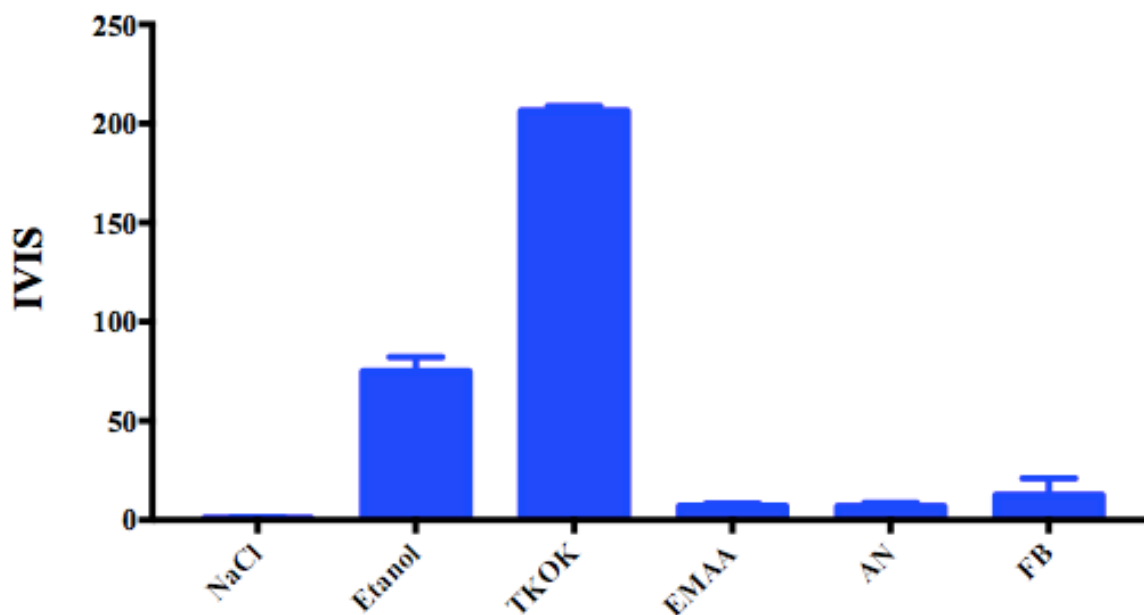
$$\text{IVIS} = \text{povprečna vrednost motnosti} + (15 \times \text{povprečna } OD_{490} \text{ vrednost}) \quad \text{Enačba 8}$$

Preglednica XII: Primerjava vrednosti IVIS in enot UN GHS

IVIS	UN GHS
≤ 3	Nekategorizirano
$> 3; \leq 55$	Brez sklepa
> 55	Kategorija 1

Raztopina NaCl (IVIS = $0,7 \pm 0,7$) na podlagi izmerjenih rezultatov ni povzročila ne motnosti kot tudi ne poškodbe epitelija in jo lahko na podlagi izračunanega IVIS uvrstimo v nekategorizirano skupino po UN GHS, torej skupino kemikalij, ki nimajo dražilnega potenciala. Kemikalije fenilbutazon (IVIS = $12,3 \pm 8,7$), etil 2-metilacetoacetat (IVIS = $6,8 \pm 1,5$) in amonijev nitrat (IVIS = $6,7 \pm 1,9$) so izkazovale mehanizem proteinske interakcije in posledičen nastanek motnosti roženice, niso pa imele vpliva na celovitost epitelija in jih na podlagi izračunanega IVIS lahko uvrstimo v kategorijo »brez sklepa«, ki določa območje blagih do zmernih dražilcev, za določanje le-teh pa metoda BCOP ni validirana. Potrebno je omeniti, da je prišlo pri fenilbutazonu do večjega odstopanja pri eni izmed treh preizkušanih roženic, vendar se njen posamičen IVIS rezultat od izračunanega povprečja ni razlikoval za več kot 10 IVIS enot, zato testa nismo rabili ponoviti (OECD TG437). Najizrazitejše so bile meritve etanola (IVIS = $74,8 \pm 7,4$) in trikloroocetne kisline (IVIS = $206,2 \pm 2,5$), ki sta izkazovala poškodbe tako na ravni interakcije s proteini kot tudi pri poškodbi epitelija. V primeru proteinske interakcije je prišlo do veliko večjega odziva pri trikloroocetni kislini, etanol pa je imel veliko večji vpliv na poškodbo epitelija. Obe kemikaliji lahko na podlagi izračunanega izida IVIS uvrstimo med resne dražilce oči

oziroma v kategorijo 1 po UN GHS. Rezultati IVIS so prikazani na sliki 27. Vse preizkušane snovi so sovpadale z referenčnimi vrednostmi, podanimi v smernici OECD TG437, tako da smo preizkušanje nadaljevali z določanjem dražilnega potenciala nanoprenašalcev.



