

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRENA ROŠKAR

**NOVI STABILIZATORJI ZA IZDELAVO TRDNIH LIPIDNIH
NANODELCEV IN NJIHOV VPLIV NA CELICE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRENA ROŠKAR

**NOVI STABILIZATORJI ZA IZDELAVO TRDNIH LIPIDNIH
NANODELCEV IN NJIHOV VPLIV NA CELICE**

**NEW STABILIZERS FOR FORMULATION OF SOLID LIPID
NANOPARTICLES AND THEIR EFFECT ON THE CELLS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl ob sodelovanju dr. Karmen Teskač Planjšek.

Za strokovno pomoč in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorici prof. dr. Julijani Kristl. Iskrena hvala dr. Karmen Teskač Planjšek za potrpežljivost, spodbudo in nesebično pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela diplomske naloge.

Za potrpežljivost, vzpodbudo ter vso strokovno podporo se iskreno zahvaljujem možu Luku. Hvala tudi družini za podporo pri doseganju tega cilja.

Izjava

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

Irena Roškar

Ljubljana, 2011

Predsednik diplomske komisije:

prof. dr. Borut Štrukelj

Člani diplomske komisije:

prof. dr. Julijana Kristl

doc.dr. Marko Anderluh

KAZALO

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1. UVOD	1
1.1 NADZOROVANO DOSTAVLJANJE UČINKOVIN IN KOLOIDNI NOSILCI	1
1.2 TRDNI LIPIDNI NANODELCEV	2
1.2.1 SESTAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	3
1.2.1.1 LIPIDI	3
1.2.1.2 STABILIZATORJI	5
1.2.2 METODE ZA IZDELAVO TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	7
1.2.2.1 DISPERGIRANJE TALINE LIPIDA	7
VISOKOSTRIŽNA HOMOGENIZACIJA IN ULTRAZVOK	7
VISOKOTLAČNA HOMOGENIZACIJA	8
1.2.2.2 HLADNO DISPERGIRANJE	9
1.2.2.3 METODA Z RAZREDČEVANJEM VROČE MIKROEMULZIJE	9
1.2.2.4 IZPAREVANJE TOPILA Z OBARJANJEM V EMULZIJAH TIPA O/V	9
1.3 VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	10
1.3.1 VELIKOST DELCEV IN POLIDISPERZNI INDEKS	10
1.3.2 ZETA POTENCIAL	11
1.3.3 KRISTALNO STANJE	13
1.4 STABILNOST TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	14
1.5 LIOFILIZACIJA	15
1.6 DERMALNA UPORABA NANODELCEV	16
1.6.1 ZGRADBA KOŽE	16
1.6.2 UPORABA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV ZA DERMALNO APLIKACIJO	16
1.7 CITOTOKSIČNOST	17
1.7.1 CELIČNE KULTURE	18
1.7.1.1 GOJENJE CELIČNIH KULTUR	19
2. NAMEN DELA	20
3. EKSPERIMENTALNI DEL	21
3.1 IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	21
3.1.1 MATERIALI	21
LIPIDNE KOMPONENTE	21
POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI	21
OSTALI REAGENTI	23
3.1.2 APARATURE	25
3.1.3 METODE	25
3.1.3.1 DOLOČANJE KRITIČNE MICELNE KONCENTRACIJE NOVIH POVRŠINSKO AKTIVNIH SNOVI	25
3.1.3.2 IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z METODO EMULGIRANJA TALINE LIPIDOV V VODNO FAZO STABILIZATORJA	27
3.1.3.3 LIOFILIZACIJA DISPERZIJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	28
3.1.3.4 REDISPERGIRANJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	28
3.1.4 VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	29
3.1.4.1 MERJENJE VELIKOSTI, POLIDISPERZNEGA INDEKSA IN ZETA POTENCIALA IZDELANIH TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	29
3.1.4.2 SPREMLJANJE FIZIKALNE STABILNOSTI DISPERZIJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	30
3.1.4.3 TERMIČNA ANALIZA VHODNIH SUROVIN IN IZDELANIH TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	30
3.2 VPLIV TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV NA CELICE	31
3.2.1 MATERIALI	31
3.2.2 APARATURE	31
3.2.3 METODE	32
3.2.3.1 GOJENJE IN PRIPRAVA KERATINOCITOV	32
3.2.3.2 DOLOČANJE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC	33
3.2.3.3 RAST IN MORFOLOGIJA TRETIRANIH CELIC	35
3.3 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	35

4. REZULTATI IN DISKUSIJA.....	37
4.1 FIZIKALNE LASTNOSTI IZDELANIH TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	37
4.1.1 KRITIČNA MICELNA KONCENTRACIJA NOVIH POVRŠINSKO AKTIVNIH SNOVI	38
4.1.2 POVPREČNA VELIKOST TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	41
4.1.3 POLIDISPERZNI INDEKS.....	42
4.1.4 ZETA POTENCIAL.....	43
4.2 VPLIV LIOFILIZACIJE NA VELIKOST TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	44
4.3 TERMIČNA ANALIZA POSAMEZNIH KOMPONENT IN TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	45
4.3.1 TERMIČNA ANALIZA POSAMEZNIH KOMPONENT TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV.....	45
4.3.2 TERMIČNA ANALIZA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	46
4.4 STABILNOST.....	50
4.4.1 SPREMEMBE V VELIKOSTI	50
4.4.2 SPREMEMBE V POLIDISPERZNEM INDEKSU	52
4.4.3 SPREMEMBE V ZETA POTENCIALU	53
4.5 VREDNOTENJE UČINKOV NOVIH STABILIZATORJEV ZA IZDELAVO TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV NA KERATINOCITIH.....	54
4.5.1 METABOLNA AKTIVNOST TRETIRANIH CELIC.....	55
4.5.2 MORFOLOŠKE SPREMEMBE KERATINOCITOV PO INKUBACIJI Z NOVIMI STABILIZATORJI IN TRDNIMI LIPIDNIMI NANODELCI	59
6. LITERATURA.....	64

POVZETEK

Trdni lipidni nanodelci so nosilni sistem za učinkovine, ki zaradi svoje sestave prinašajo vrsto prednosti ter hkrati odpravljajo slabosti klasičnih koloidnih sistemov. Na lastnosti in stabilnost ter na biološko sprejemljivost disperzij trdnih lipidnih nanodelcev v veliki meri vplivajo stabilizatorji, vezani na površino delcev. Želeli smo izdelati stabilne disperzije trdnih lipidnih nanodelcev s čim boljšimi fizikalnimi lastnostmi in čim nižjo toksičnostjo. Za ta namen smo preverjali primernost in učinkovitost petih novih stabilizatorjev: neionskih *glu-C14*, *lak-C14*, *glu-HOL* in *lak-HOL* ter kationskega *glu-C14-N*.

S postopkom dispergiranja taline lipida z rotor-stator homogenizatorjem smo izdelali trdne lipidne nanodelce z navedenimi stabilizatorji v različnih koncentracijah. Ugotovili smo, da vsi novi stabilizatorji v vseh testiranih koncentracijah omogočajo nastanek nanodelcev ter da različne vrste stabilizatorjev različno vplivajo na lastnosti lipidnih nanodelcev. Najmanjše nanodelce smo izdelali s stabilizatorjem *lak-C14*, najugodnejši zeta potencial pa smo izmerili pri nanodelcih *SLN(glu-C14-N)*. Velikost delcev je bila v vseh primerih heterogena. Za zagotavljanje stabilnosti skozi daljše časovno obdobje smo nekatere disperzije z liofilizacijo pretvorili v sipke nanodelce. Po redispergiranju so bile fizikalne lastnosti nanodelcev (razen *SLN(glu-C14-N)*) slabše, so pa vsi ostali v nanometrskem območju. S termično analizo posameznih komponent in liofiliziranih nanodelcev smo dokazali interakcije med posameznimi komponentami trdnih lipidnih nanodelcev, kakor tudi tvorbo kristaliničnega lipidnega matriksa. Stabilnost nanodelcev je bila po pričakovanjih boljša pri nižji temperaturi, med različnimi vrstami nanodelcev pa so se najboljše izkazali nanodelci s kationskim stabilizatorjem *glu-C14-N*, ki so bili ob izdelavi največji. Najbolj se je velikost povečala nanodelcem, ki so bili ob izdelavi najmanjši (*SLN(lak-C14)*). Citotoksičnost novih stabilizatorjev smo opazovali na keratinocitih. Ugotovili smo, da niti stabilizatorji v raztopini niti vezani na trdne lipidne nanodelce nimajo citotoksičnega učinka na celice, MTS test pa je celo pokazal stimulatívno delovanje nekaterih stabilizatorjev v določenih koncentracijah na metabolno aktivnost celic.

Zaključimo lahko, da so novi stabilizatorji primerni za izdelavo SLN, za njihovo učinkovito in varno uporabo pa je potrebno izvesti še vrsto raziskav.

ABSTRACT

Solid lipid nanoparticles are drug carrier system which, due to its unique composition, combines the advantages and simultaneously avoids disadvantages of other colloidal carrier systems. Surfactants bound on the particle surface are mostly responsible for properties, stability and biological compatibility of dispersion. We tried to prepare stable dispersions of solid lipid nanoparticles with best physical properties and lowest cytotoxicity. Therefore we examined suitability and efficiency of five new stabilizers: non-ionic *glu-C14*, *lak-C14*, *glu-HOL* and *lak-HOL* as well as cationic *glu-C14-N*.

Solid lipid nanoparticles were prepared with various stabilizers in various concentrations by the melt-emulsification process. All of five new stabilizers in all tested concentrations enabled formation of nanoparticles, however it was stabilizer what most affected nanoparticles' features. The lowest average diameter of nanoparticles was obtained with the use of *lak-C14*, whereas best zeta potential was measured in *SLN(glu-C14-N)*. The size dispersion was heterogeneous in all cases. To enhance long term stability, some of dispersions were lyophilized. After resolubilization all nanoparticles, except *SLN(glu-C14-N)*, showed weakened physical properties, nevertheless all of them stayed in nanoparticle range. Thermal analysis was performed on bulk material and on nanoparticles after lyophilisation, which provided evidence for interactions between single components of solid lipid nanoparticle as well as information on formation of crystalline lipid matrix of solid lipid nanoparticles. As expected, long term stability of solid lipid nanoparticles was better at low temperature, while among various nanoparticles best performance was observed in *SLN(glu-C14-N)* where cationic stabilizer was used, even though at the time of production they had the largest average diameter. The biggest increase in size was observed in *SLN(lak-C14)*, which were the smallest in size at the time of production. The cytotoxicity of new stabilizers was studied on keratinocytes. We observed no cytotoxic effect nor when they were in solution neither when they were bound on solid lipid nanoparticles. Furthermore, MTS test has even shown stimulating effect on cells of some stabilizers in certain concentrations.

We can conclude that new surfactants can be used as stabilizers in production of solid lipid nanoparticles, however further research is necessary in order to use them effectively and safely.

SEZNAM OKRAJŠAV

DSC – diferenčna dinamična kalorimetrija

KMK – kritična micelna koncentracija

LD – laserska difrakcija

MEM – medij za gojenje celične kulture

MTS test – test aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze

ND – nanodelci

PAS – površinsko aktivna snov

PBS – fosfatni pufer

PCS – fotonska korelacijska spektroskopija

PI – polidisperzni indeks

SLN – trdni lipidni nanodelci

SPP – novi stabilizatorji

TEM – transmissijska elektronska mikroskopija

TRF – faktor zmanjšanja toksičnosti

ZP – zeta potencial

1. UVOD

1.1 NADZOROVANO DOSTAVLJANJE UČINKOVIN IN KOLOIDNI NOSILCI

Farmakološki odgovor na zdravilo je neposredno odvisen od koncentracije učinkovine na mestu delovanja. Največkrat le manjši del danega odmerka učinkovine doseže to mesto, medtem ko se glavnina porazdeljuje po organizmu v odvisnosti od fizikalno-kemičnih lastnosti učinkovine. Posledica porazdelitve učinkovin v zdrava tkiva in organe pa so lahko toksični stranski učinki. Nadzorovano dostavljanje učinkovin, katerega cilj je optimiranje zdravljenja, je pomembno za številne farmacevtske oblike. Pristop vključuje optimiranje delovanja tako z nadzorovanim sproščanjem kot tudi s ciljanim dostavljanjem učinkovin na obolelo mesto, idealna pa je kombinacija obojega. S tem se zmanjša nevarnost stranskih učinkov (zaradi zmanjšane koncentracije učinkovine v zdravih tkivih) kot tudi poveča učinkovitost zdravljenja s ciljanim kopičenjem učinkovine na mestu delovanja. Ena izmed možnosti povečanja selektivnosti za določeno mesto delovanja je kemična modifikacija učinkovine s katero dosežemo ustrežnejše fizikalno-kemične lastnosti. Čeprav je ta pristop v nekaterih primerih lahko zelo uspešen, pa velikokrat sinteza učinkovine za bolj ciljano dostavo ni mogoča (1). Kot alternativa se je pri nadzorovanem dostavljanju učinkovin za zelo učinkovito izkazala asociacija učinkovine z nosilnim sistemom. Le-ta zaščiti tako zdravilno učinkovino kot bolnika ter omogoča dostavo učinkovine na želeno mesto. Glede na velikost ločimo koloidne nosilne sisteme (velike nekaj deset nm), mikrodcelce (nekaj μm) in implantate (velike do nekaj milimetrov) (2).

Idealni nosilni sistem učinkovino sprejme, varuje, ciljano prenese na želeno mesto ter terapevtsko učinkovit odmerek sprosti v optimalnem času. Je biokompatibilen, biorazgradljiv ter fizikalno in kemično stabilen. Z učinkovino ne sme ireverzibilno reagirati in ne sme povzročati imunskih reakcij (1).

V zadnjem času so veliko pozornost pritegnili koloidni nosilci. V splošnem so koloidni sistemi definirani kot večfazni sistemi, sestavljeni iz dispergirane faze, ki je enakomerno porazdeljena znotraj disperznega medija. Velikost dispergirane faze koloidnega sistema je v območju 1 – 1000 nm (3, 4). Sem prištevamo nanodelce (ND), nanoemulzije, nanosuspenzije,

liposome, micele in topne konjugate polimer-účinkovina. Za katerega od njih se odločimo je odvisno od dejavnikov kot so: kapaciteta vgrajevanja, možnost ciljane dostave, *in vivo* obnašanje, akutna in kronična toksičnost, možnost proizvodnje v industrijskem merilu, fizikalna in kemična stabilnost ter seveda cena takega sistema (2).

