

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NASTA MELE

**IZDELAVA IN FIZIKALNO-KEMIJSKO TER BIOLOŠKO
VREDNOTENJE NANODELCEV IZ HITOSANA IN
FOSFOLIPIDA S PROTEINSKO UČINKOVINO**

**PREPARATION AND PHYSICOCHEMICAL AND
BIOLOGICAL EVALUATION OF
CHITOSAN-PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES WITH A
PROTEIN DRUG**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Petre Kocbek, mag. farm. HPLC meritve so opravili na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm. in somentorici asist. dr. Petri Kocbek, mag. farm. za vse strokovne nasvete, predloge in pomoč. Bili sta mentorici v pravem pomenu besede, saj sta mi bili vedno na razpolago, ko sem ju potrebovala, mi nudili spodbudo in verjeli vame. Hvala tudi tehnični sodelavki Tatjani Hrovatič, ing. kem. tehn. za vso pomoč in praktične nasvete pri opravljanju eksperimentalnega dela diplomske naloge ter osebju na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, kjer so opravili HPLC analize. Zahvala gre tudi vsem kolegicam diplomantkam, ki so z mano delile svoje izkušnje in mi s svojo prisotnostjo polepšale dneve v laboratoriju.

Posebna zahvala pa gre vsem mojim bližnjim - moji družini in vsem prijateljem za vso podporo in spodbudo skozi vsa leta študija. Hvala, da ste me spremljali na poti do zelenega cilja, in bili ob meni, ko sem vas potrebovala.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Petre Kocbek, mag. farm.

Nasta Mele

Ljubljana, november 2010

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Andrej Umek, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	I
ABSTRACT	III
SEZNAM OKRAJŠAV	IV
1 UVOD	1
1.1 NANODELCI.....	1
1.1.1 Izdelava nanodelcev	2
1.1.2 Hitosan	3
1.1.3 Lecitin.....	4
1.1.4 Velikost nanodelcev	5
1.1.5 Električni dvosloj in zeta potencial	6
1.2 PROTEINI.....	8
1.2.1 Nestabilnost proteinov.....	9
1.2.2 Peroralni vnos proteinov	10
1.2.3 Označevanje proteinov s fluorescentnimi markerji.....	11
1.2.4 Tržno zanimive proteinske učinkovine – kandidatke za peroralni vnos	12
1.3 CELIČNA LINIJA CACO-2 KOT MODEL ZA IN VITRO ŠTUDIJE PREHODA UČINKOVIN	20
2 NAMEN DELA	24
3 EKSPERIMENTALNI DEL	25
3.1 MATERIALI.....	25
3.2 NAPRAVE.....	27
3.3 METODE	28
3.3.1 Priprava raztopin	28
3.3.2 Izdelava nanodelcev	29
3.3.3 Fizikalno vrednotenje nanodelcev	31
3.3.4 Spreminjanje velikosti molekule PZU v odvisnosti od časa	31
3.3.5 Učinkovitost vgrajevanja PZU v nanodelce.....	32
3.3.6 Vpliv dodatka disperzije nanodelcev na pH rastnega medija	32
3.3.7 Ugotavljanje viabilnosti celic.....	32
3.3.8 Fluorescentno označevanje PZU	33
3.3.9 Gojenje celične linije Caco-2	34

3.3.10	Vstop označene PZU in nanodelcev z vgrajeno označeno PZU v celice ter priprava preparatov	35
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	37
4.1	IZDELAVA PRAZNIH NANODELCEV	37
4.1.1	Nanodelci iz hitosana (pH 5) in lecitina.....	38
4.1.2	Nanodelci iz hitosana (pH 4) in lecitina.....	40
4.1.3	Nanodelci iz hitosana (pH 6) in lecitina.....	41
4.1.4	Nanodelci iz hitosana in TPP	43
4.2	IZDELAVA NANODELCEV S PROTEINSKO ZDRAVILNO UČINKOVINO	44
4.2.1	Nanodelci s PZU iz hitosana (pH 5) in lecitina.....	44
4.2.2	Nanodelci s PZU iz hitosana (pH 4 in pH 6) in lecitina.....	46
4.2.3	Nanodelci s PZU iz hitosana in TPP	49
4.3	SPREMINJANJE VELIKOSTI MOLEKULE PROTEINSKE ZDRAVILNE UČINKOVINE V ODVISNOSTI OD ČASA.....	50
4.4	UČINKOVITOST VGRAJEVANJA PROTEINSKE ZDRAVILNE UČINKOVINE V NANODELCE.....	52
4.4.1	Učinkovitost vgrajevanja PZU v nanodelce iz hitosana in lecitina.....	52
4.4.2	Učinkovitost vgrajevanja PZU v nanodelce iz hitosana in TPP.....	56
4.5	POSKUSI NA KULTURI CACO-2 CELIC	57
4.5.1	Obnašanje nanodelcev v rastnem mediju in njihov vpliv na pH medija	57
4.5.2	Vpliv nanodelcev na viabilnost celic	58
4.5.3	Vstop nanodelcev v Caco-2 celice	60
5	SKLEP.....	69
	LITERATURA	70

POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil izdelati fizikalno stabilne nanodelce ustrezne velikosti, v katere bi se vgradil čim večji delež proteinske zdravilne učinkovine¹, hkrati pa bi omogočali dostavo proteina v celice. Ker je sedaj vnos te zdravilne učinkovine zaradi njene proteinske narave omejen le na invazivno intravensko ali podkožno injiciranje, smo s svojim delom želeli narediti korak bližje k razvoju oblike za peroralno dajanje.

Nanodelce smo izdelali z metodo spontanega združevanja polimera (hitosan) in lipida (lecitin) preko ionskih interakcij, saj le-ta ne zahteva dodatnega vnosa energije in je zato primerna za vgrajevanje občutljivih proteinskih učinkovin. S spreminjanjem koncentracije hitosana, pH, vrste fosfolipida (Phospholipon[®] 80 in Phospholipon[®] 50) ter koncentracije proteina smo izdelali nanodelce, ki smo jim določili velikost, polidisperzni indeks in zeta potencial. Ugotovili smo, da se velikost nanodelcev spreminja glede na količino hitosana v sistemu in da razmerje med hitosanom in lecitinom določa zeta potencial ter posledično vpliva na fizikalno stabilnost disperzije. Uporaba Phospholipona[®] 50 je pri vseh vzorcih dala bolj negativne vrednosti zeta potenciala. Nanodelci z ustrežnejšimi fizikalnimi lastnostmi so nastali iz Phospholipona[®] 80 in manjšo količino proteinske zdravilne učinkovine. Z merjenjem velikosti z uporabo Zetasizerja Nano ZS smo dokazali tudi, da se velikost proteinske molekule po odtalitvi poveča in da narašča s časom ter s temperaturo.

Učinkovitost vgrajevanja proteinske zdravilne učinkovine v nanodelce smo ugotavljali posredno s HPLC analizo. Ker je bila le-ta precej nizka in ni presegla 10 %, sklepamo, da je poglaviti razlog nepopolna ločba nanodelcev od disperznega medija. Lecitin kot komponenta nanodelcev ima manjšo gostoto od vode, kar je otežilo centrifugiranje in verjetno dalo lažno slabši rezultat.

Pri načrtovanju farmacevtske oblike je potrebno zagotoviti, da učinkovina pride na želeno mesto v organizmu. Pri preučevanju le-tega lahko uporabimo npr. kulturo Caco-2 celic, ki služi kot model epiteljske bariere. S pripravo različnih celičnih preparatov in barvanjem celičnih organelov smo pod fluorescenčnim mikroskopom ugotovili, da ima sama proteinska zdravilna učinkovina afiniteto do celičnih membran, saj se nanje adsorbira, medtem ko vgrajena v nanodelce preide preko membrane v notranjost celic. Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da nanodelci iz hitosana in lecitina omogočajo dostavo

¹ Diplomsko delo je bilo del raziskav iz industrije, zato proteinske zdravilne učinkovine ne smemo imenovati.

proteinske zdravilne učinkovine v celice, kar je bistvenega pomena pri peroralnem vnosu proteinskih učinkovin.

ABSTRACT

The aim of this work was to prepare physically stable and suitably sized nanoparticles, use them to encapsulate a protein drug and thus enable protein delivery into cells. Since the protein drug is currently only available for intravenous and subcutaneous application we wanted to explore the possibility of its oral administration.

The nanoparticles were prepared by spontaneous electrostatic association between a polymer (chitosan) and a lipid (lecithin). Because the method does not require any additional energy it is suitable for sensitive protein drug. We prepared nanoparticles using different formulations which varied in chitosan concentration, pH, the phospholipid used (Phospholipon[®] 80 and Phospholipon[®] 50) and protein drug concentration. Subsequently their size, polydispersity index and zeta potential were evaluated. We discovered that the nanoparticles' size depends on the amount of chitosan in the system and that the mass ratio chitosan : lecithin defines the zeta potential and the physical stability of the dispersion. When we used Phospholipon[®] 50 nanoparticles with lower zeta potential were obtained. The most suitable nanoparticles were prepared from Phospholipon[®] 80 and a small amount of the protein drug. Additionally we measured the size of the protein drug and concluded that its size after defrost increases with time and increasing temperature.

The encapsulation efficiency was determined indirectly using HPLC analysis and it was rather low, i.e. under 10 %. Presumably the main reason for low encapsulation efficiency is the inability to completely separate nanoparticles from the dispersion media. Since lecithin (a component of the nanoparticles) has lower density than water the centrifugation was hindered and hence falsely low results were obtained.

When designing a pharmaceutical dosage form we have to ensure targeted delivery of the drug to a specific location in the organism. Studies of targeted delivery can be performed using Caco-2 cells, which represent a model of an epithelial barrier. By preparing several microscope specimens and colouring cell organelles two discoveries were made. Firstly, the protein drug has an affinity for cell membranes and it is adsorbed to these membranes. Secondly, the protein drug encapsulated into nanoparticles can pass through cell membranes into the cell. Therefore we can conclude that chitosan/lecithin nanoparticles enable delivery of the protein drug into the cell which is of key importance for per os administration.

SEZNAM OKRAJŠAV

AK - aminokislina

d – povprečni premer nanodelcev

EPO – eritropoetin

HIT – hitosan

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

i.v. – intravenska aplikacija

PBS – izotonični fosfatni pufer, pH 7,4

PDI – polidisperzni indeks

pI – izoelektrična točka

PL50 – Phospholipon[®] 50

PL80 – Phospholipon[®] 80

PZU – proteinska zdravilna učinkovina

SB – sladkorna bolezen

s.c. – podkožna (subkutana) aplikacija

sCT – lososov kalcitonin (angl. salmon calcitonin)

TPP – natrijev tripolifosfat

ZP – zeta potencial

1 UVOD

20. in 21. stoletje bi lahko označili kot čas intenzivnega razvoja bio- in nano-tehnologije. Razvoj na področju biotehnologije je omogočil industrijsko izdelavo številnih rekombinantnih bioloških učinkovin, ki so jih v preteklosti izolirali iz organizmov in so bile zato na voljo v zelo omejenih količinah. Razvoj na področju nanotehnologije pa teži k izdelavi naprednih nanodostavnih sistemov za učinkovit in neinvaziven vnos teh biotehnoloških zdravilnih učinkovin v organizem. Poleg tega posega nanotehnologija tudi na druga, nezdravstvena področja, saj se poleg številnih farmacevtskih tudi mnoga nefarmacevtska podjetja ukvarjajo z razvojem materialov, ki ustrezajo definiciji »nano«. V tej diplomski nalogi sta združeni obe področji, saj smo v nanodelce vgrajevali biotehnološko pridobljeno proteinsko zdravilno učinkovino.

1.1 NANODELCI

Nanodelci so koloidni sistemi v velikosti od 10-1000 nm. Delimo jih v 2 skupini: nanokapsule in nanosfere. Nanokapsule so vezikularni sistemi iz polimerne ovojnice in jedra, v katerem se nahaja učinkovina, medtem ko imajo nanosfere učinkovino dispergirano ali raztopljeno po celotnem polimernem ogrodju [1].

Nanodelci imajo mnogo pozitivnih lastnosti, zato so v današnjem času zelo popularni in kot taki predmet številnih raziskav. V prebavnem traktu so stabilnejši od ostalih koloidnih sistemov (npr. liposomov), hkrati pa tudi varujejo vgrajeno učinkovino pred ostrimi pogoji gastrointestinalnega trakta. Z uporabo različnih polimerov lahko spreminjamo fizikalno-kemijske lastnosti nanodelcev, uravnavamo sproščanje učinkovine iz njih (podaljšano, zakasnjeno sproščanje), vplivamo na bioadhezijo, tarčno dostavo ali privzem nanodelcev v celice ter tako dosežemo želene karakteristike dostavnega sistema. Z adsorpcijo ali kemijsko vezavo določenih molekul (npr. polietilenglikol (PEG), poloksamer, biološko aktivne molekule) na površino nanodelcev lahko spreminjamo tudi njihove površinske lastnosti. Ker so posamezni delci izredno majhni, je njihova skupna specifična površina velika, kar pripomore k boljši absorpciji v primerjavi z večjimi sistemi [1].

Za izdelavo polimernih nanodelcev lahko uporabimo enega od številnih znanih polimerov, vendar mora biti le-ta biokompatibilen, biorazgradljiv in omogočati mora karseda

enostavno izdelavo nanodelcev. Lastnosti polimera vplivajo na velikost nastalih nanodelcev ter na profil sproščanja učinkovine. Tako naravni polimeri navadno omogočajo relativno hitro sproščanje učinkovine iz nanodelcev, medtem ko lahko s sintezni polimeri dosežemo prirejeno npr. podaljšano sproščanje. Od polimera je velikokrat odvisna tudi izbira metode za izdelavo nanodelcev, hkrati pa ima na to velik vpliv tudi topnost učinkovine, ki jo želimo vgraditi. Najpogosteje uporabljeni sintezni polimeri so polimlečna kislina (PLA), kopolimer mlečne in glikolne kisline (PLGA), polikaprolakton (PCL), med naravnimi pa se najpogosteje poslužujemo albumina, želatine, alginatov, kolagena ali hitosana. Med temi polimeri je še posebej cenjen hitosan, ker deluje tudi kot pospeševalec absorpcije, za izdelavo nanodelcev pa ne zahteva prisotnosti organskih topil [1].

1.1.1 Izdelava nanodelcev

Nanodelce lahko izdelamo na različne načine. Z metodo nanoprecipitacije, ki je primerna predvsem za vgrajevanje lipofilnih učinkovin, lahko izdelamo nanosfere, medtem ko lahko z metodo emulgiranja in kasnejšega odhlapevanja topila izdelamo nanosfere ali nanokapsule in vanje vgradimo tako lipofilno kot hidrofilno učinkovino. Sintezni polimer raztopimo v organskem topilu, ki se z vodo ne meša, emulgator in/ali stabilizator pa v vodni fazi, nato pa glede na učinkovino pripravimo emulzijo olje v vodi (O/V) ali dvojno emulzijo tipa voda v olju v vodi (V/O/V). Ko iz emulzije odhlapimo organsko topilo, dobimo nanodelce. Emulzijo O/V tvorimo tudi pri emulzijsko-difuzijski metodi, le da tu uporabimo topilo, ki se delno meša z vodo in v katerem je raztopljen polimer, v vodni fazi pa imamo raztopljen emulgator in/ali stabilizator. Dodatek večjega volumna vode v to emulzijo povzroči difuzijo topila v zunanjo fazo, pri čemer nastanejo nanodelci. Če se želimo pri izdelavi nanodelcev izogniti uporabi organskih kloriranih topil ter večjih količin površinsko aktivnih snovi, lahko uporabimo za izdelavo nanodelcev metodo izsoljevanja/metodo nadomestitve topila.

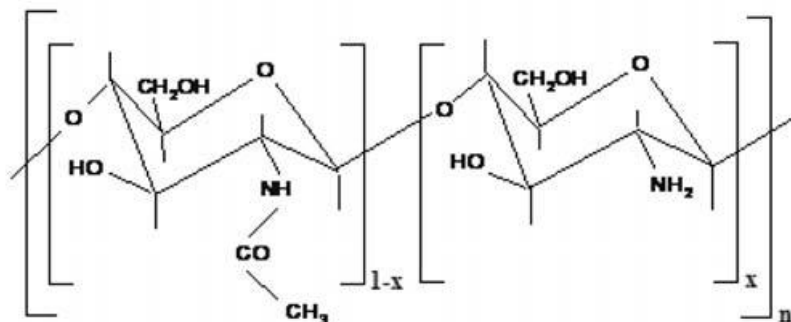
Pri izdelavi nanodelcev iz naravnih polimerov se lahko izognemo uporabi organskih topil, kar je vsekakor prednost metod, kot so ionsko geliranje, koacervacija, samoasociiranje polimerov [1].

V diplomski nalogi smo za izdelavo nanodelcev uporabili metodo samoasociiranja polimerov in lipidov. V raztopino hitosana med stalnim mešanjem z rotor-stator

homogenizatorjem enakomerno in počasi injiciramo alkoholno raztopino fosfolipida, pri čemer zaradi elektrostatskih interakcij med nasprotno nabitimi molekulami nastanejo nanodelci sferične oblike, saj pride do spontanih povezav med pozitivno nabitimi aminskimi skupinami hitosana in negativno nabitimi fosfatnimi skupinami fosfolipida [2].

1.1.2 Hitosan

Kot pozitivno nabito komponento za spontan nastanek nanodelcev smo uporabili hitosan. Hitosan je biokompatibilen in biorazgradljiv kationski polimer, ki ga pridobivajo z delnim deacetiliranjem v naravi močno razširjenega polisaharida hitina (najdemo ga npr. v ogorodju morskega rakca, jastoga, rakovice). Kemijsko je hitosan kopolimer $\beta(1-4)$ povezanih enot glukozamina in N-acetilglukozamina (slika 1). Zaradi intra- in inter-molekularnih vodikovih vezi ima rigidno polimerno strukturo [3,4].



Slika 1: Struktura hitosana; n = število sladkornih enot polimera, x = stopnja deacetiliranja [3].

Uporablja se v različnih panogah in vejah industrije. Tako ima pomembno vlogo v farmaciji, poljedelstvu, tekstilstvu, papirni industriji, kozmetiki, pa tudi v zdravstvu, saj deluje imunostimulativno, antikoagulantno, protibakterijsko, protiglivično, ugoden učinek pa ima tudi pri celjenju ran [5].

Hitosan je topen le v kislih raztopinah, kjer pride do protoniranja aminskih skupin in posledično do nastanka hitosanskega polikationa, ki je vodotopen, v alkalnih in nevtralnih medijih pa se ne raztaplja. Z določenimi organskimi in anorganskimi kislinami tvori soli, ki so prav tako topne v vodi [4]. Na tržišču je več vrst hitosana, ki se med seboj razlikujejo

v stopnji deacetiliranja, molekulske masi in viskoznosti. Stopnja deacetiliranja vpliva na topnost hitosana. Tako je hitosan z manjšo stopnjo deacetiliranja topen ne le v kislem, ampak tudi pri nekoliko bolj alkalnem pH, medtem ko je hitosan z večjo stopnjo deacetiliranja topen le v vodnih raztopinah s kislim pH. Na viskoznost raztopin vplivajo koncentracija hitosana, temperatura in stopnja deacetiliranja. Večja koncentracija hitosana, večja stopnja deacetiliranja in nižja temperatura dajejo raztopine z večjo viskoznostjo. Navidezni pKa hitosana znaša približno 6,5; torej je šibko bazičen [3].

Njegova peroralna toksičnost je majhna in odvisna od molekulske mase, načina vnosa, stopnje čistote hitosana ter stopnje deacetiliranja.

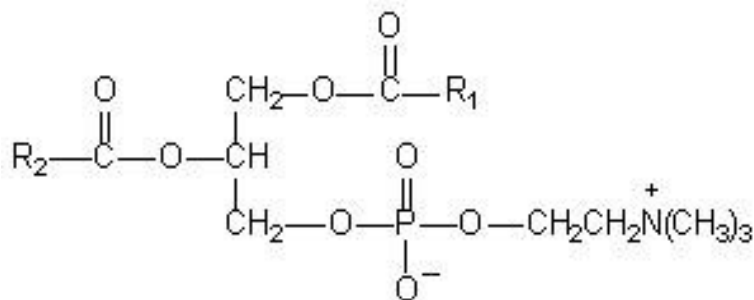
Hitosan deluje tudi kot pospeševalec absorpcije in ima bioadhezivne lastnosti, ki so posledica tvorbe vodikovih in ionskih vezi med kationskimi skupinami polimera ter negativno nabito sialično kislino, ki je sestavni del glikoproteinov in je prisotna na površini sluznic. Zaradi sposobnosti bioadhezije se hitosan pogosto uporablja v razvoju novih dostavnih sistemov (nanodelci, liposomi), saj lahko na ta način zaradi podaljšanega stika med sluznico in farmacevtsko obliko izboljšamo biološko uporabnost vgrajenih učinkovin, k temu pa pripomore tudi sama sposobnost hitosana, da pospeši absorpcijo [3].

1.1.3 Lecitin

Lecitin je zmes lipidnih komponent, kjer večinski delež predstavljajo fosfolipidi (prevladuje fosfatidilholin, prisotna sta tudi fosfatidiletanolamin in fosfatidilinozitol), poleg njih pa se v različnih kombinacijah in količinah pojavljajo tudi trigliceridi, maščobne kisline in ogljikovi hidrati. Običajno ga pridobivajo iz semen, ki vsebujejo olje in se uporabljajo v prehrani. Glavni vir lecitina je soja; lahko pa je lecitin tudi živalskega izvora (iz jajčnega rumenjaka) [6].

Molekula fosfolipida je sestavljena iz glicerola, ki ima dve hidroksilni skupini zaestreni z maščobnima kislinama, na tretjo je vezana fosforjeva kislina, nanjo pa alkohol (odvisno od vrste fosfolipida je alkohol lahko holin, etanolamin ali inozitol) (slika 2). Zaradi take strukture uvrščamo fosfolipide med amfifilne molekule, kar pomeni, da imajo v molekuli polarno glavo (pozitivno nabit holin, etanolamin ali inozitol in negativno nabita fosfatna skupina) ter nepolaren rep iz dveh molekul maščobnih kislin, ki sta lahko nasičeni ali

nenasičeni. Fosfolipid je ena izmed najpomembnejših strukturnih komponent membrane celic, saj je sestavina lipidnega dvosloja [7].



Slika 2: Fosfatidilholin; R₁ in R₂ sta alkilni verigi maščobnih kislin [8].

Lecitin se uporablja v zelo različne namene: uporabljamo ga tako v prehrambeni industriji kot tudi v krmi domačih živali, v slikarstvu in ne nazadnje tudi v farmacevtski industriji, kjer se uporablja kot močljivec, stabilizator, emulgator, olajša enkapsulacijo, lahko pa se uporabi tudi pri pripravi infuzij [9].

Zaradi množične uporabe je na tržišču v prosti prodaji veliko pripravkov s sojinim lecitinom. Za eksperimentalne namene pa so na voljo tudi različne zmesi lipidov, npr. Phospholipon[®] 80 in Phospholipon[®] 50, ki smo ju uporabili v diplomskem delu. Razlika med njima je v vsebnosti različnih fosfolipidov. Phospholipon[®] 80 pridobivajo iz sojinega lecitina z ekstrakcijo z etanolom, pri čemer dobijo topne frakcije, ki jih z nadaljnjim postopkom prevedejo do Phospholipona[®] 80. Ta vrsta lecitina je uporabna tako za peroralno kot tudi dermalno in transdermalno aplikacijo. Sestavljen je iz vsaj 70 m/m % fosfatidilholina in največ 6 m/m % lizofosfatidilholina [10]. Phospholipon[®] 50 pa vsebuje vsaj 50 m/m % fosfatidilholina in največ 6 m/m % lizofosfatidilholina; vsebuje torej manj fosfatidilholina kot Phospholipon[®] 80, a zato več drugih vrst fosfolipidov [11].

1.1.4 Velikost nanodelcev

Delci submikronskih velikosti imajo veliko prednosti pred delci mikrometrskih velikosti, zato je zelo pomembno, da poznamo velikost delcev v sistemu in njeno porazdelitev. Ti dve lastnosti sta najpomembnejši karakteristiki nanodelcev, saj vplivata na to, kaj se bo s farmacevtsko obliko dogajalo *in vivo*. Od njiju je namreč odvisno porazdeljevanje delcev v

organizmu, morebitna toksičnost, sposobnost ciljanja na želeno mesto, stabilnost nanodelcev, sposobnost vgradnje učinkovine v nanodelce in kasnejše sproščanje iz njih [12].

