

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA GLAVINIČ

**VSTOP TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z RESVERATROLOM V  
KERATINOCITE IN NJIHOV VPLIV NA MITOHONDRIJSKO  
AKTIVNOST**

**UPTAKE OF SOLID LIPID NANOPARTICLES WITH  
RESVERATROL INTO KERATINOCYTES AND THEIR  
INFLUENCE ON MITOCHONDRIAL ACTIVITY**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl.

Za strokovno pomoč, potrpežljivost, razumevanje in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge se posebej zahvaljujem mentorici prof. dr. Julijani Kristl in asist. Karmen Teskač Plajnšek.

Za brezpogojno podporo se iskreno zahvaljujem svojemu možu in družini.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl.

Nina Glavinič

Ljubljana, 2011

Predsednik diplomske komisije:

- prof. dr. Borut Štrukelj

Člani diplomske komisije:

- prof. dr. Julijana Kristl
- doc. dr. Matjaž Jeras

# KAZALO

<b>POVZETEK</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>6</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>8</b>
1.1. RESVERATROL .....	8
1.1.1. VIR RESVERATROLA .....	9
1.1.2. UČINKI RESVERATROLA .....	10
1.1.3. DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA .....	13
1.2. KOLOIDNI NOSILNI SISTEMI .....	13
1.3. TRDNI LIPIDNI NANODELCI.....	14
1.3.1. SESTAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV .....	15
1.3.2. METODE IZDELAVE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV.....	16
1.4. DERMALNA APLIKACIJA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV .....	19
1.4.1. ZGRADBA KOŽE .....	19
1.4.2. UPORABA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV ZA DERMALNO APLIKACIJO .....	20
1.5. KOŽNI RAK .....	21
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>24</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....	<b>25</b>
3.1. MATERIALI .....	25
3.1.1. LIPIDNE SESTAVINE.....	25
3.1.2. POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI.....	25
3.1.3. UČINKOVINA .....	26
3.1.4. TOPILA.....	26
3.1.5. CELICE, CELIČNI MEDIJI IN REAGENTI .....	26
3.2. APARATURE.....	27
3.3. METODE .....	28
3.3.1. VREDNOTENJE RESVERATROLA .....	28
3.3.2. IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV.....	30
3.3.3. PREIZKUŠANJE UČINKOV SAMEGA RESVERATROLA IN TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z RESVERATROLOM NA CELICAH .....	33
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>36</b>
4.1. VREDNOTENJE RESVERATROLA .....	36
4.1.1. TOPNOST RESVERATROLA .....	36
4.1.2. VPLIV TEMPERATURE NA STABILNOST RESVERATROLA.....	38

4.1.3.	VPLIV SVETLOBE NA STABILNOST RESVERATROLA .....	39
4.1.4.	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST RESVERATROLA .....	40
4.2.	VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV .....	43
4.2.1.	VELIKOST DELCEV, ZETA POTENCIAL IN POLIDISPERZNI INDEKS .....	43
4.2.2.	SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ RAZTOPINE IN IZ DISPERZIJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV.....	46
4.3.	VPLIV RAZTOPIN SAMEGA RESVERATROLA IN DISPERZIJ TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z RESVERATROLOM NA KERATINOCITE.....	47
4.3.1.	PREHAJANJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV SKOZI CELIČNE MEMBRANE KERATINOCITOV.....	47
4.3.2.	VPLIV SAMEGA RESVERATROLA ALI TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z RESVERATROLOM NA CELIČNO MORFOLOGIJO IN MITOHONDRIJSKO AKTIVNOST.....	49
5.	<b>SKLEP .....</b>	<b>56</b>
6.	<b>LITERATURA.....</b>	<b>58</b>

## POVZETEK

Za mnoge snovi, ki jih najdemo v hrani, je že znano, da delujejo kot antioksidanti in imajo protitumorne lastnosti. Mednje sodi tudi resveratrol (RSV), polifenolni fitoaleksin, ki je prisoten zlasti v rdečem grozdju, borovnicah in vinu. RSV izkazuje številne biološke učinke, med katerimi je pomembno predvsem njegovo antioksidativno delovanje, ki je značilno za polifenole in katerega smo raziskovali tudi v diplomski nalogi s pomočjo umetnega radikala DPPH<sup>•</sup>. Zaradi svojih učinkov je RSV potencialen kandidat za zaščito pred razvojem raka pri ljudeh, tudi kožnega. Koža je namreč zaradi izpostavljenosti okolju glavna tarča oksidativnega stresa, povzročenega z ultravijoličnim (UV) sevanjem. Pri celični zaščiti pred tovrstnimi poškodbami imajo bistveno vlogo mitohondriji.

Z namenom, da obidemo določene intrinzične omejitve RSV, ki smo jih predhodno določili (slaba topnost v vodi, fotolabilnost), in izboljšamo dostavo RSV v celice, smo tega vgradili v nosilni sistem. Odločili smo se za trdne lipidne nanodelce (SLN), ker omogočajo vgradnjo lipofilnih zdravilnih učinkovin (ZU), njihovo prirejeno sproščanje in povečanje stabilnosti. SLN z RSV (SLN-RSV) smo izdelali z metodo vroče homogenizacije, saj se je RSV izkazal za termostabilno spojino pri temperaturi taljenja lipidov. S spremljanjem velikosti, polidisperznega indeksa in zeta potenciala nanodelcev (ND) skozi določeno časovno obdobje smo ugotovili njihovo dobro fizikalno stabilnost.

SLN-RSV smo preizkušali na človeških keratinocitih NCTC2544. S fluorescenčno označenimi SLN smo ugotovili, da ND prehajajo v celice in se namestijo ob jedru in med mitohondrijske strukture. Nadalje smo ugotovili, da prosti RSV in RSV v SLN vplivata na celično morfologijo in mitohondrijsko aktivnost pri normalnih in stresnih pogojih (po obsevanju z žarki UVB). Posledica obsevanja keratinocitov je bila spremenjena celična morfologija in zmanjšana mitohondrijska aktivnost. Raztopine RSV v koncentracijah 10 ali 100  $\mu\text{mol/l}$  so povzročile podobne ali še bolj pogubne spremembe v celični morfologiji kot sami žarki UVB. SLN z 10  $\mu\text{mol/l}$  RSV so bili prav tako neučinkoviti v boju s posledicami UVB obsevanja, verjetno zaradi prenizke koncentracije RSV. Samo SLN s 100  $\mu\text{mol/l}$  RSV so ohranili celično morfologijo in izboljšali mitohondrijsko aktivnost obsevanih keratinocitov. Rezultate lahko pripišemo postopnemu sproščanju RSV iz SLN in tudi znotrajcelični dostavi RSV s pomočjo SLN, in sicer predvsem pretežnemu razporejanju v

mitohondrije, kjer RSV izrazi svoje antioksidativno delovanje. Iz dobljenih rezultatov in podobnih objavljenih poročil zaključujemo, da bi bil tovrsten nano-dostavni sistem primeren za zaščito keratinocitov pred nevarnimi vplivi UVB sevanja, ki se največkrat zaključijo v nastanku raka.

## **ABSTRACT**

Many substances found in food are already known to act as antioxidants and have anti-tumor properties. One of them is resveratrol (RSV), a polyphenol phytoalexin. It is found mostly in grapes, blueberries and wine. RSV has many biological effects, the most important being its antioxidant action typical of polyphenols, which has been the focus of our dissertation through the use of an artificial radical DPPH<sup>•</sup>. The effects of RSV make it a potential candidate for the prevention of cancer in humans, including skin cancer. Due to its exposure to the environment, the skin is the principle target of oxidative stress, caused by ultraviolet (UV) radiation. Mitochondria play the main role in protecting cells from UV-induced damage.

With the intent of bypassing certain intrinsic limitations of RSV determined beforehand (poor solubility, photolability) and enhancing the delivery of RSV in cells, we have put it into a delivery system. We have chosen solid lipid nanoparticles (SLN) because they enable the incorporation of lipophilic healing ingredients (HI), their adapted release and increase in stability. Solid lipid particles with RSV (SLN-RSV) were produced by the hot homogenization method, as RSV has proven to be a thermo-stable compound at the temperature of lipid's fusion. By monitoring the size, the polydispersity index and the zeta potential of nanoparticles through a given period of time, we have established them to have proper physical stability.

SLN-RSV were tested on human keratinocytes. Fluorescently marked SLN were used to determine that nanoparticles penetrate cells and position themselves along the nucleus and between the mitochondrial structures. Further we discovered that the free RSV and RSV in SLN influence the cellular morphology and mitochondrial activity in normal and stressful conditions (after the radiation with UVB rays). The ill effects of keratinocyte irradiation were changes in cellular morphology and diminished mitochondrial activity. Solutions of

RSV with concentrations of 10 or 100  $\mu\text{mol/l}$  have caused equal or even more devastating changes in the cellular morphology than UVB rays themselves. SLN with 10  $\mu\text{mol/l}$  RSV were equally powerless when faced with the consequences of UVB radiation, probably due to an insufficient concentration of RSV. Only SLN with 100  $\mu\text{mol/l}$  of RSV have maintained the cellular morphology and enhanced the mitochondrial activity of irradiated keratinocytes. Aside the gradual release of RSV in SLN the results can also be attributed to the inner-cellular delivery of RSV with the means of SLN, especially its allocation in the mitochondria, where the antioxidant properties of RSV live up to their potential. Gathered results and similar published reports led us to the conclusion that a nano-delivery system of this kind would be suitable for the protection of keratinocytes against the UVB radiation that in most cases leads to cancer.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina
AE	»Antioxidant Efficacy«, antioksidativna učinkovitost
AP-1	»Activating Protein-1«, aktivirajoči protein-1
DMPD	N,N-dimetil-p-fenilendiamin
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DPPH•	1,1'-difenil-2-pikrilhidrazil radikal
HaCaT	»Human Keratinocyte Cell Line«, keratinocitna celična linija
HEK 293	»Human Embryonic Kidney cell line«, celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic
HIF	»Hypoxia Inducible Factor«, hipoksijo inducirajoči dejavnik
HLB	»Hydrophilic-lipophilic balance«, hidrofilno-lipofilno ravnotežje
Keap1	»Kelch-like-ECH-associated protein 1«
MEM	»Minimum essential medium«, medij za gojenje celične kulture
MTS test	test aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze
ND	nanodelci
Nrf2	»NF-E2-related factor 2«
PAS	površinsko aktivna snov
PBS	fosfatni pufer
PCS	»Photon Correlation Spectroscopy«, fotonska korelacijska spektroskopija



PI	polidisperzni indeks
RNK	ribonukleinska kislina
RSV	resveratrol
ROS	»reactive oxygen species«, reaktivne kisikove zvrsti
SLN	»solid lipid nanoparticles«, trdni lipidni nanodelci
TEAC	»Trolox Equivalent Antioxidant Capacity«, troloxu-ekvivalentna antioksidativna kapaciteta
TPA	»Tissue plasminogen activator«, aktivator tkivnega plazminogena
TPP+	trifenilfosfonijev kation
UV	ultravijolično
VitE	vitamin E
ZP	zeta potencial
ZU	zdravilna učinkovina

## 1. UVOD

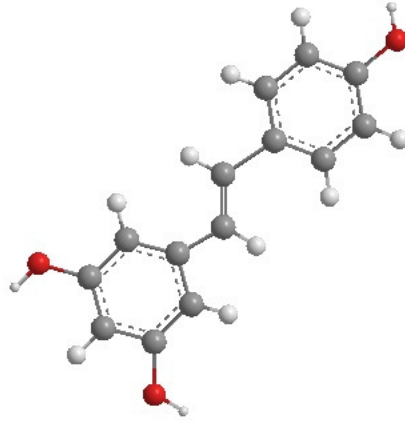
Pojavnost kožnega raka, tako melanomskega kot tudi nemelanomskega, narašča z zaskrbljujočo hitrostjo. Gre za zelo pogosto obliko malignosti z izjemnim vplivom na javno zdravje in stroške, povezane z zdravljenjem. Zaenkrat je zdravljenje kožnega raka bolj ali manj neuspešno, zato je razvoj kemopreventivnih pristopov nujen (1). Proučevanje novih, učinkovitih spojin, ki varujejo pred razvojem raka, je pripeljalo do odkritja mnogih v naravi prisotnih snovi, med katerimi je tudi RSV. To je fitoaleksin, prisoten zlasti v lupini grozdnih jagod. Med drugim ima protivnetno in antioksidativno delovanje, zavira zlepljanje trombocitov in rast številnih rakavih celic. Njegovo zaščitno in terapevtsko vlogo so dokazali na vseh treh nivojih nastanka in razvoja raka: iniciaciji, promociji in progresiji, pri kemično ali z žarki UVB povzročeni kožni karcinogenezi pri miših (2). Natančni mehanizmi omenjenega delovanja zaradi številnih bioloških učinkov RSV v glavnem ostajajo neznani (3).

Vpliv fizioloških dejavnikov (številne membrane, encimi, pH idr.) je pri apliciranju zdravil *in vivo* velikokrat usoden za številne ZU. Zato so dobrodošli takšni nosilni sistemi, ki uspejo ZU zaščititi pred nevarnim okoljem in jo prenesti na mesto delovanja. Na tem področju so precej obetajoči trdni lipidni nanodelci (angl. solid lipid nanoparticles = SLN), ki predstavljajo novo generacijo nosilnih sistemov. Sestavljeni so iz sestavin, ki jih organizem dobro prenaša. Glavna prednost je njihovo trdno ogrodje, zmožnost zaščite ZU pred kemično razgradnjo in možnost njenega prirejenega sproščanja. Zaradi svoje majhnosti in posledično velike površine imajo močne adhezivne lastnosti, kar jim omogoča tvorbo filma po nanosu na kožo. Koža se tako hitreje obnovi in navlaži (4,5).

### 1.1. RESVERATROL

Znano je, da ima uživanje rastlinske hrane koristne učinke na zdravje tudi zaradi vsebujočih fenolnih snovi, ki igrajo ključno vlogo antioksidantov v telesu. Slednje omogoča prisotnost hidroksilnih skupin in aromatskega obroča, ki lahko reagirajo s kisikovimi radikali (6).

Znanstveni izsledki kažejo, da antioksidanti zmanjšujejo možnost razvoja kroničnih bolezni, kot so rak in srčne bolezni (7). V tej skupini je tudi RSV (3,5,4'-trihidroksistilben) (Slika 1), ki kot biološko aktivna spojina spada med fitoaleksine.



Slika 1: Strukturna formula resveratrola.

#### 1.1.1. VIR RESVERATROLA

Fitoaleksini so sekundarni rastlinski metaboliti, ki nastanejo kot odgovor na prisotnost nepatogenih ali avirulentnih bakterij, virusov ali gliv (8). Nastanek RSV sprožijo tudi številni drugi stresni dejavniki, kot je izpostavljenost ozonu, sončni svetlobi in težkim kovinam. Zaznali so ga v približno 70 rastlinskih vrstah (2). Vsebnost RSV je relativno visoka v grozdju, kar je verjetno posledica okužbe vinske trte (*Vitis vinifera*) z glivo *Botrytis cinerea* (8). Sveža lupina grozdnih jagod vsebuje 50 - 100 µg RSV na gram mokre mase, kar ima za posledico visoko vsebnost RSV v rdečem vinu in grozdnem soku (2). RSV lahko pridobivamo z organsko sintezo ali s pomočjo biotehnoloških metod, a je vseeno bolj pogosta njegova ekstrakcija iz korenin japonskega dresnovca (*Polygonum cuspidatum*) in lupin grozdnih jagod, ki ji sledi koncentriranje in filtracija. Za biološke preiskave je potrebno tako pridobljeni surovi RSV očistiti s kristalizacijo (9).

RSV se nahaja tako v *trans-* (*E-*) kot v *cis-* (*Z-*) obliki, pri čemer je biološko aktivnejši *trans-* izomer (5). V rastlinskih izvlečkih je običajno prisotna zmes obeh oblik, a prevladuje *trans*-RSV (8). *Cis*-izomer je nestabilen in posledično komercialno nedostopen. Zato v glavnem uporabljamo *trans*-obliko (5).

### 1.1.2. UČINKI RESVERATROLA

Predvidevajo, da je ravno RSV tista aktivna sestavina hrane, ki je zaslužna za zaščito pred kardiovaskularnimi obolenji, kar je znano kot »francoski paradoks«. Statistično potrjeno je, da je v nekaterih predelih Francije kljub visoki vsebnosti maščob v hrani umrljivost zaradi aterosklerotičnih zapletov nizka. Vzrok naj bi bilo redno uživanje rdečega vina in v njem prisotnih antioksidantov - zlasti RSV (8). Številne študije dokazujejo edinstveno učinkovitost RSV v preventivi pred pomembnimi boleznimi, kot so srčno-žilne bolezni, rak, virusne okužbe in nevrodegenerativni procesi (10).

RSV so prvič izolirali že pred nekaj desetletji, a je ta polifenolna spojina zaradi svojih obsežnih fizioloških učinkov postala bolj zanimiva šele v zadnjih letih. Obsežne preiskave na človeških celičnih kulturah kažejo, da lahko RSV vpliva na številne signalne poti, vključene v celično rast, apoptozo in vnetje. Zaradi strukturne podobnosti z dietilstilbestrolom pomaga v preprečevanju osteoporoze pri ženskah v menopavzi (11), deluje protivnetno, antiagregacijsko, antioksidativno in protitumorsko (5). Prevladujeta predvsem zadnja dva načina delovanja, čeprav se vsi naštetih med seboj prepletajo.

#### *a) Protitumorsko delovanje resveratrola*

Zavira vse tri stopnje karcinogeneze (iniciacijo, promocijo in progresijo) ter angiogenezo in metastaziranje. Protirakavo delovanje RSV je v močni povezavi z njegovimi antioksidativnimi lastnostmi, a je lahko tudi posledica zaviranja številnih encimov, kot so ciklooksigenaza 1 in 2, peroksidaza, protein-kinaza C ter regulatorjev celičnega cikla. RSV je namreč zmožen zadržati celice v fazi G<sub>1</sub> celičnega cikla (5). Sproži lahko tudi apoptozo, kar so dokazali na mnogih celičnih kulturah. V JB6 celicah v koncentracijskem območju 2,3-40 μM zavira tumorski promotor TPA in celično transformacijo, odvisno od epidermalnega ravnega dejavnika. Pri enaki koncentraciji sproži RSV tudi apoptozo, ki poteka po ceramidno-sfingomielinazno-odvisni poti in pospešuje transkripcijo, odvisno od proteina p53 (tumor-zavirajoči protein). Pri fibroblastih se je izkazalo, da poteka apoptoza, sprožena z RSV, samo pri zvišanem nivoju proteina p53 (3). Z enakim mehanizmom lahko RSV sproži apoptozo v tumorjih mišje kože, kar kaže na njegovo kemopreventivno učinkovitost, ki poteka zlasti preko vpliva na proteine, vključene v mitohondrijske poti za sprožitev apoptoze. RSV lahko v določenih linijah rakavih celic izzove tudi od proteina p53 neodvisno apoptozo (12).

