

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JAN PELIPENKO

**IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z
RESVERATROLOM ZA TERAPIJO REVMATOIDNEGA
ARTRITISA**

**FORMULATION OF SOLID LIPID NANOPARTICLES WITH
RESVERATROL FOR TREATMENT OF RHEUMATOID
ARTHRITIS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl in somentorstvom asist. Karmen Teskač Plajnšek, mag. farm.

Za strokovno pomoč, potrpežljivost, dosegljivost in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Julijani Kristl in somentorici asist. Karmen Teskač Plajnšek, mag. farm. Iskrena hvala tudi ostalim članom Katedre za farmacevtsko tehnologijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri raziskovalnem delu.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl in somentorstvom asist. Karmen Teskač Plajnšek, mag. farm.

Jan Pelipenko

Diplomska komisija:

Predsednik: prof. dr. Borut Božič, mag. farm., spec. med. biokem.

Mentor: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

Član: doc. dr. Bojan Doljak, mag. farm.

POVZETEK.....	4
SEZNAM OKRAJŠAV	6
1 UVOD	8
1.1 REVMATOIDNI ARTRITIS	8
1.1.1 EPIDEMIOLOGIJA	8
1.1.2 ETIOPATOGENEZA	8
1.1.2.1 GENETSKI DEJAVNIKI	8
1.1.2.2 DEJAVNIKI OKOLJA.....	9
1.1.2.3 VPLIV SPOLNIH HORMONOV	9
1.1.3 VNETJE	9
1.1.4 IMUNOPATOGENEZA.....	10
1.1.5 VLOGA SINOVIALSKIH FIBROBLASTOV	12
1.1.6 KLINIČNA SLIKA.....	13
1.1.7 ZDRAVLJENJE	13
1.2 KOLOIDNI NOSILNI SISTEMI.....	16
1.2.1 TRDNI LIPIDNI NANODELCI.....	18
1.2.2 METODE IZDELAVE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	19
1.2.2.1 VISOKOSTRIŽNA HOMOGENIZACIJA IN ULTRAZVOK	19
1.2.2.2 VISOKOTLAČNA HOMOGENIZACIJA	19
1.2.2.3 IZPAREVANJE TOPILA Z OBARJANJEM V EMULZIJAH TIPA O/V	21
1.2.2.4 RAZREDČEVANJE VROČE MIKROEMULZIJE	21
1.2.2.5 IZDELAVA NANODELCEV Z DISPERGIRANJEM TALINE LIPIDA Z ROTOR-STATOR HOMOGENIZATORJEM	21
1.2.3 SHRANJEVANJE IN LIOFILIZACIJA.....	21
1.2.4 OPREDELITEV FIZIKALNIH LASTNOSTI TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	22
1.2.4.1 VELIKOST IN POLIDISPERZNI INDEKS DELCEV	22
1.2.4.2 ZETA POTENCIAL.....	23
1.2.4.3 DOLOČANJE KRISTALINičNOSTI	24
2 NAMEN DELA	25
3 EKSPERIMENTALNI DEL.....	26
3.1 IZVEDBA TEHNOLOŠKEGA DELA	26
3.1.1 MATERIALI	26
3.1.1.1 KOMPONENTE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	26
3.1.1.2 REAGENTI IN TOPILA.....	28
3.1.2 APARATURE.....	28
3.1.2 IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	28
3.1.2.1 IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z DISPERGIRANJEM TALINE LIPIDA Z ROTOR- STATOR HOMOGENIZATORJEM	28
3.1.2.2 LIOFILIZACIJA DISPERZIJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	30
3.1.2.3 REDISPERGIRANJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	30

3.1.4	VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	30
3.1.4.1	MERJENJE VELIKOSTI, POLIDISPERZNEGA INDEKSA IN ZETA POTENCIALA IZDELANIH TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	30
3.1.4.2	UČINKOVITOST VGRAJEVANJA IN VSEBNOST RESVERATROLA V TRDNIH LIPIDNIH NANODELCIH.....	31
3.1.4.3	TERMIČNA ANALIZA VHODNIH SUROVIN IN IZDELANIH TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	
	33	
3.2	PROUČEVANJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV NA FIBROBLASTIH.....	34
3.2.1	MATERIALI.....	35
3.2.2	APARATURE.....	35
3.2.3	POSTOPEK GOJENJA FIBROBLASTOV	35
3.2.4	PRIPRAVA CELIC	36
3.2.5	DOLOČANJE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC	37
3.2.6	RAST IN MORFOLOGIJA TRETIRANIH CELIC.....	39
4	REZULTATI Z DISKUSIJO.....	40
4.1	FIZIKALNE LASTNOSTI TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	40
4.1.1	VELIKOST TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV V ODVISNOSTI OD KOLIČINE RESVERATROLA	40
4.1.2	ZETA POTENCIAL TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV V ODVISNOSTI OD KOLIČINE RESVERATROLA	41
4.1.3	VELIKOST TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV V ODVISNOSTI OD KOLIČINE RESVERATROLA, DODANEGA Z ETANOLNO RAZTOPINO	41
4.1.4	VPLIV LIOFILIZACIJE NA VELIKOST ND	42
4.2	VSEBNOST RESVERATROLA V TRDNIH LIPIDNIH NANODELCIH	43
4.3	SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	44
4.4	TERMIČNA ANALIZA POSAMEZNIH KOMPONENT IN TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	48
4.4.1	TERMIČNA ANALIZA POSAMEZNIH KOMPONENT	48
4.4.2	TERMIČNA ANALIZA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	48
4.5	VPLIV TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z RESVERATROLOM NA FIBROBLASTE.....	51
4.5.1	METABOLNA AKTIVNOST FIBROBLASTOV V PRISOTNOSTI SLN-RSV0, SLN-RSV2 EtOH IN RSV	52
4.5.2	MORFOLOŠKE SPREMEMBE FIBROBLASTOV V PRISOTNOSTI SLN-RSV0, SLN-RSV2 EtOH IN RSV	53
5	SKLEP	58
6	VIRI	60

POVZETEK

Revmatoidni artritis (RA) je kronična sistemska vnetna bolezen avtoimunske narave. Bolezen so prvič jasno opisali šele v začetku 18. stoletja, zato domnevajo, da je povezana s patogenimi povzročitelji ali alergeni novejšega sveta. Po dugi strani pa se domneva, da so RA zdravili že pred dvema tisočletjema. RA prvenstveno prizadene sklepe, lahko pa tudi večino ostalih organskih sistemov. Nezdravljena bolezen ima za posledico nastanek nepopravljivih okvar sklepov in invalidnost, posredno pa tudi povečano umrljivost. S trenutnimi posegi bolezní ne znamo pozdraviti, lahko pa zmanjšamo znake vnetja, izboljšamo gibljivost prizadetih sklepov, preprečimo uničenje tkiv in deformacijo sklepov.

Namen našega dela je bil izdelati nanodelce z resveratrolom, ki bi se potencialno lahko uporabljali za zdravljenje RA. Izdelali smo trdne lipidne nanodelce (SLN; solid lipid nanoparticles) z učinkovino resveratrol (RSV) in nato opazovali vpliv RSV, vgrajenega v ND ali samega na morfologijo, rast in proliferacijo fibroblastov.

Z dispergiranjem taline lipida z rotor-stator homogenizatorjem smo izdelali ND s tremi različnimi koncentracijami RSV, kjer smo povečevali količino RSV ob hkratnem zmanjševanju količine lipidne komponente. RSV je bil dodan v obliki praška (SLN-RSV) ali v obliki etanolne raztopine (SLN-RSV EtOH). Za kontrolo smo izdelali še ND brez RSV (SLN-RSV0).

Izdelanim ND smo določili velikost, zeta potencial (ZP) in polidisperzni indeks (PDI). Ker so liofilizirani ND mnogo stabilnejši od ND dispergiranih v vodi, smo jih liofilizirali in jim po redispergiranju še enkrat določili fizikalne lastnosti. Pri določevanju učinkovitosti vgrajevanja RSV pa smo ugotovili, da je učinkovitost večja pri uporabi etanolne raztopine RSV kot pri uporabi RSV v prašku. Izdelanim ND smo določili tudi profil sproščanja RSV iz ND in ugotovili, da ND zagotovijo počasno sproščanje RSV in s tem tudi podaljšano delovanje takega zdravila. Naredili smo še termično analizo vhodnih substanc in izdelanih ND, da bi opredelili fizikalno stanje sestavin v ND ter potrdili vgrajenost RSV v ND.

Za delo na celicah smo izbrali ND ki so celokupno izkazovali najugodnejše rezultate fizikalne karakterizacije. Na celice smo aplicirali različne količine praznih ND, ND z RSV in čistega RSV ter s pomočjo svetlobnega mikroskopa in spektrofotometričnim testom opazovali vpliv vzorcev na rast ter razmnoževanje fibroblastov. Ugotovili smo,

da prazni ND nimajo citotoksičnega učinka na celice, RSV vgrajen v ND na celice deluje le citostatično, medtem ko ima čist RSV na celice tudi citotoksične učinke. Citotoksični oz. citostatični učinki naraščajo z naraščajočo koncentracijo RSV.

SEZNAM OKRAJŠAV

A3AR agonisti adenozijskih 3 receptorjev
COX ciklooksigenaza
DNK deoksiribonukleinska kislina
DSC diferenčna dinamična kalorimetrija
Ig imunoglobulin
IL interlevkin
LAF komora z laminarnim pretokom zraka
MHC glavni histokompatibilnostni kompleks
ND nanodelci
NK- κ B jedrni faktor kappa B
NSAR nesteroidni antirevmatiki
PBS fosfatni pufer
PDI polidisperzni indeks
RA revmatoidni artritis
RSV resveratrol
SLN trdni lipidni nanodelci
SLN-RSV trdni lipidni nanodelci z resveratrolom
ZP zeta potencial
ZU zdravilna učinkovina

1 UVOD

1.1 REVMATOIDNI ARTRITIS

1.1.1 EPIDEMIOLOGIJA

Revmatoidni artritis (RA) je kronična, sistemska vnetna bolezen, avtoimunske narave, ki jo zaznamuje kronično vnetje sklepov, kateremu sledi uničenje sklepnega hrustanca. Domnevajo, da je bolezen povezana s patogenimi povzročitelji ali alergeni novejšega sveta.

Razširjena je po vsem svetu in prizadene ljudi vseh ras ter etničnih skupin, od teh kar 1-2% odraslih. Pojavi se lahko sicer v vsaki starosti, najpogosteje pa med 30. in 55. letom starosti. Ženske zbole vajo trikrat pogosteje (1).

1.1.2 ETIOPATOGENEZA

Natančen vzrok za nastanek bolezni ni znan, predvidevajo pa, da je dejavnikov več. Med temi največ prispevajo genetski, okoljski in hormonski dejavniki.

1.1.2.1 GENETSKI DEJAVNIKI

RA se pogosteje pojavlja pri članih iste družine. Genetski dejavniki prispevajo okoli 50% k tveganju za nastanek bolezni. Tako je relativno tveganje za razvoj bolezni v prvi generaciji sorodnikov 1,5 (pri ostali populaciji je relativno tveganje 1). Genetsko nagnjenje k bolezni je najmočnejše povezano z genskimi produkti, imenovanimi HLA (human leukocyte antigen), ki so znotraj glavnega tkivnoskladnostnega kompleksa odgovorni za imunski odziv. HLA molekule so glikoproteini, ki so prisotni na površinah celic in so zadolženi za vezavo antigena ter posredovanje le tega limfocitom T. RA je prvenstveno povezan s prisotnostjo antigena HLA-DR4. S postopki serološke tipizacije DNK so odkrili številne alele za antigen HLA-DR4. Med temi sta za pojav bolezni pri belcih najbolj odgovorna DRB1*0401 in DRB1*0404. Pri bolnikih z RA, ki so negativni na DR4 alele, pa so prisotni DR1 aleli. Vsi aleli, ki so povezani z nastankom bolezni, imajo skupno regijo podobnih zaporedij, imenovano skupni epitopi. Zagotovo

pa je, da prisotnost določenih alelov ne predstavlja le povečanega tveganja za nastanek bolezni, ampak napoveduje tudi resnejši potek bolezni s hujšimi posledicami (ireverzibilne okvare sklepov) (1).

1.1.2.2 DEJAVNIKI OKOLJA

RA je pogostejši pri kadilcih. Na pojav bolezni pa naj bi vplivali tudi *Proteus mirabilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, Epstein-Barrov virus, *E. Coli*, retrovirusi in parvovirus B19. Raziskovalci ugotavljajo, da k razvoju RA morda prispeva tudi oksidativni stres, pomanjkanje vitamina D, stres, ... (2).

1.1.2.3 VPLIV SPOLNIH HORMONOV

Bolezen je trikrat pogostejša pri ženskah, kar je verjetno posledica vpliva spolnih hormonov na imunski sistem. Estrogeni zavirajo delovanje T zaviralk, podpirajo pa delovanje T pomagalk. Hormoni imajo pomemben vpliv predvsem v rodnem obdobju. Estrogeni naj bi tudi preko aktivacije jedrnega faktorja kappa B (NK- κ B) povečali proliferacijo makrofagov in fibroblastov.

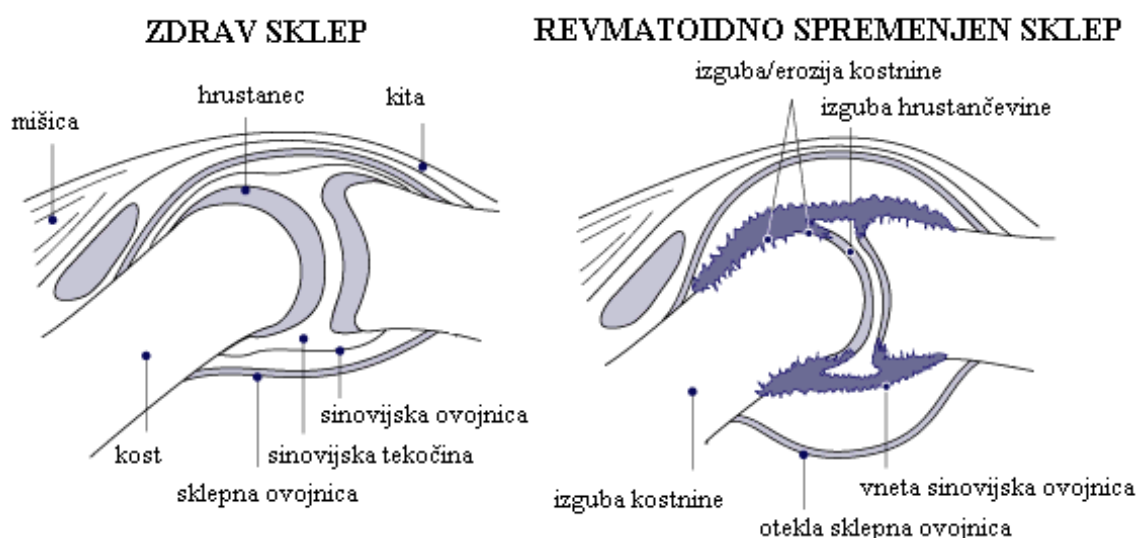
Potek bolezni se med nosečnostjo spremeni. V tem obdobju na bolezen vplivajo številni dejavniki, eden od teh je tudi razlika med materinimi in plodovimi HLA-antigeni. Večja kot je razlika med njimi, večja je verjetnost, da bo bolezen potekala v blažji obliki.

Aktivacija imunskega sistema se namreč zaustavi, saj zaradi razlike med HLA-antigeni nastajajo protitelesa, ki blokirajo glavni histokompatibilnostni kompleks (MHC2), ki se nahaja na večini imunskih celic, še posebej na antigen-predstavitvenih celicah. MHC2 se tako ne more vezati na CD4 receptor na T pomagalkah ter predstaviti fragmentov antigena (1).

1.1.3 VNETJE

Vnetje je odziv ožiljenega tkiva na nek sprožilni vzrok (kemični, imunološki, mikrobn, fizikalni). Osrednje vnetno dogajanje pri RA poteka v sinoviji (notranji kolenski ovojnici), kjer pride do povečane prekrvavljenosti tkiva, eksudacije (posledica povečane propustnosti kapilar), celične infiltracije in razrasta granulacijskega tkiva. Do povečane prekrvavljenosti in edema pride predvsem na notranji površini sinovije, posebno na meji s sklepnim hrustancem. Sinovija se zadebeli, saj celice nabreknejo. Nastane granulacijsko tkivo, ki se vrašča v sklepni hrustanec in kost ter ju ob tem razgrajuje

(slika 1). Vnetni infiltrat v sinoviji vsebuje predvsem limfocite T pomagalk, ki se pogosto v večji meri kopičijo okrog majhnih žil in tvorijo prave limfatične folikle. V tekočini so prisotne tudi plazmatke, mastociti, makrofagi in včasih tudi večjedrne velikanke. V območjih, kjer je vnetje najmočnejše, pride do razraščanja sinovijsko-epitelijskih celic in sinovijskih fibroblastov ter do nastajanja novih krvnih žil z občasno trombozo.



Slika 1: Primerjava zdravega in revmatoidno spremenjenega sklepa (3)

1.1.4 IMUNOPATOGENEZA

Imunsko ozadje RA še ni dokončno raziskano. V vnetnem procesu so večinoma pozitivne povratne zanke, zaradi česar vnetje vzpodbuja samo sebe. Bolezensko dogajanje sproži zaenkrat še neznan antigen, ki pride verjetno v sinovijsko ovojnico, kjer ga zaznajo antigen-predstavitvene celice (sinoviociti A, dendritične celice ali makrofagi) in se aktivirajo. Vse predstavitvene celice izražajo na svoji površini antigene HLA-DR. Aktivirane antigen predstavitvene celice izločajo citokine, med katerima sta najpomembnejša interlevkin-1 (IL-1) in tumor nekrozirajoči faktor alfa (TNF- α). TNF- α je kot aktivator citokinske kaskade osrednji posrednik vnetja pri RA. Poveča sintezo in sproščanje IL-1 β , IL-6 in IL-8. Tudi IL-1 β , ki ga izločajo predvsem mononuklearni fagociti in nevtrofilni levkociti, poveča sintezo in sproščanje IL-6 in IL-8, poleg tega pa tudi TNF- α in s tem ojača njegovo delovanje.