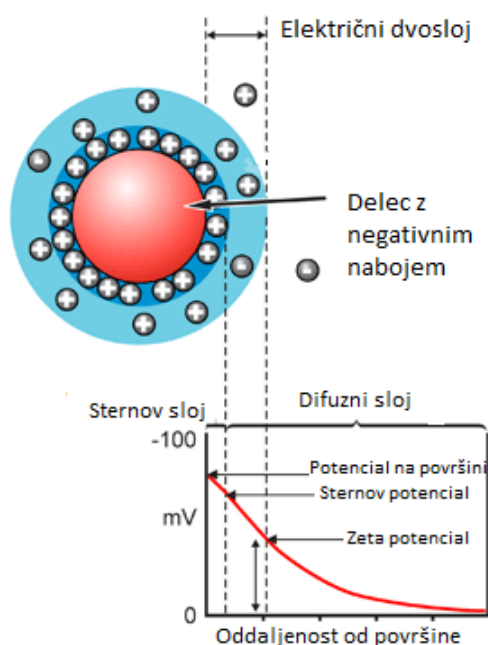
Delci veliki 100 nm imajo v primerjavi z 10-krat večjimi delci (1 μm) 2,5-krat večji privzem v Caco-2 celice oz. v primerjavi s 100-krat večjimi delci (10 μm) je ta razlika v prehajanju v celice kar 6-kratna. Zaradi manjše velikosti delcev je sproščanje učinkovine hitrejše, saj je pot, ki jo mora opraviti učinkovina, da difundira iz nanodelca, krajša in čas difuzije krajši kot pri večjih delcih. Vendar pa imajo delci manjših velikosti večjo težnjo po agregaciji med izdelavo in shranjevanjem, kar omejuje njihovo uporabo in zahteva kompromis med velikostjo delcev in stabilnostjo pripravka [12].

Za določanje velikosti nanodelcev se najpogosteje uporablja metoda fotonske korelacijske spektroskopije (PCS), ki temelji na zaznavanju Brownovega gibanja delcev v odvisnosti od časa. Brownovo gibanje je naključno gibanje dispergiranih delcev in makromolekul, do katerega pride zaradi trkov z molekulami disperznega medija. Velikost delcev in hitrost gibanja sta obratno sorazmerni – večji delci se gibljejo počasneje, manjši pa hitreje. Med meritvijo vzorec osvetlimo z lasersko svetlobo in spremljamo, kako se spreminja intenziteta sipane svetlobe, iz česar določimo difuzijski koeficient delca. Naprava nam nato preko Stokes-Einsteinove enačbe izračuna povprečno velikost delcev ter poda polidisperzni indeks (PDI), ki je pokazatelj širine porazdelitve velikosti delcev. PDI lahko zavzame vrednosti v intervalu med 0 in 1; bližje kot je 0, bolj enakomerne velikosti so obravnavani delci in zanesljivejša je meritev. Od zunanjih parametrov na meritev vplivata le viskoznost in temperatura medija, zato moramo poznati vrednosti teh dveh parametrov, da je rezultat meritve zanesljiv [13, 14].

1.1.5 Električni dvosloj in zeta potencial

Površinski naboj delca vpliva na porazdelitev ionov v njegovi okolici. V neposredni bližini se zaradi elektrostatskega privlaka skoncentrirajo ioni, ki imajo nasprotni naboj. Sloj okoli delca tako sestoji iz dveh delov: takoj na površini je Sternov sloj, kjer so ioni močno vezani, nato pa sledi zunanji, difuzni sloj, kjer so ioni šibkeje vezani in zato bolj gibljivi (slika 3). Znotraj difuznega sloja obstaja navidezna meja, do katere delec in ioni oblikujejo navidezno entiteto. Tako se v elektičnem polju skupaj z delcem gibljejo ioni znotraj meje,

medtem ko na ione izven navidezne meje gibanje delca nima vpliva. Potencial, ki se ustvari na tej meji, se imenuje zeta potencial in je pomembna karakteristika nanodelcev. Njegova vrednost kaže na stabilnost koloidnega sistema. Kadar imajo delci v sistemu velik pozitiven ali negativen zeta potencial (nad +30 mV ali pod -30 mV), le-ta prepreči, da bi prišlo do agregacije in fizikalne nestabilnosti, kar se dogodi v sistemih, kjer je zeta potencial delcev blizu ničle in tako ni prisotne odbojne sile, ki preprečuje, da bi se delci približali in agregirali. Poleg neustreznega zeta potenciala je lahko vzrok za nestabilnost tudi velika razlika v gostoti med delci in disperznim medijem, zaradi česar pride do sedimentacije delcev in nastanka zbite usedline (»hard cake«) [15].



Slika 3: Električni dvosloj na koloidnem delcu [16].

Najpomembnejši dejavnik, ki poleg narave samih delcev vpliva na vrednost zeta potenciala, je pH medija. Z njim lahko vplivamo na naboj na delcih in posledično spreminjamo samo vrednost zeta potenciala. Pri nižjem pH se protonirajo alkalne skupine in zato so delci pozitivno nabiti, ravno tako je tudi zeta potencial v pozitiven. Z dodatkom baze in prehodom v alkalno območje pa pride do deprotoniranja kislih skupin na delcih in naboj delcev je zato negativen, enako se zgodi tudi z zeta potencialom. Točko, kjer zeta potencial preide iz pozitivnega v negativno območje in je njegova vrednost 0, imenujemo

izoelektrična točka in predstavlja točko, kjer je koloidni sistem zaradi odsotnosti naboja na površini delcev najbolj fizikalno nestabilen [15].

Sonvico je s sodelavci v svoji študiji preučeval hitosanske nanodelce in ugotovil, da so bili ob močno pozitivnem ali negativnem zeta potencialu nanodelci submikronskih velikosti, disperzija pa fizikalno stabilna. V nasprotju s tem pa je pri zeta potencialu delcev okrog nič prišlo do fizikalne nestabilnosti, ki se je kazala kot agregacija delcev in s tem povečanje njihove velikosti. Na podlagi tega so zaključili, da je stabilnost sistema posledica predvsem elektrostatskih interakcij med pozitivnimi skupinami hitosana in negativnimi skupinami lecitina. Od razmerja med posameznimi komponentami je tako odvisen končni naboj delcev. Če je polisaharida več, bo prevladal njegov pozitivni naboj, v primeru prevlade lecitina v disperziji pa bo zeta potencial delcev v negativnem območju [2].

1.2 PROTEINI

Proteini so organske molekule z visoko molekulsko maso, zgrajene iz večjega števila aminokislin (AK) v točno določenem zaporedju in s specifično tridimenzionalno strukturo. V telesu imajo mnogo pomembnih funkcij: delujejo kot encimi (RNA-polimeraza, reverzna transkriptaza), so strukturni proteini (kolageni, keratini, elastini), obrambni proteini (protitelesa, interferoni), transportni in skladiščni proteini (hemoglobin, feritin, mioglobin), regulatorni in receptorski proteini (inzulin, receptor za eritropoetin), gibalni proteini in proteini, ki omogočajo krčenje mišic (aktin, miozin) [17]. Kakršnakoli motnja v koncentraciji ali delovanju katerega od fiziološko pomembnih proteinov lahko povzroči bolezensko stanje ali motnjo, ki jo je potrebno zdraviti z dajanjem običajno rekombinantno pridobljenega proteina, kar pa je zaradi narave proteinskih molekul velikokrat težavno.

Proteini imajo štiri ravni strukture: primarno, sekundarno, terciarno in kvartarno, ki morajo za pravilno delovanje proteina ostati nespremenjene. Primarna struktura pomeni zaporedje aminokislin v molekuli, sekundarna pa predstavlja obliko α -vijačnice ali β -strukture. Elementi sekundarnih struktur se lahko povežejo med seboj in zvijejo v kompaktno globularno enoto, ki predstavlja terciarno strukturo. Če pa se povežeta dve ali več polipeptidnih verig, nastane protein z več podenotami, ki ima tudi četrto raven strukture tj. kvartarno zgradbo. Zadnje tri oblike strukture so posledica relativno šibkih nekovalentnih

vezi v proteinski molekuli oz. med proteinskimi molekulami (elektrostatske interakcije, vodikove vezi, van der Waalove sile, hidrofobne interakcije), ki se lahko ob fizikalni obremenitvi porušijo, s tem pa se spremeni ali izgubi fiziološka aktivnost proteina, torej protein po aplikaciji nima ustreznega učinka, lahko pa aplikacija takega proteina povzroči tudi neželeni imunski odziv [17].

Ena izmed pomembnih lastnosti vseh proteinov je njihova izoelektrična točka (pI). To je posebna točka na titracijski krivulji, v kateri je celokupni naboj proteina, ki je funkcija pH raztopine, enak nič, zaradi česar se protein v električnem polju ne giblje proti nobeni od elektrod. Naboj proteina določajo njegove karboksilne in aminske skupine, torej je ta posledično odvisen od vrste AK v proteinski molekuli. Pri nizkem pH so aminske skupine protonirane, lahko tudi karboksilne, zato ima protein celokupno pozitiven naboj. Z večanjem pH se večja tudi deprotonacija obeh funkcionalnih skupin tj. celokupni naboj proteina postaja vse manj pozitiven in ko pH preseže pI, postane celokupni naboj proteina negativen. Ob poznavanju aminokislinske sestave lahko pI izračunamo, vendar pa se izračunana in izmerjena pI zaradi mogočih interakcij med posameznimi skupinami v proteinu lahko nekoliko razlikujeta, ravno tako pa na eksperimentalno določanje pI precej vplivata tudi temperatura in morebitna prisotnost sečnine v vzorcu [18].

1.2.1 Nestabilnost proteinov

Nestabilnost proteinov v splošnem delimo na kemijsko in fizikalno. Pri kemijski nestabilnosti pride do cepitve kovalentnih vezi, s čimer nastanejo nove spojine. To so predvsem reakcije proteolize, deamidacije, oksidacije, racemizacije in eliminacije. Pri vseh ostalih spremembah pa gre za fizikalno nestabilnost, katere posledica je navadno denaturacija proteina oziroma izguba urejene terciarne in kvartarne strukture. Do tega pride ob procesih agregacije, obarjanja ali adsorpcije na površine. Razgradnja je odvisna od vsebnosti vode v farmacevtskih izdelkih, pomožnih snovi, pH, temperature in drugih dejavnikov [19].

Deamidacija je najpogostejša oblika razgradnje proteinov; pri tem pride do hidrolize stranske verige AK asparagina in glutamina v proteinski molekuli. Na oksidacijo so najbolj

občutljive tiolne skupine metionina in cisteina, pri čemer nastane disulfidna vez. Hidroliza peptidne vezi pa se najpogosteje pojavi po predhodni deamidaciji asparagina.

Zaradi porušanja sekundarne, terciarne in/ali kvartarne strukture proteina pride do denaturacije in posledično agregacije, kar je najpogostejši pojav fizikalne nestabilnosti proteinov. Agregacija je lahko reverzibilna ali ireverzibilna. Agregati imajo navadno zmanjšano aktivnost in topnost ter so lahko imunogeni, zato moramo njihov nastanek v farmacevtskih izdelkih preprečiti. Agregati nastanejo z intermolekulsko asociacijo delno denaturiranih proteinskih molekul, ki je posledica termodinamsko neugodnih interakcij med topilom in izpostavljenimi hidrofobnimi deli proteina. Hidrofobne interakcije so torej poglavitne sile, ki vodijo v nastanek agregatov; na njihov nastanek pa vplivajo tudi ionska moč, temperatura, stresanje, adsorpcija na površine in kemijska razgradnja vzorca [19].

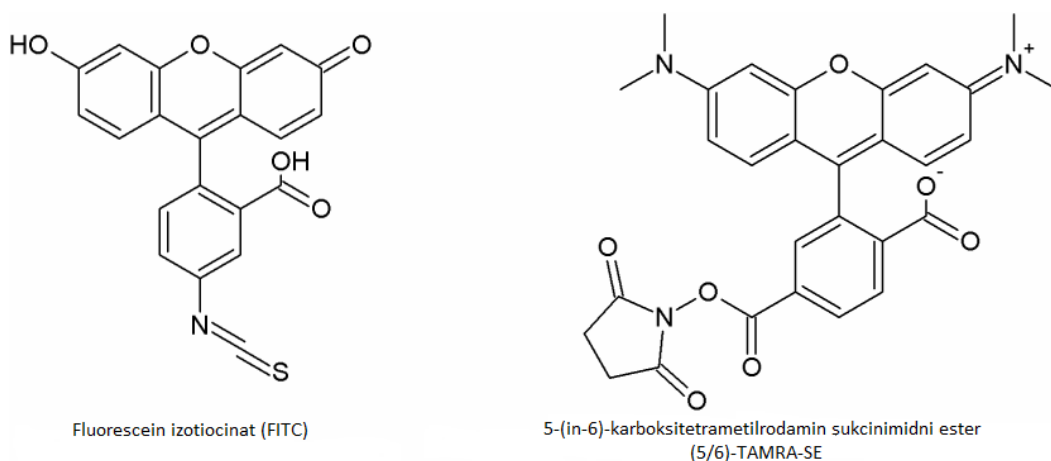
Ker imajo proteini in peptidi visoko površinsko aktivnost, se lahko pojavi adsorpcija na površine (npr. na posodo, ovojnino, opremo), kar povzroči zmanjšanje koncentracije proteina v vzorcu in/ali spremembo njegovih konformacijskih lastnosti. Tudi zmanjšanje topnosti proteina vodi do njegove spremenjene biološke aktivnosti in s tem do neustreznega izdelka [19].

1.2.2 Peroralni vnos proteinov

Po peroralnem vnosu proteinov je njihova biološka uporabnost izredno majhna. V gastrointestinalnem traktu so namreč prisotni encimi proteaze, ki proteine razgradijo, hkrati pa je tudi absorpcija proteinov skozi steno črevesa zaradi velikosti molekule in njene hidrofilnosti počasna in minimalna. Zaradi teh razlogov je danes edini način učinkovitega vnosa proteinov v organizem z injiciranjem: intravensko (i.v.), pogosteje intramuskularno (i.m.) in subkutano (s.c.). Tudi po i.m in s.c. aplikaciji je biološka uporabnost proteinov zaradi encimske razgradnje na mestu dajanja nizka. To ima lahko usodne posledice za bolnike, saj lahko npr. nekateri diabetiki zaradi visoke aktivnosti tkivnih peptidaz postanejo odporni na insulin. Znanstveniki zato že nekaj let stremijo k razvoju alternativnih poti dostave peptidnih učinkovin, med katerimi je seveda najbolj zaželena peroralna dostava, saj je za pacienta zaradi svoje neinvazivne narave najprijaznejša [13].

1.2.3 Označevanje proteinov s fluorescentnimi markerji

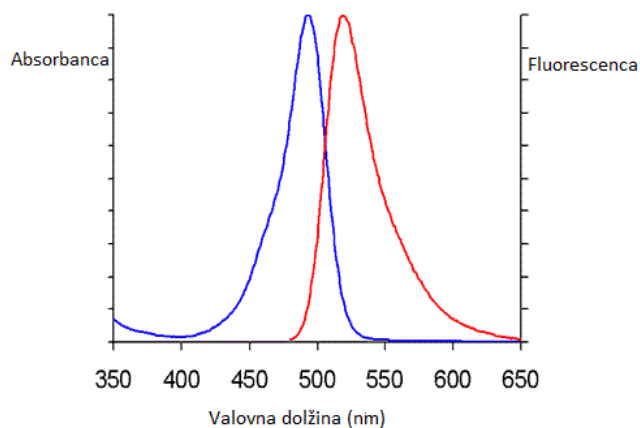
Označevanje proteinov s fluorescenčnimi markerji je rutinsko uporabljena metoda za spremljanje npr. vstopa proteinov v celice, njihove lokalizacije itd. Najpogostejši in hkrati tudi najenostavnejši fluorescenčni reagenti, ki jih vežemo na proteine, so estri N-hidroksisukcinimida (NHS), npr. 5-(in-6)-karboksitetrametilrodamin sukcinimidni ester ((5/6)-TAMRA), ter fluorescein izotiocianat (FITC) (slika 4).



Slika 4: Dva pogosto uporabljena markerja za označevanje proteinov [20].

FITC preko izotiocianatne skupine reagira s funkcionalnimi skupinami proteinov (amino, sulfhidrilna, imidazolna, tirozilna, karbonilna), vendar pa daje le reakcije s primarnimi in sekundarnimi aaminskimi skupinami stabilne produkte. Ob uporabi (5/6)-TAMRE pride do nastanka kovalentne vezi med karboksilno skupino barvila in primarnimi amino skupinami proteina, pri čemer nastane stabilen produkt. Proteini, označeni s FITC, pod UV svetlobo fluorescirajo zeleno ($A_{\max} = 494 \text{ nm}$), medtem ko estri s (5/6)-TAMRO svetijo rdeče ($A_{\max} = 546 \text{ nm}$) [19].

Poleg klasičnih barvil lahko za označevanje proteinov uporabimo tudi katerega od reagentov iz družine komercialnih barvil Alexa Fluor. Alexa Fluor[®] 488 je soroden FITC-u, le da so konjugati med proteinom in barvilom fotostabilnejši kot pri klasičnem FITC, neobčutljivi na pH medija v območju med 4 in 10, njihov signal pa je intenzivnejši. Absorpcijski maksimum tega barvila je pri 494 nm, maksimum fluorescence pa 519 nm [21] (slika 5).



Slika 5: Spekter Alexa Fluor[®] 488 [22].

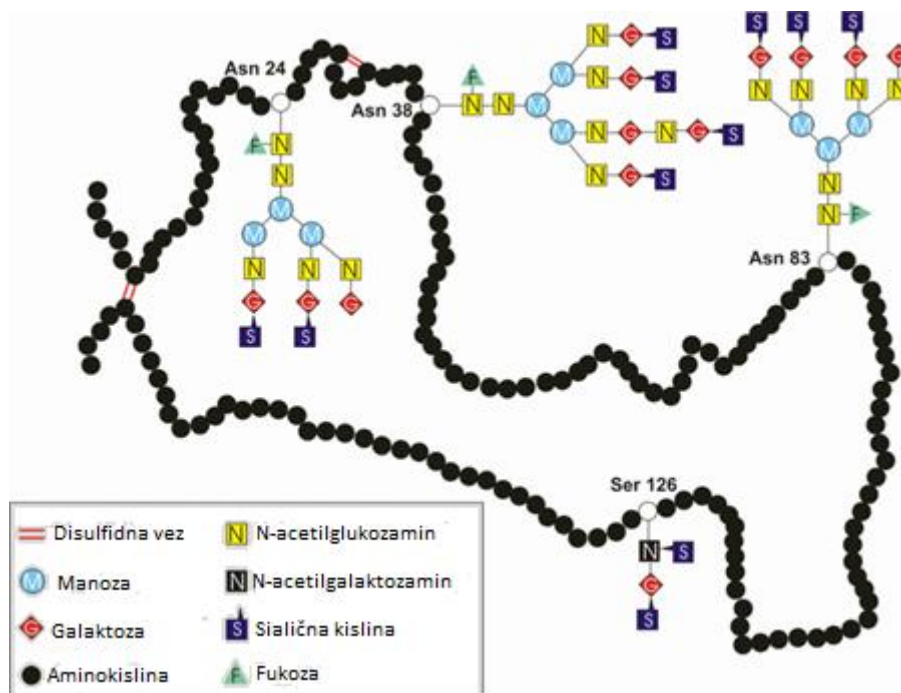
Za optimalno označevanje je pomembno, da v pufru, v katerem imamo naš protein, ni prisotnih primarnih aminov ali amoniaka, saj sicer le-ti reagirajo z barvilom in posledično se barvilo ne veže na naš protein. Ločevanje označenega proteina od nevezanega barvila poteka z metodo gelske filtracije. Ta metoda za ločevanje izkorišča razliko v velikosti molekul, ki jih ločujemo, saj se skozi gel lažje in hitreje prebijejo večje molekule, medtem ko manjše vstopijo v pore stacionarne faze in se eluirajo kasneje. Tako se najprej izloči označen protein, za njim pa sledijo frakcije, ki vsebujejo nevezano barvilo [21].

1.2.4 Tržno zanimive proteinske učinkovine – kandidatke za peroralni vnos

1.2.4.1 Eritropoetin

Eritropoetin (EPO) je najpomembnejši hematopoetski rastni dejavnik, ki nastaja večinoma v ledvicah, deloma pa tudi v jetrih (sploh pri dojenčkih so jetra glavno mesto sinteze) [23]. Uvrščamo ga med hormone in citokine, njegova naloga pa je uravnavanje nastajanja rdečih krvničk, eritrocitov. Deluje neposredno na nekatere eritroidne matične celice in prekurzorje eritrocitov v kostnem mozgu, kjer nadzira njihovo proliferacijo, diferenciacijo in zorenje. Sestavljen je iz 165 AK in je na 4 mestih glikoziliran (3-krat preko aminske skupine in 1-krat preko hidrosilne skupine), zato ga glede na strukturo uvrščamo med

sialoglikoproteine. V njegovi strukturi sta prisotni tudi dve disulfidni vezi med dvema paroma cisteinov (slika 6) [19].



Slika 6: Struktura eritropoetina [24].

Njegova molekulska masa je med 30 in 34 kDa, vendar proteinski del zavzema le 18 kDa, saj kar 40 % mase predstavljajo sladkorne komponente [25]. Glikozilacija EPO ni potrebna za njegovo aktivnost *in vitro*, saj se EPO na svoj receptor (EpoR), ki je glikoziliran in fosforiliran transmembranski polipeptid iz družine citokinskih receptorjev, veže s proteinskim delom molekule. Nasprotno pa je za *in vivo* biološko aktivnost glikozilacija proteina nujno potrebna, saj je sicer EPO neaktiven. Sladkorne komponente imajo pomembno vlogo tudi pri zmanjševanju njegove eliminacije, s čimer omogočajo podaljšano delovanje. Sladkorji so hkrati tudi mesto, kamor je vezanih najmanj 10 molekul sialične kisline, zaradi česar ima EPO relativno kisel značaj: pI okoli 4,4 oz. 4,4 – 5,2 [19, 26].

Sladkorji, vezani na EPO, vplivajo tudi na stabilnost proteina, saj ga varujejo pred denaturacijo, ki bi jo povzročila sprememba pH in/ali temperature, medtem ko sialična kislina pri tem nima vloge. Neglikoziliran protein se tako obarja že pri pH 5,5, glikoziliran EPO pa se ne obori in ostane aktiven vse do pH 2,5. Terciarna struktura glikoziliranega proteina je v primerjavi z neglikoziliranim stabilnejša v kislem okolju. Pri kislinski

povzročeni denaturaciji pride večinoma do porušanja terciarne strukture EPO, sekundarna struktura pa ostane skoraj nespremenjena. Prav tako je glikozilirana oblika proteina manj občutljiva na toplotno denaturacijo. Pri 44 °C je neglikozilirani EPO popolnoma denaturiran, medtem ko pri glikozilirani molekuli pri tej temperaturi še ni opaziti nobenih sprememb [27].

Z razvojem biotehnologije so se na tržišču pojavili tudi rekombinanti EPO, ki so pomenili pravo revolucijo v zdravljenju anemije kot posledice kronične ledvične odpovedi, saj je bila pred tem edina možnost zdravljenja teh bolnikov le redna transfuzija krvi. Prvemu zdravilu z rekombinantnim EPO je FDA že leta 1988 podelila dovoljenje za promet.

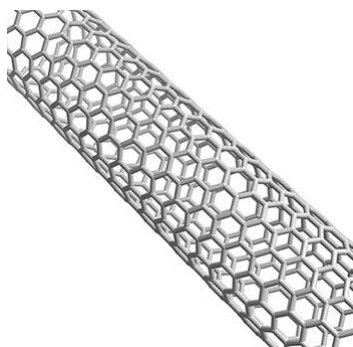
Rekombinantni EPO se med seboj razlikujejo v zgradbi sladkorne verige in v farmakokinetičnih ter farmakodinamičnih lastnostih. V prvo generacijo sodijo rekombinantni EPO alfa, beta in delta, ki jih s skupnim imenom imenujemo epoetini, predstavnik druge generacije pa je darbepoetin alfa, ki je bolj glikoziliran in ima zato trikrat večjo biološko uporabnost zaradi večjega neto negativnega naboja, zato je posledično potrebno manj pogosto odmerjanje. Biološko uporabnost lahko povečamo tudi s tehnološkimi postopki, npr. z mikrokapsuliranjem in pegiliranjem [19]. Vse rekombinantne EPO, ki so na tržišču, dajemo s.c. ali i.v., medtem ko peroralne oblike, ki bi bila za pacienta najbolj prijazna, še ni. Pogostost odmerjanja variira glede na obolenje in je lahko od 1 do 3-krat dnevno ali pa le 1 do 2-krat tedensko [23].

