

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA ŠTRUCL

VGRAJEVANJE OVALBUMINA V NANODELCE IZ HITOSANA IN LECITINA
ENTRAPMENT OF OVALBUMIN IN CHITOSAN/LECITHIN NANOPARTICLES

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Zahvala

Hvala doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, ki je bila mentorica v vsem pomenu besede. Hvala osebju celotne Katedre za farmacevtsko tehnologijo, da me je sprejelo medse. Hvala Tatjani Hrovatič za pomoč pri delu v laboratoriju.

Hvala domačim, ker ste bili moja Družina.

Hvala prijateljem za spodbudne besede in drugačne poglede.

Hvala Sabini Podkrižnik in Lekarni Mozirje za popotnico izkušenj in človeških odnosov.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Ljubljana, september 2010

VSEBINA

POVZETEK	4
ABSTRACT	5
SEZNAM OKRAJŠAV	6
1. UVOD	7
1.1. NANODELCI.....	7
1.1.1. Sestavine nanodelcev.....	7
1.1.2. Izdelava nanodelcev	10
1.2. PROTEINI.....	12
1.2.1. Temperatura denaturacije proteinov	13
1.2.2. Izoelektrična točka proteinov	14
1.2.3. Ovalbumin	15
1.3. LIOFILIZACIJA	16
1.3.1. Liofilizacija disperzij nanodelcev.....	17
1.3.2. Uporaba krioprotektantov.....	18
1.4. VREDNOTENJE NANODELCEV.....	19
1.4.1. Velikost in polidisperzni indeks	19
1.4.2. Zeta potencial	20
2. NAMEN DELA	22
3. EKSPERIMENTALNI DEL	23
3.1. MATERIALI	23
3.2. NAPRAVE	25
3.3. METODE	26
3.3.1. Izdelava nanodelcev	26
3.3.2. Fizikalno vrednotenje nanodelcev	27
3.3.3. Liofilizacija disperzij nanodelcev.....	28
3.3.4. Analitika ovalbumina	29
3.3.5. Učinkovitost vgrajevanja ovalbumina v nanodelce.....	31
3.3.6. Sproščanje ovalbumina iz liofiliziranih nanodelcev.....	31
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	33
4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI SESTAVIN NANODELCEV.....	33
4.2. IZDELAVA IN VREDNOTENJE NANODELCEV	38
4.3. LIOFILIZACIJA DISPERZIJ NANODELCEV.....	48
4.4. UČINKOVITOST VGRAJEVANJA OVALBUMINA V NANODELCE	50
4.5. SPROŠČANJE OVALBUMINA IZ LIOFILIZIRANIH NANODELCEV.....	51
5. SKLEP	54
6. LITERATURA	56

POVZETEK

Nanodelci izkazujejo za farmacevtsko uporabo številne prednosti, katerih zasluge gre pripisati predvsem majhnosti sistema. So obetavni koloidni sistemi z velikostjo od 1 do 1000 nm. Lahko jih pripravimo iz lipidov, ki so pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju in tako dobimo trdne lipidne nanodelce. Lahko pa jih pripravimo iz fiziološko sprejemljivih polimernih makromolekul in dobimo polimerne nanodelce.

V diplomski nalogi smo izdelali nanodelce s spontanim združevanjem polimera in lipida. Ta metoda ni agresivna in je primerna za občutljive biomolekule, kot so proteini. Nanodelce smo pripravili tako, da smo v razredčeno raztopino hitosana ob stalnem počasnem mešanju z rotorstator homogenizatorjem injicirali etanolno raztopino lecitina. Zaradi pozitivno nabitega polimera in negativno nabitega lipida je prišlo do spontanih elektrostatskih interakcij med nasprotno nabitimi ioni in s tem do nastanka nanodelcev. Kot modelni protein smo v nanodelce vgrajevali ovalbumin.

Na začetku diplomskega dela smo naredili osnovne raziskave na samem ovalbuminu in določili optimalne pogoje za izdelavo nanodelcev. Nanodelce smo fizikalno vrednotili v odvisnosti od časa in pH. Disperzije nanodelcev smo liofilizirali, pred tem pa dodali različne koncentracije trehaloze kot krioprotektanta in ugotavljali, katera koncentracija omogoča čim boljše redispersiranje liofiliziranih nanodelcev ter je tako najprimernejša za ohranitev velikosti delcev in homogenosti vzorca. Nato smo v nanodelce vgradili modelni protein ovalbumin. Vgrajevali smo različne začetne koncentracije proteina in ugotavljali, kako vgradnja vpliva na velikost in zeta potencial. Primerjali smo velikost praznih nanodelcev in nanodelcev z različnimi začetnimi koncentracijami ovalbumina. S HPLC-analitiko smo določili učinkovitost vgrajevanja ovalbumina v nanodelce in profil sproščanja ovalbumina iz nanodelcev.

Rezultati diplomske naloge kažejo, da nam je uspelo izdelati nanodelce s povprečnim premerom med 200 in 400 nm, polidisperznim indeksom 0,2-0,4 in zeta potencialom med -40 in 40 mV. Vgradnja različnih količin ovalbumina v nanodelce nima bistvenega vpliva niti na velikost niti na zeta potencial. Stresov zmrzovanja in sušenja med liofilizacijo smo se uspešno ubranili, ko smo v disperzijo nanodelcev dodali ustrezno koncentracijo trehaloze. Dosegli smo 20-40 % učinkovitost vgrajevanja ovalbumina v nanodelce. V vseh poskusih sproščanja smo opazili t.i. »burst« učinek.

ABSTRACT

Nanoparticles show many advantages for pharmaceutical use – the merits may be credited mainly with the smallness of the system. They are promising, colloidal systems of size from 1 to 1000 nm. They can be prepared from lipids, which are solid when at room temperature and in this way solid lipid nanoparticles are obtained. On the other hand, polymeric nanoparticles are prepared from physiologically acceptable polymer macromolecules.

In diploma work nanoparticles were created by spontaneously combining polymer and lipid. This method is not aggressive and is suitable for sensitive biomolecules such as proteins. Nanoparticles were prepared in a way that we injected ethanol solution of lecithin in a dilute solution of chitosan with a constant slow stirring with a rotor-stator homogenizer. Due to positively charged polymer and negatively charged lipid a spontaneous electrostatic interaction between opposite charged ions happened, which led to formation of nanoparticles. As a model protein, ovalbumin was incorporated in nanoparticles.

At the beginning of the diploma work, basic research on ovalbumin was performed and optimal conditions for producing nanoparticles were set. Nanoparticles were physically evaluated depending on storage time and pH. Dispersions of nanoparticles were lyophilized, and prior to this different amounts of trehalose were added as cryoprotectant and assessed which quantity enables the best redispersion of lyophilized nanoparticles and is thus the most suitable to maintain the particle size and homogeneity of the sample. Then model protein ovalbumin was incorporated in the nanoparticles. Different initial concentrations of protein were incorporated and we assessed how the incorporation affects the size and zeta potential. The size of empty nanoparticles and the nanoparticles with different initial concentrations of ovalbumin were compared. The entrapment efficiency of ovalbumin in nanoparticles and the release profile of ovalbumin from nanoparticles were determined with HPLC-analysis.

The results of this diploma work show that nanoparticles with an average diameter between 200 and 400 nm, polydispersity index of 0.2 to 0.4 and zeta potential between –40 and 40 mV were produced. The size nor the zeta potential weren't noticeably affected by entrapment of various quantities of ovalbumin in the nanoparticles. Stresses were successfully avoided due to freezing and drying during the lyophilization, when an adequate quantity of trehalose was added into dispersion of nanoparticles. 20-40% entrapment efficiency of ovalbumin in the nanoparticles was achieved. In all in vitro release experiments a »burst« effect was observed.

SEZNAM OKRAJŠAV

- BU – biološka uporabnost
- d – povprečni premer delca
- DLS – dinamično sipanje svetlobe
- GF – gelska filtracija
- HIT – hitosan
- HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
- LDV – lasersko Dopplerjevo merjenje hitrosti
- ND – nanodelci
- OVA – ovalbumin
- PCS – fotonska korelacijska spektroskopija
- pI – izoelektrična točka
- PI – polidisperzni indeks
- PL 50 – Phospholipon® 50
- PL 80 – Phospholipon® 80
- SLN – trdni lipidni nanodelci
- T_g – temperatura steklastega prehoda
- TMC – N-trimetil hitosan klorid
- TPP – tripolifosfat
- U – učinkovina
- ZP – zeta potencial

1. UVOD

21. stoletje bi lahko označili za »nanostoletje«, saj se številne tako farmacevtske kot nefarmacevtske raziskave odvijajo na tematiko »nano«. Nanodelci izkazujejo za farmacevtsko uporabo številne prednosti, katerih zasluge gre pripisati predvsem majhnosti sistema. Doseganje prave velikosti sistema in nenazadnje v tak koloidni sistem vgrajevati različne učinkovine predstavlja velik izziv farmacevtskim družbam.

1.1. NANODELCI

Nanodelci (ND) so trdni delci z velikostjo od 1 do 1000 nm. Ogrodje polimernih nanodelcev je sestavljeno iz fiziološko sprejemljivih polimernih makromolekul. Nanodelce lahko izdelamo tudi iz lipidov, ki so pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju. Tako dobimo trdne lipidne nanodelce (SLN). Učinkovine, ki jih vgrajujemo, so lahko v različnem agregatnem stanju; v ogrodju so lahko adsorbirane, raztopljene ali suspendirane. Odvisno od parametrov izdelave, fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine in nosilnega materiala dobimo sicer različne oblike nanodelcev, ki pa imajo v osnovi podobno zgradbo: nanosfere imenujemo nanodelce, ki imajo učinkovino dispergirano ali raztopljeno po celotnem ogrodju, nanokapsule pa so nanodelci, ki imajo rezervoar učinkovine v svoji notranjosti, katero obdaja ovojnica [1].

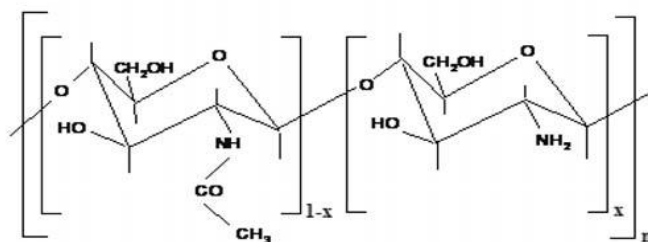
Uporaba nanodelcev omogoča številne prednosti: dostavo različnih učinkovin (U), relativno netopni učinkovini lahko povečamo hitrost raztapljanja, hitrost absorpcije in biološko uporabnost (BU), spreminjanje površine nanodelcev lahko vodi v bolj učinkovito in inteligentno dostavo (prirejeno sproščanje, ciljana dostava) [2].

1.1.1. Sestavine nanodelcev

Pred začetkom izdelave nanodelcev je potrebno poznavanje bioloških, fizikalnih in kemijskih značilnosti uporabljenih materialov. Te lastnosti neposredno vplivajo na številne dejavnike, kot sta način oblikovanja nanodelcev in sproščanje vgrajenih snovi iz nanodelcev.

1.1.1.1. Hitosan

Hitosan je bioadheziven, biokompatibilen in biorazgradljiv naravni kationski polimer z visoko molekulsko maso. Je linearni amino polisaharid, sestavljen iz približno 20 % β -1,4-N-acetil-D-glukozamina in 80 % β -1,4-D-glukozamina [3]. Njegova strukturna formula je prikazana na *Sliki 1*.



Slika 1: Strukturna formula hitosana [3].

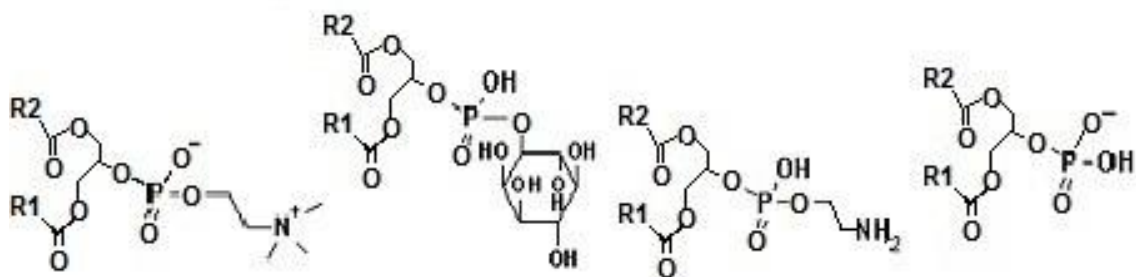
(n = število sladkornih enot polimera, x = stopnja deacetiliranja)

Pridobivamo ga z delnim deacetiliranjem polimera hitina, ki je drugi najbolj razširjen polisaharid v naravi – najdemo ga v oklepih rakov, pa tudi v nekaterih insektih in gobah. Zaradi izredno slabe topnosti hitina v vodnih raztopinah je za industrijsko uporabo bolj primeren hitosan, vendar je tudi hitosan topen le v kislih raztopinah (kjer je pozitivno nabit), pri nevtralnem in bazičnem pH pa je praktično netopen. Njegova navidezna pK_a-vrednost je okoli 6,5. Na voljo je več vrst hitosana, ki se razlikujejo glede na molekulsko maso in stopnjo deacetiliranja (60-100 %). Stopnja deacetiliranja hitosana vpliva na njegovo topnost v vodnih raztopinah: hitosan s 40 % stopnjo deacetiliranja je topen do pH=9, s 85 % stopnjo deacetiliranja pa samo do pH=6,5. Z anorganskimi in organskimi kislinami, kot so glutaminska, klorovodikova, mlečna in očetna kislina, tvori soli. Različni kompleksi, ki jih hitosan tvori, tudi imajo za posledico različno topnost pri različnih pH. Viskoznost disperzij hitosana narašča z nižanjem temperature, večanjem koncentracije hitosana in večanjem stopnje deacetiliranja (višji % D-glukozamina v primerjavi z N-acetil-D-glukozaminom). Ima majhno peroralno toksičnost, ki je odvisna od stopnje deacetiliranja, molekulske mase, čistosti hitosana in načina aplikacije. Za humano uporabo se priporoča le hitosan največje stopnje čistosti. Izkazuje dobre bioadhezivne lastnosti, ki so predvsem posledica tvorbe vodikovih in ionskih vezi med pozitivno nabitimi amino skupinami polimera in negativno nabito sialično kislino, prisotno v glikoproteinih na površini sluznice. Močno bioadhezivni so tiohitosani, ki tvorijo kovalentne vezi. Hitosan

učinkovito poveča permeabilnost različnih sluznic. Na pospeševanje absorpcije s hitosanom vplivajo: stopnja deacetiliranja, molekulska masa polimera in prisotnost mukusa na površini epitelijskih celic. Mukus ovira interakcije hitosana z negativno nabitimi glikoproteini na površini celičnih membran. Absorpcija je zmanjšana, kadar so hkrati s hitosanom prisotni tudi večvalentni kationi. Zaradi dobrih bioadhezivnih lastnosti hitosan pogosto uporabljamo v razvoju novih dostavnih sistemov, ki izboljšajo biološko uporabnost vgrajenih učinkovin (s kombinacijo bioadhezije in pospeševanja absorpcije hitosan poveča biološko uporabnost vgrajenih učinkovin), saj podaljšujejo čas zadrževanja učinkovine na mestu adhezije ter omogočajo tesnejši stik farmacevtske oblike s sluznico. V razvoju so številni dostavni sistemi s hitosanom; najpogosteje pa hitosan sestavlja mikrodcelce in nanodcelce ter liposome, pri tem pa ga lahko uporabljamo kot ogrodni polimer ali le kot sredstvo za oblaganje [3, 4].

1.1.1.2. Lecitin

Lecitin je fosfolipid (fosfatidilholin (večinoma), fosfatidilinozitol, fosfatidiletanolamin, fosfatidna kislina idr.), ki je sestavljen iz glicerola, dveh maščobnih kislin, fosfatne skupine in – odvisno od vrste fosfolipida – holina ali inozitola ali etanolamina [5, 6]. Strukture nekaterih najpogostejših fosfolipidov so predstavljene na *Sliki 2*.



Fosfatidilholin

Fosfatidilinozitol

Fosfatidiletanolamin

Fosfatidna kislina

Slika 2: Strukturne formule fosfolipidov [7].

(R1 in R2 predstavljata alifatski verigi maščobnih kislin.)

Lecitin je amfifilna molekula, sestavljena iz polarne glave (negativno nabita fosfatna skupina in pozitivno nabit holin) in dveh nepolarnih repov (12-18 ogljikovih atomov dolgi alifatski verigi maščobnih kislin). Nepolarna komponenta se lahko spreminja; odvisna je od števila C-atomov, ki jih kislini vsebujeta ter ali gre za nenasičeno ali nasičeno

maščobno kislino. Narava te komponente vpliva na vlogo lecitina v organizmu, npr. lecitin, katerega obe maščobni kislini sta nasičeni, pomaga pri absorpciji kisika v pljučih, medtem ko je lecitin z obema nenasičenima maščobnima kislinama vključen v transport holesterola v krvi. Lecitin je rumeno rjava maščobna snov, ki se nahaja v celičnih membranah in ima, v nasprotju z ostalimi maščobami, ki dajejo celicam energijo, strukturno vlogo. Nahaja se tako v živalskih kot rastlinskih tkivih. Prisoten je v vsaki celici organizma. Prvotno je lecitin iz jajčnega rumenjaka izoliral francoski kemik in farmacevt Theodore Nicolas Gobley leta 1847, njegova kemijska formula je bila znana leta 1874. V vmesnem obdobju je bila dokazana prisotnost lecitina v mnogih bioloških materialih: kri, žolč, možgani človeka, možgani ovce, ikre rib, v piščancu. Pridobivanje lecitina je v sedanjem času razmeroma enostavno, tudi viri so lahko dostopni. Bogati vir predstavlja soja, iz katere lecitin ekstrahiramo kemijsko (s heksanom) ali mehansko [5]. Navidezna vrednost pKa je okoli 1,5 [8]. V vodi se ne topi, lahko pa nabreka. Topen je etanolu, etilnem etru, petrolej etru, kloroformu, maščobnih kislinah, mineralnih oljih [9]. Lecitin se uporablja tako v komercialne namene (živilska industrija) kot tudi na področju farmacevtskih izdelkov. Je praktično netoksičen, v organizmu se dobro presnavlja [5].