Omenjena poglavitna citokina (IL-1 in TNF- α) spodbujata vnetje tudi s tem, da aktivirata različne celice: limfocite T pomagalk, hondroците, fibroblaste, sinovijske

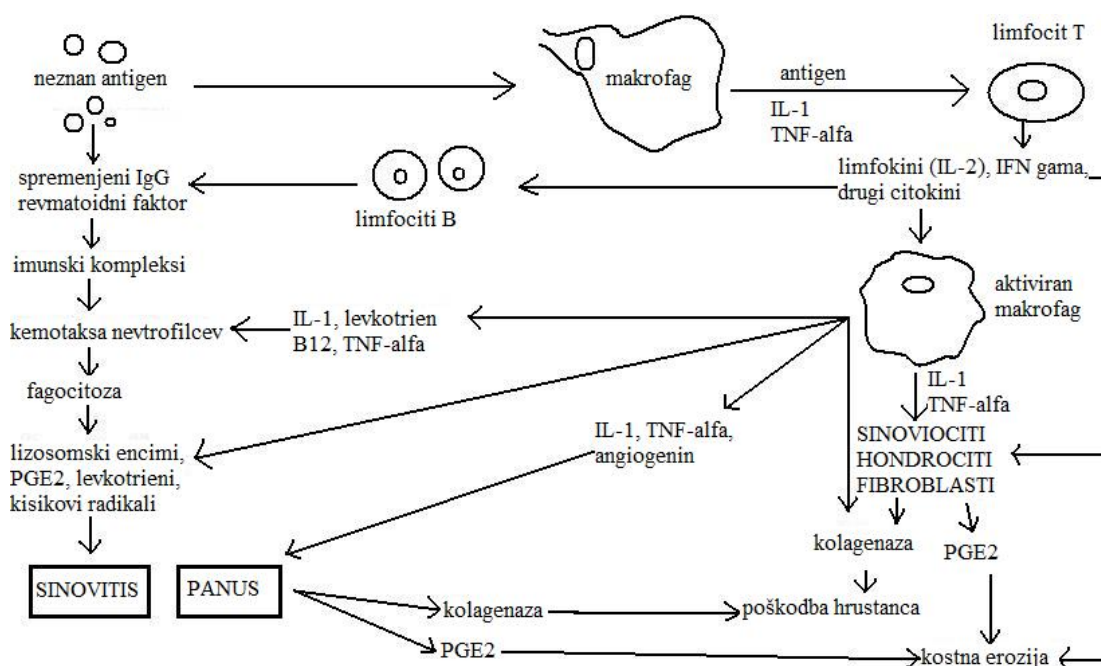
celice in endotelijske celice. Prav tako pa povzročita nastanek splošnih bolezenskih znakov pri RA, kot so povišana telesna temperatura, izguba apetita in hujšanje.

- Aktivirani limfociti T pomagalko izločajo limfokine, med katerimi sta za RA najpomembnejša IL-2 in interferon gama (INF- γ). IL-2 spodbuja diferenciacijo in rast limfocitov B in T ter aktivira limfocite T pomagalko. INF- γ aktivira makrofage in poveča izražanje HLA-DR molekul na antigen predstavitvenih celicah.
- Hondrociti, fibroblasti in sinovijske celice pod vplivom citokinov izločajo prostaglandin E2 (PGE2), ki povzroča kostno erozijo in proteolitične encime (npr. kolagenazo), ki razgrajuje hrustanec.
- Aktivirane endotelijske celice izločajo IL-1 in na svoji površini izražajo adhezijske molekule, ki privabljajo limfocite T in druge provnetne celice ter omogočajo njihovo migracijo v sinovijsko tkivo.

Vse te reakcije so značilne za kronično vnetje.

V sinovijskem prostoru potekajo tudi reakcije, ki so značilne za akutno vnetje. V teh reakcijah je udeleženih veliko nevtrofilnih granulocitov, saj makrofagi in aktivirane endotelijske celice poleg IL-1 sintetizirajo tudi levkotrien B4, ki deluje na granulocite močno kemotaktično. Različni citokini pa vzporedno vzpodbujajo tudi proliferacijo limfocitov B ter tvorbo protiteles. Protitelesa tvorijo z antigenom imunske komplekse, ki se sproščajo v sklep, kjer vežejo komplement, nato pa jih fagocitirajo polimorfonuklearni levkociti. Med fagocitozo se tvorijo kisikovi radikali, prostaglandini in različne proteaze, ki povzročajo tkivno okvaro (slika 2).

Opisane reakcije bi se po odstranitvi antigena morale ustaviti, vendar se pri RA to ne zgodi. Možno je, da je za vzdrževanje teh procesov odgovoren antigen ali le njegove komponente, ki ostanejo v sklepu, ali pa da gre za neposreden vpliv revmatoidnih faktorjev, ki jih tvorijo plazmatke vnetno spremenjene sinovijske ovojnice. Rumatoidni faktorji so protitelesa usmerjena proti lastnim tkivom, natančneje proti Fc-regijam IgG. Poznamo revmatoidne faktorje IgM, IgA in IgG razreda. Vzrok za to, da imunoglobulini reagirajo kot antigeni, gre iskati v tem, da pride do sprememb v glikozilaciji IgG. Rumatoidni faktorji vežejo komplement, vzdržujejo vnetni odziv s tvorbo imunskih kompleksov z IgG ali z agregacijo med seboj. Podobno dogajanje pa povzročijo tudi protitelesa proti nativnemu in denaturiranemu kolagenu tipa 2.



Slika 2: Skica vnetnih poti pri RA (1)

1.1.5 VLOGA SINOVIJSKIH FIBROBLASTOV

Patofiziologija RA vključuje različne celice, kot so: makrofagi, limfociti B in T, hondrociti, osteoklasti idr. Vsaka od teh celic prispeva svoj del k destruktivnemu procesu. Raziskave kažejo, da so aktivirani sinovijski fibroblasti, ki so v velikem številu prisotni v sinoviji bolnika z RA, eden glavnih nosilcev destruktivnega procesa pri RA. Revmatoidni sinovijski fibroblasti (RASf) uničujejo matriks po direktni poti, tako da na svoji površini izrazijo številne adhezijske faktorje (CAM), s katerimi se pritrdijo na sklepni hrustanec, nato pa začnejo izločati matriks-razgrajajoče encime, ki razgrajujejo kostnino in hrustanec (4). Hkrati z ogrodje-razgrajajočimi encimi izdelujejo tudi veliko število citokinov in kemokinov, kar povzroči interakcije z okolišnjimi vnetnimi ter endotelijskimi celicami in to pripelje do progresivnega uničenja sklepnega hrustanca in kosti. RA je bolezen, ki se običajno začne z vnetjem enega sklepa, nato pa se vnetje prenese še na druge sklepe po telesu. RASf so zmožni potovati po krvnem obtoku in se nato pritrditi na oddaljeni sklepni hrustanec, kjer sprožijo vnetni proces (5).

1.1.6 KLINIČNA SLIKA

Tipični znaki bolnika z RA:

- bolečine v sklepih, ki so hujše zjutraj in čez noč, a se ob telesni aktivnosti zmanjšajo
- jutranja okorelost sklepov
- otekli in topli sklepi
- omejena gibljivost z delno atrofijo mišic okoli sklepa
- deformacija sklepov (v kasnejših obdobjih)
- drugi splošni simptomi, ki so odvisni od prizadetosti ostalih organov (povišana temperatura, utrujenost, znojenje, izguba teka, hujšanje, nespečnost, splošno slabo počutje) (1,6,7).

1.1.7 ZDRAVLJENJE

Glede na to da povzročitelji in natančen razvoj RA še niso popolnoma dognani, je zdravljenje dokaj nespecifično. S trenutnimi posegi bolezni ne znamo pozdraviti, lahko pa zmanjšamo znake aktivnega vnetja, izboljšamo gibljivost prizadetih sklepov, preprečimo uničenje tkiv in deformacijo sklepov. Današnja zdravila za zdravljenje RA lahko razdelimo v naslednje štiri skupine:

- NESTEROIDNI ANTIREVMATIKI (NSAR)

Nesteroidna protivnetna zdravila imajo protibolečinski, protivnetni in antipiretični učinek. Delujejo tako, da blokirajo encim ciklooksigenazo (COX), ki sodeluje pri tvorbi prostaglandinov. Poznamo COX-1, ki sodeluje pri tvorbi fizioloških prostaglandinov, medtem ko pa je COX-2 večinoma prisotna le pri vnetjih. Klasični NSAR (ibuprofen, diklofenak, naproksen, ketoprofen, piroksikam, indometacin) neselektivno zavirajo obe obliki COX, kar lahko pripelje do neželenih učinkov (ulkus, krvavitve). Uporaba selektivnih COX-2 inhibitorjev (celekoksib) pa pripelje do motenj v metabolizmu elektrolitov in vode, saj ima COX-2 v ledvicah fiziološko vlogo. Uporaba koksibov mora biti torej dobro pretehtana.

- KLASIČNA ZDRAVILA

Ta zdravila poznamo tudi pod imenom Disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD), ki po različnih mehanizmih ugodno vplivajo na potek RA. Sem spadajo metotreksat, klorokvin, leflunomid, sulfasalazin, ciklosporin A, zlato, azatioprin in agonisti adenozijskih 3 receptorjev (A3AR) (8, 9, 10, 11).

- GLUKOKORTIKOIDI

Glukokortikoidi se uporabljajo kot dopolnilno zdravljenje v primeru močnega vnetja posameznega sklepa. Delujejo protivnetno in imunosupresivno. V primeru hudega vnetja v sklepu lahko glukokortikoide tudi injiciramo v posamezen vnet sklep.

Uporabljajo se metilprednizolon, hidrokortizon, prednizon itd.

- ANTICITOKINSKA ZDRAVILA

To so zdravila, ki na različne načine preprečujejo delovanje citokinov. V to skupino spadajo: anakinra (antagonist receptorjev za IL-1), abatacept (ko-stimulativni modulatorji limfocitov T), etanercept (veže topni obliki TNF- α in TNF- β ter jima tako prepreči, da bi vzdražila sinovijske celice), infliksimab (veže topno in transmembransko obliko TNF- α), adalimumab (inhibira TNF- α), tocilizumab (antagonist receptorjev za IL-6), HuMaxIL-15 (IL-15 inhibitorji), AIN457 (IL-17 inhibitorji) in ustekinumab (IL-12/IL-23 inhibitorji) (12, 13, 14, 15).

Mi pa smo v diplomski nalogi uporabili spojino naravnega izvora – resveratrol (RSV). Naravni produkti so bogat vir biološko aktivnih sestavin, katerim se je v preteklosti posvečalo premalo pozornosti. Zaradi slabe vodotopnosti, slabe absorpcije in hitrega metabolizma imajo take spojine velikokrat nizko biološko uporabnost, katero pa se z vgrajevanjem v ustrezno farmacevtsko obliko (npr. nanodelce) da močno izboljšati, s čemer dobimo učinkovito zdravilo. Ena takih molekul je tudi trans-resveratrol, ki je na trgu prisoten kot prehransko dopolnilo, uporabnost RSV v različnih formulacijah v terepavtske namene pa je še v fazi preizkušanja.

Resveratrol

- Lastnosti resveratrola

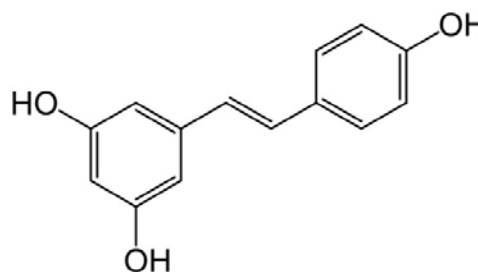
RSV je naravni polifenol, ki se nahaja v rastlinah, kot so jelka, evkaliptus, lilija,...

Prvič je bil izoliran leta 1940 iz korenin teloha. *Trans*-resvratrol (trans- 3,4',5-trihidroksistilben) se nahaja v več kot 70

vrstah rastlin (slika 3). Največji vir

resveratrola pa sta grozdje in rdeče vino (1,5-2

mg/l). Pojavlja se v trti, koreninah in pečkih, toda največja koncentracija je v lupini



Slika 3: Struktura resveratrola (RSV)

grozdnih jagod, kjer ga je od 50 do 100 µg v gramu lupine. Je fitoaleksin, vrsta antibiotične spojine, ki jo proizvaja rastlina kot odziv na stresni dejavnik oz. služi kot obrambni mehanizem proti boleznim. Obstaja v dveh strukturnih izomerah: *cis*- (*Z*) in *trans*- (*E*). *Cis*-resveratrol lahko pod vplivom toplote ali UV sevanja izomerizira v *trans*- obliko. *Trans*-resveratrol ima mnogo farmakoloških učinkov. Po vstopu v krvni obtok se zelo hitro metabolizira s konjugacijo z glukuronsko kislino in z aktiviranim sulfatom (16).

- **Nekaj fizikalno kemijskih lastnosti resveratrola**

$M = 228,25 \text{ g/mol}$

$T_{\text{tališča}} = 260^{\circ}\text{C}$

Topnost v vodi = 0,03mg/mL

Topnost v etanolu = 50mg/mL

$\log P = 3,3$

- **Mehanizem delovanja**

RSV ima več mehanizmov delovanja, ki pa še niso povsem raziskani. Izkazalo se je, da lahko RSV inhibira aktivacijo jedrnega faktorja kappa B (NF-κB), ki je najpogosteje aktiviran v celicah sinovijske tekočine v procesu RA zaradi vpliva številnih vnetnih dejavnikov. Z inhibicijo NF-κB se posledično zaustavi izražanje genov, ki so odvisni od NF-κB. Dva pomembnejša produkta teh utišanih genov sta TNF-α in IL-1β, katerima je pripisana največja odgovornost za vzdrževanje vnetja pri RA. Njuna zaustavitev s pomočjo RSV bi torej pripomogla k izboljšanju ali vsaj k ublažitvi simptomov RA.

Nenazadnje je tudi znano, da NF-κB ščiti celice pred apoptozo. Tako bi lahko s pomočjo RSV preko inhibicije aktivacije NF-κB preprečili tudi hiperplazijo sinovijskih celic in s tem posledično omilili vnetje v artritičnem sklepu. Drugi pomembnejši učinek, ki ga doseže RSV in je dobrodošel za zdravljenje RA, je aktivacija apoptoznih poti po več različnih mehanizmih. Ena od teh je apoptozna pot preko mitohondrijev, kjer se v citosol sprostijo citokrom c, ki aktivira kaspaze. Izkazalo se je, da RSV inducira celično smrt RASF preko kaspaze-8.

Navedeni mehanizmi delovanja so torej zelo ugodni za zdravljenje RA. Žal pa je RSV podvržen intenzivnemu metabolizmu. Po peroralni aplikaciji je izpostavljen precejšnjemu pedsistemskemu metabolizmu, saj nastajajo v jetrih konjugati z glukuronatom in sulfatom. Nadalje pa v krvnem obtoku prav tako potekajo procesi za hitro eliminacijo RSV. Zato je za RSV primernejši takšen način aplikacije, s katerim se

čim bolj izognemo metabolizmu. Eden teh načinov je uporaba nosilnih sistemov, ki med drugim tudi zaščitijo zdravilno učinkovino (ZU) pred zunanjimi vplivi in tako povečajo biološko uporabnost ZU.

Na trgu je mnogo zdravilnih učinkovin za zdravljenje RA, vendar redka izkazujejo toliko pozitivnih lastnosti kot RSV. Poleg tega, da ima protivnetne lastnosti, deluje tudi antioksidativno, antikancerogeno in imunomodulatorno. Poleg tega naj RSV ne bi imel pomembnejših neželenih učinkov (17).

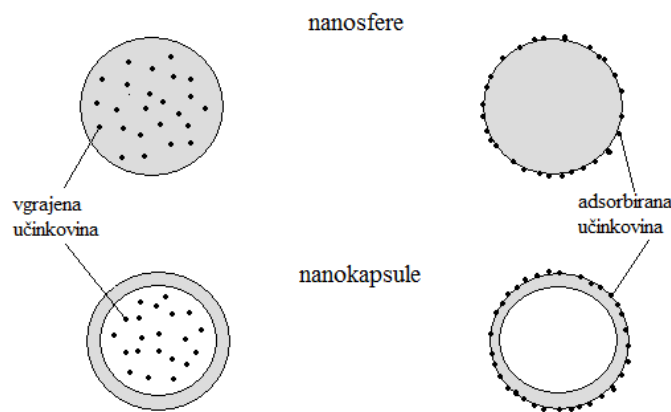
Zaradi strukture RSV (ima dva lipofilna aromatska obroča in 3 hidroksilne skupine, ki povečajo hidrofilnost) ne pričakujemo težav z vgrajevanjem v SLN. V SLN lahko dosežemo dokaj visoke koncentracije RSV in tako lahko apliciramo večje količine RSV, ki pa zaradi upočasnjene sproščanja, ki ga zagotovi koloidni dostavni sistem, ne delujejo toksično na celice.

1.2 KOLOIDNI NOSILNI SISTEMI

Pri razvoju novih zdravil se strokovnjaki velikokrat srečajo s problemom, ko razpolagajo z učinkovito spojino, vendar jo je zaradi njenih fizikalno-kemijskih lastnosti (topnost, konstanta ionizacije, porazdelitveni koeficient idr.) in farmakokinetičnih lastnosti (metabolizem, eliminacija, volumen distribucije, biološka uporabnost) težko v ustreznih koncentracijah pripeljati na mesto delovanja. Za razvoj čim bolj učinkovitega in varnega zdravila moramo največkrat zdravilno učinkovino (ZU) vgraditi v ustrezno farmacevtsko obliko, ki bo zagotovila, da bo ZU v zadostni meri in ustreznem času prišla nespremenjena do željenega mesta delovanja. Novejši primeri zelo uspešnih farmacevtskih oblik so različni nosilni sistemi: koloidni nosilci (velikost nekaj nm), mikrodenci (velikost nekaj μm) in implantati (velikost do nekaj mm) (18).

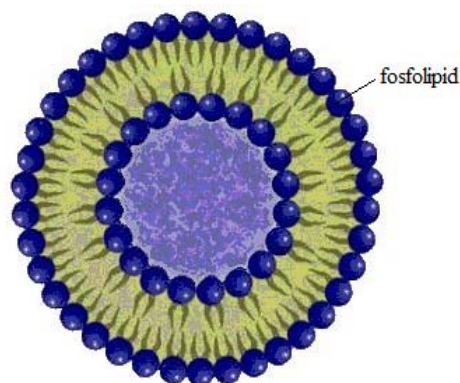
Koloidni sistemi predstavljajo delce velike od 1 nm do 1 μm . Mednje prištevamo ND (polimerni ND, trdni lipidni ND), nanosuspenzije (disperzija same ZU v obliki ND), nanoemulzije, liposome, micle, topne konjugate polimer-učinkovina idr.

- ND so trdni koloidni delci velikosti 10-1000 nm. Ločimo nanosfere, kjer je ZU v nosilcu porazdeljena ali pa je nanj adsorbirana in nanokapsule. Pri nanokapsulah imamo ovojnico, ZU pa se nahaja v jedru, ali pa je adsorbirana na ovojnico (slika 4).



Slika 4: Skica nanosfere in nanokapsule

- V nanosuspenzijah so nm veliki delci ZU dispergirani v disperznem mediju (ZU ni vgrajena v nosilni material). Nanosuspenzije so primerne predvsem za težko topne ZU.
- Nanoemulzija je heterogen sistem sestavljen iz dveh tekočin, ki se ne mešata med seboj, od katerih je ena dispergirana v drugi v obliki tekočih kapljic. Povprečna velikost kapljic je manjša od 1000 nm. Največ se uporabljajo O/V emulzije, v katerih je hidrofbna učinkovina raztopljena v oljni fazi.
- Liposomi so mikroskopski vezikli sestavljeni iz ene (enoslojni liposomi (slika 5)) ali več (večslojni liposomi) lipidnih dvojnih plasti, ki so urejene v koncentrično obliko in vključujejo enako število prostorov z vodo. Glede na sestavo ločimo liposome (oznaka za osnovno obliko), niosome (neionogeni liposomi-nimajo polarne glave), sfingosomi (liposomi zgrajeni iz sfingolipidov), etosomi (v notranjosti imajo etanol) in virosomi (posnemajo viruse). Glede na namen uporabe pa ločimo dermosome, transferosome in genosome.