EPO se v klinične namene uporablja:

1. kot nadomestno zdravljenje pri anemijah zaradi pomanjkanja endogenega EPO kot posledica kronične odpovedi ledvic, nekaterih tumorjev, prezgodnjega rojstva, okužbe s HIV;
2. kot dopolnilno zdravljenje za povečanje ali vzdrževanje eritropoeze po kemoterapiji, radioterapiji, presaditvi organov ali tkiv;
3. kot zdravljenje z namenom povečati koncentracijo hemoglobina po operacijah, situacijah, ko transfuzija krvi ni mogoča ali dovoljena ali kot doping pri športnikih [19].

Raziskave na področju vgrajevanja eritropoetina v dostavne sisteme za peroralno uporabo

Na Japonskem so poskušali z uporabo različnih poroznih adsorptivnih ogrodij (porozen SiO_2 , ogljikove nanocevke (slika 7), fulereni) in pospeševalcev absorpcije (Labrasol[®], Gelucire[®]) povečati absorpcijo EPO. Iz adsorbenta, pospeševalca absorpcije, razgrajevala in raztopine EPO so izdelali nanosistem z vgrajeno tekočo fazo. Tako pripravljene vzorce so aplicirali neposredno v črevo podgan in po določenih časovnih intervalih ugotavljali serumske koncentracije EPO. Kot najbolj optimalen se je izkazal nanosistem iz ogljikovih nanocevk in Labrasola[®], ki so mu dodali inhibitor prebavnih encimov kazein, vse skupaj pa aplicirali v jejunum [28].



Slika 7: Ogljikova nanocevka [29].

Na Kitajskem so preučevali nanodelce z vgrajenim EPO za zdravljenje možganskih poškodb kot posledica ishemije. Nanodelce so pripravili tako, da so vodni raztopini oligohitosana dodali EPO, ter nato med blagim mešanjem dodali raztopino tripolifosfata (TPP). Tako nastali nanodelci so bili sferične oblike, njihov povprečni premer je bil okoli 200 nm, porazdelitev velikosti pa monodisperzna [30].

Bokharai je s svojo skupino raziskovalcev preučeval hitosanske nanodelce z vgrajenim EPO in kontroliranim sproščanjem vgrajene učinkovine. Uporabili so postopek ionskega geliranja: pripravili so raztopino hitosana in EPO, v katero so nato med mešanjem postopoma dodali raztopino TPP. Spontano so nastali nanodelci, ki so bili odvisno od masnega razmerja med hitosanom in TPP različnih velikosti: z manjšanjem tega razmerja so nastali večji delci in obratno. Nanodelci z vgrajenim proteinom so imeli povprečni premer 200 nm, bili so sferične oblike in gladkih površin [31].

Geng s sodelavci je izdelal PLGA mikrosfere z vgrajenim EPO za podaljšano sproščanje. Najprej so iz dekstrana, EPO in PEG 8000 pripravili mikrodcelce dekstrana s proteinom. Te

so nato suspendirali v raztopini PLGA v diklorometanu in dodali še PVA in raztopino NaCl. Z nadaljnjimi postopki so dobili končne mikrosfere s povprečnim premerom med 40 in 100 μm (povprečni premer delcev dekstrana s proteinom je bil med 1 in 4 μm), ki so vsebovale visok odstotek vgrajenega proteina, ki se je iz mikrosfer tudi ustrezno sproščal. S tem ko so EPO najprej vgradili v delce dekstrana, so preprečili agregacijo proteina, ki se je pri predhodnih podobnih študijah sicer pogosto pojavljala, na ta način pa so zmanjšali tudi imunski odgovor po vnosu proteina v organizem [32].

Chen s sodelavci je v hitosanske nanodelce vgradil gen, ki kodira EPO. Za izdelavo nanodelcev so uporabili hitosan in DNA, pri čemer je zaradi nasprotnega naboja obeh komponent prišlo do spontanega nastanka nanodelcev, katerih povprečni premer je znašal med 70 in 150 nm. Ko so tako pripravljene nanodelce aplicirali mišim, je prišlo do porasta hematokrita, kar je potrdilo uspešno dostavo gena in kasnejše izražanje EPO [33].

1.2.4.2 Inzulin

Inzulin je človeški peptidni hormon, ki ga izločajo β -celice Langerhansovih otočkov v trebušni slinavki. Glavni signal za njegovo izločanje predstavlja povečana koncentracija glukoze v krvi, prav tako njegovo izločanje pospešijo tudi povečana koncentracija prostih maščobnih kislin v krvi, hormoni prebavnega trakta, glukagon, parasimpatik in β -adrenergična stimulacija. Poleg inzulina se sprosti še ekvimolarna množina peptida C, ki nastane po odcepu inzulina od proinzulina. Funkcija inzulina je uravnavanje metabolnih poti ogljikovih hidratov, beljakovin in maščob. Skrbi za privzem glukoze v celice in omogoča njeno shranjevanje v obliki glikogena v jetrih in mišicah. Receptor za inzulin so našli na praktično vseh vrstah sesalskih celic, uvrščamo pa ga v skupino membranskih receptorjev iz družine tirozinskih beljakovinskih kinaz [19, 34].

Strukturo inzulina sestavljata dve polipeptidni verigi, verigo A sestavlja 21 AK in verigo B 30 AK. Verigi sta med seboj povezani z dvema disulfidnima vezema, medtem ko je tretja disulfidna vez med dvema cisteinoma znotraj verige A (slika 8). Molekulska masa humanega inzulina je 5808 Da [19]. Monomerna oblika vsebuje več ioniziranih skupin, ki omogočajo povezavo z drugimi molekulami (npr. s hitosanom pri tvorbi nanodelcev). Izoelektrična točka inzulina je znotraj intervala 5,35-5,45 [35].



Slika 8: Zaporedje AK v inzulinu [36].

Inzulin je v obliki monomerov le v raztopinah z nizko koncentracijo, v farmacevtskih oblikah pa preko vodikovih vezi in hidrofobnih interakcij navadno dimerizira. V prisotnosti cinkovih ionov se lahko dimeri še nadalje povežejo v heksamere, pri čemer nastane skoraj sferična oblika z dvema cinkovima ionoma v osrednjem delu [19].

Inzulin dandanes tesno povežujemo s sladkorno boleznijo (SB), eno izmed najpogostejših bolezni sedanjega časa. Svetovna zdravstvena organizacija opredeljuje SB kot stanje kronične hiperglikemije, kar glede na sprejet dogovor pomeni koncentracijo glukoze v krvi na tešče preko 7,0 mM oz. nad 11,1 mM dve uri po obroku ali po obremenitvi z glukozo v peroralnem glukoznem tolerančnem testu (OGTT). Če to povemo drugače, lahko SB opredelimo kot stanje, ki nastane zaradi pomanjkanja učinkov inzulina. V splošnem SB delimo na dva glavna tipa – tip I in tip II, poznamo pa tudi nosečnostno SB. Pri tipu I, ki je avtoimunska bolezen in se pojavi v mladosti, propadejo β -celice, zato endogeni inzulin ne more nastajati, pacienti pa si ga morajo nujno vnašati v telo s podkožnim injiciranjem. Pri tipu II pa ob povečani telesni teži in pri starejših ljudeh nastopi motnja v izločanju inzulina, hkrati pa tudi manjša odzivnost tarčnih celic nanj. Bolezen zdravimo s peroralnimi antidiabetiki; ob njenem napredovanju pa je potrebno poseči tudi po aplikaciji inzulina. Pri SB nas skrbijo predvsem zapleti, do katerih lahko pride ob neustreznem zdravljenju. Značilni zapleti so akutna diabetična ketoacidoza in kronični zapleti kot so makroangiopatije, nefropatije, retinopatije in nevropatije [34].

Zaradi pogostosti in resnosti bolezni so začeli inzulin že zelo zgodaj raziskovati. Tako je bil inzulin prvi protein, ki so ga uspeli kristalizirati v čisti obliki (leta 1926), prvi, ki so mu

določili popolno aminokislinsko zaporedje, prvi protein, sintetiziran v laboratoriju, in tudi prvi protein, ki so ga proizvedli z metodami rekombinantne biotehnologije (leta 1978). Danes so vsi inzulini, ki so na tržišču, rekombinantno pridobljeni, strukturno so precej podobni humanemu hormonu, glavna razlika med njimi pa je v farmakokinetiki oz. v času njihovega delovanja. Tako poznamo hitro delujoči inzulin (lispro, aspart), srednjedolgo delujoči inzulin (protamin, lente), dolgo delujoči inzulin (determin, glargin), pa tudi različne zmesi posameznih vrst inzulinov. S kombiniranjem različno dolgo delujočih oblik inzulina lahko pri bolnikih dosežemo posnemanje sproščanja endogenega hormona in tako uspešno nadzorujemo nivo glukoze v krvi [19].

Raziskave na področju vgrajevanja inzulina v dostavne sisteme za peroralno uporabo

Cui s sodelavci je v raziskavah pripravil hitosanske nanodelce z inzulinom za peroralno uporabo. Najprej so pripravili komplekse med inzulinom in fosfolipidom, ki so jih nato z »reverzno micel - topilo evaporacijsko metodo« (reverse micelle-solvent evaporation method) ob dodatku ustreznega polimera (PLA, PLGA) formulirali v nanodelce. Nastali delci so imeli povprečen premer okoli 200 nm, učinkovitost vgrajevanja proteina pa je bila izredno velika, tj. okoli 90 %. Ovrednotili so tudi njihov učinek na zmanjšanje glukoze v plazmi in ugotovili, da se je nivo glukoze po 8 urah zmanjšal kar za 57,4 % [35].

Singapurski raziskovalci so ravno tako preučevali hitosanske nanodelce z vgrajenim inzulinom, le da so jih izdelali z metodo ionskega geliranja. Najprej so pripravili zmes inzulina in TPP, ji dodali raztopino hitosana (pri dveh različnih pHjih) in mešali. Pri višjem pH so dobili večje delce (povprečni premer 340 nm) kot pri nižjem (270 nm), ZP pa je pri nižjem pH dosegel večjo pozitivno vrednost (35 mV). Ko so nanodelce aplicirali diabetičnim podganam, so ugotovili, da je imela disperzija z nižjim pH večji učinek (40-50 % nižji nivo glukoze v krvi glede na začetno vrednost) [37].

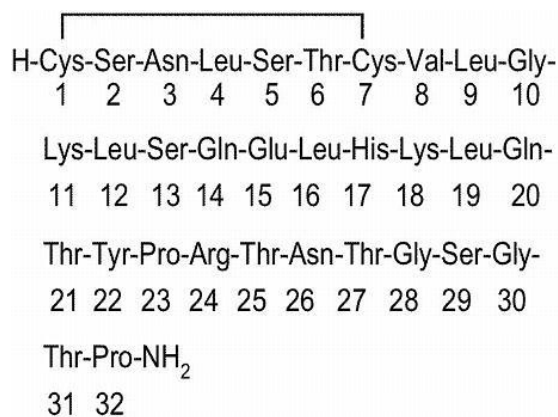
Na podoben način je pripravil nanodelce tudi Sarmento s sodelavci, le da je namesto TPP uporabil za premreževanje dekstran sulfat. Inzulin se je tako s svojimi kationskimi skupinami povezal preko negativnih sulfatnih skupin dekstrana, s pozitivno nabitim hitosanom pa je interagiral preko svojih negativno nabitih skupin. V študiji so prišli do zaključka, da ima dekstran sulfat poglavito vlogo tako pri vgrajevanju inzulina v nanodelce kot tudi pri njegovem zadržanem sproščanju iz dostavnega sistema. Povprečni

premer tako dobljenih nanodelcev je bil okoli 500 nm, njihov ZP pa okoli -15 mV. Stabilni so bili vsaj 28 dni [38].

Indijec Sajeesh s sodelavci je raziskoval možnost peroralne dostave inzulina preko spontanega kompleksiranja le-tega s ciklodekstrini. Tako je najprej izdelal komplekse inzulina – hidroksipropil- β -ciklodekstrin, ki jih je nato vključil v nanodelce, katerih osnovo je predstavljala polimetakrilna kislina. Ciklodekstrini zaščitijo proteine pred agregiranjem, temperaturno denaturacijo in razgradnjo, hkrati pa tudi preprečijo, da bi se hidrofilni inzulini adsorbirali na hidrofobne površine. Povprečni premer teh delcev je bil med 500 in 800 nm [39].

1.2.4.3 Kalcitonin

Kalcitonin je endogeni polipeptidni hormon, sestavljen iz 32 AK (slika 9), ki ga izločajo parafolikularne celice ščitnice. V homeostazi kalcija in nastajanju kostnine ima ključno vlogo, saj zavira delovanje osteoklastov in tako resorpcijo kosti, kar preprečuje izgubo kostne mase. Poveča tudi izločanje kalcijevih in fosfatnih ionov preko ledvic in stimulira nastajanje biološko aktivne oblike vitamina D. Izločanje kalcitonina uravnava koncentracija kalcija v krvi: ob njegovi večji koncentraciji se izločanje hormona poveča. Poznamo več vrst kalcitonina: človeški, svinjski, jeguljin, najpogosteje pa se uporablja lososov kalcitonin (sCT), saj ima 40-50-krat večjo jakost delovanja od humanega. Na tržišču ga lahko dobimo v obliki injekcij ali pršila za nos; uporablja pa se za zdravljenje postmenopavzne osteoporoze, Pagetove bolezni in hiperkalcemije zaradi malignih obolenj [19, 40]. Izoelektrična točka kalcitonina je 10,2 [41].



Slika 9: Zaporedje AK v lososovem kalcitoninu [42].

Raziskave na področju vgrajevanja kalcitonina v dostavne sisteme za peroralno uporabo

Tudi na področju razvoja dostavnih sistemov za peroralni vnos kalcitonina potekajo intenzivne raziskave.

Korejski znanstveniki so pripravili nanodelce iz sCT in TPP. Obe komponenti sta se zaradi nasprotnih nabojev spontano povezali preko ionskih vezi in nastali so delci s povprečnim premerom 220 nm. Takoj po izdelavi so bili delci sicer večji, vendar je s časom ob rahlem mešanju prišlo do reorganizacije med molekulami in nastanka manjših nanodelcev. Učinkovitost vgradnje sCT v delce je bila nad 90 %, zagotovljeno je bilo podaljšano sproščanje učinkovine, po peroralni aplikaciji podganam so ugotovili znižanje koncentracije kalcija v krvi, hkrati pa je kompleksiranje s TPP zavarovalo sCT pred neugodnimi vplivi prebavnega trakta. Vse te lastnosti kažejo, da je ta sistem obetajoč za peroralno dostavo sCT [43].

Precej zanimiv in nov je pristop, ki so ga uporabili Cheng in sodelavci pri pripravi nanokompleksov s sCT: kationski sCT so kompleksirali s kationskim amfifilnim polielektrolitom. Najprej so na polialilamin vezali palmitinsko kislino in tako kvarternizirali dušikov atom. Tako je nastala spojina s hidrofobnim repom in kationskim centrom. Po dodatku sCT je prišlo do kompleksiranja in nastanka nanokompleksov. Povezovanje v komplekse tu ni potekalo preko ionskih interakcij, temveč preko hidrofobnih povezav in vodikovih vezi, manjši delež pa so vseeno predstavljale ionske vezi med kationskim polielektrolitom in anionskimi skupinami sCT. Povprečni premer nanokompleksov je bil 200-230 nm in ZP med +20 mV in +50 mV. Kompleksi so bili stabilni več dni. S kompleksiranjem so zaščitili sCT pred razgradnjo, hkrati pa ohranili njegovo biološko aktivnost [41].

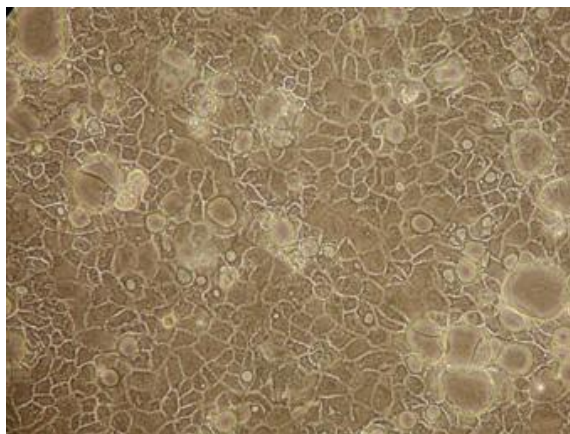
1.3 CELIČNA LINIJA CACO-2 KOT MODEL ZA IN VITRO ŠTUDIJE PREHODA UČINKOVIN

Epitelijske celice ločujejo notranjost organizma od zunanjega sveta in zato marsikdaj predstavljajo oviro, ki otežuje absorpcijo učinkovin. Te celice so močno polarizirane, njihova apikalna stran je usmerjena proti zunanosti, bazolateralna membrana pa se navezuje na spodaj ležečo bazalno lamino. Med posameznimi celicami so tesni stiki, ki

sodelujejo pri transportu snovi. Epitelij tako selektivno uravnava prehod najrazličnejših molekul in ionov preko membrane [44].

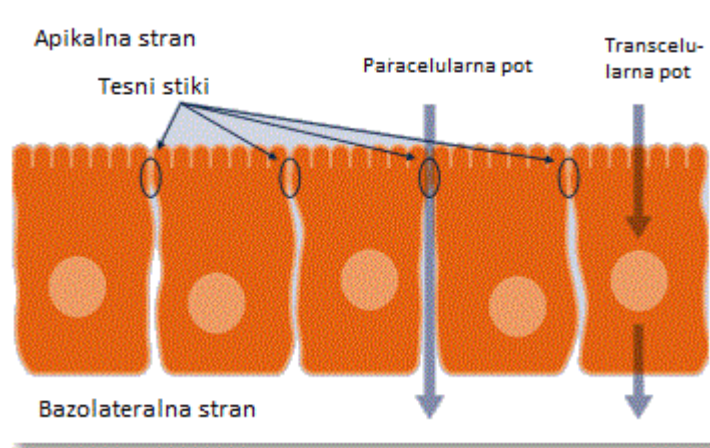
V zadnjih letih je močno porastla uporaba različnih celičnih linij, npr. Caco-2, keratinocitov, HT-29 ipd. za različna področja raziskav. Tako lahko z njihovo pomočjo raziskujemo vpliv različnih snovi na celice in na ta način ugotovljamo njihovo morebitno toksičnost, lahko pa nam služijo tudi kot dober *in vitro* model za proučevanje transporta učinkovine preko membran. Najpogosteje se v ta namen uporablja celična linija humanih celic kolorektalnega adenokarcinoma Caco-2 [45].

Caco-2 celice (slika 10) se razraščajo v monosloju z dobro definiranimi ščetinastimi robovi na apikalni strani. Zaradi svojih reprodukcijskih sposobnosti, dobre odpornosti in ker vsebujejo vsa tri barierna mesta, ki povzročajo težave pri absorpciji (vodni sloj, medcelični stiki, polarizirana membrana), so zelo primerne za *in vitro* študije absorpcije. V primerjavi s človeškimi črevesnimi celicami so brez mukuznega sloja, a kljub temu je značilna dobra korelacija med *in vivo* biološko uporabnostjo in ugotovljeno permeabilnostjo *in vitro* [46].



Slika 10: Kultura Caco-2 celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom [47].

Prehod preko črevesnega epitelija lahko poteka na enega ali več načinov, in sicer pasivno transcelularno (lipofilne učinkovine), pasivno paracelularno (hidrofilne učinkovine), s pomočjo prenašalcev ali aktivno transcelularno (s transcitozo) (slika 11). Ugotovljena *in vitro* permeabilnost čez Caco-2 celice izkazuje največjo stopnjo korelacije z *in vivo* prehodom za učinkovine, ki prehajajo pasivno transcelularno, medtem ko je pasivna paracelularna pot v celični kulturi manj prehodna kot je dejansko v *in vivo* pogojih [45, 48].



Slika 11: Načini prehoda snovi skozi epitelijske celice [49].

Oviro za pasivni paracelularni transport (prehod med celicami) predstavljata majhna površina intercelularnega prostora in tesnost stikov med epitelijskimi celicami. Hitosan zaradi interakcij pozitivno nabitih skupin v molekuli z negativno nabitimi skupinami celičnih membran ali preko kompleksiranja kalcijevih ionov posega v strukturo tesnih stikov in tako olajša paracelularni transport. Njegova prednost je tudi v tem, da je ta vpliv na celice reverzibilen in kratkotrajen, za razliko od drugih pospeševalcev absorpcije, ki delujejo na celice ireverzibilno in jih na ta način trajno poškodujejo [1].

Aktivni transcelularni transport poteka s transcitozo. Na tak način celice privzamejo delce. Prične se na apikalni strani celične membrane z enim izmed endocitotskih mehanizmov. Delce oz. učinkovina nato potuje skozi celico in na drugi strani (bazolateralni) izstopi. Na tem področju sta zanimivi predvsem dve vrsti intestinalnih celic: enterociti, ki so v večini, in M celice, ki se nahajajo v področjih Peyerjevih plošč in predstavljajo le majhen del vseh celic. Kljub temu se večina prehoda zgodi ravno v tem področju, saj imajo enterociti zelo majhno endocitotsko aktivnost. M celice so tako potencialna pot za absorpcijo peroralno vnešenih proteinov in peptidov, sposobne pa so privzeti tudi nanodelce. Njihova dodatna prednost je tudi, da imajo v primerjavi z drugimi epitelijskimi celicami manjšo encimsko aktivnost in s tem manjši negativni učinek na proteine, ki jih želimo dostaviti peroralno [1]. Na transport po transcelularni poti vpliva več dejavnikov, med njimi fizikalno-kemijske lastnosti delcev (npr. velikost, zeta potencial, hidrofobnost, prisotnost ligandov na površini), koncentracija delcev, čas zadrževanja na mestu absorpcije, temperatura, fiziologija prebavnega trakta, pa tudi sam živalski oz. celični model, ki ga uporabljamo za študijo [1]. Z večanjem delcev se možnost transcitoze zmanjšuje, saj na tak način prehajajo predvsem delci, ki so manjši od 1 μm , pri čemer je optimalna velikost manjša od 100 nm.

Večji delci, ki jim vseeno uspe preiti bariero, se zadržijo v Peyerjevih ploščah. Lipofilni nenabiti in pozitivno nabiti nanodelci imajo večjo afiniteto do črevesnih celic kot negativno nabiti lipofilni delci, medtem ko imajo po drugi strani negativni hidrofilni nanodelci dobre bioadhezivne lastnosti in se zato bolje absorbirajo tako preko enterocitov kot tudi preko M celic [50].

2 NAMEN DELA

Razvoj biotehnologije in s tem proteinskih učinkovin je v razmahu, kljub temu pa se še vedno večina teh učinkovin vnaša v telo le parenteralno, kar za bolnika ni najbolj prijetno. V tem diplomskem delu bomo zato poskušali priti korak bližje k možnosti izdelave peroralnega dostavnega sistema za vnos proteinskih učinkovin, kar bo povečalo komplianco bolnikov in posledično izboljšalo uspeh zdravljenja.

Naše raziskovalno delo bo razdeljeno na dva segmenta. Cilj prvega bo izdelati primerni dostavni sistem za peroralni vnos proteinske zdravilne učinkovine (PZU). Pripravili bomo nanodelce iz hitosana in fosfolipida in vanje vgradili PZU. Nanodelce bomo izdelali z metodo spontanega povezovanja polimera (hitosan) in lipida (lecitin) preko ionskih interakcij. S pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS bomo določili povprečni premer in širino porazdelitve velikosti delcev, tj. PDI, in zeta potencial delcev ter jih na ta način fizikalno ovrednotili. S spreminjanjem pH, masnega razmerja med komponentami in uporabe dveh različnih lecitinov bomo poskušali najti fizikalno stabilen sistem z optimalnimi lastnostmi in čim večjo učinkovitostjo vgrajevanja PZU v nanodelce. Učinkovitost vgrajevanja bomo ugotovili posredno preko določanja nevgrajenega proteina s HPLC analizo in poskušali ugotoviti, kateri parametri vplivajo na vgrajevanje PZU v nanodelce in na kakšen način bi lahko vgrajevanje izboljšali.