Slika 27: Prikaz *in vitro* izida motnosti in permeabilnosti IVIS

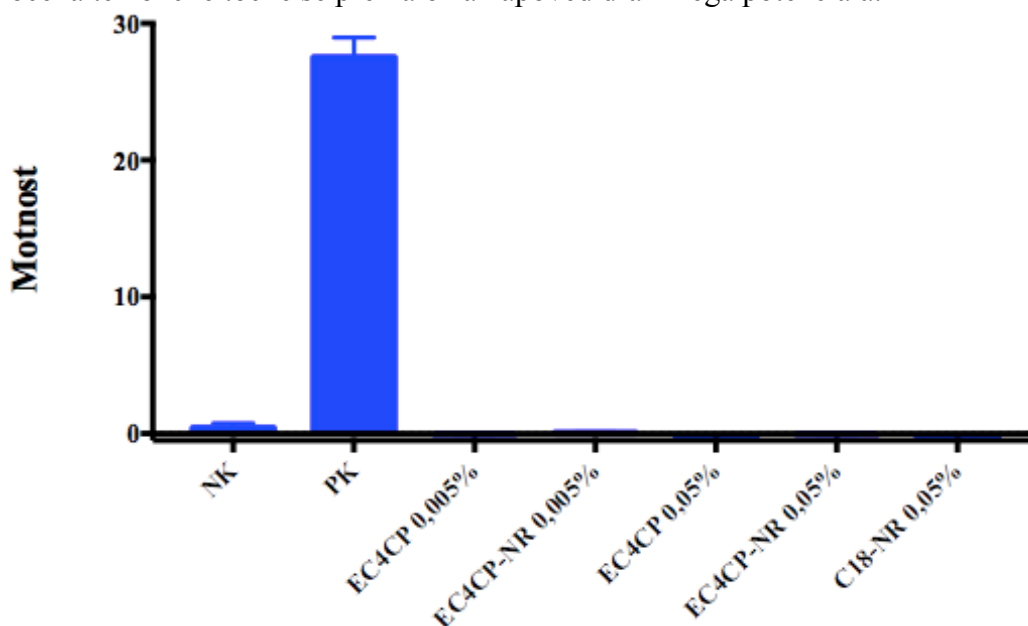
Potrebno se je zavedati, da je draženje oči posledica kompleksnega mehanizma toksičnosti, zaradi česar se je z uporabo *in vitro* metod težko približati Draizovemu testu. Možnost izboljšanja in napovedovanja mehanizma toksičnosti kemikalij bi lahko bila v bodoče histološka ocena roženice, s čimer bi lahko ocenili mehanizem toksičnosti: erozija, kondenzacija ali vakuolizacija epitelija, česar se v različnih raziskavah že poslužujejo (36, 50).

b) PREIZKUŠANJE NANOPRENAŠALCEV

• DOLOČANJE VPLIVA PREIZKUŠANIH KONCENTRACIJ NANOPRENAŠALCEV NA MOTNOST ROŽENICE

Po validaciji metode smo nadaljevali z določanjem stopnje motnosti roženice, povzročene z etilceluloznim nanoprenašalcem EC4CP z in brez vezanega lipofilnega barvila NR in večplastnim dendrimernim nanoprenašalcem C18 z vezanim NR. Izgled roženic med postopkom določanja motnosti je upodobljen na sliki 31.