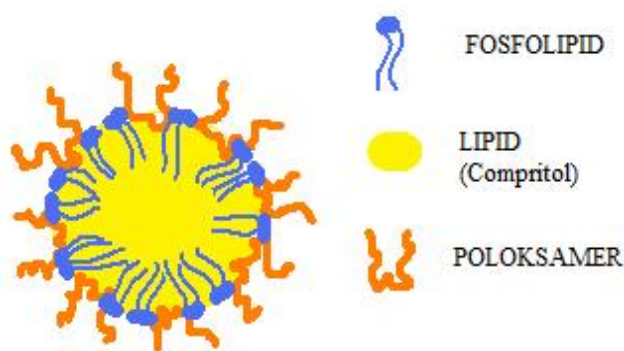
Slika 5: Skica enoslojnega liposoma

Glavni prednosti koloidnih nosilnih sistemov pred mikrodenci sta možnost i.v. aplikacije in doseganje ciljane dostave ZU. Pri izbiri koloidnega sistema je treba upoštevati naslednje dejavnike (18):

- kapaciteta vgrajevanja,
- možnosti za doseganje ciljane dostave ZU,
- *in vivo* obnašanje takega sistema,
- akutna in kronična toksičnost,
- možnost proizvodnje v industrijskem merilu,
- fizikalna in kemična stabilnost,
- cena.

1.2.1 TRDNI LIPIDNI NANODELCI

Trdni lipidni nanodelci (solid lipid nanoparticles, SLN) so delci veliki od 10 do 1000 nm. V splošnem so sestavljeni iz trdnega lipidnega jedra in zunanjskega sloja fosfolipidov z dodatkom drugih površinsko aktivnih snovi (PAS) (slika 6). Izbira lipidov ni toliko problematična z varnostnega vidika, saj se uporabljajo biorazgradljivi in biokompatibilni lipidi, npr. trigliceridi (tristearat, tripalmitat, trimiristat), parcialni gliceridi (gliceridi behenojske kisline), maščobne kisline (stearinska kislina), steroidi (holesterol) in voski (cetilpalmitat). Prav tako so uporabni številni fosfolipidi (lecitin, izolecitin, hidrogenirani fosfatidilholin). Večja pazljivost pa je potrebna pri izbiri PAS, saj le-ti narekujejo način aplikacije. Za parenteralno aplikacijo se najpogosteje uporabljajo natrijev glikoholat, poloksamer 188, lecitin in Tween 80® (18).



Slika 6: Skica trdnega lipidnega nanodelca (SLN) in sestavine

- Terapevtsko pomembne prednosti SLN pred drugimi koloidnimi sistemi (19):
 - nadzorovano sproščanje,
 - ciljane dostava,
 - povečana stabilnost ZU zaradi zaščite pred zunanjimi vplivi,
 - manjša encimska razgradnja in agregiranje delcev po peroralni aplikaciji,

- visoki delež vgrajene ZU,
- vgrajevanje majhnih lipofilnih in hidrofilnih ZU ter tudi proteinov,
- zmanjšana nevarnost akutne in kronične toksičnosti zaradi uporabe biorazgradljivih in biokompatibilnih sestavin (lipidov, fosfolipidov),
- možnost sterilizacije,
- možnost proizvodnje v industrijskem merilu,
- odsotnost organskih topil.
- Slabosti SLN:
 - polimorfne modifikacije oz. spremembe v kristalni strukturi lipida, kar lahko pripelje do manjšega vgrajevanja ZU ali njenega hitrejšega izgubljanja,
 - samo delno primerni za termolabilne ZU, saj se velikokrat SLN izdelujejo s taljenjem lipida,
 - nastale disperzije SLN vsebujejo veliko vode,
 - slabše vgrajevanje hidrofilnih učinkovin (zaradi slabe topnosti v lipidu).

1.2.2 METODE IZDELAVE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

1.2.2.1 VISOKOSTRIŽNA HOMOGENIZACIJA IN ULTRAZVOK

To sta prvi tehniki za pripravo trdnih lipidnih nanodisperzij. Sta zelo enostavni metodi. Kakovost disperzij je odvisna od prisotnosti mikrodicev. Na velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial vplivamo s časom emulgiranja, jakostjo homogenizatorja oz. ultrazvoka in pogoji hlajenja.

1.2.2.2 VISOKOTLAČNA HOMOGENIZACIJA

Visokotlačna homogenizacija se je prvotno uporabljala za izdelavo nanoemulzij za parenteralno prehrano, danes pa z njo izdelujejo tudi nanodelce in nanosuspencije.

Glavni prednosti metode sta možnost povečanja proizvodnje na industrijsko merilo in majhen delež delcev mikrometerskih velikosti.

Pri homogenizaciji homogenizator potisne tekočino pod visokim tlakom (100-2000 bar) skozi špranjo širine nekaj μm . Ker se premer zmanjša iz nekaj cm na nekaj μm , se hitrost toka disperzije močno poveča in ob tem se poviša dinamični tlak, statični tlak pa pade. Ker se v reži statični tlak zniža pod tlak vrelišča vode, začne voda vreti. Nastajajo mehurčki vodne pare, ki popokajo, ko disperzija zapusti špranjo in pride v območje normalnega zračnega tlaka. Ta pojav imenujemo kavitacija. Sila kavitacije je dovolj

velika, da zdrobi mikrodelce v nanodelce. K drobljenju delcev prispevata še visoka strižna napetost med delci in trki med njimi. Velikost nanodelcev in polidisperzni indeks sta odvisna od: koncentracije in vrste uporabljenega lipida ter PAS, količine ZU, tlaka homogeniziranja in števila homogenizacijskih ciklov. Poznamo vročo in hladno homogenizacijo;

- VROČA HOMOGENIZACIJA

Vročo homogenizacijo izvajamo nad temperaturo tališča lipida, zato gre pravzaprav za homogenizacijo emulzije. S pomočjo rotor-stator homogenizatorja pripravimo predemulzijo. Talini lipida z dispergirano učinkovino dodamo na enako temperaturo ogreto vodno fazo, ki smo ji že dodali PAS. Nastanku predemulzije sledi homogenizacija pod visokim tlakom in pri temperaturi, ki je nad temperaturo tališča lipida. V splošnem naj bi višja temperatura zaradi manjše viskoznosti notranje faze omogočila nastanek manjših delcev, vendar se moramo zavedati, da visoka temperatura poveča hitrost razpada učinkovine, zato je potrebno izbrati kompromis. Potrebno je tudi upoštevati, da že homogenizacija sama po sebi povzroči dvig temperature. Za izdelavo SLN običajno zadostuje 3-5 ciklov pri tlaku 500-1500 bar. Če bi uporabili še večji tlak in še večje število ciklov, bi zaradi koalescence tvegali nastanek večjih delcev.

Z vročo homogenizacijo dobimo zaradi tekočega stanja lipida nanoemulzijo, ko pa se homogenizat ohladi pod temperaturo tališča lipida, pa lahko govorimo o disperziji SLN. Ker lahko prisotnost PAS in majhna velikost delcev upočasni kristalizacijo lipida, se vzorec velikokrat nahaja v obliki podhlajene taline (20).

- HLADNA HOMOGENIZACIJA

Zaradi nižje temperature je pri tem postopku lipid v trdnem agregatnem stanju. Gre za mletje suspenzije pod visokim tlakom. Ker med homogenizacijo temperatura narašča, je potrebno zmes ohlajati, da zagotovimo trdno agregatno stanje lipida. V fazi predpriprave učinkovino solubiliziramo ali dispergiramo v talini lipida, nato pa talino zelo hitro ohladimo (v suhem ledu ali s tekočim dušikom), saj s tem dosežemo homogeno distribucijo zdravilne učinkovine v lipidnem matriksu. Nato trden lipid zmeljemo do velikosti delcev 50-100 μm in te nadalje uvedemo v hladno raztopino emulgatorja. Dobljeno predsuspenzijo homogeniziramo pod visokim tlakom pri sobni ali še nižji temperaturi. S hladno homogenizacijo ne moremo dobiti tako majhnih delcev kot z vročo homogenizacijo. Njeni prednosti pa sta manjša izpostavljenost zdravilne učinkovine visoki temperaturi in boljše vgrajevanje hidrofilnih učinkovin (20).

1.2.2.3 IZPAREVANJE TOPILA Z OBARJANJEM V EMULZIJAH TIPA O/V

Pri tej metodi lipid najprej raztopijo v organskem topilu, ki se ne sme mešati z vodo. Nato organsko in vodno fazo združijo ter ju ob prisotnosti PAS emulgiramo. Sledi odparevanje organskega topila, pri čemer pride do obarjanja lipida v vodni fazi in oblikovanja disperzije nanodelcev. Na velikost delcev vplivamo s koncentracijo lipida v organskem topilu. Prednost te metode je, da ni termične obremenitve. Glavna slabost pa je uporaba organskih topil.

1.2.2.4 RAZREDČEVANJE VROČE MIKROEMULZIJE

Pri tej metodi SLN oblikujemo dvostopenjsko. Najprej naredimo vročo mikroemulzijo tipa O/V, ki pa jo potem razredčimo s hladnim vodnim medijem. Pri tem se kapljice lipida strdijo in nastanejo lipidni nanodelci. Presežek vode nato odstranimo z ultrafiltracijo ali liofilizacijo. Na velikost delcev najpomembneje vpliva temperatura. Visoka temperaturna razlika omogoči hitrejšo kristalizacijo lipida in tako prepreči agregacijo.

1.2.2.5 IZDELAVA NANODELCEV Z DISPERGIRANJEM TALINE LIPIDA Z ROTOR-STATOR HOMOGENIZATORJEM

Pri tej metodi lipidno fazo segrejemo na optimalno temperaturo, ki jo določimo glede na temperaturo tališča lipidov ter je približno 10 °C nad tališčem le-tega. V staljeni lipidni fazi raztopimo ali suspendiramo ZU in ji nato dodamo na enako temperaturo segreto vodno raztopino steričnega stabilizatorja. Zmes homogeniziramo z rotor-stator homogenizatorjem pri visokih vrtljajih (15.000-20.000 obratov/min) in konstantni temperaturi (običajno 10°C nad temperaturo tališča lipida).

1.2.3 SHRANJEVANJE IN LIOFILIZACIJA

Glavna prednost SLN kot koloidnih dostavnih sistemov je njihova fizikalna in kemijska stabilnost. Kljub temu pa se pri SLN srečamo z nestabilnostnimi procesi, kot sta razpadnost ZU in povečevanje delcev. Prvi problem rešimo z uporabo kemijsko stabilnih sestavin. Povečevanju delcev, t.i. Ostwaldovi rasti, pa se lahko izognemo z izdelavo delcev, ki imajo ozko porazdelitev velikosti in tudi z liofilizacijo. S tem, ko odstranimo tekočino, preprečimo tudi reakcije solvolize.

Klub temu, da je liofilizacija draga in dolgotrajna, je najpogosteje uporabljana metoda sušenja. Zaradi nizke temperature in daljšega časa sušenja je zelo učinkovita za sušenje temperaturno občutljivih produktov. Preden nanodelce zamrznemo, jim moramo dodati krioprotektante, ki jih zaščitijo pred poškodbami med zamrzovanjem. Za nanodelce so se kot najuspešnejši krioprotektanti izkazali ogljikovi hidrati (npr. trehaloza).

Ko začnemo disperzijo SLN ohlajati (disperziji smo že pred tem dodali ustrezno količino krioprotektanta), se pri temperaturi od -10 do -30°C začnejo tvoriti kristali vode. Zamrzovanje povzroči, da začne koncentracija krioprotektantov v še nekristalizirani vodni fazi naraščati, dokler se ne preseže topnost. V tej točki začnejo ogljikovi hidrati precipitirati v nezamrznjeni vodni fazi. Precipitirajo v kristalinični ali amorfni obliki. Pri nižji temperaturi prevladuje amorfna oblika. Naloga amorfnе faze je, da ščiti nanodelce pred mehanskimi poškodbami, ki bi jih lahko povzročili kristali vode.

1.2.4 OPREDELITEV FIZIKALNIH LASTNOSTI TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Z opredelitvijo fizikalnih lastnosti SLN izvajamo kontrolo kakovosti izdelka. Glavni parametri, ki jih določamo, so: velikost delcev, širina velikostne porazdelitve (polidisperzni indeks), naboj na delcih (zeta potencial), stopnja kristaliničnosti, lipidne modifikacije in sopoljavnost drugih koloidnih struktur (miceli, liposomi, podhlajena talina, nanodelci učinkovine). To so tudi najpomembnejši dejavniki, ki imajo neposreden vpliv na stabilnost nanodelcev in kinetiko sproščanja ZU. Veliko analitskih metod zahteva SLN v obliki disperzije, zato je potrebna ustrezna predpriprava vzorca. Pri tem moramo upoštevati možne spremembe, do katerih lahko pride med pripravo vzorca.

1.2.4.1 VELIKOST IN POLIDISPERZNI INDEKS DELCEV

Poznavanje velikosti delcev in posredno tudi polidisperznega indeksa (PDI) je v farmaciji zelo pomembno, saj lahko pomembno vplivata na varnost in učinkovitost samih nanodelcev. Velikost delcev je tudi dober indikator stabilnosti, saj se spremembe v velikosti delcev pojavijo pred makroskopskimi spremembami. Vrednosti $PDI < 0,1$ kažejo na dobro homogenost vzorca in ozko porazdelitev velikosti ND, vrednosti $PI > 0,3$ pa na večjo heterogenost.

Na velikost delcev vplivamo z izbiro lipida, zdravilne učinkovine ter pomožnih snovi. Pomembno je njihovo razmerje. Na velikost delcev vplivajo tudi: tehnološki postopek izdelave, sterilizacija, disperzni medij, liofilizacija in pogoji shranjevanja. Za merjenje velikosti delcev se uporabljajo predvsem fotonska korelacijska spektroskopija (PCS; Photon Correlation Spectroscopy), laserska difrakcija (LD; Laser Diffraction) in transmisijska elektronska mikroskopija (TEM).

PCS temelji na meritvah nihanja intenzitete sipane laserske svetlobe, ki je posledica Brownovega gibanja delcev. Gre za naključno gibanje kot posledico trkov ND z molekulami disperznega medija. Zaradi tega je zgornja meja velikosti delcev, ki jo s to metodo še lahko merimo, omejena s sedimentacijo, ki je odvisna tako od velikosti kot tudi od gostote ND.

LD temelji na odvisnosti difrakcijskega kota od velikosti delcev. Manjši delci povzročijo intenzivnejše sipanje pri večjih kotih. Prednost te metode je ta, da lahko z njo določimo delce velike od nekaj nm pa do nekaj μm .

TEM je mikroskopska tehnika, kjer žarek elektronov potuje skozi tanko plast vzorca, in med potovanjem skozi plast z vzorcem interagira. Slika se izoblikuje na podlagi interakcij elektronov, ki potujejo skozi vzorec. Zaradi majhne valovne dolžine žarka elektronov nam ta mikroskopska tehnika zagotavlja mnogo večjo resolucijo kot svetlobni mikroskop.

1.2.4.2 ZETA POTENCIAL

Stabilnost suspendiranih ND je tesno povezana z zeta potencialom (ZP). V splošnem velja, da so stabilne disperzije z absolutno vrednostjo ZP nad 30 mV, nestabilne pa tiste z absolutno vrednostjo ZP pod 5 mV. ZP ND je definiran kot razlika med potencialom na površini delca močno vezane plasti ionov in elektronevtralnimi območjem v raztopini. Merimo ga z elektroforezo. To je merjenje hitrosti gibanja nabitih delcev v električnem polju skozi tekočino. Z elektroforezo lahko ocenimo vrsto naboja na delcih ter elektroforezno gibljivost delcev, ki je povezana z nabojem na površini oz. zeta potencialom. ZP je lahko posledica selektivne adsorpcije ionov iz disperznega medija ali ionizacije skupin na površini nanodelcev (npr. COOH), kjer je znano, da je naboj odvisen od pKa in pH.

1.2.4.3 DOLOČANJE KRISTALINIČNOSTI

Stopnja lipidne kristalizacije je parameter, ki močno vpliva na količino vgrajene učinkovine in na hitrost njenega sproščanja. Za proučevanje kristalinične strukture se največ uporabljata diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC; differential scanning calorimetry) in rentgenska difrakcija.

Rentgenska difrakcija je metoda, ki je zelo pogosto uporabljena za rutinske kot tudi zahtevnejše strukturne preiskave trdnih kristaliničnih vzorcev. Z njo preiskujemo vrsto materiala, kristaliničnost in fazno čistost materiala, spremembe v elementarni sestavi izomorfni spojini, velikosti delcev, deformacije v kristalih itd.

DCS je v farmaciji najpogostejše uporabljena termična analitska metoda. Obsega nadzorovano segrevanje, hlajenje vzorca ali vzdrževanje konstantne temperature ter opazovanje fizikalnih in kemijskih sprememb, ki medtem potekajo. S to metodo merimo različne lastnosti snovi, kot so: tališče, toplotna kapaciteta, entalpija reakcije, kinetika reakcije idr. Uporabljamo jo za analizo zdravilnih učinkovin, pomožnih snovi, v kompatibilnostnih študijah, v nadzoru različnih farmacevtskih procesov in pri proučevanju farmacevtskih oblik. Metoda je primerna tudi za ugotavljanje polimorfizma, preverjanje čistosti in preiskave steklastega prehoda (21).

2 NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo naravno spojino resveratrol (RSV), ki ima ugodne protivnetne in proapoptotične učinke, vgradili v trdne lipidne nanodelce (SLN) in s tem izdelali koloidni sistem, ki bi bil zaradi številnih prednosti pred drugimi zdravili zelo obetaven za zdravljenje RA.

S tehnologijo dispergiranja taline lipida z rotor-stator homogenizatorjem bomo izdelali SLN:

- z različnimi koncentracijami RSV
- jim določili fizikalne lastnosti (velikost, polidisperzni indeks, zeta potencial) pred in po liofilizaciji
- jim določili učinkovitost vgrajevanja
- določili bomo profil sproščanja učinkovine iz SLN
- naredili bomo tudi DSC analize vseh izhodnih substanc in izdelanih liofiliziranih SLN, da bomo dokazali kompatibilnost sestavin in fizikalno stanje vgrajene učinkovine.

Tiste SLN, ki bodo izkazovali najboljše lastnosti, bomo preizkusili na celični kulturi fibroblastov. Celicam bomo po določenem času inkubacije z vzorci s pomočjo svetlobnega mikroskopa določili rast ter grobo morfologijo. Z uporabo kolorimetričnega testa pa bomo kvantificirali metabolno aktivnost celic po dodatku SLN-RSV ter tako opredelili proliferacijo oz. živost celic.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 IZVEDBA TEHNOLOŠKEGA DELA

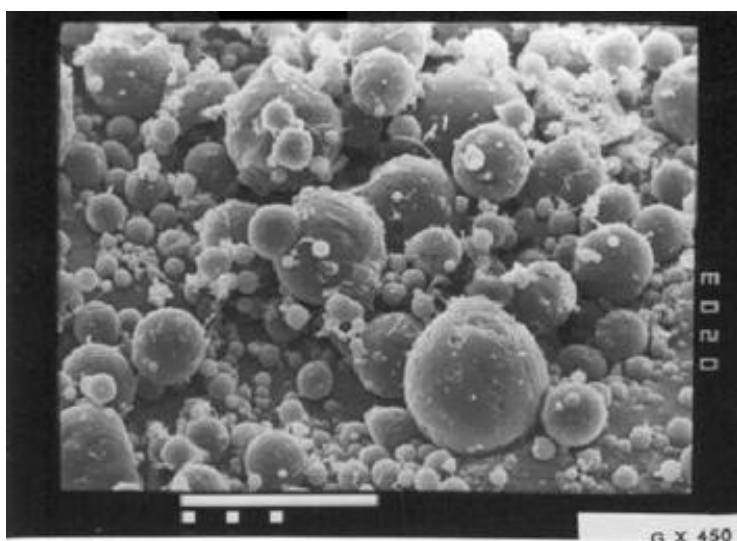
3.1.1 MATERIALI

3.1.1.1 KOMPONENTE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

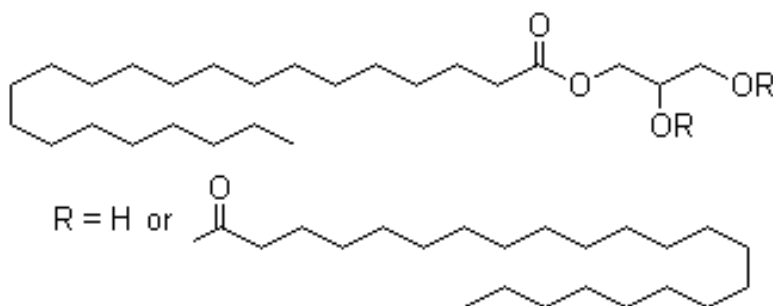
- **Compritol® 888 ATO**
(Gattefosse, Francija).