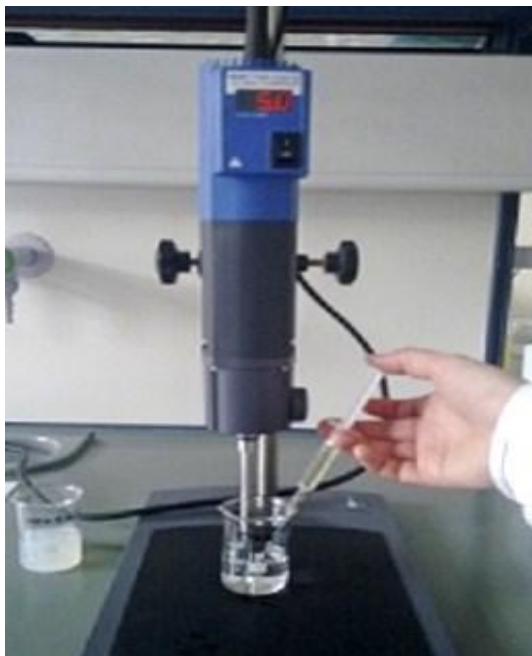
Na tržišču je na voljo več vrst zmesi lipidov, med drugim tudi Phospholipon® 50 in Phospholipon® 80, ki smo ju uporabili v diplomskem delu. Razlika med njima je v vsebnosti različnih fosfolipidov. Phospholipon® 50 vsebuje minimalno 50 m/m % fosfatidilholina in maksimalno 6 m/m % lizofosfatidilholina, Phospholipon® 80 pa minimalno 73-76 m/m % fosfatidilholina in maksimalno 6 m/m % lizofosfatidilholina. Vsebujeta še druge vrste fosfolipidov, med katerimi so najpogostejši: fosfatidilinozitol, fosfatidna kislina, fosfatidiletanolamin. Phospholipon® 50 vsebuje manj fosfatidilholina kot Phospholipon® 80 in zato več vrst še drugih fosfolipidov [6, 10].

1.1.2. Izdelava nanodelcev

Poznamo emulzijske, obarjalne in polimerizacijske metode izdelave nanodelcev. A večina teh pristopov vključuje uporabo organskih topil, agresivno homogeniziranje ali močno segrevanje, ki so potencialno škodljivi za občutljive biomolekule. Tem neugodnim okoliščinam se lahko izognemo z uporabo hidrofilnih polimerov in milejših metod.

Ena takih metod izdelave nanodelcev je spontano združevanje polimera in lipida. Nanodelce z metodo samoasociiranja polimera in lipida pripravimo tako, da v razredčeno raztopino hitosana ob stalnem počasnem mešanju z rotor-stator homogenizatorjem direktno

injeciramo etanolno raztopino lecitina (*Slika 3*). Zaradi pozitivno nabitega polimera (hitosan) in negativno nabitega lipida (lecitin) pride do spontanah elektrostatskih interakcij med nasprotno nabitimi ioni in s tem do nastanka nanodelcev.



Slika 3: Izdelava nanodelcev s samoasociiranjem polimera in lipida.

Injeciranje alkoholnih raztopin ustreznih koncentracij fosfolipidov v vodo je dobro uveljavljena metoda za pripravo liposomov, saj sta jo že leta 1973 raziskala Batzri in Korn [11]. Nadaljnje študije so pokazale, da lahko s to metodo oblikujemo tudi nanodelce oz. natančneje, nanodelce lahko pridobivamo z združevanjem alkoholne raztopine lecitina s koncentracijo 25 mg/ml z vodno raztopino hitosana s koncentracijo med 0,025 in 0,4 mg/ml. Za tako izdelane nanodelce je značilna majhna velikost (73 nm) in visoko negativen površinski naboj (-53 mV). Fizikalno-kemijske raziskave nanostruktur so pokazale, da hitrost in vrsta mešanja malo vplivata na porazdelitev velikosti delcev koloidnih sistemov. Na velikost in površinski naboj nanodelcev je odločilno vplivala koncentracija hitosana v vodni raztopini. Z mešanjem raztopin lecitin:hitosan v masnem razmerju od 5:1 do 20:1 so dobili koloidne delce s pozitivno nabito površino (okoli 40 mV), velikostjo manjšo od 280 nm in vrednostjo polidisperznega indeksa pod 0,2. Ko so razmerje lecitin:hitosan povečali na 30:1 pa vse do 50:1, so se začeli koloidni delci po nekaj minutah združevati v agregate, to je bilo še posebej izrazito pri razmerjih od 40:1 do 50:1. Sklepali so, da je do združevanja delcev prišlo zaradi pomanjkanja elektrostatske

stabilizacije nanosistema. Pri razmerju 50:1 so bili delci veliki okoli 1 μm in so imeli široko distribucijo velikosti. Ko so razmerje med polimeroma še povečali (od 60:1 do 80:1), so dobili koloidne delce z negativno nabito površino (okoli -42 mV), velikostjo okoli 400 nm in višjo vrednostjo polidisperznega indeksa (več kot 0,231). Dobljeni rezultati raziskave kažejo, da sta stabilnost koloidnega sistema in velikost delcev odvisni od neto naboja na površini delcev. Ko je vrednost zeta potenciala nanodelcev pozitivna ali negativna, je sistem fizikalno stabilen in velikost delcev v submikronskem območju, medtem ko pride v nevtralnem območju zeta potenciala do agregacije delcev in s tem do njihovega usedanja – fizikalna nestabilnost sistema. Z raziskavo so ugotovili, da so za stabilnost koloidnega sistema odgovorne elektrostatske interakcije med negativno nabitimi skupinami lecitina in pozitivno nabitimi skupinami hitosana. Sam fosfatidilholin, ki je nevtralen, ne vstopa v interakcije s hitosanom, zato nanodelci v tem primeru ne nastanejo. Lecitin vsebuje poleg fosfatidilholina tudi lipidne komponente, kot sta npr. fosfatidna kislina in fosfatidilinozitol, ki mu dajejo negativni naboj. Ko je hitosana dovolj na razpolago za tvorbo nanodelcev, daje le-tem pozitivni naboj; če je prisoten v majhni količini, ne more popolnoma nevtralizirati negativnega naboja lipidne strukture [11].

Proučevali so tudi odvisnost velikosti in zeta potenciala nanodelcev od pH disperzije. Pri povečanju pH iz 2,5 na 5 se je površinski naboj rahlo zmanjšal, nadaljnje povečanje pH nad 5 pa povzroči hiter padec absolutne vrednosti zeta potenciala. Povečanje pH iz 2,5 na 5 vpliva tudi na velikost delcev, ki se večajo, dokler ne pride do agregacije (pH nad 5). Rezultati so potrdili, da je stabilizacija koloidnega sistema elektrostatske narave in da polisaharidna komponenta, t.j. hitosan, karakterizira površino delcev. Vrednost pKa hitosana okoli 6,5 pojasni, zakaj se je površinski naboj koloidnega sistema približal nevtralnosti pri pH blizu 6 [11].

Površinske lastnosti nanodelcev so torej pojasnjene z nabojem komponent, ki se giblje od pozitivnega proti negativnemu v odvisnosti od zmanjšanja kationske komponente – hitosana. Ko je površinski naboj blizu nevtralnosti, začnejo nanodelci agregirati. Zaradi že omenjenih elektrostatskih interakcij lahko nanodelce obravnavamo kot samo-organizacijske strukture [11].

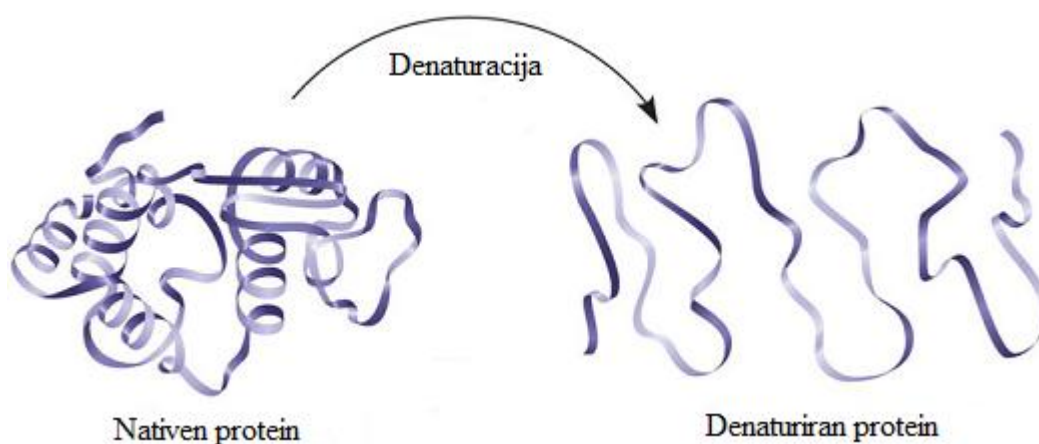
1.2. PROTEINI

Proteini so makromolekule, sestavljene iz aminokislin, ki so med seboj povezane v peptidno verigo. Sintetizirajo se znotrajcelično s kombiniranjem dvajsetih različnih tipov

aminokislin. Proteinske verige so v naravnem stanju zvite v unikatno tridimenzionalno strukturo. Strukture polipeptidnih verig so stabilizirane s kombinacijo elektrostatskih in hidrofobnih interakcij ter tvorbo multiplih vodikovih vezi med stranskimi verigami aminokislin ali peptidnim ogrodjem.

1.2.1. Temperatura denaturacije proteinov

Proteini izvajajo specifične funkcije znotraj bioloških sistemov, kot sta na primer kataliza reakcij in transport molekul ali ionov. Imajo natančno definirano zgradbo, ki pa mora vseeno omogočati visoko stopnjo fleksibilnosti. Interakcije, ki stabilizirajo proteinsko strukturo, so torej ravno zadostne za vzdrževanje ustrezne konformacije proteina znotraj ozkega območja okoliških pogojev. Če so pogoji v raztopini zunaj tega območja (sprememba pH ali temperature), hitro pride do entropijsko vodene denaturacije ali razvijanja verig [12]. Denaturacija proteina je prikazana na *Sliki 4*.



Slika 4: Denaturacija proteina [13].

V tem primeru velikost proteina naraste na vrednost naključno zvitega polimera enake molekulske mase. Dodatno lahko v odsotnosti kaotropnih snovi hidrofobne interakcije hitro vodijo v nespecifično agregacijo denaturiranih polipeptidnih verig. Točka, pri kateri protein preide iz nativne v denaturirano obliko, je definirana kot temperatura denaturacije. Spremembo velikosti, ki spremlja denaturacijo, detektiramo z metodo dinamičnega sipanja svetlobe (DLS). Zaradi unikatnega primarnega zaporedja aminokislin posameznih proteinov obsegajo temperature denaturacije zelo različne vrednosti. Opazen vpliv na stabilnost proteinskih struktur in s tem na temperaturo denaturacije imajo tudi pogoji v raztopini (pH in ionska moč) ter posttranslacijske modifikacije (npr. glikozilacija).

Določitev te temperature je torej izrednega pomena pri celokupni karakterizaciji proteina [12].

1.2.2. Izoelektrična točka proteinov

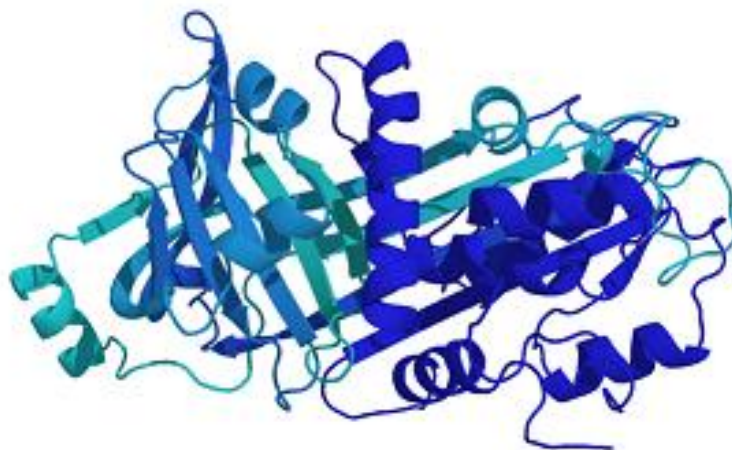
Aminokislina vsebujejo kislno karboksilno $-\text{COOH}$ skupino in bazično amino $-\text{NH}_2$ skupino; so amfoliti. Obe funkcionalni skupini sta takšni, da omogočata oz. favorizirata topnost aminokislin v vodi. O vodotopnosti odloča tudi stranska skupina aminokislina: večja je hidrofobnost stranske skupine, manjša je vodotopnost aminokislina. Kot vodotopne snovi in snovi, ki imajo v svoji strukturi kislno in bazično funkcionalno skupino, se aminokislina v vodnih raztopinah obnašajo specifično. V vodni raztopini se omenjeni funkcionalni skupini medsebojno nevtralizirata in nastane zwitterion (dvojni ion). Molekul brez naboja je v raztopini zelo malo. Vsaka aminokislina se specifično odzove tudi na spremembe pH. Pri nizkem pH, ko je v raztopini dosti protonov, se bodo na posamezni aminokislini protonirale tudi $-\text{COOH}$ skupine. Protonirale se bodo tudi vse morebitno prisotne bazične skupine v stranski veji aminokislina. Takšna popolnoma protonirana aminokislina ima samo pozitiven naboj. Z večanjem pH je razpoložljivih protonov vse manj in tako se začnejo protoni sproščati tudi iz popolnoma protonirane aminokislina. Najprej se sprost proton iz $-\text{COOH}$ skupine. Z nadaljnjim dvigom pH pridemo pri nevtralnih in pri kisljih aminokislinah že do tistega pH, ko ima aminokislina enako število pozitivnih in negativnih nabojev; navzven je tako glede na naboj nevtralna in se v električnem polju ne pomika niti proti katodi niti proti anodi. Zato temu pH rečemo izoelektrična točka (pI). Aminokislina je takrat tudi najmanj topna, saj je prisotnih največ molekul brez naboja. Strukture z nabojem so namreč precej bolje topne v polarnem topilu (vodi) kot molekule brez naboja. V primeru bazičnih aminokislin pa se deprotonira ena od bazičnih skupin. Ko je ta proces z nadaljnjo rastjo pH končan, imamo zopet pH, pri katerem sta tudi v bazičnih aminokislinah v enaki meri prisotna oba naboja – izoelektrična točka [14].

V območju izoelektrične točke je torej topnost proteina najmanjša, saj nosi tako pozitiven kot negativen naboj in tvori notranjo sol. Zeta potencial znaša v tej točki 0 mV. Pri pH pod pI nosi protein pozitiven naboj, pri pH nad pI pa negativen.

1.2.3. Ovalbumin

Ovalbumin je glavni protein jajčnega beljaka, saj predstavlja kar 60-65 % vseh proteinov v njem [15]. Prvič je bil izoliran leta 1889. Standardni postopki čiščenja so v tistem času predstavljali velik delovni napor, zato množična proizvodnja čistega ovalbumina ni bila izvedljiva. Razvoj kromatografskih tehnik je prinesel proizvodnjo izjemno čistega ovalbumina v komercialnem obsegu [16]. Ovalbumin je glikoprotein s štirimi glikozilacijskimi mesti [17]. Njegova relativna molekulska masa znaša 45 kDa. Sestavljen je iz 386 aminokislin. Zaradi svoje tridimenzionalne zgradbe (*Slika 5*) in zaporedja aminokislin spada v družino »serpinov«, vendar ne izkazuje inhibicije serinskih proteaz, niti ne vpliva na procese kot sta fibrinoliza in koagulacija [15].

Funkcija ovalbumina ni znana, domneva pa se, da je skladiščni protein (zaloga aminokislin) [18]. Domnevno je pomemben tudi pri vezavi kovinskih ionov, saj jih je sposoben kelirati znotraj sulfhidrilnih vezi. V primeru zastrupitve s težkimi kovinami keliranje onemogoči absorpcijo le-teh v gastrointestinalnem traktu in tako prepreči zastrupitev [19]. Navidezna pKa-vrednost ovalbumina je okoli 6 [20], izoelektrična točka pa okoli 4,8 [21].



Slika 5: Tridimenzionalna zgradba ovalbumina [22].

Ovalbumin je v raziskavah pomemben pri proučevanju strukture in lastnosti proteinov, ker je dostopen v velikih količinah. S primerjavo strukture ovalbumina in serpinov ugotavljajo strukturne značilnosti, ki so pomembne za inhibitorni učinek. Kot marker za kalibracijo elektroforeznih gelov se uporablja v proteomiki, medtem ko se v imunologiji uporablja za stimulacijo alergijskih reakcij na testnih osebkih [23].

Študije vgrajevanja ovalbumina v nanodelce so do določene mere že raziskane. Ovalbumin kot modelni protein so vgrajevali v nanodelce, ki so bili pripravljene iz agaroznega hidrogela pa tudi v nanodelce iz N-trimetil hitosana.

Agaroz je nevtralen polisaharid iz rdečih morskih alg s širokim področjem uporabe v biologiji in medicini. Je hidrofilna, inertna, biokompatibilna. Predvsem se uporablja kot izhodna snov za izdelavo hidrogelov, saj ima dobre fizikalne lastnosti. Topna je v vreli vodi, v hladni se ne topi. Pri temperaturi 31-36 °C tvori agarozna raztopina gel, ki se ohranja vse do temperature 65-85 °C, ko preide v sol. Nanodelce iz agaroznega gela so pripravili *in situ* (v fizikalnem smislu s temperaturno spremembo, t.j. ohlajanjem) metodo pretvorbe emulzije (w/o) v disperzijo. Agarozo so raztopili v fosfatnem pufru s fiziološkim pH pri temperaturi 95 °C, nato pa raztopino ohladili na temperaturo 40 °C. V enakem pufru so pripravili tudi raztopino ovalbumina in jo segreli na 40 °C. Potem so obe raztopini v razmerju 1:1 združili in dobili vodno fazo emulzije. Oljno fazo je predstavljalo koruzno olje. 2 ml vodne faze so dodali 200 ml oljne faze in homogenizirali 20 sekund pri 7000 obratih/minuto. Dobili so w/o-emulzijo. Nato so dodali še 50 ml ohlajenega koruznega olja in homogenizirali pri enakih obratih še 10 sekund. Emulzijo so ohladili do temperature geliranja agaroze (okoli 36 °C) in dobili disperzijo nanodelcev iz agaroznega hidrogela z ovalbuminom [24].

N-trimetil hitosan klorid (TMC) je delno kvaterniziran derivat hitosana. Je vodotopen v širokem pH območju, tudi pri pH=7. Nanodelce iz TMC z različnimi koncentracijami vgrajenega ovalbumina so pripravili z ionskim geliranjem pri sobni temperaturi. TMC so raztopili v vodi. Raztopina je vsebovala tudi 1 m/v % Tweena® 80. V to raztopino so potem dodali različne koncentracije ovalbumina. 5 ml tako pripravljene raztopine TMC z ovalbuminom, ki je imela pH=6, so po kapljicah med mešanjem dodajali 1,8 ml raztopine tripolifosfata (TPP) s pH=8. Nastala je disperzija nanodelcev s končnim pH=7, ki so jo s pomočjo gradientnega centrifugiranja skoncentrirali in očistili nečistot, t.j. nevgrajenega OVA, prostih TMC, TPP in Tween®. Supernatant so zavrgli, nanodelce pa redispergirali v fosfatnem pufru s pH=7,4 [25].