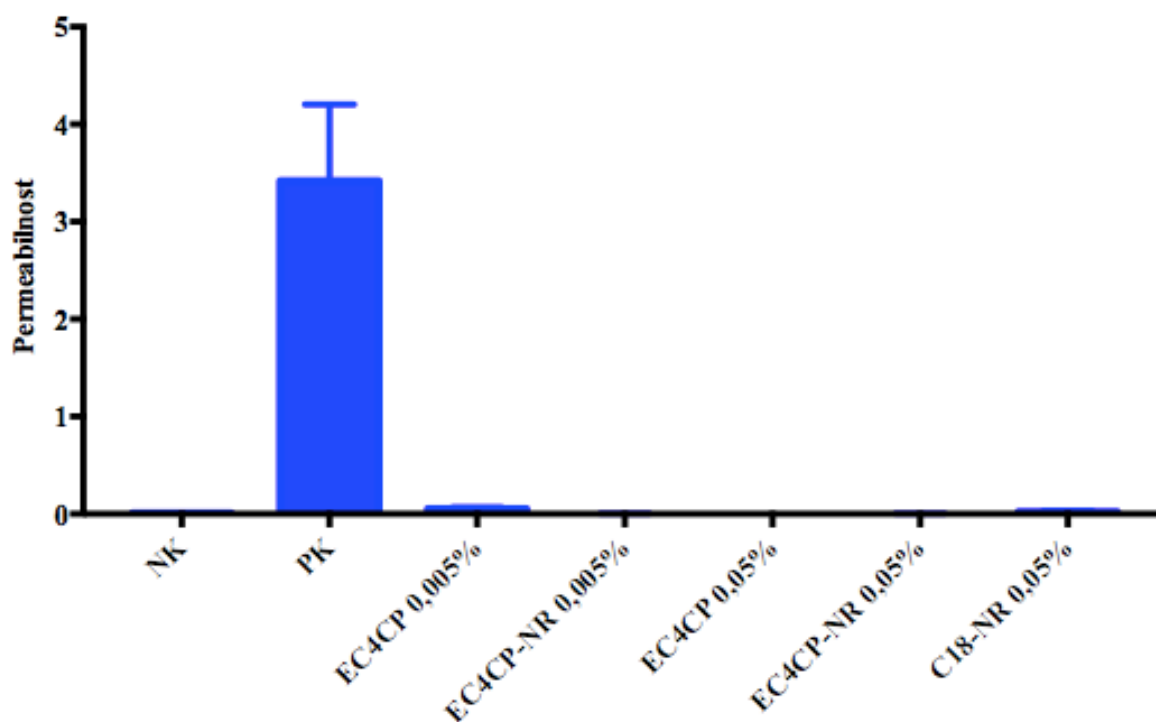
EC4CP, EC4CP-NR smo preizkušali pri koncentracijah 0,05% in 0,005%, nanoprenašalca C18-NR pa pri 0,05%. Kot negativno kontrolo smo uporabili destilirano vodo, kot pozitivno pa 100% etanol. Po inkubaciji in merjenju motnosti z opacitometrom smo ugotovili, da 0,05% EC4CP ($-0,20 \pm 0,10$), 0,005% EC4CP ($-0,6 \pm 0,5$), 0,05% EC4CP-NR ($0,00 \pm 0,01$), 0,005% EC4CP-NR ($0,050 \pm 0,03$), 0,05% C18-NR ($-1,0 \pm 1,1$) ne povzročajo motnosti roženice. Presenetil nas je negativen rezultat pri računanju razlike med začetno motnostjo in motnostjo po inkubaciji z nanoprenašalcema EC4CP in C18-NR. Predpostavljali smo, da je bil razlog v slabem spiranju roženic pred začetno inkubacijo. Stopnja motnosti, povzročene zaradi etanola ($27,5 \pm 1,5$), je sovpadala z vrednostjo pri validaciji metode, destilirana voda ($0,4 \pm 0,3$), ki je služila kot negativna kontrola, pa je povzročila komaj zaznavno motnost. Na podlagi rezultatov prikazanih na sliki 28 tako lahko sklepamo, da testirani nanoprenašalci ne povzročajo proteinskih interakcij, vendar je ocena te končne točke še premalo za napoved dražilnega potenciala.