Je trden lipid v obliki finega belega prahu (slika 7). Sestavljen je iz zmesi monogliceridov (12-18%), digliceridov (52-54%) in trigliceridov (28-32%) behenojske kisline (C 22 kislina) (slika 8). Zaradi prostih hidroksilnih skupin ima emulgirajoče lastnosti. Spada med varne substance (GRAS; Generally recognized as safe). Temperatura tališča je 65-77°C.

Pri izdelavi SLN smo ga uporabili za tvorbo trdnega lipidnega jedra.



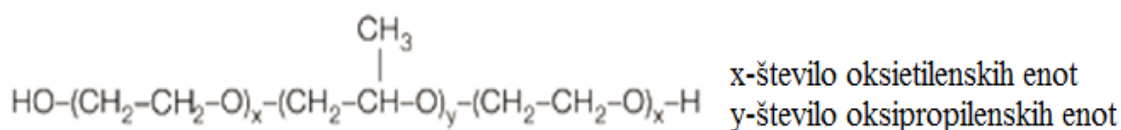
Slika 7: Compritol® 888 ATO pod svetlobnim mikroskopom (22)



Slika 8: Struktura gliceril behenata (23)

- **Lutrol® F68** (Ludwigshofen, Nemčija)

Lutrol F68 ali poloksamer 188 je polioksietilen-polioksipropilen blok kopolimer (slika 9). Povprečna molekulska masa je 8600 g/mol. Polioksietilenske enote predstavljajo približno 81 %, polioksipropilenske enote pa 19 % molekulske mase. V vodi se takoj raztopi. Njegova temperatura tališča je med 52 in 57 °C (24). Spada med hidrofilne, neionogene površinsko aktivne snovi (PAS). Zaradi nizke toksičnosti je primeren celo za parenteralne farmacevtske oblike (25).



Slika 9: Lutrol® F68

Pri izdelavi SLN ima vlogo steričnega stabilizatorja in sicer se s hidrofobnim (propilenskim) delom adsorbira na površino nanodelcev, medtem ko so hidrofilne (etilenske) verige usmerjene v stran od nanodelcev – v medij.

- **Phospholipon® 90H** (Rhône-Poulenc Rorer, Köln, Germany)

Phospholipon® 90H je fosfolipid, natančneje hidrogenirani fosfatidilholin. Približno 85 % maščobnih kislin predstavlja stearinska kislina, 15 % pa palmitinska kislina. Je bel kristaliničen prašek, s temperaturo tališča okrog 55 °. V vodi tvori micele. Uporabljajo ga za izdelavo liposomov, ND in emulzij (26).

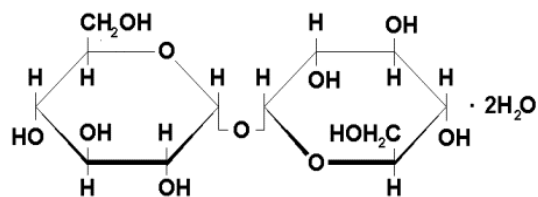
Pri izdelavi SLN ima vlogo emulgatorja, ki se razporedi na mejo med lipofilnim ogrodjem zunanjim hidrofilnim medijem. Dolge maščobne verige se usmerijo v lipidno jedro, hidrofilni del pa je usmerjen navzven.

- **Resveratrol** (Sigma, Germany)

Resveratrol je sivo-rjava praškasta snov, slabo topna v vodi (0,03g/l) in dobro topna v etanolu (50g/l). Pri izdelavi SLN ima vlogo ZU. (Podrobnejši opis je v uvodu).

- **Trehaloza dihidrat**

Trehaloza je disaharid, topen v vodi in vročem etanolu, netopen v etru (slika 10). Temperatura tališča je okrog 97 °C. Pri delu smo jo uporabili kot krioprotektant v postopku liofilizacije SLN.



Slika 10: Struktura trehaloze dihidrata

3.1.1.2 REAGENTI IN TOPILA

- Etanol 96 % (Kefo, Slovenija)
- Metanol (Merck, Germany)
- Tekoči dušik, reagent za zamrzovanje disperzij SLN
- Prečiščena in bidestilirana voda (Fakulteta za farmacijo)
- Tween 80 (Fluka analytical, Anglija)

3.1.2 APARATURE

- precizna tehtnica XS205 (Mettler Toledo, ZDA)
- rotor-stator homogenizator, Labtek homogenizer (Omni international, ZDA)
- Zetasizer 3000 in Zetasizer nano (Malvern instruments, Anglija)
- liofilizator Beta 1-8K (Christ, Nemčija)
- ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra, Slovenija)
- tehtnica EB-1200C (Tehtnica, Slovenija)
- magnetno mešalo in grelec (IKA®, Nemčija)
- magnetna mešalna plošča (IKA®, Nemčija)
- centrifugirka Centric 322A (Tehtnica, Slovenija)
- UV-VIS spektrofotometer Hewlett-Packard 8453 (Hewlett-Packard, Nemčija)
- DSC 1 (Mettler Toledo, ZDA)

3.1.2 IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

3.1.2.1 IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z DISPERGIRANJEM

TALINE LIPIDA Z ROTOR-STATOR HOMOGENIZATORJEM

Na precizni tehtnici smo natehtali sestavine za disperzijo lipidnih ND. ND smo izdelali po recepturah prikazanih v preglednici 4. ND se med seboj razlikujejo po količini RSV.

S povečevanjem RSV smo zmanjševali količino lipida (preglednica I). Za vsako recepturo smo naredili dve paralelki.

V epruveti smo združili lipidne komponente: Compritol in Phospholipon ter tudi RSV, ko smo izdelovali SLN z ZU. RSV smo dodali v natehtani obliki ali pa raztopljenega v etanolu. V 15 mL centrifugirko smo stabilizator poloksamer raztopili v prečiščeni vodi. Na vodni kopeli (T okrog 90 °C) smo stalili lipidne komponente in jim dodali polovico na enako temperaturo segrete vodne faze. Sledilo je homogeniziranje 10 min pri 15000 vrtljajih/min z rotor-stator homogenizatorjem (Labtek homogenizer, Omni international). Zadnje tri minute pred koncem smo dodali še preostanek vodne faze, umaknili segrevanje in pri nespremenjenih vrtljajih homogenizirali do konca. Nato smo disperzijo nastalih SLN za 5 minut prestavili v zamrzovalnik. Med ohlajanjem so se lipidne kapljice strdile in nastali so lipidni nanodelci.

Preglednica I: Različne sestave SLN

Sestava	SLN-RSV0		SLN-RSV1		SLN-RSV2		SLN-RSV3	
	čist		čist	EtOH	čist	EtOH	čist	EtOH
Lipid (Compritol) [mg]	40		36	36	32	32	24	24
Phospholipon 90H [mg]	24		24	24	24	24	24	24
Resveratrol [mg] oz. [mL]	0		4	1,0 mL	8	2,0 mL	16	4,0 mL
Poloksamer (pol.) [mg]	16		16	16	16	16	16	16
Voda [mg]	20		20	20	20	20	20	20

V preglednici »čist« pomeni natehtan RSV; »EtOH« pa RSV, dodan z etanolno raztopino RSV s koncentracijo 4 mg/mL. Le-to smo pripravili tako, da smo v 10 mL EtOH raztopili 40 mg RSV. RSV smo raztopili v EtOH, ker je v vodi slabo topen. S tem smo želeli prveriti, če je v primeru ratopljenega RSV učinkovitost vgrajevanja boljša, kot takrat ko RSV ni raztopljen.

3.1.2.2 LIOFILIZACIJA DISPERZIJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Z liofilizacijo zagotovimo boljšo stabilnost nanodelcev. Liofilizacijo smo izvedli na liofilizatorju Beta 1-8 K (Christ, Nemčija).

Najprej smo disperziji SLN dodali krioprotektant (trehaloza dihidrat) v razmerju SLN : trehaloza = 5 : 1 (m/m). Nato smo tako pripravljeno disperzijo prenesli v 100 mL bučko in jo zamrznili v tekočem dušiku (-70 °C). Zamrznjene disperzije smo do suhega liofilizirali pri sobni temperaturi in 170 mbar. Proces liofilizacije je obsegal 18 urno fazo sekundarnega sušenja pri sobni temperaturi in 170 mbar.

3.1.2.3 REDISPERGIRANJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Liofiliziranim ND (2 mg) smo dodali 5 mL destilirane vode in si pri redispergiranju pomagali z ultrazvočno kadičko. Čas redispergiranja v ultrazvočni kadički smo spreminjali tako, da smo se čim bolj približali začetnim vrednostim velikosti SLN.

3.1.4 VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

3.1.4.1 MERJENJE VELIKOSTI, POLIDISPERZNEGA INDEKSA IN ZETA

POTENCIALA IZDELANIH TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Velikost in polidisperzni indeks SLN smo določevali na Zetasizerju nano (Malvern, UK). Vzorec za meritev smo pripravili v kiveti, in sicer tako, da smo vzeli 500 µL disperzije nanodelcev in dodali 500 µL destilirane vode. Tako pripravljeno kiveto smo vstavili v aparaturo in za vsak vzorec naredili tri meritve pri naslednjih pogojih:

Temperatura: 25 °C

Kot merjenja: 173°

Viskoznost disperznega medija (voda): 0,890 cP

λ laserske svetlobe (He-Ne laser): 633 nm

Lomni količnik medija: 1,330

Zeta potencial smo prav tako določili na napravi Zetasizer nano (Malvern, UK). Za meritev smo uporabili isti vzorec, ki smo ga pred tem uporabili za določevanje velikosti delcev in mu dodali 3 mL destilirane vode. Vzorec smo s pomočjo injekcijske brizge napolnili v posebno kiveto z elektrodami (slika 11). Pri polnjenju kivete smo bili pozorni na to, da smo iz kivete odstranili vse zračne mehurčke, saj vplivajo na pravilnost meritve.

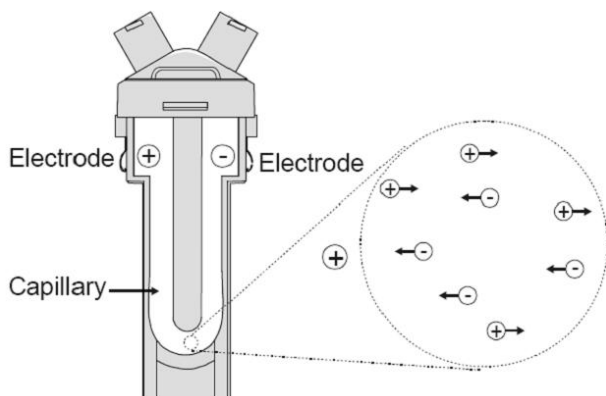
Meritve smo izvajali pri sledečih pogojih:

Temperatura: 25 °C

Kot merjenja: 173°

Viskoznost disperznega medija (voda): 0,890 cP

Dielektrična konstanta disperznega medija: 79,0



Slika 11: Skica kivete za merjenje zeta potenciala

3.1.4.2 UČINKOVITOST VGRAJEVANJA IN VSEBNOST RESVERATROLA V TRDNIH LIPIDNIH NANODELCIH

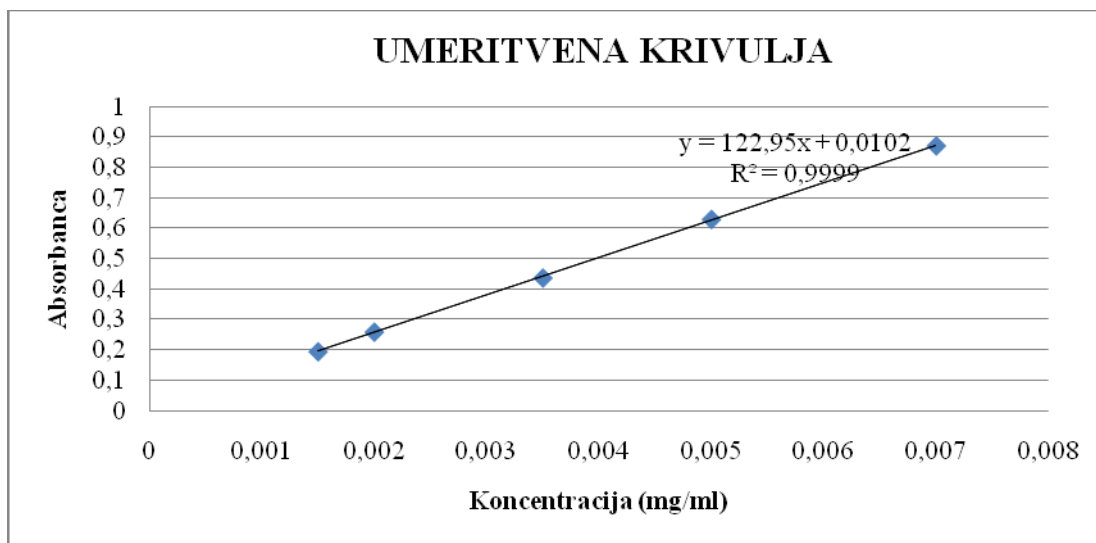
- *UMERITVENA KRIVULJA*

Kot analizno metodo za določanje koncentracije resveratrola smo uporabili spektrofotometrijo. Meritve smo izvajali na UV-VIS spektrofotometru Hewlett-Packard 8453. Najprej smo naredili umeritveno krivuljo (preglednica II in graf 1). Pripravili smo 5 različnih koncentracij raztopin RSV v etanolu in izmerili absorbanco pri 306 nm, kjer ima RSV absorpcijski maksimum.

Preglednica II: Podatki za umeritveno krivuljo

KONCENTRACIJA (mg/mL)	ABSORBANCA
0,007	0,87002
0,005	0,62849
0,0035	0,43614
0,002	0,25848
0,0015	0,19407

Graf 1: Umeritvena krivulja



Umeritvena krivulja nam je dala povezavo med absorbanco in koncentracijo resveratrola v vzorcu. Na osnovi te smo določili neznane koncentracije RSV v nadaljnjih vzorcih.

- **DOLOČANJE VSEBNOSTI IN UČINKOVITOSTI VGRAJEVANJA
RESVERATROLA V TRDNE LIPIDNE NANODELCE**

Vsebnost in učinkovitost vgrajevanja RSV v SLN smo določili s pomočjo raztapljanja liofiliziranih ND v metanolu. Vzorce smo pripravili tako, da smo v 25 mL erlenmajerice natehtali po 2 mg liofilizata in dodali 5 mL metanola. Erlenmajerico smo opremili s poenostavljenim povratnim hladilnikom (skozi plutovinasti zamašek smo zvrtili luknjo in vanjo vstavili stekleno cevko), da smo preprečili izhlapevanje metanola. Tako opremljeno erlenmajerico smo za približno 45 minut postavili na vodno kopel, ki je bila ogreta na 80 °C. Nato smo disperzijo ohladili na sobno T, da se je lipid strdil, medtem ko je RSV ostal raztopljen v topilu. Nastalo disperzijo smo centrifugirali (4000 rpm, 15 min) in nato določili vsebnost RSV v supernatantu. Za merjenje absorbanc in nadaljni preračun koncentracij RSV, smo vzorce (supernatante) še toliko redčili z metanolom, da so bili odzivi znotraj umerjenega območja. Za vsako vrsto nanodelcev smo naredil dve paralelki.

Enačba 1: izračun vsebnosti RSV in enačba 2: izračun učinkovitosti vgrajevanja RSV

$$\text{Vsebnost RSV } \left(\% \frac{w}{w} \right) = \frac{\text{masa RSV v zatehtanih ND}}{\text{zatehtana masa ND}} * 100$$

$$\text{Učinkovitost vgrajevanja } \left(\% \frac{w}{w} \right) = \frac{\text{masa RSV v zatehtanih ND}}{\text{celotna količina RSV uporabljena za izdelavo ND}} * 100$$

- *SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV*

Sproščanje RSV iz ND smo spremljali z dializno metodo. Pri delu smo uporabili dializne membrane Spectra/Por® (Thomas scientific®, USA), s širino 75 mm, premerom 48 mm in MWCO (molecular weight cut-off) 12-14,000. V dializne vrečke, ki smo jih predhodno hidratirali, smo injicirali 2,5 mL pripravljene disperzije ND oz. RSV (preglednica III). Nato smo vrečke potopili v 100 mL dializnega medija. Medij smo mešali z magnetnim mešalom. Ob določenih časovnih intervalih smo odvzeli po 1,5 mL medija, ki smo ga analizirali na UV-VIS spektrofotometru ter tako določili količino sproščenega RSV. Odvzeti medij smo sproti nadomeščali z enako količino svežega medija. Dializni medij je bil sestavljen iz 0,65 % vodne raztopine Tweena , ki smo jo pripravili tako, da smo 13 g Tweena-80 raztopili v 1987 g destilirane vode.

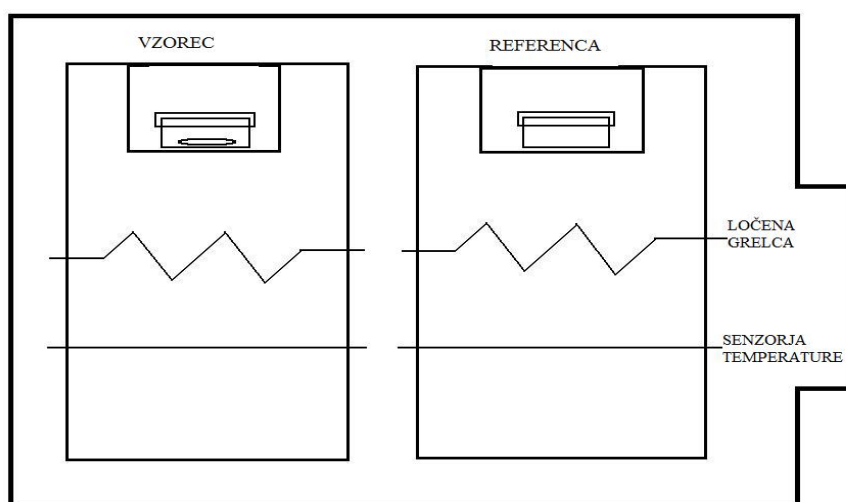
Preglednica III: Priprava disperzij za test sproščanja RSV iz ND

Sestava	SLN- RSV0	RSV	SLN- RSV1		SLN-RSV2		SLN- RSV3	
			čist	EtOH	čist	EtOH	čist	EtOH
Natehta SLN [mg]	5	3	5		5		5	
Dod.vode [mL]	5	15	5		5		5	

Čist = pri izdelavi ND smo uporabili RSV v obliki praška, EtOH = pri izdelavi ND smo uporabili etanolno raztopino RSV

3.1.4.3 TERMIČNA ANALIZA VHODNIH SUROVIN IN IZDELANIH TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Z diferenčno dinamično kalorimetrijo smo opazovali odziv izhodnih spojin in posameznih SLN na zunanji toplotni tok ter ugotavljali predvsem kristalinično oz. amorfno stanje posameznih komponent in interakcije med komponentami. V 40 μL aluminijske lončke smo natehtali od 1-3 mg izhodnih spojin in liofiliziranih ND. V drugo celico pa smo vstavili prazen aluminijski lonček, ki je služil kot referenca (slika 12). Nato smo lončke segrevali od 0 do 270 $^{\circ}\text{C}$ s hitrostjo 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ob hitrosti prepihanja z dušikom 15 mL/min. Vsak vzorec smo dvakrat segreli na 270 $^{\circ}\text{C}$, vmes pa smo ga ohladili na 0 $^{\circ}\text{C}$. Pri tem smo merili razliko v toplotnem toku, ki smo ga morali dovajati, da sta oba lončka dosegla isto temperaturo. Toplota, ki sta jo dovajala grelca, je sorazmerna dovedenemu električnemu toku.