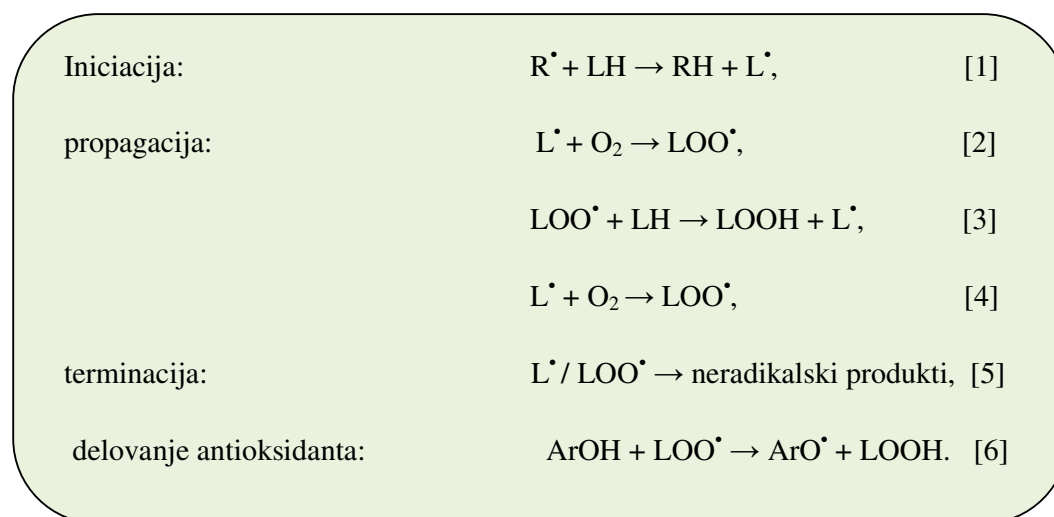
*b) Neposredno in posredno antioksidativno delovanje resveratrola*

Rakave celice so neprestano pod oksidativnim stresom, zato lahko intenziteta teh procesov omogoča njihovo selektivno prepoznavanje (13). Predvidevajo, da je ključni dejavnik karcinogeneze prisotnost zlasti tistih reaktivnih kisikovih zvrsti (angl. reactive oxygen species = ROS), ki nastajajo v mitohondrijih (14). Mitohondrijski ROS so vključeni v aktivacijo dejavnika HIF (Hypoxia Inducible Factor), ki uravnava angiogenezo in ostale faze razvoja raka. Poskusi na miših so pokazali, da RSV vzpodbuja mitohondrijsko aktivnost in poveča aerobno zmogljivost miši preko indukcije genov za oksidativno fosforilacijo in mitohondrijsko biogenezo. Mitohondriji so namreč za celico ključni proizvajalci energije, ki skozi procese celičnega dihanja pretvarjajo hranila v energijo (15). Sklepamo lahko, da bi bilo možno z RSV, še zlasti če ga dostavimo do mitohondrijev, zmanjšati delovanje ROS.

Ker je koža glavni tarčni organ ROS, ki nastanejo pod vplivom UV žarkov, morajo biti celice v koži opremljene z učinkovitim sistemom antioksidativnih spojin in encimov, ki jim omogoča vzdrževanje ravnotežja med oksidativnim stresom in antioksidativno obrambo ter jih tako varuje pred poškodbami zaradi oksidativnega stresa. Do tega namreč pride, v kolikor antioksidativni obrambni sistem v živih celicah hitro ne odstrani ROS.

Ključni beljakovini za pospeševanje transkripcije različnih antioksidativnih encimov sta z NF-E2-sorodni dejavnik 2 (angl. NF-E2-related factor 2 = Nrf2) in Kelchu-podoben-iz-ECH-povezani protein 1 (angl. Kelch-like-ECH-associated protein 1 = Keap1). Nrf2 se nahaja v številnih tkivih in organih (tudi v keratinocitih) in se vezan na Keap1 večinoma zadržuje v citoplazmi. Ko se kompleks Nrf2-Keap1 prekine, se Nrf2 hitro razporedi v celično jedro, kjer poveča izražanje antioksidativnih encimov in encimov II faze. Povečanje aktivnosti Nrf2 predstavlja smiselen način kemopreventive v začetnih stopnjah karcinogeneze. Na celicah HaCaT (angl. Human Keratinocyte Cell Line) so dokazali, da RSV ojača celično antioksidativno zaščito preko razgradnje Keap1 in povečanega razporejanja Nrf2 v jedro keratinocitov. Posledica slednjega je večja zaščita celic pred oksidativnim stresom, povzročenim s sevanjem UVA. Ko so namreč celice HaCaT obsevali s svetlobo UVA, se je vsebnost ROS povečala, ob dodatku RSV pa znižala. RSV je torej zmožen varovati keratinocite pred oksidativnim stresom, ki ga povzroča sevanje UVA (16).

Polifenoli (ArOH), med katere spada RSV, pa so sposobni tudi neposredno vplivati na kisikove radikale v telesu, ki nastajajo med encimskimi reakcijami, obsevanjem z ionizirajočim sevanjem ali s svetlobo UV. Nastali kisikovi radikali lahko sprožijo lipidno peroksidacijo (peroksidacija polinenasičenih maščobnih kislin v lipidih, Slika 2), ki je verižna reakcija (Slika 2; koraki [1]-[5]). Lipidna peroksidacija je ena izmed bistvenih mehanizmov poškodb celic in tkiv, katerih posledice so številne bolezni, kot so ateroskleroza, vnetje in rak (17). Princip reševanja lipidne peroksidacije je prenos vodikovega atoma z antioksidanta h kisikovemu radikalumu. Poznavanje kinetike tega prenosa je nadvse pomembno, saj imajo kisikovi radikali v telesu kratko življenjsko dobo (6). Prisotnost različnih antioksidantov, npr. RSV, lahko inhibira lipidno peroksidacijo na različnih nivojih, kar je posledica reakcije s kisikovimi radikali, kot je peroksilni radikal (LOO<sup>•</sup>). Pri tem nastanejo manj reaktivni ArO<sup>•</sup> radikali z daljšo življenjsko dobo (17).



Slika 2: Shema poteka lipidne peroksidacije in delovanja fenolnih antioksidantov (ArOH).

RSV v teh reakcijah deluje kot antioksidant ali prooksidant, tj. kot inhibitor ali pospeševalec oksidativnih in radikalnih verižnih procesov. Kateri učinek bo prevladal, je poleg njegovega redoks potenciala, odvisno še od prisotnosti kovinskih ionov, ki sodelujejo v redoks procesih (Fe<sup>2+/3+</sup>, Cu<sup>+/2+</sup>) in/ali od oksidativnih encimov, pH, koncentracije RSV, celične vrste in od samega subceličnega prostora (14).

### 1.1.3. DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

Za oceno antioksidativnega delovanja so razvili številne metode *in vitro*, pri katerih so v uporabi različne snovi, kot so: 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina (ABTS), 1,1'-difetil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH<sup>•</sup>) in N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD). Ti predstavljajo »umetne« radikale, ki niso prisotni v pogojih *in vivo*, kar je njihova glavna pomanjkljivost (6).

Pri metodi DPPH uporabljamo stabilni in dostopni radikal in je široko uporabna zlasti pri preučevanju antioksidativnih lastnosti sestavin v hrani (7). Je hitra, enostavna, poceni in ponovljiva metoda. Lahko jo uporabljamo za testiranje trdnih ali tekočih vzorcev in ni specifična za noben antioksidant, ampak izraža antioksidativno kapaciteto celotnega vzorca.

Rezultate lahko izrazimo na različne načine, najbolj pogosto v obliki vrednosti TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), pri kateri antioksidativno učinkovitost (AE = Antioxidant Efficacy) preiskovane snovi primerjamo z AE standardnega antioksidanta Troloxa ([S]-[-]-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina). DPPH<sup>•</sup> uporabljamo za oceno sposobnosti fenolnih komponent za prenos šibko vezanega vodikovega protona radikalu. Sposobnost doniranja vodikovega atoma nam podaja vrednost EC<sub>50</sub>, ki predstavlja koncentracijo, potrebno za zmanjšanje DPPH<sup>•</sup> na polovico. Čas, potreben za doseg EC<sub>50</sub>, označujemo s TEC<sub>50</sub>. AE pa je parameter, ki upošteva oba dejavnika ( $AE = 1/(EC_{50} \times TEC_{50})$ ) (6).

## 1.2. KOLOIDNI NOSILNI SISTEMI

Definicija koloidnih sistemov temelji na upoštevanju sestave sistema in velikosti delcev. V splošnem so koloidni sistemi sestavljeni iz dispergirane faze, ki je enakomerno porazdeljena znotraj disperznega medija. Velikost dispergirane faze koloidnega sistema je v območju 1-1000 nm (18). V ožjem smislu so to sistemi, sestavljeni iz delcev, velikih 10-400 nm.

Nanodostavni sistemi zaradi svojih prednosti predstavljajo veliko priložnost za boljšo dostavo ZU. Omenjeni nosilci omogočajo, da so lastnosti ZU, ki jo vsebujejo, skrite pred »uničevalno« okolico. Z določenimi nosilnimi sistemi lahko dosežemo tudi ciljno dostavo

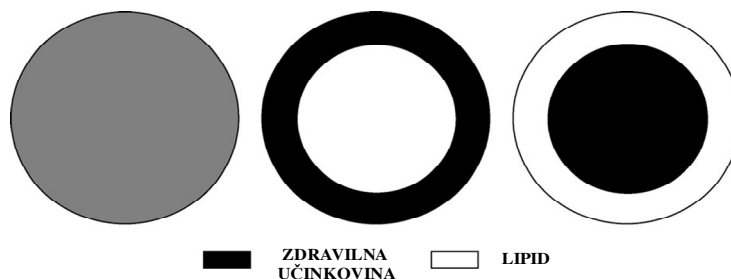
in nadzorovano sproščanje ZU. Omogočajo tudi zaščito ZU pred kemičnim in biološkim razpadom, povezanim z načinom dajanja. Znotraj številnih nanometrskih sistemov razvijajo zlasti lipidne sisteme, in sicer liposome, micelle, nanoemulzije, mikroemulzije in SLN (4, 19).

### **1.3. TRDNI LIPIDNI NANODELCI**

ND, sestavljeni iz trdnih, biološko razgradljivih lipidov, so t.i. SLN (20). Velikost SLN običajno znaša od 40 do 1000 nm (21). Osnovni namen njihove uporabe izvira iz prednosti SLN, ki jih prinaša njihovo lipidno ogrodje. To so nizka toksičnost, sposobnost ciljane in nadzorovane dostave ZU, visoka stopnja vgrajevanja, vgrajevanje hidrofilnih in zlasti lipofilnih ZU, zmanjšana možnost akutne ali kronične toksičnosti zaradi prisotnosti fiziološko sprejemljivih lipidov, odpravljanje uporabe organskih topil, možnosti povečanja izdelave in sterilizacije v industrijskem merilu. Vodne disperzije SLN lahko z liofilizacijo ali z metodo razprševanja s sušenjem pretvorimo v dolgotrajno stabilno obliko, z ustrezno modifikacijo površine SLN pa lahko pridobimo možnost ciljanega dostavljanja ZU. So potencialni nosilci ZU za peroralno, dermalno in parenteralno dajanje (19, 20, 22).

Glede na mesto vgrajevanja ZU in načina sproščanja le-te se SLN delijo na tri skupine (Slika 3). V tip I sodijo SLN, ki vsebujejo enakomerno porazdeljeno ZU. Le-ta je bodisi molekularno dispergirana v lipidnem jedru ali pa prisotna v obliki amorfnih skupkov. Tak tip SLN izdelajo s hladno homogenizacijo. Zaradi svoje strukture je uporaben za doseganje prirejenega sproščanja. SLN tipa II vsebujejo ZU v ovojnici. Nastanejo takrat, ko je koncentracija ZU v talini lipida nizka. Pri uporabi vroče homogenizacije se tekom ohlajanja nanoemulzije lipidna faza prva obori, kar poveča koncentracijo ZU v preostali talini lipida. Ko koncentracija ZU v preostali talini preseže topnost, se okrog lipidne sredice z zelo nizko količino ali brez ZU tvori zunanja ovojnica, ki vsebuje ZU in lipid. Opisani tip SLN je uporaben za neprirejeno sproščanje ZU, njegova posebnost pa so okluzivne lastnosti lipidnih jeder. V tip III uvrščamo SLN z višjo vsebnostjo ZU v jedru. Nastanejo, kadar je koncentracija ZU v talini lipida približno enaka njeni topnosti. Med ohlajanjem nanoemulzije topnost ZU pada. Ob prenasičenju raztopine pa se ZU obori. Nazadnje nastane lipidna ovojnica, ki skoraj ne vsebuje ZU. Tip III SLN uporabljamo za doseganje podaljšanega sproščanja ZU (23).



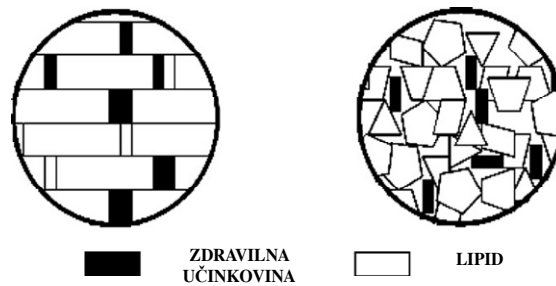


Slika 3: Modeli vključitve ZU v SLN: Tip I - molekularno dispergirana ZU (levo), tip II - lipidno jedro, obdano z ovojem z ZU (na sredini) in tip III - jedro z ZU, obdano z lipidnim ovojem (desno).

### 1.3.1. SESTAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

SLN so sestavljeni iz lipidov, ki so pri sobni in telesni temperaturi trdni, ter površinsko aktivnih snovi (PAS), ki so na površini in stabilizirajo disperzijo ND (24). Po kemijski naravi so lahko lipidi trigliceridi, delni gliceridi, maščobne kisline, steroidi ali voski (22). Delež trdnih lipidov, dispergiranih v vodnem mediju je od 0.1% (m/m) do 30% (m/m), PAS predstavljajo od 0.5% (m/m) do 5% (m/m) (21). PAS mora biti prisotna v ustrezni koncentraciji, pomembno je tudi, da izberemo primerno vrsto PAS. Običajno temelji izbira PAS na njeni vrednosti hidrofilno-lipofilnega ravnotežja (angl. Hydrophilic-lipophilic balance, HLB), ki mora biti nižja od 12 (25). V SLN so lahko vključeni tudi antioksidanti, ki varujejo pred peroksidacijo sestavin SLN. Znano je namreč, da so številni lipidi in PAS občutljivi na oksidacijo, pri kateri lahko nastanejo ROS (23). SLN lahko vsebujejo še ZU (21). Količina ZU, ki jo SLN lahko nosijo in dostavijo, je odvisna od topnosti ZU v talini lipida, fizikalno kemijskih lastnosti trdnega lipida in njegove polimorfne oblike. Glede na lipofilnost in hidrofilnost se ZU v SLN razporeja na različna mesta.

Za doseganje visoke vsebnosti ZU v SLN je najosnovnejši pogoj visoka topnost ZU v talini lipida. To lahko povečamo z uporabo solubilizatorjev. Pri izdelavi SLN je izredno pomemben izbor sestavin lipidne faze. Lipidi, kot so trigliceridi ene maščobne kisline, tvorijo visoko kristalinične delce z urejeno kristalno zgradbo in povzročijo izključevanje ZU med shranjevanjem. V nasprotju s tem pa zmesi lipidov, ki vsebujejo maščobne kisline z različno dolgimi verigami, tvorijo nepopolne kristale s strukturnimi nepravilnostmi, v katere se umestijo gostujoče molekule, npr. ZU (Slika 4).



Slika 4: Nastanek pravilnih kristaliničnih struktur v lipidnem nanodelcu vodi v manjšo učinkovitost vgrajevanja ZU (levo). Več ko je nepravilnosti v kristalni strukturi, večja je učinkovitost vgrajevanja ZU (desno).

Na vsebnost ZU v SLN odločilno vpliva polimorfizem. Kristalizacija lipidov v SLN poteka drugače kot v primeru večjih količin lipidov. V SLN lipidno ogrodje vsaj delno rekristalizira v  $\alpha$ -obliki (nestabilna polimorfna oblika) ali v  $\beta'$ -obliki (metastabilna polimorfna oblika). Lipidi v večjih količinah rekristalizirajo zlasti v  $\beta'$ -obliko, ki zelo hitro prehaja v stabilno  $\beta$ -obliko. Med nastajanjem stabilnejših polimorfnih oblik število napak v rešetki pada, kar pomeni, da spreminjanje  $\beta'$ - v  $\beta$ -obliko pospešuje iztiskanje ZU. V splošnem je opisani pojav v primerjavi s kratkoverižnimi počasnejši za dolgoverižne trigliceride (23).

### 1.3.2. METODE IZDELAVE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

- Visokostrižna homogenizacija in ultrazvok

Visokostrižna homogenizacija in ultrazvok sta prvotno uporabljani tehniki dispergiranja za pripravo trdnih lipidnih nanodisperzij. Obe sta široko razširjeni in enostavni. Kakovost disperzij je pogosto odvisna od prisotnosti mikrodelcev. Pri uporabi kovinskih elementov za homogeniziranje lahko pride do kontaminacije s kovinami.

- Emulgiranje taline lipida v vodni disperzni medij z rotor-stator homogenizatorjem (ali vroča homogenizacija)

Ta postopek izvajamo pri temperaturi, višji od temperature tališča lipida, zato ga obravnavamo kot homogenizacijo emulzije. Talini lipida z dispergirano ZU dodamo na enako temperaturo segreto vodno fazo s PAS ter dispergiramo s hitrim mešalnikom.

- Visokotlačna homogenizacija

Visokotlačna homogenizacija je zanesljiva in zelo zmogljiva tehnika za izdelavo SLN. Že vrsto let jo uporabljamo za izdelavo nanoemulzij za parenteralno prehrano.

Pri tem postopku najprej pripravimo predemulzijo s pomočjo hitrega mešalnika, kot je opisano zgoraj. Zelene so kapljice mikrometrskih velikosti, saj kakovost predemulzije močno vpliva na kakovost končnega izdelka. Sledi homogenizacija predemulzije pod visokim tlakom in pri temperaturi nad temperaturo tališča lipida. Tako homogenizator potisne tekočino pod visokim tlakom (100-2000 bar) skozi ozko špranjo (območje nekaj mikronov). Zaradi pospeševanja disperzije na kratki razdalji do visoke hitrosti (preko 1000 km/h) nanjo delujejo močne strižne sile in sile kavitacije. Tako se mikrokapljice razbijejo v nanokapljice (22).

Višja temperatura načeloma omogoča nastanek manjših delcev zaradi manjše viskoznosti notranje faze, a po drugi strani pospeši razpad ZU in nosilnega sistema. Visokotlačna homogenizacija prav tako poveča temperaturo vzorca (približno za 10°C na 500 barov). Homogenizacijo lahko ponovimo večkrat, običajno pa zadostuje 3 do 5 ciklov, pri tlaku 500 do 1500 barov. Višji tlak in večje število ciklov pogosto povzročita nastanek večjih delcev zaradi koalescence, ki je posledica povečane kinetične energije delcev.

Primarni produkt vroče homogenizacije je zaradi tekočega stanja lipida nanoemulzija. Trdni delci nastanejo šele po ohladitvi vzorca na sobno ali od te nižjo temperaturo. Majhna velikost delcev in prisotnost PAS lahko upočasni kristalizacijo lipida. Zato lahko vzorec v obliki podhlajene taline vztraja nekaj mesecev. Visokotlačna homogenizacija ima v primerjavi z drugimi metodami številne prednosti, kot so npr. odsotnost organskih topil, enostaven »scale up« in kratek čas izdelave (21).

- Hladna homogenizacija

Hladna homogenizacija predstavlja mletje trdnih lipidov. Gre za mletje suspenzije pod visokim tlakom. Ker se med homogenizacijo temperatura povečuje, sta za zagotavljanje trdega stanja lipida potrebna njen učinkovit nadzor in uravnavanje.

Med predpripravo ZU solubiliziramo ali dispergiramo v talini lipida, ki jo nato hitro ohladimo v suhem ledu ali tekočem dušiku. Hitro ohlajanje omogoča homogeno porazdelitev ZU v lipidnem matriksu. Sledi mletje lipida, ki vsebuje ZU, do mikrodelcev, velikosti 50 do 100  $\mu\text{m}$ , ki jih nato dispergiramo v mrzli raztopini emulgatorja. Dobljeno predsuspenzijo izpostavimo hladni homogenizaciji (22).