1.3. LIOFILIZACIJA

Kadar vodne disperzije nanodelcev shranjujemo skozi daljše časovno obdobje, pogosto opazimo njihovo nestabilnost, ki predstavlja največjo prepreko pri uporabi nanodelcev. Zaradi velike mejne površine in z njo povezane proste površinske energije skušajo

nanodelci doseči energijsko ugodnejše stanje. Nestabilnost je lahko fizikalna, kemijska ali biološka. Pri fizikalni nestabilnosti velja omeniti dve vrsti sil, ki delujejo na nanodelce v disperziji, in sicer so to difuzijske sile, znane kot termično oz. Brownovo gibanje ter gravitacijska sila. Obe vrsti sil si nasprotujeta, vendar je v koloidnih sistemih Brownovo gibanje bolj izrazito kot gravitacijska sila, kar sistem sili, da ostane dispergirano. Agregacija in flokulacija se pojavita v primeru, da disperziji dodamo polimer z visoko molekulsko maso, učinkovino ali pa ionske stabilizatorje enakih nabojev v kombinaciji z nasprotno nabitimi ioni ali drugim nasprotno nabitim stabilizatorjem (heterokoagulacija). Kemijska stabilnost disperzije nanodelcev je odvisna od pogojev shranjevanja (pH, temperatura) in sestave sistema (polimer, učinkovina). Nanodelci, pripravljene iz polimerov, ki se razgrajujejo v vodnem okolju, bodo sčasoma hidrolizirali. Kemijska nestabilnost učinkovine se lahko kaže kot uhajanje učinkovine iz nanodelcev ali kemijska sprememba učinkovine med shranjevanjem (npr. povezano s hidrolitično razgradnjo polimera). V disperziji nanodelcev lahko začnejo rasti mikroorganizmi, kar pomeni biološko nestabilnost [26].

Stabilnost disperzij nanodelcev omogočajo elektrostatske odbojne sile, sterična stabilizacija in stabilnost filma stabilizatorja, dolgotrajno stabilnost pa dosežemo le s popolno odstranitvijo vode [26].

1.3.1. Liofilizacija disperzij nanodelcev

Da bi izboljšali stabilnost koloidnih sistemov, ki vsebujejo vodo, uporabimo liofilizacijo. Gre za pogosto uporabljen proces na področju farmacije, pri katerem vzorec zmrzujemo in iz njega s pomočjo sublimacije in desorpcije ob uporabi vakuumu vodo odstranimo. Liofilizacija je relativno počasen in drag postopek, ki se uporablja le za produkte z visoko dodano vrednostjo in je sestavljen iz treh korakov: zmrzovanja, primarnega in sekundarnega sušenja. Z zmrzovanjem pretvorimo vodne raztopine v kristale ledu. Disperzije lahko zmrzujemo v tekočem dušiku, z razprševanjem v tok mrzlega plina in na mrzli plošči z možnostjo reguliranja temperature. Hitrost zmrzovanja vpliva tako na poznejšo sublimacijo kot tudi na končno kakovost suhega produkta. Splošno velja, da počasno zmrzovanje skrajša čas sublimacije, ker se zaradi velikih kristalov ledu pri sublimaciji tvorijo velike pore, s hitrim zmrzovanjem pa se izognemo agregaciji nanodelcev. S primarnim sušenjem omogočimo sublimacijo zmrznjenega topila in oblikovanje poroznega materiala. To dosežemo z znižanjem temperature in tlaka na

vrednost pod trojno točko. Med sekundarnim sušenjem pa s postopnim dvigom temperature dovedemo energijo, potrebno za desorpcijo vode, ki ni zmrznila/sublimirala. Na tej stopnji sušenja je lahko temperatura višja od temperature tališča topila, a hkrati nižja od temperature steklastega prehoda matriksa. Tlak je lahko celo nižji kot v prvi stopnji sušenja [26, 27].

Liofilizat nanodelcev naj bi izpolnjeval naslednje zahteve: zaščita primarnih kemičnih in fizikalnih lastnosti produkta (kratek čas redispergiranja, nizka ali nespremenjena velikost delcev v disperziji, nespremenjena aktivnost učinkovine ter sprejemljiv videz liofilizata in disperzije), sprejemljiva relativna vlažnost in dolgoročna stabilnost. Za pridobivanje produkta visoke kakovosti je treba kontrolirati formulacijo disperzije nanodelcev, proces liofilizacije in pogoje shranjevanja. Na odpornost nanodelcev na stres med liofilizacijo (zmrzovanje, dehidracija) vplivajo vrsta polimera in lipida ter narava stabilizatorjev, ki jih uporabimo za oblikovanje nanodelcev ter vrsta in koncentracija dodanih krioprotektantov [26].

Pri liofilizaciji med fazo zmrzovanja pride do nastanka dveh faz: ledu in krio-koncentrirane raztopine, ki je sestavljena iz nanodelcev in drugih komponent formulacije (prosti stabilizatorji, pufri in prosta U). Da bi zagotovili popolno zmrznjenost vzorca pri prvem koraku liofilizacije, moramo vzorec ohladiti pod temperaturo steklastega prehoda – T_g . Ta visoko koncentrirana faza lahko povzroči agregacijo in ireverzibilno fuzijo nanodelcev, kristalizacija ledu pa lahko povzroči mehanski stres in destabilizacijo nanodelcev. Pri drugem koraku liofilizacije moramo temperaturo držati pod temperaturo kolapsa formulacije. Pri tretjem koraku liofilizacije pa moramo odstraniti vso vodo, saj lahko le-ta v nasprotnem primeru dvigne T_g formulacije, povzroči kristalizacijo krioprotektanta in destabilizira sistem [26].

1.3.2. Uporaba krioprotektantov

Da bi občutljive sisteme zaščitili pred stresi liofilizacije, uporabljamo snovi, ki jih ščitijo pred stresom zmrzovanja (krioprotektant) in sušenja (lioprotektant) ter povečajo stabilnost sistemov med shranjevanjem. Najpogosteje uporabljeni krioprotektanti za liofilizacijo nanodelcev so sladkorji (trehaloza, saharoza, glukoza, manitol). Za te sladkorje je značilno, da T_g raztopine zvišajo na T_g' . Pod temperaturo steklastega prehoda tvorijo steklast matriks, ki imobilizira nanodelce in jih zaščiti pred agregacijo in mehanskimi poškodbami

z ledenimi kristali. Nekatere pomožne snovi (pufri, manitol) lahko delno kristalizirajo med zmrzovanjem, vendar večina krioprotektantov ostane v amorfni obliki [26].

V diplomskem delu smo kot krioprotektant uporabili trehalozo, saj je v literaturi opisana kot najbolj pogosto uporabljeni sladkor, ki daje najboljše rezultate. Trehaloza je disaharid, ki ga je največ v mladih gobah. Nastane iz dveh D-glukoz, ki sta povezani z α, α -1,1-glikozidno vezjo. S kislom hidrolizo trehaloze dobimo dve glukozi [28]. Kot krioprotektant za biomolekule ima številne prednosti: manjša higroskopnost, odsotnost notranjih vodikovih vezi, ki dopuščajo bolj fleksibilne vodikove vezi z nanodelci med liofilizacijo, zelo nizka kemična reaktivnost in višja temperatura steklastega prehoda [26].

Na stopnjo stabilizacije sistema vpliva koncentracija krioprotektanta. Višja kot je koncentracija, večja je stopnja stabilizacije. Po drugi strani pa lahko v nekaterih primerih povečana koncentracija nanodelcev destabilizira sistem. Med zmrzovanjem, dokler je temperatura nad T_g , krioprotektanti stabilizirajo nanodelce z vrivanjem med njih, pod T_g pa so nanodelci že ujeti v steklasti matriks krioprotektantov. Nekateri stabilizatorji v vodni fazi, ki jih uporabljamo pri oblikovanju nanodelcev, lahko uspešno stabilizirajo nanodelce tudi med procesom liofilizacije brez dodatka krioprotektantov. Uspeh liofilizacije je torej odvisen od koncentracije krioprotektantov oz. od masnega razmerja med krioprotektantom in nanodelci, odločilno pa vpliva tudi koncentracija nanodelcev [26].

Druga razlaga stabilizacije disperznih sistemov s krioprotektanti je izolacija posameznih delcev s sladkorji v nezmrznjeni frakciji in s tem preprečitev agregacije med zmrzovanjem nad T_g [23].

1.4. VREDNOTENJE NANODELCEV

1.4.1. Velikost in polidisperzni indeks

Naprava Zetasizer Nano ZS meri velikost delcev na podlagi dinamičnega sipanja svetlobe (DLS), imenovanega tudi fotonska korelacijska spektroskopija (PCS). Naprava določi velikost delcev na podlagi Brownovega gibanja. Delce osvetlimo z lasersko svetlobo in analiziramo spreminjanje intenzitete sipane svetlobe. Če blizu delca postavimo zaslon, bo ta osvetljen s sipano svetlobo. Če pa zamenjamo en delec s tisočimi, se bo na zaslonu pojavil vzorec belih pik in temnih področij, kjer ni detektirane svetlobe. Svetle lise dobimo tam, kjer svetlobni valovi padajo na zaslon v isti fazi in interferirajo konstruktivno, medtem ko so fazni prispevki na temnih področjih medsebojno destruktivni in se izničijo.

Če bi bili delci negibljivi, se tudi vzorec svetlečih pik na zaslonu ne bi spreminjal niti v poziciji niti v velikosti [23, 29].

Dejansko pa delci, suspendirani v tekočini, niso nikoli stacionarni. Zaradi naključnih trkov z molekulami topila so stalno podvrženi Brownovemu gibanju. Pomembno dejstvo za DLS je, da se majhni delci gibljejo hitreje kot veliki. Razmerje med velikostjo delca in njegovu hitrostjo, kot posledico Brownovega gibanja, je podano v Stokes-Einsteinovi enačbi. Ker se delci neprestano gibljejo, se spreminja vzorec svetlih pik na zaslonu. Z gibanjem delca konstruktivni in destruktivni fazni prispevki valov sipane svetlobe vodijo v naraščanje in upadanje intenzitete osvetljenih in neosvetljenih predelov na zaslonu [23, 30].

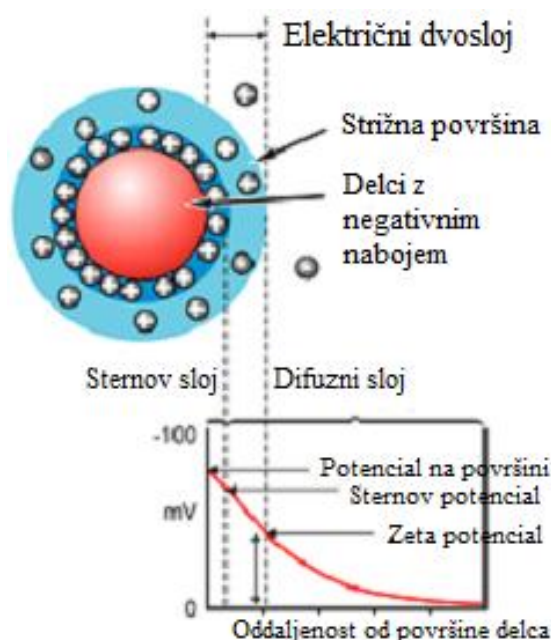
Zetasizer Nano ZS meri stopnjo nihanja intenzitete sipane svetlobe in na podlagi teh meritev izračuna velikost delcev. Problem tega principa merjenja je v tem, da prisotnost velikih delcev v raztopini močno zmanjša možnost detekcije manjših delcev. Na podlagi te teorije tudi lahko pojasnimo, zakaj je povprečna velikost delcev, ki jo izračuna digitalni korelator, komponenta naprave Zetasizer, manjša od velikosti, kjer se nahaja vrh intenzitete sipane svetlobe. Manjši delci, čeprav jih je več, manj sipajo svetlobo in vrh se pomakne k večjim vrednostim. Rezultati so torej zanesljivi šele, ko je velikost delcev v disperziji dovolj homogena. Naprava sama oceni kakovost rezultatov na podlagi ustreznosti števila sipanja in polidisperznega indeksa [23].

1.4.2. Zeta potencial

Zetasizer Nano ZS izračuna zeta potencial na podlagi elektroforetske gibljivosti z uporabo Henryjeve enačbe. Na vzorcu izvedemo elektroforetski eksperiment in določimo hitrost gibanja delcev v električnem polju z merjenjem Dopplerjevega premika laserske svetlobe, ki jo sipajo ti gibajoči se delci. Princip je imenovan lasersko Dopplerjevo merjenje hitrosti. Hitrosti delca v električnem polju pravimo torej elektroforetska mobilnost in je odvisna od moči električnega polja, dielektrične konstante, viskoznosti medija in zeta potenciala. Če raztopino elektrolita postavimo v električno polje, bodo nabiti delci potovali k nasprotno nabiti elektrodi. Temu gibanju bodo nasprotovale viskozne sile na delec. Delec se bo gibal s konstantno hitrostjo, ko bo doseženo ravnotežje med tema dvema nasprotujočima si silama [30, 31].

1.4.2.1. Električni dvosloj

Površinski naboj delca vpliva na porazdelitev ionov v okoliški raztopini (Slika 6). Posledično se v bližnji okolici delca poveča koncentracija protiionov. Sloj, ki obdaja delce, sestoji iz dveh delov: notranjega Sternovega sloja, kjer so ioni močno vezani na površino delca in zunanjega difuznega sloja, kjer je povečana koncentracija prosto gibajočih se ionov v tekočini. Znotraj difuznega sloja obstaja meja, do katere delec in ioni tvorijo stabilno entiteto. Ko se delec giblje, se ioni do te meje gibljejo z njim, ostali pa se odstranijo. Potencial, ki obstaja na tej meji, se imenuje zeta potencial. Vrednost zeta potenciala podaja informacijo o fizikalni stabilnosti koloidnih sistemov. Če imajo vsi delci v disperziji močno negativen/pozitiven zeta potencial, se med sabo odbijajo in ne težijo k flokulaciji. Za splošno mejo med stabilno in nestabilno disperzijo običajno velja zeta potencial ± 30 mV. Za suspenzije, katerih delci imajo zeta potencial bolj pozitiven od 30 mV oz. bolj negativen od -30 mV, pravimo, da so fizikalno stabilne. Delci so bolj pozitivno nabiti pri nižjih vrednostih pH in bolj negativno pri višjih vrednostih. V izoelektrični točki ima zeta potencial vrednost nič, delci pa nimajo naboja; koloidni sistem je tu najmanj fizikalno stabilen. Najbolj pomemben faktor, ki vpliva na vrednost zeta potenciala, je torej pH [23].



Slika 6: Prikaz površinskega naboja delca v raztopini [32].

2. NAMEN DELA

Nanodelce bomo izdelali z metodo samoasociiranja polimera in lipida. Disperzijo nanodelcev bomo pripravili tako, da bomo v razredčeno raztopino hitosana ob stalnem počasnem mešanju z rotor-stator homogenizatorjem direktno injicirali etanolno raztopino lecitina. Kot modelni protein bomo v nanodelce vgrajevali ovalbumin.

Na začetku bomo naredili osnovne raziskave na samem ovalbuminu oz. njegovih raztopinah. Določili bomo temperaturo denaturacije ter ugotavljali stabilnost raztopin ovalbumina pri različnih temperaturah in pH-vrednostih. Nato bomo določili optimalne pogoje za izdelavo nanodelcev. Spremljali bomo povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial nanodelcev v odvisnosti od pH in časa. Disperzije bomo liofilizirali ter preverili velikost in polidisperzni indeks nanodelcev po redispergiranju v odvisnosti od koncentracije dodanega krioprotektanta.

Na podlagi izbranih optimalnih pogojev iz prvega dela naloge bomo v drugem delu izdelali nanodelce z različnimi začetnimi koncentracijami ovalbumina. Primerjali bomo velikost praznih nanodelcev in nanodelcev z različnimi koncentracijami ovalbumina. S HPLC-analitiko bomo določili učinkovitost vgrajevanja ovalbumina v nanodelce in profil sproščanja ovalbumina iz nanodelcev.

Glavni cilj diplomske naloge bo razviti metodo izdelave nanodelcev, katere osnova je spontano združevanje polimera in lipida. Takšna metoda ne vključuje vnosa energije v sistem, zato bo primerna za vgrajevanje občutljivih molekul, kot so npr. proteini.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1. MATERIALI

Sestavine nanodelcev

Polimer

- Hitosan, Chitosan low-viscous (Fluka, Švica)

Lipida

- Phospholipon® 50 (Lipoid, Nemčija)
- Phospholipon® 80 (Rhône-Poulenc, Nattermann Phospholipid GmbH, Nemčija)

Protein

- Ovalbumin Grade II: albumin iz jajčnega beljaka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

Topila

- Aceton, CH_3COCH_3 (Merck, Nemčija)
- Etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (Merck, Nemčija)
- Klorovodikova kislina, HCl (Merck, Nemčija)
- Prečiščena voda

Krioprotektant

- Trehaloza dihidrat, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MM}=378$ g/mol (Quadrant Holdings, Anglija)

Reagent za zmrzovanje disperzij nanodelcev

- Tekoči dušik

Tekoči dušik je dušik v tekočem stanju pri zelo nizkih temperaturah (pri atmosferskem tlaku se utekočini pri temperaturi -196 °C).

Reagenti za pripravo mobilne faze in medija za sproščanje ovalbumina iz nanodelcev

- Dinatrijev hidrogenfosfat, Na_2HPO_4 , $\text{MM}=142$ g/mol (Merck, Nemčija)
- Fosforna kislina, H_3PO_4 , 85 %, $\rho=1,71$ kg/l, $\text{MM}=98$ g/mol (Merck, Nemčija)
- Kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 , $\text{MM}=136,1$ g/mol (Merck, Nemčija)
- Kalijev klorid, KCl , $\text{MM}=74,6$ g/mol (Merck, Nemčija)

- Natrijev hidroksid, NaOH, MM=40 g/mol (Merck, Nemčija)
- Natrijev klorid, NaCl, MM=58,5 g/mol (Merck, Nemčija)
- Bidestilirana voda

Priprava mobilne faze

Mobilno fazo za HPLC-analizo smo pripravili iz NaCl in Na₂HPO₄ ter bidestilirane vode. Ko sta se obe soli raztopili (cca. 1-2 uri), smo raztopino s fosforno kislino umerili na pH=7. Za pripravo dveh litrov mobilne faze smo v dvolitrsko bučko natehtali 5,68 g Na₂HPO₄ in 15,2 g NaCl ter dopolnili z bidestilirano vodo do oznake.

Priprava medija za sproščanje ovalbumina iz nanodelcev

Kot medij, v katerem smo določali sproščanje ovalbumina iz nanodelcev, smo uporabili fosfatni pufer s pH=7,4. Za pripravo pufra (1 liter) smo natehtali 8 g NaCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl, 0,24 g KH₂PO₄. Natehte smo vsuli v 1000 ml bučko in dopolnili do oznake z bidestilirano vodo. Ko so se vse soli raztopile, smo raztopini pomerili pH, ki je znašal 7,3. Raztopino smo titrirali z 0,01 M NaOH do pH=7,4.