Drugi sklop raziskovalnega dela te diplomske naloge pa bo predstavljajo delo na kulturi Caco-2 celic kot *in vitro* modelu intestinalnega epitelija. Pri načrtovanju dostavnega sistema moramo namreč upoštevati tudi njegovo obnašanje v organizmu in morebiten negativen vpliv, ki ga ima farmacevtska oblika na telo. Z MTS testom bomo najprej preverili, kakšen učinek ima disperzija nanodelcev na preživetje Caco-2 celic. Pri peroralnem vnosu je pomembno, da učinkovina preide absorpcijsko bariero in vstopi v centralni krvni obtok, zato bomo na kulturi celic spremljali vstop fluorescenčno označene PZU v raztopini in PZU v nanodelcih v Caco-2 celice. Pripravili bomo preparate celic in s fluorescenčno mikroskopijo poskušali ugotoviti, če nanodelci in z njimi PZU prehaja v celice.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

Sestavine nanodelcev

- Hitosan klorid, Protasan UP CL 212 (Pronova, Norveška)
- Hitosan (nizke viskoznosti, iz oklepa morskega rakca) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Phospholipon[®] 50 (Lipoid, Nemčija)
- Phospholipon[®] 80 (Rhône-Poulenc, Nattermann Phospholipid GmbH, Nemčija)
- Natrijev tripolifosfat (pentabazični) (TPP), 90–95 % (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Proteinska zdravilna učinkovina v raztopini (PZU), koncentracija 2,5 mg/ml (Lek, Slovenija)

Topila in reagenti za spreminjanje pH raztopin

- Prečiščena voda
- Etanol, CH₃CH₂OH (Merck, Nemčija)
- Ocetna kislina, 96 %, $\rho=1,05$ kg/l (Merck, Nemčija)
- Natrijev hidroksid, NaOH, MM 40 g/mol (Merck, Nemčija)

Sestavine PBS pufra, pH 7,4

- Natrijev klorid, NaCl, MM 58,5 g/mol (Merck, Nemčija)
- Kalijev klorid, KCl, MM 74,6 g/mol (Merck, Nemčija)
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Na₂HPO₄, MM 142 g/mol (Merck, Nemčija)
- Kalijev dihidrogenfosfat, KH₂PO₄, MM 136,1 g/mol (Merck, Nemčija)
- Klorovodikova kislina, HCl (Merck, Nemčija)

- Sterilizirana voda - bidestilirana voda, sterilizirana z avtoklaviranjem (121 °C, 2 bar, 20 min)

Gojenje celic

- Celična kultura Caco-2 (American Type Culture Collection, ZDA)
- Medij MEM: »Minimum Essential Medium Eagle« (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Toplotno inaktivirani fetalni goveji serum (HIFBS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- 100 U/mL antibiotik (penicilin, streptomycin) in antimikotik (amfotericin B) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- 1 % neesencialne aminokisliline (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- 0,25 % tripsin x EDTA (Promega Corporatinon, ZDA)

Barvanje in tretiranje celic ter označevanje PZU

- Formaldehid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Triton[®] X-100 (Merck, Nemčija)
- Barvilo za modro barvanje jeder: Hoechst, (bisbenzimid H33342), 2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazole trihydrochloride (Honeywell Riedel de Haen[®], Nemčija)
- RNAza A (QIAGEN GmbH, Nizozemska)
- Propidijev jodid, vodna raztopina 1,0 mg/ml (Invitrogen, Molecular Probes[™], ZDA)
- Barvilo za rdeče barvanje aktina: Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Barvilo za zeleno barvanje aktina: Phalloidin, Fluorescein Isothiocyanate Labeled (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Tripan modro (Trypan blue solution, 0,4 %) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)

- ProLong[®] Antifade Kit (Invitrogen, Molecular Probes[™], ZDA)
- Alexa Fluor[®] 488 Protein Labeling Kit (Invitrogen, Molecular Probes[™], ZDA)
- MTS reagent, CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, ZDA)

3.2 NAPRAVE

- Analitska tehtnica Exacta (Tehtnica, Slovenija)
- Aparat za pripravo ultra čiste vode Purelab Classsic VF (Elga, Velika Britanija)
- Centrifuga (Tehtnica, Slovenija)
- Elektronske pipete e 1000 (50-1000 µl), e 5000 (100-5000 µl) (Biohit, Finska)
- Elektronska pipeta mid plus (Biohit, Finska)
- Fluorescenčni mikroskop Olympus IX81 cell^M (Olympus, Japonska)
- Inkubator SANYO CO₂ (SANYO, Japonska)
- LAF komora M12 (Iskra Pio, Slovenija)
- Magnetno mešalo (IKA-WERKE, Nemčija)
- Magnetno mešalo Variomag[®] Poly (Variomag, ZDA)
- Mikroskop Olympus CKX41 (Olympus, Japonska)
- Mikrotitrski čitalec Tecan Safire² (Tecan, Švica)
- Naprava za merjenje velikosti delcev Zetasizer Nano ZS (PCS naprava) (Malvern, Velika Britanija)
- pH meter MA235 (Mettler Toledo, ZDA)
- Precizna tehtnica AG245 (Mettler Toledo, ZDA)
- Precizna tehtnica XS205 Dual Range (Mettler Toledo, ZDA)
- Rotor-stator homogenizator Ultra-turrax (IKA, Nemčija)
- Ultracentrifuga 3K30 (Sigma, Nemčija)

- Vodna kopel (Memmert, Nemčija)
- Vorteks Vibramix 10 (Tehtnica, Slovenija)

3.3 METODE

3.3.1 Priprava raztopin

Raztopina lecitina v etanolu

Posamezno vrsto lecitina (Phospholipon[®] 50 oz. 80) smo raztopili v etanolu, da smo dobili raztopino s koncentracijo 25 mg/ml. Navadno smo natehtali 625 mg lecitina v 25 ml bučko, dopolnili do oznake z etanolom, dodali magnet ter mešali na magnetnem mešalu slabo uro. V tem času se je lecitin raztopil in dobili smo bistro, rumeno raztopino.

Raztopina lecitina v vodi

Obe vrsti lecitina smo dispergirali tudi v vodi. 625 mg Phospholipona[®] 50 oz. 80 smo natehtali v stekleno čašo in dopolnili s prečiščeno vodo do volumna 25 ml. Z rotor stator homogenizatorjem (Ultra-turraxom) smo pri visokih obratih (okoli 11.000 obratov/min) homogenizirali nekaj minut, dokler se ni ves lecitin popolnoma dispergiral in je nastala mlečno rumena disperzija.

Povprečni premer tako dobljenih delcev v disperziji je znašal 341 nm, PDI pa je bil 0,562.

Raztopina hitosana v prečiščeni vodi

Najprej smo pripravili raztopino hitosan klorida v vodi s koncentracijo 10 mg/ml. V 5 ml bučko smo natehtali 50 mg hitosana, do oznake dopolnili s prečiščeno vodo, dodali magnet ter mešali na magnetnem mešalu. Ko se je ves hitosan raztopil, smo raztopino prelili v 500 ml bučko in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo. Končna koncentracija hitosana tako pripravljene raztopine je znašala 0,1 mg/ml, njen pH pa je bil okoli 5. To raztopino smo nato uporabili za pripravo ostalih raztopin hitosana, ki smo jih ustrezno redčili s prečiščeno vodo. Željen pH raztopine hitosana smo dosegli z dodajanjem HCl oz. NaOH.

Raztopina hitosana v očetni kislini

Za izdelavo hitosanskih nanodelcev s TPP smo pripravili raztopino hitosana s koncentracijo 1,75 mg/ml v 1 % raztopini očetne kisline. V 100 ml bučko smo natehtali 175 mg hitosana ter do oznake dopolnili z ustrezno redčeno očetno kislino. Dodali smo magnet in na magnetnem mešalu mešali, dokler se ni hitosan popolnoma raztopil. Raztopini smo izmerili pH (2,9) in ga nato z NaOH dvignili do pH 4,7 [51].

Raztopina TPP v vodi

Za pripravo raztopine TPP s koncentracijo 2,91 mg/ml smo v 50 ml bučko natehtali 145,5 mg TPP, do oznake dopolnili s prečiščeno vodo in raztopino dobro premešali, da se je ves TPP raztopil.

Priprava izotoničnega PBS pufra

Za pripravo 1 l PBS pufra, ki smo ga uporabljali za spiranje celic, smo natehtali 8,00 g NaCl, 0,20 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ in 0,24 g KH₂PO₄. Soli smo v 1 l bučki raztopili v približno 0,8 l bidestilirane vode, pomerili pH in ga nato s HCl uravnali na pH 7,4. Puffer smo z vodo dopolnili do oznake in ga premešali. Ker je bil namenjen uporabi na celicah, ki zahtevajo sterilnost materialov, smo ga avtoklavirali, razdelili na alikvote in shranili v hladilniku.

3.3.2 Izdelava nanodelcev

Izdelava praznih nanodelcev iz hitosana in lecitina

Za izdelavo nanodelcev smo vedno uporabljali hitosan klorid. V 46 ml vodne raztopine hitosana (različne koncentracije) smo s pomočjo injekcijske brizge in igle s konstantno hitrostjo injicirali 4 ml etanolne raztopine lecitina s koncentracijo 25 mg/ml ter med tem mešali z Ultra-turraxom pri 5000 obratih/min. Nastale so mlečne disperzije nanodelcev z različnimi masnimi razmerji lecitin : hitosan. Disperzije smo postavili na magnetno mešalo in pustili mešati čez noč, da je etanol izhlapel.

Enak postopek smo uporabili tudi v primeru uporabe lecitina, ki smo ga predhodno dispergirali v vodi.

Izdelava praznih nanodelcev iz hitosana in TPP

V čašo smo z merilnim valjem odmerili 5 ml raztopine hitosana v 1 % raztopini očetne kisline (1,75 mg/ml) ter med mešanjem na magnetnem mešalu s pomočjo injekcijske brizge in igle injicirali 1 ml raztopine TPP (2,91 mg/ml). Nastala je mlečna disperzija nanodelcev z masnim razmerjem hitosan : TPP = 3 : 1.

Izdelava nanodelcev s PZU

Ker smo imeli za raziskave na voljo le omejeno količino raztopine PZU, smo pripravljali le majhne volumne vzorcev – običajno od 400 µl do 1 ml. Posledično je bil tudi način izdelave vzorcev drugačen od priprave nanodelcev brez PZU.

Za pripravo 1 ml vzorca smo v epico s pipeto odmerili 840 µl raztopine hitosana določene koncentracije, dodali 80, 60, 40 ali 20 µl raztopine PZU s koncentracijo 2,5 mg/ml ter med počasnim mešanjem na vorteksu dodali še 80 µl raztopine lecitina (raztopljenega v etanolu ali dispergirane v vodi). Končna koncentracija PZU v vzorcih je bila 0,2, 0,153, 0,104 oz. 0,053 mg/ml. Določili smo maso vzorcev v epicah in jih pustili odprte na sobni temperaturi nekaj ur, da je etanol izhlapel. Vmes smo vzorce nekajkrat premešali na vorteksu in jih tehtali. Maso izhlapelega etanola smo nadomestili s prečiščeno vodo, da je koncentracija PZU ostala enaka kot ob pripravi, in vzorce do nadaljnje obravnave shranili v hladilniku.

Na enak način smo izdelali tudi hitosanske nanodelce, pri katerih smo uporabili TPP. V epice smo odpipetirali 500 µl raztopine hitosana v 1 % raztopini očetne kisline (1,75 mg/ml, pH 4,7), dodali ustrezen volumen raztopine PZU (2,5 mg/ml), da je bila njena končna koncentracija v vzorcu enaka kot pri nanodelcih iz hitosana in lecitina (52 µl raztopine PZU za 0,2 mg/ml, 39 µl raztopine PZU za 0,153 mg/ml oz. 26 µl PZU raztopine za 0,104 mg/ml) in nato med vorteksiranjem dodali še 100 µl vodne raztopine TPP.

3.3.3 Fizikalno vrednotenje nanodelcev

Z napravo Zetasizer Nano ZS smo nanodelcem določili povprečni premer, polidisperzni indeks (PDI) in zeta potencial (ZP). V kiveto oz. v celico za merjenje ZP smo odpipetirali/injicirali ustrezen volumen vzorca (pri čemer smo pazili, da ni bilo prisotnih mehurčkov) in izvedli meritev. Naprava pri merjenju velikosti nanodelcev in določanju PDI uporablja princip fotonske korelacijske spektroskopije (PCS), za določitev ZP pa se poslužuje metode laserske Dopplerjeve elektroforeze.

Pogoji meritev (povprečni premer, PDI):

- temperatura: 25 °C
- viskoznost disperznega medija: $\eta = 0,8872$ mPas (voda)
- lomni količnik disperznega medija: $RI = 1,330$ (voda)
- valovna dolžina laserske svetlobe (He-Ne laser, »rdeči laser«): $\lambda = 633$ nm
- kot merjenja: 173°
- celica: DTS0012, kiveta; ZEN0112, kiveta
- število meritev: 1-2

Pogoji meritev (ZP):

- temperatura: 25 °C
- viskoznost disperznega medija: $\eta = 0,8872$ mPas (voda)
- lomni količnik disperznega medija: $RI = 1,330$ (voda)
- dielektrična konstanta disperznega medija: $\epsilon = 78,5$ (voda)
- model: Smoluchowski
- celica: DTS1060C, kapilarna celica
- število meritev: 1-2

3.3.4 Spreminjanje velikosti molekule PZU v odvisnosti od časa

Na novo odtaljeno raztopino PZU smo s PBS pufrom redčili na koncentracijo 0,06 mg/ml in z napravo Zetasizer Nano ZS izmerili povprečni premer in PDI molekule PZU. Vzorce smo shranjevali v hladilniku in na sobni temperaturi, meritve pa smo izvajali v določenih časovnih intervalih (takoj, čez 1, 2, 3, 4 ure, čez 24 ur, po 14 in po 15 dneh).

3.3.5 Učinkovitost vgrajevanja PZU v nanodelce

Količino vgrajene PZU smo določevali posredno preko nevgrajenega proteina. V epice smo odpipetirali ustrezen volumen vzorcev in 45 min centrifugirali pri 24.000 obratih/min in 15 °C. Odvzeli smo supernatant (vsaj 300 µl) in v njem s HPLC analizo določili koncentracijo PZU. Iz razlike med začetno koncentracijo proteina v vzorcu in količino nevgrajene PZU smo izračunali odstotek proteina, ki se je vgradil v nanodelce.

3.3.6 Vpliv dodatka disperzije nanodelcev na pH rastnega medija

K 2 ml rastnega medija smo dodajali 0,2 ml alikvote disperzije nanodelcev s pH 4,8 do končnega volumskega razmerja 1:1 med ravnim medijem in disperzijo nanodelcev. Po vsakem dodatku nanodelcev smo sprti opazovali vizualne spremembe vzorca in merili njegov pH.

3.3.7 Ugotavljanje viabilnosti celic

Za ugotavljanje vpliva koncentracije in pH disperzije nanodelcev na preživetje celic v kulturi smo uporabili kolorimetrični MTS test. Samo žive celice namreč vsebujejo encime, ki reducirajo MTS reagent ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol) do vijoličnega formazona, zato lahko na podlagi izmerjene absorbance ugotovimo, kolikšen delež celic je po dodatku vzorca viabilnih [52]. Poskus smo izvajali v zatemnjenem prostoru, saj je barvilo občutljivo na svetlobo. Test smo izvedli z dvema različnima disperzijama nanodelcev brez proteina, ki sta se razlikovali v pH (v prvem primeru je bil hitosan raztopljen v 0,275 M HCl - pH disperzije nanodelcev je bil 2,5, v drugem primeru pa je bil hitosan klorid raztopljen v prečiščeni vodi - pH disperzije nanodelcev je bil 4,8) in pri treh različnih koncentracijah.

V LAF komori smo v ploščo s 96 vdolbinicami nasadili 10^4 celic/cm² v 50 µl rastnega medija. Ker smo ugotavljali vpliv nanodelcev na preživetje celic po 24, 48 in 72 urah, smo pripravili 3 enake plošče. Celice smo inkubirali 24 ur, da so se pritrdele na podlago, in nato dodali 50 µl disperzije nanodelcev, ki smo jo predhodno ustrezno redčili z ravnim

medijem. Končne koncentracije nanodelcev na celicah so bile 1 mg/ml, 0,5 mg/ml in 0,1 mg/ml. Izvedli smo tudi kontrolni poskus, kjer smo namesto nanodelcev celicam dodali le rastni medij. Vzorce smo inkubirali pri 37 °C in 5 % CO₂ 24, 48 oz. 72 ur ter nato dodali 10 µl MTS reagenta/vdolbinico in inkubirali 2–4 ure (odvisno od gostote celic v vdolbinicah) ter z mikrotitrskim čitalcem izmerili absorbanco vzorca pri valovni dolžini 488 nm. Kot kontrolo smo uporabili celice, h katerim smo namesto disperzije nanodelcev dodali enak volumen ravnega medija, in kot slepo sam medij z dodanimi nanodelci. Poskus smo izvedli v treh paralelkah.

3.3.8 Fluorescentno označevanje PZU

Za označevanje proteina smo uporabili komercialno dostopen kit za fluorescentno označevanje proteinov (Alexa Fluor[®] 488 Protein Labeling Kit). Postopek smo izvedli po predpisu proizvajalca v zatemnjenem prostoru, saj je barvilo občutljivo na svetlobo. Raztopino PZU smo najprej razredčili s PBS pufrom do zahtevane koncentracije 2 mg/ml. K 0,5 ml raztopine PZU smo dodali 50 µl 1 M raztopine NaHCO₃, ki smo jo pripravili tako, da smo v priloženo vialo z NaHCO₃ dodali 1 ml bidestilirane vode in premešali na vorteksu, da se je NaHCO₃ raztopil. Z dodatkom raztopine NaHCO₃ k proteinu smo povišali pH reakcijske zmesi in tako dosegli pogoje, pri katerih barvilo reagira. Nato smo raztopino proteina prenesli v drugo vialo, ki je vsebovala fluorescentno barvilo ter magnetno mešalo, in pustili mešati 1 uro, da se je barvilo kovalentno vezalo na proste amino skupine proteina.

Medtem ko je potekala vezava fluorescentnega barvila na protein, smo pripravili kolono za kolonsko kromatografijo. Kolono smo vpeli v držalo, da je bila ves čas postopka v navpičnem položaju, in na vrh postavili lij, skozi katerega smo vanjo nanašali vzorec in elucijski pufer. Kolono smo do višine 3 cm pod vrhom enakomerno napolnili z gelom, ki omogoča ločevanje molekul glede na njihovo velikost (»size exclusion«), in pustili, da je odvečni pufer odtekel. Na pripravljeno kolono smo po 1 uri mešanja kvantitativno prenesli raztopino označenega proteina, počakali, da je ves vzorec prešel v gel, ter nato začeli s počasnim in konstantnim spiranjem z elucijskim pufrom, ki smo ga pripravili z desetkratnim redčenjem koncentrirane raztopine PBS z bidestilirano vodo. Na koloni sta se označena PZU in nevezano barvilo ločila, kar smo na koloni videli kot dva ločena

obarvana pasova. V epice smo zbirali eluat označenega proteina, ki se je zaradi večje molekulske mase eluiral iz kolone pred nevezanim barvilom. Zbrano označeno PZU smo razdelili na alikvote in jih zaščitili pred svetlobo z aluminijasto folijo. En alikvot smo shranili v hladilniku, preostale pa smo pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zamrznili za kasnejšo uporabo in tako podaljšali stabilnost označenega proteina [21].

3.3.9 Gojenje celične linije Caco-2

Za delo s celicami so potrebni aseptični pogoji, zato smo vse postopke izvajali v LAF komori, ki preprečuje morebitne okužbe in ohranja sterilnost izdelka oz. celične linije.

Medij za gojenje Caco-2 celic smo pripravljali tako, da smo zamrznjene sestavine medija najprej odtalili in nato za 50 ml medija v centrifugirko s pipetami odmerili 43,5 ml MEM medija, 5 ml FBS, 0,5 ml raztopine glutamina, 0,5 ml raztopine antibiotika in antimikotika ter 0,5 ml raztopine neesencialnih aminokislin. Medij smo premešali ter ga shranili v hladilniku.

Ves material, ki smo ga uporabljali pri presajanju celic, smo najprej dobro obrisali s 70 % etanolom. Caco-2 medij in PBS pufer smo na vodni kopeli segreli na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, tripsin smo odtalili in ravno tako segreli na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Najprej smo iz plastenke s celicami odlili medij ter celice sprali s 5 ml PBS pufra. Pufer smo odstranili in dodali 1,5 ml tripsina. Po nekaj minutah, ko so se celice ločile od podlage, smo v gojitveno plastenko dodali 3-5 ml rastnega medija z dodanim FBS, da smo inaktivirali tripsin. Celice smo s pipetiranjem sprali s podlage in suspenzijo dobro prepipetirali, da smo dobili v vzorcu ločene celice. Suspenzijo celic smo prenesli v centrifugirko in celice centrifugirali 5 min s hitrostjo 1300 obratov/min. Na stekelce hemocitometra smo nanесли kapljico suspenzije celic (če je bilo potrebno, smo jo prej 5-krat redčili z medijem) in pod mikroskopom prešteli celice v 4 kvadrantih hemocitometra. Iz tega smo izračunali število celic v vzorcu:

$$N = 10^4 * X * (n_1 + n_2 + n_3 + n_4)/4 * V$$

X = faktor redčenja; $n_1 - n_4$ = število celic v posameznem kvadrantu na stekelcu hemocitometra; V = volumen suspenzije celic, ki smo jo centrifugirali.

Celice smo sadili z gostoto 10^4 celic/cm² rastne površine, tj. $7,5 * 10^5$ celic v plastenko s površino 75 cm² oz. $2,5 * 10^5$ v plastenko s površino 25 cm².

Centrifugiranim celicam smo odstranili supernatant, dodali 1 ml svežega ravnega medija in vzorec dobro prepipetirali. V novo označeno gojitveno plastenko smo odpipetirali svež ravnji medij (7-8 ml v malo plastenko oz. 15 ml v večjo) in ustrezen volumen suspenzije celic. Celice smo gojili v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂ ter jih presajali dvakrat tedensko.

3.3.10 Vstop označene PZU in nanodelcev z vgrajeno označeno PZU v celice ter priprava preparatov

V plošče s 6 vdolbnicami smo na predhodno sterilizirana krovna stekelca nasadili Caco-2 celice (5×10^3 celic/cm²), dodali 2 ml ravnega medija in počakali 24 ur, da so se celice pritrdile na stekelce ter začele rasti. Naslednji dan smo nanje nanegli naš vzorec: 5 µl fluorescentno označene PZU oz. 300 µl nanodelcev z označenim proteinom (predhodno smo odvzeli enak volumen medija kot je bil volumen dodanega vzorca, torej 5 µl oz. 300 µl). Vzorec smo inkubirali 24 ur pri 37 °C in 5 % CO₂ in nato začeli z barvanjem celičnih struktur.

Tekom eksperimentalnega dela smo v različnih kombinacijah barvali celična jedra in aktinske filamente. Jedra smo pobarvali modro ali rdeče, aktin pa zeleno ali rdeče, s tem da kombinacije rdeče – rdeče nismo uporabili, ker bi bila zaradi enake obarvanosti jedra in aktinskih filamentov ločljivost pod fluorescenčnim mikroskopom neznatna.

Najprej smo s celic odpipetirali medij in celice sprali z 0,5 ml PBS pufru s pH 7,4. Nato smo dodali 0,5 ml 4 % formaldehida za fiksiranje celic na stekelce, inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi, odpipetirali raztopino formaldehida s celic in celice ponovno sprali z 0,5 ml PBS. Zatem smo dodali 0,5 ml 0,5 % Triton-X 100, s čimer smo permeabilizirali celične membrane in s tem omogočili vstop barvilom. Vzorce smo inkubirali pri sobni temperaturi 10 min, sprali z 0,5 ml PBS, temu pa je sledilo dodajanje barvil. Najprej smo pobarvali jedra: za modro barvanje jeder smo na celice dodali 0,5 ml barvila Hoechst s koncentracijo 5 µg/ml in 30 min inkubirali pri sobni temperaturi zaščiteno pred svetlobo. Postopek rdečega barvanja jeder pa je bil dvostopenjski. Prva stopnja je bila 15 minutna inkubacija celic v prisotnosti 0,5 ml raztopine RNAze v PBS (koncentracija 1,0 mg/ml), ki ji je sledilo spiranje z 0,5 ml PBS. Druga stopnja barvanja pa je bila inkubacija z 0,5 ml

raztopine propidijevega jodida s koncentracijo 10 $\mu\text{g/ml}$, ki smo ga po 5 minutah sprali z 0,5 ml PBS.