1.2 TRDNI LIPIDNI NANODELCI

Trdni lipidni nanodelci (SLN) so ND, sestavljeni iz biološko razgradljivih lipidov, ki so pri sobni in telesni temperaturi v trdnem agregatnem stanju (5). Njihova velikost običajno znaša od 50 do 1000 nm (6). Sistem predstavlja vodna koloidna disperzija trdnih lipidov, ki je stabilizirana z različnimi površinsko aktivnimi spojinami (PAS). Z liofilizacijo ali z metodo razprševanja s sušenjem jih lahko pretvorimo tudi v dolgotrajno stabilno obliko suhih prahov.

Uveljavili so se v 90-ih letih prejšnjega stoletja kot alternativa ostalim koloidnim sistemom. Združujejo namreč prednosti polimernih delcev (trdno ogrodje za zaščito in nadzorovano sproščanje učinkovin) in O/V maščobnih emulzij za parenteralno uporabo (uporaba netoksičnih lipidov in možnost izdelave v industrijskem merilu) ter hkrati odpravljajo njune slabosti (zaostanek organskih topil in toksičnost sestavin v polimernih ND, hitro sproščanje učinkovin iz maščobnih emulzij ter težave s stabilnostjo pri liposomih) (7, 8, 9).

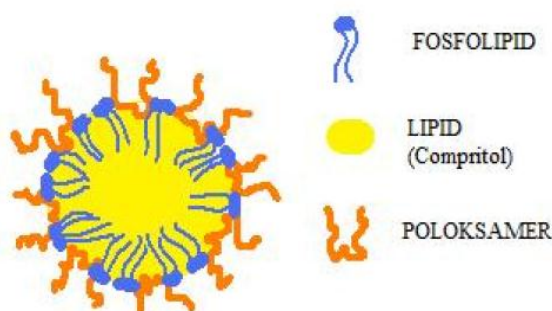
Glavne značilnosti SLN, na katerih temelji njihova uporabnost, so torej (2):

- možnost nadzorovanega sproščanja in ciljane dostave (trdno ogrodje, velikost in modifikacija površine)
- zaščita vgrajene učinkovine
- visoka zmogljivost vgrajevanja učinkovin
- možnost vgrajevanja tako lipofilnih kot hidrofilnih učinkovin ter tudi proteinov
- uporaba sestavin, ki so fiziološko sprejemljive in biološko razgradljive. Na ta način je zmanjšana tudi možnost za nastanek toksičnih metabolitov ali kopičenje ogrodnega materiala.
- izdelava brez uporabe organskih topil
- možnost izdelave v industrijskem merilu
- možnost sterilizacije.

1.2.1 SESTAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Glavne sestavine disperzije SLN so (Slika 1):

- lipidi, ki tvorijo jedro nanodelca
- stabilizatorji, vezani na površino delca
- voda kot disperzni medij.



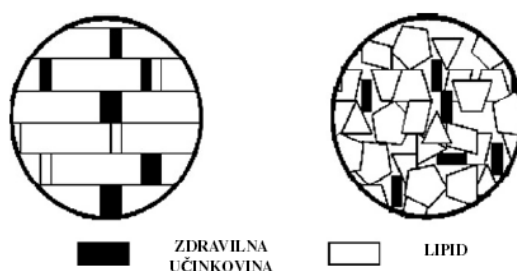
Slika1: Shematski prikaz sestave SLN.

1.2.1.1 LIPIDI

Po kemijski naravi so lahko lipidi, ki jih uporabljamo za izdelavo SLN, trigliceridi, zmesi monogliceridov, digliceridov in trigliceridov, maščobne kisline, steroidi ali voski. Delež trdnih lipidov, dispergiranih v vodnem mediju, je od 0,1% (m/m) do 30% (m/m) (5). Povečanje tega deleža vodi, zaradi zmanjšane učinkovitosti homogeniziranja in povečane možnosti aglomeracije delcev, v povečanje velikosti delcev in širšo distribucijo velikosti (2).

Izbira lipida je prvi faktor, ki vpliva na velikost in druge karakteristike SLN. Velikost ND v disperziji je večja, če so sestavljeni iz lipidov z višjim tališčem, kar povezujejo z večjo viskoznostjo taline lipidov med izdelavo. Ostali kritični parametri vključujejo dolžino verig maščobnih kislin, hitrost lipidne kristalizacije, samoemulgirajoče sposobnosti lipida in obliko lipidnih kristalov (vpliv na površino) (2, 8).

Znano je, da so gliceridi polimorfni, kar pomeni, da lahko kristalizirajo v različnih mrežnih strukturah in se pojavljajo v obliki različnih kristalnih modifikacij. Glavne polimorfne oblike gliceridov so tri: α (heksagonalna), β' (ortorombska) in β (triklinska) (4). Spreminjanje ene modifikacije v drugo poteka monotropno, torej le v eni smeri, od termodinamsko nestabilne α -modifikacije (z najnižjim tališčem in najvišjim energetske nivojem) preko β' do termostabilne β -modifikacije. Posledično v tej smeri narašča tudi pravilnost kristalne mreže in pada količina vgrajene učinkovine (Slika2) (2).



Slika 2: Nastanek pravilnih kristaliničnih struktur v lipidnem ND vodi v manjšo učinkovitost vgrajevanja zdravilnih učinkovin (levo). Več kot je nepravilnosti v kristalni strukturi, večja je učinkovitost vgrajevanja zdravilnih učinkovin (desno) (10).

Poleg različnih polimorfnih stanj so s kristalizacijo lipidov povezani še nekateri drugi pojavi, kot so npr. obstoj podhlajene taline in fenomen geliranja.

Do nastanka podhlajene taline pride, ko staljeni lipidi med ohlajanjem ne rekristalizirajo. Hitrost rekristalizacije je odvisna od narave lipida, koncentracije lipida in stabilizatorja ter vgrajene učinkovine. Verjetnost za nastanek podhlajene taline narašča s padanjem velikosti kapljic, saj je v manjših kapljicah nastanek kritičnega števila kristalizacijskih jeder manj verjeten. Včasih je potrebno znižati temperaturo pod sobno, da omogočimo kristalizacijo (2, 11).

Pojav geliranja je povezan s povečanjem površine delcev med shranjevanjem ob nastajanju stabilnejše β -modifikacije. Nanj pomembno vplivajo različni dejavniki, kot so visoka temperatura, izpostavljenost svetlobi ali mehanski stres. Nastanek gela je ireverzibilni proces in vodi v izgubo koloidnega velikostnega reda (2, 4).

Od kristalizacije lipidov je odvisna tudi oblika lipidnih ND, ki se razlikuje od oblike kroglice. Za β -modifikacijo so značilni kristali v obliki ploščic, kar ima za posledico, da se tudi sam lipidni nanodelec oblikuje v obliko ploščice. Na ta način se poveča površina, kar pomeni, da je potrebnega več stabilizatorja za stabilizacijo takega sistema (2).

1.2.1.2 STABILIZATORJI

Površinsko aktivne snovi se zaradi svoje amfifilne strukture porazdeljujejo na meji med dvema fazama (tekoče-tekoče, tekoče-trdno, tekoče plinasto). Z naraščanjem koncentracije površinsko aktivne snovi v vodni raztopini pada površinska napetost vse dokler molekule zapolnjujejo mejno površino med obema fazama. Pri določeni koncentraciji se te površine nasitijo in površinsko aktivne snovi se pričnejo združevati in tvoriti agregate, ki jih imenujemo miceli. Koncentracijo, pri katerih se pričnejo tvoriti miceli, imenujemo kritična micelska koncentracija (KMK). Vrednost KMK je pomemben dejavnik, ko se odločamo kateri surfaktant je najbolj optimalna izbira za določen sistem. Nižja vrednost pomeni, da je potrebne manj PAS za nasičenje površine in nastanek micelov. KMK je torej merilo učinkovitosti PAS in omogoča medsebojno primerjavo različnih surfaktantov.

Pri oblikovanju SLN je bistvena izbira stabilizatorja in njegova koncentracija, saj le-ta v veliki meri vpliva na kakovost in stabilnost disperzije. V kolikor za oblikovanje SLN izberemo metodo dispergiranja taline lipida v vodni medij, stabilizatorji že v tej fazi odigrajo odločilno vlogo. Kot emulgatorji namreč zmanjšajo površinsko napetost in olajšajo nastajanje kapljic. Z zmanjševanjem kapljic se poveča njihova površina, ki jo morajo molekule stabilizatorja prekriti. Proces rekristalizacije lipidov privede do dodatnega povečanja specifične površine (oblikovanje anizometričnih kristalov v obliki ploščic), kar zahteva dodatne molekule stabilizatorja (2).

Presežek stabilizatorja je prisoten v različnih oblikah, kot so: raztopljene posamezne molekule, različni miceli, vezikli. Različne oblike potrebujejo različno dolg čas za prerazporeditev. Za molekule, orientirane v micelo, v splošnem velja, da tiste z manjšo molekulsko maso hitreje dosežejo ravnovesje (2).

Disperzije SLN, stabilizirane samo s fosfolipidom, so nestabilne. Presežek molekul fosfolipida namreč tvori vezikle in ne more dovolj hitro stabilizirati novo nastalih površin med rekristalizacijo. Pojav nestabilnosti lahko preprečimo z dodatkom še enega stabilizatorja, tako imenovanega »ko-surfaktanta« (tiloksapol, lutrol), ki je topen v vodi in tvori visokodinamične micele. Iz njih se posamezne molekule stabilizatorja hitro sproščajo in na ta način stabilizirajo novonastale mejne površine (12). Po drugi strani pa je treba upoštevati, da so površinsko aktivne spojine, ki se z lahkoto prerazporedijo, običajno zelo dobro vodotopni in potencialno toksični. Priporočljiva je torej kombinacija različnih stabilizatorjev (2).

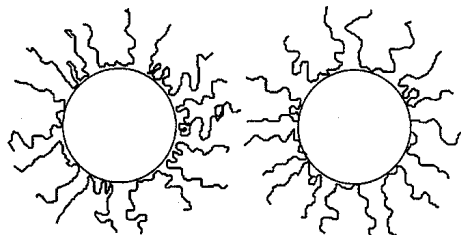
Pri oblikovanju SLN se poslužujemo tako naravnih (lecitin), kot tudi sintetičnih stabilizatorjev. Lahko se uporabljajo vsi, ki so dovoljeni za parenteralne farmacevtske oblike. Pri zmanjševanju velikosti delcev so se za uspešnejše izkazali ionski stabilizatorji v primerjavi z neionskimi. V uporabi so (2, 5):

- fosfolipidi: sojin lecitin, jajčni lecitin, fosfatidilholin
- neionski stabilizatorji: kopolimeri etilen in propilen oksida (poloksamer, poloksamin), tiloksapol, polisorbati (*Tween*[®]-i), monoestri sorbitola (*Span*[®]-i), estri z glicerolom, estri saharoze z maščobnimi kislinami,
- ionski stabilizatorji: natrijev holat, natrijev glikoholat, natrijev tavroholat, natrijev lavrilsulfat, dioktil natrijev sulfosukcinat, itd.

Poleg vrste stabilizatorja je pomembna tudi njihova koncentracija. Če je le-ta prenizka, se v disperziji pojavijo delci mikrometrskih velikosti. S pravšno koncentracijo lahko dosežemo homogeno porazdelitev velikosti delcev. Pri visoki koncentraciji stabilizatorjev pa se v disperziji v povečani meri pojavijo različne druge koloidne vrste. Zaradi potencialne toksičnosti se je prevelikih koncentracij potrebno izogibati (2).

Stabilizacija nanodelcev poteka po dveh mehanizmih. Stabilizatorji omogočijo bodisi elektrostatični naboj med delci bodisi sterično stabilizacijo. V prvem primeru odboj med delci nastopi zaradi naboja, ki nastane, ko stabilizatorji v obliki soli v vodi disociirajo. V drugem primeru (Slika 3) pa polimeri, poleg tega, da predstavljajo mehansko pregrado, onemogočijo agregacijo po dveh osnovnih mehanizmih (12):

- Polimerne verige, adsorbirane na površini delcev, se ob približevanju dveh delcev prepletajo. Povečana koncentracija polimera povzroči večji osmotski tlak v predelu med delcema, zato molekule zunanje faze difundirajo v to območje, kar potiska delce narazen.
- Pri zbliževanju delcev se lahko polimerne verige stisnejo. To vodi v izgubo konformacijske entropije adsorbiranega polimera, kar je vzrok za povečano prosto energijo sistema, ki povzroči odboj delcev.



Slika 3: Sterična stabilizacija delcev s pomočjo blok kopolimera (1).

1.2.2 METODE ZA IZDELAVO TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Pri oblikovanju SLN poskušamo doseči čim večjo stopnjo dispergiranosti in čim bolj monodisperzno porazdelitev velikosti delcev v nanometrskem področju. Tehnološke metode, ki jih za to uporabljamo so: dispergiranje taline lipida, hladno dispergiranje ter razredčevanje vroče mikroemulzije (13). Pomembni tehnološki parametri, ki jih je potrebno pri tem optimizirati so: temperatura, intenziteta mešanja ter način ohlajanja (14).

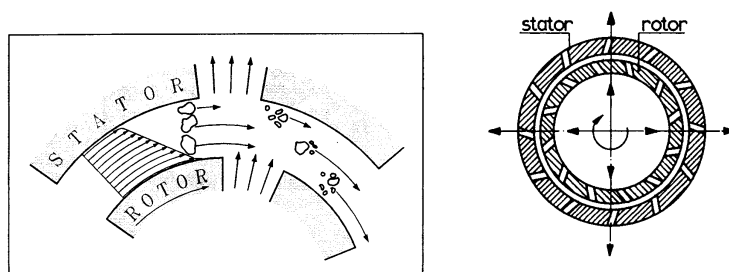
1.2.2.1 DISPERGIRANJE TALINE LIPIDA

VISOKOSTRIŽNA HOMOGENIZACIJA IN ULTRAZVOK

Visokostrižna homogenizacija in ultrazvok sta prvotno uporabljani tehniki dispergiranja taline lipidov za pripravo trdnih lipidnih nanodisperzij. Obe sta široko uporabljani in enostavni metodi. Kakovost disperzij je pogosto odvisna od prisotnosti mikrodelcev, pri uporabi ultrazvoka pa lahko pride tudi do kontaminacije s kovinami. Na velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial vplivamo s časom emulgiranja, jakostjo homogenizatorja oziroma ultrazvoka in pogoji hlajenja (2, 15).

Emulgiranje taline lipida v vodni disperzni medij z rotor-stator homogenizatorjem

Lipidno fazo (glicerid, fosfolipid) segrejemo nad temperaturo tališča lipida, v njej raztopimo učinkovino in ji dodamo na enako temperaturo segreto vodno raztopino steričnega stabilizatorja. Zmes homogeniziramo z rotor-stator homogenizatorjem pri visokih obratih (10000 – 20000 obratov/min) in konstantni temperaturi (običajno 10°C nad temperaturo tališča lipida). V reži med zunanjim mirujočim statorjem in notranjim rotorjem prihaja zaradi velikih strižnih sil do turbulence (Slika 4), kar povzroča razprševanje večjih kapljic v manjše. Z ohlajanjem nastale O/V emulzije taline lipida v vodni raztopini steričnega stabilizatorja omogočimo otditev lipidnih kapljic in nastanek SLN (1, 16).