V primerjavi z vročo homogenizacijo nastanejo pri hladni homogenizaciji večji delci s širšo porazdelitvijo velikosti in ostrih robov (24). Največja prednost je v manjši izpostavljenosti vzorca visoki temperaturi, a se temu zaradi začetnega taljenja lipida ne moremo povsem izogniti.

- Izparevanje topila z obarjanjem v emulzijah tipa O/V

Pri tej metodi lipid raztopimo v organskem topilu, ki se ne meša z vodo. Organsko fazo nato emulgiramo v vodno fazo z dodatkom emulgatorja. Po odparitvi organskega topila pride do obarjanja lipida v vodni fazi. Nastane disperzija ND.

Velikost delcev je odvisna od koncentracije lipida v organski fazi. Z naraščajočo koncentracijo lipida učinkovitost homogenizacije pada zaradi večje viskoznosti dispergirane faze. Prednost te metode je odsotnost termičnega stresa, slabost pa uporaba organskih topil.

- Redčenje vroče mikroemulzije

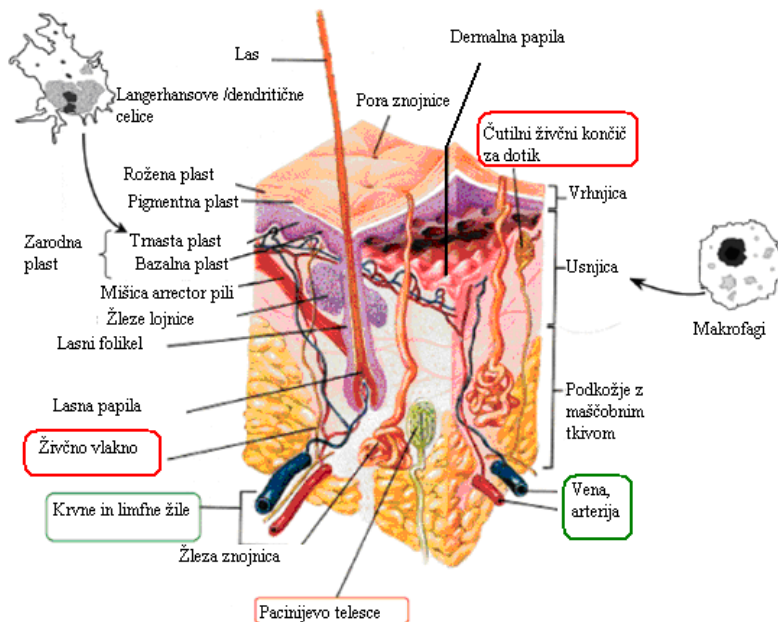
V prvem koraku oblikujemo mikroemulzijo tipa O/V, v drugem pa vročo mikroemulzijo hitro razredčimo v mrzlem vodnem mediju. Mikroemulzijo pripravimo pri 65-70°C, z mešanjem optično transparentne zmesi, sestavljene iz maščobnih kislin, emulgatorja, koemulgatorja in vode. Nastalo vročo mikroemulzijo dispergiramo v hladni vodi (2-3°C), in sicer v razmerju 1:25 ali 1:50, odvisno od sestave mikroemulzije.

Na kakovost izdelka pomembno vplivajo temperaturni gradient, pH in sestava mikroemulzije. Večji temperaturni gradient omogoči hitrejšo kristalizacijo lipida in prepreči agregacijo. Zaradi faze razredčevanja je koncentracija lipida v disperzijah znatno nižja kot pri visokotlačni homogenizaciji, težava pa je tudi v popolni odstranitvi emulgatorja in koemulgatorja (22).

## 1.4. DERMALNA APLIKACIJA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

### 1.4.1. ZGRADBA KOŽE

Koža je zgrajena iz treh plasti: vrhnjice (epidermisa), usnjice (dermisa) in podkožja (hipodermisa). Zunanja plast kože, tj. vrhnjica, je sestavljena iz rožene, zrnate, trnaste in bazalne plasti. Predstavlja učinkovito zaščito dermisa, ki vsebuje številne krvne in tkivne makrofage ter pet vrst senzornih živčnih končičev, pred vplivi okolja (Slika 5) (26,27).



Slika 5: Zgradba kože (26).

Čvrstost vrhnjice in posledično zmožnost zaščite notranjosti telesa omogoča njena edinstvena struktura. Osnovne gradbene enote vrhnjice so keratinociti, ki so med seboj

čvrsto povezani s posebnimi drobnimi beljakovinskimi vlakni, imenovanimi dezmosomi. Keratinociti nastajajo z delitvijo celic v zarodni plasti ter postopoma potujejo proti površini. Na tej poti se morfološko spreminjajo in zorijo. Glavna sprememba v keratinocitih je keratinizacija ali poroženevanje, pri kateri se v njihovi citoplazmi tvorijo posebne vlaknate beljakovine, imenovane keratini. Le-ti počasi napolnijo celico, tako da ta postopoma odmre in postane drobna rožena "luska", ki se odluči s površine kože. Celoten proces v povprečju traja 28 dni (28).

#### *1.4.2. UPORABA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV ZA DERMALNO APLIKACIJO*

Dermalna aplikacija postaja vedno bolj zanimiva, saj je peroralno uživanje zdravil veliko močnejše povezano z neželenimi sistemskimi stranskimi učinki (24). Po drugi strani pa dermalno dajanje ostaja velik izziv za farmacijo predvsem zaradi težav pri nadzoru in določanju natančne količine ZU, ki doseže posamezno plast kože (21).

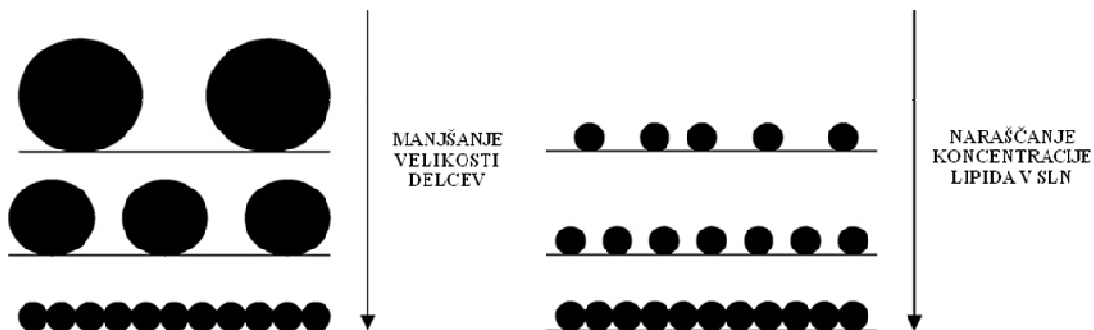
Zaradi velike površine je koža potencialno pomembna pot vstopa ND v organizem (26). V splošnem obstajajo tri poti prehajanja snovi v ali skozi kožo: intercelularna (skozi intercelularne lipide), transcelularna (skozi celice) in transfolikularna (skozi lasne mešičke in mešičke znojnic) (24).

Rožena plast predstavlja zelo učinkovito prepreko in varuje telo pred vdorom škodljivih snovi in mikroorganizmov iz okolja, preveliko izgubo vode ter nenazadnje tudi pred prehajanjem ZU. Prehajanje v/skozi kožo je oteženo zlasti hidrofilnim snovem. Zato je trenutno razvoj usmerjen k izdelavi nosilcev za uspešno prehajanje rožene plasti, bodisi z vključevanjem pospeševalcev penetracije v samo formulacijo ali z uporabo nosilnih sistemov (24). Koži lastni lipidi močno prispevajo h kožni permeabilnosti. Zato so lipidni nosilci, ki omogočajo izmenjavo lipidov s površino kože, zelo obetajoči. V to skupino spadajo liposomi, SLN, nanostrukturirani lipidni nosilci, lipidne mikrosfere, mikroemulzije in heksagonalno fazne nanodisperzije (29).

SLN imajo v primerjavi z ostalimi nosilnimi sistemi mnoge prednosti v dermalni aplikaciji. Ne le, da povečajo perkutano absorpcijo, ampak omogočajo tudi tarčno dostavo ZU v kožo in celo v njene posamezne strukturne dele. SLN lahko sproščajo ZU neprirejeno (takoj) ali pa prirejeno, predvsem skozi daljše časovno obdobje. Oba načina sta za dermalno

aplikacijo izredno koristna. Takojšnje sproščanje lahko poveča prehajanje ZU v kožo, medtem ko podaljšano sproščanje prepreči draženje kože pri visokih koncentracijah ZU in zagotavlja oskrbo kože skozi določeno daljše časovno obdobje. SLN lahko tudi povečajo kemično stabilnost spojin, občutljivih na svetlobo, oksidacijo in hidrolizo. Ker so sestavljeni iz fiziološko prisotnih in biorazgradljivih lipidov, so šibko citotoksični in odlično prenosljivi.

Zaradi svoje majhnosti se SLN koži tesno približajo in povečajo količino ZU, ki prehaja vanjo. Nastali film preprečuje izhlapevanje vode iz kože in poveča navlaženost v roženi plasti (Slika 6). Ta običajno vsebuje 20% vode. Ko se vsebnost vode poveča, je prehajanje ZU v globlje plasti kože dodatno olajšano. Ta pojav je močno povezan z velikostjo delcev in koncentracijo lipidov. Tako so delci nanometrskih velikosti tudi do 15-krat bolj učinkoviti kot mikrodelci. Za najboljše so se izkazale disperzije z delci, manjšimi od 400 nm, in z vsaj 35% vsebnostjo visoko kristaliničnih lipidov. ZU je znotraj SLN lahko različno porazdeljena, kar prav tako vpliva na perkutani privzem. Zaenkrat so dokazali, da SLN prodirajo v kožo po transfolikularni poti (21, 24).



Slika 6: Pri enaki vsebnosti lipida in manjšanju velikosti delcev se število delcev večja. Nastali film je gostejši. Če narašča koncentracija lipida pri dani velikosti delcev, narašča tudi število delcev in gostota nastalega filma.

### 1.5. KOŽNI RAK

Sončno svetlobo glede na valovno dolžino delimo na tri skupine: UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) in UVA (320-400 nm). Ultravijolično (UV) sevanje, ki prodre do zemlje, je sestavljeno iz 1-10% UVB in 90-99% žarkov UVA, medtem ko žarke UVC ustavi plast ozona. Za poškodbe DNK zaradi UV žarkov je zlasti odgovorno žarčenje

UVB, medtem ko žarki UVA škodujejo samim celicam in tako delujejo kot promotorji kožne karcinogeneze preko tvorbe ROS (30). Najpomembnejši dejavnik tveganja za razvoj nemelanomskega kožnega raka je kronična izpostavljenost sončnim žarkom in s tem UV sevanju. Pojavnost bolezni je tako povezana s staranjem ljudi in večji izpostavljenosti UV sevanju, ki narašča s tanjšanjem ozonske plasti. Umrljivost je pri nemelanomskem kožnem raku veliko nižja kot pri melanomskem. Večje tveganje za maligni melanom je verjetno povezano s pogostostjo sončnih opeklin v mladosti. Maligni melanom, ki ga odkrijejo zgodaj, se lahko zdravi kirurško. Če pa je odkritje pozno in so že prisotne metastaze, je bolezen neozdravljiva. Tak bolnik običajno umre v 4-8 mesecih. Za omenjeno bolezen ni ustreznega zdravila, ki bi bolezen ozdravilo ali podaljšalo življenje bolnikov(1).

UV sevanje je popolni karcinogeni dejavnik, ki vzpodbuja vse stopnje kožne karcinogeneze (30). Deluje zlasti preko vzbujanja molekul. V molekuli DNK nukleotidne baze absorbirajo UV žarke, kar v njih povzroči kemijske spremembe. Najpogosteje nastanejo dimeri med sosednjima pirimidinskima ostankoma, npr. med timinom in timinom, v enojni verigi DNK. Nastali dimeri ovirajo transkripcijo in podvojitev DNK. Če se take poškodbe ne popravijo, nastanejo mutacije. Pogosto in dolgotrajno izpostavljanje sončnim žarkom lahko čez čas izzove karcinom kože. Mehanizmi za popraviljanje poškodb molekul DNK so v tem primeru preobremenjeni in zato nekatere poškodbe ostanejo nepopravljene, kar s kopičenjem dodatnih mutacij lahko povzroči kožnega raka. Med prvimi mutacijami zaradi UV sevanja in prvimi zaznavnimi znaki rakave bolezni je latentna doba, ki lahko traja več let ali celo desetletij (31).

Osnovna načina zaščite pred kožnim rakom sta preventivno izogibanje UV sevanju in uporaba varovalnih pripravkov za sončenje, a je zaradi njunega neupoštevanja, potrebno razviti še druge načine zaščite. Mednje zagotovo sodi kemopreventiva (1). Kemopreventiva je preprečevanje malignih neoplazem z uporabo kemičnih spojin, ki zavirajo karcinogenezo že na začetni stopnji ali pa tudi kasneje (31). Cilj je razvoj pripravka za peroralno ali dermalno uporabo, ki bo ustrezno dopolnjeval primarne načine zaščite (1).

Glavna tarča kemopreventivnih spojin so spremenjene celične biomolekule v fazi promocije karcinogeneze, povzročene z UV sevanjem. V zgodnji fazi kožne karcinogeneze veljajo za najpomembnejše mutacije gena p53 (1). Mutacije ali izguba proteina p53 so povezane z več kot polovico vseh vrst raka pri ljudeh (3). Poškodbe DNK zaradi UV



sevanja povečajo izražanje proteina p53. Ta sproži prepisovanje gena za protein p21, ki zadrži celico v fazi G<sub>1</sub> celičnega cikla. Celični popravilni encimi imajo tako dovolj časa, da popravijo okvarjene odseke DNK. Če je okvara DNK prevelika, protein p53 sproži apoptotično smrt celice (31). Apoptoza posameznih celic namreč predstavlja zaščito pred razvojem tumorja, saj pravočasno odstrani vse poškodovane celice (3). Izpostavljenost normalnih keratinocitov UV sevanju povzroči porast proteina p53, kar je odvisno od valovne dolžine. Žarki UVA povečajo nivo proteina p53 v bazalni plasti, medtem ko ga UVB dvignejo v vseh plasteh kože. Žarki UVC pa pospešijo nastanek proteina p53 v zrnati in trnasti plasti (30). V fazi promocije kožne karcinogeneze ima pomembno vlogo tudi transkripcijski dejavnik AP-1 (angl. Activating Protein-1) (1). Inducira se pod vplivom žarkov UVB. UV sevanje povzroči še mnoga druga stanja, kot so rdečica in posledično tvorba citokinov, povečana sinteza prostanooidov in povečanje nivoja ciklooksigenaze - 2 (30).

## 2. NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo izdelali SLN z RSV (SLN-RSV) s tehnologijo vroče homogenizacije. Določili bomo fizikalno-kemijske lastnosti RSV, ki so pomembne za izdelavo SLN-RSV. Cilj naloge je uporaba RSV (samega in v SLN) na keratinocitih z namenom ojačanja njihove mitohondrijske funkcije. Dokazati želimo, da lahko s pomočjo SLN apliciramo visoko koncentracijo RSV in ga hkrati dostavimo znotrajcelično. Predvidevamo, da z uporabo SLN-RSV lahko pomagamo keratinocitom, da okrepijo svojo mitohondrijsko funkcijo in so tako pripravljeni na prekomerno količino radikalov, do katere pride zaradi najrazličnejših stresnih dejavnikov (npr. izpostavljenost UV sevanju pri sončenju).

V okviru eksperimentalnega dela bomo sledili naslednjim korakom:

- Z spektroskopijo UV-VIS bomo določali topnost RSV v različnih topilih. Le-to bomo povezali s fizikalno-kemijskimi lastnostmi topil. Iz rezultatov topnosti bomo določili, kakšen medij ustreza RSV, in predvidevali mesto vgrajevanja RSV v SLN.
- Spremljali bomo vpliv temperature in svetlobe na stabilnost RSV. Ti rezultati bodo pomembni za nadaljnji postopek izdelave SLN-RSV.
- Z metodo DPPH bomo določali, kakšno je neposredno antioksidativno delovanje RSV. Skozi določeno časovno obdobje bomo ugotavljali in spremljali produkt reakcije med RSV in umetnim radikalom ter tako opredelili kinetiko redukcije. Ovrednotili bomo antioksidativno aktivnost RSV v primerjavi z vitaminom E (VitE).
- Izdelali bomo disperzije SLN-RSV, v katerih bomo spremljali velikost delcev, polidisperzni indeks (PI) in zeta potencial (ZP), in sicer znotraj 15 dni.
- S spektroskopijo UV-VIS bomo ugotavljali učinkovitost vgrajevanja in profil sproščanja RSV iz SLN v primerjavi z raztopino RSV.
  - Fluorescenčno-označene SLN-RSV bomo preizkušali na človeških keratinocitih. Preverili bomo, kam se ND v celičnem okolju locirajo. Nato bomo raztopino RSV ali SLN-RSV uporabili na keratinocitih z namenom ojačanja njihove mitohondrijske funkcije. Učinke vzorcev na celice bomo ovrednotili z fluorescenčno mikroskopijo (vpliv RSV na rast celic, celično morfologijo, morebitno uničenje določenih celičnih struktur) ter kvalitativno in kvantitativno ovrednotili mitohondrijsko aktivnost.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1. MATERIALI

##### 3.1.1. LIPIDNE SESTAVINE

- Compritol<sup>®</sup> 888 ATO je gliceril behenat (Gattefosse, Francija) in predstavlja zmes digliceridov (40-60%), trigliceridov (21-35%) in monogliceridov (13-21%) behenojske kisline. Gliceril behenat je trdna voskasta snov v obliki finega belega praška s temperaturo tališča 65-77°C (32).

##### 3.1.2. POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI

- Lutrol<sup>®</sup> F68 je poloksamer 188, neionogen blok kopolimer polietilen in polipropilen glikola (Ludwigshafen, Nemčija). Je bela, voskasta snov v obliki zrn, brez vonja in okusa, s temperaturo tališča 52-57°C. Kot PAS se poloksameri v farmaciji uporabljajo zlasti v vlogi emulgatorjev in solubilizatorjev. Veljajo za varne in nedražeče snovi. Toksikološke študije na živalih so pokazale, da poloksameri ne povzročajo senzibilizacije in ne delujejo dražeče, ko so jih nanесли na oči, dlesni in kožo (32). Pojavljajo se v številnih peroralnih, parenteralnih in dermalnih farmacevtskih pripravkih (33).

- Phospholipon<sup>®</sup> 90H je hidrogeniran sojin lecitin (Natterman, Nemčija). Lecitin je kompleksna zmes fosfatidov, sestavljena zlasti iz fosfatidilholina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina in fosfatidilinozitola. V nizkih količinah so prisotni tudi trigliceridi, maščobne kisline in ogljikovi hidrati. Sestava lecitina je v splošnem odvisna od vira pridobivanja in od stopnje čistote. Lecitin je kot sestavina celičnih membran in običajna sestavina prehrane biokompatibilen. Ob nanosu na kožo ne deluje dražeče in ne povzroča senzibilizacije (32). Kot PAS ima Phospholipon<sup>®</sup> 90H pri izdelavi SLN vlogo emulgatorja in ND daje naboj (33).

### 3.1.3. UČINKOVINA

- Resveratrol (Sigma, Nemčija) je umazano bel kristaliničen prašek (9). Njegova molekulska formula je  $C_{14}H_{12}O_3$ , njegova molska masa znaša 228.25 g/mol in ima logP 3,06 (34).

### 3.1.4. TOPILA

- Prečiščena voda, pripravljena z reverzno osmozo na Fakulteti za farmacijo,
- acetonitril (Merck, Nemčija),
- 96% etanol (Merck, Nemčija),
- etilacetat,
- benzilalkohol,
- 2-propranol,
- butillaktat,
- metanol.