Slika 28: Prikaz vpliva preizkušanih nanoprenašalcev na motnost roženice

• **DOLOČANJE VPLIVA PREIZKUŠANIH KONCENTRACIJ NANOPRENAŠALCEV NA PERMEABILNOST ROŽENICE**

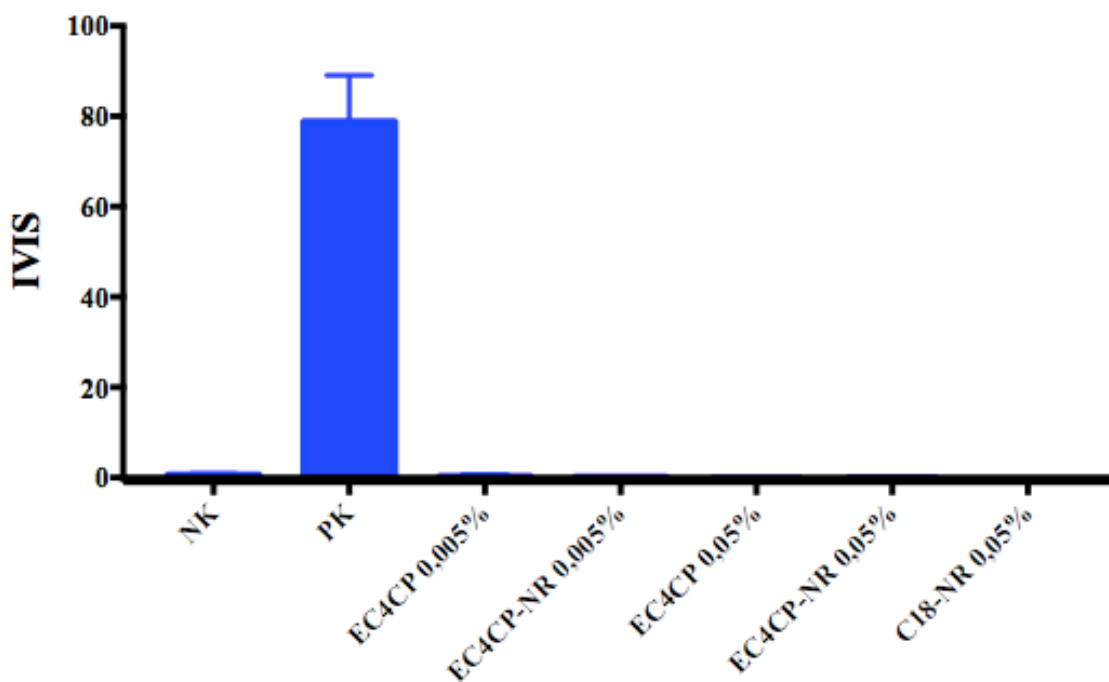
Pri določanju permeabilnosti Na-fluoresceinata z UV/VIS spektrofotometrom pri 490 nm smo nadaljevali s preizkušanjem nanoprenašalcev in etanolom kot pozitivno kontrolo ter destilirano vodo kot negativno kontrolo. Na podlagi izmerjenih rezultatov 0,05% EC4CP ($0,000 \pm 0,002$), 0,005% EC4CP ($0,05 \pm 0,017$), 0,05% EC4CP-NR ($0,00 \pm 0,01$), 0,05% C18-NR ($0,020 \pm 0,012$) lahko tako kot pri določanju motnosti, sklepamo, da tudi pri določanju te končne točke, nanoprenašalci ne izkazujejo toksičnega učinka na epitelij, saj do permeabilnosti praktično ni prišlo. Na podlagi etanola ($3,417 \pm 0,787$), katerega vrednost je korelirala z vrednostjo, izmerjeno pri validaciji metode in destilirane vode ($0,007 \pm 0,004$), ki ni povzročila permeabilnosti, lahko sklepamo, da je bilo merjenje uspešno. Na podlagi meritev nanoprenašalcev upodobljenih na sliki 29 lahko sklepamo, da noben ne povzroča poškodbe epitelija.