3.2. NAPRAVE

- Analitska tehtnica Exacta (Tehtnica, Slovenija)
- Aparat za pripravo ultra čiste vode Purelab Classic VF (Elga, Anglija)
- Centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Slovenija)
- Elektronske pipete e 5000 (100-5000 μ l), e 1000 (50-1000 μ l) (Biohit, Nemčija)
- HPLC-instrument (Agilent, 1100 Series, Hewlet Packard, Nemčija) s kolono za gelsko filtracijo s stabilizirano hidrofilno stacionarno fazo (4-4,5 μ m; 25 cm x 9,4 mm; Zobrax GF-250, Agilent technology, ZDA) in predkolono (Diol Guard Column 4,6 mm x 12,5 mm)
- Liofilizator Beta 1-8K (Christ, Nemčija)
- Magnetno mešalo (IKA-WERKE, Nemčija)
- Magnetno mešalo in grelec (IKA-RTC basic, Nemčija)
- Naprava za merjenje velikosti delcev Zetasizer Nano ZS (PCS naprava) (Malvern, Velika Britanija)
- pH meter MA235 (Mettler Toledo, Amerika)
- Precizna tehtnica AG245 (Mettler Toledo, Amerika)
- Rotor-stator homogenizator Ultra-turrax (IKA, Nemčija)
- Rotor za bučke RW30 (IKA, Nemčija)
- Ultracentrifuga 3K30 (Sigma, Nemčija)
- Ultrazvočna kad Sonis4 PIO (Iskra, Slovenija)

3.3. METODE

3.3.1. Izdelava nanodelcev

3.3.1.1. Priprava raztopin hitosana in lecitina

Raztopina hitosana v klorovodikovi kislini

Hitosan smo raztopili v 0,275 M HCl, da smo dobili koncentracijo 10 mg/ml. V 5 ml bučko smo zatehtali 50 mg hitosana, dodali do oznake 0,275 M HCl, pokrili z zamaškom in pustili mešati na magnetnem mešalu. Ko se je ves hitosan raztopil (cca. dve uri), smo dobljeno bistro raztopino prelili v 500 ml bučko in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo. Tako smo dobili 100-krat redčeno raztopino hitosana s koncentracijo 0,1 mg/ml. Tej raztopini smo izmerili pH, ki je znašal 2,8.

Pri določenih poskusih smo osnovni raztopini hitosana s pH=2,8 dvignili pH na 4,5, 6, 7 in 7,5 z dodajanjem 0,01 M oz. 0,1 M NaOH ter opazovali možno obarjanje takoj in po enem dnevu.

Raztopina lecitina v etanolu (acetonu)

Posamezno vrsto lecitina (Phospholipon® 50 oz. 80) smo raztopili v etanolu, da smo dobili koncentracijo 25 mg/ml. Navadno smo raztopine lecitina pripravljali v 25 ml bučkah. V bučko smo zatehtali 625 mg Phospholipona® 50 oz. 80, dopolnili do oznake z etanolom, pokrili z zamaškom in pustili mešati na magnetnem mešalu. Po slabi uri sta se Phospholipona® popolnoma raztopila; nastali sta bistri rumeni raztopini.

Raztopino lecitinov smo poskusili pripraviti tudi v acetonu, vendar je njuna topnost premajhna, da bi bilo takšno raztopino smiselno uporabiti pri izdelavi nanodelcev.

3.3.1.2. Izdelava nanodelcev iz hitosana in lecitina

4 ml etanolne raztopine lecitina (Phospholipon® 50, Phospholipon® 80) s koncentracijo 25 mg/ml (100 mg lecitina v vzorcu) smo s konstantno hitrostjo injicirali skozi injekcijsko brizgo v 46 ml raztopine hitosana s koncentracijo 0,1 mg/ml (4,6 mg hitosana v vzorcu) med mešanjem z Ultra-turraxom pri 5000 obratih/minuto. Dobili smo mlečno disperzijo nanodelcev z masnim razmerjem lecitin:hitosan cca. 20:1. Izdelano disperzijo nanodelcev smo pustili čez noč na magnetnem mešalu, da je odhlapel prisoten etanol.

3.3.1.3. Vgrajevanje ovalbumina v nanodelce

Ovalbumin smo raztopili v raztopini hitosana. Različne koncentracije smo dosegli z redčenjem. V 200 ml bučko smo zatehtali 20 mg ovalbumina in dopolnili do oznake z raztopino hitosana ($c_{OVA} = 0,1$ mg/ml). Ko se je ovalbumin raztopil (mešanje na magnetnem mešalu eno uro), smo iz te raztopine odpipetirali 50 ml v 100 ml bučko in dopolnili do oznake z raztopino hitosana ($c_{OVA} = 0,05$ mg/ml) ter v drugo 100 ml bučko 10 ml in dopolnili do oznake z raztopino hitosana ($c_{OVA} = 0,01$ mg/ml). Raztopine hitosana z različnimi koncentracijami ovalbumina smo prefiltrirali skozi filter z velikostjo por $0,2 \mu\text{m}$, da smo odstranili nečistote, ki so lahko prisotne v hitosanu ali ovalbuminu, saj gre za material naravnega izvora. Takšne raztopine ($0,01$ mg/ml, $0,05$ mg/ml, $0,1$ mg/ml) smo uporabili pri izdelavi nanodelcev po zgoraj opisanih postopkih.

3.3.1.4. Vpliv pH na izdelavo in stabilnost disperzije nanodelcev

Različne pH-vrednosti končne disperzije nanodelcev smo dosegli z dodajanjem $0,01$ M oz. $0,1$ M NaOH. Vrednosti pH smo spreminjali bodisi raztopini hitosana bodisi končni disperziji nanodelcev. Osnovna raztopina hitosana je imela pH $2,8$. Z $0,1$ M NaOH smo dvignili pH na določene vrednosti (3 , $3,5$, 4 , $4,5$) in izdelali nanodelce. Disperzijam nanodelcev smo še bolj dvignili pH (na 5 , 6 , 7 in $7,5$) z $0,01$ M NaOH.

V primeru, da smo v nanodelce vgrajevali ovalbumin, smo le-tega dodali osnovni raztopini hitosana s $\text{pH}=2,8$ in izdelali nanodelce. Izdelani disperziji smo nato z $0,01$ M NaOH dvignili pH na vrednosti $4,5$ in $7,4$.

3.3.2. Fizikalno vrednotenje nanodelcev

Povprečni premer (d) in **polidisperzni indeks (PI)** nanodelcev smo ocenili z metodo PCS s pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS. Povprečni premer nam pove povprečno velikost nanodelcev, medtem ko je polidisperzni indeks merilo za širino porazdelitve velikosti nanodelcev. Vrednosti PI blizu 0 kažejo na monodisperznost vzorca, kar pomeni, da so delci zelo podobnih velikosti. Če pa je PI večji in se približuje 1 , je vzorec polidisperzen in s tem delci zelo različnih velikosti. Zaželeno je, da je vrednost polidisperznega indeksa manjša od $0,2$.

Pogoji meritev:

- temperatura: 25 °C
- viskoznost disperznega medija: $\eta = 0,8872$ mPas (voda)

- lomni količnik disperznega medija: $RI = 1,330$ (voda)
- valovna dolžina laserske svetlobe (He-Ne laser, »rdeči laser«): $\lambda = 633 \text{ nm}$
- kot merjenja: 173°
- celica: DTS0012, kiveta
- število meritev: 1-3

V primeru, da smo določali velikost redispergiranim liofiliziranim nanodelcem, smo disperzije predhodno centrifugirali pri 5000 obratih/minuto, da smo odstranili možne prisotne večje agregate, ki bi sicer motili samo meritev.

Zeta potencial (ZP) nanodelcev v disperziji smo določili z metodo laserske Dopplerjeve elektroforeze.

Pogoji meritev:

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

3.3.3. Liofilizacija disperzij nanodelcev

Disperzije nanodelcev smo liofilizirali 24 ur pri tlaku $0,630 \text{ mbar}$. Liofilizat smo nato redispergirali ter določali povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial. Disperzijam smo pred liofilizacijo dodali krioprotektant trehalozo z namenom zaščite vzorca pred stresu zmrzovanja in sušenja.

Priprava disperzije nanodelcev in raztopine trehaloze za liofilizacijo:

Uporabili smo disperzije nanodelcev, ki so bile izdelane iz Phospholipona® 50 oz. 80 in raztopine hitosana s pH 2,8 oz. 4,5. Tako smo dobili štiri različne disperzije.

Raztopino trehaloze smo pripravili s koncentracijo, ki je bila 10-krat večja od koncentracije suhih snovi v disperziji nanodelcev ($45,48 \text{ mg/ml}$).

Liofilizacijo smo izvedli v $1,5 \text{ ml}$ mikrocentrifugirkah. Pokrovček vsake mikrocentrifugirke smo preluknjali s šivanko in vanjo odpipetirali po $1000 \mu\text{l}$ disperzije nanodelcev. Nato smo dodali ustrezno količino raztopine trehaloze in tako dosegli masno razmerje trehaloza:nanodelci (hitosan+lecitin): 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1

in 0`5:1. Npr. pri razmerju 10:1 smo dodali 1000 μ l disperzije nanodelcev in 500 μ l trehaloze. Pri razmerju 0`5:1 smo raztopino trehaloze 10-krat redčili in nato dodali 25 μ l. Mikrocentrifugirke smo polili s tekočim dušikom, tako da so vzorci zmrznili, nato pa smo jih liofilizirali 24 ur (po 10 mikrocentrifugirk skupaj v bučko z obrusom in bučko na liofilizator s pomočjo posebnega nastavka za bučke).

Disperzije nanodelcev smo liofilizirali tudi za poskus sproščanja ovalbumina iz nanodelcev. Proces liofilizacije je potekal 24 ur pri tlaku 0,630 mbar. V 100 ml bučke z obrusom smo odmerili po 20 ml disperzije nanodelcev. Tako pripravljene vzorce smo ob neprestanem vrtenju bučke okoli svoje osi in pod ustreznim kotom potopili v tekoči dušik (*Slika 7*). Zaradi vrtenja in naklona je vzorec v bučki zmrznil v obliki tankega filma, razporejenega po notranjosti bučke.



Slika 7: Zmrzovanje disperzije nanodelcev v vrteči se bučki s tekočim dušikom.

3.3.4. Analitika ovalbumina

3.3.4.1. HPLC-analitika ovalbumina (gelska filtracija (GF))

Kot analizno metodo za določanje koncentracije ovalbumina smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

Umeritvena krivulja ovalbumina je predstavljal linearno odvisnost med koncentracijo (c) in površino pod vrhovi (A) v koncentracijskem območju med 0,005 mg/ml in 1,000 mg/ml.

Enačba umeritvene premice: $A = 3449,1 \times c \text{ (mg/ml)} - 2,8661$; $r^2 = 0,9997$. Retencijski čas (Rt) za ovalbumin je znašal 9,7 minut.

Parametri meritve s HPLC:

- kolona: Agilent Zorbax Bio Series GF-250, 9·4 mm ID x 250 mm, 4·5 μm
- mobilna faza: 130 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH=7
- pretok: $\Phi = 1,0 \text{ ml/min}$
- temperatura kolone: kontrolirana sobna, T = 23 °C
- detekcija: $\lambda = 210 \text{ nm}$
- volumen injiciranja: V = 10 μl

3.3.4.2. Določitev temperature denaturacije ovalbumina

Ovalbumin smo raztopili v 100 mM raztopini NaCl in raztopino postopno segrevali iz 40 °C na 60 °C (naprava: Zetasizer Nano ZS). Na temperaturnih razmikih 0,7 °C smo pomerili velikost peptidnih verig. Temperaturo, pri kateri je velikost proteina začela signifikantno naraščati, smo označili kot temperaturo denaturacije.

3.3.4.3. Preverjanje stabilnosti raztopin ovalbumina pri različnih pogojih

Raztopine z različnimi koncentracijami ovalbumina (0·1 mg/ml, 0·05 mg/ml, 0·01 mg/ml) smo pripravili v dveh medijih, v raztopini hitosana s pH=4,5 in v fosfatnem pufri s pH=7,4. V 100 ml bučko smo natehtali po 10 mg ovalbumina in dopolnili do oznake z medijema. Pustili smo na magnetnem mešalu eno uro, da se je ovalbumin raztopil. Obe raztopini, ki sta imeli koncentracijo 0,1 mg/ml, smo prefiltrirali skozi 0,45 μm -filter. Ostali dve koncentraciji smo dosegli tako, da smo z medijema redčili pripravljene raztopine s koncentracijo 0,1 mg/ml. Dobili smo raztopine ovalbumina v fosfatnem pufri in raztopine ovalbumina v raztopini hitosana. 500 μl raztopin vsake koncentracije ovalbumina v fosfatnem pufri oz. v raztopini hitosana smo analizirali s HPLC. Iz dobljenih podatkov smo izračunali koncentracije. Iz preostalih vzorcev ovalbumina v obeh medijih smo odmerili po 1000 μl v mikrocentrifugirke, ki smo jih potem pustili stati en dan pri različnih temperaturah: pri sobni temperaturi, v hladilniku in v zmrzovalniku. 500 μl vsakega (staranega) vzorca smo analizirali s HPLC in iz dobljenih podatkov izračunali koncentracije ovalbumina.

3.3.5. Učinkovitost vgrajevanja ovalbumina v nanodelce

Učinkovitost vgrajevanja nam pove, kolikšen delež ovalbumina, ki ga uporabimo pri izdelavi nanodelcev, se vgradi v nanodelce. Če bi se vgradil ves ovalbumin, bi bila učinkovitost vgrajevanja 100 %. Določili smo % vgrajenega ovalbumina (sediment) in % nevgrajenega ovalbumina (supernatant). Maso ovalbumina, ki smo jo uporabili pri izdelavi nanodelcev, smo določili s pomočjo HPLC v prefiltrirani (0,45 µm) raztopini hitosana. Maso ovalbumina, ki se je oz. ni vgradila v nanodelce, pa smo določili tako, da smo v mikrocentrifugirke odpipetirali 1500 µl disperzije nanodelcev in centrifugirali 1 uro pri 24.000 obratih/minuto pri 15 °C. Iz zgornjega dela supernatanta smo s pipeto odvzeli 500 µl in v njem določili koncentracijo ovalbumina s pomočjo HPLC. Dobili smo količino nevgrajenega ovalbumina. Količino vgrajenega ovalbumina smo določili posredno, tako da smo količino nevgrajenega ovalbumina odšteli od mase ovalbumina, uporabljene med izdelavo nanodelcev in učinkovitost vgrajevanja izračunali po spodnji formuli (*Enačba 1*). Količino vgrajenega ovalbumina smo določili tudi iz sedimenta. Iz mikrocentrifugirke smo previdno odlili še preostali supernatant, dodali do oznake za 1 ml prečiščeno vodo s pH=6 (sklepamo, da se pri tem pH sediment najlažje razbije, ker je zeta potencial nanodelcev 0 in je posledično kompleks najmanj stabilen), stresali ročno, nato smo dali še v ultrazvočno kadičko za 20 minut. Disperzijo smo nato prefiltrirali skozi 0,2 µm-filter in v filtratu določili vsebnost ovalbumina s pomočjo HPLC (*Enačba 2*).

Učinkovitost vgrajevanja ovalbumina (izračunana posredno iz supernatanta):

$$\% \text{ vgrajenega OVA} = \frac{(\text{količina uporabljene OVA pri izdelavi ND} - \text{količina nevgrajenega OVA})}{\text{količina uporabljene OVA pri izdelavi ND}} \times 100 \%$$

Enačba 1

Učinkovitost vgrajevanja ovalbumina (izračunana neposredno iz sedimenta):

$$\% \text{ vgrajenega OVA} = \frac{\text{količina vgrajenega OVA}}{\text{količina uporabljene OVA pri izdelavi ND}} \times 100 \%$$

Enačba 2

3.3.6. Sproščanje ovalbumina iz liofiliziranih nanodelcev

Za določanje sproščanja ovalbumina smo uporabili enako HPLC-analitiko kot pri določanju učinkovitosti vgrajevanja ovalbumina v nanodelce. Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev smo spremljali 24 ur v fosfatnem pufru s pH=7,4. Liofilizate iz bučk smo

redispersgirali v mediju za sproščanje. V bučke smo dodali 20 ml fosfatnega pufra (najprej 10 ml, nato še 10 ml). Disperzije smo prelili v 25 ml čaše, ki smo jih pokrili s parafilmom in dali na magnetno mešalo, kjer smo izvajali sproščanje. V ustreznih časovnih intervalih (0 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 24 h) smo vzorčili po 1500 μ l disperzije nanodelcev. Ta volumen smo dali v mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 uro pri 24.000 obratih/minuto pri 15 °C. Iz zgornjega dela supernatanta smo odpipetirali 500 μ l in v njem določili koncentracijo ovalbumina s pomočjo HPLC. Preostanku v mikrocentrifugirki smo dodali 500 μ l fosfatnega pufra in razbili sediment z iglo (ročno stresanje in ultrazvočna kadička nista bila uspešna postopka). Vsebino smo zlili nazaj v čašo na magnetnem mešalu in tako vsakič vrnilo tolikšen volumen kot smo ga odvzeli. Iz HPLC-podatkov smo izračunali koncentracijo sproščenega ovalbumina (v mg/ml) v določenih časovnih točkah in iz teh koncentracij ustrezno preračunali maso sproščenega ovalbumina (v mg).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI SESTAVIN NANODELCEV

4.1.1. Iskanje ustreznega topila za lecitin

Za izdelavo nanodelcev iz hitosana in lecitina potrebujemo raztopino lecitina v organskem topilu, ki se popolnoma meša z vodo. Ko takšno raztopino injiciramo v vodno raztopino hitosana, organsko topilo oddifundira v vodo, nato pa na zraku odhlapi. Kot organski topili za lecitin smo preizkusili etanol in aceton. Phospholipon® 50 in Phospholipon® 80 sta se po eni uri v etanolu popolnoma raztopila (25 mg/ml). V obeh primerih je nastala bistra, rumeno obarvana raztopina. Obe vrsti lecitinov smo poskusili v enaki koncentraciji kot v etanolu raztopiti v acetonu, vendar se tudi po 24-urnem mešanju na magnetnem mešalu nista raztopila. Tudi po literaturi se lecitin v acetonu ne topi [33]. Kot organsko topilo smo izbrali etanol. Na *Sliki 8* je prikazana topnost obeh lecitinov v etanolu in netopnost v acetonu.

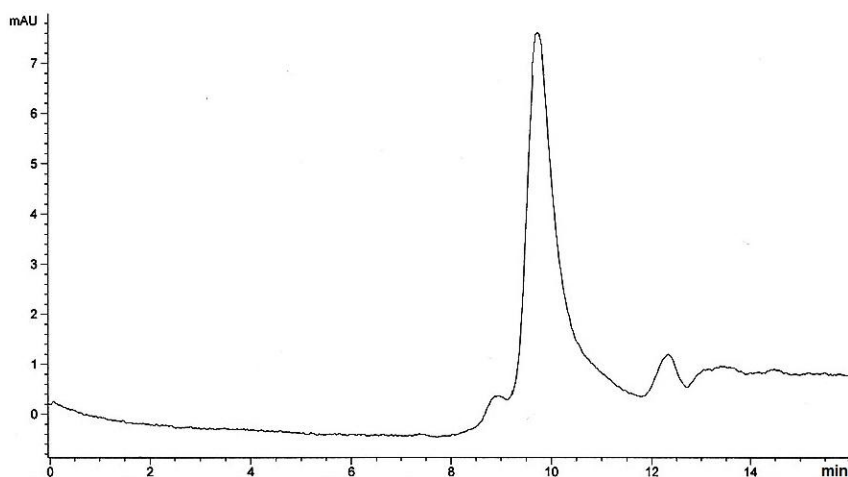


Slika 8: Disperzije Phospholipona® 50 (levi bučki) oz. Phospholipona® 80 (desni bučki) v etanolu (skrajni bučki) oz. acetonu (sredinski bučki).