### 3.1.5. CELICE, CELIČNI MEDIJI IN REAGENTI

- Celična kultura: človeški keratinociti NCTC2544, ICLC (Univerza v Genovi, Italija).
- Celični medij: Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, ZDA) z dodatki:
  - 10% (v/v) fetalni goveji serum (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, ZDA),
  - 1% (v/v) neesencialne aminokisljine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
  - 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija) in
  - 100 U/mL antibiotik/antimikotik (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija).
- Pufri: fosfatni pufer, pH 7,4 (PBS), pripravljen z raztapljanjem 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g  $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$  in 0,24 g  $KH_2PO_4$  v 800 mL destilirane vode, uravnanjem pH na 7,4 s HCl in dopolnitvijo do 1 L z destilirano vodo, pred uporabo razdeljen na alikvotne in steriliziran.

- Barvila:
  - Hoechst 33342, 2'-(4-Etoksifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol trihidroklorid (Honeywell Riedel de Haen<sup>®</sup>, Nemčija),
  - Phalloidin, Fluorescein Isothiocyanate Labeled (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
  - Mito Tracker<sup>®</sup> Red CMXRos (Molecular probes, Invitrogen<sup>™</sup>, Anglija).
- *Sterilna voda*: bidestilirana voda, sterilizirana z avtoklaviranjem po postopku za sterilizacijo vsebine (121 °C, 20 min).
- 0,25% Trypsin × EDTA (Promega Corporation, Madison, WI, ZDA).
- 4% formalin (Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Nemčija).
- Triton<sup>®</sup> X-100 (Merck, Darmstadt, Nemčija).
- RNAza A brez DNAze (DNase-free RNase A, 1 mg/mL; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
- Propidijev jodid (Propidium iodide solution, 1mg/1mL; Molecular probes, Invitrogen<sup>™</sup>, Anglija).
- Metanol 99,8% (Fluka, Nemčija).

### 3.2. APARATURE

- Tehnica Exacta 300EB (Tehnica, Slovenija),
- precizna tehtnica AG245 (Mettler Toledo, Švica),
- rotor stator homogenizator (Omni International, Gainesville, ZDA),
- UV-VIS spektrofotometer (Hewlett Packard, 8453, Nemčija),
- magnetno mešalo in grelec (IKA, Labortechnik, Nemčija),
- PCS naprava Zetasizer nano-ZS (Malvern Instrument, Velika Britanija),
- brizge; 10 ml (Ico, Italija),
- fluorescenčni mikroskop (Olympus IX 81, Tokio, Japonska),
- dializne vrečke (Sigma, Nemčija),
- avtoklav (Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija),
- pH meter (SevenMulti, Mettler Toledo, InLab<sup>®</sup> Expert Pro pH, Švica),
- avtomatske pipete (BIOHIT za 2-20, 10-100 in 100-1000 µL, za velike volumne BIOHIT MIDI PLUS, Headquarters Biohit OYJ, Helsinki, Finska; EPPENDORF za 10 µL, Hamburg, Nemčija),

- plastične polistirenske ploščice za gojenje celičnih kultur s 6, 12 ali 24-imi vdolbinicami (TPP<sup>R</sup> Techno Plastic Products, Transadingen, Švica),
- plastične epruvete (TPP<sup>R</sup> Techno Plastic Products, Transadingen, Švica),
- hladilnik (Gorenje, Velenje, Slovenija),
- krovna stekelca Assistent (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Nemčija),
- objektna stekla Assistent 50 Elka (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Nemčija),
- inkubator s CO<sub>2</sub> (SORVALL<sup>R</sup> Heraeus, KendroLaboratory products),
- vodna kopel (Memmert, Micro+Polo d.o.o., Maribor, Slovenija; Lab Vision Corporation, Kalifornija, ZDA),
- izvor sevanja UVB (ENF-260C/FE Spectroline<sup>®</sup>, Spectronics Corporation, Westbury, ZDA).

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. VREDNOTENJE RESVERATROLA

Za določanje vsebnosti RSV v vzorcih smo uporabljali UV metodo, ki omogoča hitro in ekonomično kvantifikacijo RSV.

##### 3.3.1.1. Umeritvena krivulja resveratrola

Najprej smo posneli celoten spekter RSV, da bi določili absorpcijski maksimum, ki je bil pri valovni dolžini 306 nm. Pripravili smo standardno raztopino RSV (10 mg/l) tako, da smo natančno zatehto raztopili v etanolu. Delovne standarde smo pripravili z redčenjem standardne raztopine. Absorbanco smo merili pri 306 nm. Zveza je bila v koncentracijskem območju 2-10 mg/l linearna ( $r^2 = 0,99954$ ). Med delom smo pazili, da RSV ni bil izpostavljen svetlobi.

##### 3.3.1.2. Preizkušanje topnosti resveratrola v različnih topilih

Pri sobni temperaturi smo v osmih topilih (voda, acetonitril, 96% etanol, etilacetat, benzilalkohol, 2-propranol, butillaktat in metanol) dispergirali 12 različnih količin RSV in

pripravke pustili stati 24 ur. Naslednji dan smo določali koncentracijo RSV v supernatantih z UV-VIS spektrofotometrom pri 306 nm. Vzorce smo predhodno z etanolom redčili do koncentracij v meritvenem območju UV-VIS spektrofotometra. Na podlagi največje izmerjene koncentracije smo določili topnost RSV v posameznem topilu. Glede na dobljene rezultate topnosti smo sklepali, kam se RSV umesti v SLN.

#### 3.3.1.3. Preizkušanje toplotne stabilnosti resveratrola

Pripravili smo osnovno raztopino RSV v etanolu s koncentracijo 1 mg/ml, ki smo jo razredčili do koncentracije 20 mg/l. Po dva vzorca smo za 10 minut izpostavili različnim temperaturam, in sicer: 25, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 in 90°C. Po 10 minutah smo v vzorcih neposredno določili vsebnost RSV preko merjenja absorbance pri 306 nm in dobljeno vrednost primerjali z začetno vsebnostjo RSV.

#### 3.3.1.4. Preizkušanje občutljivosti resveratrola na svetlobo

Po dva 10 ml vzorca raztopine RSV v etanolu s koncentracijo 100 mg/l smo več dni hranili pri različnih pogojih: pri sobni temperaturi nezaščitene pred svetlobo, pri sobni temperaturi z zaščito pred svetlobo, v hladilniku nezaščitene pred svetlobo in v hladilniku z zaščito pred svetlobo. Po enem, dveh, treh, desetih in petnajstih dneh smo v vzorcih po ustreznem predhodnem redčenju določali vsebnost RSV z merjenjem absorbance pri 306 nm in izmerjene vrednosti primerjali z začetno vsebnostjo RSV.

#### 3.3.1.5. Določanje antioksidativnega delovanja resveratrola

Za določitev umeritvene krivulje DPPH<sup>•</sup> smo pripravili 5 različnih koncentracij DPPH<sup>•</sup> (30, 50, 80, 100, 150 µmol/l) in določili linearni odnos med koncentracijo radikala in absorbanco pri 515 nm ( $r^2=0,99961$ ), kjer ima DPPH<sup>•</sup> svoj maksimum absorbance.

Za opredelitev antioksidativnega delovanja RSV smo pripravili svežo raztopino DPPH<sup>•</sup> v metanolu (25 mg/l) in jo zaščitili pred svetlobo. 0,1 mL 50, 80 in 100 µmol/l raztopine RSV v 15% etanolu smo dodali 3,9 ml metanolne raztopine DPPH<sup>•</sup>. Slepni vzorec je vseboval le metanol, ki je tudi sicer prevladoval v testnih vzorcih (97,5% v/v). Nato smo merili absorbance vzorcev pri 515 nm v določenih časovnih intervalih, vse dokler reakcija

ni dosegla ravnotežja, in nato preračunali delež preostalega DPPH<sup>•</sup> v reakcijski mešanici z naslednjo enačbo:

$$\text{Delež preostalega DPPH}^{\bullet} = A_t / A_0,$$

kjer  $A_t$  ustreza absorbanci DPPH<sup>•</sup> v določenem času meritve,  $A_0$  pa absorbanci DPPH<sup>•</sup> na začetku meritve. Iz nastale krivulje smo določili kinetiko reakcije RSV z DPPH<sup>•</sup>.

V naslednjem koraku smo primerjali antioksidativno učinkovitost RSV z antioksidativno učinkovitostjo VitE. V ta namen smo najprej pripravili 5 različnih koncentracij DPPH<sup>•</sup> (10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{mol/l}$ ) in določili linearni odnos med koncentracijo radikala in absorbanco pri 515 nm ( $r^2 = 0,9994$ ). Nato smo sveže pripravljene 50  $\mu\text{mol/l}$  raztopine DPPH<sup>•</sup> v metanolu, zaščitene pred svetlobo, dodali 50  $\mu\text{mol/l}$  raztopino RSV v etanolu oziroma 50  $\mu\text{mol/l}$  raztopino VitE v etanolu, in sicer v razmerju 1:1 (v/v). Sledilo je merjenje absorbance pri 515 nm v različnih časovnih intervalih, vse dokler reakcija ni dosegla ravnotežja. Slep vzorec je vseboval ustrezno mešanico topil metanola-etanola.

### 3.3.2. IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

#### 3.3.2.1. Izdelava disperzij trdnih lipidnih nanodelcev z vročo homogenizacijo

V 50 mililitrsko čašo smo zatehtali lipidne sestavine, tj. lipid Compritol, lipidni emulgator Phospholipon<sup>®</sup> 90H in RSV (razen pri praznih SLN). Zaradi majhnih količin in posledičnega nihanja tehtnice je bilo tehtanje precej oteženo. Čašo z lipidnimi sestavinami smo segrevali na vodni kopeli, dokler se niso popolnoma stalile.

Sterični stabilizator Lutrol<sup>®</sup> F 68 smo natehtali v epruveto z zamaškom in tako omejili odparevanje vode pri segrevanju. Polovico segrete vodne faze smo dodali staljenim lipidom ter pričeli s homogeniziranjem sestavin nad vodno kopeljo z rotor-stator homogenizatorjem, 5 min pri 12000 obratih/min. V drugem koraku smo dodali naslednjo polovico segrete vodne faze ter nadaljevali s homogeniziranjem sestavin nad vodno kopeljo še nadaljnjih 5 min pri 12000 obratov/min. Nastalo disperzijo smo hitro ohladili tako, da smo jo dali za nekaj minut v zamrzovalnik.

Izdelali smo 20 ml disperzije SLN (tri različne disperzije z različnim deležem RSV glede na maso ND) po naslednjih recepturah:



	0% m/m RSV		12,5% m/m RSV		37,5% m/m RSV	
	%	mg	%	mg	%	mg
Compritol® 888 ATO	4	8	3	6	1	2
Phospholipon® 90H	2	4	2	4	2	4
Lutrol F 68	2	4	2	4	2	4
RSV	0	0	1	2	3	6
Skupni delež/ masa SLN	8	16	8	16	8	16
Koncentracija RSV (µg/ml)			100		300	

### 3.3.2.2. Odstranjevanje nevgrajenih komponent z dializo

S pomočjo injekcijske brizge in igle smo previdno (da smo vnesli čim manj zraka) vbrizgali 2 ml izdelane disperzije z ND v spodaj speto dializno vrečko, ki smo jo predhodno približno 4 ure namakali v čaši s prečiščeno vodo in mešalom. Napolnjeno dializno vrečko smo speli še na zgornji strani in jo potopili v 200 ml prečiščene vode v 300 ml stekleni čaši. Čašo smo 15 minut pustili na delujočem magnetnem mešalu.

### 3.3.2.3. Vrednotenje izdelanih trdnih lipidnih nanodelcev

V neočiščeni disperziji praznih SLN smo še isti dan določili velikost delcev, porazdelitev velikosti (polidisperzni indeks, PI) in zeta potencial (ZP). Velikost delcev in PI smo v vodni disperziji določali s fotonsko korelacijsko spektroskopijo (angl. Photon Correlation Spectroscopy, PCS) (Zetasizer Nano ZS; Malvern Instrument, Velika Britanija). Vzorec disperzije ND smo ustrezno redčili (1:9) s prečiščeno vodo, nato pa 1 ml razredčene disperzije SLN odpipetirali v plastično kiveto za merjenje velikosti in izmerili velikosti delcev.

Pogoji meritev:

- temperatura : 25°C,
- kot merjenja: 173°,
- število ponovitev: 3,
- $\lambda$  laserske svetlobe (He-Ne laser): 633 nm,
- lomni količnik medija: 1,330.

Metoda temelji na meritvah fluktuacije intenzitete sipane laserske svetlobe, ki je posledica Brownovega gibanja delcev. Gre za naključno gibanje, ki je posledica trkov delcev z molekulami disperznega medija. Ker je gibanje naključno, je zgornja meja velikosti delcev,

ki jih s to metodo še lahko izmerimo, omejena s sedimentacijo, ki je odvisna od velikosti in gostote delcev (20). PCS daje najzanesljivejše rezultate za označitev glavne populacije v nanometrskem območju. Rezultat meritev, ki temelji na predpostavki, da so delci sferične oblike, sta povprečna velikost delcev in PI. PI podaja porazdelitev velikosti delcev v disperziji in lahko zavzema vrednosti med 0 in 1, pri čemer 0 pomeni monodisperzne, 1 pa polidisperzne delce. Vrednosti  $PI < 0,1$  kažejo na dobro homogenost vzorca in ozko porazdelitev velikosti ND, vrednosti  $PI > 0,3$  pa na večjo heterogenost delcev v vzorcu (19, 35).

Za merjenje ZP smo disperzijo SLN s pomočjo injekcijske brizge previdno vbrizgali v elektroforezno celico. ZP je definiran kot razlika med potencialom na površini delca močno vezane plasti ionov in elektronevtralnem območjem v raztopini. Merimo ga z elektroforezo. Pri tem gre za merjenje hitrosti gibanja nabitih delcev v električnem polju skozi tekočino. Z elektroforezo lahko ocenimo vrsto naboja delcev ter njihovo elektroforezno gibljivost, ki je povezana z nabojem na površini oz. potencialom zeta (20). V naših disperzijah smo ocenili ZP z metodo laser Dopplerjeve anemometrije.

Pogoji meritev:

- temperatura: 25°C,
- število ponovitev: 3,
- dielektrična konstanta disperznega medija: 79,0.

Na opisan način smo 2., 4., 8., 11. in 15. dan ovrednotili tudi vzorce disperzij SLN brez RSV, SLN-RSV 12,5% in SLN-RSV 37,5%, ki so bili bodisi neočiščeni ali očiščeni z dializo, shranjeni v hladilniku ali pa pri sobni temperaturi na svetlobi.

#### 3.3.2.4. Določanje učinkovitosti vgrajevanja in sproščanja resveratrola iz trdnih lipidnih nanodelcev z UV-VIS spektroskopijo

Učinkovitost vgrajevanja in profil sproščanja RSV smo določali s pomočjo dialize in UV-VIS spektroskopije. Uporabili smo disperzijo SLN z 12,5% m/m RSV, ki smo jo izdelali po postopku, opisanem v poglavju 3.3.2.1. S pomočjo injekcijske brizge in igle smo previdno (da smo vnesli čim manj zraka) vbrizgali 2 ml izdelane disperzije SLN-RSV v spodaj speto dializno vrečko, ki smo jo predhodno približno 4 ure namakali v čaši s prečiščeno vodo in mešalom. Napolnjeno dializno vrečko smo speli še na zgornji strani in

jo potopili v 200 ml prečiščene vode v 300 ml stekleni čaši. Vsakih 15 min smo odvzeli 5 ml dializnega medija, v katerem smo neposredno določali vsebnost RSV z merjenjem absorbance pri 306 nm. Odvzete volumne smo sproti nadomeščali s prečiščeno vodo. Količino RSV, ki je prešla iz dializne vrečke v dializni medij, smo izrazili v obliki odstotka glede na količino RSV, ki smo jo uporabili na začetku. Meritve smo izvajali v treh ponovitvah.

### 3.3.3. *PREIZKUŠANJE UČINKOV SAMEGA RESVERATROLA IN TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z RESVERATROLOM NA CELICAH*

#### 3.3.3.1. *Gojenje keratinocitov*

Pritrjene keratinocite NCTC2544 smo gojili v plastičnih polistirenskih ploščicah za gojenje celičnih kultur ter jih vsake 3-4 dni presajali v razmerju 1:4. Celice smo hranili v inkubatorju pri 37°C, v navlaženem zraku s 5% CO<sub>2</sub>. Uporabili smo celični medij MEM (Minimum Essential Medium) z dodatkom 10% (v/v) fetalnega govejega seruma, 1% (v/v) neesencialnih aminokislin, 2 mM L-glutamina in 100 U/ml antibiotika in antimikotika.

Za eksperimentalno delo smo celice nasadili na krovna stekelca, ki smo jih predhodno avtoklavirali in položili v polistirenske plošče s šestimi vdolbinami, ter inkubirali 24 ur v inkubatorju pri 5% CO<sub>2</sub> in 37°C, da so se oprijele podlage. V vsaki vdolbinici je bilo po 10<sup>5</sup> celic v 2 ml medija.

#### 3.3.3.2. *Ugotavljanje lokalizacije fluorescirajočih trdnih lipidnih nanodelcev v celicah*

Po 24 urah, ko so se celice pritrdile, smo jim dodali SLN v koncentraciji 230 µg/ml, ki so bili fluorescenčno označeni s SPP-189. SPP-189 je fluorescenčno barvilo s kumarinsko osnovo in dolgim lipofilnim repom. Zelo dobro se integrira v strukturo SLN in jim zagotavlja modro fluorescenco. Fluorescenčno-označene SLN smo izdelali po isti recepturi kot ostale, le da smo jim v fazi taljenja lipidov dodali lipofilno fluorescenčno barvilo SPP-189.

Po 24-urni inkubaciji celic s fluorescenčno-označenimi SLN, pri 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, je sledilo barvanje različnih celičnih organelov, in sicer jedra, mitohondrijev ter aktina. Ker

smo za barvanje izbrali 2 barvili, ki dajeta rdečo fluorescenco (za jedra in mitohondrije), je bila kombinacija barvanja sledeča: jedro in aktin, mitohondriji in aktin. Aktin smo obarvali z zeleno-fluorescirajočim barvilom. Pred vsakim dodatkom novega barvila smo celice dvakrat spirali z 0,5 mL PBS fosfatnim pufrom. Najprej smo odpipetirali medij in jim dodali barvilo za mitohondrije Mitotracker v koncentraciji 400 nM ter inkubirali 30 min pri 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Po fiksiranju celic s 500 µL 4% formalina in 10 minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo celice permeabilizirali z dodatkom 500 µL 0,25% raztopine detergenta Triton-X 100 in jih 10 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Sledil je dodatek RNAze (1 mg/ml), ki je v 10 minutah uničila morebitne fragmente RNK. Nato smo dodali propidijev jodid (40 µg/ml) in preparat inkubirali 5 minut. Propidijev jodid se veže na DNK in obarva jedro z rdečo fluorescenco. Aktin smo barvali z dodatkom barvila Phalloidin Fluorescein Isothiocyanate v koncentraciji 1 µg/mL in preparat še zadnjič inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Tako obdelane celice smo nato s krovnim steklom prenesli na objektno steklo, ki smo ga predhodno premazali s snovjo, ki preprečuje bledenje fluorescence in tako poveča obstojnost fluorescenčnih barvil. Preparate smo dva dneva pustili v temi, da so se vzorci posušili in nato robove krovnega stekla premazali s prozornim lakom za nohte ter jih shranili v hladilniku, zaščitene pred svetlobo.

Pripravljene preparate smo opazovali s fluorescenčnim mikroskopom. Celice smo posneli po rezinah ob uporabi filtrov, optimalnih za posamezno fluorescentno barvilo. Izbrane nastavitve mikroskopiranja: za modro-fluorescirajoče SLN filter DAPI, za zeleno barvilo Phalloidin Fluorescein Isothiocyanate filter FITC, za propidijev jodid in Mito Tracker Red CMXRos pa filter Tx-Red. Za vsako barvilo posebej smo nastavili intenziteto svetlobe in čas izpostavljenosti svetlobi. O lokalizaciji SLN v celicah smo sklepali na osnovi dobljenih slik, poleg tega pa tudi iz profilov intenzitete posamezne fluorescence.