Slika 4: Princip homogeniziranja z rotor-stator homogenizatorjem (1).

VISOKOTLAČNA HOMOGENIZACIJA

Zelo pogosto pri izdelavi SLN uporabljamo homogeniziranje pri visokem tlaku. V tem primeru poteka postopek v dveh stopnjah. Prva stopnja je izdelava predemulzije s pomočjo rotor-stator homogenizatorja. Zelene so kapljice mikrometrskih velikosti, saj kakovost predemulzije močno vpliva na kakovost končnega izdelka. Sledi homogenizacija pod visokim tlakom in pri temperaturi nad temperaturo tališča lipida. Homogenizator potisne tekočino pod visokim tlakom (100 – 2000 bar) skozi ozko špranjo (v območju nekaj mikronov). Zaradi pospeševanja disperzije na kratki razdalji do visoke hitrosti (preko 1000 km/h) nanjo delujejo močne strižne sile in sile kavitacije. Mikrokapljice se tako razbijejo v nanokapljice (2, 15). Dispergiranje je odvisno od temperature, tlaka in števila ciklov postopka. Te pogoje je potrebno določiti za vsako sestavo SLN disperzije posebej (13, 14).

1.2.2.2 HLADNO DISPERGIRANJE

Učinkovino dispergiramo v talino lipida. Zmes ohladimo v tekočem dušiku in jo zmeljemo. Hitro hlajenje poveča krhkost lipida in omogoča nastanek delcev v mikrometrskem območju. Lipidni prašek dispergiramo v vodni raztopini stabilizatorja pri temperaturi, ki je nižja od temperature tališča lipida, temu pa sledi homogenizacija pod visokim tlakom pri enaki temperaturi. Na ta način se mikodelci zmanjšajo na nanometersko velikost.

Dobra stran te metode je, da je z njo možno v SLN vgraditi tudi hidrofilne učinkovine, uporabimo pa lahko tudi lipide z višjo temperaturo tališča. Vendar pa je za homogeniziranje trdnih delcev potrebne več energije, kar pomeni več ciklov in višji tlak za enako velikost kot pri metodi emulgiranja taline. Pri tem lahko v šobi homogenizatorja nastanejo zelo visoke temperature, kar poveča nevarnost taljenja lipidov z nižjim tališčem (13, 17).

1.2.2.3 METODA Z RAZREDČEVANJEM VROČE MIKROEMULZIJE

Tudi tukaj gre za dvostopenjsko metodo. V prvem koraku oblikujemo mikroemulzijo tipa O/V, v drugem pa vročo mikroemulzijo hitro razredčimo v mrzlem vodnem mediju. Kapljice ustrezne velikosti so že prisotne v vroči mikroemulziji, tako da za tvorbo SLN energija ni potrebna. Vpliv na velikost SLN imajo: sestava mikroemulzije, razmerje mikroemulzija/disperzni medij, temperaturna razlika, način in hitrost dispergiranja. Poleg lipofilnih učinkovin je s to metodo možno v SLN vključiti tudi hidrofilne učinkovine, in sicer tako, da jih raztopimo v notranji fazi V/O/V mikroemulzije (13).

1.2.2.4 IZPAREVANJE TOPILA Z OBARJANJEM V EMULZIJAH TIP A O/V

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

Prednost te metode je odsotnost termičnega stresa, slabost pa uporaba organskih topil. Z naraščajočo koncentracijo lipida učinkovitost homogenizacije pada zaradi večje viskoznosti dispergirane faze (2, 15).

1.3 VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Kakovost izdelka lahko kontroliramo z ustreznim vrednotenjem disperzije SLN. Ključni dejavniki, ki imajo tudi neposreden vpliv na stabilnost in kinetiko sproščanja, so: velikost delcev, zeta potencial, stopnja kristaliničnosti, lipidne modifikacije in sopojavnost drugih koloidnih struktur (miceli, liposomi, podhlajena talina, nanodelci učinkovine). Z merjenjem velikosti ND lahko ugotovljamo uspešnost dispergiranja in distribucijo velikosti SLN, z meritvijo zeta potenciala pa lahko napovemo fizikalno stabilnost disperzije.

Veliko analitskih metod ne dovoljuje direktnega merjenja v nerazredčeni disperziji SLN, zato je potrebna ustrezna predpriprava vzorcev. Ob tem je potrebno upoštevati morebitne spremembe, do katerih lahko pride, kot npr. odstranjevanje emulgatorja s površine delcev z razredčevanjem, indukcijo kristalizacije in spremembe modifikacij lipida (2).

1.3.1 VELIKOST DELCEV IN POLIDISPERZNI INDEKS

Velikost delcev je pomemben parameter kakovosti, saj so od njega lahko odvisne fizikalne in farmakološke lastnosti učinkovine. Posredno z velikostjo delcev določimo tudi polidisperzni indeks, ki nam pove kakšna je porazdelitev velikosti delcev v disperziji SLN. Zavzema lahko 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 SLN, vrednosti $PI > 0,3$ pa na večjo heterogenost delcev v vzorcu (16).

Velikost delcev je odvisna od izbire učinkovine in pomožnih snovi ter njihovega razmerja, od tehnološkega postopka izdelave, procesnih faktorjev (npr. temperatura), disperznega medija, liofilizacije, sterilizacije ter od pogojev shranjevanja. Spremembe v velikosti delcev se lahko

pojaviijo pred makroskopskimi spremembami, zato je velikost delcev dober in pomemben indikator nestabilnosti (4).

V submikronskem območju se za določanje velikosti delcev uporabljajo tri metode: fotonska korelacijska spektroskopija (PCS), laserska difrakcija (LD) in transmissijska elektronska mikroskopija (TEM).

PCS temelji na meritvah nihanja intenzitete sipane laserske svetlobe, ki je posledica Brownovega gibanja delcev. Gre za naključno gibanje, ki je posledica trkov delcev z molekulami disperznega medija. Manjši delci se gibljejo hitreje, kar pomeni hitrejše nihanje intenzitete razpršene svetlobe. Zgornja meja velikosti delcev je tako določena s sedimentacijo delcev, ki je odvisna tako od velikosti kot tudi od gostote delcev. Običajno lahko s to metodo določimo delce velike do 3 μm , večje delce pa lahko določimo z lasersko difrakcijo (2, 4).

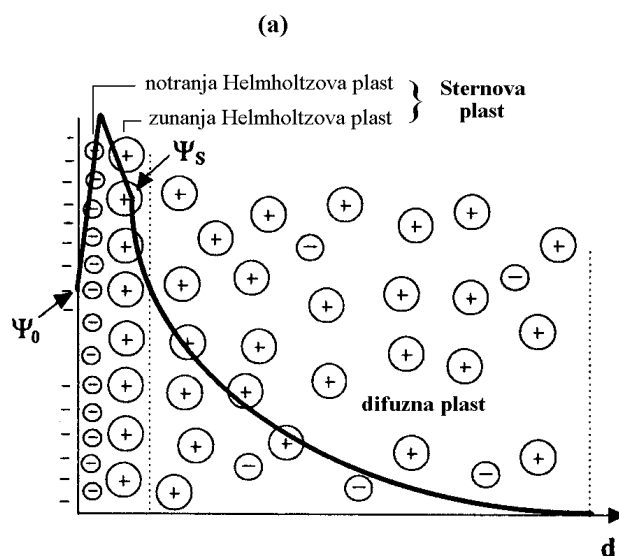
LD izkorišča uklon laserske svetlobe za določanje porazdelitve velikosti delcev od submikronskega velikostnega območja do velikosti nekaj milimetrov. Temelji na odvisnosti difrakcijskega kota od premera delca. Manjši delci sipajo svetlobo pod večjim kotom in obratno.

Tako PCS kot LD za izračun velikosti delcev uporabljata sipanje svetlobe in predpostavljata sferično obliko delcev, kar ni vedno pravilno. Direktno informacijo o obliki delcev nam da TEM. S to tehniko lahko delcem določimo velikost (med 1 nm in 5 μm), obliko, strukturo in kristalno stanje (2).

1.3.2 ZETA POTENCIAL

S stališča fizikalne stabilnosti je ugodno, če imajo dispergirani delci na površini določen naboj. Kot merilo gostote le-tega služi zeta potencial. Ta je lahko posledica selektivne adsorpcije ionov iz disperznega medija ali ionizacije skupin na površini, pri čemer je naboj odvisen od pH in pKa. Če so v sistemu prisotne molekule ionskega stabilizatorja, običajno prav one določajo naboj na površini.

Naboj na površini je stabiliziran z nasprotno nabitimi ioni v mediju. Tvorijo se električna dvojna plast, sestavljena iz dveh delov. Sternova plast ob površini delca tvorijo protiioni, trdno vezani na površino. Nadalje jo lahko razdelimo še v dve plasti. Tik ob površini delca je notranja Helmholtzova plast, ki jo sestavljajo trdno vezani dehidratirani soioni, med katerimi prevladuje van der Waalsov privlak. Sledi zunanja Helmholtzova plast, v kateri so trdno vezani hidratirani protiioni. Sternova plast se nadaljuje v difuzno plast, kjer so ioni razporejeni v skladu z elektrostatičnimi silami in naključnim termičnim gibanjem. V elektronevtralni okolici sta koncentraciji pozitivnih in negativnih ionov uravnoteženi (Slika 5).



Slika 5: Električna dvojna plast okoli negativno nabitega delca in spreminjanje potenciala v odvisnosti od razdalje od površine delca (1).

Potencial na površini delca imenujemo Nernstov potencial ψ_0 in je definiran kot razlika v potencialu med površino delca in elektronevtralno zunanjo fazo. Razliko v potencialu med Sternovo plastjo in elektronevtralno okolico pa imenujemo Sternov potencial ψ_s . Le-ta ni neposredno merljiv. Kot merilo zanj običajno določamo njegov približek, elektrokinetični zeta potencial, ki ga izračunamo iz gibljivosti delcev, izmerjene med elektroforezo. To je merjenje hitrosti gibanja nabitih delcev v električnem polju skozi tekočino. Na ta način lahko ocenimo vrsto naboja na delcih in elektroforezno gibljivost delcev, ki je povezana z nabojem na površini delca. Metoda, ki temelji na teh načelih se imenuje laser-Dopplerjeva anemometrija (4).

Zaradi električnega odboja bo pri nabitih delcih manj verjetno prišlo do agregacije delcev. Na splošno velja, da so stabilne tiste disperzije, pri katerih je ZP večji od +30 mV ali manjši od -30 mV. Izjema so sistemi, ki so stabilizirani s steričnimi stabilizatorji, saj adsorpcija le-teh, zaradi sprememb na površini delca, zniža vrednost zeta potenciala (4).

1.3.3 KRISTALNO STANJE

Ena izmed glavnih prednosti SLN kot koloidnega nosilnega sistema je njihovo trdno agregatno stanje, ki omogoča nadzorovano sproščanje. Poleg faznega prehoda lipidnega ogrodja iz tekočega v trdno agregatno stanje so zanimive tudi pri tem nastajajoče kristalne modifikacije. Polimorfno obnašanje lipidov ima namreč pomemben vpliv na rast delcev in s tem na dolgotrajno stabilnost SLN (18). Močna je tudi korelacija stopnje lipidne kristalizacije s količino vgrajene učinkovine in s hitrostjo sproščanja.

Za proučevanje kristalinične strukture sta široko v uporabi dve metodi: diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) in rentgenska difrakcija.

Rentgenska difrakcija se redno uporablja za strukturne preiskave trdnih kristaliničnih vzorcev. Z njo lahko ocenjujemo dolžine prostorov v kristalni mreži, lahko pa jo tudi uporabimo za proučevanje vpliva učinkovine in pomožnih snovi na temperaturo tališča in rekristalizacijo lipidnega ogrodja (2, 4).

DSC je v farmaciji ena izmed najpogostejše uporabljanih termičnih analitskih metod. Obsega nadzorovano segrevanje, hlajenje vzorca ali vzdrževanje konstantne temperature ter opazovanje fizikalnih in kemijskih sprememb, ki med tem potekajo (19). Pri vrednotenju SLN se DSC najpogostejše uporablja za ugotavljanje rekristalizacijskega obnašanja lipidnega ogrodja ND. Na ta način lahko ugotovimo ali se prične rekristalizacija lipidnega ogrodja takoj po izdelavi ali šele po določenem času shranjevanja. S polkvantitativnim vrednotenjem DSC-termogramov lahko izračunamo delež rekristaliziranih delcev v odvisnosti od časa shranjevanja. Določimo lahko tudi odvisnost rekristalizacijskega poteka od pogojev shranjevanja, metoda pa omogoča tudi določitev polimorfni prehodov različnih kristalnih modifikacij gliceridov (20, 21).

1.4 STABILNOST TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Zaradi velike mejne površine in z njo povezane proste površinske energije so disperzije SLN termodinamsko nestabilni sistemi, ki z združevanjem delcev skušajo doseči energijsko ugodnejše stanje. Skupno delovanje stabilizirajočih in destabilizirajočih dejavnikov je kompleksno, zaradi česar je težko vnaprej napovedati stabilnost posamezne disperzije SLN med shranjevanjem (2). Za optimizacijo stabilnosti delcev med procesom izdelave, med shranjevanjem in v biološkem okolju je potrebno poznavanje destabilizacijskih mehanizmov. V grobem jih lahko delimo na tiste, ki izhajajo iz sestave, procesa izdelave in pogojev shranjevanja. Kot že opisano v poglavju 1.2.1.1 je potrebna posebna pozornost pri izbiri lipida. Upoštevati moramo namreč možnost nastanka podhlajene taline, prisotnost različnih lipidnih modifikacij, obliko ND ter pojav geliranja. Stabilizator pomeni pregrado za prenos molekul dispergirane faze v kontinuirano fazo, kakor tudi onemogoči agregiranje pri približevanju delcev. K stabilizaciji SLN pripomorejo elektrostatične odbojne sile, sterična stabilizacija in stabilnost filma stabilizatorja (glej poglavje 1.2.1.2). Določeno stopnjo povečanja stabilnosti lahko dosežemo tudi s procesom izdelave. Homogena distribucija velikosti delcev, na primer, zmanjša možnost Ostwaltove rasti velikih delcev na račun manjših (4).