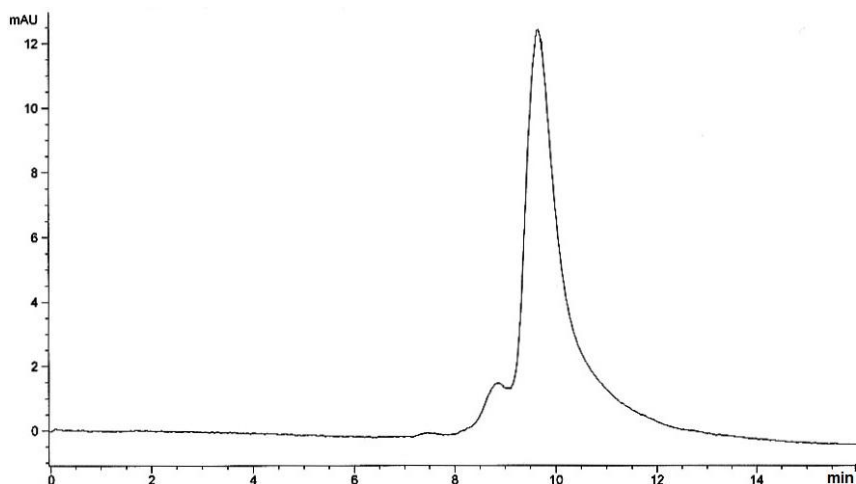
4.1.2. Analitika ovalbumina

4.1.2.1. HPLC-analitika ovalbumina

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je predstavljala analizno metodo za določanje koncentracije ovalbumina. S HPLC-analitiko smo dobili kromatograme, kjer je absciso grafa predstavljal čas (min), ordinato pa absorbanca (mAU). Iz površine pod krivuljo smo po enačbi umeritvene premice izračunali koncentracijo ovalbumina.



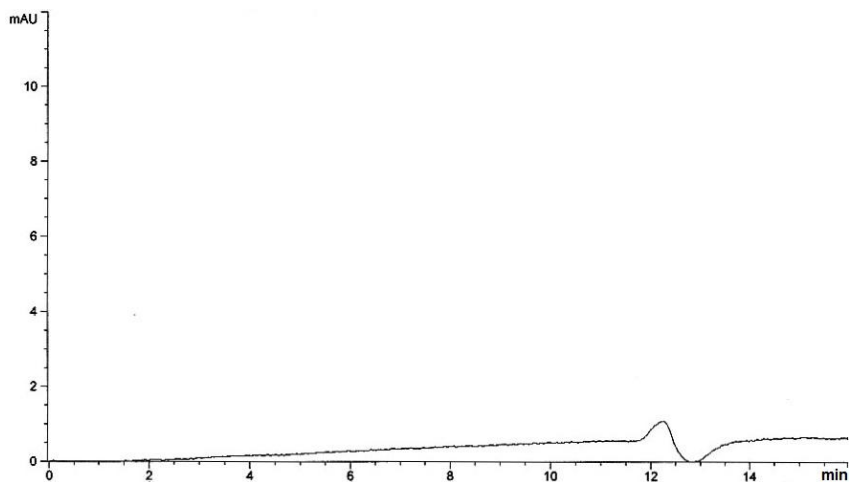
Slika 9: Kromatogram ovalbumina v supernatantu disperzije nanodelcev.



Slika 10: Kromatogram samega ovalbumina v mobilni fazi.

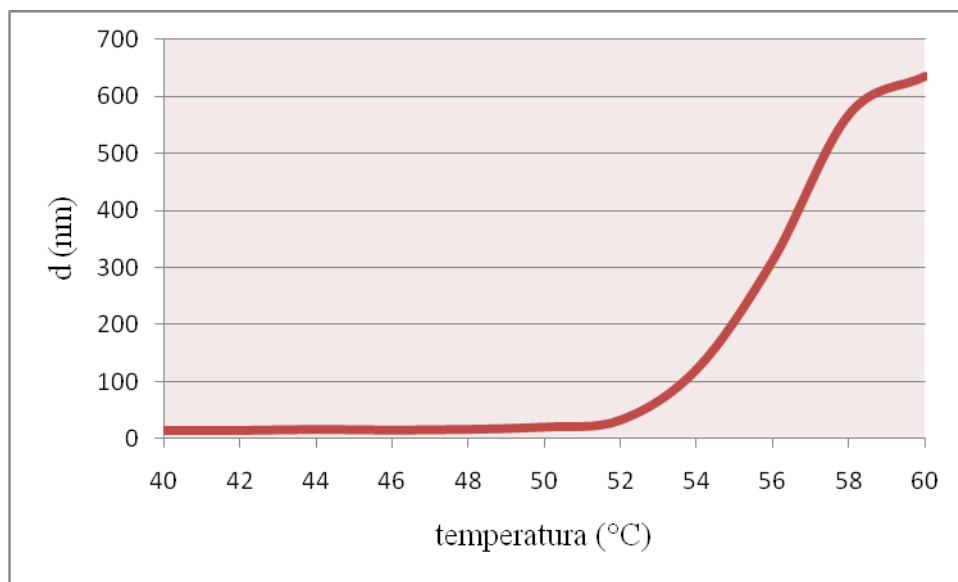
Sliki 9 in 10 predstavljata kromatogram ovalbumina v supernatantu disperzije nanodelcev iz hitosana in lecitina oz. kromatogram samega ovalbumina v mobilni fazi. Če sliki primerjamo, vidimo, da sta krivulji enaki: obe dosežeta vrh pri času okoli 9,7 minut, ki je retencijski čas ovalbumina ter imata pred glavnim vrhom še dodaten majhen vrh pri času

okoli 8,7 minut – gre za nečistoto, prisotno v samem ovalbuminu (v diplomskem delu smo uporabljali Ovalbumin Grade II, ki ni najvišje stopnje čistosti). Na kromatogramu ovalbumina v supernatantu disperzije nanodelcev (*Slika 9*) se pri času 12,3 minut pojavi še dodaten vrh, ki ustreza hitosanu. To smo dokazali z analizo same raztopine hitosana (*Slika 11*).



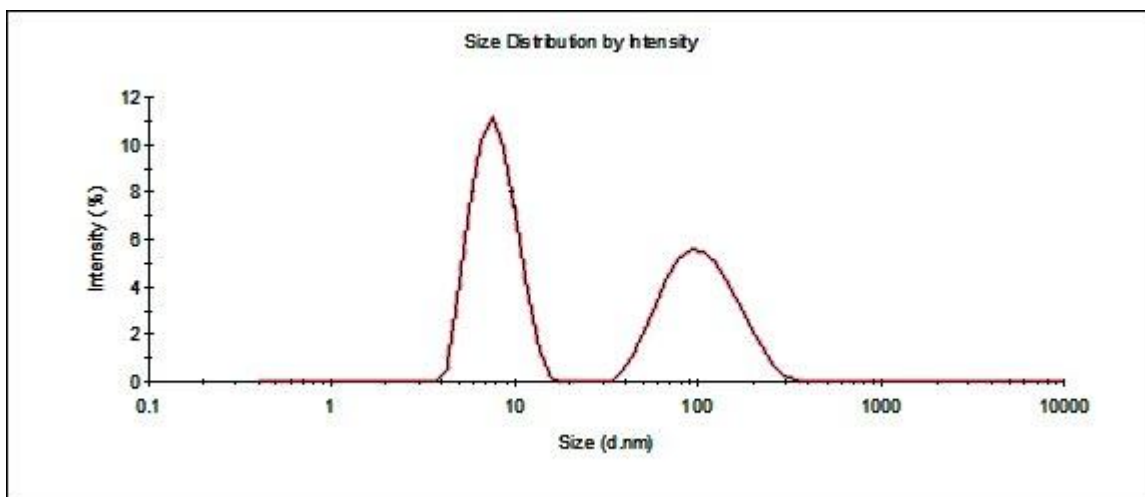
Slika 11: Kromatogram raztopine hitosana.

4.1.2.2. Temperatura denaturacije ovalbumina

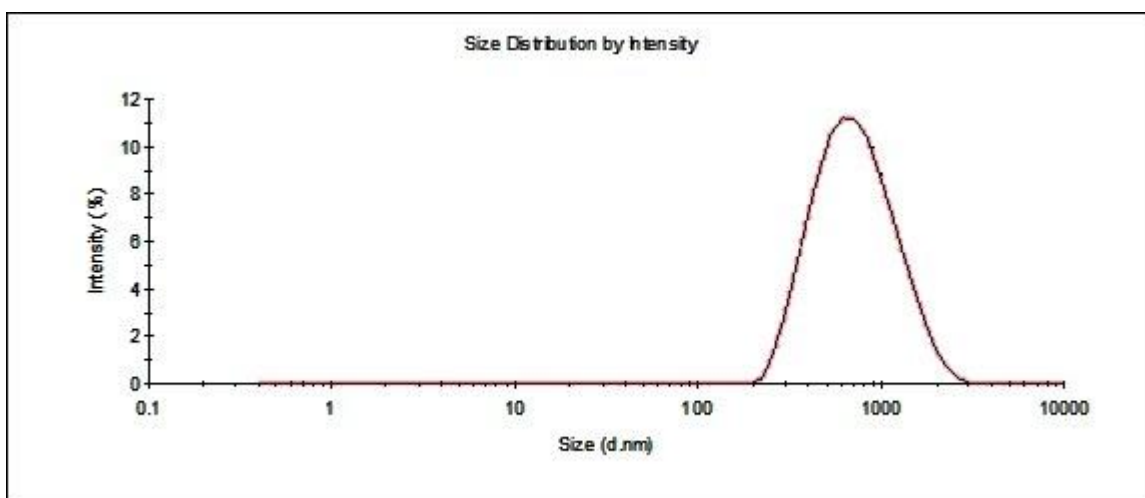


Slika 12: Povprečna velikost ovalbumina v odvisnosti od temperature.

Denaturacijo ovalbumina smo določili pri temperaturi 54 °C (Slika 12). Protein pri tej temperaturi preide iz nativne v denaturirano obliko, izgubi svojo globularno konformacijo in njegova velikost začne značilno naraščati. Sliki 13 in 14 predstavljata povprečno velikost ovalbumina pri 40 °C oz. 60 °C v 100 mM raztopini NaCl. Pri temperaturi 40 °C (Slika 13), ko ovalbumin še ohranja nativno obliko, vidimo dva vrhova. Krivulja ima prvi vrh pri 8 nm, drugega pri 111 nm. Vrh pri 111 nm je možna posledica kompleksov (npr. dimerov), ki jih ovalbumin v raztopini lahko tvori. Pri temperaturi 60 °C (Slika 14), ko je ovalbumin že denaturiran in nima več globularne konformacije, ima krivulja samo en vrh in sicer pri 788 nm. Primerjava povprečne velikosti ovalbumina pri 40 °C (8 nm) in 60 °C (788 nm) dokazuje značilno naraščanje velikosti ovalbumina po točki denaturacije, t.j. po 54 °C.



Slika 13: Povprečna velikost ovalbumina v 100 mM raztopini NaCl pri T=40 °C.



Slika 14: Povprečna velikost ovalbumina v 100 mM raztopini NaCl pri T=60 °C.

Izpostavitve ovalbumina temperaturi denaturacije spremeni tudi videz same raztopine proteina (*Slika 15*). Bistra raztopina postane motna in takšna tudi ostane. Deformacija proteina je torej ireverzibilen proces, velikost denaturiranega proteina pa doseže takšne velikosti, da jih naše oko že zazna kot motnost raztopine.



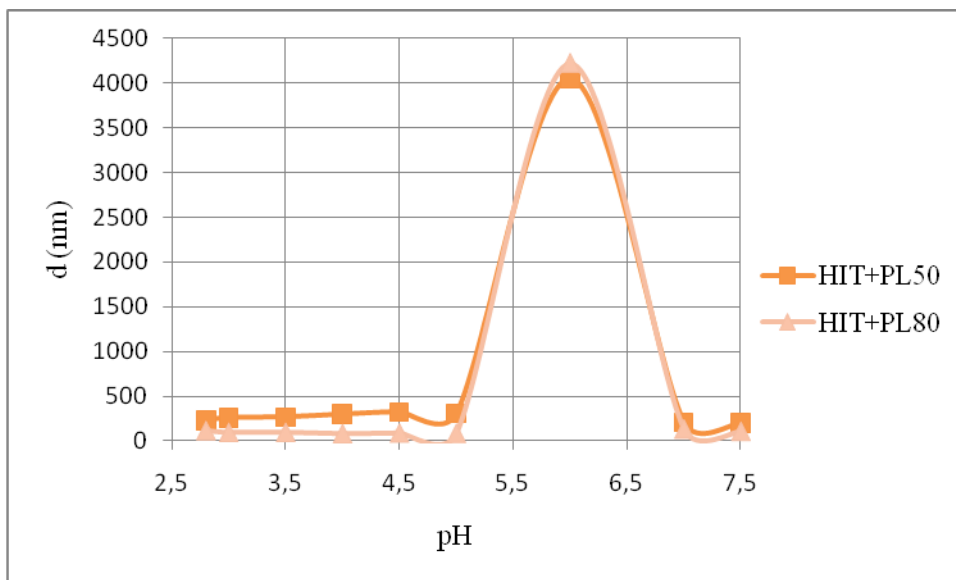
Slika 15: Raztopina ovalbumina pred (levo) in po (desno) izpostavitvi temperaturi denaturacije.

4.1.2.3. Stabilnost raztopin ovalbumina pri različnih pogojih

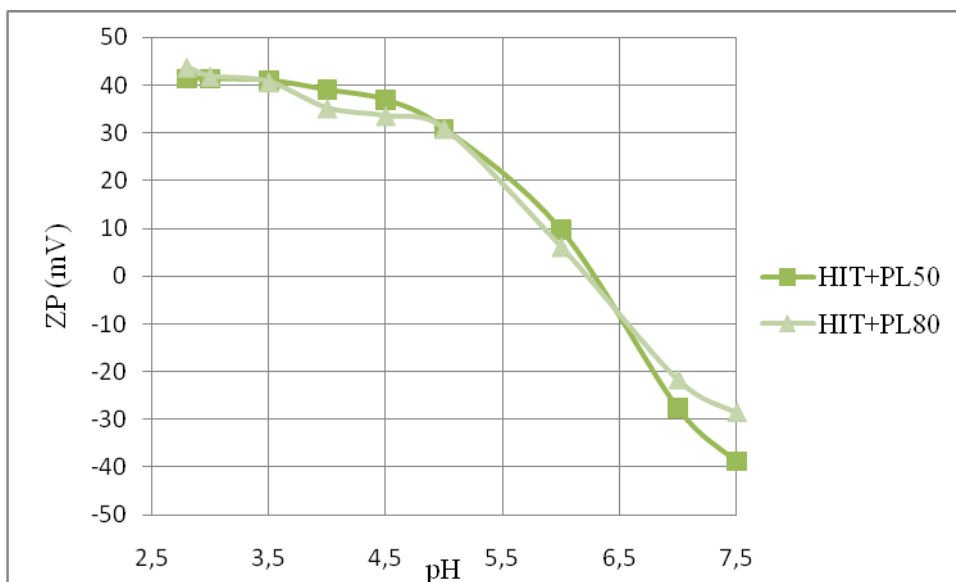
Stabilnost raztopin ovalbumina (v raztopini hitosana s pH=4,5 in fosfatnem pufru s pH=7,4), ki smo jih 24 ur hranili pri različnih pogojih (sobna temperatura, hladilnik, zmrzovalnik), smo spremljali s HPLC-analitiko. Koncentracije ovalbumina v vseh vzorcih se po enem dnevu niso bistveno spremenile. Dokazali smo, da so raztopine ovalbumina vsaj en dan obstojne brez kakršnih koli opaznih fizikalnih sprememb tako pri sobni temperaturi kot pri nižjih temperaturah.

4.2. IZDELAVA IN VREDNOTENJE NANODELCEV

4.2.1. Spremljanje velikosti, polidisperznega indeksa in zeta potenciala praznih nanodelcev v odvisnosti od pH končne disperzije



Slika 16: Povprečni premer nanodelcev v odvisnosti od pH disperzije. Nanodelci so bili izdelani iz hitosana (HIT) in Phospholipona® 50 (PL 50) oz. Phospholipona® 80 (PL 80).



Slika 17: Zeta potencial nanodelcev v odvisnosti od pH disperzije. Nanodelci so bili izdelani iz hitosana (HIT) in Phospholipona® 50 (PL 50) oz. Phospholipona® 80 (PL 80).

S titracijo disperzij nanodelcev smo želeli preveriti njihovo fizikalno stabilnost pri različnih vrednostih pH. Ugotovili smo, da je disperzija fizikalno stabilna pri $\text{pH} < 5$ in $\text{pH} > 7$ ne glede na vrsto lecitina, iz katerega je izdelana (*Slika 16*). Med titracijo pri teh vrednostih ni bilo vidnih sprememb disperzije. V območju pH med 5 in 6 smo opazili postopno večanje motnosti, ki je bila najbolj izrazita okoli $\text{pH} = 6$. Pojavili so se kosmičasti delci, nastala je oborina. Velikost delcev je dosegla mikrometrsko območje. Nadaljnja titracija v območju pH med 6 in 7 je povzročila zmanjšanje motnosti, kosmičasti delci so izginili. Razlog za agregacijo delcev pri $\text{pH} = 6$ je v hitosanu, ki ima pK_a -vrednost okoli 6,5. Hitosan je komponenta nanodelcev, ki karakterizira površino nanodelcev. Površinski naboj koloidnega sistema se začne pri vrednosti pH okoli 6 naglo približevati nevtralnosti, hitosan pa izgublja pozitiven naboj. Elektrostatska stabilizacija sistema se poruši. To dokazuje tudi krivulja zeta potenciala v odvisnosti od pH, saj vrednost zeta potenciala nanodelcev prehaja iz pozitivne v negativno v intervalu $\text{pH} = 6-7$ (*Slika 17*).

Rezultati našega diplomskega dela so skladni z rezultati preteklih študij [11], ki kažejo, da sta fizikalna stabilnost koloidnega sistema in velikost delcev odvisni od neto naboja na površini delcev. V nevtralni točki zeta potenciala je sistem fizikalno nestabilen (agregacija delcev), medtem ko je pri pozitivni ali negativni vrednosti zeta potenciala sistem fizikalno stabilen. Stabilizacija koloidnega sistema je elektrostatske narave. Dokazali so tudi, da daje površini nanodelcev glavni značaj hitosan z vrednostjo pK_a okoli 6,5. Površinski naboj nanodelcev se je približal nevtralnosti pri pH blizu 6 [11].

Če primerjamo nanodelce iz hitosana in Phospholipona® 50 z nanodelci iz hitosana in Phospholipona® 80, ugotovimo, da so nanodelci, ki vsebujejo Phospholipon® 80, manjši. Na to kaže tudi sam videz disperzije teh nanodelcev, ki je mnogo bolj transparentna kot tista iz Phospholipona® 50 (*Slika 18*). Na velikost praznih nanodelcev vpliva vrsta lecitina, iz katerega so nanodelci izdelani. Phospholipon® 50 kot manj čist fosfatidilholin z raznoliko vsebnostjo različnih fosfolipidov daje večje nanodelce kot Phospholipon® 80, ker vsebuje več fosfolipidov z negativnim nabojem in lahko tvori več interakcij s hitosanom.