Barvanju jeder je sledilo še barvanje aktinskih filamentov. Iz osnovnih barvil smo s 100-kratnim redčenjem s PBS pripravili delovno raztopino s koncentracijo 1 $\mu\text{g/ml}$. 0,5 ml te raztopine smo dodali k celicam in inkubirali 30 minut, da so se aktinski filament obarvali rdeče ali zeleno. Za rdeč aktin smo uporabili barvilo faloidin-tetrametilrodamin B izotiocianat, za zelenega pa faloidin – fluorescein izotiocianat. Po končanem postopku barvanja smo celice še dvakrat dobro sprali s PBS pufrom, da smo odstranili ostanke nevezanih barvil.

Da bi zmanjšali difuzno fluorescenco, ki je posledica prisotnosti proste označene PZU, smo za barvanje celic uporabili tudi barvilo tripan modro. Tu smo po začetnem spiranju s PBS pufrom celice 1 minuto inkubirali z 0,2 ml raztopine tripskega modrila s koncentracijo 100 $\mu\text{g/ml}$, ki smo jo pripravili z redčenjem 0,4 % osnovne raztopine s PBS. Po spiranju s PBS smo postopek nadaljevali s fiksacijo s formaldehidom, permealizacijo s Tritonom-X 100 in barvanjem jeder z rdečo na način, ki je že bil predhodno opisan [53].

Na označeno objektno stekelce smo za preprečevanje bledenja barve kanili kapljico odtaljenega reagenta, ki preprečuje bledenje fluorescence («antifade») in nanjo položili krovno stekelce s celicami, tako da so bile le-te obrnjene navzdol, tj. potopljene v reagent proti bledenju. Preparate smo shranili v hladilniku, čez nekaj dni robove krovnih stekelc premazali s prozornim lakom za nohte, da smo stekelca fiksirali, in jih nato pogledali pod fluorescenčnim mikroskopom z uporabo ustreznih filtrov.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

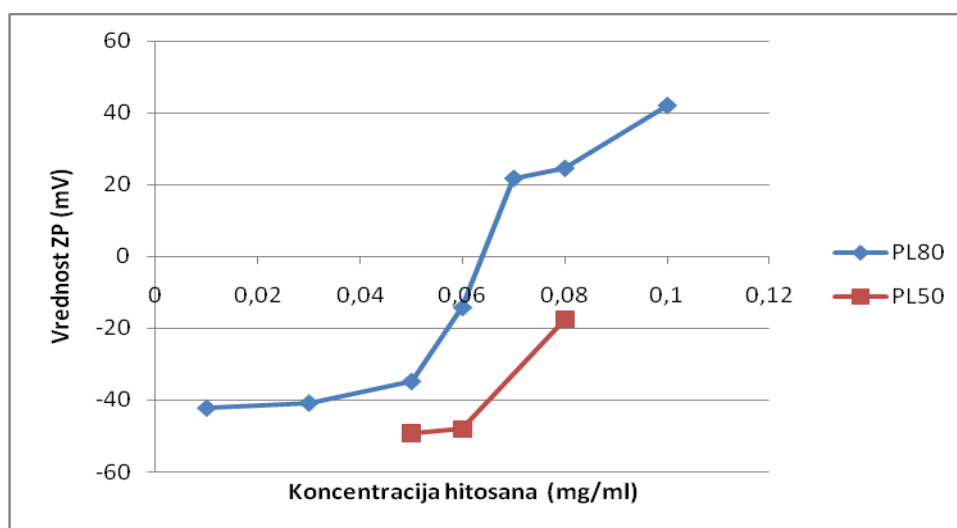
4.1 IZDELAVA PRAZNIH NANODELCEV

Diplomsko delo smo začeli z izdelavo praznih nanodelcev z masnim razmerjem lecitin : hitosan = 21,7 : 1. Iz predhodnih rezultatov in literaturnih podatkov smo namreč vedeli, da pri izbranem masnem razmerju nastane fizikalno stabilen sistem nanodelcev ustrezne velikosti. Ko smo pri enakem razmerju komponent želeli v nanodelce vgraditi še PZU (njena koncentracija v končni disperziji je bila 0,2 mg/ml), je prišlo do obarjanja. Zaradi dodatka še tretje komponente z nabojem je prišlo do spremembe celokupnega naboja v sistemu in spremembe zeta potenciala, ki se je očitno približal ničli, kar je bil povod za fizikalno nestabilnost. Da bi se temu izognili, smo spreminjali pH raztopine hitosana in njeno koncentracijo ter na ta način spreminjali tudi fizikalne parametre nanodelcev. Uporabili smo raztopine hitosana z različnimi pH vrednostmi (pH osnovne raztopine hitosan klorida v vodi s koncentracijo 0,10 mg/ml je znašal 5) in tako spreminjali protoniranje aaminskih skupin hitosana, ki so odgovorne za ionske povezave pri nastanku nanodelcev. S spreminjanjem le-tega smo spreminjali tudi pogoje nastanka in posledično lastnosti nanodelcev.

4.1.1 Nanodelci iz hitosana (pH 5) in lecitina

Preglednica I: Vpliv masnega razmerja Phospholipon[®] 80 : hitosan na velikost, polidisperzni indeks in zeta potencial praznih nanodelcev.

Konc. HIT (mg/ml)	Masno razmerje PL80 : HIT	d (nm)	PDI	ZP (mV)
0,10	21,7 : 1	229,3	0,353	42,1±8,0
0,08	27,2 : 1	382,1	0,634	24,6±6,6
0,07	31,1 : 1	870,8	0,867	21,8±3,7
0,06	36,2 : 1	565,1	0,744	-14,2±3,5
0,05	43,5 : 1	431,4	0,511	-34,8±5,9
0,03	72,5 : 1	254,1	0,497	-40,8±7,6
0,01	217,4 : 1	170,8	0,463	-42,2±5,3



Slika 12: Spreminjanje vrednosti zeta potenciala nanodelcev v odvisnosti od koncentracije hitosana in vrste lecitina.

Iz rezultatov v preglednici I lahko vidimo, da ob uporabi PL80 najmanjši nanodelci nastanejo pri največji in najmanjši koncentraciji hitosana v disperziji. Povprečni premer nanodelcev pri začetnem masnem razmerju lecitin : hitosan = 21,7 : 1, iz katerega smo izhajali, je bil 229,3 nm, PDI 0,353, ZP pa +42 mV (slika 12). Enako absolutno vrednost ZP, le nasprotnega naboja, so imeli tudi nanodelci, pri katerih je bilo razmerje med lecitinom in hitosanom 100-krat večje v prid lecitina (217,4 : 1). Z zmanjševanjem količine hitosana v disperziji smo manjšali tudi količino pozitivno nabite komponente, zato je ZP prehajal iz pozitivne vrednosti preko izoelektrične točke v negativno. Izoelektrično točko smo dosegli pri razmerju lecitin : hitosan med 31,1 : 1 in 36,2 : 1. V tem območju koncentracij je bila velikost nanodelcev največja, kar je razumljivo, saj zaradi manjše absolutne vrednosti ZP ni bilo elektrostatske stabilizacije, zato je prišlo do fizikalne nestabilnosti in agregacije delcev. To je vplivalo tudi na vrednost PDI, ki je bil okoli izoelektrične točke največji, saj je bila tu zaradi združevanja delcev tudi porazdelitev velikosti najbolj neenakomerna. Do enakih zaključkov je prišel tudi Sonvico v svoji študiji, kjer je s sodelavci ugotovil, da sta velikost in ZP nanodelcev odvisna od količine hitosana v disperziji [2].

Preglednica II: Vpliv masnega razmerja Phospholipon[®] 50 : hitosan na velikost, polidisperzni indeks in zeta potencial praznih nanodelcev.

Konc. HIT (mg/ml)	Masno razmerje PL50 : HIT	d (nm)	PDI	ZP (mV)
0,10	21,7 : 1	vidni delci	/	/
0,08	27,2 : 1	362,8	0,476	-17,5±8,6
0,06	36,2 : 1	225,5	0,385	-48,1±6,5
0,05	43,5 : 1	210,7	0,420	-49,3±8,3

Za razliko od prej, ko smo pri masnem razmerju PL80 : hitosan = 21,7 : 1 dobili fizikalno stabilen sistem z ustrezno velikimi nanodelci, so ob uporabi PL50 in istem masnem

razmerju nastali delci mikrometrskih velikosti, ki so bili že vizualno neustrezni (preglednica II). Pri PL50 je bilo mogoče tudi pri masnem razmerju 27,2 : 1 že na oko opaziti nekaj večjih delcev. Iz tega in iz vrednosti ZP vidimo, da smo bili pri teh dveh masnih razmerjih v okolici izoelektrične točke (slika 12). ZP je namreč z manjšanjem količine hitosana v sistemu padal in ker pri teh dveh razmerjih ni presegel absolutne vrednosti 30 mV, kar je pogoj za fizikalno stabilnost, so nastali večji delci od zelenih. Z večanjem razmerja med lecitinom in hitosanom pa ni padal le ZP, temveč se je zmanjševala tudi velikost delcev, kar smo lahko opazili že pri uporabi PL80 (preglednica I). Večja absolutna vrednost ZP namreč pomeni večjo silo, ki drži delce narazen, zato ne pride do združevanja delcev in posledično so le-ti manjših velikosti. Kljub temu pa lahko ob primerjavi obeh sistemov opazimo dve razliki. Ena je ta, da smo ob uporabi PL50 dobili bolj negativen ZP, kar je razumljivo, saj PL50 vsebuje več negativno nabitih fosfolipidov. Druga razlika pa je v tem, da je bila izoelektrična točka zaradi različnega števila negativno nabitih skupin obeh lecitinov pri različnih masnih razmerjih: pri uporabi PL50 se je zaradi njegovega večjega negativnega naboja prehod iz pozitivnega v negativen ZP zgodil pri manjšem razmerju med lecitinom in hitosanom kot se je to zgodilo pri nanodelcih iz PL80 (torej pri večji količini hitosana), saj je negativen naboj lecitina prej prevladal nad pozitivnim nabojem hitosana.

Na enak način smo poskušali izdelati tudi nanodelce z uporabo obeh lecitinov, dispergiranih v vodi, vendar je pri vseh masnih razmerjih hitro prišlo do obarjanja, nastanka večjih delcev in sedimentacije, iz česar smo zaključili, da uporaba takšnega postopka ni ustrezna.

4.1.2 Nanodelci iz hitosana (pH 4) in lecitina

Vodne raztopine hitosana smo s HCl nakisali do pH 4 in pripravili prazne nanodelce. Glede na predhodno dobljene rezultate (nanodelci iz hitosana s pH 5 in s PZU, glej preglednici VI in VII) smo se odločili, da bomo poskuse izvajali le s koncentracijama hitosana 0,05 mg/ml in 0,06 mg/ml oz. z masnim razmerjem lecitin : hitosan = 43,5 : 1 in 36,2 : 1.

Preglednica III: Vpliv koncentracije raztopine hitosana (pH 4) na velikost, polidisperzni indeks in zeta potencial praznih nanodelcev iz Phospholipona® 80 in 50.

Konc. HIT (mg/ml)	Vrsta lecitina	Masno razmerje PL : HIT	d (nm)	PDI	ZP (mV)
0,05	PL80	43,5 : 1	285,9	0,532	-28,5±3,2
0,06	PL80	36,2 : 1	261,0	0,221	-15,4±4,1
0,05	PL50	43,5 : 1	217,3	0,257	-33,5±5,5
0,06	PL50	36,2 : 1	279,6	0,493	-31,7±4,0

Opazimo lahko, da pri pH 4 vrsta lecitina in koncentracija hitosana nista imeli velikega vpliva na velikost delcev, saj je bil povprečni premer delcev v vseh štirih vzorcih v območju od 220 do 290 nm (preglednica III). Pri teh masnih razmerjih hitosan : lecitin smo bili izven območja izoelektrične točke, zato so bili vzorci stabilni tako ob izdelavi kot tudi dan kasneje.

4.1.3 Nanodelci iz hitosana (pH 6) in lecitina

Zanimalo nas je tudi, kaj se dogaja pri nekoliko višjem pH (v okolici pKa hitosana), zato smo z NaOH naalkalili vodno raztopino hitosana do pH 6 in pripravili prazne nanodelce.

Preglednica IV: Vpliv koncentracije raztopine hitosana (pH 6) na velikost, polidisperzni indeks in zeta potencial praznih nanodelcev iz Phospholipona® 80 in 50.

Konc. HIT (mg/ml)	Vrsta lecitina	Masno razmerje PL : HIT	d (nm)	PDI	ZP (mV)
0,05	PL80	43,5 : 1	1109	0,525	-34,7±9,5
0,06	PL80	36,2 : 1	838	0,597	-32,7±9,2
0,05	PL50	43,5 : 1	205	0,289	-41,7±20,7
0,06	PL50	36,2 : 1	322,5	0,410	-39,5±6,3

Pri uporabi raztopine hitosana s pH 6 (preglednica IV) smo prišli do ugotovitve, da v primeru uporabe PL80 nastanejo precej večji delci kot ob uporabi PL50 (mikrometrške velikosti pri PL80 in le 200-300 nm pri PL50). Kljub temu, da je bil ZP ustrezen, saj je absolutna vrednost v vseh primerih presegla mejo 30 mV, ki je potrebna za fizikalno stabilnost, je bilo v vzorcih mogoče opaziti nekaj večjih plavajočih delcev. Če te rezultate primerjamo z velikostjo nanodelcev, izdelanih iz raztopine hitosana s pH 4 in 5 (preglednice I-III), opazimo, da so bili pri višjem pH in uporabi PL80 delci precej večji kot pri istih koncentracijah in nižjih pH. Vzrok za to razliko v velikosti lahko iščemo v samem pH, saj smo s pH 6 dosegli bližino pKa hitosana, zaradi česar so se nekatere aminske skupine že deprotonirale, s tem se je zmanjšal pozitiven naboj, možnosti ionskih povezav z lecitinom pa so bile drugačne. Na enak način lahko razložimo tudi nižji ZP pri pH 6 v primerjavi s pH 4: hitosan je imel pri pH 6 manjši pozitivni naboj, zato je prevladal negativni naboj lecitina in posledično je bil ZP delcev bolj negativen. Enako kot pri pH 5 (slika 12) lahko tudi pri pH 4 in 6 opazimo, da je ZP delcev iz PL50 nižji kot ZP delcev iz PL80, hkrati pa se zmanjšuje tudi z manjšo količino hitosana v disperziji, kar nam ponovno dokazuje, da razmerje med obema komponentama vpliva na vrednost ZP.

Nanodelci iz PL50 so se v primeru višjega pH izkazali kot ustrežnejši ne samo zaradi manjšega povprečnega premera in večje absolutne vrednosti ZP, temveč tudi zaradi manjše vrednosti PDI.

Disperzije nanodelcev smo pustili čez noč na magnetnem mešalu, da je etanol izhlapel, in nato naslednji dan ponovno pomerili fizikalne karakteristike nanodelcev. Če primerjamo rezultate takoj po izdelavi in naslednji dan, vidimo, da se je velikost nanodelcev v vseh primerih zmanjšala – pri pH 6 se je iz začetnih mikrometrskih velikosti zmanjšala na 500 nm. Ravno tako se je tudi ZP znižal in pri nanodelcih iz PL50 (pH 6) celo presegel vrednost -50 mV. Predvidevamo, da je zaradi mešanja in izhlapevanja etanola prišlo do reorganizacije povezav med molekulami in posledično do spremenjenih karakteristik nanodelcev.

Če povzamemo te rezultate, lahko rečemo, da so bile najugodnejše formulacije praznih nanodelcev sledeče:

- nanodelci iz raztopine hitosana s pH 5, koncentracije hitosana 0,10 mg/ml ali 0,01 mg/ml in iz PL80 ter nanodelci iz raztopine hitosana s pH 5, koncentracije hitosana 0,05 mg/ml ali 0,06 mg/ml ter iz PL50;
- nanodelci iz raztopine hitosana s pH 4, koncentracije hitosana 0,05 mg/ml in PL50;
- nanodelci iz raztopine hitosana s pH 6, koncentracije hitosana 0,05 mg/ml in PL50.

4.1.4 Nanodelci iz hitosana in TPP

Za primerjavo smo za izdelavo hitosanskih nanodelcev namesto lecitina uporabili tudi natrijev tripolifosfat (TPP). Najprej smo poskušali pripraviti nanodelce z vodnima raztopinama hitosana s pH 5 in 6 ter različnimi masnimi razmerji med TPP in hitosanom. Ker je v vseh teh primerih prišlo do obarjanja, smo nanodelce izdelali po postopku iz literature in hitosan namesto v vodi raztopili v 1 % raztopini očetne kisline (pH smo z NaOH dvignili na 4,7), masno razmerje med hitosanom in TPP pa je znašalo 3 : 1 [51]. Tako izdelani nanodelci so imeli povprečni premer 507 nm, PDI je znašal 0,541, ZP +15,8 mV, disperzija pa je bila fizikalno stabilna.

4.2 IZDELAVA NANODELCEV S PROTEINSKO ZDRAVILNO UČINKOVINO

Ker je bil naš namen izdelati čim bolj optimalen sistem nanodelcev ustreznih karakteristik, ki bi bili fizikalno stabilni in v katere bi se vgradilo čim več PZU, smo spreminjali količino hitosana v disperziji, pH raztopine hitosana in količino dodanega proteina. Zaradi majhne količine PZU, ki smo jo imeli na voljo, smo v primerjavi s praznimi nanodelci izdelovali volumsko precej manjše vzorce, zato smo lahko določili le povprečni premer nanodelcev in PDI, ZP pa ne.

4.2.1 Nanodelci s PZU iz hitosana (pH 5) in lecitina

Preglednica V: Vpliv koncentracij raztopin PZU in hitosana (pH 5) na velikost in polidisperzni indeks nanodelcev iz Phospholipona[®] 80.

Konc. HIT (mg/ml)	Masno razmerje PL : HIT	Konc. PZU (mg/ml)	d (nm)	PDI
0,05	43,5 : 1	0,2	90,9	0,389
0,06	36,2 : 1	0,2	110,1	0,629
0,08	27,2 : 1	0,2	804,4	0,836

Preglednica VI: Vpliv koncentracij raztopin PZU in hitosana (pH 5) na velikost in polidisperzni indeks nanodelcev iz Phospholipona® 50.

Konc. HIT (mg/ml)	Masno razmerje PL : HIT	Konc. PZU (mg/ml)	d (nm)	PDI
0,05	43,5 : 1	0,2	308,7	0,508
0,06	36,2 : 1	0,2	398,9	0,733
0,08	27,2 : 1	0,2	4478	1,00

Na podlagi rezultatov v preglednicah V in VI lahko ugotovimo, da se z večanjem koncentracije hitosana v disperziji povečuje tudi povprečni premer nanodelcev. Ko smo za izdelavo nanodelcev uporabili PL80, so pri koncentracijah hitosana 0,05 in 0,06 mg/ml (torej koncentracijah, ki smo ju kasneje uporabljali pri raztopinah hitosana s pH 4 in 6) nastali delci povprečnega premera od 90 do 110 nm, medtem ko so ob uporabi druge vrste lecitina nastali večji delci – od 300 do 400 nm. Vzrok za razliko v velikosti je v razliki nabojev obeh lecitinov. Ker ima PL50 več negativno nabitih skupin kot PL80, se je v tem primeru več hitosanskih molekul povežalo z lecitinom, zaradi česar so nastali večji delci. Tudi PDI je bil v primeru PL50 večji kot pri PL80. Vsi vzorci (razen zadnjega v preglednici VI) so bili fizikalno stabilni na dan izdelave in tudi 24 ur kasneje.

Do podobnih ugotovitev je prišla tudi Hafner s sodelavci. Pri pH okoli 5 so preučevali nanodelce iz hitosan klorida in treh različnih vrst lecitina ter spremljali vgradnjo melatonina vanje. Tudi v njihovem primeru se je povprečni premer delcev z naraščanjem količine hitosana v sistemu povečeval, z uporabo bolj negativno nabitega lecitina pa so enako kot pri nas nastali večji delci [54].

Pripravili smo tudi delce s PZU, kjer smo uporabili lecitin, dispergirani v vodi. Tako kot predhodno pri praznih nanodelcih je tudi tu prišlo do precejšnje fizikalne nestabilnosti in obarjanja (kljub temu da je bila sama disperzija lecitina v vodi stabilna skozi daljši čas), zato smo tak postopek izdelave opustili.

4.2.2 Nanodelci s PZU iz hitosana (pH 4 in pH 6) in lecitina

Preglednica VII: Vpliv koncentracij raztopin PZU in hitosana (pH 4) na velikost in polidisperzni indeks nanodelcev iz Phospholipona[®] 80.

Konc. HIT (mg/ml)	Masno razmerje PL : HIT	Konc. PZU (mg/ml)	d (nm)	PDI
0,05	43,5 : 1	0,2	288,6	0,336
0,05	43,5 : 1	0,153	186,9	0,277
0,05	43,5 : 1	0,104	221,7	0,315
0,05	43,5 : 1	0,053	164,4	0,483
0,06	36,2 : 1	0,2	453,6	0,604
0,06	36,2 : 1	0,053	306,2	0,485

Preglednica VIII: Vpliv koncentracij raztopin PZU in hitosana (pH 4) na velikost in polidisperzni indeks nanodelcev iz Phospholipona[®] 50.

Konc. HIT (mg/ml)	Masno razmerje PL : HIT	Konc. PZU (mg/ml)	d (nm)	PDI
0,05	43,5 : 1	0,2	vidni delci	1,0
0,05	43,5 : 1	0,153	708,2	0,668
0,05	43,5 : 1	0,104	434,1	0,464
0,05	43,5 : 1	0,053	189	0,292
0,06	36,2 : 1	0,2	vidni delci	0,963
0,06	36,2 : 1	0,053	214,8	0,380

Preglednica IX: Vpliv koncentracij raztopin PZU in hitosana (pH 6) na velikost in polidisperzni indeks nanodelcev iz Phospholipona® 80.

Konc. HIT (mg/ml)	Masno razmerje PL : HIT	Konc. PZU (mg/ml)	d (nm)	PDI
0,05	43,5 : 1	0,2	452,6	0,640
0,05	43,5 : 1	0,153	92,5	0,939
0,05	43,5 : 1	0,104	90,5	0,294
0,05	43,5 : 1	0,053	139,6	0,263
0,06	36,2 : 1	0,2	1010	1,00
0,06	36,2 : 1	0,053	224	0,406

Preglednica X: Vpliv koncentracij raztopin PZU in hitosana (pH 6) na velikost in polidisperzni indeks nanodelcev iz Phospholipona® 50.

Konc. HIT (mg/ml)	Masno razmerje PL : HIT	Konc. PZU (mg/ml)	d (nm)	PDI
0,05	43,5 : 1	0,2	1997	1,00
0,05	43,5 : 1	0,153	198	0,927
0,05	43,5 : 1	0,104	214,3	0,345
0,05	43,5 : 1	0,053	191	0,266
0,06	36,2 : 1	0,2	2082	1,00
0,06	36,2 : 1	0,053	141,2	0,378

Na podlagi rezultatov v preglednicah VII - X lahko opazimo enak trend spreminjanja velikosti nanodelcev kot smo ga zaznali pri pH 5 (preglednici V in VI). Tudi pri uporabi raztopine hitosana s pH 4 in 6 se je povprečni premer delcev zmanjševal s padajočima

koncentracijama hitosana in PZU. PL50 je pri enakih koncentracijah komponent ponovno dal večje delce kot PL80 – pri najvišji koncentraciji PZU so pri obeh pH (pH 4 in 6) nastali delci mikrometrskih velikosti, ki smo jih lahko opazili tudi s prostim očesom, medtem ko sta najmanjši dve koncentraciji PZU (0,104 in 0,053 mg/ml) tudi ob uporabi PL50 dali ustrezno velike delce. V odvisnosti od velikosti se je spreminjal tudi PDI, saj je le-ta naraščal z naraščajočo velikostjo delcev in pri mikrometrskih velikostih dosegel svojo maksimalno vrednost 1. Povprečna premera delcev iz raztopine hitosana s pH 6, PL80 oz. PL50 in koncentracijo PZU 0,153 mg/ml sta bila sicer ustrezna, vendar sta bili PDI vrednosti previsoki, zaradi česar ti dve formulaciji nista ustrezali. Grafični predstavitvi teh rezultatov sta predstavljali 3 vrhove pri treh različnih velikostih – delci so bili torej precej različnih velikosti in so se porazdelili v tri velikostne razrede, zato sta bili tudi vrednosti PDI tako visoki.