### 3.3.3.3. Vpliv samega resveratrola in trdnih lipidnih nanodelcev z resveratrolo na mitohondrijsko aktivnost in morfologijo keratinocitov

Pritrjene celice smo za 24 ur izpostavili naslednjim vzorcem: 2,3 µg/ml raztopine RSV (RSV 10), 23 µg/ml raztopine RSV (RSV 100), 230 µg/ml SLN brez RSV (SLN), 23 µg/ml SLN z 10 µM RSV (SLN-RSV 10) in 230 µg/ml SLN z 100 µM RSV (SLN-RSV 100). Kontrolnim celicam smo dodali samo medij.

Naslednji dan smo po eno 6-vdolbinsko polistirensko ploščo s celicami za vsak posamezen vzorec najprej za eno uro izpostavili sevanju UVB ( $350 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ). Sledil je postopek barvanja neobsevanih in obsevanih celic. Jedra smo obarvali z barvilom, ki daje modro fluorescenco, mitohondrije z rdeče- in aktin z zeleno-fluorescirajočim barvilom. Pred vsakim dodatkom novega barvila smo celice dvakrat sprali z 0,5 mL PBS fosfatnim pufrom. Najprej smo iz celične kulture odpipetirali medij in celicam dodali barvilo za mitohondrije Mitotracker v koncentraciji 200 nM ter jih inkubirali 30 min pri  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . Po 10 minutnem fiksiranju s 500  $\mu\text{L}$  4% formalinom in 10 minutni permeabilizaciji s 500  $\mu\text{L}$  0,25% raztopine detergenta Triton-X 100 smo 30 minut barvali celična jedra po dodatku barvila Hoechst 33342, in sicer v koncentraciji 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Nazadnje smo 30 minut barvali še aktin s 500  $\mu\text{L}$  1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  barvila Phalloidin Fluorescein Isothiocyanate. Obravnavane celice smo skupaj s krovnim steklom prenesli na objektno steklo, ki smo ga predhodno premazali s snovjo, ki preprečuje bledenje fluorescence in s tem povečali obstojnost fluorescenčnih barvil. Preparate smo dva dni pustili v temnem prostoru pri sobni temperaturi, tako da so se vzorci posušili in nato robove krovnega stekla premazali s prozornim lakom za nohte ter jih shranili v hladilniku, zaščitene pred svetlobo.

Vpliv RSV v obliki raztopin in disperzij SLN-RSV na morfologijo keratinocitov smo opazovali s fluorescenčnim mikroskopom Olympus X81. Celice smo posneli po rezinah ob uporabi filtrov, optimalnih za posamezno fluorescentno barvilo. Mikroskopiranje smo izvedli z naslednjimi filtri: za modro barvilo Hoechst 33342 smo uporabili filter DAPI, za zeleno barvilo Phalloidin Fluorescein Isothiocyanate filter FITC, za rdeče barvilo Mito Tracker Red CMXRos pa filter Tx-Red. Mitohondrijsko aktivnost smo opredelili tako kvalitativno kot kvantitativno, in sicer s primerjanjem intenzitete rdeče fluorescence (mitohondriji) med posameznimi vzorci. Kvalitativno smo med seboj vizualno primerjali slike, kvantitativno oceno mitohondrijske aktivnosti pa smo dobili iz povprečja fluorescenčne intenzitete petih izbranih točk na vsaki celici, na treh različnih slikah. Za zanesljivo primerjavo med različnimi vzorci smo vse slike posneli pri enakih nastavitvah intenzitete svetlobe in enakem času izpostavljenosti svetlobi.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. VREDNOTENJE RESVERATROLA

#### 4.1.1. TOPNOST RESVERATROLA

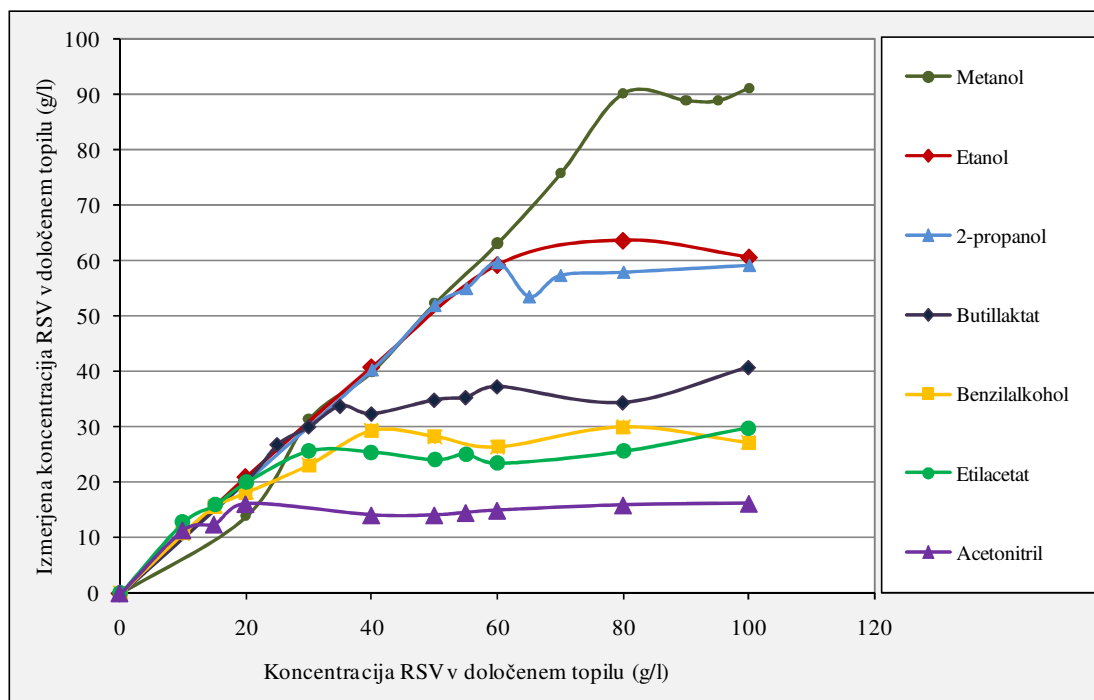
Ocena topnosti ZU v različnih topilih je velikokrat bistvena za razvoj farmacevtske formulacije. ZU, ki jo vgrajujemo v zdravilo, mora biti topna v varnih in farmacevtsko sprejemljivih topilih (36). Izmerjena topnost RSV v metanolu znaša  $90,0 \pm 1,3$  g/l, v etanolu  $61,3 \pm 2,3$  g/l in v 2-propanolu  $57,0 \pm 2,4$  g/l. V ostalih organskih topilih je njegova topnost zelo nizka, in sicer: v butillaktatu  $35,5 \pm 2,7$  g/l, v benzilalkoholu  $28,2 \pm 1,5$  g/l, v etilacetatu  $25,6 \pm 2,1$  g/l in v acetonitrilu  $14,9 \pm 1,3$  g/l (Slika 7, Preglednica I). Najnižjo topnost RSV pa smo določili v vodi, in sicer:  $32,7 \pm 1,9$  mg/l.

Prisotnost fenolne skupine v strukturi RSV je eden od pomembnejših dejavnikov, ki omogoča večjo topnost RSV v topilih, s katerimi lahko tvori vodikove vezi, na kar kažejo tudi naši rezultati (dobra topnost v alkoholih). Pomemben dejavnik, ki vpliva na topnost RSV, je tudi lipofilnost topil. Pri vseh topilih, razen pri alkoholih, se izkaže, da bolj ko prevladuje lipofilna narava topila, boljša je topnost RSV v njem (Slika 8). V alkoholih pa njegova topnost pada s povečevanjem števila ogljikovih atomov v molekulah topila.

Glede na strukturo RSV in rezultate topnosti predvidevamo, da so SLN prava izbira nosilnega sistema za RSV, saj se ta bolje raztaplja v bolj lipofilnih topilih. Kljub temu pa nad lipofilnostjo v pogledu topnosti prevlada sposobnost nastajanja vodikovih vezi. Zato lahko sklepamo, da bo pozicioniranje RSV v strukturi SLN bližje površini delcev, kjer lahko med fenolnimi skupinami RSV in stabilizatorji (npr. fosfolipidi) nastajajo vodikove vezi. Tako bodo hidroksilne skupine RSV tudi bolj izpostavljene zunanjemu mediju, s tem pa bodo posledično omogočene njegove reakcije s kisikovimi radikali. Lego RSV v SLN smo dodatno potrdili s testi sproščanja RSV iz SLN-RSV (Glej poglavje 4.2.2.).

Tudi v literaturi lahko zasledimo podoben opis obnašanja RSV. Pri vgrajevanju RSV v liposome so namreč ugotovili, da se RSV zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti vgradi v njihov fosfolipidni dvosloj, s čimer je preprečena pretvorba aktivne *trans*- konformacije v *cis*- obliko, prav tako pa tudi olajša njegov prehod v lipofilna področja bioloških

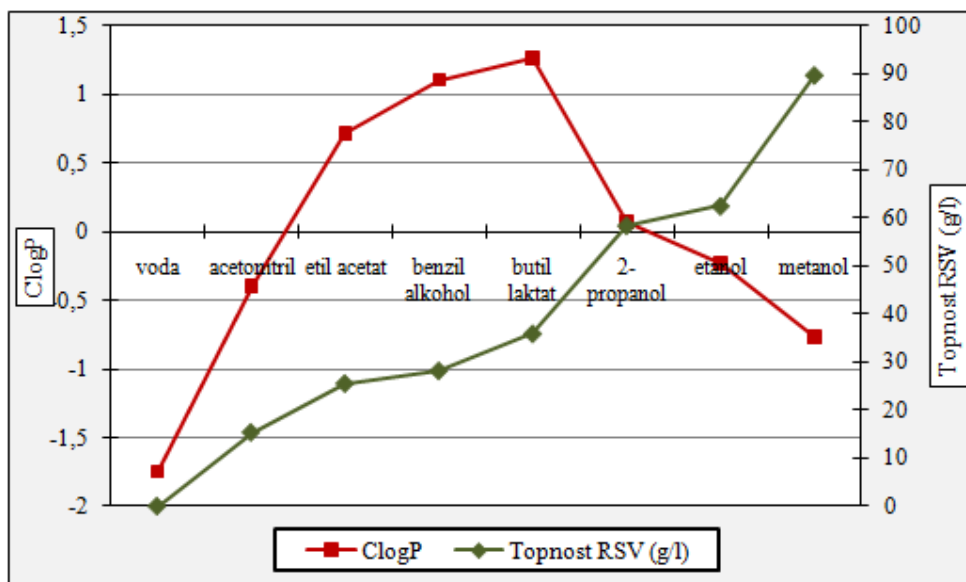
membran. Hidroksilne skupine RSV, odgovorne za njegovo antioksidativno delovanje, so tako izpostavljene na površini liposomov, kjer lahko neovirano reagirajo z radikali (37).



Slika 7: Topnost RSV v različnih topilih. Zaradi veliko nižje topnosti RSV v vodi (~ 30 mg/l), le-ta na grafu ni prikazana.

Preglednica I: Topnost RSV v različnih topilih pri 25 °C.

Topilo	Topnost pri 25 °C
Voda	32,7 ± 1,9 mg/l
Metanol	90,0 ± 1,3 g/l
Etanol	61,3 ± 2,3 g/l
2-propanol	57,0 ± 2,4 g/l
Butillaktat	35,5 ± 2,7 g/l
Benzilalkohol	28,2 ± 1,5 g/l
Etilacetat	25,6 ± 2,1 g/l
Acetonitril	14,9 ± 1,3 g/l



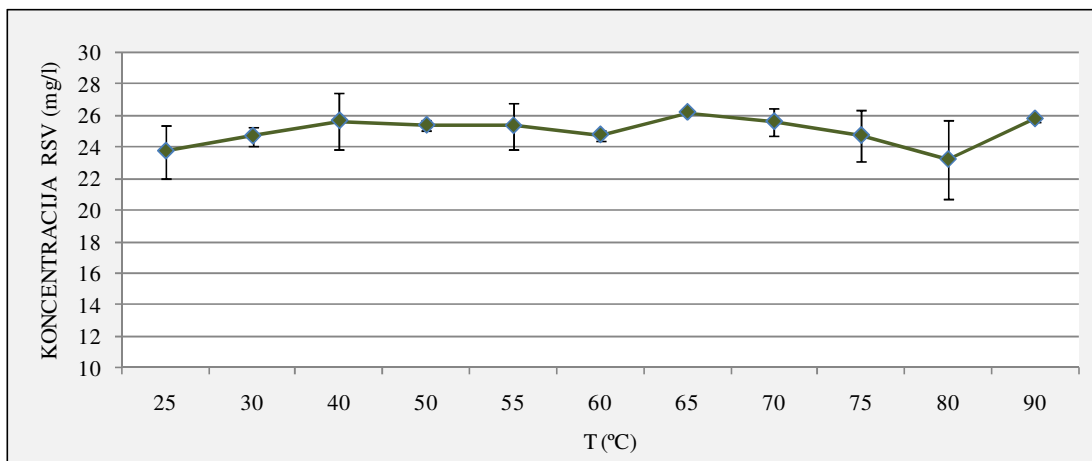
Slika 8: Povezava med lipofilnostjo topil, podano kot ClogP, in topnostjo RSV v njih.

#### 4.1.2. VPLIV TEMPERATURE NA STABILNOST RESVERATROLA

SLN največkrat izdelujejo s postopkom, pri katerem je prisotna visoka temperatura. Ker lahko le-ta pospeši kemijske spremembe ZU (38), moramo zato pred tovrstno izpostavitvijo ZU preveriti njeno termično stabilnost.

Za uspešno vgrajevanje RSV v SLN z vročo homogenizacijo moramo preveriti stabilnost RSV pri povišanih temperaturah. Naši rezultati kažejo, da se koncentracija RSV bistveno ne spreminja, če RSV krajši čas (do 10 minut) izpostavimo povišani temperaturi (Slika 9). Nekateri koncentracije RSV v vzorcih so bile višje od pričakovane vrednosti, tj. 20 mg/l, kar je najverjetneje posledica nenatančne priprave osnovne raztopine in nadaljnjega redčenja. Ohranitev stabilnosti RSV po krajši izpostavitvi temperaturam do 90°C nam torej omogoča izdelavo SLN-RSV z metodo vroče homogenizacije.

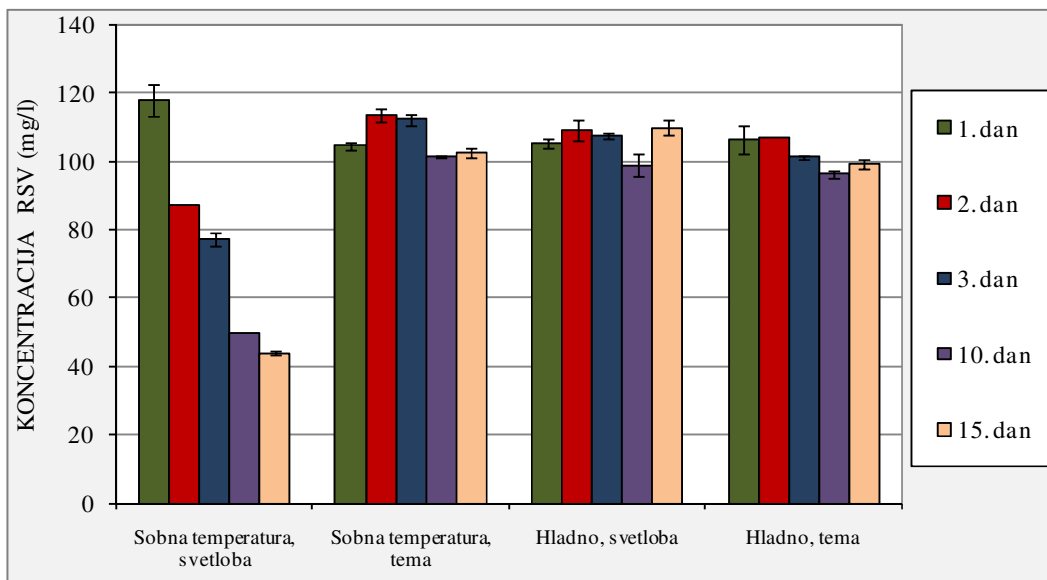




Slika 9: Vpliv temperature na stabilnost RSV.

#### 4.1.3. VPLIV SVETLOBE NA STABILNOST RESVERATROLA

Izpostavljanje ZU svetlobi lahko povzroči kemične spremembe v na svetlobo občutljivih molekulah (38). To je izrednega pomena pri načinu rokovanja z ZU in kasnejšim zdravljenjem, pomembno pa vpliva tudi na izbor farmacevtske oblike. Naši rezultati jasno kažejo, da je RSV fotolabilen, s čimer je njegova uporaba za dermalno dajanje omejena (39). Največji upad koncentracije RSV smo namreč opazili v primeru, ko smo raztopino RSV hranili pri sobni temperaturi in nezaščiten pred svetlobo (Slika 10). V primerih, ko smo raztopino shranjevali pri sobni temperaturi z zaščito pred svetlobo ali v hladilniku, nezaščiten pred svetlobo in v hladilniku z zaščito pred svetlobo, se rezultati med seboj niso bistveno razlikovali. Koncentracija RSV v raztopini, ki smo jo hranili v hladilniku brez zaščite pred svetlobo, se znotraj 15 dni ni pomembno spremenila, kar je najverjetneje povezano z dejstvom, da je bil RSV kljub temu, da ni bil posebej zaščiten pred svetlobo, v hladilniku večino časa v temi. Poleg tega pa tudi velja, da se pri nižjih temperaturah dogodki / reakcije počasneje odvijajo. Rezultati nas opozarjajo na takšno ravnanje z RSV, ki bo ohranjalo njegovo stabilnost. Pri delu moramo zato vedno paziti, da RSV kar se da malo izpostavljam svetlobi.

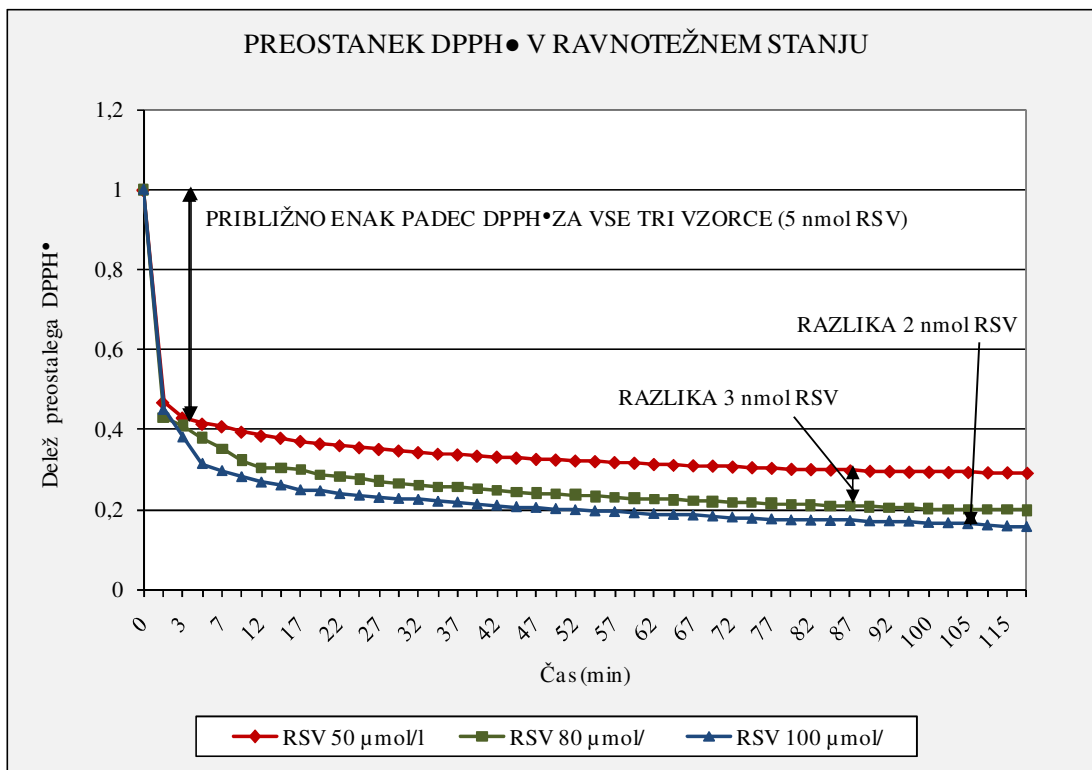


Slika 10: Stabilnost RSV med shranjevanjem na svetlobi ali v temnem prostoru, pri sobni temperaturi ali v hladilniku.