Slika 18: Videz disperzij nanodelcev iz hitosana in obeh lecitinov.

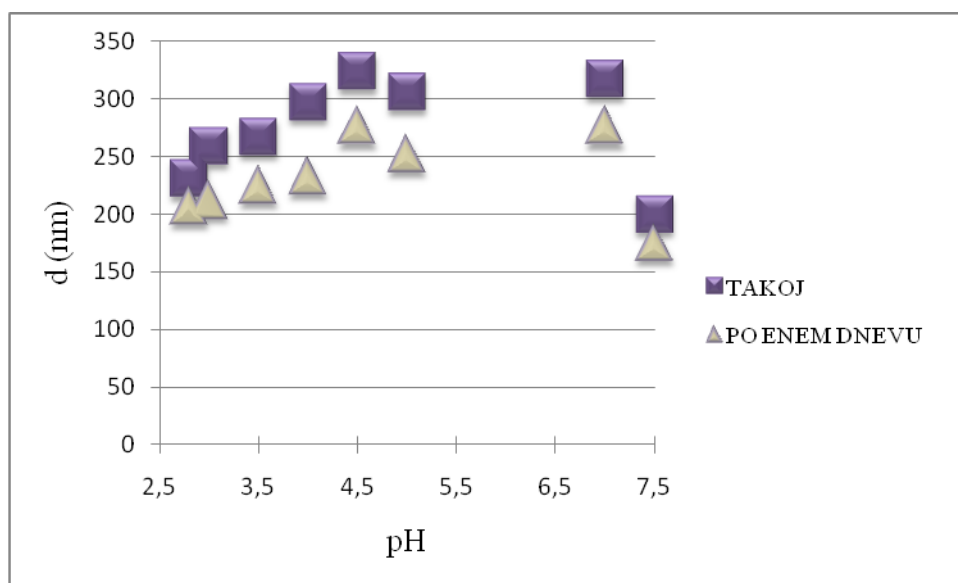
(leva čaša: Phospholipon® 50, desna čaša: Phospholipon® 80)

Polidisperzni indeks se v območju agregacije delcev približuje vrednosti 1, kar pomeni, da so delci zelo različnih velikosti. V drugih testiranih pH-območjih se PI giblje med 0,2 in 0,4 in kaže na ozko porazdelitev velikosti delcev. Vrednosti polidisperznega indeksa pri različnih vrednostih pH podaja *Preglednica I*.

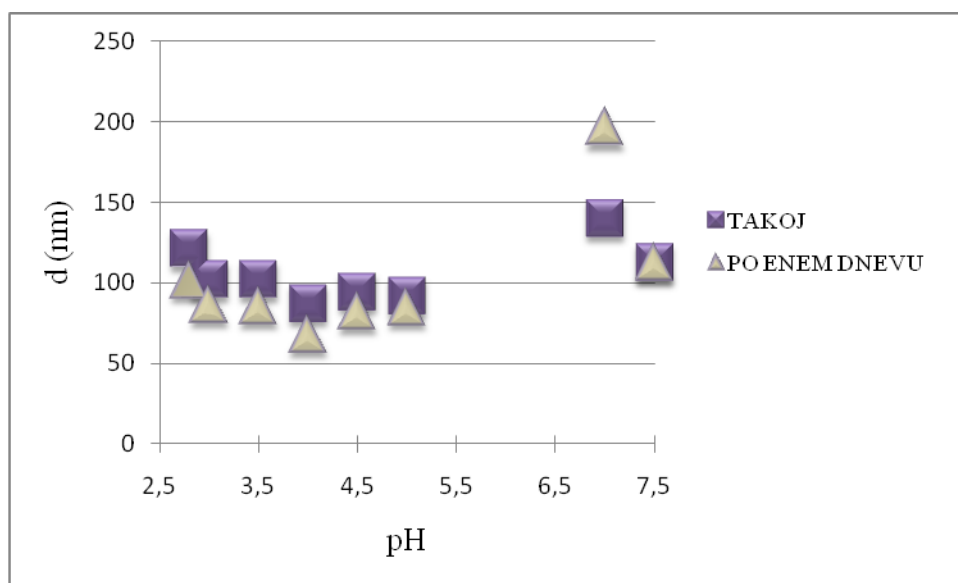
Preglednica I: Vrednosti polidisperznega indeksa nanodelcev v disperzijah z različnimi vrednostmi pH.

pH	Vrednosti polidisperznega indeksa	
	ND iz HIT in PL50	ND iz HIT in PL80
2,8	0,278	0,330
3	0,320	0,410
3,5	0,433	0,430
4	0,337	0,308
4,5	0,300	0,390
5	0,276	0,374
6	1	0,932
7	0,235	0,254
7,5	0,220	0,395

4.2.2. Primerjava velikosti praznih nanodelcev takoj po izdelavi in po enem dnevu pri različnih pH disperzije



Slika 19: Povprečni premer nanodelcev iz hitosana in Phospholipona® 50 pri različnih pH disperzije v odvisnosti od časa – velikost ND smo pomerili takoj in po enem dnevu.



Slika 20: Povprečni premer nanodelcev iz hitosana in Phospholipona® 80 pri različnih pH disperzije v odvisnosti od časa – velikost ND smo pomerili takoj in po enem dnevu.

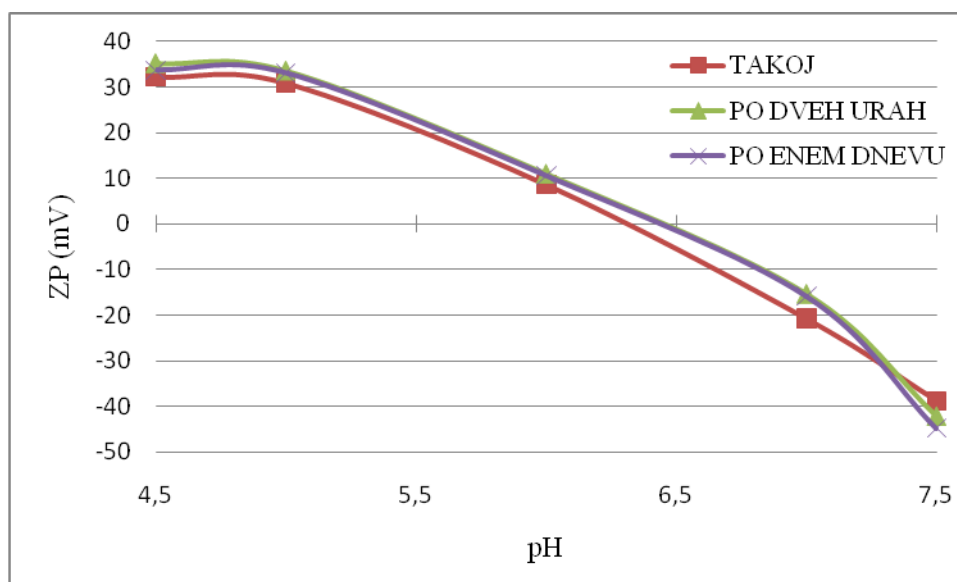
Disperzije nanodelcev smo po izdelavi pustili 24 ur na magnetnem mešalu, da je večina etanola odhlapela. Primerjava velikosti nanodelcev, ki smo jih izmerili takoj po izdelavi

oz. po enem dnevu (*Slika 19, Slika 20*), kaže na zmanjšanje velikosti delcev. Sklepamo, da je vzrok v odstranitvi etanola, ki je po izdelavi prisoten v disperziji nanodelcev kot medij, v katerem smo raztopili Phospholipona®. Izjema je le vrednost pH=7, kjer so nanodelci po enem dnevu večji in disperzija kaže znak fizikalne nestabilnosti. Verjeten razlog je hitosan in njegova vrednost pKa.

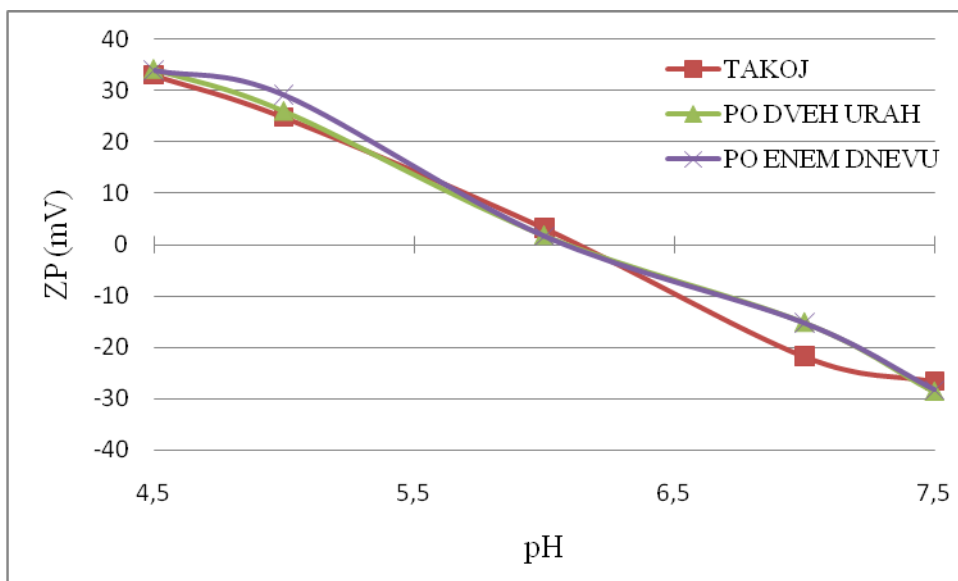
Vrednost polidisperznega indeksa znaša v območju nestabilnosti 1, drugje so vrednosti podobne vrednostim takoj po izdelavi.

4.2.3. Primerjava zeta potenciala praznih nanodelcev takoj po izdelavi, po dveh urah in po enem dnevu pri različnih pH disperzije

Disperzijam nanodelcev smo izmerili tudi zeta potencial. Na podlagi rezultatov s *Slik 21* in *22* lahko ugotovimo, da se zeta potencial nanodelcev pri večini vrednosti pH po enem dnevu bistveno ne spremeni. Pri pH=7 absolutna vrednost zeta potenciala nekoliko pade (zeta potencial se spremeni iz -20 mV na -15 mV) in potrdi že prej omenjeno fizikalno nestabilnost sistema pri tem pH. Disperzije, katerih delci imajo absolutno vrednost zeta potenciala manjšo od -30 mV in se le-ta približuje 0 mV (izoelektrična točka), veljajo za fizikalno nestabilne. Delci so tu premalo negativno nabiti, da bi se lahko med sabo odbijali in težijo k združevanju.

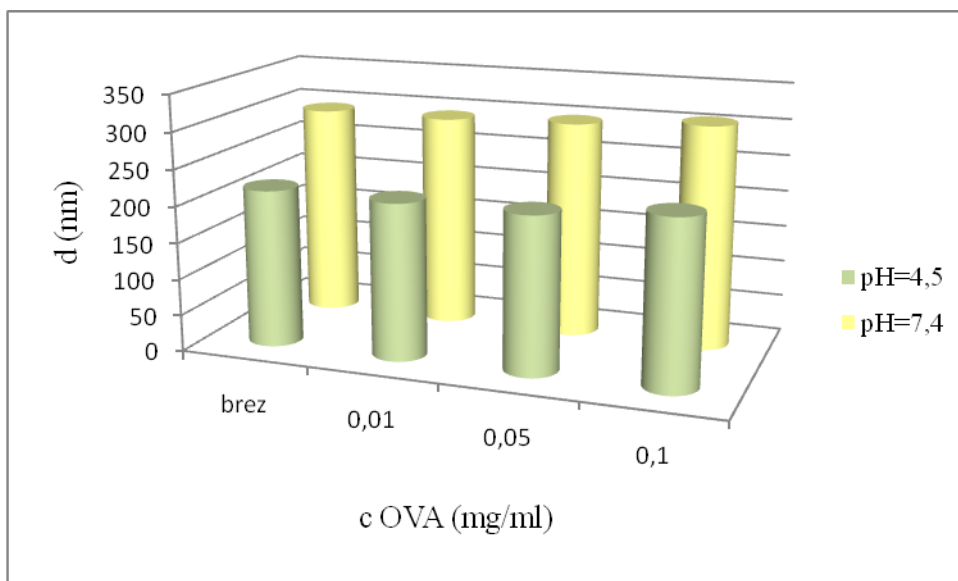


Slika 21: Zeta potencial nanodelcev iz hitosana in Phospholipona® 50 pri različnih pH disperzije v odvisnosti od časa – ZP smo merili takoj, po dveh urah, po enem dnevu.

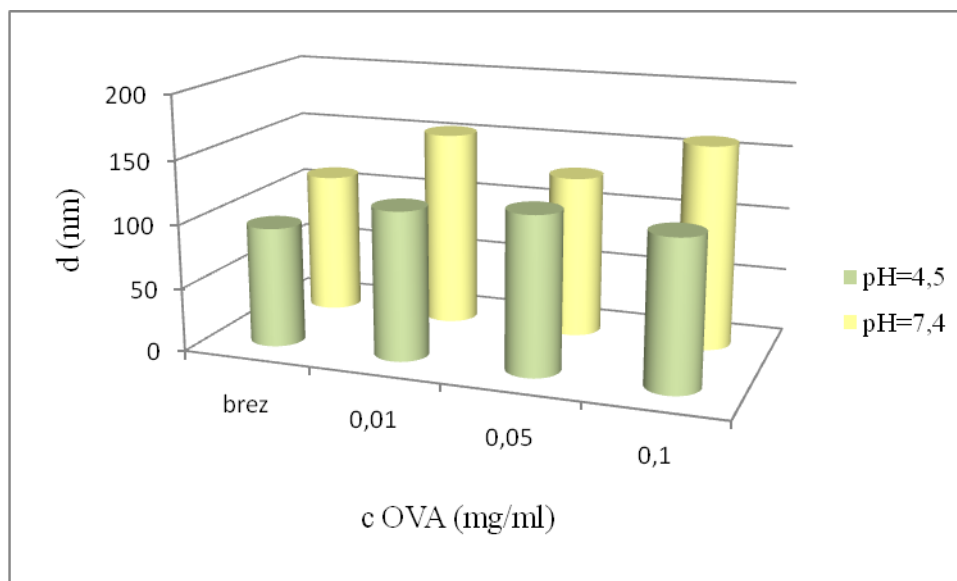


Slika 22: Zeta potencial nanodelcev iz hitosana in Phospholipona® 80 pri različnih pH disperzije v odvisnosti od časa – ZP smo merili takoj, po dveh urah, po enem dnevu.

4.2.4. Primerjava velikosti ter zeta potenciala praznih nanodelcev in nanodelcev z ovalbuminom



Slika 23: Velikost nanodelcev iz hitosana in Phospholipona® 50 brez OVA in z različnimi koncentracijami OVA. Velikost smo merili disperzijama s pH=4,5 in pH=7,4.

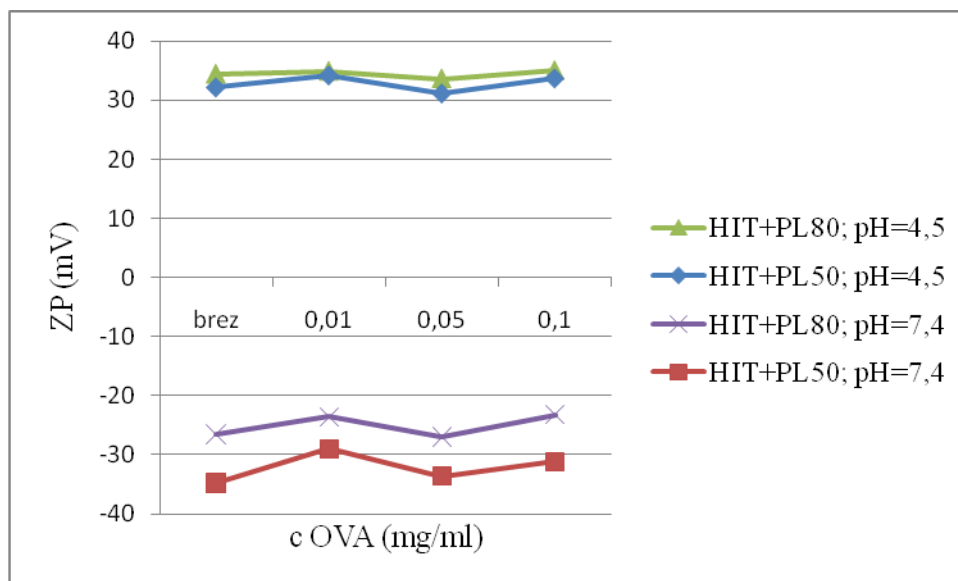


Slika 24: Velikost nanodelcev iz hitosana in Phospholipona® 80 brez OVA in z različnimi koncentracijami OVA. Velikost smo merili disperzijama s pH=4,5 in pH=7,4.

Nanodelci v disperzijah z različnimi koncentracijami ovalbumina niso bistveno večji od nanodelcev brez ovalbumina (*Slika 23, Slika 24*). Iz tega lahko sklepamo, da ovalbumin nima bistvenega vpliva na velikost delcev. Tudi tu se kot odločilni dejavnik, ki vpliva na velikost delcev, kaže pH, kajti disperzije, ki smo jih izdelali pri fiziološkem pH, imajo večje delce kot tiste pri pH=4,5. Bolj izrazito razliko v velikosti delcev opazimo pri nanodelcih, ki so izdelani iz hitosana in Phospholipona® 50.

Prav tako kot na velikost tudi na zeta potencial vgradnja različnih količin ovalbumina v nanodelce ne vpliva. Krivulje odvisnosti zeta potenciala od koncentracije ovalbumina v disperziji so bolj ali manj ravne črte (*Slika 25*), kar pomeni, da je zeta potencial bolj ali manj konstanten glede na različne koncentracije ovalbumina. Nanodelci imajo pri pH=4,5 pozitivno vrednost zeta potenciala, kar je posledica pozitivno nabitih amino skupin hitosana, pri pH=7,4 pa negativno (pH>pKa hitosana, zato je hitosan neioniziran).

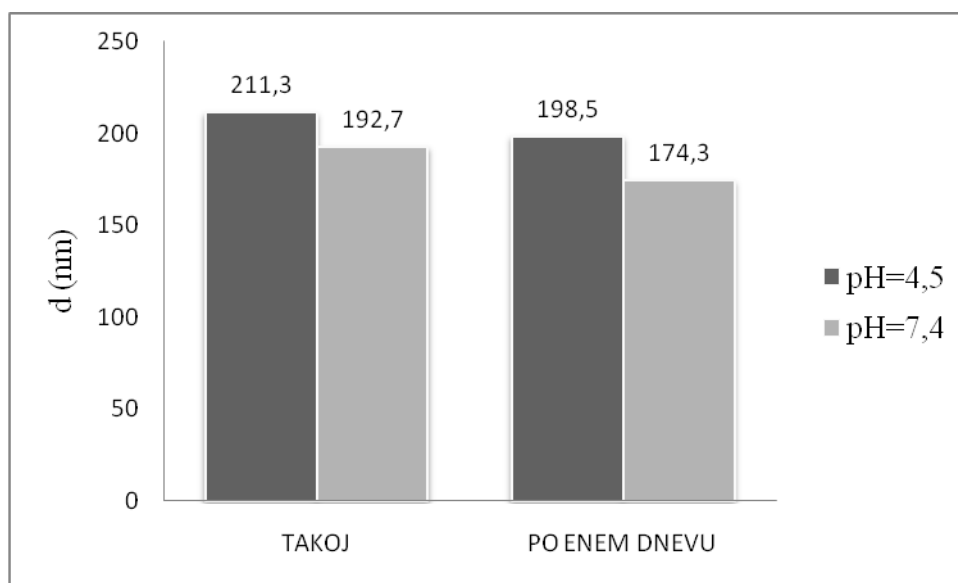
Ne glede na to, da smo v nanodelce vgradili še dodatno komponento – modelni protein ovalbumin, se trend odvisnosti velikosti in zeta potenciala nanodelcev ohranja. Očitno je, da ima glavno vlogo v stabilnosti koloidnega sistema še vedno hitosan, saj so vrednosti zeta potenciala praznih nanodelcev in nanodelcev z OVA zelo podobne.