Slika 29: Prikaz vpliva preizkušanih nanoprenašalcev na permeabilnost roženice

• RAZPRAVA DOBLJENIH REZULTATOV

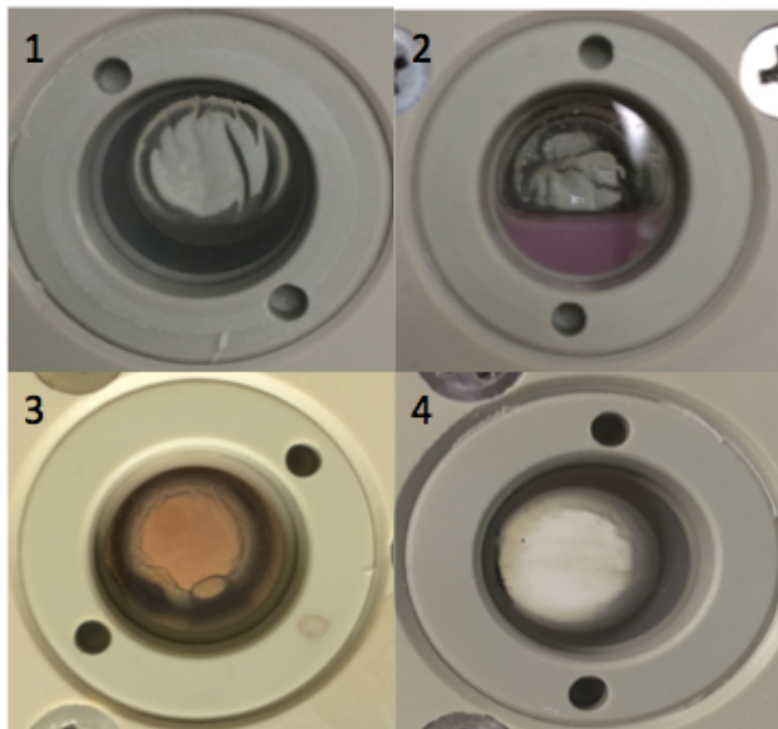
Kot pri validaciji metode smo tudi pri preizkušanju dražilnega potenciala nanoprenašalcev na podlagi kvantitativne določitve motnosti in permeabilnosti roženice preizkušanim nanoprenašalcem z enačbo 8 in preglednico XII določili njihov dražilni potencial. Na podlagi izračunov IVIS za 0,005% EC4CP ($0,2 \pm 0,6$), 0,05% EC4CP ($-0,20 \pm 0,20$), 0,005% EC4CP-NR ($0,06 \pm 0,05$), 0,05% EC4CP-NR ($0,00 \pm 0,02$) in 0,05% C18-NR ($-0,7 \pm 1,2$), ki so prikazani na sliki 30, lahko predpostavimo, da tako etilcelulozni nanoprenašalec EC4CP z in brez vezanega barvila nilsko rdeče v koncentracijah 0,05% in 0,005%, kot tudi večplastni dendrimerni nanoprenašalec C18 z vezanim barvilom spadajo po UN GHS v nekategorizirano skupino, kar pomeni, da ne povzročajo draženja oči. Na podlagi izmerjenega IVIS za etanol ($78,7 \pm 10,3$), katerega vrednost je korelirala z vrednostjo, izmerjeno pri validaciji metode in IVIS destilirane vode ($0,5 \pm 0,4$), lahko sklepamo, da je bilo merjenje uspešno.



Slika 30: Prikaz *in vitro* izida motnosti in permeabilnosti IVIS

Na podlagi ocene in potrditve metode BCOP s strani ICCVAM, ECVAM in JaCVAM, je metoda BCOP potrjena kot metoda, ki omogoča pravilno identifikacijo resnih dražilcev oči (UN GHS kat 1.) in snovi, ki ne potrebujejo klasifikacije kot resni dražilci ali dražilci (UN GHS nekategorizirano), brez potrebnega nadaljnjega testiranja. V našem primeru smo na podlagi meritev in izračuna IVIS dokazali, da se oba nanoprenašalca EC4CP in C18

uvrščata v skupino nekategorizirano, kar pomeni, da lahko z veliko gotovostjo trdimo, da nista dražilca oči in ne potrebujeta nadaljnjega testiranja.



Slika 31: (1) Roženica po prvotni inkubaciji z medijem EMEM pred nanosom C18-NR, (2) Roženica po nanosu C18-NR, (3) Roženica po enourni inkubaciji z C18-NR, (4) Roženica po trikratnem spiranju z EMEM z in na koncu brez indikatorja fenol rdeče.

6 SKLEP

V koraku validacije metod smo ugotovili:

- Pri metodi privzema barvila nevtralnno rdeče so vrednosti IC_{50} in KB_{50} snovi SDS in DMSO dobro sovpadale z referenčnimi vrednostmi. Pri BCL je prišlo do večjih odstopanj, kar smo si razlagali z nastankom ireverzibilne precipitacije barvila nevtralnno rdeče in možnim učinkom BCL na pritrditev celic na dno vdolbinic plošče. Pri testiranju vsebnosti proteinov smo na podlagi rezultatov sklepali, da je prišlo med BCL in barvilom brilijantno modro do interakcije, kar je lahko bil možen razlog odstopanj v meritvah.
- Pri metodi rdečih krvničk sta vrednosti H_{50} za SDS in BCL sovpadali z rezultati referenčnih meritev, vendar je prišlo do odstopanj pri merjenju proteinske denaturacije. Slednje pri preizkušanju ni imelo kritičnega pomena, saj preizkušani nanoprenašalci niso imeli vpliva na proteinsko denaturacijo, kar pomeni, da je zadostovala validacija stopnje povzročene hemolize.
- Izmerjene vrednosti za motnost, permeabilnost in IVIS pri metodi za določanje motnosti in permeabilnosti roženice goveda za etanol, trikloroocetno kislino, etil 2-metilacetoacetat, amonijev nitrat in fenilbutazon, so popolnoma sovpadale z referenčnimi vrednostmi, vendar bi lahko v bodoče nastalo poškodbo roženice še dodatno histopatološko ocenili, kar bi omogočilo oceno (i)reverzibilnosti poškodbe.