Poleg fizikalne stabilnosti SLN je pomembna tudi kemična stabilnost sestavin. Pod vplivom vlage, kisika in svetlobe lahko pride do določenih sprememb v vzorcu. Glavni tipi reakcij, ki potekajo ob tem so hidroliza, oksidacija in fotoliza. Večjo stopnjo stabilnosti dosežemo, če med samo izdelavo odstranujemo kisik iz sistema, izdelke shranjujemo zaščitene pred svetlobo in pri nizkih temperaturah. Dodamo lahko antioksidante, SLN pa lahko tudi pretvorimo v suho obliko, ki je v primerjavi z vodno disperzijo stabilna daljši čas. To lahko storimo na dva načina, s sušenjem z razprševanjem in z liofilizacijo. Prvi način je nekoliko manj primeren, saj pogosto prihaja do delnega taljenja lipidne faze, zato večinoma posegamo po liofilizaciji (22).

1.5 LIOFILIZACIJA

Liofilizacija je postopek odstranjevanja topila iz zmrznjenega vzorca s sublimacijo. Na ta način je mogoče ohraniti fizikalno in kemično stabilnost disperzij SLN skozi daljše časovno obdobje, saj transformacija v trdno obliko omogoča zaščito delcev pred Ostwaldovo rastjo in prepreči reakcije hidrolize. Odstranitev topila je nujna tudi, če želimo SLN vgrajevati v tradicionalne farmacevtske oblike kot so tablete ali kapsule.

Poteka pri zelo nizkih temperaturah in tlakih, kar predstavlja velik stres za ND. Nujna je zaščita med zamrzovanjem (krioprotekcija) in sušenjem (lioprotekcija), sicer se pojavijo problemi, kot so slaba redisperzibilnost liofilizata, porast velikosti delcev in agregacija. Krioprotektanti naj bi okrog suhega produkta tvorili amorfen steklast matriks, ki ND ščiti pred pritiskom oziroma mehanskimi poškodbami kristalov ledu pri sušenju (23). Kot najuspešnejši so se izkazali ogljikovi hidrati (trehaloza, glukoza, laktoza, manoza, itd.), katerih mehanizem še ni povsem raziskan, domnevajo pa, da interagirajo s polarnimi skupinami PAS in služijo kot psevdohidratacijski ovoj ter na ta način preprečijo medsebojni stik delcev (2).

Kljub ugodnostim, ki jih ponuja liofilizacija, je potrebno upoštevati, da odstranitev topila lahko spremeni lastnosti stabilizacijskega ovoja, poveča se koncentracija delcev, kar vodi v agregacijo. Spremembe velikosti delcev med liofilizacijo lahko zmanjšamo z optimiranjem kritičnih parametrov liofilizacije, kot je hitrost zamrzovanja in metode redispergiranja. Pri hitrem zamrzovanju nastanejo majhni kristali ledu, kar pomeni, da med sublimacijo ni kontinuiranih poti za izhajanje pare iz spodnjih plasti vzorca. Pri počasnem zamrzovanju nastanejo večji kristali z večjimi porami, kar vodi k hitrejši sublimaciji. Katero je boljše, je odvisno od posameznega primera (2).

1.6 DERMALNA UPORABA NANODELCEV

1.6.1 ZGRADBA KOŽE

Zaradi svoje velike površine je koža potencialno pomembna pot vstopa ND v organizem. Zgrajena je iz treh plasti: vrhnjice (epidermisa), usnjice (dermisa) in podkožja (hipodermisa). Vrhnjica, sestavljena iz rožene, zrnate, trnaste in bazalne plasti, učinkovito varuje spodaj ležeči dermis pred vplivi okolja. To ji omogoča njena edinstvena struktura. Osnovne gradbene enote vrhnjice so keratinociti, ki so med seboj povezani z beljakovinskimi vlakni, imenovanimi dezmosomi. Nastanejo z delitvijo celic v zarodni plasti, nato pa potujejo proti površini. Na tej poti se morfološko spreminjajo in zorijo. Pride do keratinizacije ali poroženevanja, ko citoplazmo celice postopoma napolnijo vlaknate beljakovine, imenovane keratini. Celice postopoma odmrejo in se odluščijo s površine kože. Celoten proces v povprečju traja 28 dni (10).

1.6.2 UPORABA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV ZA DERMALNO APLIKACIJO

Peroralna aplikacija zdravil je povezano z neželenimi sistemskimi učinki, zato je vedno več pozornosti namenjene dermalni aplikaciji učinkovin. Ker rožena plast kože varuje telo pred vdorom snovi iz okolja, je prehajanje oteženo tudi zdravilnim učinkovinam, zlasti hidrofilnim. Razvoj je zato usmerjen k izdelavi nosilcev za uspešno prehajanje rožene plasti (24). H kožni permeabilnosti močno prispevajo koži lastni lipidi, zato veliko obetajo lipidni nosilci, ki omogočajo izmenjavo lipidov s površino kože. V to skupino spadajo tudi SLN, ki imajo glede dermalne aplikacije številne prednosti (25):

- Lipidi kot glavna sestavina SLN so neirritirajoči in netoksični, zato so SLN primerni tudi za aplikacijo na poškodovano in vneto kožo.
- Z uporabo SLN lahko dosežemo podaljšano sproščanje učinkovine, s čimer se zmanjšajo njihove iritacijske lastnosti in neželeni sistemski učinek. SLN morajo ostati v trdnem stanju pri telesni temperaturi, da omogočajo počasno sproščanje. Pri tem moramo upoštevati dejstvo, da se taljenje ND začne pri nižjih temperaturah kot taljenje izhodnih surovin (glej poglavje 4.3.2). Zato moramo izbrati take lipide, ki imajo temperaturo

tališča višjo od telesne temperature, vendar vseeno dovolj nizko, da je mogoča izdelava z metodo emulgiranja (26).

- S SLN lahko zaščitimo učinkovine, ki v emulzijah niso obstojne (npr. vitamin A, vitamin E, koencim Q10).
- SLN imajo na koži okluziven učinek, ker zaradi svoje majhnosti tvorijo film, ki preprečuje izgubo vode. Okluziven učinek olajša penetracijo učinkovine skozi roženo plast zaradi povečane hidratacije, na koži pa ne pušča mastnega in težkega občutka, ki je prisoten pri običajnih okluzivnih sredstvih. Ta pojav je močno povezan z velikostjo delcev in koncentracijo lipidov. Za najboljše so se izkazale disperzije z delci, manjšimi od 400 nm, in z vsaj 35% vsebnostjo visoko kristaliničnih lipidov (27).
- Vgrajevanje UV-filtrov v lipidno ogrodje zmanjša njihove stranske učinke, zaščita pred sončnimi žarki pa se zaradi sinergističnega delovanja UV-filtrov in SLN celo poveča.

1.7 CITOTOKSIČNOST

Večina lastnosti SLN je zelo obetavnih, njihova potencialna toksičnost pa se še vedno le redko omenja. Le-ta najverjetneje izhaja iz njihove majhnosti in ostalih fizikalno-kemičnih lastnosti ND. Manjši delci izkazujejo večji toksični potencial, ker imajo, v primerjavi z večjimi, večjo površino na enoto mase. V nasprotju z mikrodenci jih celice tudi z lahkoto sprejmejo, vendar pa so interakcije med celicami in SLN še vedno slabo raziskane (16).

Ker so SLN sestavljeni pretežno iz trigliceridov in fosfolipidov, ki se v organizmu metabolizirajo relativno hitro, predvidevamo, da so biorazgradljivi in da jih živi sistemi dobro prenašajo. Vendar pa moramo za nastanek stabilnih ND z optimalnimi površinskimi lastnostmi uporabiti tudi stabilizatorje. Le-ti lahko izkazujejo toksične lastnosti, tudi če so prisotni v le majhnih količinah. Ker so adsorbirani na površino ND, ne samo da vplivajo na njihove lastnosti, pač pa igrajo tudi pomembno vlogo pri interakcijah s celicami (16).

Citotoksičnost je lahko posledica adheriranja ND na celično membrano, internalizacije ND ali razgradnih produktov ND v mediju celične kulture oziroma znotraj samih celic (7). Nižja dokazana citotoksičnost je lahko tudi posledica manjšega privzema ND v celice. Načeloma se

internalizirajo delci do velikosti 200 nm, vendar pa je bilo v literaturi dokazano, da celice brez problemov privzemejo tudi delce do 600 nm velikosti (16).

1.7.1 CELIČNE KULTURE

Celična kultura je homogena populacija celic, ki živi in se razmnožuje v hranilnem gojišču. Pridobi se lahko iz koščka tkiva z mehansko, encimsko ali kemično razgradnjo. Tako dobljene celice se pritrdijo na podlago v enem sloju ali pa preživijo v suspenziji ter tvorijo osnovo primarne kulture. Normalne celice v kulturi rastejo in se delijo le toliko časa, dokler ne zapolnijo celotne površine posode v eni sklenjeni plasti (konfluentna kultura). Med celicami se vzpostavijo medcelični stiki. Na tej stopnji se zaradi kontaktne inhibicije gibanje in delitev celic ustavi. Za doseganje normalnega fenotipa v kulturi je pomembno, da se vzdržuje nizka gostota celic. Celice je zato potrebno redčiti in nasaditi v nova gojišča. Po prvi pasaži postane primarna kultura že celična linija, ki se z nadaljnjimi pasažami selekcionira. Prevladujejo hitro deleče se celice, ki prerastejo počasi deleče, celična linija postane stabilnejša in nespremenjena skozi številne generacije. Po 40 – 50 pasažah lahko propade, lahko pa zaradi genetskih sprememb nastanejo trajne celične linije. Pri njihovem nastanku pride do *in vitro* transformacije, ki se zgodi spontano ali pa je kemično oziroma virusno povzročena. Transformacija celic poteka večstopenjsko; najprej nastanejo trajne celične linije, ki nato izgubijo kontrolo rasti in pride do malignih transformacij (28, 29).

Prednosti gojenja celic *in vitro* so homogenost vzorca (opazovanje samo enega tipa celic), lažje zagotavljanje enakih pogojev za vse celice ter lažje spreminjanje ter kontroliranje teh pogojev, relativno konstantni fiziološki pogoji, ekonomičnost in etičnost.

Problemi gojenja celic v kulturi pa so nujnost aseptičnih pogojev gojenja ter izguba specifičnih lastnosti in celičnih funkcij. Spremeni se tridimenzionalna struktura tkiva, zaradi česar se prekinajo interakcije med celicami in medceličnino, manjkata pa tudi živčni in endokrini sistem. Kulture so genetsko slabše stabilne, pogosto pride tudi do dediferenciacije (29).

1.7.1.1 GOJENJE CELIČNIH KULTUR

Pri delu s celičnimi kulturami *in vitro* je najpomembnejše delo pod aseptičnimi pogoji, v sterilnih gojiščih in sterilnih posodah v sterilnih sobah ali v posebej ločenem laboratoriju s komoro s pretokom filtriranega zraka.

Humane celične kulture rastejo v inkubatorju pri 37°C, v atmosferi s 5% CO₂ in 100% relativno vlažnostjo. Gojimo jih lahko v suspenziji ali pritrjene na steklo z rahlo negativnim nabojem ali na plastiko s posebej obdelano površino (z visokoenergetskim ionizirajočim sevanjem), da se celice lažje pritrdijo. Celice gojimo v petrijevkah, ploščah z žepki ali stekleničkah z zamaški s filtri.

Celice rastejo v gojiščih z dodanimi sestavinami za rast. Zagotoviti moramo stalne ustrezne fizikalno-kemijske pogoje: pH (7,2 – 7,4), osmolalnost in viskoznost. Vsebovati morajo esencialne aminokisline, soli, vitamine ter kombinacije antibiotikov in antimikotikov za preprečevanje okužb. Za gojenje zahtevnejših celic so potrebni tudi dodatki neesencialnih aminokislin in metabolitov. Za ohranjanje ustreznega pH se uporabljajo različni pufri, dodajajo se tudi serum z rastnimi faktorji, minerali, lipidi, hormoni, proteini (albumini, globulini, proteazni inhibitor...) (29).

2. NAMEN DELA

V prvem delu naloge bomo z metodo emulgiranja taline lipidov v vodno fazo stabilizatorja oblikovali trdne lipidne ND z različnimi novimi stabilizatorji. Raziskovali bomo vpliv vrste in koncentracije stabilizatorjev na fizikalne parametre ND.

Izdelanim disperzijam SLN bomo ovrednotili fizikalne lastnosti. S fotonsko korelacijsko spektroskopijo bomo ocenili velikost delcev in širino velikostne porazdelitve, stabilnost disperzij pa bomo določili z meritvijo zeta potenciala z lasersko Dopplerjevo anemometrijo. Z merjenjem velikosti delcev, polidisperznega indeksa in zeta potenciala bomo tudi spremljali fizikalno stabilnost disperzij SLN v odvisnosti od časa in pogojev shranjevanja. Vodno fazo bomo iz disperzij odstranili z liofilizacijo. Z diferenčno dinamično kalorimetrijo bomo ugotavljali termično obnašanje ogrodnih lipidov, stabilizatorjev ter izdelanih liofiliziranih SLN.

Nanodelce, ki bodo izkazovali najboljše lastnosti bomo aplicirali na celično kulturo keratinocitov. Z MTS testom bomo ugotavljali vpliv SLN na metabolno aktivnost celic, medtem ko bomo vpliv na grobo morfologijo celic opazovali pod svetlobnim mikroskopom.

V diplomski nalogi bomo skušali ugotoviti:

- Ali vrsta stabilizatorja vpliva na lastnosti nastalih SLN – ali različni stabilizatorji sploh omogočajo nastanek nanodelcev ter s katerim izmed njih lahko izdelamo najmanjše delce z najbolj homogeno distribucijo velikosti in najugodnejšim zeta potencialom?
- Ali koncentracija stabilizatorja vpliva na lastnosti nastalih SLN?
- Kako se fizikalne lastnosti SLN z različnimi stabilizatorji spreminjajo skozi čas?
- Ali liofilizacija spremeni fizikalne lastnosti SLN?
- Kakšna je kristaliničnost izdelanih SLN?
- Kakšen je celični odziv ob prisotnosti različnih novih stabilizatorjev?
- Ali se ta odziv spremeni, če so stabilizatorji vgrajeni v SLN?

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

3.1.1 MATERIALI

Za izdelavo SLN potrebujemo lipid, ki tvori trdno jedro nanodelcev, fosfolipid kot emulgator in sterične stabilizatorje, ki pripomorejo k ohranjanju stabilnosti SLN.

LIPIDNE KOMPONENTE

Compritol® 888 ATO (Gattefosse, Weil a. R., Francija)

Je trdna voskasta snov v obliki finega belega praška. Kemijsko je to glicerilbehenat, sestavljen iz zmesi monogliceridov (12 – 18 %), digliceridov (52 – 54 %) in trigliceridov (28 – 32 %) behenojske (C₂₂) kisline. Zaradi prisotnih hidroksilnih skupin ima emulgirajoče lastnosti. FDA ga uvršča med GRAS (generally recognised as safe) substance. Primeren je tako za peroralno kot tudi parenteralno uporabo. Temperatura tališča: 65 – 77°C (30).