Slika 12: Shema grelcev diferenčnega dinamičnega kalorimetra (21)

3.2 PROUČEVANJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV NA FIBROBLASTIH

Za delo na celicah smo uporabili tiste ND, ki so izkazovali najboljše lastnosti. To so bili nanodelci s srednjo koncentracijo RSV, ki smo ga pred vgrajevanjem raztopili v etanolu (SLN-RSV2 EtOH). Izbrani ND so imeli najprimernejšo velikost, polidisperzni indeks, zeta potencial, dobro so se redispergirali, vsebovali so visok odstotek ZU ter imeli primeren profil sproščanja ZU.

3.2.1 MATERIALI

- Celična linija dermalnih fibroblastov
- Reagenti za medij, presajanje, teste
- Steklenice za gojenje
- 15 in 30 mL centrifugirke
- Mikrotitrska plošča

3.2.2 APARATURE

- Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka (Iskra Pio, Slovenija)
- Svetlobni mikroskop CKX41 (Olympus, Japan) (slika 13)
- Fotoaparati (Olympus, Japan)
- Čitalec mikrotitrne plošče Safire 2 (Tecan, Švica)
- Različne pipete
- Centrifugirka Centric 322A (Tehtnica, Slovenija)
- Neubauerjeva komora (slika 14)
- Inkubator za celične kulture (Sanyo, Japan)
- Vodna kopel (Mettler, England)



Slika 11: Svetlobni mikroskop



Slika 12: Skica hemocitometra v Neubauerjevi komori

3.2.3 POSTOPEK GOJENJA FIBROBLASTOV

Učinek ND smo ugotavljali na celični kulturi fibroblastov. Fibroblaste smo gojili v steklenicah za gojenje celic ($S=75 \text{ cm}^2$) v prisotnosti rastnega medija. 50 mL tega medija je bilo sestavljenega iz 41 mL MEM medija (Minimum essential medium), 7,5 mL FBS (fetal bovine serum, Gibco® - Invitrogen, USA) 0,5 mL L-glutamina, 0,5 mL neesencialnih aminokislin (cistein, tirozi in glutamin) in 0,5 mL zmesi antibiotikov in antimikotikov. Ko so celice dosegle 70 % konfluentnost (opazovali smo jo pod svetlobnim mikroskopom), smo jih presadili v nove posode s svežim medijem.

POSTOPEK PRESAJANJA FIBROBLASTOV

Iz posode smo najprej odlili medij (celice so bile pritrjene, tako da so ostale v posodi). Posodo smo nato dvakrat sprali s po 3 mL PBSa in ga odlili. Celicam smo potem dodali tripsin in počakali nekaj minut, da so se odlepili od podlage (odlepljanje od podlage smo gledali pod mikroskopom). Ko so se celice odlepili, smo dodali 4,5 mL medija za fibroblaste, ki je deaktiviral tripsin. Odlepljene celice smo nato odpipetirali v 15 mL centrifugirke in jih centrifugirali 5 min pri 1200 vrtljajih/minuto. Supernatant smo zavrgli, celice pa dispergirali v mediju. Dispergirane celice smo prenesli v čiste steklenice za gojenje celic, v katere smo že pred tem dali 10 mL svežega medija. Celice smo inkubirali pri $T=37^{\circ}\text{C}$ in 5% CO_2 toliko časa, da so dosegle približno 70 % konfluentnost, nato smo jih spet presadili.

3.2.4 PRIPRAVA CELIC

Preden celice uporabimo v eksperimentalne namene, jih je potrebno še prešteti in jih nadalje v ustrezni koncentraciji nasaditi v primerne rastne pogoje. Število celic smo ugotavljali s pomočjo tripanskega modrila. To barvilo selektivno obarva mrtve celice (modro), žive pa ostanejo neobarvane.

Ko smo celice tripsinizirali in pripravili homogeno disperzijo celic iz nastalega sedimenta po centrifugiranju (glej prejšnje poglavje), smo 10 μL le-te odpipetirali in jo zmešali z 10 μL barvila. Nato smo vzorec nanесли na očiščeno Neubauerjevo komoro in s pomočjo svetlobnega mikroskopa določili število mrtvih in živih celic. Poskusi morajo biti namreč izvedeni z zdravo celično linijo, za katero je značilno, da mora biti živih vsaj 90 % celic.

Enačba 3: izračun volumna Neubauerjeve komore in enačba 4: izračun števila celic na volumsko enoto

$$\text{Volumen Neubauerjeve komore} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,0001 \text{ mL} = 10^{-4} \text{ mL}$$

Prešteli smo žive in mrtve celice v štirih poljih in določili količino celic v disperziji. Le-to smo nadalje ustrezno redčili tako, da je nastala koncentracija omogočala izvedbo celičnih eksperimentov.

3.2.5 DOLOČANJE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC

Za določanje

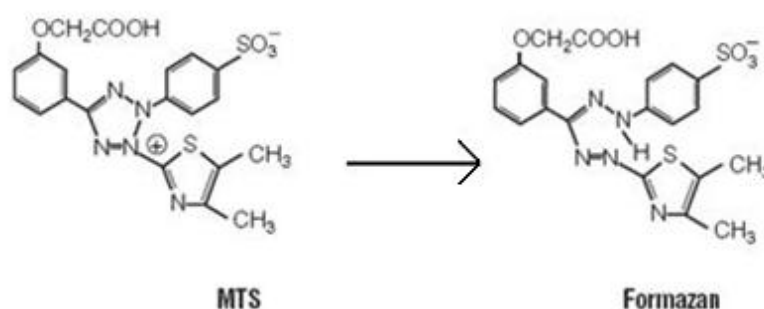
proliferacije celic smo

uporabili MTS test, kjer smo ugotavljali aktivnost mitohondrijske dehidrogenaze. To je kolorimetrična metoda. Raztopina MTS reagenta vsebuje 2 spojini: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-5-(3-carboksिमethoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol in elektrone povezujoči reagent fenazin etosulfat, ki izboljšuje kemijsko stabilnost reagenta v raztopini. MTS tetrazolijev

kompleks reducirajo žive celice v rdeče obarvan produkt, topen v celičnem mediju (slika 15). Pretvorbo omogočajo NADPH- ali NADH- dehidrogenazni encimi v metabolno aktivnih celicah.

Prednosti metode:

- enostavna (dodatek reagenta, inkubacija, merjenje absorbance)



- hitra (izognemo se izpiranju, lizi celic ter raztapljanju reagenta, kar je potrebno pri MTT testu)
- ni radioaktivna
- fleksibilna metoda (po merjenju absorbance lahko mikrotitrsko ploščo vrnemo v inkubator)
- varna (ni uporabe hlapnih topil za raztapljanje formazanovega produkta)

Slabosti metode:

- MTS reagent je občutljiv na svetlobo,
- pojavlja se nekaj spontane absorbance, ki je odvisna od pH medija, vrste seruma ter dolžine izpostavitve svetlobi,
- različna metabolna aktivnost posameznih tipov celic (slabo aktivne celice dajejo nižji signal, potrebujemo jih več)
- nekateri močni reducenti lahko zvišajo absorbanco ozadja

Izvedba testa:

Najprej smo si s pomočjo štetja celic v Neubauerjevi komori pripravili disperzijo celic v koncentraciji 1×10^5 celic/mL. V 96-vdolbinsko ploščo smo v 30 vdolbinic odpipetirali 100 μ L disperzije celic (rumena polja), v 30 vdolbinic pa smo dali 100 μ L medija za fibroblaste (zelena polja) (slika 16).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Kontr	s-r10	s-r100	r10	r100	Kontr	s-r10	s-r100	r10	r100	
C		Kontr	s-r10	s-r100	r10	r100	Kontr	s-r10	s-r100	r10	r100	
D		Kontr	s-r10	s-r100	r10	r100	Kontr	s-r10	s-r100	r10	r100	
E		Sln250	s-r50	s-r250	r50	r250	Sln250	s-r50	s-r250	r50	r250	
F		Sln250	s-r50	s-r250	r50	r250	Sln250	s-r50	s-r250	r50	r250	
G		Sln250	s-r50	s-r250	r50	r250	Sln250	s-r50	s-r250	r50	r250	
H												

Slika 146: Skica 96-vdolbinske plošče

Naslednji dan, ko so se celice pritrdile, smo v vdolbinice dodali še 10 μ L vzorcev:

- Kontr = 10 μ L destilirane vode
- Sln250 = 10 μ L praznih SLNjev, ki ustrezajo količini, dani za SLN-RSV 250
- s-r10 = 10 μ L SLN-RSV, da je bila v 110 μ L koncentracija RSV 10 μ M
- s-50 = 10 μ L SLN-RSV, da je bila v 110 μ L koncentracija RSV 50 μ M

- s-r100 = 10 µL SLN-RSV, da je bila v 110 µL koncentracija RSV 100 µM
- s-r250 = 10 µL SLN-RSV, da je bila v 110 µL koncentracija RSV 250 µM
- r10 = 10 µL RSV (raztopina RSV v etanolu), da je bila v 110 µL koncentracija RSV 10 µM
- r50 = 10 µL RSV (raztopina RSV v etanolu), da je bila v 110 µL koncentracija RSV 50 µM
- r100 = 10 µL RSV (raztopina RSV v etanolu), da je bila v 110 µL koncentracija RSV 100 µM
- r250 = 10 µL RSV (raztopina RSV v etanolu), da je bila v 110 µL koncentracija RSV 250 µM (slika 16)

Pripravili smo dve 96-vdolbinski plošči in tako opazovali proliferacijo celic po 24 in 48 urah inkubacije z vzorci. Po končanem tretiranju smo celicam dodali 10 µL MTS reagenta. Po dveh urah smo izmerili absorbance v posameznih vdolbinicah pri 492 nm in iz meritev izračunali proliferacijo celic v koncentracijski in časovni odvisnosti.

Enačba 5: izračun proliferacije

$$Proliferacija = \frac{A_{vzorca} - A_{kontrola\ vzorca}}{A_{kontrola} - A_{kontrola\ kontrole}}$$

3.2.6 RAST IN MORFOLOGIJA TRETIRANIH CELIC

Vpliv posameznih vzorcev se lahko velikokrat opazi tudi na makroskopskem nivoju, zato smo celice, tretirane po zgoraj opisanem postopku, pred dodatkom MTS reagenta še slikali. 96-vdolbinsko ploščo smo postavili pod objektiv svetlobnega mikroskopa (slika 21) in s pomočjo fotoaparata, pritrjenega na mikroskop, slikali posamezne celice. S primerjavo slik smo ocenili koncentracijski in časovni vpliv ND in RSV na rast celic ter njihovo obliko oz. grobo morfologijo.

4 REZULTATI Z DISKUSIJO

4.1 FIZIKALNE LASTNOSTI TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

S postopkom dispergiranja taline lipida z rotor-stator homogenizatorjem smo izdelali SLN z različnimi koncentracijami RSV. Za izdelavo smo uporabili Compritol® 888 ATO, Lutrol® F68, Phospholipon® 90H, prečiščeno vodo in ZU (RSV v obliki praška ali etanolne raztopine). S povečevanjem mase RSV v ND smo zmanjševali maso lipida (Compritol® 888 ATO), medtem ko smo mase ostalih sestavin ohranjali nespremenjene.

4.1.1 VELIKOST TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV V ODVISNOSTI OD KOLIČINE RESVERATROLA

V primeru, ko je bil masni delež RSV 4 % oz. 8 % (SLN-RSV1 in SLN-RSV1 EtOH ter SLN-RSV2 in SLN-RSV2 EtOH), RSV ni motil nastajanja ND, saj so bili izmerjeni parametri v območju vrednosti, ki smo jih določili za prazne SLN (SLN-RSV0). Tako se je velikost gibala od 125,4 nm do 249,9 nm. Nasprotno pa so pri najvišji masi RSV (SLN-RSV3 in SLN-RSV3 EtOH) nastali občutno večji ND s slabšimi lastnostmi (večja velikost ND, absolutno manjši zeta potencial, večji PDI). Pri teh SLN je količina samega lipida premajhna, količina RSV pa previsoka, da bi nastalo majhno lipidno

jedro, kjer je osnova sam lipid, v katerem je homogeno porazdeljen RSV. Glede na dobljene meritve lahko sklepamo, da se je nekaj RSV adsorbiralo tudi na površino ND ali pa je ostal samostojen in morebiti samo obdan s stabilizatorji, saj je ostalih osnovnih gradnikov za ND (fosfolipida, poloksamera) prisotnih v nespremenjeni količini.

4.1.2 ZETA POTENCIAL TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV V ODVISNOSTI OD KOLIČINE RESVERATROLA

Opazi se trend padanja zeta potenciala z naraščanjem količine RSV. Vzrok temu je zmanjševanje količine lipida (gliceril behenata), v katerem so v majhnem deležu prisotne tudi proste maščobne kisline, katere prispevajo en del negativnega naboja

4.1.3 VELIKOST TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV V ODVISNOSTI OD KOLIČINE RESVERATROLA, DODANEGA Z ETANOLNO RAZTOPINO

Prav tako je opaziti, da na kakovost ND vpliva tudi količina etanola, ki je dodan z etanolno raztopino RSV. V primeru najmanjše količine RSV (SLN-RSV1 in SLN-RSV1 EtOH) se izoblikujejo dvakrat manjši ND, ko je RSV dodan v obliki etanolne raztopine, kot takrat, ko je dodan v obliki praška.

V naslednjih dveh primerih, ko je koncentracija RSV višja, pa je velikost ND, kjer je RSV dodan v obliki etanolne raztopine, precej večja od ND, kjer je RSV natehtan. Sklepamo lahko, da izredno majhna količina etanola dobro prerazporedi komponente ND in omogoči nastanek izredno majhnih ND. Opisano prisotnost etanola bi lahko primerjali z majhno količino elektrolita, ki ustvari ravno pravšnje odbojne sile, ter omogoči lepo redispergiranje, medtem ko previsoka količina elektrolita sproži agregacijo.

Pri SLN-RSV2 EtOH količina etanola ni imela velikega vpliva na oblikovanje nanodelcev, saj so izmerjene lastnosti primerljive s praznimi nanodelci. Nasprotno pa v primeru natehtanega RSV k majhnosti nastalih ND (SLN-RSV2) prispeva dobro razmerje med lipidom in RSV, saj najverjetneje nastane tekoča disperzija, ko se RSV raztopi v staljenem lipidu. Nazadnje pa pri vzorcu SLN-RSV3 EtOH etanol najverjetneje ni popolnoma izhlapel, zaradi česar so sestavine ND ostale v etanolnem mediju in posledično prispevale k visokim vrednostim velikosti (preglednica IV).

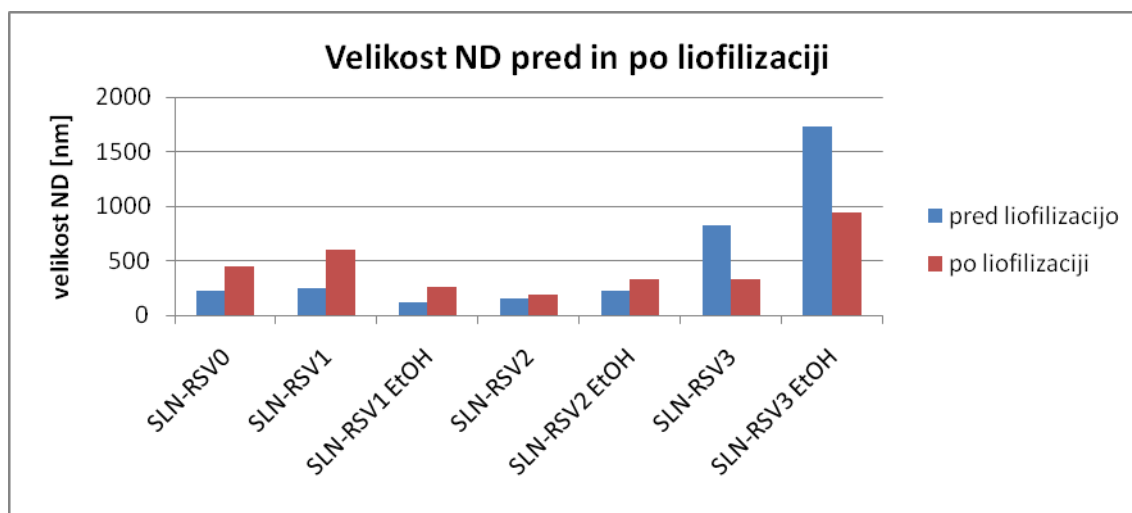
Preglednica IV: Fizikalne lastnosti različnih SLN

Vrsta ND	Velikost [nm]	PDI	ZP [mV]
SLN-RSV0	222,13 ± 51,7	0,55 ± 0,25	-17,68 ± 7,88
SLN-RSV1	249,9 ± 15,7	0,69 ± 0,38	-16,4 ± 7,65
SLN-RSV1 EtOH	125,35 ± 2,8	0,514 ± 0,04	-16,9 ± 1,5
SLN-RSV2	153,1 ± 38,2	0,484 ± 0,03	-13,4 ± 1,1
SLN-RSV2 EtOH	226,8 ± 17,1	0,514 ± 0,61	-16,2 ± 1,5
SLN-RSV3	822,3 ± 618,9	0,531 ± 0,14	-6,9 ± 2,6
SLN-RSV3 EtOH	1736,4 ± 647,0	0,612 ± 0,24	-5,8 ± 1,8

4.1.4 VPLIV LIOFILIZACIJE NA VELIKOST ND

Pripravljene disperzije SLN smo pretvorili v suho obliko s postopkom liofilizacije. Nastalo suho zmes smo redispergirali v vodi s pomočjo ultrazvočne kadičke. Najustreznejši čas redispergiranja ND je precej težko določiti, saj lahko s podaljševanjem le-tega sprožimo tudi veliko povečevanje/agregiranje ND. Z namenom čim bolj se približati velikosti ND pred liofilizacijo, smo vse vzorce redispergirali 21 minut, razen vzorca SLN-RSV1 EtOH, ki smo ga redispergirali 16 minut. Večina ND je imelo po redispergiranju nekoliko slabše lastnosti (graf 2).