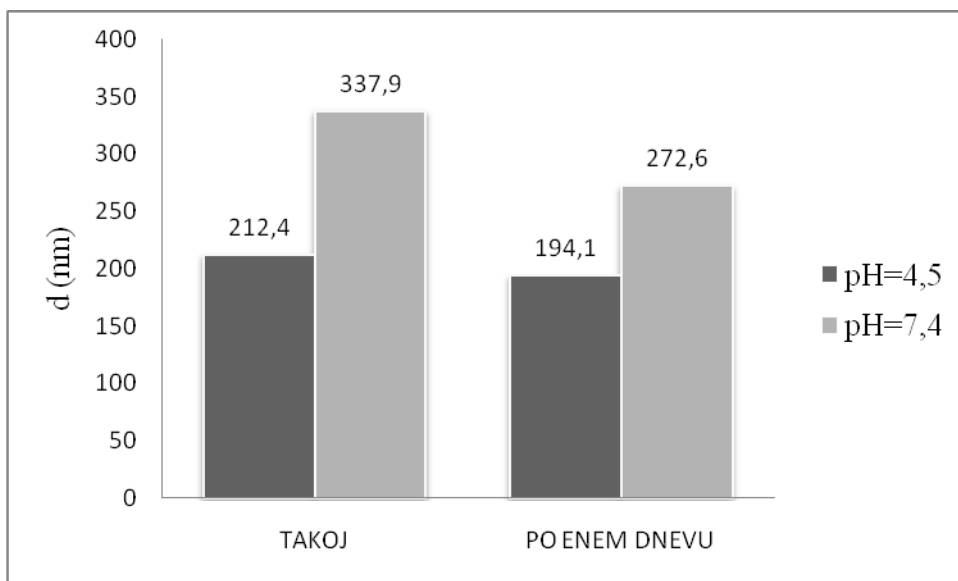
Slika 25: Zeta potencial nanodelcev v disperzijah z različnimi koncentracijami OVA. ZP smo merili disperzijam s pH=4,5 in pH=7,4 iz hitosana in Phospholipona® 50 oz. 80.

4.2.5. Primerjava velikosti nanodelcev v disperzijah z različnimi koncentracijami ovalbumina takoj po izdelavi in po enem dnevu

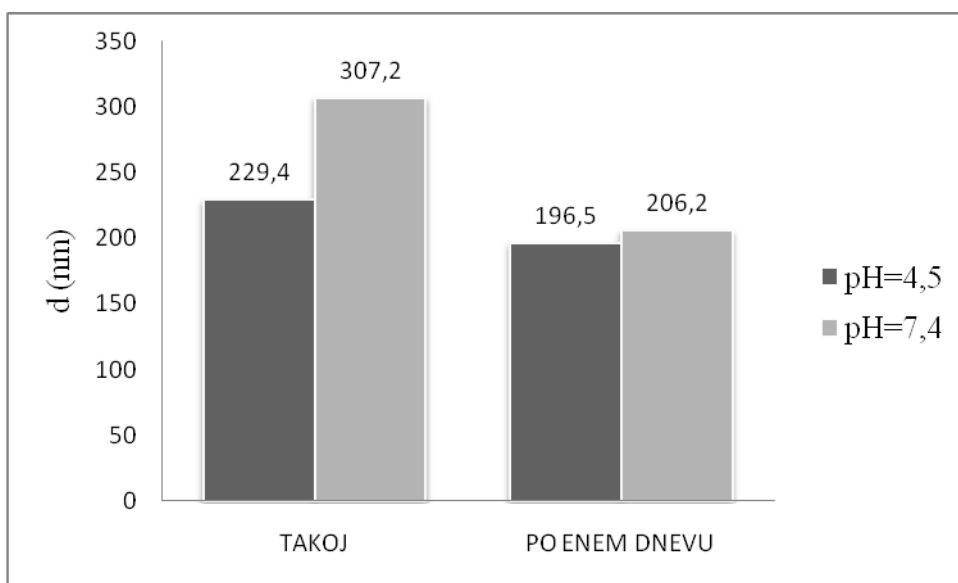
4.2.5.1. Nanodelci iz hitosana in Phospholipona® 50



Slika 26: Velikost ND v disperzijah s koncentracijo OVA 0,01 mg/ml v odvisnosti od časa. Velikost smo merili disperzijama s pH=4,5 in pH=7,4 takoj po izdelavi in po enem dnevu.

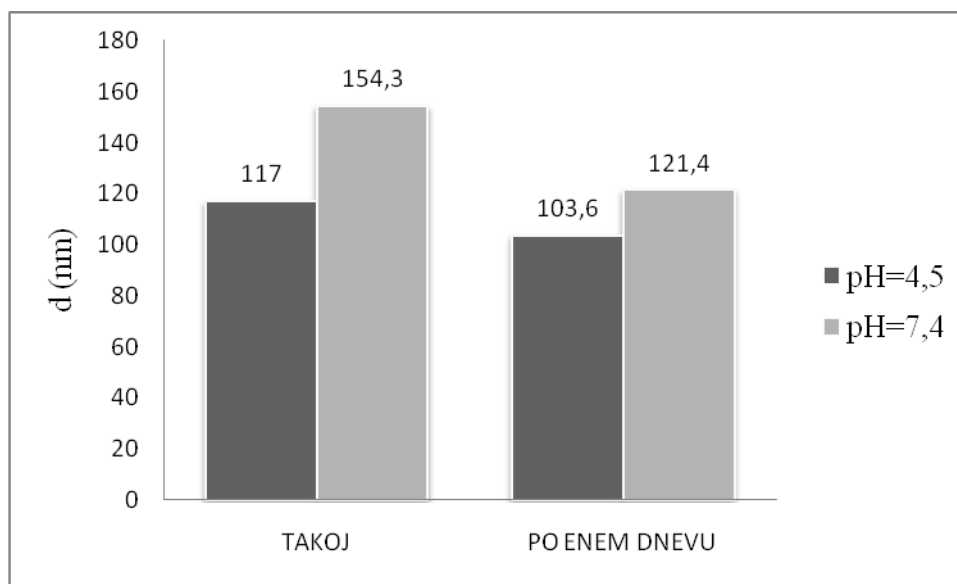


Slika 27: Velikost ND v disperzijah s koncentracijo OVA 0,05 mg/ml v odvisnosti od časa. Velikost smo merili disperzijama s pH=4,5 in pH=7,4 takoj po izdelavi in po enem dnevu.



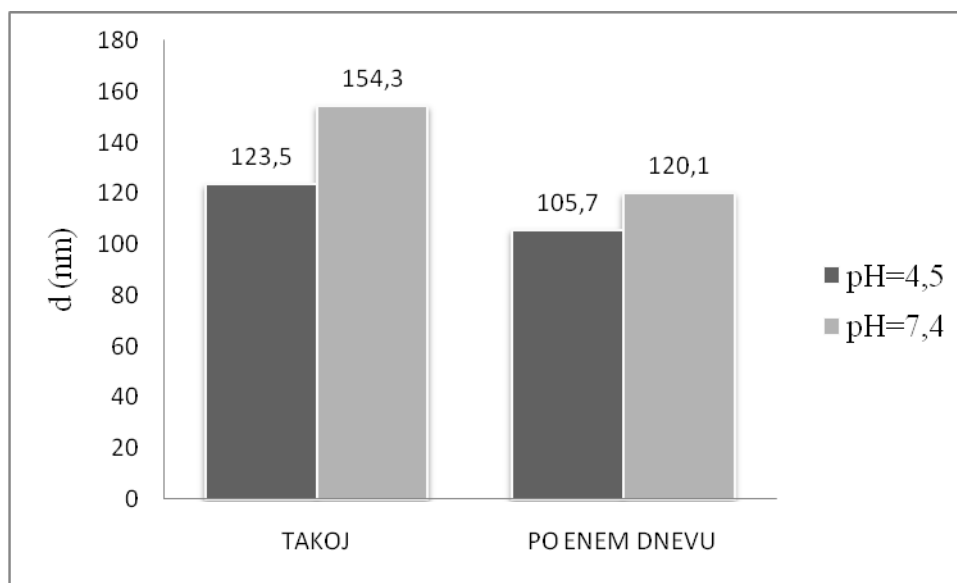
Slika 28: Velikost ND v disperzijah s koncentracijo OVA 0,1 mg/ml v odvisnosti od časa. Velikost smo merili disperzijama s pH=4,5 in pH=7,4 takoj po izdelavi in po enem dnevu.

4.2.5.2. Nanodelci iz hitosana in Phospholipona® 80



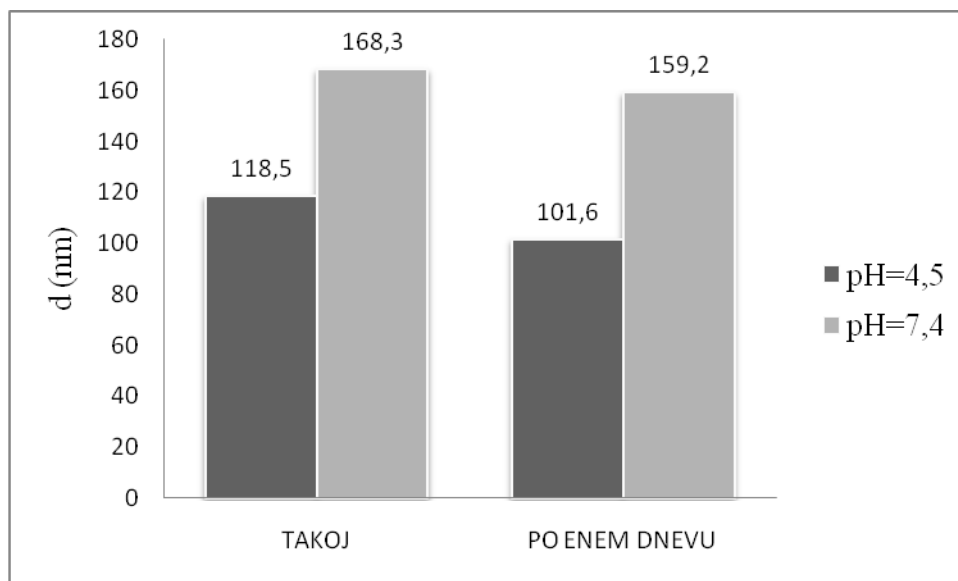
Slika 29: Velikost ND v disperzijah s koncentracijo OVA 0,01 mg/ml v odvisnosti od časa.

Velikost smo merili disperziji s pH=4,5 in pH=7,4 takoj po izdelavi in po enem dnevu.



Slika 30: Velikost ND v disperzijah s koncentracijo OVA 0,05 mg/ml v odvisnosti od časa.

Velikost smo merili disperzijama s pH=4,5 in pH=7,4 takoj po izdelavi in po enem dnevu.



Slika 31: Velikost ND s koncentracijo OVA 0,1 mg/ml v odvisnosti od časa. Velikost smo merili disperzijama s pH=4,5 in pH=7,4 takoj po izdelavi in po enem dnevu.

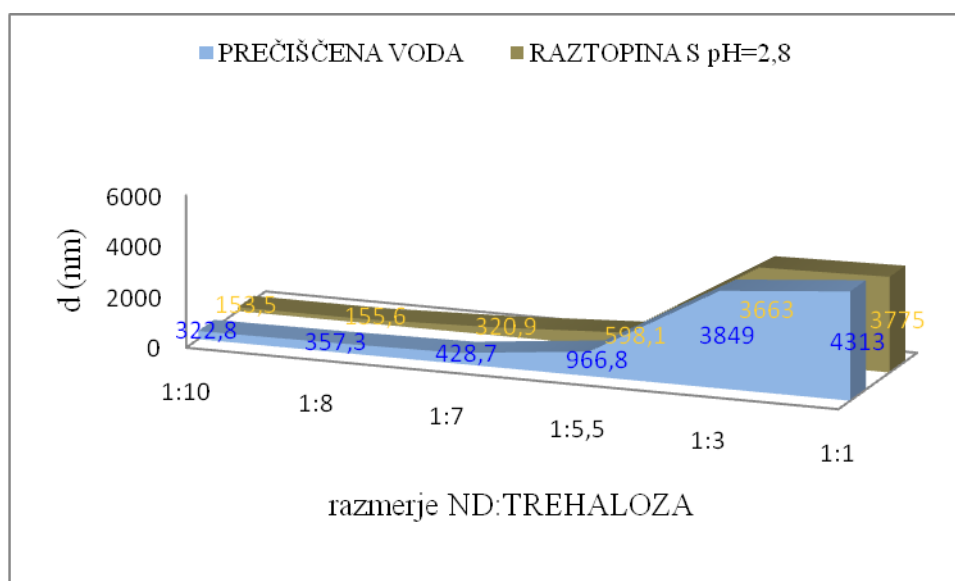
Če primerjamo velikosti nanodelcev pri enakih koncentracijah ovalbumina, ugotovimo, da v odvisnosti od časa padajo, kar je posledica odstranitve etanola iz vzorca. To načelo se pojavi tako pri disperziji s pH=4,5 kot pri disperziji s pH=7,4 ne glede na vrsto lecitina v nanodelcih. Iz grafov (Slike 26-31) tudi lahko razberemo že poznano dejstvo, da so nanodelci pri pH=4,5 manjši kot nanodelci pri pH=7,4. Vzrok je v navidezni pKa-vrednosti hitosana, ki je okoli 6,5.

4.3. LIOFILIZACIJA DISPERZIJ NANODELCEV

Liofilizacijo smo izvedli z namenom pretvorbe disperzije nanodelcev v suho, stabilno stanje. Cilj je bil doseči ustrezno redispergiranje liofiliziranega produkta. Disperzije smo po izdelavi pustili na magnetnem mešalu 24 ur, da je odhlapel etanol. Pred liofilizacijo smo vzorcem dodali različne količine trehaloze in na ta način preizkušali, katera količina krioprotektanta je še učinkovita v zmanjšanju stresa zmrzovanja in sušenja.

4.3.1. Vpliv količine dodanega krioprotektanta na velikost nanodelcev

Pred liofilizacijo smo disperziji nanodelcev dodali različne koncentracije raztopine trehaloze, da smo dosegli ustrezno masno razmerje ND:trehaloza.



Slika 32: Velikost ND v odvisnosti od količine dodane trehaloze disperziji nanodelcev pred liofilizacijo. Liofilizate smo redispergirali v raztopini s pH=2,8 in v prečiščeni vodi.

Krioprotektant smo uporabili z namenom zaščite nanodelcev pred stresom zmrzovanja in sušenja ter po podatkih, ki jih kaže graf (Slika 32), dosegli svoj namen. Uspešnost trehaloze kot krioprotektanta je odvisna od koncentracije tega disaharida v disperziji nanodelcev. Rezultati kažejo na to, da višja kot je koncentracija trehaloze v vzorcu, manj prizadeti so nanodelci in večja je stabilizacija sistema. Masna razmerja med nanodelci (hitosan+lecitin) in trehalozo 1:10, 1:8, 1:7 dajejo po redispergiranju liofilizata nanometriške velikosti. Velikost nanodelcev se giblje v območju od 150 do 400 nm in narašča z manjšanjem količine dodane trehaloze, npr. pri 1:10 so delci veliki 154 nm, pri 1:7 pa 321 nm, itd. Polidisperzni indeks znaša pri teh razmerjih okoli 0,4. Velikost delcev začne strmo naraščati pri razmerju 1:5,5 in doseže mikrometriške velikosti (1000-4000 nm). Polidisperzni indeks kaže vrednost 0,8 ali več, kar pomeni, da so delci v vzorcu zelo različnih velikosti. Vrednosti polidisperznega indeksa so podane v Preglednici II.

Če primerjamo velikost nanodelcev glede na medija, v katerima smo liofilizate redispergirali, ugotovimo, da je velikost odvisna tudi od tega. Liofilizati se lepše redispergirajo v mediju z nižjim pH; delci so cca. 200 nm manjši in bolj podobnih velikosti. Lepše in hitreje se redispergirajo tudi tisti liofilizati, ki po masnem razmerju vsebujejo največ trehaloze, t.j. 1:10, 1:8 in 1:7. Kljub temu pa smo morali pred meritvijo na Zetasizerju Nano ZS vzorce redispergiranih liofilizatov vedno centrifugirati 10 minut pri 5000 obratih/minuto, da smo odstranili prisotne agregate, ki bi sicer motili meritev.

Preglednica II: Vrednosti PI redispergiranih liofiliziranih nanodelcev v prečiščeni vodi oz. raztopini s pH=2,8 v odvisnosti od dodane količine trehaloze pred liofilizacijo.

Masno razmerje ND:TREHALOZA	PI	
	PREČIŠČENA VODA	RAZTOPINA S pH=2,8
1:10	0,356	0,254
1:8	0,387	0,236
1:7	0,383	0,282
1:5,5	0,609	0,584
1:3	0,833	0,912
1:1	0,946	0,866

4.4. UČINKOVITOST VGRAJEVANJA OVALBUMINA V NANODELCE

Delež vgrajenega ovalbumina smo določali pri različnih začetnih koncentracijah proteina. 100-odstotno učinkovitost bi dosegli, če bi se v nanodelce vgradil ves ovalbumin. Rezultati v *Preglednici III* kažejo na 20-40 % učinkovitost vgrajevanja ovalbumina (določena posredno preko supernatanta). Na uspeh vgrajevanja vpliva tako začetna koncentracija ovalbumina kot tudi vrsta lecitina, iz katerega so nanodelci izdelani. Lecitina se razlikujeta v vsebnosti posameznih fosfolipidov. Phospholipon® 80 je bolj prečiščena vrsta fosfolipida in vsebuje več fosfatidilholina kot Phospholipon® 50; po literarnih podatkih [10] je razlika med njunima vsebnostima cca. 25 %. Phospholipon® 50 vsebuje v večji meri še druge vrste fosfolipidov, kot so: fosfatidna kislina, fosfatidilinozitol, fosfatidiletanolamin in druge. Fosfatidilholin in fosfatidiletanolamin sta nevtralna, ostali omenjeni pa imajo pri fiziološkem pH negativni naboj. Iz tega sklepamo, da vsebuje Phospholipon® 50 več fosfolipidov z negativnim nabojem, ki vstopajo v interakcije z ovalbuminom; posledica tega pa je večja učinkovitost vgrajevanja v nanodelce.