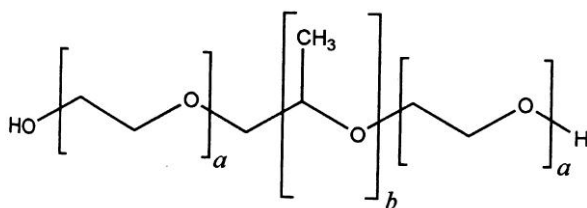
POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI

Phospholipon® 90H (Natterman, Köln, Nemčija)

Phospholipon® se pri izdelavi SLN pogosto uporabljajo kot elektrostatični stabilizatorji. Izhodna snov pri vseh je sojin lecitin, ki ga proizvajalec ustrezno predela. Da dobijo Phospholipon® 90H, morajo odstraniti fosfatidno kislino in fosfatidiletanolamin. Sestavljata ga torej le hidrogeniran fosfatidilholin (min. 90 %) in hidrogeniran izofosfatidilholin (max. 4 %). Od nasičenih maščobnih kislin vsebuje palmitinsko in stearinsko kislino (min. 98 %), od nenasičenih pa oleinsko, linolno in linolensko kislino (max. 2 %). Po izgledu je Phospholipon® 90H bel prašek (31). Je biokompatibilen in po nanosu na kožo ne deluje dražeče in ne povzroča senzibilizacije (30). Kot PAS ima pri izdelavi SLN vlogo emulgatorja, ki se razporedi na mejo med lipofilnim ogrodjem in hidrofilnim medijem. Dolge maščobne verige se usmerijo v lipofilno jedro, hidrofilni del pa je usmerjen navzven.

Lutrol F68 (poloksamer 188, BASF AG, Ludwigshafen, Nemčija)

Poloksamer 188 (Slika 6) je sintezni neionogeni blok kopolimer etilenoksida in propilenoksida. Je amfifilna molekula. Osrednji lipofilni del molekule (polioksipropilenska veriga) obdajata na vsaki strani po ena polioksietilenska veriga kot hidrofilna dela molekule. Razmerje med hidrofilnim in lipofilnim delom molekule je štiri proti ena. Je nizko toksičen in primeren za parenteralno aplikacijo. Iz organizma se izloča nespremenjen (30).



$$a = 80, b = 27$$

$$M_r = \text{od } 7680 \text{ do } 9510$$

Slika 6: Strukturna formula poloksamera 188.

Poloksameri stabilizirajo maščobne emulzije in ND s steričnim efektom. Z lipofilnim polipropilenoksidnim delom se adsorbirajo na hidrofobno površino delcev, hidrofilne polietilenoksidne verige pa štrlijo v vodni medij in sterično ovirajo približevanje delcev (32).

NOVE POVRŠINSKO AKTIVNE SPOJINE

Kot je bilo opisano že v uvodu, disperzije ND, stabilizirane samo s fosfolipidom, niso stabilne, saj molekule le-tega prepočasi prehajajo iz veziklov na novo nastale lipidne površine. Prav tako je bilo dokazano, da niso stabilne disperzije samih lipidnih ND brez emulgatorja (33). S sintezo novih spojin se skušamo izogniti pomanjkljivostim fosfolipidnih emulgatorjev in izdelati ND, ki so dalj časa stabilni in za organizem čim manj škodljivi. Na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani so sintetizirali 5 novih spojin (SPP), ki lahko pri izdelavi SLN nadomestijo fosfolipid (Slika 7).

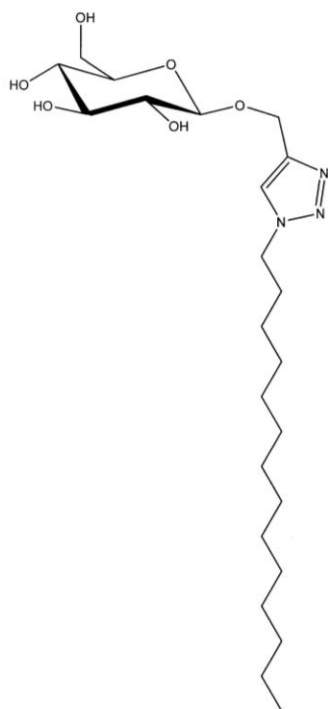
Vse so sestavljene iz polarnega (sladkornega) dela, ki štrli v vodni medij, in nepolarnega (lipidnega) dela, ki se zasidra v lipofilno jedro ND. Spojine se med seboj razlikujejo v eni sladkorni enoti: pri *glu-C14*, *glu-HOL* in *glu-C14-N* je kot sladkor prisotna glukoza, pri *lak-C14* in *lak-HOL* pa laktoza. S tem se poveča del molekule, ki štrli v vodni medij. Sladkor je na lipidni del pripet z β -O-glikozidno vezjo. Pri *glu-C14*, *lak-C14* in *glu-C14-N* je kot lipofilni del prisoten miristilni (C₁₄) alkohol, pri *glu-HOL* in *lak-HOL* pa holesterol. V obeh primerih je -OH skupina substituirana s 4-metil-1,2,3-triazolnim obročem in preko tega metilenskega mostu je pripet sladkor. *Glu-C14-N* ima -OH skupino glukoze na mestu 2 substituirano s primarnim aminom in ima za razliko od ostalih naboj. Glede na podatke iz literature bi zaradi tega morali biti SLN stabilizirani s tem stabilizatorjem manjši in bolj citotoksični (2, 34). Namen je ugotoviti ali te razlike v strukturah vplivajo na učinkovitost stabilizacije disperzije SLN ter na njihovo citotoksičnost.

OSTALI REAGENTI

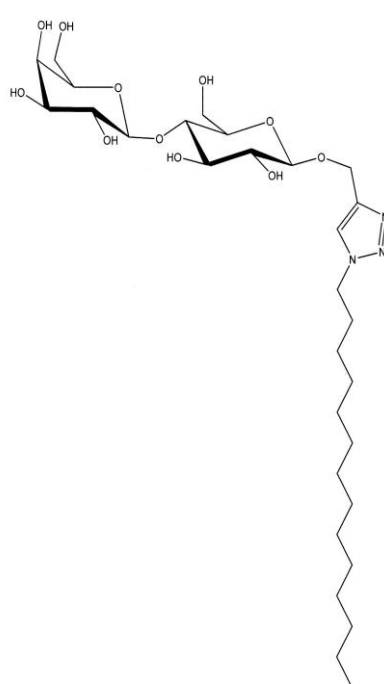
Prečiščena voda, pripravljena z reverzno osmozo na Fakulteti za farmacijo UL

Tekoči dušik, reagent za zamrzovanje disperzij SLN

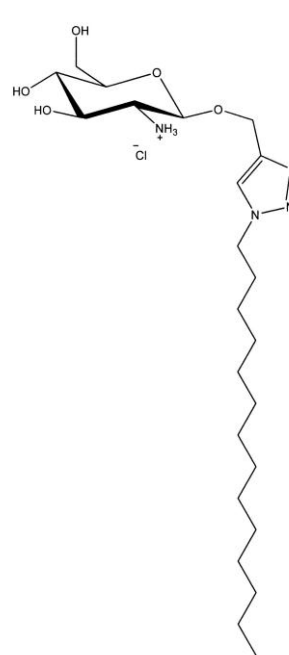
Trehaloza dihidrat (Quadrant Holdings, Nemčija), krioprotektant pri postopku liofilizacije

glu-C14

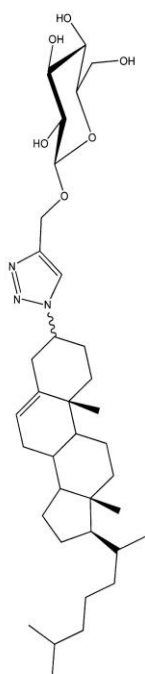
Kemijska formula: $C_{23}H_{43}N_3O_6$
 Molska masa: 457,60

lak-C14

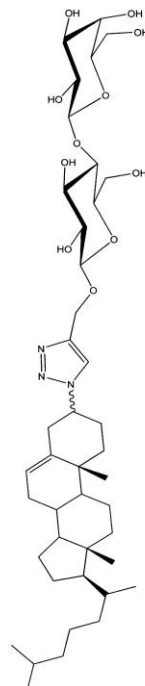
Kemijska formula: $C_{29}H_{53}N_3O_{11}$
 Molska masa: 619,74

glu-C14-N

Kemijska formula: $C_{23}H_{45}ClN_4O_5$
 Molska masa: 493,08

glu-HOL

Kemijska formula: $C_{36}H_{59}N_3O_6$
 Molska masa: 629,87

lak-HOL

Kemijska formula: $C_{42}H_{69}N_3O_{11}$
 Molska masa: 792,01

Slika7: Strukture molekul novih stabilizatorjev.

3.1.2 APARATURE

- tehtnica EB-1200 (Tehtnica, Slovenija)
- precizna tehtnica XS205, (Mettler Toledo, ZDA)
- tenziometer Krüss K12 (Krüss GmbH, Nemčija)
- rotor-stator homogenizator, Labtek homogenizer (Omni International, ZDA)
- Zetasizer 3000 in Zetasizer nano-ZS (Malvern Instruments, UK)
- liofilizator Beta 1-8K(Christ, Nemčija)
- ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra, Slovenija)
- magnetna mešalna plošča (IKA, Nemčija)
- magnetno mešalo in grelec (IKA, Nemčija)
- centrifugirka Centric 322A (Tehtnica, Slovenija)
- DSC 1 (Mettler Toledo, ZDA)
- hladilnik (Gorenje, Slovenija)

3.1.3 METODE

3.1.3.1 DOLOČANJE KRITIČNE MICELNE KONCENTRACIJE NOVIH POVRŠINSKO AKTIVNIH SNOVI

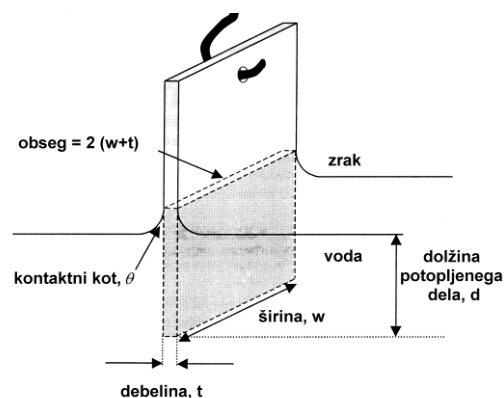
Za ugotavljanje KMK novih PAS smo le-tem morali izmeriti površinsko napetost pri različnih koncentracijah. V ta namen smo pripravili raztopine petih novih stabilizatorjev ter Phospholipona 90H v koncentracijah od 5×10^{-6} do 5×10^{-2} w/V%. Z Wilhelmyjevo metodo določanja površinske napetosti s ploščico smo nato izmerili površinske napetosti posameznih raztopin. Metoda, ki smo jo izvajali na tenziometru Krüss K12 (Krüss GmbH, Nemčija), temelji na merjenju sile pri vleki telesa (ploščice) iz tekočine. Za merjenje uporabimo navpično postavljeno pravokotno ploščico z znanimi dimenzijami (Slika 8). S torzijsko tehtnico izmerimo silo, ki je potrebna, da se ploščica odtrga od površine tekočine, ki ji določamo površinsko napetost. Površinsko napetost izračunamo kot kvocient te sile in obsega ploščice.

$$\gamma_l = \frac{F}{o}$$

γ_l – površinska napetost (mN/m)

F – izmerjena sila (mN)

o – obseg ploščice



Slika 8: Shema ploščice za merjenje površinske napetosti z Wilhelmyjevo metodo.

Vzorci smo termostatirali na 25°C in jim določili površinsko napetost po zgoraj opisanem postopku. Vsako meritev smo ponovili dvakrat, za nadaljnje izračune pa smo uporabili povprečno vrednost. Po vsaki meritvi smo ploščico sprali z bidestilirano vodo, prežarili nad plamenom gorilnika ter ohladili. Izmerjene vrednosti površinske napetosti smo uporabili za določitev KMK.



Slika 9: Tipičen graf odvisnosti površinske napetosti od logaritma koncentracije PAS.

Iz slike 9 lahko razberemo, da je graf površinske napetosti v odvisnosti od logaritma koncentracije PAS sestavljen iz treh delov:

1. Pri zelo nizkih koncentracijah PAS pride do skoraj nične spremembe površinske napetosti.
2. Dodatne molekule PAS znižujejo površinsko napetost.
3. Ko je površina nasičena s PAS, se površinska napetost ne spreminja več oz. pada z manjšim naklonom.

KMK smo določili kot presečišče premic 2. in 3. dela grafa, kot je prikazano na sliki 9.

3.1.3.2 IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z METODO EMULGIRANJA TALINE LIPIDOV V VODNO FAZO STABILIZATORJA

Na precizni tehtnici smo natehtali sestavine za disperzijo lipidnih ND. V epruveti smo združili Compritol in Phospholipon ali enega od SPP-jev, v 15 ml centrifugirki pa smo raztopili Lutrol v prečiščeni vodi. Na vodni kopeli (T okrog 90°C) smo stalili lipidne komponente in jim dodali na enako temperaturo segreto vodno fazo. Sledilo je homogeniziranje 15 minut pri 12000 obratih/min z rotor-stator homogenizatorjem (Labtek Homogenizer, Omni International). Zadnje tri minute pred koncem smo dodali še preostanek vodne faze, prekinili segrevanje in pri nespremenjenih vrtiljajih homogenizirali do konca. Disperzijo nastalih SLNjev smo za 3 – 5 minut postavili v zamrzovalnik. Med ohlajanjem so se lipidne kapljice strdile in nastali so trdni lipidni nanodelci.

Nanodelci, ki smo jih izdelali, se med seboj razlikujejo po vrsti in koncentraciji uporabljenih površinsko aktivnih snovi. S povečevanjem količine Phospholipona (Ph) ali SPP-ja smo zmanjševali količino lipida. Celotna masa ND je ostala konstantna. Recepture so prikazane v tabeli 1. Vsako recepturo smo izdelali v dveh paralelkah.

Označevanje sestave SLN v nadaljevanju se nanaša na vsebnost Compritola. Tako je v *SLN(SPP)28* najmanjša koncentracija novega stabilizatorja, v *SLN(SPP)20* pa največja.

Tabela 1: Različne sestave SLN.