Do podobnih zaključkov je prišel tudi Sarmiento s svojo raziskovalno skupino, s katero je raziskoval nanodelce iz hitosana in dekstran sulfata (ima negativen naboj, torej ga lahko primerjamo z lecitinom) z vgrajenim inzulinom. Pri večji koncentraciji proteina so nastali delci večjih velikosti, ravno tako pa so bili tudi delci iz raztopine hitosana s pH 4 večji od tistih, ki so jih pripravili iz raztopine hitosana s pH 5 [38]. Pri nižjem pH je bil namreč hitosan bolj protoniran in je imel večji pozitivni naboj, zato je lahko vezal več molekul z negativnim nabojem in posledično so bili delci večjih velikosti.

Vzorci smo čez noč shranili v hladilniku in jih naslednji dan ponovno ovrednotili. Pri delcih iz PL80 ni prišlo do večjih sprememb, medtem ko so bili delci iz PL50 naslednji dan večji. To je v nasprotju z rezultati, ki smo jih dobili pri praznih nanodelcih, saj se je tam velikost delcev po 24 urah zmanjšala. Eden izmed razlogov za to razliko je verjetno način shranjevanja vzorcev čez noč – pri praznih nanodelcih smo disperzije ves čas mešali, s čimer smo v sistem vnesli silo, ki je preprečila, da bi se delci začeli združevati in se na ta način povečali. Nanodelce s PZU pa smo zaradi občutljivosti proteina na temperaturo shranjevali v hladilniku – zaradi tega in zaradi majhnega volumna vzorca nismo mogli zagotoviti konstantnega mešanja, zato so vzorci mirovali in je lažje prišlo do združevanja posameznih delcev in povečanja velikosti.

Rezultate tega poglavja lahko strnemo v naslednje ustrezne formulacije:

- nanodelci iz raztopine hitosana s pH 5, koncentracije hitosana 0,05 mg/ml oz. 0,06 mg/ml, PL80 in PZU v koncentraciji 0,2 mg/ml;

- nanodelci iz raztopine hitosana s pH 4, koncentracije hitosana 0,05 mg/ml, PL80 in PZU v vseh 4 preizkušeni koncentracijah ter nanodelci iz raztopine hitosana s pH 4, koncentracije hitosana 0,05 mg/ml oz. 0,06 mg/ml, PL50 in PZU v koncentraciji 0,053 mg/ml;
- nanodelci iz raztopine hitosana s pH 6, koncentracije hitosana 0,05 mg/ml, PL80 in PZU v koncentraciji 0,104 oz. 0,053 mg/ml ter nanodelci iz raztopine hitosana s pH 6, koncentracije hitosana 0,06 mg/ml, PL80 in PZU v koncentraciji 0,053 mg/ml.

Manjši delci so torej nastali ob uporabi PL80 in pri nižjih koncentracijah PZU.

4.2.3 Nanodelci s PZU iz hitosana in TPP

Preglednica XI: Vpliv koncentracije PZU na velikost in polidisperzni indeks nanodelcev iz hitosana in TPP.

Konc. PZU (mg/ml)	d (nm)	PDI
0	507	0,541
0,2	802,1	0,797
0,153	933,8	0,889
0,104	793,4	0,734

Pri teh vzorcih smo za izdelavo nanodelcev namesto raztopine lecitina uporabili raztopino TPP, ki ima prav tako negativni naboj. Z dodatkom PZU so se nanodelci povečali iz začetnih 500 nm, kolikor so merili prazni nanodelci, na približno 800 oz. 900 nm (preglednica XI). Temu ustrezno velik je bil tudi PDI, ki je pri največji velikosti dosegel skoraj vrednost 0,9. Vzrok za porast velikosti lahko iščemo v dodatku še tretje komponente in drugačnih pogojih za organizacijo molekul v nanodelce. Pri koncentracijah PZU 0,2 in 0,104 mg/ml so bili delci enako veliki, medtem ko je srednja koncentracija proteina dala večje delce. Če te rezultate primerjamo z vrednostmi, ki smo jih pri enakem pH (pH 5) dobili pri nanodelcih iz lecitina (preglednici V in VI), opazimo, da so lecitinski nanodelci precej manjši (tudi samo 90 nm). Vendar pa moramo upoštevati, da smo pri nanodelcih iz

lecitina uporabili manjše koncentracije hitosana (od 0,05 do 0,08 mg/ml), medtem ko je bila tu njegova začetna koncentracija kar 1,75 mg/ml. S tem lahko razložimo večje velikosti teh nanodelcev, saj smo že predhodno ugotovili, da se s povečevanjem količine hitosana v sistemu veča tudi velikost delcev.

Poskusili smo izdelati tudi nanodelce iz vseh 4 uporabljenih komponent – iz hitosana, PZU, TPP in lecitina. Dobljena disperzija je bila ob nastanku sicer stabilna, vendar je čez noč prišlo do izrazitega obarjanja in nastanka velike količine usedline.

4.3 SPREMINJANJE VELIKOSTI MOLEKULE PROTEINSKE ZDRAVILNE UČINKOVINE V ODVISNOSTI OD ČASA

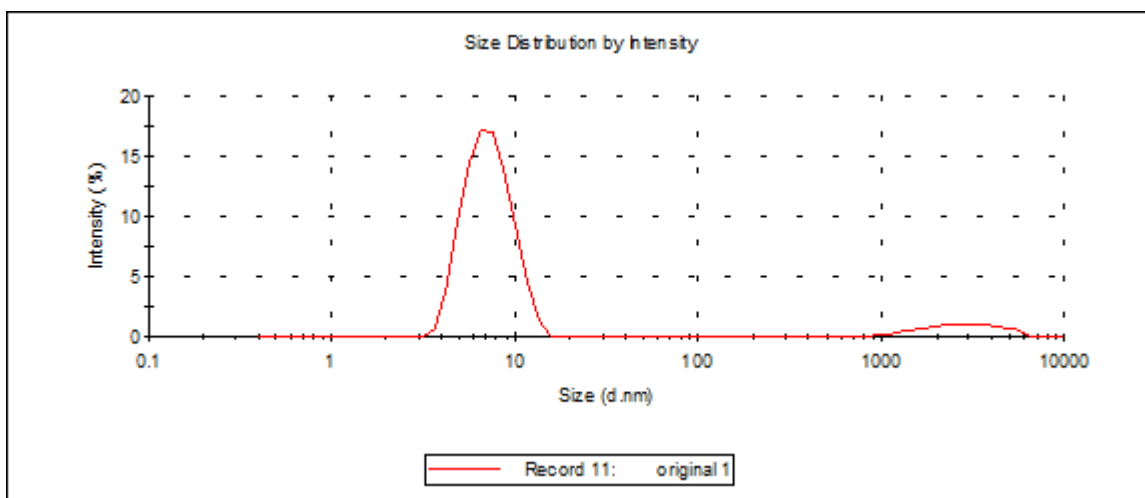
Ker nas je zanimalo, kako se spreminja velikost molekule PZU po tistem, ko jo odtalimo z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo v določenih časovnih intervalih z napravo Zetasizer Nano ZS merili njen povprečni premer. Preverili smo tudi, do kakšnih razlik pride, če je vzorec določen čas shranjen na sobni temperaturi oz. v hladilniku.

Povprečni premer molekule PZU takoj po odtalitvi je bil med 7 in 8 nm. Take velikosti je bil večinski delež proteina, medtem ko je majhen odstotek že takoj po odtalitvi dosegal mikrometrške velikosti. V roku 4 ur je njegov povprečni premer narastel na 9,94 nm (v hladilniku) oz. 13,55 nm (na sobni temperaturi). 24 ur po odtalitvi je bil povprečni premer molekule PZU, shranjene v hladilniku, enak kot 20 ur pred tem, medtem ko se je na sobni temperaturi povečal še za 10 nm. Iz teh rezultatov vidimo, da je s časom povprečni premer molekule naraščal, saj se je povečeval odstotek molekul PZU mikrometrskih velikosti in zmanjševal odstotek proteinskih molekul v velikosti do 10 nm, ter da je bil porast velikosti večji na sobni temperaturi kot v hladilniku.

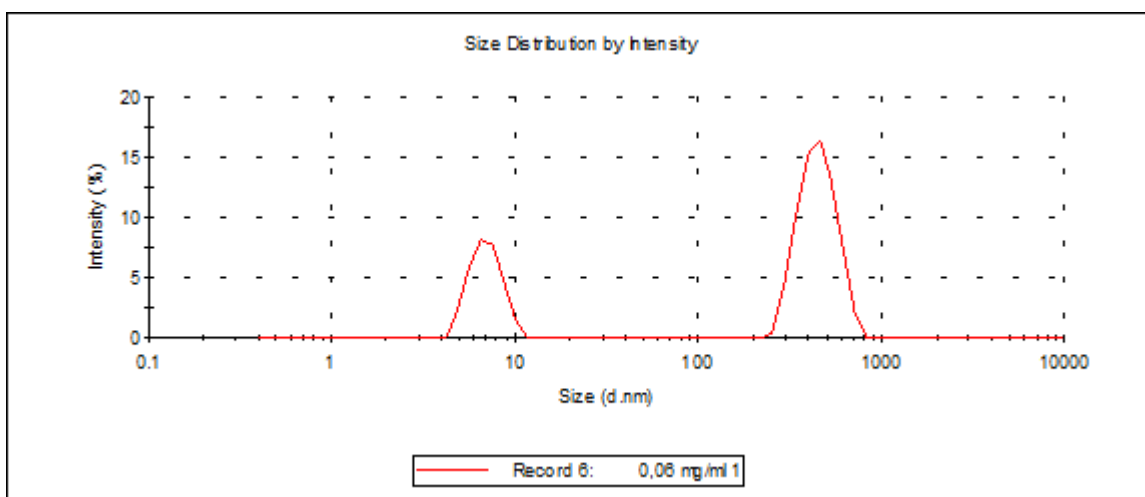
Do podobnih rezultatov so prišli tudi pri termodinamskih študijah EPO, kjer se je z daljšim časom izpostavljenosti višji temperaturi večalo število oligomerov in manjšal odstotek monomera tega proteina [55]. Višja temperatura lahko povzroči razvijanje verig, denaturacijo proteina, njegovo agregacijo v oligomere in s tem povečanje velikosti. V našem primeru do tega skrajnega primera sicer ni prišlo, saj nismo presegli temperature denaturacije in je zato PZU ostala aktivna, je pa zaradi višje temperature od idealne vseeno prišlo do nekaterih strukturnih sprememb v zvitju proteina, kar je povzročilo porast

velikosti. Spremembo v porazdelitvi velikosti je nakazoval tudi PDI, ki je pri meritvah prvega dne znašal med 0,2 in 0,3, po enem tednu pa je močno narastel in dosegel vrednost 0,8. Kljub vsemu pa je zanimivo, da je bilo ugotovljeno, da je razvitje verig EPO visoko reverzibilen pojav in da se tudi po izpostavljenosti precej visokim temperaturam (okoli temperature denaturacije ali celo ob nekoliko višjih temperaturah) struktura povrne, če temperaturo ponovno znižamo [55].

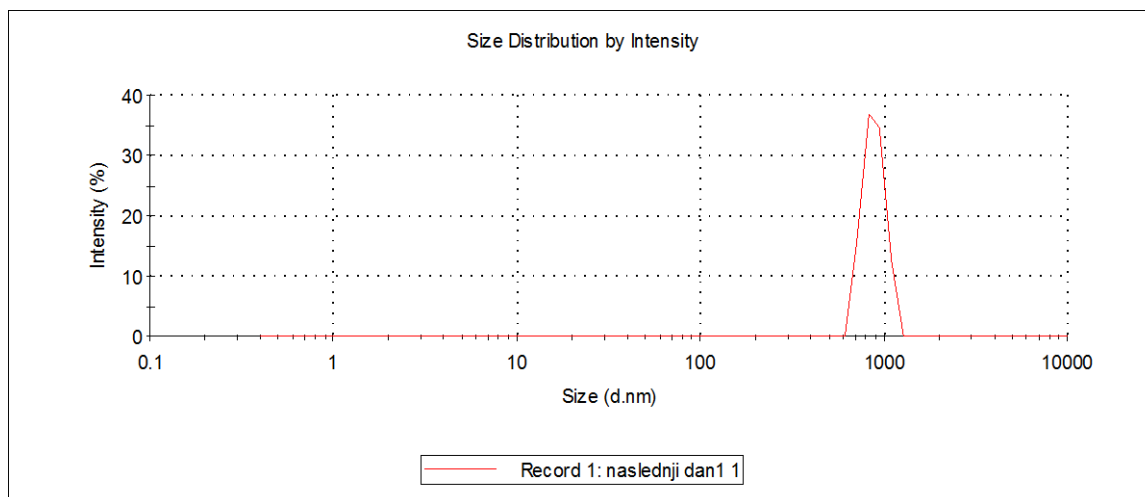
Trend sprememb nam jasno nakazujejo tudi spodnje tri slike meritev na Zetasizerju Nano ZS (slike 13-15).



Slika 13: Povprečni premer molekule PZU takoj po odmrzovanju.



Slika 14: Povprečni premer molekule PZU po 14 dneh shranjevanja v hladilniku.



Slika 15: Povprečni premer molekule PZU po 14 dneh shranjevanja v hladilniku in 1 dnevu na sobni temperaturi.

4.4 UČINKOVITOST VGRAJEVANJA PROTEINSKE ZDRAVILNE UČINKOVINE V NANODELCE

4.4.1 Učinkovitost vgrajevanja PZU v nanodelce iz hitosana in lecitina

Pri izdelavi dostavnega sistema je eden izmed pglavitnih parametrov, ki določajo uspešnost njegove izdelave, količina učinkovine, ki se vanj vgradi. Žal vgrajevanje velikokrat ne dosega zelenih vrednosti, saj velik delež učinkovine ostane v disperziji in se ne vključi v dostavni sistem.

Učinkovitost vgrajevanja PZU v nanodelce smo določevali s HPLC analizo. Najprej smo izdelali nanodelce iz raztopine hitosana s pH 5 in koncentracijama 0,05 in 0,06 mg/ml ter PZU v koncentraciji 0,2 mg/ml. Vgrajevanje PZU v take nanodelce je bilo nično, zato smo poskušali to izboljšati s spreminjanjem pH in koncentracije PZU. Pri vzorcih, katerim smo določevali učinkovitost vgrajevanja, smo uporabljali sveže odtaljeno PZU oz. PZU iz istega alikvota, saj smo se na ta način želeli izogniti morebitnim spremembam proteina, do katerih bi lahko prišlo po njegovem daljšem shranjevanju v hladilniku.

Preglednica XII: Učinkovitost vgrajevanja PZU v nanodelce iz hitosana (pH 4) in obeh lecitinov.

Konc. HIT (mg/ml)	Vrsta lecitina	Masno razmerje PL : HIT	Konc. PZU (mg/ml)	Učinkovitost vgrajevanja PZU (%)
0,06	PL50	36,2 : 1	0,2	6,0
0,06	PL50	36,2 : 1	0,053	0,0
0,05	PL50	43,5 : 1	0,2	2,5
0,05	PL50	43,5 : 1	0,153	7,5
0,05	PL50	43,5 : 1	0,104	8,8
0,06	PL80	36,2 : 1	0,2	3,0
0,06	PL80	36,2 : 1	0,053	5,8
0,05	PL80	43,5 : 1	0,2	2,8
0,05	PL80	43,5 : 1	0,153	5,0
0,05	PL80	43,5 : 1	0,104	6,6

Preglednica XIII: Učinkovitost vgrajevanja PZU v nanodelce iz hitosana (pH 6) in obeh lecitinov.

Konc. HIT (mg/ml)	Vrsta lecitina	Masno razmerje PL : HIT	Konc. PZU (mg/ml)	Učinkovitost vgrajevanja PZU (%)
0,06	PL50	36,2 : 1	0,2	0,9
0,06	PL50	36,2 : 1	0,053	0,0
0,05	PL50	43,5 : 1	0,2	0,0
0,06	PL80	36,2 : 1	0,2	8,5
0,06	PL80	36,2 : 1	0,053	2,1
0,05	PL80	43,5 : 1	0,2	6,9
0,05	PL80	43,5 : 1	0,153	8,8
0,05	PL80	43,5 : 1	0,104	5,7

Iz rezultatov v tabelah XII in XIII vidimo, da je bila učinkovitost vgrajevanja v nanodelce kljub spreminjanju koncentracij hitosana in PZU ter pH zelo majhna, saj ni presegla 10 %. Pri nanodelcih iz hitosana s pH 4 ne moremo ugotoviti nekega posebnega trenda, ki bi nakazoval, kaj je vplivalo na učinkovitost vgrajevanja oz. kateri izmed dejavnikov je imel odločujoč vpliv na rezultate. Edina podobnost, ki smo jo opazili pri obeh vrstah lecitina, je bil največji odstotek vgradnje pri najmanjši koncentraciji PZU. Za razliko od tega pa lahko pri uporabi raztopine hitosana s pH 6 opazimo, da se PZU v nanodelce iz PL50 ni vgradila, medtem ko je bila učinkovitost vgrajevanja pri delcih iz druge vrste lecitina med 2,1 in 8,8 %. Razlog za to razliko je v naboju – PZU je negativno nabita, prav tako lecitin. PL50 ima več negativno nabitih skupin kot PL80, torej je bil ob uporabi tega lecitina v disperziji večji celokupni negativni naboj. Pozitivno nabiti hitosan se je torej raje povezoval z negativnimi skupinami lecitina kot s PZU, in ker ima PL50 več teh skupin, se je manj PZU vezalo s hitosanom, zaradi česar je bila učinkovitost vgrajevanja v nanodelce manjša in je večina PZU ostala prosta v disperziji. Glede na predhodne raziskave, kjer je bilo ugotovljeno, da se inzulin kot modelna proteinska učinkovina v hitosanske nanodelce vključuje preko ionskih interakcij [35] predvidevamo, da je poglobljen mehanizem

vgradnje PZU v nanodelce ravno preko ionskih interakcij. Drug način povezave PZU z nanodelci pa je bila verjetno adsorbcija na površino nanodelcev. Maitani s sodelavci je raziskoval liposome z EPO in prišel do ugotovitve, da se je del proteina pasivno vgradil v dostavni sistem, manjši del pa se je adsorbiral na površino [56]. Glede na to, da so liposomi vsebovali fosfatidilholin, ki je tudi prevladujoča komponenta lecitina, in da smo pri poskusih na celicah (slika 23) ugotovili, da PZU kaže afiniteto do celičnih membran, ki ravno tako vsebujejo fosfatidilholin, lahko predpostavimo, da se je del proteina povezal z nanodelci tako, da se je adsorbiral nanje.

Poglavitni razlog za majhno učinkovitost vgrajevanja pa moramo vseeno iskati drugje. Predvidevamo, da je bil vzrok za tako majhen odstotek vgradnje v nezmožnosti ločiti nanodelce od disperznega medija. Za to ločevanje smo uporabljali centrifugiranje, ki pa najverjetneje ni bila najbolj primerna metoda. Nanodelci so namreč vsebovali lecitin, ki ima kot maščobna snov manjšo gostoto kot voda, zaradi česar smo nanodelce z uporabo centrifugalne sile težko sedimentirali. Posledično je v supernatantu ostalo precej nanodelcev, ki niso sedimentirali (na kar nakazuje tudi majhna količina sedimenta). In ker smo učinkovitost vgrajevanja določevali preko določanja PZU v supernatantu, smo na tak način poleg prostega proteina, ki se res ni vgradil v nanodelce, zaznali tudi vgrajeno PZU v nesesimentiranih nanodelcih (predvsem tisti del, ki je bil adsorbiran na površini), kar je učinkovitost vgrajevanja navidezno zmanjšalo. K tej razlagi nas napeljuje tudi rezultat, ki smo ga dobili pri določanju učinkovitosti vgrajevanja pri kompleksih med hitosanom in PZU. Pripravili smo tudi vzorec brez lecitina, torej le iz PZU in raztopine hitosana s pH 6 (koncentracija PZU v vzorcu je bila 0,2 mg/ml). Pri tem naj bi prišlo do povezave med hitosanom in PZU in nastali naj bi kompleksi. HPLC meritev je pokazala, da se je v tem primeru vgradilo 17,7 % PZU, kar je mnogo več kot v primeru nanodelcev, kjer so bile uporabljene vse tri komponente (100 % večja vgradnja kot pri najboljšem rezultatu z lecitinom). Vzrok za to lahko torej iščemo v lecitinu, ki ga tu ni bilo, zato je bilo centrifugiranje uspešnejše in tudi končni rezultat boljši.

Poleg fosfolipida pa je tudi sama PZU problematična za centrifugiranje, saj ima v primerjavi z ovalbuminom, za katerega vemo, da je centrifugiranje pri enakih pogojih ustrezna metoda ločevanja nanodelcev od medija, precej manjšo molekulsko maso. V našem primeru bi torej za ustrezno ločitev potrebovali večjo centrifugalno silo, ki pa je z aparaturami na fakulteti nismo mogli doseči.

Na podlagi teh rezultatov torej težko zaključimo, katera formulacija je najprimernejša za pripravo nanodelcev s PZU, saj je bila učinkovitost vgrajevanja povsod precej majhna in se je gibala v približno enakem območju pri vseh vzorcih. Zagotovo lahko rečemo le, da je PL80 ustrežnejši od PL50 in da nanodelci iz raztopine hitosana s pH 5 (koncentracija 0,05 oz. 0,06 mg/ml) in PZU v koncentraciji 0,2 mg/ml z vidika vgrajevanja proteina niso ustrezni, čeprav so bili prav ti nanodelci eni izmed najbolj idealnih z vidika velikost in PDI.

4.4.2 Učinkovitost vgrajevanja PZU v nanodelce iz hitosana in TPP

Preglednica XIV: Učinkovitost vgrajevanja PZU v nanodelce iz hitosana (pH 4,7) in TPP.

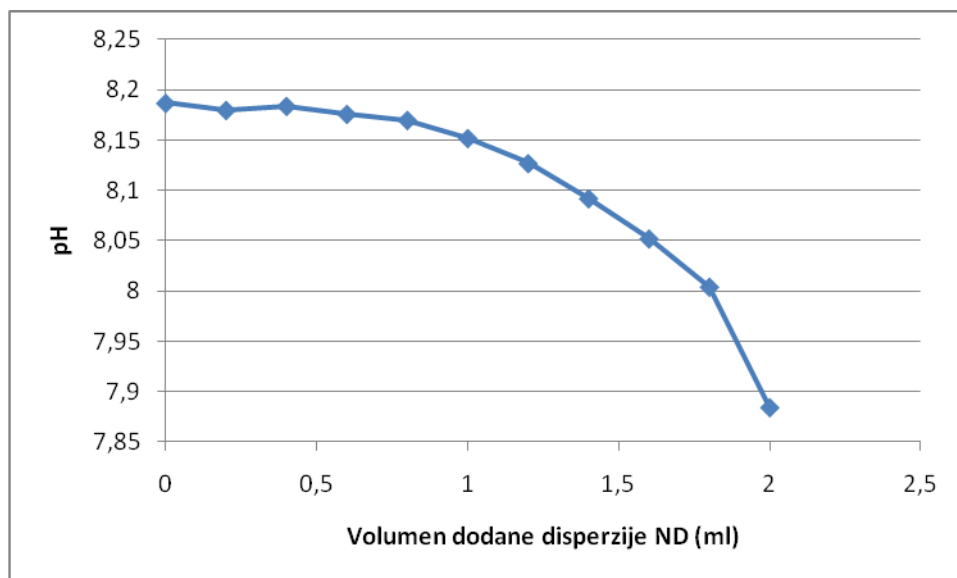
Konc. HIT (mg/ml)	Konc. PZU (mg/ml)	Učinkovitost vgrajevanja PZU (%)
1,75	0,2	35,2
1,75	0,153	23,1
1,75	0,104	19,8

Iz zbranih rezultatov v preglednici XIV takoj opazimo, da je bila v primeru nanodelcev iz hitosana in TPP učinkovitost vgrajevanja precej večja kot ob uporabi lecitina. Tu je bila vgradnja PZU v intervalu med 20 in 35 %, medtem ko pri uporabi lecitina ni preseгла 10 %. Zanimivo je tudi to, da se pri približno enakem pH raztopine hitosana (pH 5) v primeru lecitina v nanodelce pravzaprav ni vgradilo nič PZU in da smo morali spremeniti pH, da smo dosegli vsaj nekaj-odstotno učinkovitost vgrajevanja. Iz preglednice XIV razberemo, da je s padanjem koncentracije proteina v disperziji padala tudi učinkovitost vgrajevanja. Za razlago boljše učinkovitosti vgrajevanja PZU v nanodelce lahko ponovno uporabimo vpliv lecitina, saj je odsotnost le-tega pripomogla k učinkovitejšemu centrifugiranju in zato realnejšemu ter boljšemu rezultatu.