#### 4.1.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST RESVERATROLA

Poskuse smo izvedli ob presežku DPPH<sup>•</sup>, da bi popolnoma izčrpali zmožnost RSV za oddajanje vodikovih protonov. Za določitev kinetike reakcije RSV z DPPH<sup>•</sup> smo spremljali upadanje absorbance DPPH<sup>•</sup> skozi določen čas, vse dokler ni bilo doseženo ravnotežno stanje (Slika 11).

Združili smo 3,9 ml 100  $\mu$ M DPPH<sup>•</sup> in 0,1 ml RSV v koncentracijah 50  $\mu$ M, 80  $\mu$ M in 100  $\mu$ M. Če to preračunamo v množino dobimo: 390 nmol DPPH<sup>•</sup> in 5, 8 ali 10 nmol RSV. Razlika v množini DPPH<sup>•</sup> in molekul RSV je precej velika, a strmi padec krivulje v grafu (Slika 11) v prvih nekaj minutah nakazuje, da je RSV zelo učinkovit in hiter antioksidant. V strmem padcu se kaže sposobnost treh hidroksilnih skupin RSV, ki sodelujejo pri radikalski reakciji. Predvidevamo tudi, da se sproži nadaljevanje radikalske reakcije. Začetna hitra faza upadanja absorbance DPPH<sup>•</sup> je skoraj popolnoma enaka pri vseh treh vzorcih RSV (50, 80 in 100  $\mu$ M). Sklepamo, da v tem delu sodeluje ~ 5 nmol RSV.



Slika 11: Kinetika radikalske reakcije med DPPH• in raztopinami RSV v treh različnih koncentracijah.

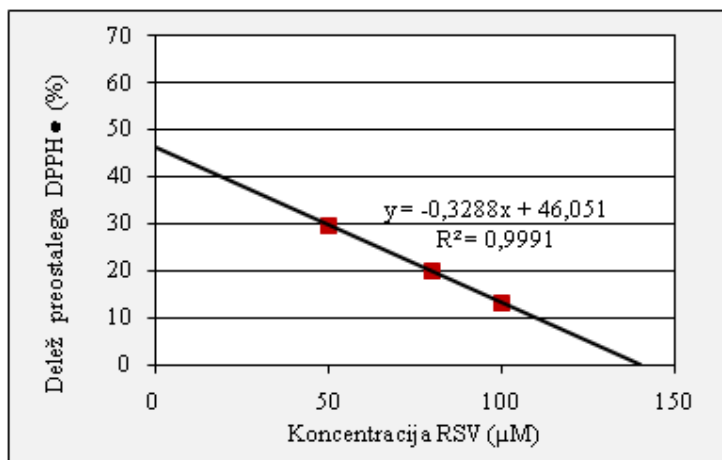
V nadaljevanju pa se krivulje ločijo. Najverjetneje je za nadaljnji padec ravnotežnega stanja DPPH• odgovorna še preostala množina RSV, in sicer v vzorcu z 80 µM še preostali 3 nmoli RSV (delež preostalega DPPH• =  $-0,063 \cdot \ln(\text{čas}) + 0,4326$ ,  $R^2 = 0,9893$ ) ter v vzorcu s 100 µM še preostalih 5 nmolov RSV (delež preostalega DPPH• =  $-0,0651 \cdot \ln(\text{čas}) + 0,4012$ ,  $R^2 = 0,9649$ ). Enačba krivulje za vzorec s 50 µM RSV po 2. minuti reakcije je: delež preostalega DPPH• =  $-0,047 \cdot \ln(\text{čas}) + 0,4686$ ,  $R^2 = 0,9984$ .

Tudi razlike med končnimi točkami korelirajo z razmerjem preostalega RSV. Prva razlika (med 50 µM in 80 µM) je nekoliko večja od druge razlike (med 80 µM in 100 µM). Hitrost reakcije (padec deleža DPPH• v prisotnosti RSV) po začetnem strmem padcu (po približno 2 minutah) je v povprečju =  $-0,0585 \cdot \ln(\text{čas})$ .

Antioksidante največkrat opredelimo z EC<sub>50</sub>, ki predstavlja koncentracijo proučevane učinkovine, potrebno za znižanje količine DPPH• na polovico. Temu sledi TEC<sub>50</sub>, to je

čas, ki je potreben, da dosežemo ravnotežno stanje pri koncentraciji  $EC_{50}$  in ga določimo s pomočjo grafičnega odčitavanja. Oba parametra matematično povežemo v AE ( $AE = 1/(EC_{50} \cdot TEC_{50})$ ), ki je v bioloških sistemih izredno pomembna, saj imajo ROS zelo kratko razpolovno dobo (40).

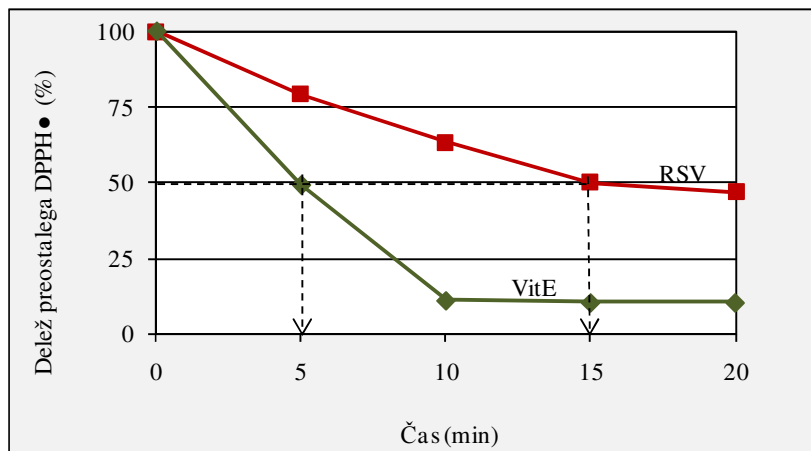
Žal pa iz naših izsledkov zgornjih parametrov nismo mogli določiti. Glede na dobljene rezultate (Slika 12) lahko sklepamo, da smo uporabili previsoke koncentracije RSV, saj je že začetek premice pod 50% preostale količine DPPH<sup>•</sup>. Kljub temu je graf izredno lep, saj je popolnoma linearen. Najverjetneje je vzrok za to v propagaciji radikalske reakcije, kjer produkti, ki nastanejo, sprožijo nadaljevanje radikalskih reakcij. To možnost nakazuje tudi velika razlika v množini spojin in zelo strmi začetni del grafa, prikazanega na sliki 11. Če bi npr. vse tri hidroksilne skupine vezale DPPH<sup>•</sup> in se reakcija ne bi nadaljevala, bi morale ostati npr. v primeru 100  $\mu\text{M}$  RSV:  $390 \text{ nmol} - 3 \cdot 10 \text{ nmol} = \sim 360 \text{ nmol}$  DPPH<sup>•</sup> (92,3%). Šele »repi«  
zgornjih krivulj najverjetneje ponazarjajo »enostavno«  
radikalsko reakcijo (1:1) in s tem antioksidativnost, kot si jo predstavljamo.



Slika 12: Grafično določanje vrednosti  $EC_{50}$  za RSV v reakciji z DPPH<sup>•</sup>.

Za primerjavo antioksidativnega delovanja med RSV in VitE smo združili 50 nmol RSV in 50 nmol DPPH<sup>•</sup> oziroma 50 nmol VitE in 50 nmol DPPH<sup>•</sup>. V primeru RSV vidimo, da je kinetika radikalske reakcije veliko počasnejša od prejšnjih, v katerih je bilo razmerje med množinami reaktantov izjemno visoko. Sklepamo, da v tem primeru ne pride do nadaljevanja radikalske reakcije in da kinetika odraža radikalsko reakcijo brez nadaljnjih reakcij, ki jo lahko sprožajo nastali produkti.

V primerjavi s kinetiko radikalne reakcije med DPPH<sup>•</sup> in RSV se v primeru uporabe VitE v reakciji hitreje, že po 10 minutah, vzpostavi ravnotežje (Slika 13).



Slika 13: : Kinetika radikalne reakcije med DPPH<sup>•</sup> in RSV oz. DPPH<sup>•</sup> in VitE.

Enaki koncentraciji RSV in VitE (50  $\mu\text{mol/l}$ ) sta znižali koncentracijo DPPH<sup>•</sup> na polovico v različnih časih. V primeru VitE se je to zgodilo v 5 minutah, z RSV pa v 15 minutah. Rezultat je presenetljiv, saj podatki v literaturi navajajo, da je RSV učinkovitejši v inhibiciji lipidne peroksidacije kot VitE. Vzrok za to naj bi bil v manjšem številu hidroksilnih skupin, ki jih v primerjavi z RSV vsebuje VitE. Pri RSV z ROS veliko učinkoviteje kot *meta*-hidroksilna reagira *para*-hidroksilna skupina (25). Medtem ko se VitE umesti v notranjost membrane, se RSV lahko pozicionira bližje površini celične membrane in je tako posrednik med izvenmembranskimi in znotrajmembranskimi radikali. Poleg tega pa so za RSV potrdili še številne posredne antioksidativne učinke, ki skupaj z neposrednimi težijo k znižanju kisikovih radikalov v celici.

## 4.2. VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

### 4.2.1. VELIKOST DELCEV, ZETA POTENCIAL IN POLIDISPERZNI INDEKS

Fizikalne lastnosti SLN, SLN z 12,5% m/m RSV (SLN-RSV 12,5%) in SLN s 37,5% m/m RSV (SLN-RSV 37,5%) se niso pomembno razlikovale. Tudi znotraj posamezne skupine nismo opazili pomembnejših razlik v velikosti delcev, vrednostih PI in ZP, in sicer pri

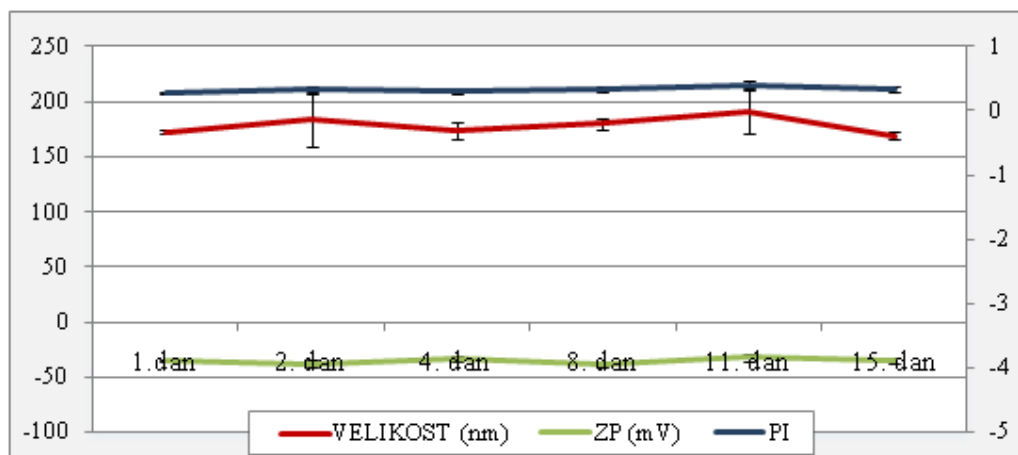
različnih pogojih shranjevanja (na svetlobi pri sobni temperaturi ali v hladilniku v temi), niti v primerih, ko smo jih očistili z dializo ali pa ne. Omenjene vrednosti so ostale nespremenjene skozi vseh 15 dni opazovanja (Slika 14-16).

Povprečni premer za SLN je znašal  $181 \pm 16$  nm, za SLN-RSV 12,5%  $183 \pm 10$  nm in za SLN-RSV 37,5%  $207 \pm 20$  nm. Za dobro načrtovane sisteme mora namreč veljati čim bolj ozka porazdelitev velikosti v submikronskem območju in odsotnost delcev, ki so večji od 1  $\mu$ m. V kolikor se število delcev, večjih od 1  $\mu$ m, tekom shranjevanja povečuje, je to običajno pokazatelj fizikalne nestabilnosti (19). Tudi sicer je poznavanje velikosti delcev pomembno, saj lahko odraža fizikalno in kemijsko nestabilnost ter opredeljuje farmakološke lastnosti ND.

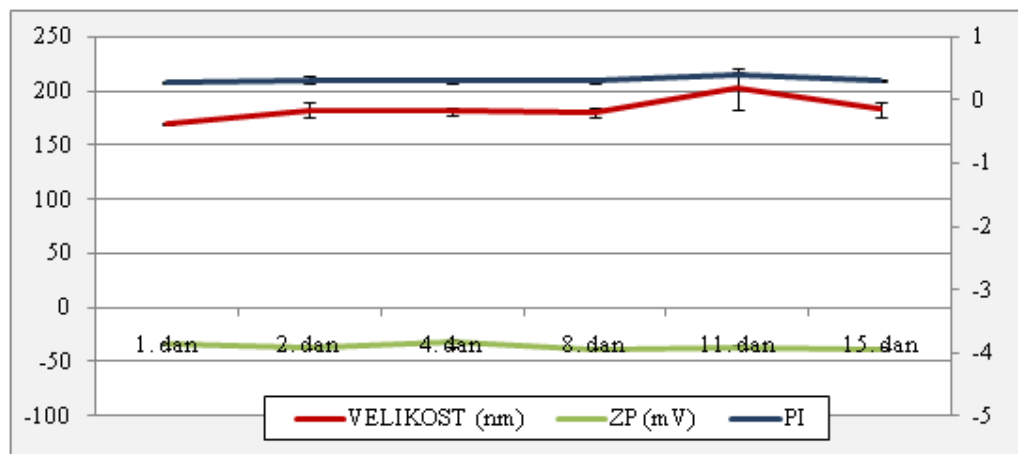
Vrednost PI je bila pri SLN in SLN-RSV 12,5% v omejenem časovnem obdobju  $\sim 0,3$ , kar kaže na ustrezno homogenost velikosti delcev. Povprečni PI v intervalu 15 dni je bil nekoliko večji le pri SLN-RSV 37,5%, in sicer 0,38, a je bila disperzija kljub temu še vedno stabilna.

Vrednost ZP je bila za vse vzorce  $\sim -35$  mV, kar je znak visoke fizikalne stabilnosti disperzij ND. ZP je pomemben in uporaben pokazatelj naboja površine delcev, ki ga lahko uporabljamo za napovedovanje in nadzor fizikalne stabilnosti koloidnih suspenzij in emulzij. Z njegovo določitvijo lahko tudi dobro predvidimo, kakšna bo stabilnost koloidnih disperzij med shranjevanjem. Večja kot je vrednost ZP, večja je verjetnost, da bo suspenzija stabilna, saj se nabiti delci odbijajo drug od drugega. Absolutne vrednosti ZP, ki so večje od 30 mV, kažejo na visoko stabilnost, medtem ko so tiste, ki so manjše od 5 mV, znak za nestabilnost sistema. Vendar pa to ne velja popolnoma za sisteme, ki so stabilizirani s steričnim stabilizatorjem, katerega adsorpcija zmanjša vrednost ZP (41).

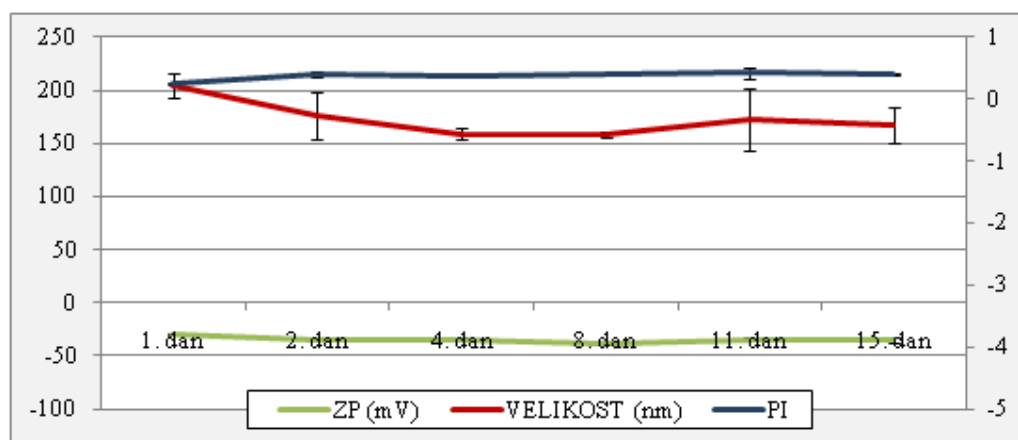
Zaključimo lahko torej, da med praznimi SLN in SLN-RSV ni bilo bistvene razlike in da so bile vse izmerjene vrednosti, ki opredeljujejo fizikalno stabilnost disperzij SLN, tekom celotnega obdobja opazovanja ustrezne, kar se je dejansko odražalo v dobri fizikalni stabilnosti disperzij ND.



Slika 14: Spreminjanje velikosti, ZP in PI za SLN z 0% RSV znotraj časovnega intervala 15 dni.



Slika 15: Spreminjanje velikosti, ZP in PI za SLN-RSV 12,5% znotraj časovnega intervala 15 dni.

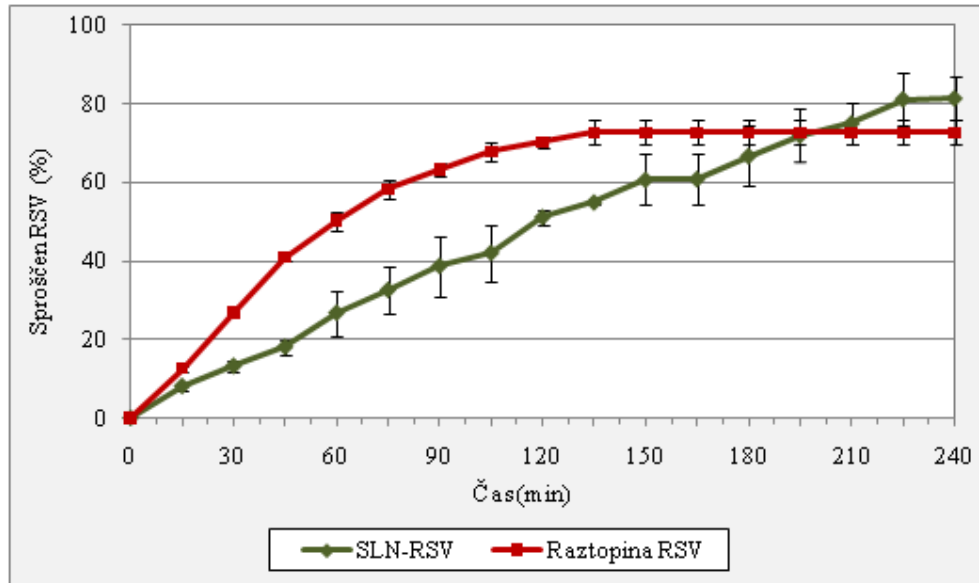


Slika 16: Spreminjanje velikosti, ZP in PI za SLN-RSV 37,5% znotraj časovnega intervala 15 dni.