Pri preizkušanju dražilnega potenciala nanoprenašalcev smo ugotovili:

- Pri metodi privzema barvila nevtralnno rdeče tako pri etilceluloznima nanoprenašalcema z in brez vezanega barvila nilsko rdečega kot tudi pri večplastnemu dendrimernemu nanoprenašalcu z vezanim barvilom nilsko rdeče pri preizkušanih koncentracijah ni prišlo do citotoksičnega učinka, zato jim nismo mogli izmeriti vrednosti IC_{50} in KB_{50} .
- Pri metodi rdečih krvničk nanoprenašalci niso poškodovali celične membrane rdečih krvničk in posledično niso imeli vpliva na sproščen oksihemoglobin, zato tudi tukaj vrednosti H_{50} in denaturacijskega indeksa nismo mogli določiti.
- Pri metodi za določanje motnosti in permeabilnosti roženice goveda nanoprenašalci niso povzročili motnosti roženice in niso interagirali z epitelijem roženice, končni IVIS je bil v primeru obeh preizkušanih koncentracijah < 3 , kar pomeni, da preizkušane nanoprenašalce po UN GHS uvrčamo v skupino nekategorizirano, ki ne potrebuje nadaljnje testiranja.

Na podlagi izmerjenih rezultatov lahko trdimo, da nanoprenašalci v preizkušanih koncentracijah 0,005% in 0,05% (in v primeru NRU tudi 0,10%) ne povzročajo draženja očesa in bi se potencialno lahko uporabljali v nadaljnjih preizkusih kot dostavni sistemi učinkovin za lokalno uporabo.

7 LITERATURA

1. P. Hunter et al, Toxic brew we cannot live without. Micronutrients give insights into the interplay between geochemistry and evolutionary biology., *EMBO*, 9, 2008, 15 – 18
2. C. Kent, *Basics of Toxicology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998, 402
3. S. Parasuraman, Toxicological screening, *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2, 2011, 74 – 79
4. <http://echa.europa.eu/sl/regulations/reach/understanding-reach> (21.06.2016)
5. http://www.prc.cnrs-gif.fr/reach/sl/toxicological_data.html (21.06.2016)
6. <https://osha.europa.eu/sl/themes/dangerous-substances/reach> (27.06.2016)
7. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/> (28.06.2016)
8. V. Zuang et al, EURL ECVAM progress report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods, Joint Research Centre's Scientific and policy reports, 2013, 1 – 50
9. OECD TG404 TG405 - Organisation for Economic Co-operation and Development, Revised Proposal for Updated Test Guidelined 404 and 405, 2001, 2 – 13
10. ECHA Guidlines R.7.2-2/3 on the Integrated Testing Strategy (ITS) assesing skin corrosion and irritation potential of substances, 191 – 195
11. L. Lewin, H. Guillery, *Die Wirkungen von Arzneimitteln und Giften auf das Auge*, August Hirschwald, Berlin, 1913, 40 – 85
12. J.H. Draize et al, Methods for study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82, 1944, 377–390
13. Guidance document on Integrated Approached to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion, 2014, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, 2014, 19, 20 – 24
14. A. Rougier et al, In vitro methods: their relevance and complementarity in ocular safety assessment., *Lens Eye Toxic Research*, 9, 1992, 45
15. <http://www.oecd.org/about/whatwedoandhow/> (22.07.2016)
16. U.S. EPA, *Label Review Manual: 3rd Edition*, EPA737-B-96-001, Washington, DC, U.S., Environmental Protection Agency

17. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), 4, 2011, New York & Geneva, 568
18. X. Yang et al, Preliminary study on neutral red uptake assay as an alternative method for eye irritation test, Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments, 14, 2007, 509 – 514
19. Anon, White Paper on a Strategy for a Future Chemicals Policy, COM, 2001, 1 – 32
20. Regulation European Commission (EC) No. 1272/2008 of the European Parliament and of the Council, 2008, Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures, amending and repealing Directives, 2006, 1907, 1 – 1355.
21. EURL-ECVAM, Chapter 5: Local Toxicity: Acute Dermal and Ocular Effects, 1, 2002, 35 – 47
22. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm> (29.06.2016)
23. R. Duncan, The dawning era of polymer therapeutics., Nature Reviews Drug Discovery, 2, 2003, 60 – 347
24. W. De Jong et al, Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards, International Journal in Nanomedicine, 3, 2008, 133 – 149
25. M. Ferrari, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges., Nature Reviews Cancer, 5, 2005, 71 – 161
26. A. B. Lokhande et al., Preparation and characterization of repaglinide loaded ethylcellulose nanoparticles by solvent diffusion technique using high pressure homogenizer, Journal of Pharmacy Research, 7, 2013, 421 – 426
27. M.R. Radowski et al, Supramolecular Aggregates of Dendritic Multishell Architectures as Universal Nanocarriers, Angewandte Chemie, Int. Ed., 46, 2007, 1265 – 1269
28. S. Naahid et al, Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery, Journal of Controlled Release, 166, 2013, 182 – 194
29. B. Baroli, Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality?, Journal of Pharmaceutical Sciences, 99, 2010, 21 – 50
30. A. Nel et al, Toxic potential of materials at the nanolevel, Science, 311, 2006, 622 - 627
31. P. HM Hoet et al, Nanoparticles – known and unknown health risks, Journal of Nanobiotechnology, 12, 2004, 1 – 15

32. G. Oberdorster et al, Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy, *Particle and Fibre Toxicology*, 2, 2005, 8
33. http://epa.gov/ncer/rfa/current/2003_nano.html (30.06.2016)
34. <http://echa.europa.eu/regulations/nanomaterials> (30.06.2016)
35. J. Reineke, Nanotoxicity, Department of Pharmaceutical Sciences Eugene Applebaum College of Pharmacy and Health Sciences, Wayne State University, 2012, 1 – 10
36. G.E. Costin et al, Protocol refinement of the bovine corneal and opacity permeability (BCOP) test for eye irritation, IIVS, 2006
37. H. Spielmann et al, Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany, *Toxicology in Vitro*, 5, 1991, 539 – 542
38. S. Kalweit et al, A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test., *Toxicology in vitro*, 4, 1990, 702 – 706
39. M. Bartok et al, Reduction of cytotoxicity of benzalkonium chloride and octenidine by Brilliant Blue G., *EXCLI Journal*, 14, 2015, 123 – 132
40. N. Alnasif et al, Penetration of normal, damaged and diseased skin – An in vitro study of dendritic core-multishell nanotransporters, *Journal of Controlled Release*, 180, 2014, 45 – 50
41. I. Gerner et al, Assessment of the Eye Irritating Properties of Chemicals by Applying Alternatives to the Draize Rabbit Eye Test: The Use of QSARs and In Vitro Tests for the Classification of Eye Irritation, *ATLA*, 33, 2005, 215 – 237
42. H. Abdelkader et al, Critical appraisal of alternative irritation models: three decades of testing ophthalmic pharmaceuticals., *British Medical Bulletin*, 113, 2015, 59 – 71
43. W.G. Zijlstra et al, Visible and Near Infrared Absorption Spectra of Human and Animal Haemoglobin, VSP BV, Utrecht, Boston, Köln, Tokyo, 2010, 119 – 127
44. ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol N°37, Red Blood Cell Test System
45. H. Ahyayauch et al, Detergent Effects on Membranes at Subsolubilizing Concentrations: Transmembrane Lipid Motion, Bilayer Permeabilization, and Vesicle Lysis/Reassembly Are Intependent Phenomena, *Langmuir*, 26, 2010, 7307 – 7313
46. S. Kumar et al, Impact of structural differences in hyperbranched polyglycerol-polyethylene glycol nanoparticles on dermal drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88, 2014, 625 – 634

47. M. Bartok et al, Development of an in vitro ocular test system for the prediction of all three GHS categories, *Toxicology in Vitro*, 29, 2015, 72 – 80
48. R. Sjöback et al, Absorption and fluorescence properties of fluorescein, *Spectrochimica Acta Part A*, 51, 1995, 7 – 21.
49. Report from the Bovine corneal opacity and permeability Technical Workshop, 3-4, 1997 - 1998. *In vitro and Molecular Toxicology* 11, 315 – 351
50. H. Abdelkader, Conjunctival and corneal tolerability assessment of ocular naltrexone niosomes and their ingredients on the hen's egg chorioallantoic membrane and excised bovine cornea models, *International Journal of Pharmaceutics*, 432, 2012, 1 – 10

8 PRILOGE

Zaradi nazornejšega podajanja smo se tekom naloge posluževali imena »kenacid modro«, ki je načeloma 0,04% raztopina briljantno modrega R, ki smo ga uporabljali.