Graf 2: Velikost ND pred in po liofilizaciji



Pri SLN z nižjimi vsebnostmi RSV (SLN-RSV0, SLN-RSV1, SLN-RSV1 EtOH, SLN-RSV2 in SLN-RSV2 EtOH), smo po redispergiranju dobili večje delce. Vzrok za to bi

lahko bile močne hidrofozne povezave med površinami ND, ki niso popolnoma zaščitene s stabilizatorji. K povečanju velikosti ND bi lahko prispeval tudi stabilizator (poloksamer), ki bi se lahko prerazporedil in usmeril svoje dolge hidrofilne verige navzven v medij in tako prispeval k spremembi velikosti. Pri SLN z najvišjo vsebnostjo RSV (SLN-RSV3 in SLN-RSV3 EtOH) smo po liofilizaciji izmerili veliko manjše velikosti ND. Pri teh SLN je zaradi velike količine RSV verjetno prišlo do nastajanja agregatov RSV, ki smo jih z redispergiranjem v ultrazvočni kadički uspeli razbiti. Mislim, da samih SLN z uporabljenim postopkom redispergiranja ne bi mogli kar tako zmanjšati za več kot polovico (graf 2).

4.2 VSEBNOST RESVERATROLA V TRDNIH LIPIDNIH NANODELCIH

Izdelanim ND smo poleg fizikalnih lastnosti določili tudi vsebnost RSV (učinkovitost vgrajevanja RSV).

Iz nateht posameznih sestavin smo preračunali teoretično vsebnost RSV v SLN, medtem ko smo dejansko vsebnost ugotovili s praktičnim postopkom raztapljanja SLN v metanolu (glej 3.1.4 *VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV*).

Rezultati kažejo, da se v primerih, kjer je bil RSV dodan v obliki etanolne raztopine, dejanska vsebnost najbolj približa teoretični vsebnosti in da je učinkovitost vgrajevanja najbolj blizu 100 %. Etanolna raztopina RSV je molekularna disperzija, ki kot takšna omogoči boljše pomešanje RSV z ostalimi komponentami ND in tako se RSV v večji meri zadrži v nanodelcih ali tudi na njihovi površini. Nasprotno pa se natehtan RSV deloma porazdeli v mešanico ostalih sestavin, deloma pa ostane v vodni fazi (RSV je topen v vodi, topnost = 0,03 g/L), kar prispeva k slabšim rezultatom vsebnosti in učinkovitosti vgrajevanja. Vpliv topnosti RSV v vodi, na učinkovitost vgrajevanja, je največji pri najnižji koncentraciji RSV, kar potrjuje tudi rezultat učinkovitosti vgrajevanja pri SLN-RSV1. V vseh primerih pa k slabšim rezultatom prispeva tudi dejstvo, da je RSV občutljiv na svetlobo, saj smo celoten postopek določanja količine vgrajenega RSV delali na dnevni svetlobi. K nepravilnim rezultatom pa bi lahko prispevala tudi uporabljena oprema, saj smo za določanje vsebnosti RSV uporabili poenostavljen povratni hladilnik (plutovinast zamašek, skozi katerega smo zvrtili luknjo

in vanjo vstavili stekleno cevko), ki mogoče ni popolnoma preprečil izhlapevanje metanola (preglednica V).

Preglednica V: Vsebnosti resveratrola in učinkovitosti vgrajevanja RSV v SLN

	Vsebnost ZU (%w/w)		Učinkovitost vgrajevanja (%)
	Teoretična	Dejanska	
SLN-RSV1	4,84	2,24	46,4
SLN-RSV1 EtOH	4,95	4,44	89,7
SLN-RSV2	9,84	5,64	57,3
SLN-RSV2 EtOH	9,68	9,04	93,4
SLN-RSV3	19,9200	9,9345	49,872
SLN-RSV3 EtOH	19,7130	19,1257	97,036

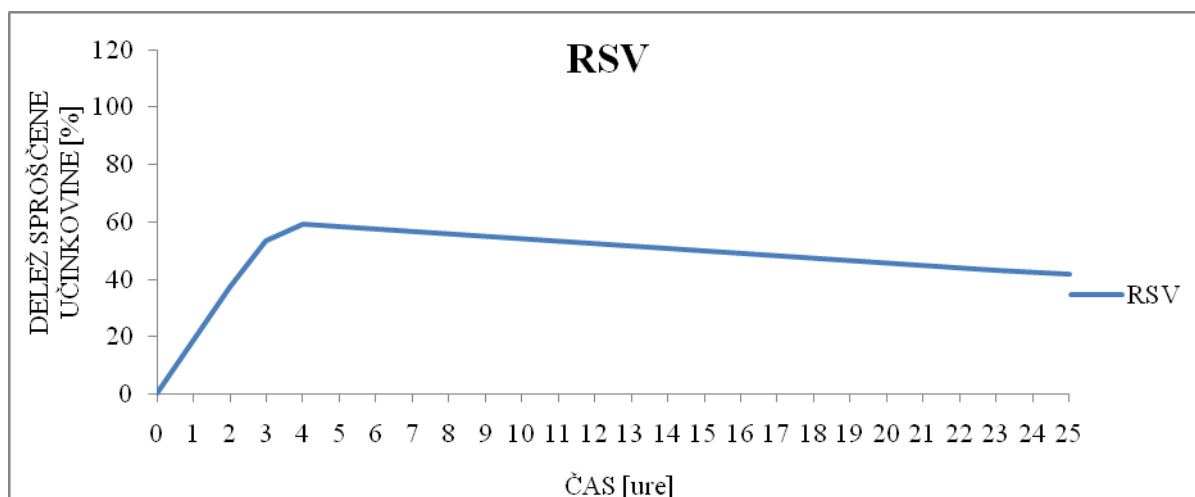
4.3 SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Eden od razlogov vgrajevanja RSV v ND je tudi možnost doseganja počasnega sproščanja RSV iz ND. Kot je razvidno iz profilov sproščanja, smo v določenih primerih ta namen dosegli. Za vsako vrsto izdelanih ND smo naredili po dve paraleli. Odstopanja znotraj iste vrste ND so lahko posledica priprave in izvedbe same dialize. Vzorce smo injicirali v dializno vrečko s pomočjo injekcijske brizge, zato volumen injiciranja ni bil natančno 2,5 mL. Dializni medij v čaši ni bil vedno najboljše premešan, ker so se magneti, s katerimi smo mešali medij, pogosto zatikali ob dializno vrečko.

Zaradi vrtenja same dializne vrečke je bilo tudi jemanje vzorcev iz čaše vedno iz istega mesta nemogoče. Nenazadnje so lahko odstopanja tudi posledica zamašenih por v membrani (dializni vrečki). Ker smo tudi pri SLN-RSV0 izmerili absorbanco pri valovni dolžini 306 nm, lahko sklepamo, da so v ND komponente, ki vsaj malo absorbirajo tudi pri tej valovni dolžini, vendar je ta absorbanca zanemarljivo majhna.

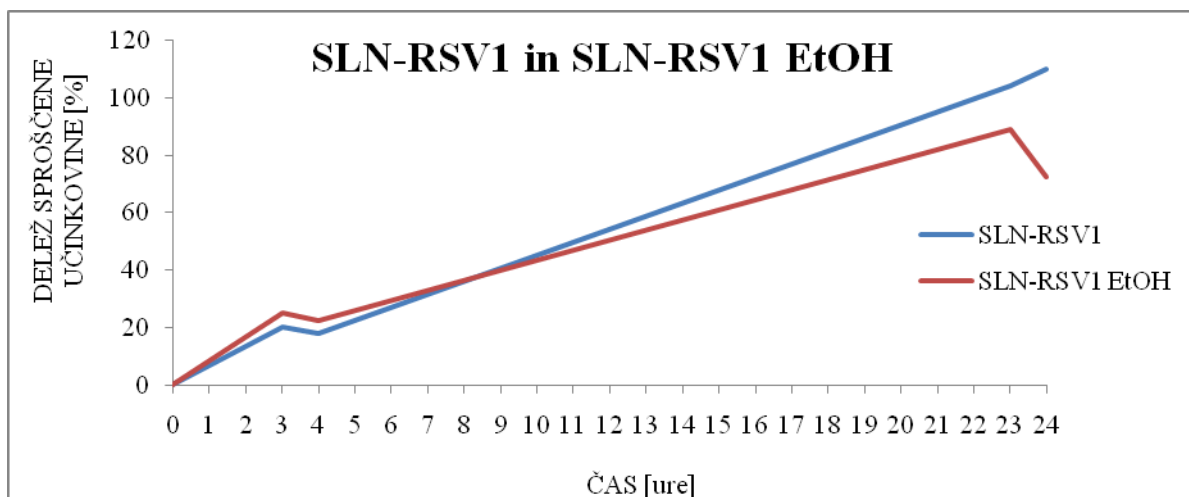
Profil sproščanja samega RSV (graf 3) nam kaže hiter porast koncentracije znotraj 4 ur, ko se sprosti 60 % začetne količine. Nadaljnjega sproščanja ni zaznati, kar je verjetno posledica nastalih agregatov RSV, ki ne preidejo skozi pore dializne vrečke. Po 4 urah nastopi celo padec koncentracije RSV, kar je verjetno posledica občutljivosti RSV na svetlobo. Iz teh rezultatov lahko nadalje upoštevamo, da se nevezani RSV sprosti iz disperzije znotraj štirih ur.

Graf 3: Profil sproščanja samega RSV



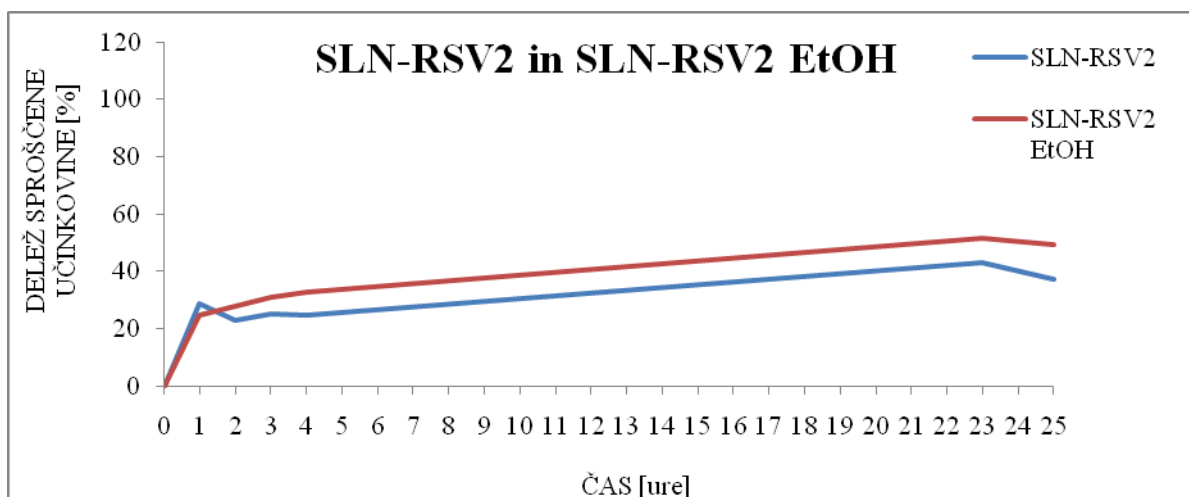
Pri SLN-RSV1 in SLN-RSV1 EtOH (graf 4) se znotraj 4 ur sprosti okrog 25 % RSV, kar predstavlja nevezani RSV, oz. RSV, ki je bil prisoten na površini ND in se je ob pripravi disperzije hitro sprostil. V nadaljnjih 20 urah se je iz ND postopoma sprostil skoraj še ves preostali RSV. V primeru SLN-RSV1 je količina sproščenega RSV celo rahlo presegla 100 %, kar je verjetno posledica injiciranja večjega volumna od 2,5 mL. Zaradi nizkih koncentracij RSV bi lahko v tem primeru k prekoračitvi 100 % prispevale tudi ostale komponente, saj smo s slepim vzorcem pokazali, da so v ND poleg RSV še druge komponente, ki rahlo absorbirajo pri valovni dolžini, ki smo jo uporabili (graf 3).

Graf 4: Profil sproščanja RSV iz SLN-RSV1 in SLN-RSV1 EtOH



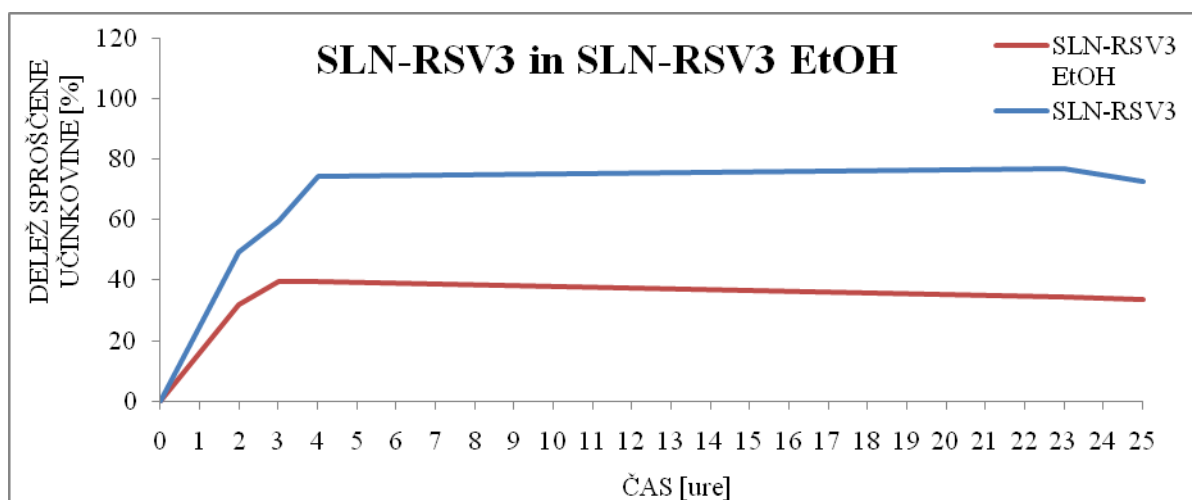
Pri SLN-RSV2 (graf 5) je prav tako značilna 25 % sprostitve RSV v prvih 4 urah. Nato pa se v naslednjih 20 urah sprosti še 20 % RSV. Nasprotno pa v primeru SLN-RSV2 EtOH (graf 5) koncentracija RSV postopno narašča že od samega začetka in v času 24 ur se sprosti okrog 50 %. To je najverjetneje posledica majhnega zaostanka etanola v nanodelcih, ki pripomore k enostavnejšemu in postopnemu sproščanju RSV iz ND in tako ne nastopijo ovire pri prehodu skozi pore dializne membrane. Kakorkoli, trend profilov je tako za SLN-RSV2 kot tudi za SLN-RSV2 EtOH naraščajoč, zato lahko predpostavimo, da se sproščanje iz teh ND še nadaljuje. Ob predpostavki, da ostane kinetika sproščanja enaka, lahko pričakujemo, da bo RSV popolnoma sproščen v nadaljnjih dveh dneh.

Graf 5: Profil sproščanja RSV iz SLN-RSV2 in SLN-RSV2 EtOH



Pri SLN-RSV3 in SLN-RSV3 EtOH (graf 6) koncentracija RSV v prvih 3 urah zelo hitro naraste, nato pa se le še malo spreminja. Hiter začetni dvig koncentracij je verjetno posledica sproščanja RSV s površine ND. Nadaljnjega sproščanja RSV iz teh ND ni bilo zaznati. Verjetno je prispevek le-tega tako majhen, da RSV hitreje razpade na svetlobi, prav tako pa se lahko sproščanje zaustavi tudi zaradi prevelikih agregatov samega RSV ter nenazadnje tudi zaradi zamašitve por v membrani.

Graf 6: Profil sproščanja RSV iz SLN-RSV3 in SLN-RSV3 EtOH



Pri nobenem vzorcu, razen pri SLN-RSV1, nismo dosegli 100 % sprostitve RSV. Vzrokov za to je lahko več. Eden od vzrokov bi bil lahko ta, da se RSV iz ND sprošča tako počasi, da bi morali sproščanje izvajati dalj časa. Začetni dializni medij smo odmerili z merilnim valjem, disperzijo ND pa z injekcijsko brizgo, zaradi česar volumni niso bili povsem natančno odmerjeni. Del RSV bi se lahko vezal tudi na dializno membrano ali pa na stene posode. Za test sproščanja smo uporabili že pred tem liofilizirane ND, ki izkazujejo slabše lastnosti od sveže narejenih. K nižjim deležem sproščenega RSV pa zagotovo prispeva tudi fotosenzibilnost RSV, saj čaše z vzorci niso bile zaščitene pred svetlobo.

4.4 TERMIČNA ANALIZA POSAMEZNIH KOMPONENT IN TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Z uporabo DSC aparata smo z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije najprej analizirali posamezne sestavine naših ND, nato pa še prazne SLN (SLN-RSV0) ter ND z RSV, ki so izkazovali najboljše lastnosti (SLN-RSV2 in SLN-RSV2 EtOH). Opazovali smo obliko nastalih krivulj in nastale vrhove, ki nam povejo temperaturo tališča in entalpijo. Metoda je uporabna za določanje interakcij med sestavinami ter tudi kristaliničnosti ali amorfности in drugih struktur, v katerih se te snovi nahajajo. Z DSC krivuljami lahko razložimo ali potrdimo številne rezultate, ki smo jih dobili z drugimi metodami.

4.4.1 TERMIČNA ANALIZA POSAMEZNIH KOMPONENT

Naredili smo termično analizo vseh komponent. Pri Compritolu in RSV smo opazili en signal. Pri analizi Lutrola smo opazili glavni signal pri 54,28 °C in manjši signal pri 101,22 °C. Vzrok za to je lahko ta, da obstajata dve polimorfni modifikaciji. Pri Phospholiponu pa smo opazili enega glavnega in dva manjša signala. Verjetno gre tudi v tem primeru za različne polimorfne modifikacije (preglednica VI).