#### 4.2.2. SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ RAZTOPINE IN IZ DISPERZIJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Učinkovitost vgrajevanja RSV smo določili iz profila njegovega sproščanja iz SLN–RSV (Slika 17). Prvih 15 minut je bilo sproščanje RSV iz njegove raztopine in iz SLN-RSV zelo podobno. Sklepamo lahko, da se približno 15% RSV ni vgradilo v SLN. Po 15. minuti pa se je sproščanje RSV iz SLN-RSV v primerjavi z raztopino RSV upočasnilo. Po grafu sodeč se je RSV iz SLN-RSV sproščal razmeroma hitro.

Glede na njegovo lipofilno naravo ( $\log P = 3,06$ ) bi lahko predvidevali, da se bodo molekule rajši kot na površino umestile v notranjost SLN. Glede na dobljene rezultate pa je verjetneje, da se navkljub njegovi lipofilni naravi, RSV pretežno zadržuje bližje površini SLN. Tako so njegove hidroksilne skupine tudi bližje vodnemu mediju. Rezultati sproščanja RSV iz SLN-RSV potrjujejo našo domnevo pri oceni topnosti RSV, kar smo opisali pod točko 4.1.1. Ne glede na lego RSV v SLN pa je razlika v hitrosti sproščanja RSV iz raztopine in iz SLN-RSV vseeno očitna. SLN namreč omogočijo postopno sproščanje RSV, kar je lahko zelo ugodno za njihovo terapevtsko uporabo.



Slika 17: Profil sproščanja RSV iz raztopine ali iz disperzije SLN-RSV.



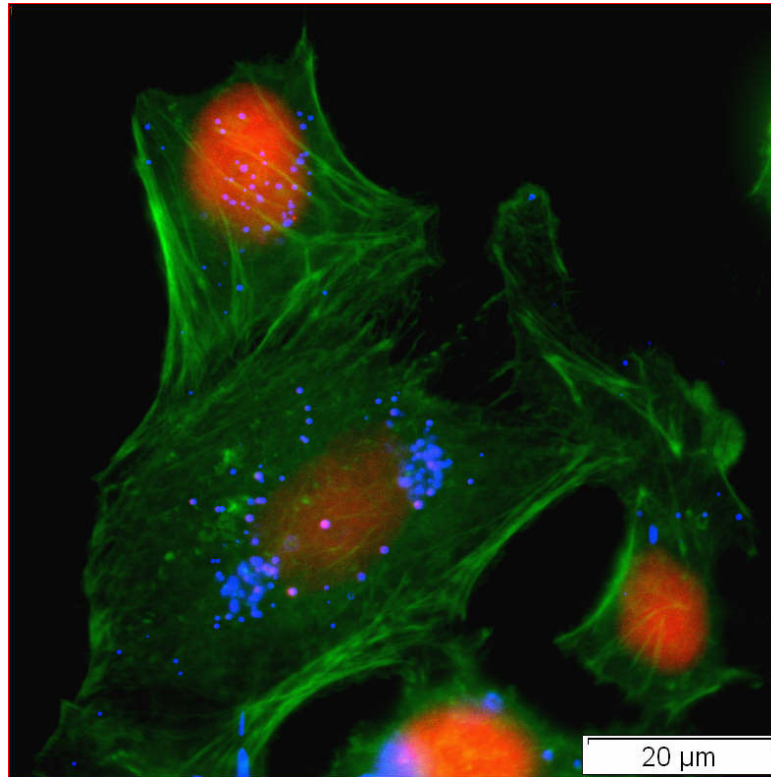
Tudi v literaturi zasledimo različne možnosti vgrajevanja ZU v SLN. Te so namreč lahko enakomerno porazdeljene v lipidnem ogrodju SLN, vgrajene v njihovo ovojnico ali pa adherirane na površino SLN (42). Naši rezultati kažejo, da je bila večina RSV najverjetneje vgrajena v ovojnico SLN, tisti del RSV, ki se je sprostil najkasneje, pa se je nahajal v lipidnem jedru SLN.

### ***4.3. VPLIV RAZTOPIN SAMEGA RESVERATROLA IN DISPERZIJ TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z RESVERATROLOM NA KERATINOCITE***

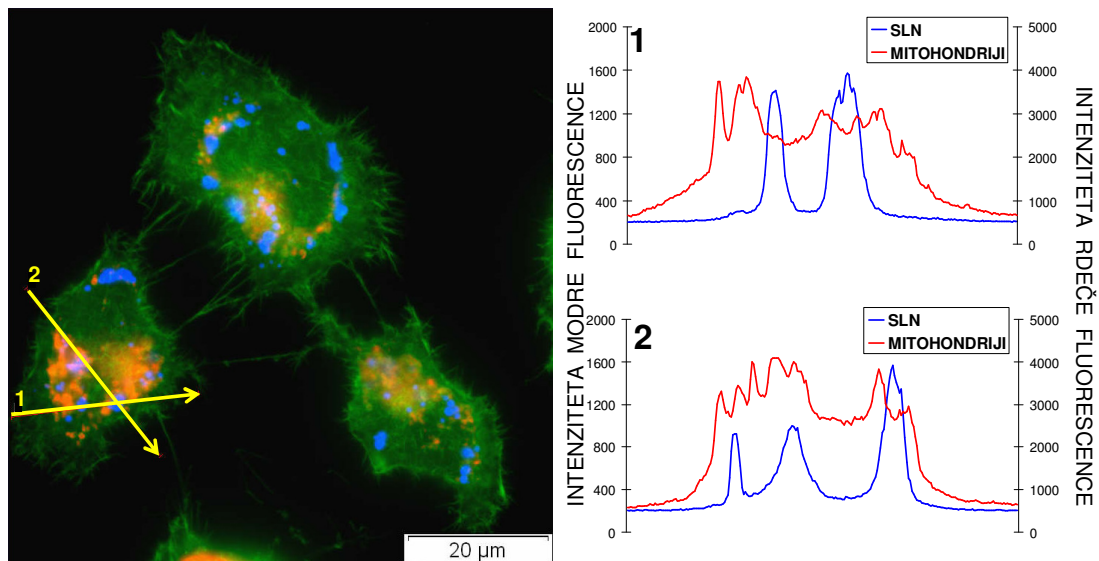
#### ***4.3.1. PREHAJANJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV SKOZI CELIČNE MEMBRANE KERATINOCITOV***

Nekateri avtorji so že opisali, da uporaba SLN, v katere je vgrajena ZU, bistveno izboljša njeno prehajanje v epidermis, kjer se nahajajo keratinociti (39, 43, 44). Mi smo z uporabo fluorescenčno označenih SLN ugotovili, da so le-ti sposobni prehajati celične membrane keratinocitov. Slike, ki smo jih posneli po 24-urni izpostavitvi celic fluorescenčno-označenim SLN, kažejo, da se SLN, ki so vidni kot modre pike, porazdeljujejo po celotni celični notranjosti, pri čemer se ponekod razporejajo zlasti ob jedru (obarvano rdeče) (Slika 18). SLN, ki jih zasledimo v okolici jedra, so locirani tik nad njim. Slike fluorescence tudi kažejo, da so SLN umeščeni med mitohondrijske strukture (Slika 19). To smo potrdili tudi z ugotavljanjem profilov intenzitete modre (SLN) in rdeče (mitohondriji) fluorescence, kar označujeta puščici na sliki 19. Hkratni porast intenzitete obeh fluorescenc ponazarja ko-lokalizacijo mitohondrijev in SLN. Zaradi visoke gostote radikalov v mitohondrijih in nastajanja ROS, ki lahko ključno vplivajo na karcinogenezo (14), je dostava RSV s SLN v njihovo bližino več kot ugodna. RSV lahko na tem mestu učinkovito deluje kot posredni ali neposredni antioksidant.

V sorodnih študijah, v katerih so kontinuirano spremljali prehajanje fluorescenčno označenih SLN v celice, so ugotovili, da ti zelo hitro preidejo membrane keratinocitov, saj so porast fluorescence znotraj celic zaznali že 15 minut po tem, ko so jim dodali SLN. Opazili so tudi, da celice privzamejo velik delež dodanih SLN, ki pa znotraj celic ne mirujejo na enem mestu, temveč se konstantno gibljejo po citosolu (42).



Slika 18: Lokalizacija SLN (modre pike) v keratinocitih z obarvanimi jedri (rdeče) in aktinom (zeleno).



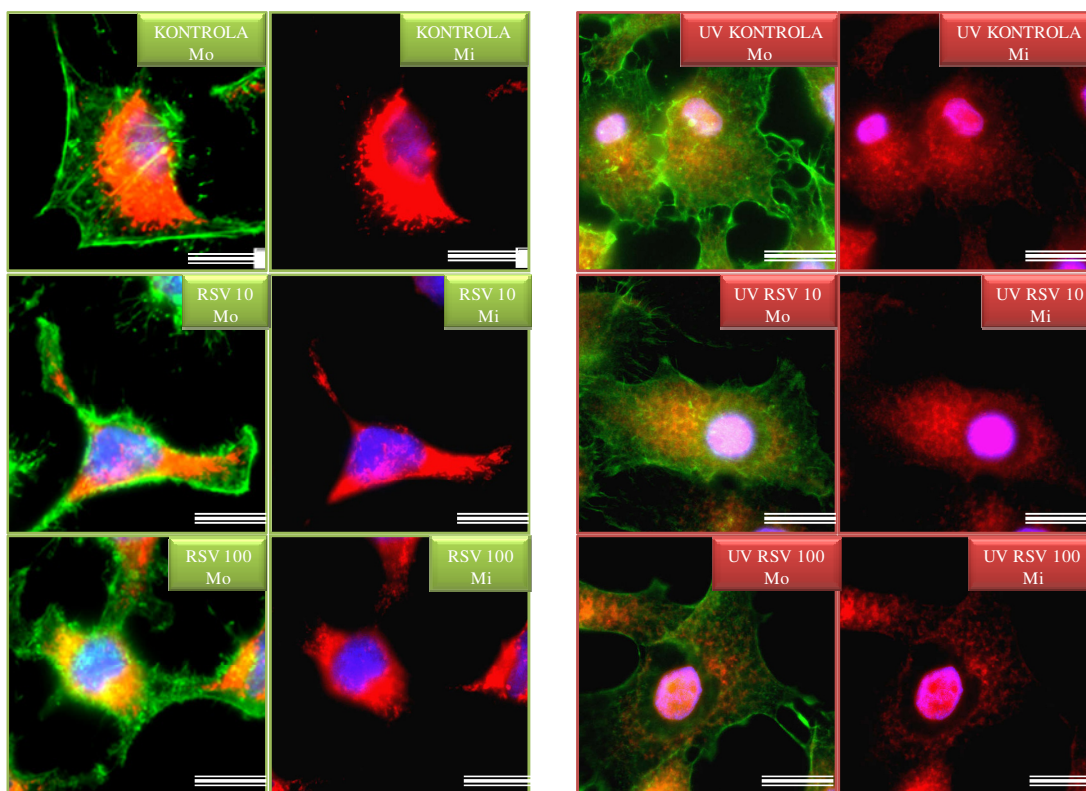
Slika 19: Lokalizacija SLN (modre pike) v keratinocitih z obarvanimi mitohondriji (rdeče) in aktinom (zeleno). Grafa na desni ponazarjata nihanje intenzitete določene fluorescence glede na puščici, prikazani na sliki levo. Hkratni porast fluorescence (začetek 2. grafa) potrjuje kolo-kalizacijo SLN in mitohondrijev.

#### 4.3.2. *VPLIV SAMEGA RESVERATROLA ALI TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z RESVERATROLOM NA CELIČNO MORFOLOGIJO IN MITOHONDRIJSKO AKTIVNOST*

Spremembe v celični morfologiji so prvi in najbolj očiten pokazatelj kakršnega koli celičnega stresa. Za zanesljivo primerjavo rezultatov med vzorci, smo mikroskop nastavili za vse vzorce enako, kar smo ponekod opazili kot ojačano fluorescenco.

Med z UV svetlobo neobsevanimi celicami (kontrola, RSV 10 in RSV 100) ni bilo izrazitih razlik, razen šibkega upada intenzitete rdeče fluorescences ter rahlega fragmentiranja aktina v primeru RSV 100, kar bi lahko bilo posledica koncentracijsko-odvisne citotoksičnosti RSV (Slika 20).

Domneva o spremembi celične morfologije, kot odziva na celični stres, se je potrdila, ko smo keratinocite za eno uro izpostavili sevanju UVB. Kontrolni keratinociti, ki smo jih obsevali z žarki UVB, so se spremenili, postali so nekoliko večji, imeli bolj izraženo jedro ter manjšo aktivnost mitohondrijev, ki so bili porazdeljeni po celotni citoplazmi. V literaturi smo zasledili podatek, da sevanje UVB na celice deluje kot stresni dejavnik, ki lahko v 1 uri za dvakrat zmanjša preživetje celic. Te poskuse so izvajali na celičnih linijah HEK 293 (45). Stopnja sprememb celične morfologije pa je po inkubaciji z raztopino RSV le še narasla, in sicer v odvisnosti od njegove koncentracije. Tako so bile najbolj spremenjene tiste obsevane celice, ki smo jih inkubirali s 100  $\mu$ M raztopino RSV (UV RSV 100).



Slika 20: Spremembe morfologije (Mo) in mitohondrijske aktivnosti keratinocitov (Mi), ki so bili izpostavljeni raztopinam z različnimi koncentracijami RSV. Za kontrolne celice smo uporabili samo medij. Celična jedra so obarvana modro, mitohondriji rdeče, aktinska vlakna pa zeleno. UV-celice, 1 uro obsevane z žarki UVB. Merilo predstavlja 10  $\mu$ m.

Rezultati sprememb celične morfologije po izpostavitvi keratinocitov SLN pa kažejo, da v primerjavi s kontrolo prazni SLN niso povzročili večjih razlik v celični morfologiji (Slika 21). Prazni SLN nimajo torej nobenega škodljivega učinka na keratinocite, saj so biokompatibilni in netoksični ter predstavljajo ustrezní nosilni sistem za aplikacijo na keratinocite.

Pri obsevanih vzorcih so se v obeh primerih, UV KONTROLA in UV SLN, celice podobno spremenile, kar je še en dokaz več, da je za poškodbo celic odgovorno sevanje UVB in ne SLN. Celice so postale nekoliko večje, imele zgoščeno jedro in manjšo aktivnost mitohondrijev, ki so bili enakomerno porazdeljeni po citoplazmi.

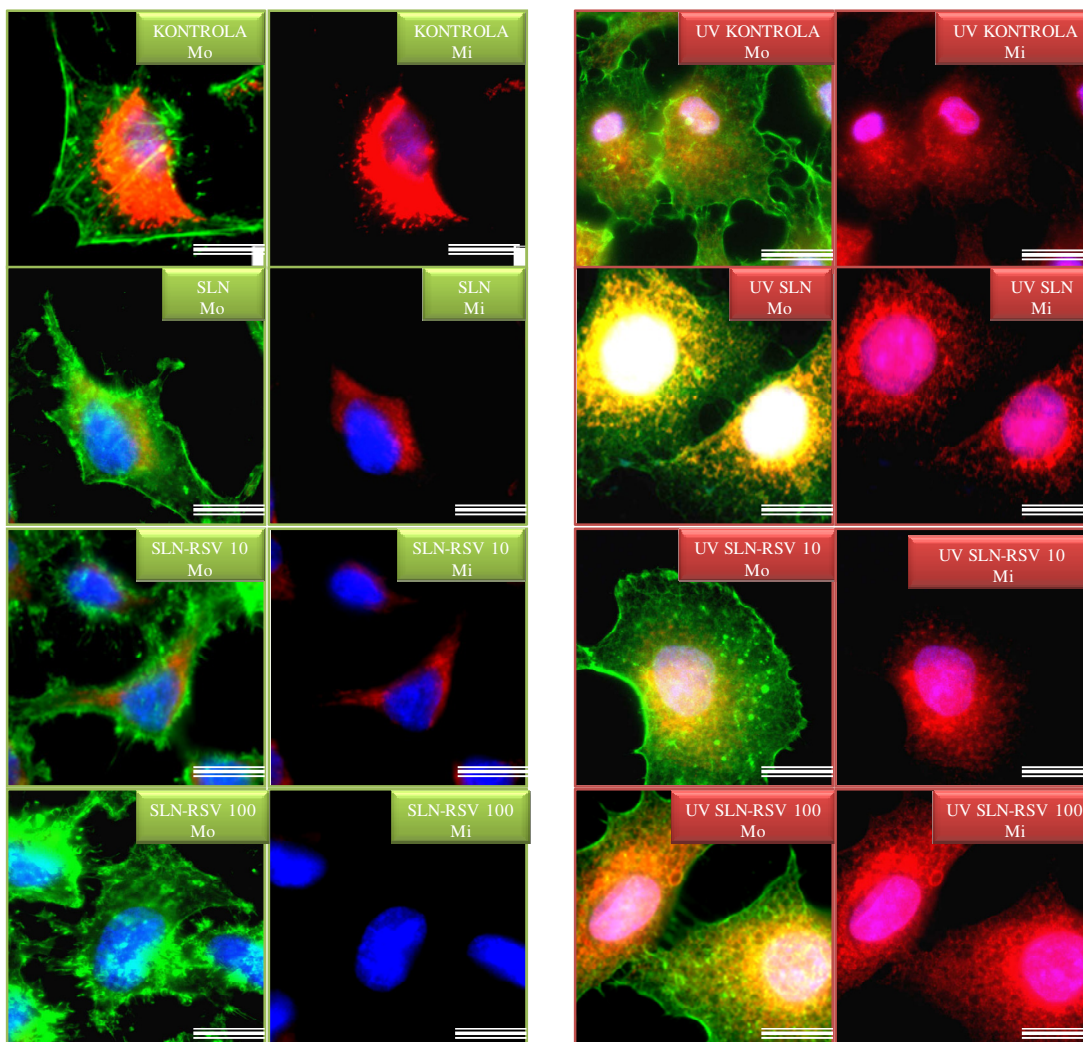
Pri celicah, inkubiranih s SLN-RSV, je prišlo do morfoloških sprememb, odvisnih od koncentracije vgrajenega RSV. V primeru SLN-RSV 10 smo pri neobsevanih celicah

opazili manj intenzivno rdeče sevanje, kar kaže na zmanjšano aktivnost mitohondrijev. Celice so bile v primerjavi s kontrolo tudi malo večje, njihova jedra pa nekoliko bolj izražena. Ti učinki na neobsevanih celicah so bili še bolj opazni v primeru uporabe SLN-RSV 100, saj rdeče barve skoraj nismo več zaznali, kar kaže na močno zmanjšano mitohondrijsko aktivnost.

Tudi v primeru obsevanih celic, ki smo jih inkubirali s SLN-RSV 10, so se v primerjavi z neobsevano kontrolo pojavile velike morfološke spremembe, ki so odražale poškodovanost celic: večje celice, bolj izraženo jedro, manjša aktivnost mitohondrijev. Pri tistih obsevanih celicah, ki smo jih izpostavili SLN-RSV 100, pa se je intenziteta oddajanja rdeče svetlobe v primerjavi z neobsevanim vzorcem in tudi z obsevano kontrolo, povečala. Mitohondrijska funkcija se je torej v teh celicah ojačala. V primerjavi z obsevano kontrolo so bile celice s SLN-RSV 100 še zelo dobro ohranjene. Takšen rezultat je posledica znorajcelične dostave RSV v bližino mitohondrijev, njegovega postopnega sproščanja iz SLN in njegovega protistresnega delovanja.

Prednosti uporabe SLN-RSV v primerjavi z raztopinami RSV so očitne, če med seboj primerjamo morfologijo na oba načina tretiranih keratinocitov. Pri obeh uporabljenih koncentracijah SLN-RSV (10 in 100  $\mu\text{M}$ ) so bile celice boljše ohranjene kot tiste, ki smo jih inkubirali z 10 oziroma 100  $\mu\text{M}$  raztopino RSV. To še posebej velja za obsevane keratinocite. Najočitnejšo razliko smo opazili pri celicah, ki smo jih izpostavili 100  $\mu\text{M}$  raztopini RSV oziroma SLN-RSV 100.