Učinkovitost vgrajevanja smo poskušali določiti neposredno iz sedimenta, ki smo ga redispergirali v vodi s pH=6. Pri tem pH je zeta potencial nanodelcev blizu 0, kar pomeni, da je v takšnih pogojih disperzni sistem fizikalno nestabilen. Sklepali smo, da bodo kompleksi razpadli in sprostili ovalbumin v zunanji medij. Vendar pa smo dobili za učinkovitost vgrajevanja, ki smo jo določili neposredno iz sedimenta, zelo nizke vrednosti.

Kljub temu, da se je fizikalna stabilnost sistema porušila, pa nastali agregati očitno niso sprostil večine ovalbumina, ki je tako ostal v agregatih. Agregate pa smo pred HPLC-analitiko odstranili iz vzorcev s filtriranjem.

Preglednica III: Učinkovitost vgrajevanja OVA v nanodelce iz hitosana in obeh lecitinov. Delež vgrajenega OVA smo določali posredno v supernatantu in neposredno v sedimentu.

Vrsta Phospholipona®	Koncentracija ovalbumina (mg/ml)	Učinkovitost vgrajevanja ovalbumina (%)	
		Posredno (preko supernatanta)	Neposredno (v sedimentu)
PL 50	0,01	38,5 ± 0,2	/
PL 50	0,05	36,3 ± 0,8	4,8
PL 50	0,1	24,4 ± 0,3	3,7
PL 80	0,01	36,7 ± 0,2	/
PL 80	0,05	25,9 ± 0,2	4
PL 80	0,1	19,6 ± 0,7	3,2

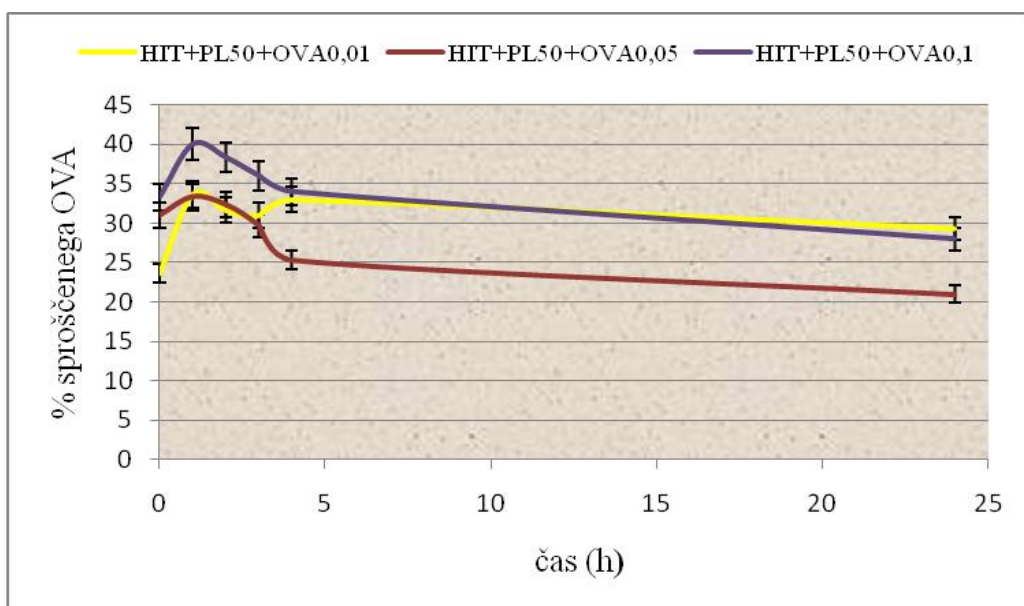
Glede na težave pri določanju učinkovitosti vgrajevanja iz sedimenta, smo le-to določali tudi posredno preko supernatanta. Na podlagi rezultatov v *Preglednici III* lahko ugotovimo, da večja kot je začetna koncentracija ovalbumina, (procentualno) manj se ga v nanodelce vgradi. Sklepamo, da ima vgrajevanje neko mejo in ko je ta dosežena, se ovalbumin ne more več vgrajevati – ne glede na to, koliko ga je še na razpolago. Preostali nevgrajeni ovalbumin ostaja raztopljen v disperznem mediju.

4.5. SPROŠČANJE OVALBUMINA IZ LIOFILIZIRANIH NANODELCEV

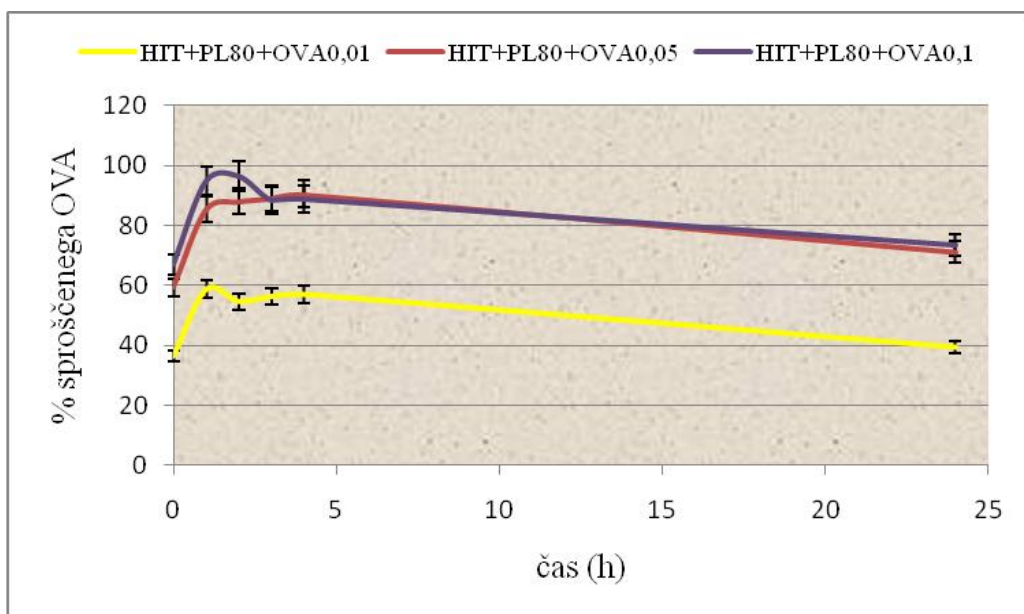
Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev smo spremljali 24 ur. Izvedli smo ga v fosfatnem pufru s pH=7,4. Želeli smo preveriti vpliv sestavin (konkretno različnih fosfolipidov) nanodelcev ter vpliv različnih začetnih koncentracij ovalbumina na sproščanje ovalbumina iz nanodelcev.

Slika 33 prikazuje profil sproščanja ovalbumina iz nanodelcev iz hitosana in Phospholipona® 50 z različnimi začetnimi koncentracijami ovalbumina. Na podlagi rezultatov lahko ugotovimo, da pride pri vseh vzorcih v prvih 60 minutah do t.i. »burst« učinka sproščanja. V primeru uporabljene najvišje začetne koncentracije ovalbumina (0,1 mg/ml) se je v prvih 60 minutah sprostil 40 % ovalbumina, v primeru nižjih začetnih

koncentracij ovalbumina (0,05 mg/ml in 0,01 mg/ml) pa okoli 33 %, nato pa v vseh primerih delež sproščene ovalbumina v 24 urah ne narašča več.



Slika 33: Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev (hitosan+ Phospholipon® 50), ki vsebujejo različne začetne koncentracije OVA (n=3).



Slika 34: Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev (hitosan+ Phospholipon® 80), ki vsebujejo različne začetne koncentracije OVA (n=3).

Slika 34 prikazuje profil sproščanja ovalbumina iz nanodelcev, ki so bili izdelani iz hitosana in Phospholipona® 80 z različnimi začetnimi koncentracijami ovalbumina. Tudi tu je v prvih 60 minutah pri vseh vzorcih opazen »burst« učinek sproščanja. V primeru uporabljene najnižje začetne koncentracije ovalbumina (0,01 mg/ml) se je v prvih 60 minutah sprostil 59 % ovalbumina, v primeru višjih začetnih koncentracij pa 85 % (0,05 mg/ml) oz. 95 % (0,1 mg/ml), nato pa v vseh primerih v 24 urah delež sproščenega ovalbumina ne narašča več.

»Burst« učinek sproščanja je najverjetneje povezan s prisotnostjo nevgrajenega ovalbumina v disperziji nanodelcev ter z nahajanjem vgrajenega ovalbumina na površini nanodelcev. V primeru uporabljene najnižje začetne koncentracije ovalbumina (0,01 mg/ml) je večji delež ovalbumina stopil v interakcijo z negativnimi skupinami lecitina. Ko je prostih negativnih skupin zmanjkalo, se ovalbumin ni več vgrajeval v nanodelce, temveč je ostajal raztopljen v disperznem mediju. Posledica je večji »burst« učinek pri uporabljenih višjih začetnih koncentracijah ovalbumina. V nadaljevanju se je delež sproščenega ovalbumina celo nekoliko zmanjšal, kar je lahko posledica adsorpcije ovalbumina na steklovino oz. razpadnih reakcij.

Primerjava sproščanja ovalbumina iz nanodelcev, ki vsebujejo dva različna lecitina, kaže na počasnejše sproščanje ovalbumina v primeru Phospholipona® 50. Phospholipon® 50 vsebuje v primerjavi s Phospholiponom® 80 več nabitih fosfolipidov, ki lahko vstopajo v interakcije s pozitivno nabitimi skupinami hitosana, zato lahko vgradi več ovalbumina (negativni naboj fosfolipidov prispeva k večji vgradnji ovalbumina v nanodelce), kar smo že dokazali z učinkovitostjo vgrajevanja. Glede na to, da je več interakcij, ostane manj ovalbumina raztopljenega v disperznem mediju in je »burst« učinek sproščanja manjši. V nadaljevanju se ovalbumin iz nanodelcev sprošča počasi.

Krivulje sproščenega ovalbumina potekajo v vseh primerih na podoben način – ne glede na odstotek sproščenega ovalbumina smo opazili t.i. »burst« učinek, kar pomeni, da se večina ovalbumina sprosti na začetku, t.j. v prvih treh urah. Takšno sproščanje je ugodno, saj z njim hitro dosežemo čim večji koncentracijski gradient na mestu absorpcije. To pa bi lahko izboljšalo biološko uporabnost modelnega proteina.

5. SKLEP

- ✓ Kot organski topili za lecitin smo preizkusili etanol in aceton. Iskali smo topilo, ki se popolnoma meša z vodo, hkrati pa se v njem lecitin popolnoma raztopi. Izbrali smo etanol, ki daje za razliko od acetona, bistro rumeno raztopino lecitina.
- ✓ Ovalbumin pri temperaturi 54 °C denaturira, kar pomeni, da preide iz native v denaturirano obliko, izgubi svojo globularno konformacijo in njegova velikost začne naraščati. Denaturacija je ireverzibilen proces, ki spremeni tudi videz raztopine proteina – bistra raztopina postane motna in takšna tudi ostane.
- ✓ Raztopine ovalbumina s pH=4,5 in pH=7,4 so stabilne vsaj en dan tako pri sobni temperaturi kot pri nižjih temperaturah (hladilnik, zmrzovalnik). Koncentracije ovalbumina v raztopinah se po enem dnevu ne spremenijo bistveno.
- ✓ Disperzije nanodelcev so fizikalno stabilne pri pH<5 in pH>7 ne glede na vrsto lecitina, iz katerega so izdelane. V teh območjih pH znaša velikost nanodelcev med 200 in 400 nm, polidisperzni indeks se giblje od 0,2 do 0,4 in zeta potencial med –40 mV in 40 mV.
- ✓ Pri pH okoli 6 so disperzije fizikalno nestabilne: pride do agregacije delcev, ki dosežejo mikrometrске velikosti. Zeta potencial ima v fizikalno nestabilnem območju disperzije vrednost izoelektrične točke, t.j. 0 mV. Razlog za nastanek oborine pri pH okoli 6 je v hitosanu, ki ima vrednost pKa okoli 6,5 in je komponenta nanodelcev, ki karakterizira površino nanodelcev.
- ✓ Velikost nanodelcev fizikalno stabilnih disperzij se 24 ur po izdelavi zmanjša. Vzrok je v odstranitvi etanola, ki je takoj po izdelavi prisoten kot medij, v katerem smo oba lecitina raztopili. Izjema je le disperzija pri pH=7, kjer so nanodelci naslednji dan večji – verjeten razlog fizikalne nestabilnosti je hitosan s pKa okoli 6,5. Zeta potencial se pri večini pH-vrednostih (razen pri pH=7, ko vrednost nekoliko pade) po enem dnevu ne spremeni.
- ✓ Nanodelci iz hitosana in Phospholipona® 50 so večji od nanodelcev iz hitosana in Phospholipona® 80. Disperzija slednjih je bolj transparentna. Ugotavljamo, da na velikost praznih nanodelcev vpliva vrsta lecitina – Phospholipon® 50 kot manj prečiščen fosfatidilholin z bolj raznoliko vsebnostjo različnih fosfolipidov z negativnim nabojem daje večje nanodelce kot Phospholipon® 80.

- ✓ Različne količine ovalbumina, ki jih vgradimo v nanodelce, ne vplivajo bistveno na velikost in zeta potencial, ki sta spremenljivki, odvisni predvsem od pH.
- ✓ Trehaloza kot krioprotektant je v procesu liofilizacije uspešna v vzorcih, ki po masnem razmerju med nanodelci (hitosan+lecitin) in trehalozo vsebujejo največ tega disaharida, t.j. 1:10, 1:8 in 1:7. Stabilizacija sistema je tu večja, nanodelci pa so manj prizadeti – velikost se giblje med 150 in 400 nm, polidisperzni indeks je okoli 0,4.
- ✓ V nanodelce nam je uspelo vgraditi 20-40 % ovalbumina. Na uspeh vgrajevanja vpliva tako začetna koncentracija ovalbumina kot tudi vrsta lecitina, iz katerega so nanodelci izdelani. Večjo učinkovitost vgrajevanja smo dosegli pri nanodelcih, ki vsebujejo Phospholipon® 50, saj le-ta vsebuje več fosfolipidov z negativnim nabojem, ki vstopajo v interakcije z ovalbuminom.
- ✓ V vseh poskusih sproščanja ovalbumina iz nanodelcev smo ne glede na odstotek sproščenega ovalbumina opazili t.i. »burst« učinek, kar pomeni, da se je večina ovalbumina sprostila na začetku, t.j. v prvih treh urah. Sproščanje je počasnejše pri nanodelcih, ki vsebujejo Phospholipon® 50, saj le-ta vsebuje več fosfolipidov z negativnimi skupinami, kar posledično pomeni več interakcij z ovalbuminom. Tako ostane manj ovalbumina raztopljenega v disperznem mediju in »burst« učinek je manjši. »Burst« učinek je tako najverjetneje povezan s prisotnostjo nevgrajenega ovalbumina v disperziji nanodelcev in z nahajanjem vgrajenega ovalbumina na površini nanodelcev.

6. LITERATURA

1. Kreuter J. Nanoparticles. In: Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel Dekker, New York – Basel – Hong Kong, 1994; 165-190.
2. Teskač K. Izdelava nanodelcev z metodo elektrorazprševanja in druge uporabne metode. Seminar pri predmetu Farmacevtske tehnološke operacije in farmacevtske oblike. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.
3. Kerec Kos M. Uporaba hitosana v farmaciji. Farm Vest 2006; 57: 287-291.
4. Jokanović V. Proučevanje sproščanja modelne hidrofobne učinkovine iz polimernih nanodelcev. Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2009.
5. <http://en.wikipedia.org/wiki/Lecithin>. Dostopano: 04-2010.
6. <http://www.americanlecithin.com/aboutphos.html>. Dostopano: 04-2010.
7. http://www2.chemie.uni-erlangen.de/services/dissonline/data/dissertation/Christoph_Wabel/html/Chapter1.html
Dostopano: 05-2010.
8. Ogawa S, Decker EA, McClements DJ. Production and characterization of O/W emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan-pectin multilayered membranes. J Agricult Food Chem 2004; 52: 3595-3600.
9. http://www.bikudo.com/product_search/details/37868/soybean_lecithin.html#desc.
Dostopano: 04-2010.
10. http://www.in-cosmetics.com/ExhibitorLibrary/186/PHOSPHOLIPID_Brochure.pdf.
Dostopano: 04-2010.

11. Sonvico F, Cagnani A, Rossi A, Motta S, Di Bari MT, Cavatorta F, Alonso MJ, Deriu A, Colombo P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *Int J Pharm* 2006; 324: 67-73.
12. <http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=1224>. Dostopano: 05-2010.
13. <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/protein/c8.5x23.denaturation.jpg>. Dostopano: 04-2010.
14. <http://atom.uni-mb.si/~ukelaborg/StropnikPedagosko/Biokemija/MdcPodplSt/MdcPodpProt.pdf> Dostopano: 04-2010.
15. Huntington JA, Stein PE. Structure and properties of ovalbumin. *J Chrom B* 2001; 756: 189-198.
16. <http://www.fordras.com/ovalbumin>. Dostopano: 04-2010.
17. Nisbet AD, Saundry RH, Moir AJG, Fothergill LA, Fothergill JE. The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *Eur J Biochem* 1981; 115 (2): 335.
18. Gettins PGW. Serpin structure, mechanism and function. *Chem Rev* 2002; 102 (12): 4751-4804.
19. Dominiczak MH, Baynes JW. *Med Biochem* 2005, 2th Ed: 59.
20. Vogel HJ, Bridger WA. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the two phosphoserine residues of hen egg white ovalbumin. *Biochem* 1982; 21 (23): 5825-31.
21. Yu S, Hu J, Pan X, Yao P, Jiang M. Stable and pH-sensitive nanogels prepared by self-assembly of chitosan and ovalbumin. *Langmuir* 2006; 22: 2754-2759.

22. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0e/Ovalbumin_1OVA.png.
Dostopano: 04-2010.
23. Kralj A. Samoasociiranje polielektrolitov z modelnim proteinom ovalbuminom. Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2009.
24. Wang N, Wu XS. Preparation and characterization of agarose hydrogel nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Pharm Dev Techn* 1997; 2 (2): 135-142.
25. Amidi M, Romeijn SG, Borchard G, Junginger HE, Hennink WE, Jinskoot W. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *J Contr Rel* 2006; 111: 107-116.
26. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1688-1713.
27. Liu J. Physical characterisation of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development. *Pharm Dev Techn* 2006; 111: 185-192.
28. Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Walkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxic* 2002; 40 (7): 871-898.
29. Malvern Instruments Ltd. Size theory. Zetasizer Nano User Manual. MAN0317; 2008; 14-1 do 14-6.
30. Attwood D, Florence AT. Physical pharmacy. Pharm Press 2008; 25-26, 63-78.

31. Malvern Instruments Ltd. Zeta potencial theory. Zetasizer Nano User Manual. MAN0317; 2008; 16-1 do 16-11.
32. http://www.malvern.de/LabGer/technology/images/zeta_potential_schematic.png. Dostopano: 04-2010.
33. El-Shattory Y, Aly SM. Soybean lecithin: acetone insoluble residue fractionation and their volatile components. *Grasas y Aceites* 2002; 53 (3): 319-323.