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone (800) 325-5832 • (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: sigma-techserv@sial.com
Internet: www.sigma-aldrich.com

Technical Service

IN VITRO TOXICOLOGY ASSAY KIT KENACID BLUE BASED

Stock No. TOX-5

Store at Room Temperature

**IT IS RECOMMENDED THAT THE ENTIRE PROTOCOL
BE REVIEWED BEFORE STARTING THE ASSAY.**

Product Description

Traditionally, the in vitro determination of toxic effects of unknown compounds has been performed by counting viable cells after staining with a vital dye. Alternative methods used are measurement of radioisotope incorporation as a measure of DNA synthesis, counting by automated counters and others which rely on dyes and cellular activity. The Kenacid Blue Assay System is a means of measuring total biomass via staining of cellular proteins by the dye Brilliant Blue R¹.

The Kenacid Blue Assay, as originally developed by Knox et al.¹ is simple, accurate and yields reproducible results. The key component is the dye, Brilliant Blue R (identified as kenacid blue R in the original citation¹). The cells are briefly washed, fixed and stained with the dye. The incorporated dye is then liberated from the cells in an extraction solution. An increase or decrease in the number of cells (total biomass) results in a concomitant change in the amount of dye incorporated by the cells in the culture. This indicates the degree of cytotoxicity caused by the test material.

REAGENT

For Research Use Only.
Not for Use in Diagnostic Procedures.

Kit Components

Product No.	Item	Quantity
K3880	Kenacid Blue Assay Stain Solution (0.04% Brilliant Blue-R)	100 ml

D1283	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), 10X	100 ml
G6257	Glutaraldehyde, 25%	2x10 ml
K3755	Kenacid Blue Assay Extraction Solution	125 ml
K4005	Kenacid Blue Wash, 5X	2x50 ml

WARNING: Components in this kit should be carefully handled when using. Glutaraldehyde may be harmful if swallowed, inhaled, or absorbed through skin.

Product Storage

Kit components should be stored at room temperature.

Procedure

The kenacid blue method of monitoring in vitro cytotoxicity is well suited for use with multiwell plates. For best results, cells in the log phase of growth should be employed and final cell number should not exceed 10⁶ cells/cm². Each test should include a blank containing complete medium without cells.

1. Remove cultures from incubator into laminar flow hood or other sterile work area.
2. Remove medium and wash cells 3 times with 1X DPBS. 1X DPBS is prepared by diluting 10 ml of 10X DPBS [D1283] into 90 ml of sterile water.
3. Prepare fixative (3% glutaraldehyde) by diluting each bottle of 25% glutaraldehyde [G6257] with 70 ml of 1X DPBS prepared above. Fix the cells by gently removing DPBS and replacing with a volume of fixative equal to the original volume of culture medium.
4. Incubate plate for 10-20 minutes at room temperature. Blank background optical density is measured in wells incubated with growth medium without cells.

For additional technical information visit our website at <http://www.sigma-sial.com>

*Sigma is a Member of the Sigma-Aldrich Family
Providing Biochemicals and Reagents for Life Science Research.*

Podatki za etilcelulozni nanoprenašalec (EC4CP):

Probenbegleitzettel

Datum: 09.01.2015

Mitarbeiter: Benjamin Balzus

Laborjournalnummer: 1

090115EC4CP

AG Haag

Tel.: +49 30 838 50625

Batchnummer:

Chemische Struktur/Formulierung/Beladung:
Ethylcellulose (EC4CP) Nanopartikel ohne
Dexamethasone

Partikelgröße: DLS

Z-Average: 108,3 nm ; PDI: 0,128

Löslichkeit/Medium:

Medium: wässrige 2,5% PVA Lösung

Polymerkonzentration: 1%

Polymerlöslichkeit: unlöslich

Stabilität/Lagerung: autoklavierbar, Lagerung
verschlossen bei Raumtemperatur