4.5 POSKUSI NA KULTURI CACO-2 CELIC

4.5.1 Obnašanje nanodelcev v rastnem mediju in njihov vpliv na pH medija

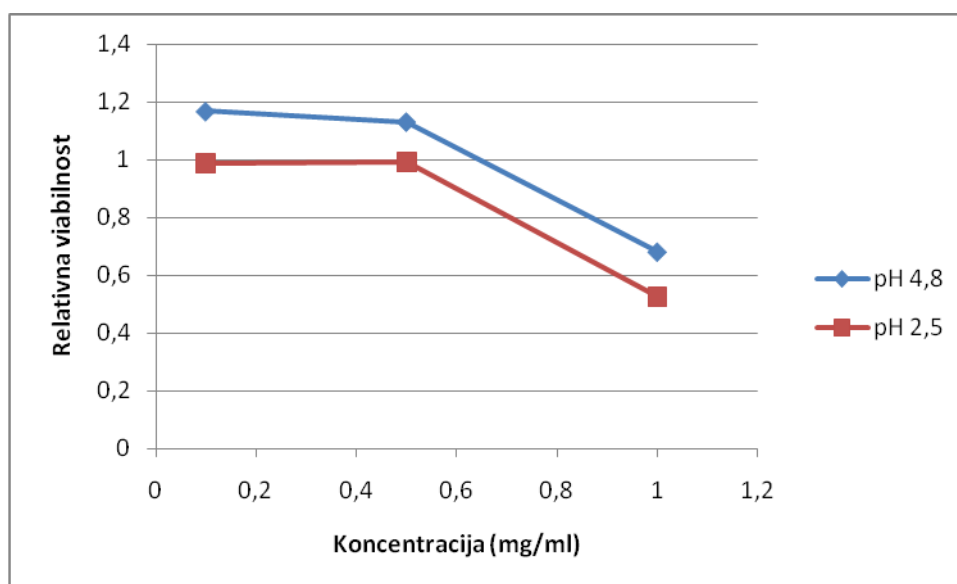
Sestavine celičnega rastnega medija lahko vplivajo na nanodelce in povzročijo njihovo obarjanje ali agregacijo. Da bi ugotovili, kako se nanodelci obnašajo v prisotnosti medija, smo k rastnemu mediju dodajali disperzijo nanodelcev s pH 4,8 in spremljali vizualne spremembe ter spremembe pH. Ugotovili smo, da do volumskega razmerja 1 : 1 med medijem in disperzijo nanodelcev ni prišlo do opaznih sprememb ter da medij ni povzročil obarjanja nanodelcev. Opazili smo le rahlo zamotnitev medija, kar je bila posledica mešanja medija in disperzije nanodelcev, ki je bila taka že sama po sebi. Spremljali smo tudi spreminjanje pH medija in ugotovili, da se do volumskega razmerja 2 : 1 med medijem in disperzijo nanodelcev pH skorajda ni spreminjal, z nadaljnjim dodajanjem disperzije nanodelcev pa se je pH nekoliko znižal (slika 16). Razlika med začetnim in končnim pH pri volumskem razmerju 1 : 1 je znašala le 0,3 enote, iz česar smo zaključili, da je bila ta sprememba premajhna, da bi lahko signifikantno vplivala na preživetje celic ter da so takšni vzorci primerni za poskuse na celicah.



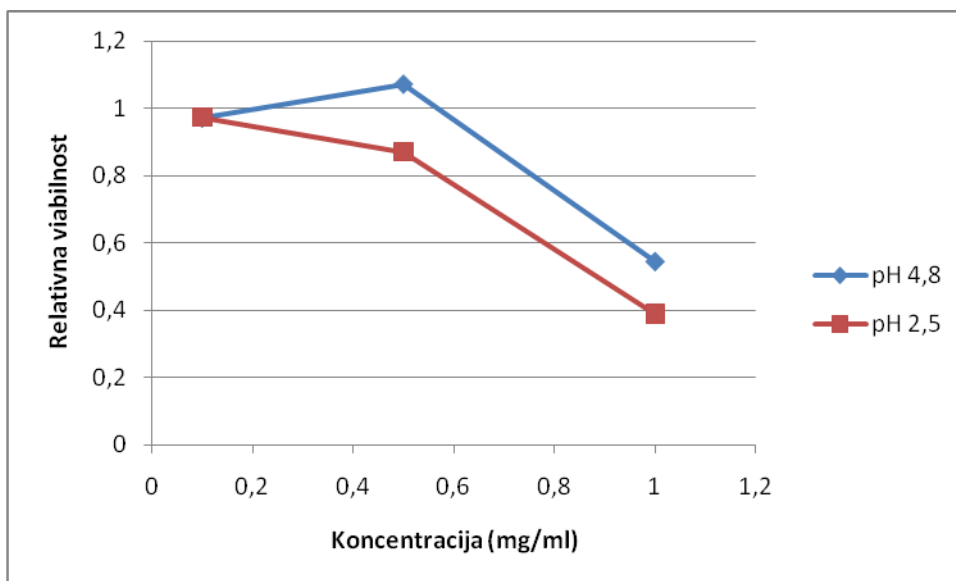
Slika 16: Spreminjanje pH rastnega medija zaradi dodajanja disperzije nanodelcev s pH 4,8.

4.5.2 Vpliv nanodelcev na viabilnost celic

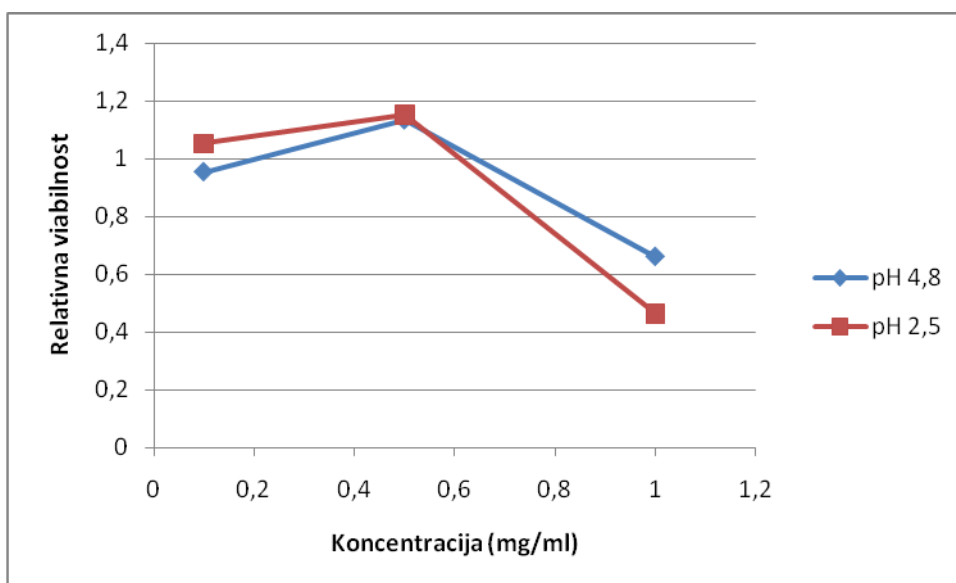
Za poskuse na kulturi Caco-2 celic smo želeli uporabiti disperzijo nanodelcev, kot je bila izdelana, tj. brez kakršnegakoli čiščenja ali druge obdelave, zato smo najprej preverili, ali prisotnost nanodelcev brez PZU v kulturi vpliva na celice in njihovo preživetje. Zanimal nas je vpliv pH disperzije, vpliv koncentracije nanodelcev in časa izpostavljenosti celic nanodelcem. Na ta način smo ugotavljali, do katere koncentracije nanodelci še nimajo vpliva na preživetje celic v kulturi in kako nizek pH disperzije lahko uporabimo, ne da bi na ta način škodovali celični kulturi.



Slika 17: Vpliv koncentracije in pH disperzije nanodelcev na viabilnost Caco-2 celic po 24 urah.



Slika 18: Vpliv koncentracije in pH disperzije nanodelcev na viabilnost Caco-2 celic po 48 urah.



Slika 19: Vpliv koncentracije in pH disperzije nanodelcev na viabilnost Caco-2 celic po 72 urah.

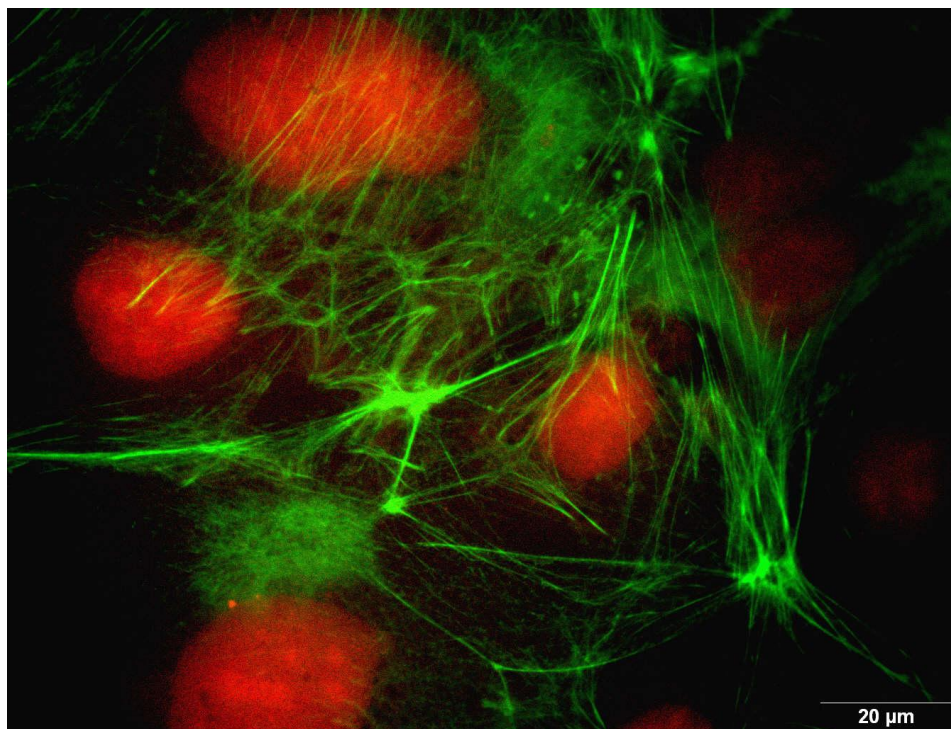
Iz slik 17-19 vidimo, da tako pH disperzije kot koncentracija nanodelcev vplivata na viabilnost. Pri najnižji testirani koncentraciji tekem celotnega poskusa ni prišlo do zmanjšanja viabilnosti celic; pri pH 4,8 je bila viabilnost po 24 urah celo za skoraj 20 % višja od kontrolne. Podobno lahko opazimo tudi pri koncentraciji 0,5 mg/ml, kjer je prišlo ali do povečanja preživetja (to je bilo še posebej izrazito po 72 urah) ali pa je bilo

preživetje nespremenjeno. Izjema je le disperzija s pH 2,5, kjer se je viabilnost po 48 urah nekoliko zmanjšala (za približno 10 %). Pri koncentraciji nanodelcev 1 mg/ml pa sta obe disperziji močno znižali preživetje celic: po 24 urah je bil padec le-tega 30 oz. 50 %, po 48 urah 45 oz. 60 %, po 72 urah pa 35 oz. 55 % glede na kontrolo. Disperzija z nižjim pH je imela pri vseh koncentracijah in vseh časovnih točkah bolj negativen vpliv na preživetje celice; tako je bila pri koncentraciji 1 mg/ml razlika v viabilnosti pri celicah, izpostavljenih disperzijama nanodelcev z različnimi pHji, približno 20 %. Večji negativni vpliv na celice pri pH 2,5 je pričakovan, saj pride po dodatku disperzije k celicam do znižanja pHja rastnega medija, čemur pa celice tudi v fizioloških pogojih niso prilagojene.

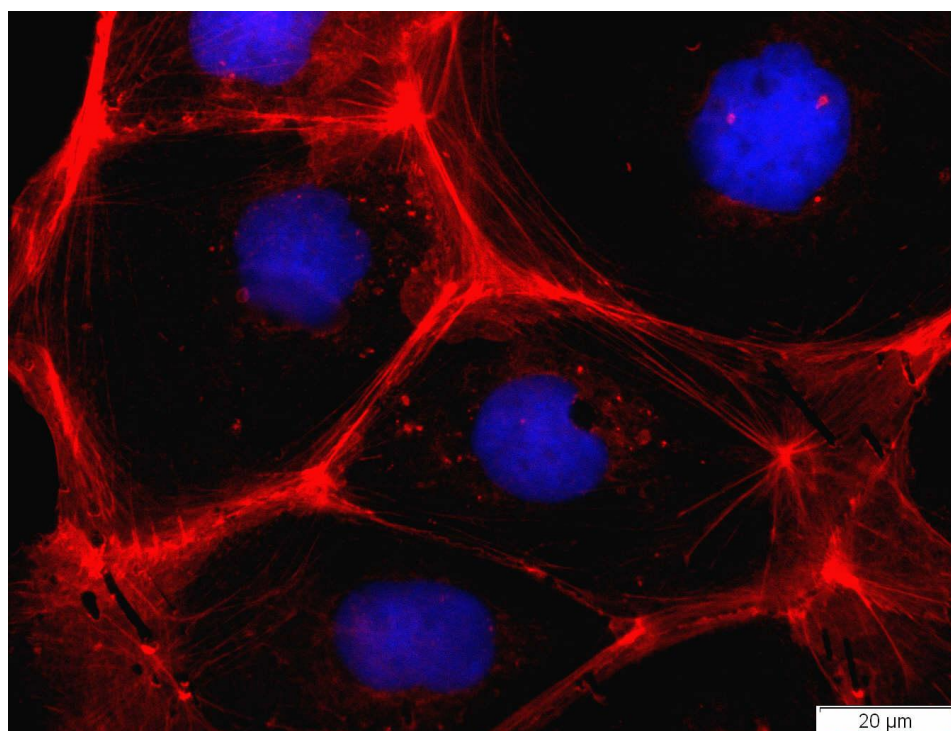
Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo za naslednje poskuse na celicah uporabljali disperzijo s pH 4,8 in maksimalno koncentracijo nanodelcev 0,5 mg/ml.

4.5.3 Vstop nanodelcev v Caco-2 celice

Pri načrtovanju izdelave farmacevtske oblike je potrebno misliti tudi na to, da mora dostavni sistem omogočati, da zdravilna učinkovina preide morebitne absorpcijske bariere in doseže mesto delovanja. V tem diplomskem delu smo vstop v celice preučevali na kulturi Caco-2 celic, ki nam je služila kot *in vitro* model epitelijske bariere. Barvanje celičnih organelov in fluorescentno označena PZU sta nam omogočila, da smo lahko videli, kje se nanodelci in protein lokalizirajo ter ali prehajajo preko membrane v celice. Najprej smo pripravili preparate Caco-2 celic, ki jih nismo izpostavili nanodelcem ali prosti PZU, in pod fluorescenčnim mikroskopom pogledali njihovo morfologijo (sliki 20 in 21). Ugotovili smo, da so celice med seboj povezane, aktinski filamenti dobro vidni in jedra kroglaste oblike.



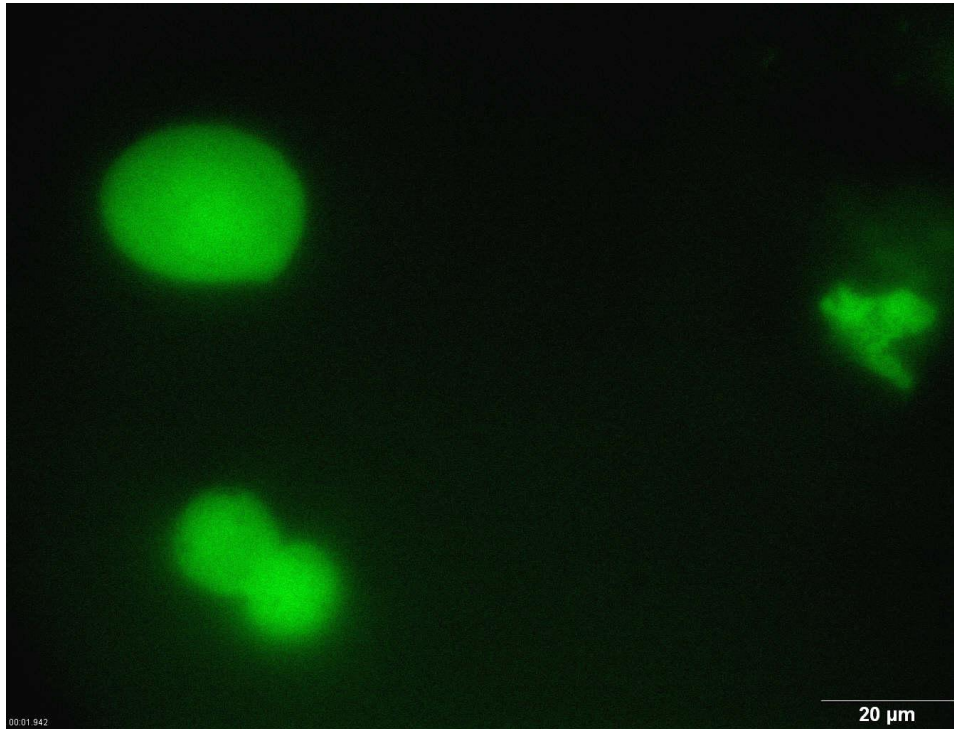
Slika 20: Celice Caco-2 v kulturi (rdeče so obarvana jedra, zeleno pa aktinski filamenti).



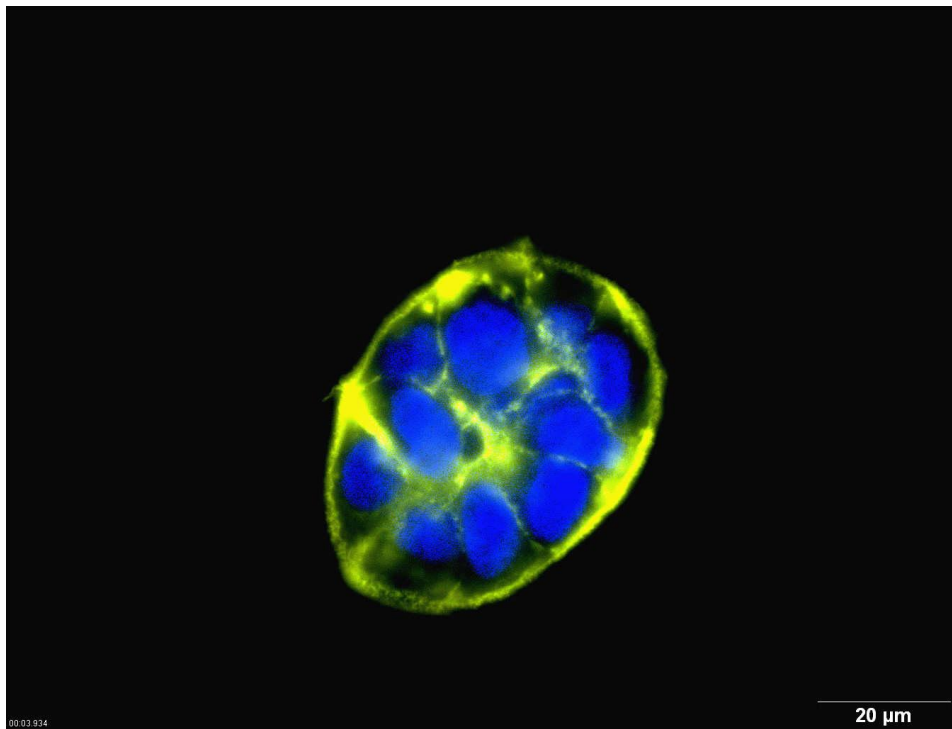
Slika 21: Celice Caco-2 v kulturi (modro so obarvana jedra, rdeče pa aktinski filamenti).

Pri pripravi preparatov celic, ki smo jih predhodno inkubirali s fluorescentno označeno PZU ali z nanodelci z vgrajenim proteinom, smo imeli precej težav, ko smo jih želeli pogledati pod fluorescenčnim mikroskopom. Prihajalo je do prekrivanja fluorescentnih signalov, kar nam je otežilo ločevanje posameznih struktur. Zato smo se odločili, da ne bomo barvali več celičnih struktur sočasno, ampak bomo raje pogledali transmisijo, ki nam da podatek o obliki in velikosti celic, ter fluorescenco našega vzorca (bodisi označena PZU ali nanodelci s PZU).

Potem ko smo spoznali morfologijo celic, smo želeli najprej preveriti, kje se lokalizira sama PZU, če jo dodamo celični kulturi. Celice smo tako 24 ur inkubirali z označenim proteinom, pripravili preparate in jih nato pogledali pod mikroskopom. Na preparatu, na katerem nismo pobarvali nobene od celičnih struktur, smo videli enakomerno fluorescentno obarvanje celotne celične površine, kar je bila posledica prisotnosti označene PZU v kulturi (slika 22). Po pregledu preparata, kjer smo jedra pobarvali modro, smo lahko opazili, da je zelena fluorescenca skoncentrirana predvsem na področju membran in da se PZU nahaja predvsem na teh mestih – torej zunaj celic (slika 23). Rezultati nam tako nakazujejo, da ima PZU afiniteto do celičnih membran, saj se nanje adsorbira, ne vstopa pa v notranjost celic. Ravno neprehajanje celične membrane in posledično slaba absorpcija je značilnost večine proteinskih učinkovin in zato ena izmed ovir, ki onemogoča njihovo peroralno dajanje.



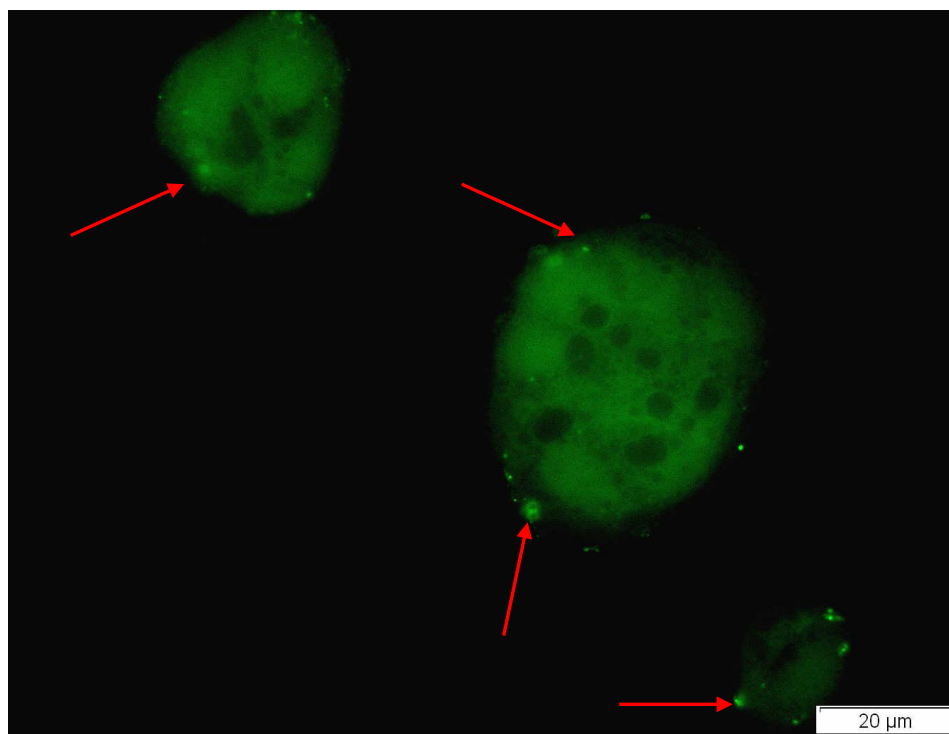
Slika 22: Celice Caco-2 v kulturi po 24-urni inkubaciji v prisotnosti fluorescentno označene PZU (zelena fluorescenca).