Sestava	SLN(Ph)			SLN(SPP)		
Compritol (lipid) [mg]	28	24	20	28	24	20
Lutrol (stabilizator) [mg]	8	8	8	8	8	8
Phospholipon 90H [mg]	4	8	12			
SPP [mg]				4	8	12
Voda [mg]	10	10	10	10	10	10

3.1.3.3. LIOFILIZACIJA DISPERZIJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Liofilizacijo smo izvedli na liofilizatorju Beta 1-8 K (Christ, Nemčija). Najprej smo združili paralelke SLN posameznih sestav. Disperziji SLN smo dodali krioprotektant trehalozo dihidrat v količini, ki je ustrezala razmerju SLN:trehaloza 1:4 (m/m %). Tako pripravljeno disperzijo smo prenesli v 100 ml bučko in jo zamrznili v tekočem dušiku ($T = -70^{\circ}\text{C}$). Proces liofilizacije je obsegal 18 urno fazo sekundarnega sušenja pri sobni temperaturi in tlaku 170 mbar.

3.1.3.4 REDISPERGIRANJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

V 15 ml centrifugirko smo natehtali 2 mg liofiliziranih ND ter dodali 5 ml prečiščene vode. Pri redispergiranju smo si pomagali z ultrazvočno kadičko. Čas redispergiranja v njej smo spreminjali tako, da se je velikost delcev čim bolj približala vrednosti velikosti ob izdelavi SLN.

3.1.4 VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

3.1.4.1 MERJENJE VELIKOSTI, POLIDISPERZNEGA INDEKSA IN ZETA POTENCIALA IZDELANIH TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Velikost in polidisperzni indeks SLN v disperzijah smo ocenjevali z metodo fotonske korelacijske spektroskopije (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Velika Britanija). Vzorec disperzije smo ustrezno redčili (1:1) s prečiščeno vodo, nato pa 1 ml razredčene disperzije SLN odpipetirali v plastično kiveto za merjenje velikosti. Le-to smo vstavili v aparaturu in izvedli tri meritve za vsak vzorec.

Pogoji merjenja so bili naslednji:

temperatura: 25°C

kot merjenja: 173°

število ponovitev: 3

viskoznost disperznega medija (voda): 0,890 cP

valovna dolžina laserske svetlobe (He-Ne laser): 633 nm

lomni količnik medija: 1.330

Zeta potencial smo prav tako določili na napravi Zetasizer nano-ZS, Malvern Instruments, Velika Britanija. Uporabili smo metodo laser-Dopplerjeve anemometrije. Vzorec, ki smo ga uporabili za merjenje velikosti delcev smo še dodatno razredčili s prečiščeno vodo (1:2) in ga s pomočjo injekcijske brizge vbrizgali v posebno kiveto za merjenje zeta potenciala. Bili smo pozorni na morebitne ujete mehurčke, saj le-ti vplivajo na meritev. Kiveto smo vstavili v merilno celico in naredili za vsak vzorec 3 meritve.

Pogoji meritev:

temperatura: 25°C

kot merjenja: 173°

število ponovitev: 3

viskoznost disperznega medija (voda): 0,890 cP

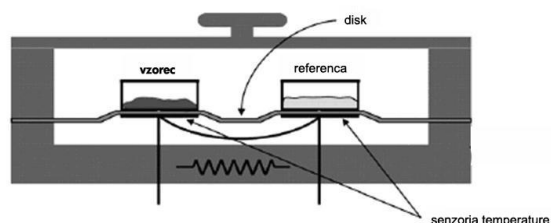
dielektrična konstanta disperznega medija: 79,0

3.1.4.2 SPREMLJANJE FIZIKALNE STABILNOSTI DISPERZIJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Fizikalno stabilnost disperzij SLN smo določevali tako, da smo na zgoraj opisan način določevali velikost, PI in ZP disperzijam SLN, shranjenim na sobni temperaturi in v hladilniku. V prvem tednu smo parametre stabilnosti izmerili trikrat, do konca prvega meseca enkrat tedensko, nato pa v povprečju vsakih 10 dni. Končno meritev smo izvedli v povprečju po dveh in pol mesecih.

3.1.4.3 TERMIČNA ANALIZA VHODNIH SUROVIN IN IZDELANIH TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Z diferenčno dinamično kalorimetrijo smo opazovali odziv izhodnih spojin in posameznih SLN na zunanji toplotni tok. V 40 μ l aluminijaste lončke smo natehtali 1-5 mg izhodnih spojin in liofiliziranih SLNjev. Uporabili smo *SLN(SPP)28*, ker so ti izkazovali najboljše lastnosti. V drugo celico aparature (DSC1, Mettler Toledo, ZDA) smo vstavili prazen aluminijasti lonček, ki je služil kot referenca (Slika 10). Lončke smo segrevali dvakrat od 0 do 270°C s hitrostjo 10 K/min ob hitrosti prepihanja z dušikom 15 ml/min. Merili smo razliko v toplotnem toku, ki smo ga morali dovesti, da sta oba lončka dosegla isto temperaturo. Toplota, ki jo dovaja grelec, je sorazmerna dovedenemu električnemu delu. Rezultat merjenja je krivulja odvisnosti toplotnega toka od temperature ali časa.



Slika 10: Shema grelcev diferenčnega dinamičnega kalorimetra (35).

3.2 VPLIV TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV NA CELICE

3.2.1 MATERIALI

CELIČNA KULTURA: človeški keratinociti NCTC2544, ICLC (Univerza v Genovi, Italija)

CELIČNI MEDIJ: Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco[®], Invitrogen, ZDA) z dodatki:

- 10% c(v/v) fetalni goveji serum (Gibco[®], Invitrogen, ZDA)
- 1% (v/v) neesencialne aminokisline (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- 2 nML-glutamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- 100 U/ml antibiotik/antimikotik (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)

PUFER: fosfatni pufer, pH 7,4 (PBS), pripravljen z raztapljanjem 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na₂HPO₄·12H₂O in 0,24 g KH₂PO₄ v 800 ml destilirane vode, uravnavanjem pH na 7,4 s HCl in dopolnitvijo do 1 l z destilirano vodo. Pred uporabo razdeljen na alikvote in steriliziran.

Sterilna voda: bidestilirana voda, sterilizirana z avtoklaviranjem po postopku za sterilizacijo vsebine (121°C, 20 min)

Barvilo tripan modro

0,25% Trypsin x EDTA (Promega Corporation, Madison, WI, ZDA)

Sredstvo za dezinfekcijo: etanol 70%

3.2.2 APARATURE

- aseptična komora z laminarnim pretokom zraka (Iskra Pio, Slovenija)
- svetlobni mikroskop CKX41 (Olympus, Japonska)
- fotoaparatus Olympus C-7070 (Olympus, Japonska)
- čitalec mikrotitrne plošče Safire 2TM (Tecan, Mannedorf/Zürich, Švica)
- centrifugirka Centric 322A (Tehtnica, Slovenija)
- Neubauerjeva komora (BRAND, Nemčija)
- inkubator za celične kulture (Sanyo, Japonska)
- vodna kopel (Mettler, ZDA)

- avtomatske pipete (BIOHIT za 2-20, 10-100 in 100-1000 μ l, Headquarters Biohit OYJ, Helsinki, Finska)
- beli, rumeni in modri nastavki za pipete (SarStedt, Aktiengesellschaft & Co., Nemčija)
- mikrotitrne ploščice s 96-imi vdolbinicami (TPP[®] Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)

3.2.3 METODE

3.2.3.1 GOJENJE IN PRIPRAVA KERATINOCITOV

Keratinociti NCTC2544 so pritrjene celice, ki smo jih gojili v plastičnih steklenicah za gojenje celičnih kultur (površina 75 cm²) v MEM mediju z dodatki 10% (v/v) fetalnega govejega seruma, 1% (v/v) neesencialnih aminokislin, 2mM L-glutamina in 100 U/ml antibiotika/antimikotika. Hranili smo jih v inkubatorju pri 37°C v navlaženem zraku s 5% CO₂.

Ko so celice dosegle 70% konfluentnost, kar smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom, smo jih presadili v nove posode s svežim medijem. Iz posode smo najprej odlili medij. Ker so bile celice pritrjene na površino posode, so ostale v njej. Celice smo nato sprali z dvakrat po 3 ml PBSa in ga odlili. Dodali smo 1,0 ml tripsina, ki je prekinil medcelične stike, in pustili nekaj minut. Pod mikroskopom smo spremljali odlepljanje celic od podlage. Po končanem odlepljanju smo dodali 4 ml medija, ki je prekinil delovanje tripsina. Spirali smo po celotni rastni površini. Odlepljene celice smo nato odpipetirali v 15 ml centrifugirko in jih centrifugirali 5 min pri 1200 vrtljajih/minuto. Supernatant smo zavrgli, celice pa dispergirali v mediju. Dispergirane celice smo nato nasadili v nove steklenice za gojenje celic. Gojili smo jih po enakem postopku kot celice v prvi steklenici.

Preden smo celice uporabili v eksperimentalne namene, smo jih morali še prešteti, da smo jih lahko potem v ustrezni koncentraciji nasadili v primerne rastne pogoje. Število celic smo ugotavljali s pomočjo barvila tripan modro, ki selektivno obarva mrtve celice, medtem ko žive ostanejo neobarvane. Ko smo celice tripsinizirali in prenesli v centrifugirko, smo odvzeli 10 μ l disperzije celic in jih zmešali z 10 μ l barvila. 10 μ l tako pripravljene disperzije celic in

barvila smo nato nanесли na očiščeno Neubauerjevo komoro in s pomočjo svetlobnega mikroskopa določili število živih in mrtvih celic. V zdravi celični liniji, na kateri lahko izvedemo poskuse, mora biti živih vsaj 90% celic.

Dimenzije Neubauerjeve komore = $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,1\text{mm} = 0,1\text{mm}^3 = 0,0001\text{ml} = 10^{-4}\text{ml}$

$$\text{Število celic/ml} = \frac{\text{število vseh prešteti celic}}{\text{število kvadratkov na mreži}} \times \text{dilucijski faktor} \times 10^4$$

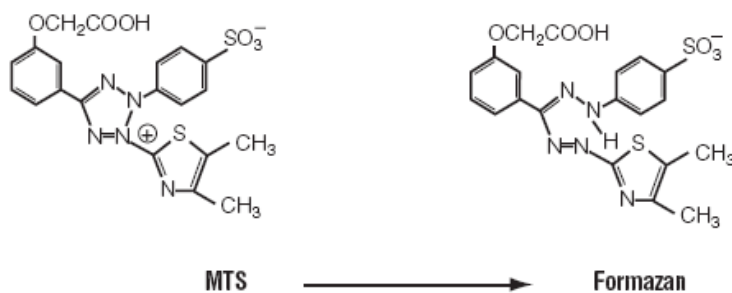
Prešteli smo žive in mrtve celice na mreži Neubauerjeve komore in določili število celic v disperziji. Le-to smo potem ustrezno redčili do koncentracije, ki je omogočala izvedbo eksperimentov ter jih nasadili v žepke mikrotitrne ploščice s 96-imi vdolbinicami. Pred inkubacijo celic z ND smo počakali 24 ur, da so si celice po tripsinizaciji opomogle, oblikovale izrastke in se oprijele podlage.

3.2.3.2 DOLOČANJE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC

Metabolno aktivnost celic smo ugotavljali z MTS testom. To je kolorimetrična metoda, osnovana na aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze kot indikatorju proliferajočih celic.

Raztopina MTS reagenta vsebuje:

- [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol
- elektrone povezujoči reagent fenazin etosulfat (PES), ki izboljšuje kemijsko stabilnost reagenta v raztopini.



Slika 11: Formuli MTS reagenta in formazana.

Žive celice reducirajo MTS tetrazolijev kompleks v rdeče obarvan produkt, topen v celičnem mediju (Slika 11). Pretvorbo omogočajo NADPH ali NADH dehidrogenazni encimi v metabolno aktivnih celicah. Pri testu dodamo majhno količino reagenta v celično kulturo, celice z reagentom nato inkubiramo 1 – 4 ure, nakar izmerimo absorbanco pri 490 nm. Le-ta je direktno proporcionalna številu živih celic v mediju oz. njihovi aktivnosti.

Za začetek dela smo pripravili disperzijo celic v koncentraciji 10^5 celic/ml. V mikrotitrsko ploščo s 96-imi vdolbinicami smo v 30 vdolbinic odpipetirali 100 μ l disperzije celic (Slika 12, rumena polja). Na ta način je bilo v vsaki vdolbinici 10^4 celic. V preostalih 30 vdolbinic (Slika 12, modra polja) pa smo odpipetirali 100 μ l medija.

Tako pripravljene celice smo nato inkubirali 24 ur, da so si opomogle po tripsinizaciji in se pritrdile na površino. Nato smo v vseh 60 vdolbinic dodali 10 μ l vzorcev, kot je prikazano na sliki 12.

	Kon	10 SLN	100 SLN	10 st	100 st	Kon	10 SLN	100 SLN	10 st	100 st	
	Kon	10 SLN	100 SLN	10 st	100 st	Kon	10 SLN	100 SLN	10 st	100 st	
	Kon	10 SLN	100 SLN	10 st	100 st	Kon	10 SLN	100 SLN	10 st	100 st	
	Polox	50 SLN	250 SLN	50 st	250 st	Polox	50 SLN	250 SLN	50 st	250 st	
	Polox	50 SLN	250 SLN	50 st	250 st	Polox	50 SLN	250 SLN	50 st	250 st	
	Polox	50 SLN	250 SLN	50 st	250 st	Polox	50 SLN	250 SLN	50 st	250 st	

Slika 12: Skica mikrotitrské plošče za izvedbo MTS testa.

- Kon = 10 μ l medija
- Polox = 10 μ l Lutrola, ki ustreza količini, dani za 250 SLN
- 10 SLN = 10 μ l SLN tako, da bo v 110 μ l koncentracija SLN 10 μ g/ml
- 50 SLN = 10 μ l SLN tako, da bo v 110 μ l koncentracija SLN 50 μ g/ml
- 100 SLN = 10 μ l SLN tako, da bo v 110 μ l koncentracija SLN 100 μ g/ml
- 250 SLN = 10 μ l SLN tako, da bo v 110 μ l koncentracija SLN 250 μ g/ml
- 10 st = 10 μ l stabilizatorja tako, da bo v 110 μ l koncentracija kot pri 10 SLN
- 50 st = 10 μ l stabilizatorja tako, da bo v 110 μ l koncentracija kot pri 50 SLN
- 250 st = 10 μ l stabilizatorja tako, da bo v 110 μ l koncentracija kot pri 250 SLN

Glede na navedene pogoje smo pripravili ustrezne vzorce. Vrednosti veljajo za vse izdelane SLN.