Preglednica VI: Rezultati termičnih analiz posameznih komponent

	Onset [°C]	Peak [°C]	Entalpija [mJ]
Compritol	68,70	71,35	-277,92
Resveratrol	266,06	267,64	-156,29
Lutrol	52,33	54,28	-426,20
	99,83	101,22	-32,18
Phospholipon	67,39	69,27	-3,58
	114,28	121,22	-197,36
	174,99	178,71	-16,30

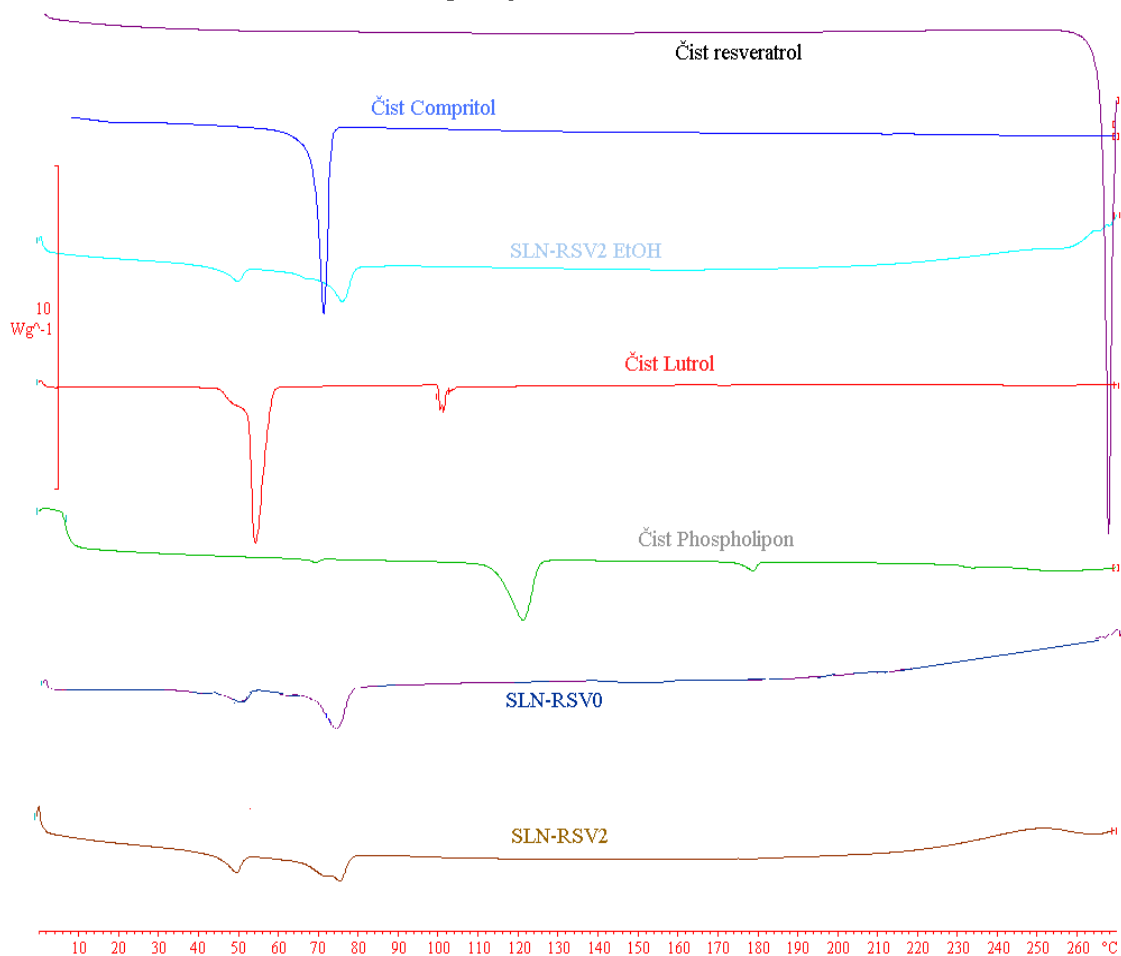
4.4.2 TERMIČNA ANALIZA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

DSC krivulja samega RSV ima tališče pri okrog 266 °C. Omenjeni talilni vrh RSV v primeru ND, ki vsebujejo RSV, izgine. Iz tega lahko sklepamo, da je med izdelavo ND prešel RSV v amorfno obliko. V takšni obliki se RSV tudi lažje raztaplja in postopoma sprošča iz izdelanih ND.

Pri DSC termogramih vseh treh vrst nanodelcev je opaziti dva signala. Prvi ostaja med posameznimi ND precej podoben (okrog 49 °C) in nakazuje na poloksamer, ki ima vlogo stabilizatorja pri SLN in za katere je v splošnem značilno, da se njihovo tališče zniža (v našem primeru z 54 °C na okrog 49 °C), ko je prisoten v strukturi ND. V splošnem znižanje tališča ene komponente v DSC krivulji nakazuje na interakcije med trdnimi snovmi, in sicer večje kot je znižanje, večje so interakcije.

Drugi signali (pri okrog 75 °C) so mnogo širši, znotraj njih pa je možno zaslediti še manjše signale. Manjši signali so lahko posledica različnih polimorfnih modifikacij. Položaj teh signalov najbolje ustreza signalu čistega Compritola, medtem ko signalov, ki bi ustrezali Phospholiponu, v termogramih nismo opazili. V primerjavi s samim Compritolom je drugo talilno območje, ki je primerljivo z lipidom, pri ND nekoliko višje (z 71 na 73). Dodatno se ta talilni vrh dvigne za okoli 3 °C (iz 73 °C na 76 °C) pri tistih ND, ki vsebujejo RSV, za kar verjetno poskrbi amorfna oblika RSV. Dozdajšnja okarakterizacija SLN-RSV2 kaže na nastanek tekoče disperzije med lipidom in RSV, kar najverjetneje povzroči, da se drugi vrh (okoli 75 °C) razdeli v dva signala. Velika podobnost med praznimi SLN (SLN-RSV0) in SLN, kjer je bil RSV dodan z etanolno raztopino (SLN-RSV2 EtOH), še dodatno potrjuje, da etanol v postopku izdelave skoraj popolnoma izhlapi in tako ne vpliva signifikantno na nastalo strukturo ND (slika 17 in preglednica VII).

SLN-RSV0, SLN-RSV2, SLN-RSV2 EtOH 1.segrevanje



Slika 157: DSC-termogram SLN-RSV0, SLN-RSV2, SLN-RSV2 EtOH in vseh komponent

Preglednica VII: Primerjava temperatur tališč čistih komponent s komponentami v SLN

	RESVERATROL		COMPRITOL		PHOSPHOLIPON		LUTROL	
	Onset [°C]	Peak [°C]	Onset [°C]	Peak [°C]	Onset [°C]	Peak [°C]	Onset [°C]	Peak [°C]
ČIST	266,06	267,64	68,70	71,35	67,39 114,28 174,99	69,27 121,22 178,71	52,33 99,83	54,28 101,22
SLN-RSV0	signal se ne pojavi		68,25	73,43	signal se ne pojavi		43,76	49,15
SLN-RSV2	signal se ne pojavi		69,66	75,79	signal se ne pojavi		45,62	49,96
SLN-RSV2	signal se ne pojavi		71,91	76,06	signal se ne pojavi		45,37	49,78

EtOH						
------	--	--	--	--	--	--

4.5 VPLIV TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z RESVERATROLOM NA FIBROBLASTE

Za delo na celicah smo izbrali SLN-RSV2 EtOH, ker so izmed vseh izdelanih ND izkazovali najboljše fizikalne lastnosti in imeli najustrežnejši profil sproščanja RSV.

Sinovijski fibroblasti so med poglavitnimi celicami, ki so odgovorne za proces vnetja in nenadzorovano napredovanje RA. Zaradi tehničnih in finančnih razlogov smo za naše delo namesto sinovijskih fibroblastov uporabili dermalne fibroblaste.

Fibroblaste smo inkubirali z različnimi koncentracijami RSV, samega ali pa vgrajenega v ND. Kontrolni vzorci niso bili tretirani. Po 24 in 48 urah smo celice poslikali in jim določili metabolno aktivnost, ki odraža proliferacijo oz. živost celic.

V splošnem so rezultati odsev prenosa RSV na določeno mesto v celicah. Nanodelci so koloidni nosilci, ki so sposobni preiti celično membrano in prenesti vsebujočo učinkovino (v našem primeru RSV) na znotrajcelično mesto. Čeprav je sproščanje RSV iz nanodelcev upočasnjeno, lahko RSV kljub temu hitro zasede aktivno mesto in tako sproži ali prepreči določene celične procese. Na drugi strani pa sam RSV, ki je dodan k celicam kot takšen – »farmacevtsko nepreoblikovan« oz. nevgrajen v kakšen koloidni sistem, deluje na celični površini ali pa mora za doseganje znotrajceličnih učinkov preiti najprej celično membrano in nato zasedi aktivno mesto, kjer posreduje svoj učinek. Zato so v tem primeru vidni učinki na celicah nekoliko zakasneni, v okrnjeni ali ojačani obliki ali pa so celo popolnoma drugačni, kot jih povzroči s koloidnim sistemom (SLN) vnešen RSV.

Visoko biološko uporabnost RSV vgrajenega v SLN so dokazali tudi v raziskavi, kjer so s pomočjo fluorescenčnega slikanja pod mikroskopom dokazali, da SLN z RSV, ki so manjši od 180 nm, zagotovo prehajajo celično membrano in se porazdelijo po citosolu. Primerjali so tudi učinkovitosti RSV vgrejenega v SLN in RSV v obliki raztopine. Dokazali so, da je RSV vgrajen v SLN učinkovitejši (citostatični efekt je bolj izražen), prav tako pa pri RSV vgrajenemu v SLN ni opaziti citotoksičnosti, ki je pri RSV v obliki raztopine izražena (27).

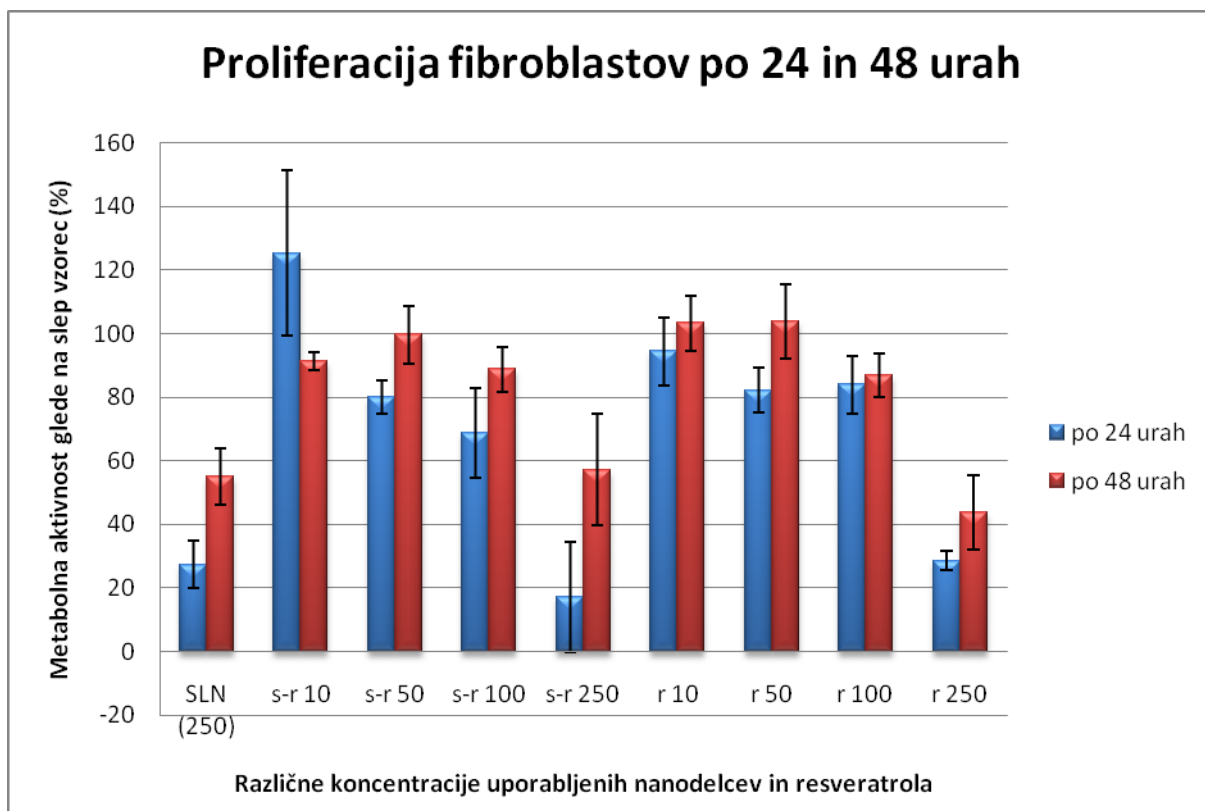
V diplomski nalogi smo se osredotočili predvsem na potencialno uporabnost RSV pri terapiji RA, njegovo pomembnost pa so potrdili tudi v raziskavi, kjer so dokazali, da je RSV učinkovit inhibitor NF- κ B, ki pomembno prispeva k vnetju pri RA (28).

4.5.1 METABOLNA AKTIVNOST FIBROBLASTOV V PRISOTNOSTI SLN-RSV0, SLN-RSV2 EtOH IN RSV

Metabolna aktivnost celic, po dodatku RSV z nanodelci, je bila v vseh primerih primerljiva s kontrolo (100 %) ali nižja od le-te (graf 7). Od tega so odstopale samo celice, ki so bile tretirane z vzorcem s-r 10. V tem primeru je koncentracija RSV v celicah izredno majhna in ravno ta minimalna količina RSV se je izkazala kot izredno stimulativni agens. Posledično je metabolna aktivnost teh celic v prvih 24 urah prekoračila metabolno aktivnost kontrolnih celic. Nasprotno pa vsi preostali vzorci, kjer je RSV dodan z nanodelci, sprožijo v 24 urah padec metabolne aktivnosti, ki se z večanjem koncentracije RSV pogloblja. V nadaljnjih 24 urah, torej po 48 urah, pa izgleda, da si celice večinoma opomorejo, saj se njihova metabolna aktivnost približa kontrolnim vrednostim. Nekoliko večje odstopanje v metabolni aktivnosti nastopi pri vzorcu z najvišjo koncentracijo RSV, dodanega s SLN (s-r 250), a je dobljeni rezultat najverjetneje posledica samih ND, ki motijo meritev in tako prikrivajo realno stanje.

Pri celicah, tretiranih z vzorcema r 10 oz. r 50, je zaustavitev proliferacije bolj šibka, sledi pa prav tako okrevanje celic in porast metabolne aktivnosti na kontrolno raven. Nasprotno pa višji koncentraciji RSV (vzorca r 100 in r 250) že izkazujejo nekaj vidnih učinkov na celice. Pri vzorcu r 100 se metabolna aktivnost ustavi na okrog 80 % kontrolne aktivnosti in na tej točki ostanejo celice tudi po 48 urah. Meritev potrjujejo tudi slike celic. Dobljeni rezultati kažejo zaustavitev rasti celic, ki so bile izpostavljene vzorcu r 100. Prvi citotoksični učinki so opazni pri vzorcu r 250. Metabolna aktivnost teh celic močno pade (na okrog 30 % glede na kontrolo) in tudi v nadaljnjih 24 urah si celice le malo opomorejo. V tem primeru je dobljena meritev odraz realnega stanja saj so celice precej redke, prisotne pa so tudi odlepljene in okrogle celice (slika 27).

Graf 7: Metabolna aktivnost fibroblastov po 24 in 48 urah

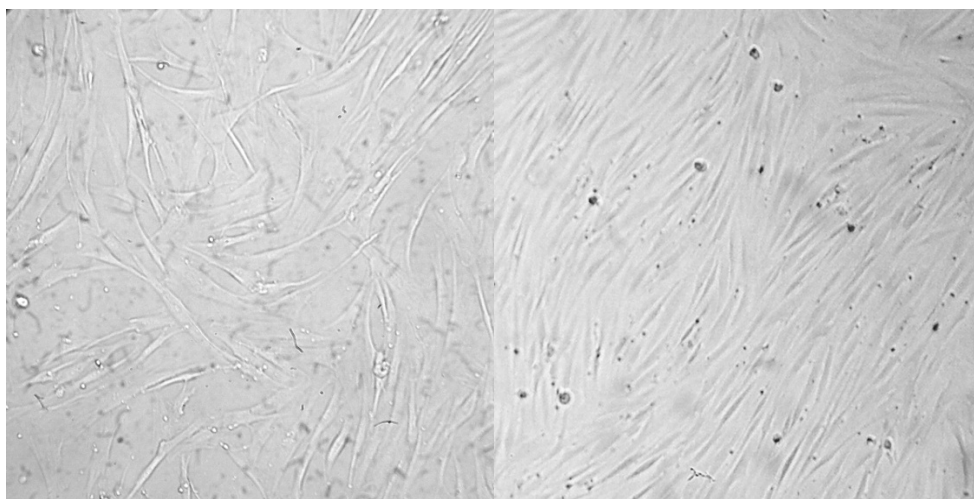


4.5.2 MORFOLOŠKE SPREMEMBE FIBROBLASTOV V PRISOTNOSTI SLN-RSV0, SLN-RSV2 EtOH IN RSV

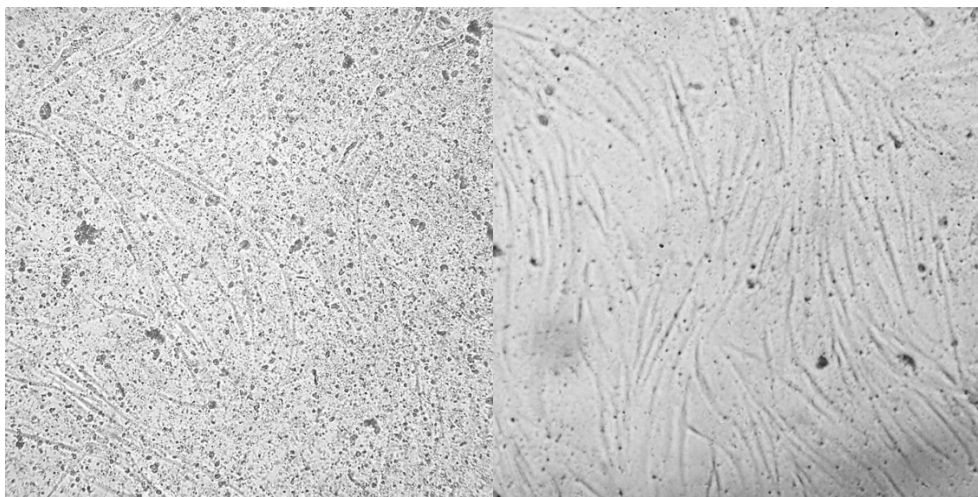
Morfološke spremembe celic smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom (Olympus, Japan). Po dodatku RSV z ND na celicah ni opaziti morfoloških sprememb. Poraščenost je podobna poraščenosti kontrolnega vzorca, kar dokazuje, da ni bilo citotoksičnih vplivov na celice. Pri vzorcu s-r 10 je po 24 urah (slika 20), v primerjavi s kontrolnim vzorcem (slika 18), prišlo celo do rahlega povečanja poraščenosti, kar nakazuje, da minimalna količina RSV deluje stimulatивно. Pri vzorcu s-r 250 smo zabeležili velik padec metabolne aktivnosti, kljub temu, da ni opaziti morfoloških sprememb (slika 23). Navidezno zmanjšana metabolna aktivnost celic je verjetno posledica samih ND, ki motijo meritev. To nam potrjuje tudi kontrola samih ND (vzorec SLN 250), kjer je končni rezultat precej primerljiv z rezultatom pri vzorcu s-r 250, tako v metabolni aktivnosti kot tudi samem izgledu celic (sliki 19 in 23). Le-ta je namreč precej podoben

kontrolnim celicam, tako po obliki, morfologiji in zasedenosti rastne površine. Opaziti ni nobenega citotoksičnega učinka, kot so npr. redkejša poraščenost, okrogle celice ali odlepljenost celic. Iz tega torej sklepamo, da dejansko stanje v celični kulturi ob prisotnosti visoke koncentracije RSV, dodanega s SLN (vzorec s-r 250), vseeno ni tako dramatično kot kaže kolorimetrična meritev.

Pri celicah, ki smo jih tretirali s samim RSV koncentracije 10 μM in 50 μM , pod mikroskopom ni opaziti vidnih sprememb. Celice so lepo razraščene po rastni površini in imajo obliko, značilno za normalne, zdrave celice (sliki 24 in 25). Pri višjih koncentracijah se pa že pojavljajo vidne spremembe. Pri vzorcu r 100 je po 48 urah opaziti nekoliko redkejšo poraščenost, vendar pa morfološko spremenjenih ali pa odlepljenih celic ni opaziti (slika 26). Pri najvišji koncentraciji dodanega RSV (vzorec r 250) po 24 urah opazimo morfološko spremenjene celice, ki si tudi po dodatnih 24 urah ne opomorejo (slika 27). Celice so redkejše, krajše, zaobljene, nekatere so že odlepljene. Torej ima RSV v tako visoki koncentraciji poleg citostatičnega (zaustavitev proliferacije) tudi citotoksičen učinek. Možni vzroki so umeščanje RSV v celično membrano, kar jo razrahlja in povzroči uničenje celice. Lahko se sproži tudi nenadzorovana radikalna reakcija pri kateri je lahko RSV uspešen pospeševalec. Nenazadnje pa lahko visoke količine znotrajceličnega RSV zasedejo najrazličnejša aktivna mesta, med katerimi so nekatera tudi povezana s celično smrtjo (nekroza, apoptoza).