V literaturi zasledimo podobne študije, v katerih so preverjali prednosti vgrajevanja RSV v nosilne sisteme. Tako so RSV vgrajevali v liposome, ki so jih preizkušali na celični liniji HEK293. Liposomi so se izkazali kot ustrezen nosilni sistem. Ker omogočajo shranjevanje RSV fosfolipidnem dvosloju, je s tem zagotovljeno njegovo počasnejše sproščanje in zato manjše prehajanje ter kopičenje v celični membrani. Zato RSV ne deluje citotoksično, kar je sicer običajen pojav, v kolikor se nahaja v visokih koncentracijah v celični membrani (37). Tudi na osnovi naših rezultatov lahko predpostavimo, da pride do počasnejšega sproščanja RSV iz SLN-RSV, njegovega manjšega prehajanja in kopičenja v celičnih membranah, kar je za celice seveda ugodneje.



Slika 21: Spremembe morfologije (Mo) in mitohondrijske aktivnosti keratinocitov (Mi), ki so bili izpostavljeni disperzijam praznih SLN in SLN-RSV z vsebnostjo, ki ustreza 10  $\mu\text{M}$  oziroma 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji RSV. Kontrolnim celicam smo dodali samo medij. Celična jedra so obarvana modro, mitohondriji rdeče, aktinska vlakna pa zeleno. UV-celice, 1 uro obsevane z žarki UVB. Merilo predstavlja 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.3. KVANTITATIVNO DOLOČANJE MITOHONDRIJSKE FUNKCIJE

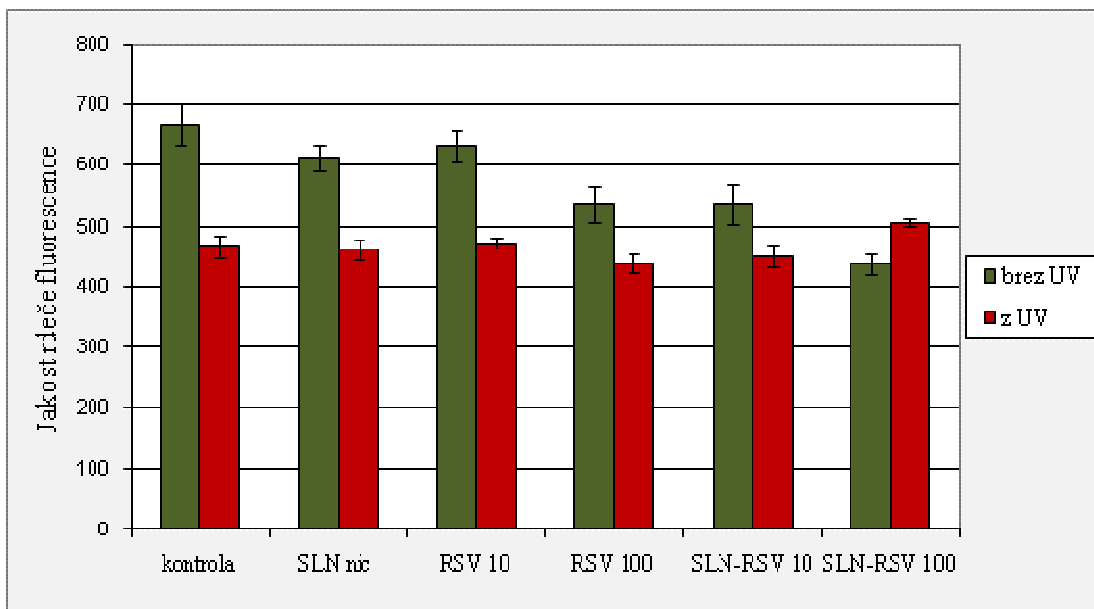
Na miših so že dokazali, da RSV vzpodbuja mitohondrijsko aktivnost in poveča aerobno zmogljivost živali tako, da inducira gene za oksidativno fosforilacijo in mitohondrijsko biogenezo. Omejena mitohondrijska aktivnost namreč vodi do številnih bolezeni, saj so mitohondriji ključni vir energije za celice (12). Z ojačanjem mitohondrijske funkcije bi

morda lahko celice bolje pripravili na različne stresne obremenitve. Ta učinek lahko razberemo iz kvalitativne ocene fluorescenčne intenzitete (Slika 20, 21), ki smo jo dodatno podprli s kvantitativnimi rezultati mitohondrijske aktivnosti (Slika 22).

Če primerjamo neobsevane kontrolne celice, ki smo jim dodali le medij, s tistimi, ki smo jih inkubirali s praznimi SLN, opazimo pri slednjih rahlo znižanje aktivnosti mitohondrijev. Veliko raziskovalcev se namreč strinja, da imajo ND zaradi svoje nanovelikosti drugačne lastnosti kot večji delci istega kemizma. Pri tem so seveda pomembni zlasti neželeni učinki ND na celice. Prevladuje mnenje, da imata oksidativni stres in lipidna peroksidacija pomembni vlogi pri nastanku poškodb DNK in razgradnji celične membrane, kar vodi v celično smrt. ND lahko povzročajo nastanek prooksidantov, zato se v celici poruši ravnovesje med tvorbo ROS in med popravljivimi mehanizmi biološkega sistema. Tako nastali oksidativni stres v celici povzroči poškodbe proteinov, DNK, celičnih membran, indukcijo encimov, vnetje in poškodbe mitohondrijev. Posledice poškodb mitohondrijev so spremembe v prepustnosti celične membrane, citotoksičnost, apoptoza in nekroza celic (35). Kljub temu pa v našem primeru po inkubaciji celic s praznimi SLN nismo opazili večjih sprememb aktivnosti mitohondrijev, zato sklepamo, da SLN niso povzročili večjih poškodb na keratinocitih. To smo potrdili tudi z ugotavljanjem mitohondrijske aktivnosti po obsevanju, ki je bila občutno manjša, a enaka v kontrolah in v primerih, ko smo uporabili prazne SLN.

S primerjavo rezultatov neobsevanih celic, izpostavljenih 10  $\mu\text{mol/l}$  RSV (RSV 10), s tistimi, dobljenimi pri neobsevanih kontrolnih keratinocitih, ugotovimo, da je prišlo do rahlega znižanja intenzitete rdeče fluorescence. Zato sklepamo, da se prosti RSV umesti predvsem v celično membrano, kjer ima za celice škodljive učinke. Ker je delovanje RSV v smislu antioksidanta ali prooksidanta odvisno tudi od subcelularnega prostora (14), je možno, da je RSV v našem primeru deloval prooksidativno. Ker pa je koncentracija 10  $\mu\text{M}$  razmeroma nizka, njegov učinek ni zelo izrazit. Je pa citotoksični učinek prostega RSV postal opaznejši v primeru neobsevanih celic, ki smo jim dodali 100  $\mu\text{M}$  RSV (RSV 100). V tem primeru smo namreč zaznali večje znižanje sevanja rdeče fluorescence v primerjavi s kontrolo. Predvidevamo, da RSV pri tako visoki koncentraciji bolj uniči celice, saj ga je več v celični membrani, kar ojača njegovo prooksidativno delovanje. Pri obsevanih vzorcih pa se zaradi kumulativnega delovanja sevanja UVB in visoke koncentracije prostega RSV poškodbe seštejejo.

Pri neobsevanih keratinocitih, ki smo jih predhodno inkubirali s SLN-RSV, v primerjavi s kontrolo opazimo zmanjšanje jakosti sevanja rdeče fluorescence. Rezultat je seštevek učinkov praznih SLN in raztopine RSV (10  $\mu\text{M}$  ali 100  $\mu\text{M}$ ). V primeru SLN-RSV 10 je bil padec mitohondrijske aktivnosti obsevanih celic v primerjavi z neobsevanimi najmanjši, kar jasno kaže na prednosti znotrajcelične dostave RSV s SLN. To smo le še potrdili pri keratinocitih, inkubiranih s SLN-RSV 100. Tako je RSV znotraj celic v koncentracijah, pri katerih deluje kot antioksidant in zato ne vzpodbuja dodatnih radikalnih reakcij, kot smo to ugotovili v primeru RSV 100. Ojačanje mitohondrijske aktivnosti smo torej dosegli le s SLN-RSV 100 in to izključno v primeru predhodnega obsevanja keratinocitov z žarki UVB.



Slika 22: Mitohondrijska aktivnost, določena na osnovi intenzitete rdeče fluorescence, kontrole, SLN brez RSV, 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  raztopine RSV, SLN z 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  RSV.

Če povzamemo, naši rezultati potrjujejo, da UV sevanje poškoduje celice in zmanjša njihovo mitohondrijsko aktivnost. Po eni uri obsevanja z žarki UVB so se jakosti sevanja rdeče svetlobe, ki odražajo mitohondrijsko aktivnost, zmanjšale v vseh vzorcih, z izjemo pri tistih keratinocitih, ki smo jih predhodno inkubirali s SLN-RSV 100.



Do podobnih rezultatov so prišli tudi v sorodni študiji, ko so s pomočjo testa MTS ovrednotili vpliv RSV na metabolno aktivnost keratinocitov. Ugotovili so, da niti prazni SLN niti 100  $\mu\text{M}$  samega RSV ne zvišajo metabolne aktivnosti celic. To so dosegli samo z uporabo SLN-RSV 100  $\mu\text{M}$  (42). V literaturi lahko zasledimo tudi druge poskuse na temo ciljane dostave RSV, in sicer s pomočjo njegove derivatizacije. Da bi RSV dostavili do mitohondrijev, kjer je antioksidativno delovanje RSV najverjetneje najbolj izkoriščeno, so sintetizirali njegove nove derivate, in sicer tako, da so molekuli RSV pripeli lipofilni trifenilfosfonijev kation (TPP+), ki lahko prehaja celične membrane in omogoča kopičenje omenjene učinkovine v celičnih prostorih z negativno relativno napetostjo, med katere sodi tudi mitohondrijski matriks. Taki derivati RSV so dejansko ciljano prehajali v mitohondrije in delovali citotoksično na hitro se deleče celice. Na počasneje rastoče celice pa niso imeli takšnega učinka, kar je posledica dejstva, da mitohondriji rakavih celic vzdržujejo večji transmembranski potencial kot tisti v normalnih celicah (46).

## 5. SKLEP

Že sam RSV ima pozitivni farmakološki učinek, ker pa ima kar nekaj slabih intrinzičnih lastnosti, smo ga vgradili v nanodostavni sistem – SLN. SLN niso vplivali na celično morfologijo, kar kaže na njihovo biokompatibilnost in necitotoksičnost. Zato ugotavljamo, da so SLN ustrezni nosilni sistem za vnos RSV v keratinocite.

Neposredne antioksidativne lastnosti RSV smo dokazali z uporabo umetnega radikala DPPH<sup>•</sup>, katerega količina se je ob prisotnosti RSV hitro zmanjševala. To je bila najverjetneje tudi posledica nadaljevalnih radikalskih reakcij, ki jih sprožajo nastali produkti. Pri preizkušanju topnosti RSV v različnih topilih smo ugotovili, da je zmožnost tvorbe vodikovih vezi med RSV in molekulami topil ključni dejavnik, ki določa njegovo topnost in da bolj ko je topilo lipofilno, boljše se RSV topi v njem. Zato je RSV v vodi izredno slabo topen, medtem ko v različnih alkoholih njegova topnost pada s številom ogljikovih atomov v molekulah alkoholov. Nadalje smo dokazali, da je RSV fotolabilen, medtem ko visoke temperature niso problematične za njegovo stabilnost. Ob upoštevanju teh značilnosti smo nato izdelali SLN z RSV (SLN-RSV), in sicer z metodo vroče homogenizacije.

Pri vrednotenju izdelanih SLN smo ugotovili, da so si fizikalne lastnosti, torej velikost delcev, PI in ZP, med preiskovanimi vzorci: SLN, SLN-RSV 12,5% in SLN-RSV 37,5%, zelo podobne in kažejo na fizikalno stabilne disperzije SLN. To smo potrdili tudi s 15-dnevnim spremljanjem fizikalnih lastnosti posameznih SLN, ki smo jih shranjevali pod različnimi pogoji.

Rezultati sproščanja RSV iz SLN kažejo, da je bila večina učinkovine najverjetneje prisotna bližje površini SLN, saj je bilo njegovo sproščanje razmeroma hitro, še vedno pa občutno počasnejše kot iz raztopine samega RSV.

V poskusih na keratinocitih smo z uporabo fluorescenčno označenih SLN ugotovili, da ti prehajajo celične membrane keratinocitov in da se znotraj celic razporejajo zlasti ob jedru in med mitohondriji. To smo potrdili tudi s profili intenzitete fluorescence SLN in mitohondrijev. Nadalje se je izkazalo, da obsevanje celic z žarki UVB sproži izrazite morfološke spremembe, ki so posledica poškodovanosti keratinocitov, npr. povečanje celic, bolj izraženo jedro, manj medceličnih povezav, manjša aktivnost mitohondrijev in

njihova porazdelitev po celotni citoplazmi. Med spremljanjem vpliva RSV, bodisi prostega ali vgrajenega v SLN, na morfologijo in mitohondrijsko aktivnost neobsevanih ali obsevanih celic smo ugotovili, da je le 100  $\mu\text{M}$  RSV, vgrajenega v SLN (SLN-RSV 100), ohranilo normalno celično obliko in hkrati še ojačalo mitohondrijsko aktivnost, kar smo potrdili tudi na kvantitativnem nivoju.

Pozitivni učinki, ki smo jih ugotovili, so posledica prednosti, ki jih prinaša vgrajevanje RSV v SLN. SLN so sposobni RSV prenesti v notranjost celice, in sicer v bližino celičnega jedra in mitohondrijev, kjer lahko nato RSV najbolj izrazi svojo »protistresno« delovanje. Ugodno je tudi to, da se RSV iz SLN sprošča postopoma, s čimer je preprečen prehit in previsok dvig lokalne koncentracije RSV, s tem pa tudi njegova citotoksičnost. Zaključimo lahko, da SLN povečajo biološko razpoložljivost RSV in hkrati zagotavljajo boljšo zaščito keratinocitov pred žarki UVB, za kar je odgovorno ojačanje mitohondrijske aktivnosti.

## 6. LITERATURA

1. Stratton SP, Dorr RT, Alberts DS. The state-of-the-art in chemoprevention of skin cancer. *European Journal of Cancer* 2000; 36: 1292-1297.
2. Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Resveratrol: A Review of Pre-clinical Studies for Human Cancer Prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007; 224: 274–283.
3. Dong Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutation Research* 2003; 523–524: 145–150.
4. Müller-Goymann CC. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004; 58: 343-356.
5. Camont L, Cottart CH, Rhayem Y, Nivet-Antoine V, Djelidi R, Collin F, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta* 2009; 634: 121-128.
6. Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 2007; 71: 230–235.
7. [http://www.medallionlabs.com/Downloads/Antiox\\_acti\\_.pdf](http://www.medallionlabs.com/Downloads/Antiox_acti_.pdf)
8. Filip V, Plocková M, Šmidrkal J, Špičková Z, Melzoch K, Schmidt Š. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry* 2003; 83: 585-593.
9. Sun X, Peng B, Yan W. Measurement and correlation of solubility of trans-resveratrol in 11 solvents at T = (278.2, 288.2, 298.2, 308.2, and 318.2) K. *The Journal of Chemical Thermodynamics* 2008; 40: 735–738.
10. Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D, Lançon A, Latruffe N. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochemical Pharmacology* 2004; 68: 1113–1118.
11. Calabrese G. Nonalcoholic compounds of wine: the phytoestrogen resveratrol and moderate red wine consumption during menopause. *Drugs under experimental and clinical research* 1999; 25: 111-114.

12. Kalra N, Roy P, Prasad S, Shukla Y. Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis. *Life Sciences* 2008; 82: 348–358.
13. Chandel NS, Simon MC. Hypoxia-inducible factor: roles in development, physiology, and disease. *Cell Death and Differentiation* 2008; 15: 619-20.
14. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochemical Journal* 2007; 401: 1–11.
15. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Miln J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* 2006; 127: 1109–1122.
16. Liu Y et al. Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. *European Journal of Pharmacology* 2010; doi:10.1016/j.ejphar.2010.10.009.
17. Stojanović S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 391:79-89.
18. Myers D. Surfaces, Interfaces and Colloids. Principles and Applications. Second Edition. John Wiley & Sons; 216-219.
19. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003; 23: 4283-4300.
20. Kristl J, Kokol D, Šmid-Korbar J. Trdni lipidni nanodelci: Izdelava, vrednotenje in možnosti za dostavo učinkovin. *Farmaceutski vestnik* 1997; 48:123-131.
21. Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 366: 170–184.
22. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 47: 165-196.
23. Souto EB, Müller RH. Lipid Nanoparticles: Effect on Bioavailability and Pharmacokinetic Changes. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2010; 197: 115-41.

24. Schäfer-Korting M, Mehnert W, Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 427–443.
25. Bummer PM. Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery-solid lipid nanoparticles. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2004; 21: 1-20.
26. Švelc T. Vpliv sestave nanodelcev na preživetje in funkcijo celic. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2006.
27. Kobe V, Dekleva A, Lenart IF. Anatomija 4. del. Drobje in koža. Medicinska fakulteta, Ljubljana, 1986.
28. Inohara S, Tatsumi Y, Cho H, Tanaka Y, Sagami S. Actin filament and desmosome formation in cultured human keratinocytes. *Archives of Dermatological Research* 1990; 282: 210-12.
29. Kuchler S, Radowski MR, Blaschke T, Dathe M, Plendl J, Haag R, Schäfer-Korting M, Kramer KD. Nanoparticles for skin penetration enhancement – A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; 71: 243–250.
30. Einspahr JG, Stratton SP, Bowden GT, Alberts DS. Chemoprevention of human skin cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2002; 41: 269–285.
31. Ribarič S. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9.izdaja, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2001; 101, 102, 105-113.
32. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Fourth Edition, American Pharmaceutical Association; 260,447-449.
33. Zabukovnik N. Izdelava in vrednotenje trdnih lipidnih nanodelcev s hidrofobno učinkovino. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2006.
34. Caruso F, Tanski J, Villegas-Estrada A, Rossi M. Structural Basis for Antioxidant Activity of trans-Resveratrol: Ab Initio Calculations and Crystal and Molecular Structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52: 7279-7285.
35. Caglič N. Optimiranje izdelave disperzije nanodelcev ZnO in ugotavljanje varnosti na celični liniji keratinocitov. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.

36. Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Ravi Kumar MNV. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; 40: 206–210.
37. Kristl J, Teskač K, Caddeo C, Abramović Z, Šentjurc M. Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; 73: 253–259.
38. Waterman KC, Adami RC. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 293: 101–125.
39. Shah KA, Date AA, Joshi MD, Patravale VB. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: potential in topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 345: 163-71.
40. Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition* 1998; 80: 77-112.
41. Schwarz C, Mehnert W, Lucks JS, Müller RH. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *Journal of Controlled Release* 1994; 30: 83-96.
42. Teskač K, Kristl J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 390: 61-69.
43. Santos Maia C, Mehnert W, Schaller M, Korting HC, Gysler A, Haberland A, Schäfer-Korting M. Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use. *Journal of Drug Targeting* 2002 ; 10: 489-95.
44. Chen H, Chang X, Du D, Liu W, Liu J, Weng T, Yang Y, Xu H, Yang X. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *Journal of Controlled Release* 2006; 110: 296-306.
45. Caddeo C, Teskač K, Sinico C, Kristl J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 363: 183-191.
46. Biasutto L, Mattarei A, Marotta E, Bradaschia A, Sassi N, Garbisa S, Zoratti M, Paradisi C. Development of mitochondria-targeted derivatives of resveratrol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008; 18: 5594–5597.