Po 24 urah inkubacije celic z ND (37°C, 5% CO₂) smo celični kulturi dodali 10 µl MTS reagenta. Po treh urah smo izmerili absorbanco v žepkih mikrotitrski plošče pri 492 nm. Iz rezultatov meritev smo izračunali procent vitalnosti celic.

$$\text{Vitalnost celic} = \frac{(A_s - A_{s_0})}{(A_c - A_{c_0})} \times 100\%$$

A_s – absorbanca tretiranih celic

A_c – absorbanca netretiranih celic (Kon, rumena)

A_{s_0} – absorbanca testnih raztopin SLN brez celic

A_{c_0} – absorbanca medija brez celic (Kon, modra)

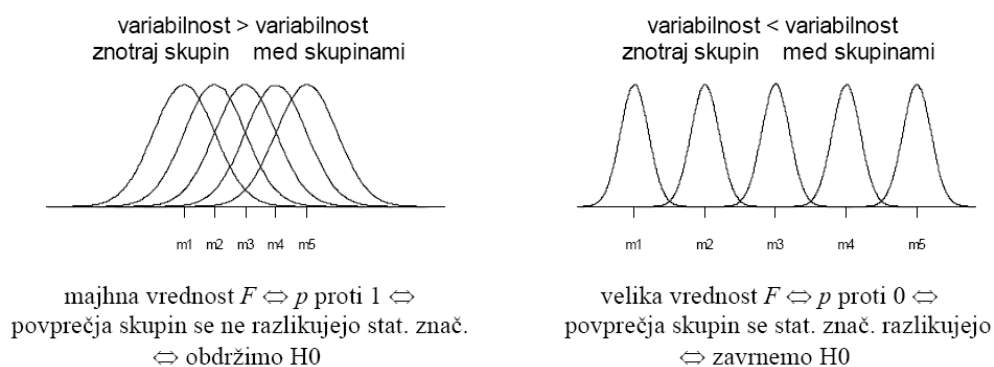
3.2.3.3 RAST IN MORFOLOGIJA TRETIRANIH CELIC

Ker se vpliv posameznih vzorcev velikokrat opazi tudi na makroskopskem nivoju, smo celice, tretirane po zgoraj opisanem postopku, pred dodatkom MTS reagenta opazovali še pod svetlobnim mikroskopom. Mikrotitrsko ploščo smo postavili pod objektiv mikroskopa in s fotoaparatom, pritrjenim na mikroskop, fotografirali posamezne vdolbinice plošče. S pomočjo slik smo skušali oceniti vpliv SLN, stabiliziranih z različnimi stabilizatorji, in vpliv samih stabilizatorjev na rast in grobo morfologijo celic.

3.3 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Ker smo med sabo primerjali več kot 2 vzorca, smo rezultate statistično ovrednotili z analizo variance (ANOVA), ki za razliko od t-testa primerja tudi povprečja treh ali več vzorcev. Uporaba več t-testov med posameznimi skupinami bi namreč povečala verjetnost za napako I.

tipa, torej zavrnitev pravilne ničelne hipoteze. Naše vzorce smo testirali ali med njimi obstaja statistično signifikantna razlika, torej ali je varianca med skupinami večja od variance znotraj skupin. Ničelno hipotezo (da med vzorci ni razlik) smo zavrgli, če je bil $p < 0,05$. Signifikantne razlike med posameznimi skupinami smo ovrednotili deskriptivno (36).



4. REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 FIZIKALNE LASTNOSTI IZDELANIH TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

S postopkom dispergiranja taline lipida z rotor-stator homogenizatorjem smo izdelali SLN z različnimi stabilizatorji v treh različnih koncentracijah. Za izdelavo SLN smo uporabili Compritol[®] 888 ATO, Lutrol[®] F68, prečiščeno vodo ter kot dodatni stabilizator še Phospholipon[®] 90H za izdelavo *SLN(Ph)* oziroma enega izmed petih novih stabilizatorjev (SPP) za izdelavo ostalih SLN.

Tabela 2: Fizikalne lastnosti SLN. Sestava se nanaša na vsebnost lipida v SLN.

Vrsta ND	Sestava	Velikost (nm)	±sd	PI	±sd	ZP (mV)	±sd
<i>SLN(Ph)</i>	28	164,4	1,3	0,256	0,018	-27,8	2,3
	24	167,7	1,8	0,379	0,019	-26,8	1,6
	20	184,1	4,4	0,352	0,473	-17,7	1,1
<i>SLN(glu-C14)</i>	28	114,3	1,5	0,496	0,027	-23,8	1,9
	24	336,7	15,8	0,842	0,171	-27,5	1,1
	20	521,0	33,9	1		-21,5	2,2
<i>SLN(lak-C14)</i>	28	82,6	3,9	0,535	0,050	-29,2	6,0
	24	69,4	1,6	0,469	0,041	-33,5	8,2
	20	174,9	40,3	0,934	0,065	-7,9	0,8
<i>SLN(glu-HOL)</i>	28	140,5	4,2	0,354	0,057	-23,7	1,4
	24	152,8	3,1	0,076	0,038	-22,3	3,0
	20	148,7	4,0	0,087	0,053	-19,0	0,7
<i>SLN(lak-HOL)</i>	28	163,3	2,5	0,083	0,058	-18,2	0,7
	24	152,9	1,8	0,190	0,030	-17,6	0,1
	20	152,9	3,3	0,256	0,080	-12,9	6,4
<i>SLN(glu-C14-N)</i>	28	257,8	18,5	0,569	0,034	33,1	9,2
	24	378,4	10,6	0,898	0,052	30,6	0,9
	20	353,1	17,5	0,892	0,086	35,9	35,9

Za izdelavo SLN smo uporabili pogoje izdelave ter sestavine v razmerju, ki so se že predhodno izkazali za ugodne (37). V literaturi zasledimo, da je za nastanek SLN potrebno minimalno 10% (w/w) lecitina v lipidnem matriksu (torej v zmesi Phospholipona oziroma SPPja in Compritola), z naraščanjem tega procenta do 30% pa velikost delcev pada (38). V

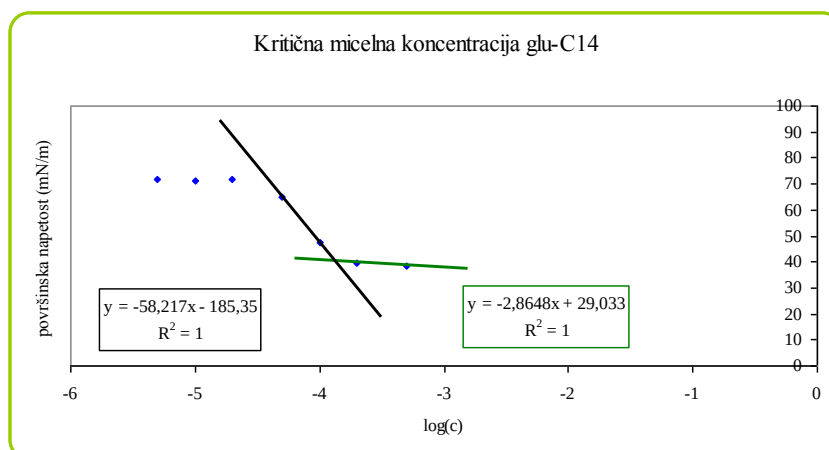
naših eksperimentih smo izdelali SLN z 12,5, 25 in 37,5% emulgatorja v lipidni zmesi. Optimalen delež poloksamera v zmesi sestavin bi naj bil okrog 17%, mi pa smo ga uporabili 20%. (V disperziji to pomeni, da smo dodali 8% neionogenega stabilizatorja, medtem ko ga je potrebnega vsaj 1%.) S tem nismo tvegali povečanja toksičnosti SLN, saj smo imeli podatek iz literature, da Lutrol nima negativnega vpliva na celično rast (16). Iz tabele 2 vidimo, da vsi SPPji omogočajo nastanek SLN.

4.1.1 KRITIČNA MICELNA KONCENTRACIJA NOVIH POVRŠINSKO AKTIVNIH SNOVI

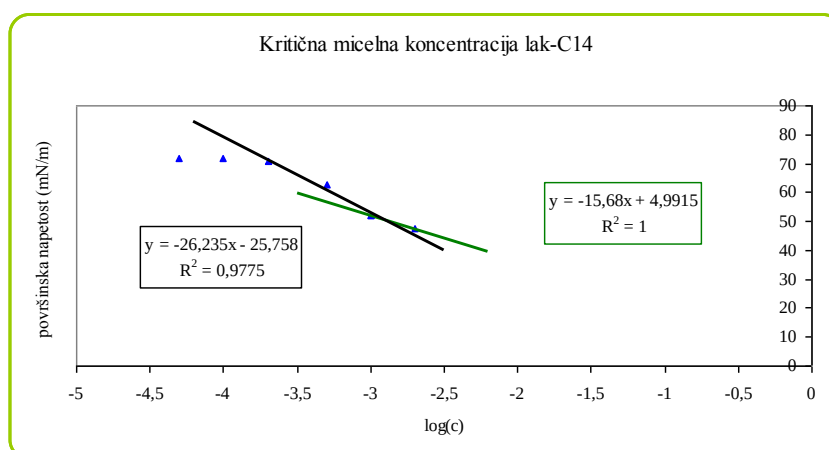
Pripravili smo vodne raztopine Phospholipona 90H in petih novih stabilizatorjev. Pripravljenim raztopinam smo izmerili površinsko napetost z Wilhelmyjevo metodo ter vrednosti vnesli v graf površinske napetosti v odvisnosti od logaritma koncentracije. Naš namen je bil določiti KMK preskušanih PAS in na ta način ovrednotiti njihovo potencialno učinkovitost. Vrednosti KMK nam namreč povejo kakšna količina PAS je potrebna za maksimalno znižanje površinske napetosti. Izraženo v % (w/V), nižja je KMK, manj PAS je potrebno za doseg želenega učinka stabilizatorja.

Avtorji raziskovalnega dela, na podlagi katerega so nastali novi stabilizatorji, pojasnjujejo, da je alkilna veriga *glu-C14*, *lak-C14* in *glu-C14-N* kemijsko podobna sestavinam SLN, poleg tega je fleksibilna in se prilagodi notranjosti ND. Upravičeno je pričakovati, da pripomore k pozitivnim lastnostim novih stabilizatorjev. Posledice različne molekulske geometrije so različne fizikalno-kemijske lastnosti, zato pričakujemo, da se bodo SPP s steroidnim lipofilnim delom obnašali drugače (39). Pomemben parameter je tudi molska masa in sposobnost znižanja medfazne napetosti (33). Nižja je le-ta, manjši delci lahko nastanejo.

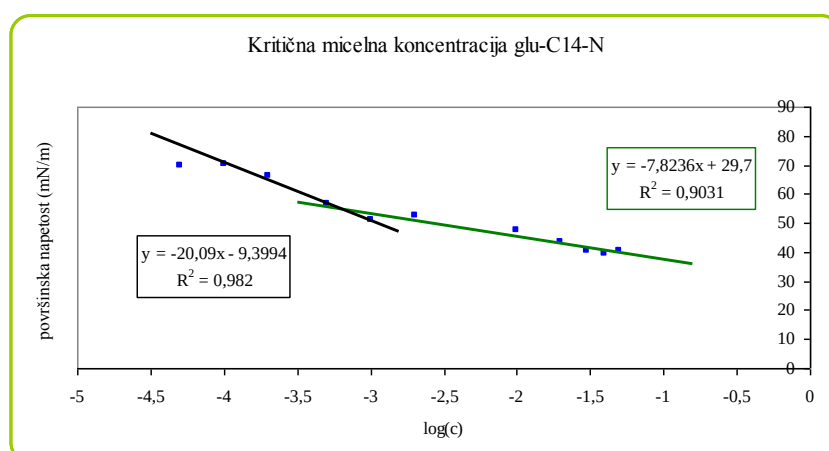
Grafi, ki smo jih dobili za stabilizatorje *glu-C14*, *lak-C14* in *glu-C14-N*, torej za SPP s C_{14} kot lipofilnim delom, so prikazani v nadaljevanju.



Graf 1: Odvisnost površinske napetosti raztopine glu-C14 od logaritma koncentracije. Presek linearnih premic označuje KMK.



Graf 2: Odvisnost površinske napetosti raztopine lak-C14 od logaritma koncentracije. Presek linearnih premic označuje KMK.



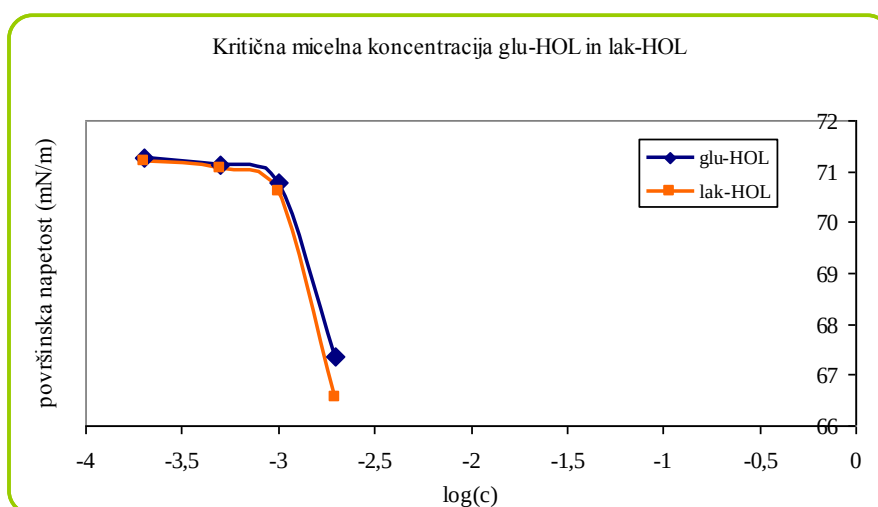
Graf 3: Odvisnost površinske napetosti raztopine glu-C14-N od logaritma koncentracije. Presek linearnih premic označuje KMK.

Z linearno regresijo posameznih delov grafa smo iz rezultatov dobili dve premici, katerih presečišče predstavlja KMK. Vrednosti le-te so zbrane v tabeli 3.

Tabela 3: Vrednosti KMK in minimalne površinske napetosti za SPP-C14.

PAS	log(KMK)	KMK (% w/V)	γ (mN/m)
<i>glu-C14</i>	-3,873	$1,340 \times 10^{-4}$	40,129
<i>lak-C14</i>	-2,913	$12,218 \times 10^{-4}$	50,671
<i>glu-C14-N</i>	-3,255	$5,559 \times 10^{-4}$	55,990

Na enak način smo poskušali določiti tudi KMK *glu-HOL*, *lak-HOL* in Phospholipona 90H, vendar je bila topnost teh treh spojin pri eksperimentalnih pogojih prenizka, da bi lahko določili koncentracijo presečišča. Pri Phospholiponu smo to pričakovali, saj vemo, da je KMK lecitina visoka (0,9g/100ml), kar je posledica dejstva, da lecitin v vodi ne tvori zlahka micelov, pač pa teži k tvorbi lamelarnih tekočih kristalov (40). Nizko topnost smo opazili tudi pri novih stabilizatorjih s holesterolno lipofilno komponento.