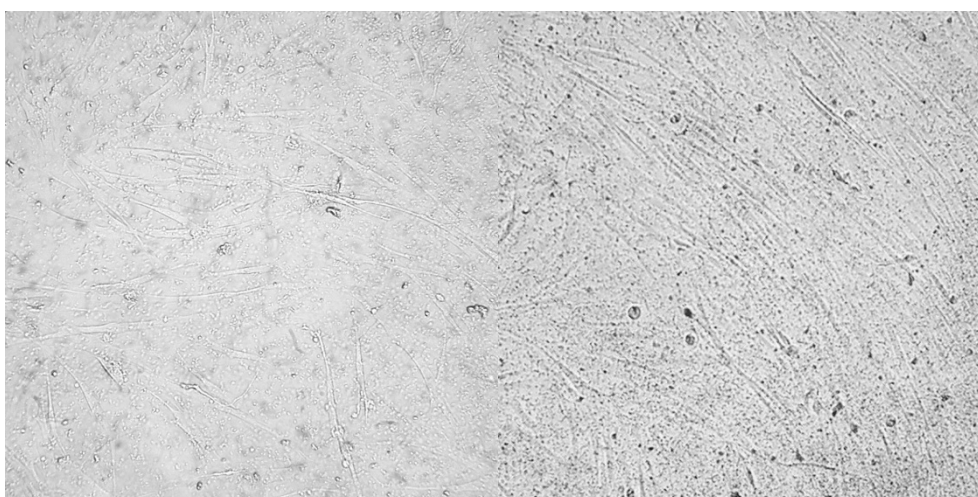
Slika 18: Kontrola po 24 in 48 urah



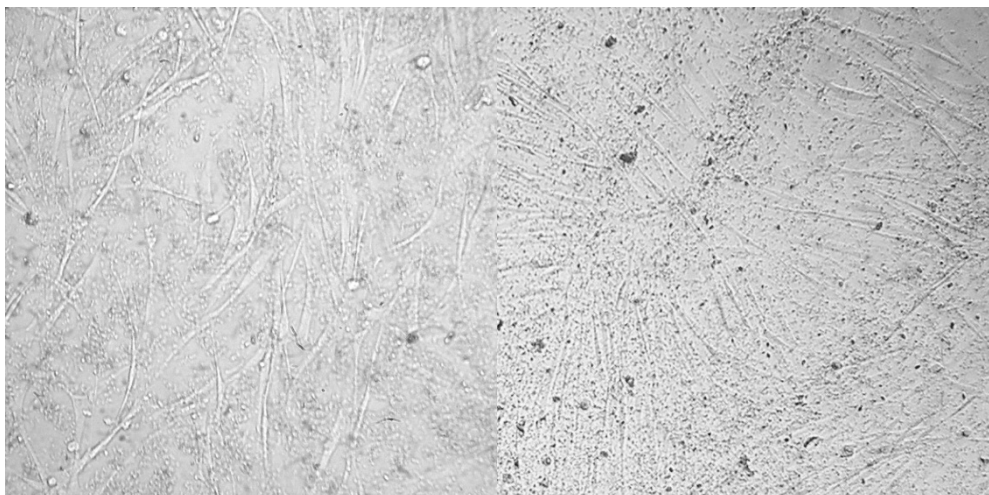
Slika 19: SLN 250 po 24 in 48 urah



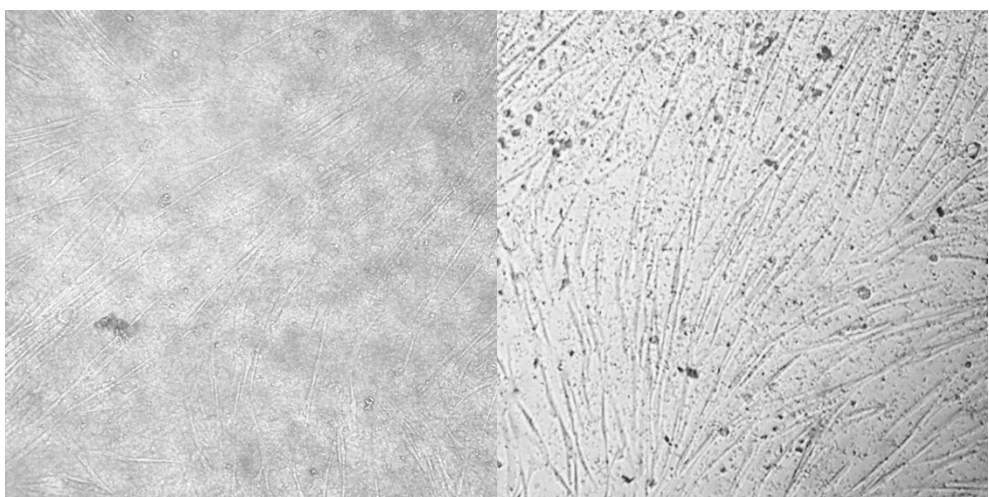
Slika 20: s-r 10 po 24 in 48 urah



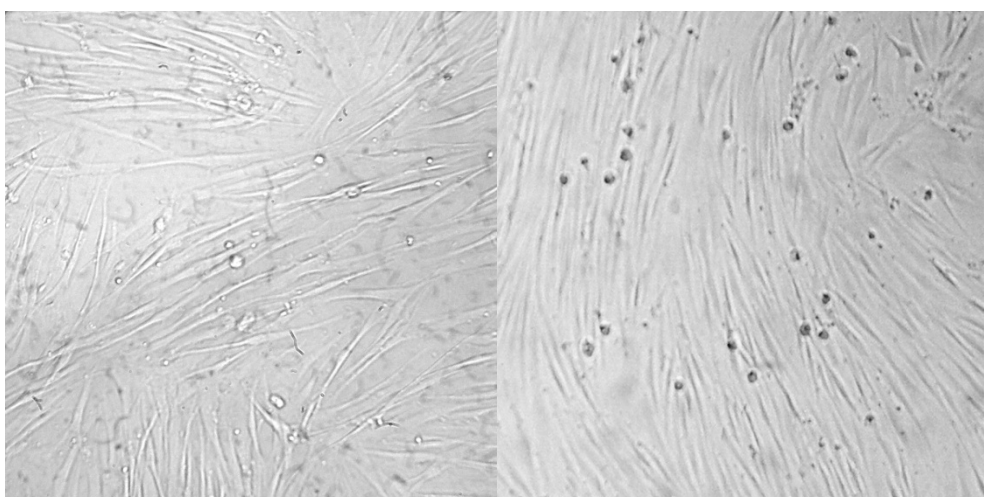
Slika 21: s-r 50 po 24 in 48 urah



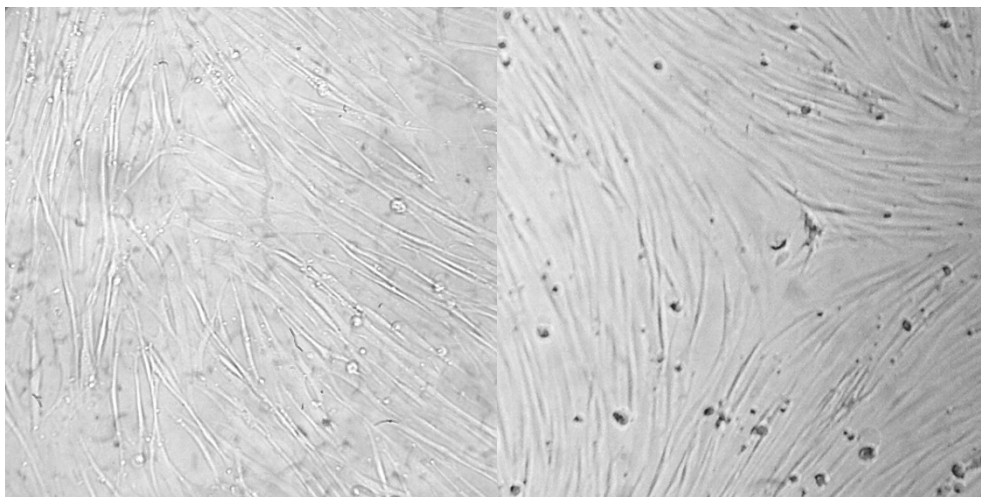
Slika 22: s-r 100 po 24 in 48 urah



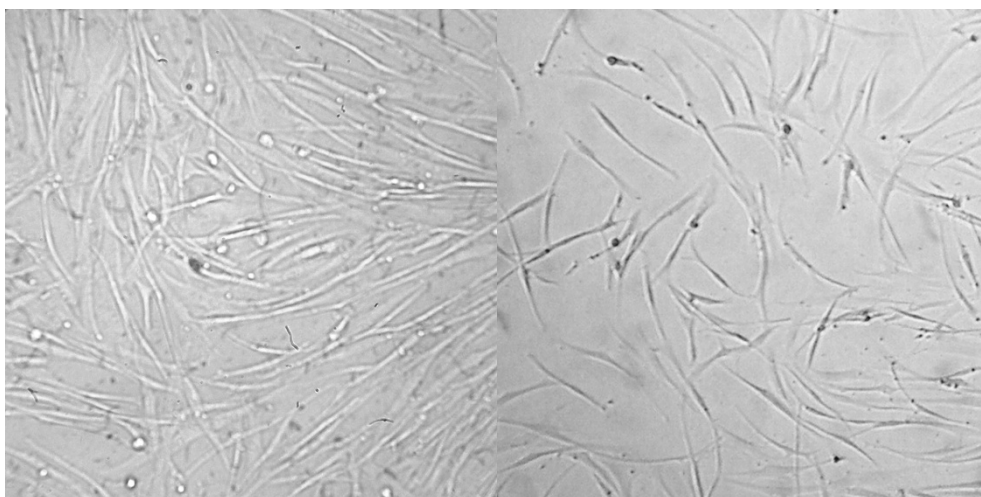
Slika 23: s-r 250 po 24 in 48 urah



Slika 24: r 10 po 24 in 48 urah



Slika 25: r 50 po 24 in 48 urah



Slika 26: r 100 po 24 in 48 urah



Slika 27: r 250 po 24 in 48 urah

5 SKLEP

V diplomski nalogi smo s postopkom dispergiranja taline lipida z rotor-stator homogenizatorjem izdelali SLN z RSV za potencialno zdravljenje RA, ki velja za eno od še vedno neozdravljivih bolezni. RSV izkazuje številne lastnosti, ki ugodno vplivajo na potek bolezni, z vgrajevanjem v ND pa zagotovimo učinkovit in varen dostavni sistem, ki omogoča prenos RSV v celice in ugoden profil sproščanja ZU.

Tehnološki del smo začeli z izdelavo ND z različnimi koncentracijami RSV. ND smo določili velikost, polidisperzni indeks ter zeta potencial. Učinkovitost vgrajevanja RSV v ND je bila boljša z uporabo etanolne raztopine RSV namesto samega RSV. Profili sproščanja pa so pokazali, da s SLN ob ustrezni koncentraciji RSV lahko upočasnimo sproščanje.

Za zagotavljanje stabilnosti skozi daljše časovno obdobje smo disperzije SLN liofilizirali ob prisotnosti krioprotektanta trehaloze dihidrata, pri čemer smo ugotovili, da postopek liofilizacije poslabša fizikalne lastnosti SLN.

DSC analiza posameznih komponent in izdelanih SLN je pokazala, da je RSV vključen v strukturo nanodelcev in sicer se nahaja v amorfem stanju.

Za delo na fibroblastih smo uporabili SLN-RSV2 EtOH, ker so celokupno izkazovali najboljše lastnosti. Njihova velikost in PDI (polidisperzni indeks) pred oz. po liofilizaciji in redispergiranju je bila 226,8 nm / 0,514 oz. 328,9 nm / 0,773, zeta potencial $-16,2 \pm 1,5$ mV, učinkovitost vgrajevanja RSV pa je bila 93,4 %. Ugoden je bil tudi profil sproščanja RSV, saj le-ta počasi in enakomerno prehaja iz SLN, s čimer smo s temi SLN zagotovili podaljšano delovanje takšnega zdravila.

Učinkovitost izdelanih ND smo opazovali na fibroblastih. Nanje smo nanесли različne koncentracije RSV samega ali pa vgrajenega v ND. Za proučevanje vpliva samih ND na celice, smo na celice aplicirali še prazne ND. Na podlagi slik posnetih s svetlobnim mikroskopom lahko zaključimo, da tako prazni ND kot tudi ND z RSV nimajo citotoksičnega delovanja na fibroblaste. Najverjetneje je temu vzrok tudi počasno sproščanje RSV iz ND, kar omogoča konstantno in enakomerno dovajanje ZU na mesto delovanja. Najnižja dodana količina ND (vzorec s-r 10) deluje v prvih 24 urah rahlo stimulatивно, medtem ko ostali vzorci sprožijo sprva šibko citostatično delovanje, ki pa v nadaljevanju splahni.

Z aplikacijo samega RSV smo dobili nekoliko bolj raznolike rezultate. Koncentraciji 10 μ M in 50 μ M RSV (vzorca r 10 in r 50) delujeta sprva rahlo citostatično, kar se nadalje normalizira na kontrolno raven. Vzorec s koncentracijo 100 μ M RSV (vzorec r 100) popolnoma zaustavi proliferacijo, saj se metabolna aktivnost tudi po 48 h ne spremeni. Citotoksični učinki so bili opazni tako kvantitativno (MTS test) kot tudi kvalitativno (slikanje celic) po aplikaciji RSV v koncentraciji 250 μ M (vzorec r 250).

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da so ND primeren koloidni sistem za RSV. Znotrajcelična dostava RSV s pomočjo SLN nam omogoči povečanje učinkovitosti RSV, saj se ves RSV prenese v celico in se tam postopoma sprošča. Zaradi slednjega lahko apliciramo tudi veliko večjo količino RSV, vgrajenega v ND, kot bi si jo lahko privoščili s samim RSV, saj ima lahko le-ta v visokih koncentracijah uničujoče – citotoksične učinke.

ND, ki bi bili primerni za zdravljenje RA, morajo vsebovati takšno koncentracijo RSV, ki zaustavi rast fibroblastov, saj so produkti le-teh eni od glavnih spodbujevalcev bolezni. Zaustavitev njihove rasti in nadaljnja apoptoza bi tako precej upočasnila napredovanje RA. Natančna koncentracija RSV v teh nanodelcih in njihova uporabnost na sinovijskih fibroblastih bo predmet nadaljnjih raziskav. Apliciranje SLN z RSV bi bila namreč zelo varna in učinkovita alternativa dosedanjim zdravilom in drugim sredstvom, ki se uporabljajo za zdravljenje oz. lajšanje simptomov RA.

6 VIRI

1. Tomšič M., Revmatoidni artritis. In: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, tretja izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 1343-1352
2. Kivity S., Agmon-Levin N., Blank M., Shoenfeld Y: Infections and autoimmunity--friends or foes?, Trends Immunol. 2009; 30: 409-414
3. http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Rheumatic_Disease/default.asp (september, 2010)
4. Huber L. C, Distler O, Tarner I, Gay R. E, Gay S, Pap T: Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis, Rheumatology 2006; 45: 669–675
5. Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnäker E-M, Tarner I H, Robbins P, Evans C, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S,

- Schölmerich J, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E: Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints, *Nature Medicine* 2009; 15: 1414-1420
6. Ihan A: Etiologija in patofiziologija revmatoidnega artritisa, *Farmacevtski vestnik* 2004; 55: 109-112
 7. Klareskog L, Irinel A, Paget S: Rheumatoid arthritis, *Lancet* 2009; 373: 659-672
 8. Caporali R, Caprioli M, Bobbio-Pallavicini F, Montecucco C: DMARDS and infections in rheumatoid arthritis, *Autoimmunity Reviews* 2008; 8: 139-143
 9. Fox R, Herrmann M, Frangou C, Wahl G, Morris R, Strand V, Kirschbaum B: Mechanism of Action for Leflunomide in Rheumatoid Arthritis, *Clinical Immunology* 1999; 93: 198-208
 10. Kanako K, Shinichi K: Cyclosporine and tacrolimus for the treatment of rheumatoid arthritis, *Current Opinion in Rheumatology* 2007; 19: 238-245
 11. Ochaion A, Bar-Yehuda S, Cohen S, Amital H, Jacobson K.A, Joshi B.V, Gao Z.G, Barer F, Patoka R, Del Valle L, Perez-Liz G, Fishman P: The A3 adenosine receptor agonist CF502 inhibits the PI3K, PKB/Akt and NF-kB signaling pathway in synoviocytes from rheumatoid arthritis patients and in adjuvant-induced arthritis rats, *Biochemical pharmacology* 2008; 76: 482-494
 12. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, prva izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007
 13. Falgarone G, Semerano L, Rulle' S, Boissier M-C: Targeting lymphocyte activation to treat rheumatoid arthritis, *Joint Bone Spine* 2009; 76: 327-332
 14. Jazayeri A, Carroll J, Vernallis A: Interleukin-6 subfamily cytokines and rheumatoid arthritis: Role of antagonists, *International Immunopharmacology* 2009
 15. Šenolt L, Vencovský J, Pavelka K, Ospelt C, Gay S: Prospective new biological therapies for rheumatoid arthritis, *Autoimmunity Reviews* 2009; 9: 102-107
 16. Kristl J, Teskač K, Caddeo C, Abramovič Z, Šentjerc M: Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; 73: 253-259
 17. Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B: Effects of Resveratrol in Inflammatory Arthritis, *Inflammation* 2007; 30

18. Mehnert W, Mader K: Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications, *Adv Drug Del Rev* 2001; 47: 165-196
19. Mao S, Wang P, Bi D: Investigation on 5-fluorouracil solid lipid nanoparticles (SLN) prepared by hot homogenization, *Pharmazie* 2005; 60: 273-277
20. Cegnar M, Krstl J, Kos J: Tehnološki pristopi za izdelavo nanodelcev, *Nanotehnologija v farmaciji, Zbornik referatov* 2004: 47-63
21. Planinšek O, Zajc N, Srčič S: Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji, *Farmacevtski vestnik* 2001; 52: 173-185
22. <http://abstracts.aapspharmaceutica.com/ExpoAAPS08/ec/forms/attendee/index.aspx?content=vbooth&id=42&ecbooth=1825> (september, 2010)
23. <http://www.chemblink.com/products/77538-19-3.htm> (september, 2010)
24. <http://www.signetchem.com/downloads/datasheets/Basf/Lutrol-F-68-Specifications.pdf> (september, 2010)
25. Fussnegger B: Poloxamers (1), Excipients and Actives for Pharma 1999; 3: 5-6
26. <http://www.phospholipid.de/pdf/Phospholipon%2090%20H.pdf> (september, 2010)
27. Teskač K, Kristl J: The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol, *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 390: 61–69
28. Shakibaei M, Csaki C, Nebrich S, Mobasheri A: Resveratrol suppresses interleukin-1b-induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: Potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis, *Biochemical pharmacology* 2008; 76: 1426-1439