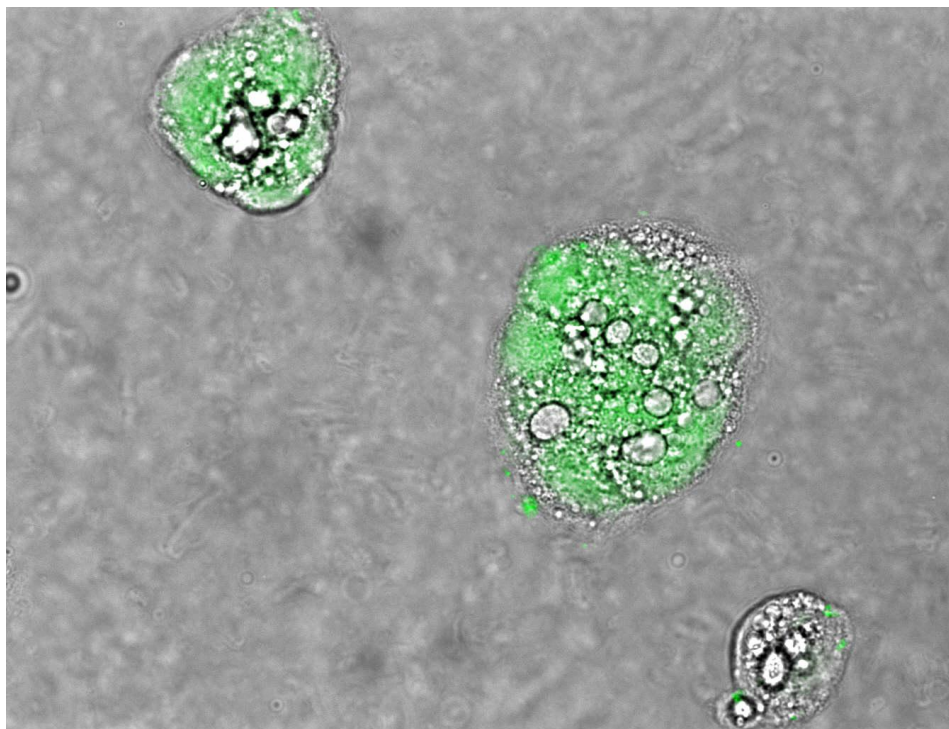
Slika 23: Celice Caco-2 v kulturi po 24-urni inkubaciji v prisotnosti fluorescentno označene PZU (PZU fluorescira zeleno, jedra so obarvana modro).

Celice smo 24 ur inkubirali tudi z disperzijo nanodelcev (iz raztopine hitosana s pH 5 in koncentracijo 0,05 mg/ml ter iz PL80) z vgrajeno fluorescentno označeno PZU. Tako kot v primeru inkubacije s prosto označeno PZU smo tudi tu opazili zeleno fluorescenco po celotni celični površini. Razlika pa je bila v tem, da smo v tem primeru zaznali tudi bolj intenzivno točkasto zeleno fluorescenco, ki je zelo verjetno predstavljala nanodelce z vgrajenim proteinom (slika 24). Ti so bili tako na površini celic kot tudi v njihovi notranjosti, kar potrjuje slika istega preparata, sestavljena s kombinacijo transmisije in fluorescence celic (slika 25).

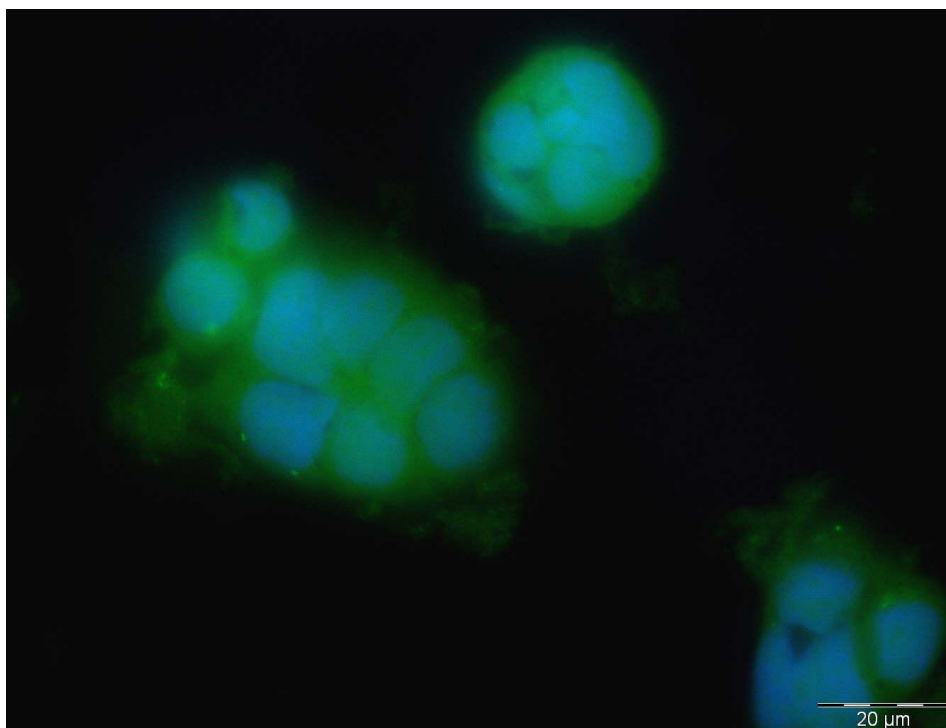
Podobno sliko smo dobili tudi po pregledu preparata z modro obarvani jedri, kjer smo celice za 24 ur izpostavili kompleksom iz hitosana (raztopina s pH 6) in PZU. Tudi v tem primeru smo opazili intenzivno točkasto fluorescenco ne le zunaj, ampak tudi znotraj celic, ki zelo verjetno predstavlja komplekse hitosana s PZU in dokazuje, da so le-ti prešli celično membrano (slika 26).



Slika 24: Celice Caco-2 v kulturi po 24-urni inkubaciji v prisotnosti nanodelcev z vgrajeno fluorescentno označeno PZU (PZU fluorescira zeleno, rdeče puščice kažejo nanodelce z vgrajeno fluorescentno označeno PZU).



Slika 25: Celice Caco-2 v kulturi po 24-urni inkubaciji v prisotnosti nanodelcev z vgrajeno fluorescentno označeno PZU (PZU fluorescira zeleno); slika je kombinacija fluorescence in transmisije.



Slika 26: Celice Caco-2 v kulturi po 24-urni inkubaciji v prisotnosti kompleksov iz hitosana (raztopina s pH 6) in fluorescentno označene PZU (PZU fluorescira zeleno, jedra so obarvana modro).

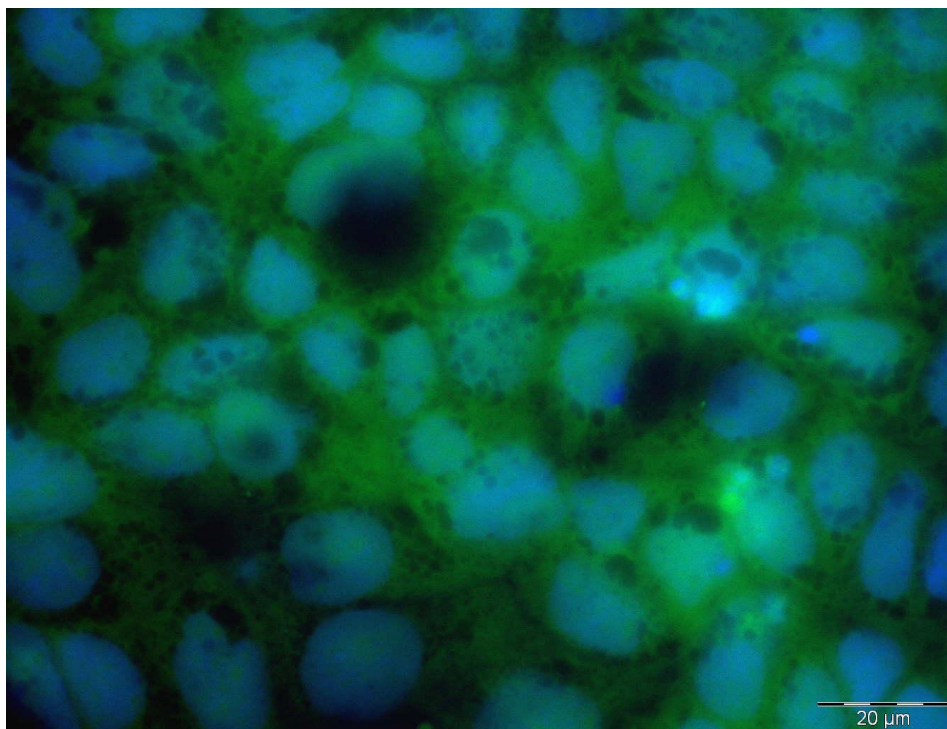
Ti rezultati kažejo na to, da so nanodelci primerni dostavni sistem za dostavo PZU v celice. S primerjavo slike preparata celic, ki so bili izpostavljeni prosti PZU, in slike preparata celic, ki so ble izpostavljene nanodelcem s PZU, lahko sklepamo, da so ravno nanodelci tisti, ki so omogočili, da je PZU prešla v znotrajcelični prostor Caco-2 celic. Pomemben ni le sam dostavni sistem, temveč tudi njegove komponente, v tem primeru predvsem hitosan. To nam nakazuje že slika 26, saj je proteinu dodan le hitosan, kar je dovolj, da kompleksi preidejo celično membrano. Kot je bilo že predhodno omenjeno v uvodu, hitosan deluje kot pospeševalec absorpcije in se v ta namen tudi pogosto uporablja. S svojimi pozitivno nabitimi skupinami vstopa v interakcije z negativno nabitimi glikoproteini na celični površini, poveča prepustnost tesnih stikov med celicami, s čimer se poveča paracelularna permeabilnost in posledično olajša prehod delcev čez epiteljske bariere. Vstop delcev z vgrajeno proteinsko učinkovino v celice je pri peroralni aplikaciji farmacevtske oblike z nanodelci bistvenega pomena, saj temu lahko sledi prehod v centralni krvni obtok. Prebavni trakt s svojimi karakteristikami predstavlja veliko oviro za peroralno dostavo proteinov, zato so hitosanski nanodelci obetajoč sistem, ki omogoča prehod proteina preko

epitelijske bariere gastrointestinalnega trakta in vstop proteinske učinkovine v centralni krvni obtok, kar je pravzaprav cilj takega načina dajanja.

V tem diplomskem delu smo preučevali le celični privzem nanodelcev, izdelanih iz PL80, nismo pa preverili, če se nanodelci iz PL50 obnašajo kako drugače. To bi bilo v prihodnje dobro preučiti, sploh ker je bilo v eni izmed predhodnih študij [54] ugotovljeno, da nanodelci iz lecitina z večjim negativnim nabojem manj zmanjšajo transepitelijsko električno upornost (TEER), ki je merilo za paracelularno permeabilnost Caco-2 celic. Pojav razlagajo s tem, da lecitin z več negativno nabitimi skupinami veže več hitosana, zaradi česar v disperziji ostane manj prostega polisaharida. Le-ta še bolj kot hitosanski nanodelci poveča permeabilnost celic, zato je ob manjši količini prostega hitosana tudi vstop nanodelcev in vanje vgrajene učinkovine v celice manjši. Po drugi strani pa je potrebno upoštevati tudi citotoksičnost, ki je pri višjih koncentracijah prostega hitosana večja, saj lažje pride do interakcij s celičnimi membranami, kar lahko vodi do njihovih ireverzibilnih poškodb [54]. Pri načrtovanju takih nanodelcev moramo torej znati najti kompromis med želenim vstopom učinkovine v celice in negativnim vplivom dostavnega sistema na celice.

Pri barvanju celic z barvilom tripan modro smo prišli do zaključka, da barvilo ne vstopa v celice (s tripan modrim se obarvajo le mrtve celice s poškodovano membrano), slike preparatov pa so bile primerljive predhodnim. Tak način barvanja torej ni izboljšal kvalitete preparatov, zato slike le-teh niso prikazane v tej diplomski nalogi.

Pri pregledu preparata celic, ki smo jih inkubirali z vzorcem kompleksov iz PZU in lecitina in nato jedra pobarvali modro (slika 27), smo prišli do še ene zanimive ugotovitve. Preparati so bili v primerjavi s predhodnimi precej bolj intenzivno obarvani, iz česar smo sklepali, da je lecitin kot površinsko aktivna snov vplival na permeabilnost celičnih membran, zaradi česar je lahko v celice prešlo več barvila in tudi večji odstotek kompleksov med proteinom in lecitinom. Tako kot hitosan tudi fosfatidilholin kot glavna sestavina lecitina poveča prehod molekul preko membrane in na ta način izboljša biološko uporabnost. Obstaja več možnih mehanizmov za razlago tega pojava, eden izmed njih je tudi ta, da fosfolipid spremeni lastnosti bariere, viskoznost mukusa in fluidnost membrane ter tako olajša absorpcijo [57].



Slika 27: Celice Caco-2 v kulturi po 24-urni inkubaciji v prisotnosti vzorca disperzije iz lecitina in fluorescentno označene PZU (PZU fluorescira zeleno, jedra so obarvana modro).

Poleg bolj intenzivne obarvanosti tega preparata smo opazili tudi precej večje število celic v njem. Glede na to, da smo za preparate vedno nasadili enako število celic in jih enako dolgo tudi gojili, lahko sklepamo, da lecitin ni vplival le na večjo permeabilnost preko celičnih membran, temveč je povzročil tudi pospešeno rast in razmnoževanje Caco-2 celic. Na podlagi teh rezultatov lahko ponovno zaključimo, da so nanodelci iz hitosana in fosfolipida primeren dostavni sistem za dostavo PZU, saj obe komponenti vplivata na boljši prehod proteinske učinkovine v celice, ki je v primeru proste PZU neznaten.

5 SKLEP

Nanodelci so zaradi svojih številnih pozitivnih lastnosti obetajoč sistem za dajanje najrazličnejših učinkovin. V diplomski nalogi smo izdelali nanodelce iz hitosana in lecitina s spontanim povezovanjem preko ionskih interakcij ter v nanodelce vgrajevali PZU. Prišli smo do zaključka, da z večanjem količine hitosana v sistemu raste velikost delcev, ravno tako pa je velikost odvisna tudi od ZP in pH (vpliv na naboj hitosana), saj v okolici izoelektrične točke nastopi fizikalna nestabilnost in porast velikosti delcev. ZP lahko uravnavamo preko razmerja med obema komponentama, odvisen pa je tudi od vrste lecitina – nanodelci iz Phospholipona[®] 50 imajo bolj negativen ZP. Tudi večja količina PZU in uporaba PL50 povzroči nastanek večjih delcev (tudi mikrometrške velikosti). Ugotovili smo, da je za pripravo delcev nanometrskih velikosti potrebno uporabiti PL80 in raztopino PZU s koncentracijo 0,104 ali 0,053 mg/ml.

Predpostavljamo, da se je PZU v nanodelce vgradila preko ionskih interakcij, del pa se je adsorbiral na površino nanodelcev. Učinkovitost vgrajevanja je bila sicer precej nizka, saj ni presegla 10 %, vendar menimo, da je bila dejanska vgradnja večja in je bil tak rezultat le posledica nepopolne ločbe nanodelcev od disperznega medija. V prihodnje bi bilo torej dobro poskusiti s kakšno drugo metodo ločevanja nanodelcev od disperznega medija oz. centrifugiranjem pri večjih obratih.

Celična kultura Caco-2 se je izkazala kot primeren model za *in vitro* raziskave prehoda proste PZU in nanodelcev z vgrajeno PZU v celice. Prosta PZU ni prehajala v celice, ampak se je le adsorbirala na membrane, medtem ko so nanodelci prešli celično membrano in tako omogočili dostavo proteina v celice. Tako hitosan kot fosfolipid, ki sta bila sestavini naših kompleksov, delujeta kot pospeševalca absorpcije, zato so taki nanodelci ugoden sistem za peroralno dostavo proteinskih učinkovin. Kljub vsemu pa bo potrebno v prihodnje opraviti še mnogo študij in raziskav na tem področju, preden bo na tržišču mogoče lansirati peroralno farmacevtsko obliko s PZU.

LITERATURA

1. Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider Y-J, Preat V: Nanoparticles as potential delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J. Control. Release* 2006; 116: 1-27.
2. Sonvico F, Cagnani A, Rossi A, Motta S, Di Bari M T, Cavorta F, Alonso M J, Deriu A, Colombo P: Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *Int. J. Pharm.* 2006; 324: 67-73.
3. Kerec Kos M: Uporaba hitosana v farmaciji. *Farm. vest.* 2006; 57: 287-291.
4. Hejazi R, Amiji M: Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *J. Control. Release* 2003; 89: 151-165.
5. Dodane V, Vilivalam V D: Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm. Sci. Technol. Today* 1998; 1: 246-253.
6. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph4/additive-250-m4.pdf>, dostopano: avgust 2010.
7. http://www2.chemie.uni-erlangen.de/services/dissonline/data/dissertation/Christoph_Wabel/html/Chapter1.html, dostopano: junij 2010.
8. <http://themedicalbiochemistrypage.org/images/phosphatidylcholine.jpg>, dostopano: junij 2010.
9. <http://www.ambujagroup.com/soya%20lecithin.asp>, dostopano: avgust 2010.
10. http://www.in-cosmetics.com/ExhibitorLibrary/186/PHOSPHOLIPID_Brochure.pdf, dostopano: junij 2010.
11. <http://www.americanlecithin.com/aboutphos.html>, dostopano: junij 2010.
12. Mohanraj V J, Chen Y: Nanoparticles – a review. *Trop. J. Pharm. Res.* 2006; 5: 561-573.
13. Aulton M E: *Pharmaceutics, The Science of Dosage Forms*, 2nd Edition. Churchill Livingstone, 2002: 160-162, 550-552
14. Yegin B A, Lamprecht A: Lipid nanocapsule size analysis by hydrodynamic chromatography and photon correlation spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 2006; 320: 165-170.
15. [http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zeta potential - An introduction in 30 minutes.pdf](http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zeta%20potential%20-%20An%20introduction%20in%2030%20minutes.pdf), dostopano: junij 2010.

16. http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm, dostopano: avgust 2010.
17. Boyer R: Temelji biokemije, 1. izdaja. Študentska založba, Ljubljana 2005: 79-84.
18. Righetti P G: Determination of isoelectric point of proteins by capillary isoelectric focusing. *J. Chromatogr., A* 2004; 1037: 491-499.
19. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila, od gena do učinkovine, 1. izdaja. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 2007: 189-192, 284-289, 338-353, 453-456, 491-493.
20. <http://www.gbiosciences.com/EducationalUploads/EducationalProductIMGFile/633456162188222500.pdf>, dostopano: junij 2010.
21. Alexa Fluor[®] 488 Protein Labeling Kit. Invitrogen, Molecular Probes[™], 2006.
22. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/Product-Spectra.21680h2o.html>, dostopano: avgust 2010.
23. Helena D A, Jyothsna A, Lakshmi N, Jaganmohana Rao P, Venkateswara Rao G, Sambasiva Rao K R S: Therapeutic implications of recombinant human erythropoietin in anaemic related clinical manifestations. *Afr. J. Biotechnol.* 2006; 5: 2503-2509.
24. <http://www.steroidreport.com/wp-content/uploads/2008/07/epo-structure.png>, dostopano: avgust 2010.
25. Choi D, Kim M, Park J: Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. *J. Chromatogr., B* 1996; 687: 189-199.
26. Schmidt C A, Codevilla C F, Fronza M, Casali R G, Dalmora S L: Physico-chemical characterization and biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Lat. Am. J. Pharm.* 2003; 44: 343-350.
27. Narhi L O, Arakawa T, Aoki K H, Elmore R, Rohde M F, Boone T, Strickland T W: The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 23022-23026.
28. Venkatesan N, Yoshimitsu J, Ito Y, Nobuhito S, Takada K: Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics. *Biomaterials* 2005; 26: 7154-7163.
29. <http://rd.evhsrobotics.com/09-0116/mdl/nano.jpg>, dostopano: junij 2010.

30. Wang T, Hu Y, Zhang L, Jiang L, Chen Z, He N: Erythropoietin nanoparticles: therapy for cerebral ischemic injury and metabolize in kidney and liver. *Nano Biomed. Eng.* 2010; 2: 46-61.
31. Bokharaei M, Margaritis A, Xenocostas A, Freeman D J: Controlled release of recombinant human Erythropoietin encapsulated in chitosan nanoparticles. 8th World Congress of Chemical Engineering, Montreal, Canada, 2009. <http://archivos.labcontrol.cl/wcce8/offline/techsched/manuscripts\rrz5zf.pdf>, dostopano: avgust 2010.
32. Geng Y, Yuan W, Wu F, Chen J, He M, Jin T: Formulating erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation. *J. Control. Release* 2008; 130: 259-265.
33. Chen J, Yang W-L, Li G, Qian J, Xue J-L, Fu S-K, Lu D-R: Transfection of mEpo gen to intestinal epithelium in vivo mediated by oral delivery of chitosan-DNA nanoparticles. *World J. Gastroenterol.* 2004; 10: 112-116.
34. Bresjanac M et al.: *Izbrana poglavja iz patološke fiziologije*, 9. izdaja. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2005: 154-170.
35. Cui F, Shi K, Zhang L, Tao A, Kawashima Y: Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *J. Control. Release* 2006; 114: 242-250.
36. http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Williford/asignment2_home.htm, september 2010, dostopano: september 2010.
37. Ma Z, Lim T M, Lim L-Y: Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats. *Int. J. Pharm.* 2005; 293: 271-280.
38. Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Ferreira D: Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloid Surface B* 2006; 53:193-202.
39. Sajeesh S, Sharma P: Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. *Int. J. Pharm.* 2006; 325: 147-154.
40. Chesnut C H, Azria M, Silverman S, Engelhardt M, Olson M, Mindeholm L: Salmon calcitonin: a review of current and future therapeutic indications. *Osteoporos. Int.* 2008; 19: 479-491.

41. Cheng W-P, Thompson C, Ryan S, Aguirre T, Tetley L, Brayden D: In vitro and in vivo characterization of a novel peptide delivery system: Amphiphilic polyelectrolyte-salmon calcitonin nanocomplexes. *J. Control. Release* 2010, article in press.
42. http://www.theodora.com/drugs/fortical_nasal_spray_upsher_smith.html, dostopano: september 2010.
43. Lee H E, Lee M J, Park C R, Kim A Y, Chun K H, Hwang H J, Oh D O, Jeon S O, Kang J S, Jung T S, Choi G J, Lee S: Preparation and characterization of salmon calcitonin-sodium triphosphate ionic complex for oral delivery. *J. Control. Release* 2010; 143: 251-257.
44. Cartiera M S, Johnson K M, Rajendran V, Caplan M J, Saltzman W M: The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials* 2009; 30: 2790-2798.
45. Artusson P, Palm K, Luthman K: Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 46: 27-43.
46. Leonard M, Creed E, Brayden D, Baird A W: Evaluation of the Caco-2 monolayer as a model epithelium for iontoporetic transport. *Pharm. Res.* 2000; 17: 1181-1188.
47. [http://www.iclc.it/images/Caco-2\(20X\).JPG](http://www.iclc.it/images/Caco-2(20X).JPG), dostopano: avgust 2010.
48. Lennernäs H, Palm K, Fagerholm U, Artursson P: Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Int. J. Pharm.* 1996; 127: 103-107.
49. <http://www.nanoanalytics.com/en/hardwareproducts/cellscope/howitworks/chapter01/index.php>, dostopano: avgust 2010.
50. Jung T, Breitenbach A, Kaiserling E, Xiao J X, Kissel T: Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000; 50: 147-160.
51. Janes K A, Fresneau M P, Marazuela A, Fabra A, Alonso M J: Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *J. Control. Release* 2001; 73: 225-267.
52. <http://www.promega.com/enotes/applications/0004/ap0017.htm>, dostopano: avgust 2010.

53. Ma Z, Lim L-Y: Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: a comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* 2003; 20: 1812-1819.
54. Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grčić J: Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.* 2009; 381: 205-213.
55. Arakawa T, Philo J S, Kita Y: Kinetic and thermodynamic analysis of thermal unfolding of recombinant erythropoietin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001; 65: 1321-1327.
56. Maitani Y, Moriya H, Shimoda N, Takayama K, Nagai T: Distribution characteristics of entrapped recombinant human erythropoietin in liposomes and its intestinal absorption in rats. *Int. J. Pharm.* 1999; 185: 13-22.
57. Sypernath A, Aserin A, Ziserman L, Danino D, Garti N: Phosphatidylcholine embedded microemulsions: Physical properties and improved Caco-2 cell permeability. *J. Control. Release* 2007; 119: 279-290.