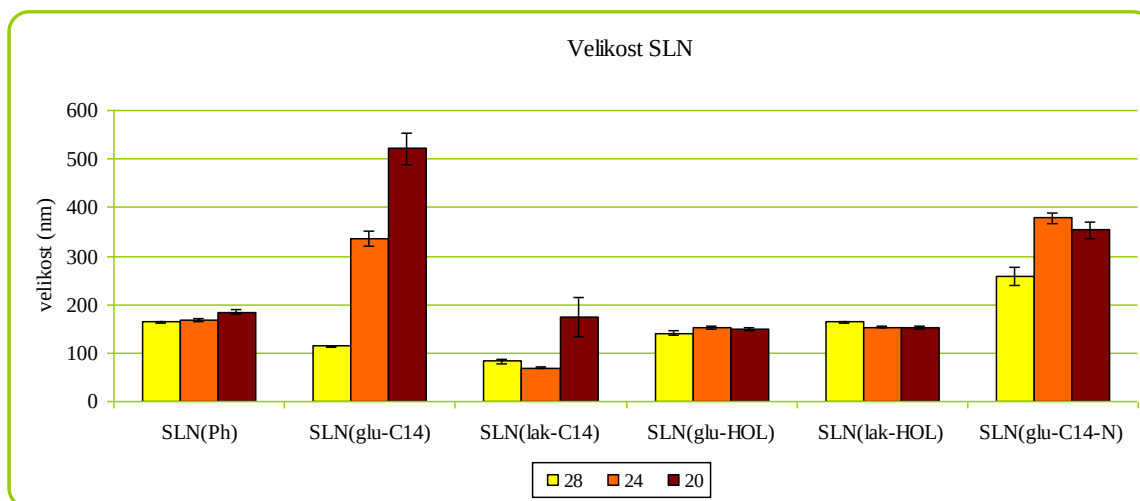


Graf 4: Odvisnost površinske napetosti vodnih raztopin *glu-HOL* in *lak-HOL* od logaritma koncentracije raztopin. Krivulja ne doseže območja z zmanjšanim naklonom, zato sklepamo, da je KMK pri višji koncentraciji kot se je dalo zaradi slabe topnosti izmeriti.

Skušali smo povezati pričakovano učinkovitost stabilizatorja, izraženo s KMK, in dejansko učinkovitost pri stabilizaciji SLN. Ugotovili smo, da med tema dvema v realnosti ni povezave, niti ko smo primerjali same vrednosti KMK niti glede na sposobnost znižanja površinske napetosti vode (Tabela 3). Povezave nismo opazili niti ob izdelavi SLN niti pri

stabilnosti ND. Prav tako v nobenem od teh pogledov ne izstopajo *SLN(Ph)*, *SLN(glu-HOL)* in *SLN(lak-HOL)*, ki so izkazovali KMK, višjo od ostalih SPP.

4.1.2 POVPREČNA VELIKOST TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV



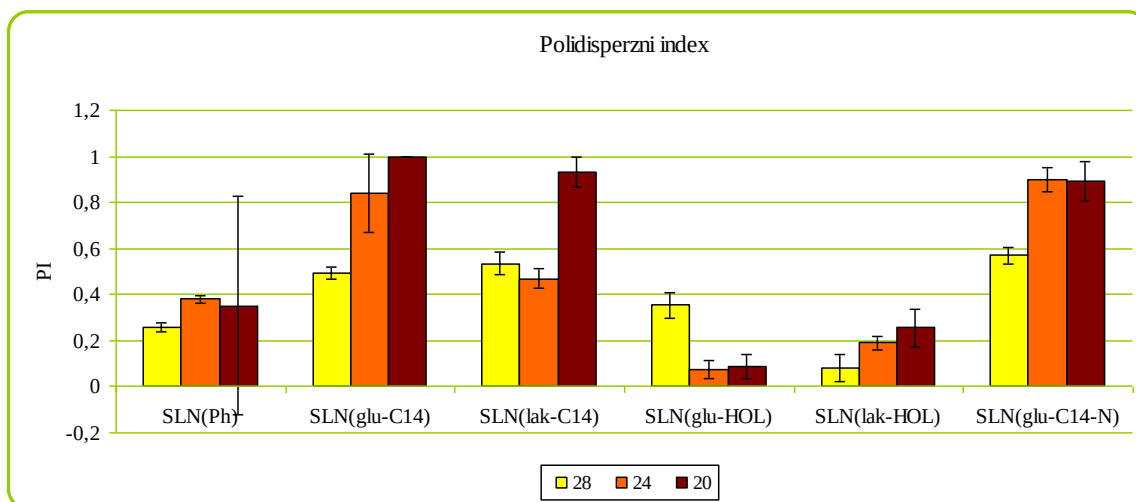
Graf 5: Velikost SLN, izdelanih z različnimi stabilizatorji. Rezultati predstavljajo povprečje treh paralelk s standardno deviacijo.

Velikost delcev lahko med drugim kontroliramo s spreminjanjem procesnih pogojev ter formulacije, na primer surfaktanta (8). Vse uporabljene kombinacije sestavin so omogočale nastanek SLN, je pa bila razlika v njihovi velikosti signifikantno različna ($p < 0,05$). Kot stabilizator se je najbolje izkazal *lak-C14*, z nekoliko večjim polarnim odsekom (disaharid) in dolgo gibljivo alkilno verigo. Z njim smo izdelali v povprečju najmanjše delce (*SLN(lak-C14)*). Statistično pomembno večja velikost SLN od ostalih pa je bila dobljena ob uporabi *glu-C14-N* (*SLN(glu-C14-N)*), kar je presenetljivo, saj smo na osnovi literaturnih podatkov pričakovali, da bodo ti SLN zaradi ionskega surfaktanta najmanjši (2).

Med formulacijami različnih koncentracij v splošnem ni signifikantne razlike, je pa povprečje velikosti najmanjše pri *SLN(28)*, t.j. kjer je prisoten največji delež lipida. To je v nasprotju s pričakovanim, saj običajno povečanje koncentracije lipida in znižanje koncentracije stabilizatorja vodi v povečanje velikosti delcev. Možna razlaga je, da je pri *SLN(20)* več stabilizatorja v obliki soobstoječih koloidnih struktur, ki so morda večje od samih ND. To pojasni tudi večji povprečni PI pri *SLN(20)*.

Obstajata dve razlagi zakaj en stabilizator omogoča manjše delce kot drugi. Ali ima ugodnejšo strukturo, ki omogoča nastanek kompleksnejšega stabilizacijskega ovoja, ali pa mu manjša molekulska masa omogoča, da se molekule hitreje porazdelijo na mejni površini med lipidno in vodno fazo (33). Testirani novi stabilizatorji imajo vsi podobno strukturo, razlikujejo se v vrsti sladkornega hidrofilnega dela (glukoza / laktoza) in naravi lipofilnega dela (mitristilna alkilna veriga / holesterol). Če primerjamo SLN(28), ki se je v večini primerov izkazala za najugodnejšo, opazimo, da so *SLN(glu-C14)* in *SLN(lak-C14)* v povprečju manjši kot *SLN(glu-HOL)* in *SLN(lak-HOL)*. Ugodnejši učinek *glu-C14* in *lak-C14* lahko za razliko od *glu-HOL* in *lak-HOL*, ki imata holesterolni lipofilni del, pripišemo dolgi alkilni verigi ali pa le nižji molski masi.

4.1.3 POLIDISPERZNI INDEKS



Graf 6: Polidisperzni indeks SLN, izdelanih z različnimi stabilizatorji. Nižji PI pomeni bolj homogeno porazdelitev velikosti. Rezultati predstavljajo povprečje treh paralelk s standardno deviacijo.

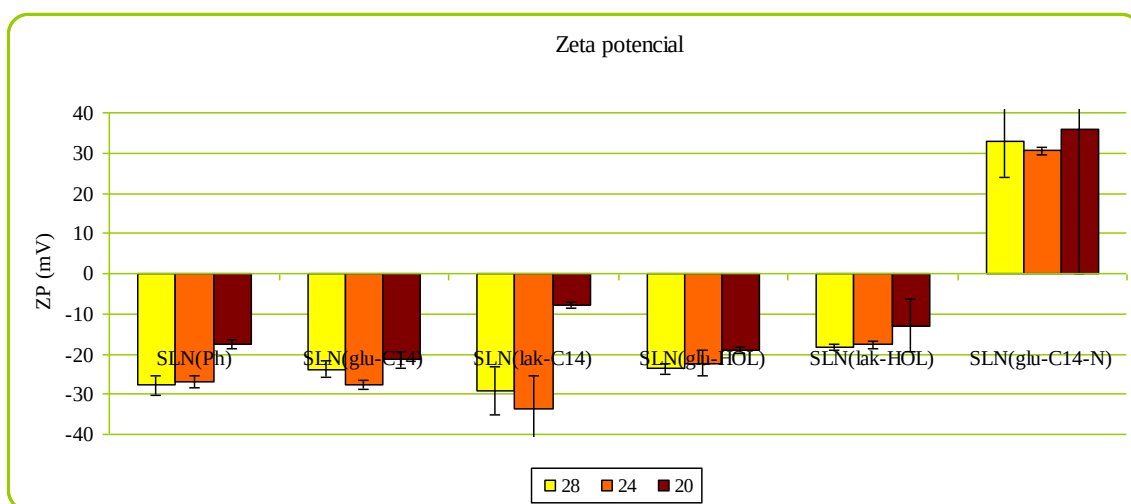
Tudi v primeru PI obstaja med posameznimi SLNji signifikantna razlika. PI *SLN(glu-HOL)* in *SLN(lak-HOL)* je bistveno nižji od ostalih, vendar je vzrok temu verjetno napaka pri meritvi. Po izdelavi teh ND so bili opazni beli kosmi, ki so se posedali, pipetirali pa smo nad njimi. Pri meritvah stabilnosti se pri pipetiranju nismo ozirali na to in PI je temu primerno večji. PI je pri večini vzorcev visok in kaže na heterogeno porazdelitev velikosti delcev. Vzrok temu so

verjetno soobstoječe koloidne vrste. Sklepamo namreč, da se več le-teh oblikuje z višanjem koncentracije stabilizatorjev in PI je dejansko naraščal od SLN(28) proti SLN(20).

4.1.4 ZETA POTENCIAL

V primeru ZP, gledano absolutno, med SLNji ni statistično pomembnih razlik. Najočitnejša razlika je v karakterju naboja. *Glu-C14-N* je kationski surfaktant in ZP *SLN(Glu-C14-N)* je posledično pozitiven. Povprečno gledano je ZP največji pri *SLN(Glu-C14-N)*, najmanjši pa pri *SLN(lak-HOL)*. Pričakujemo, da se bo to odražalo tudi na stabilnosti.

V literaturi je kot minimalni pogoj za ohranjanje stabilnosti naveden ZP med 8 in 9 mV v kombinaciji s steričnim stabilizatorjem (Lutrol) (4). Ta pogoj je izpolnjen pri vseh ND, razen pri *SLN(lak-C14)20*, kjer znaša ravno -7,9 mV. Po 3h urah smo pri tem vzorcu opazili geliranje, ki je ireverzibilen proces in vodi v izgubo koloidnih velikosti. V enem tednu je velikost teh ND zrasla na mikrometrsko območje, po 2 mesecih pa smo opazili močno sedimentacijo.

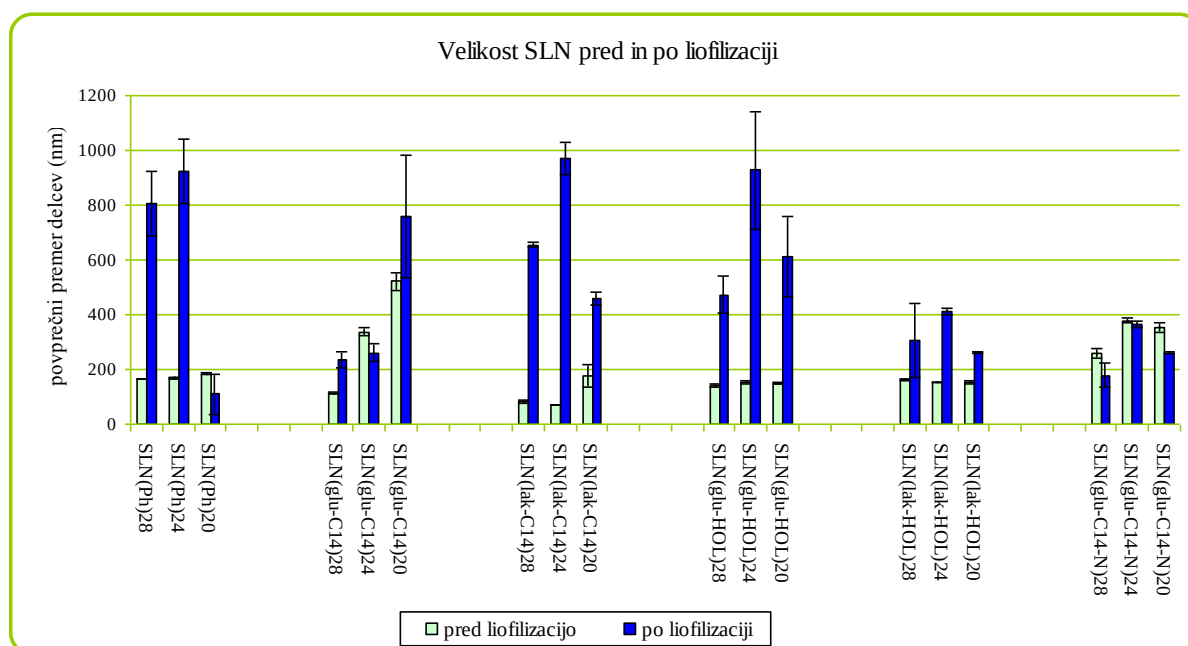


Graf 7: Zeta potencial SLN, izdelanih z različnimi stabilizatorji. Višja absolutna vrednost ZP pomeni boljšo stabilnost disperzije. Rezultati predstavljajo povprečje treh paralelk s standardno deviacijo.

4.2 VPLIV LIOFILIZACIJE NA VELIKOST TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

S postopkom liofilizacije smo disperzije SLN pretvorili v suho obliko. Biološki učinek delcev je odvisen od njihove velikosti, kar pomeni, da imajo lahko delci združeni v agregate drugačen učinek, kot če so prisotni posamično. Pred pričetkom liofilizacije smo zato vzorcem dodali krioprotektant (trehalozo), da bi čim bolj preprečili agregacijo delcev in dosegli lažje redispergiranje po liofilizaciji.

Suhe delce smo redispergirali v vodi s pomočjo soniciranja v ultrazvočni kadički. Primeren čas redispergiranja je težko določiti, saj se lahko s podaljševanjem le-tega sproži tudi dodatno agregiranje delcev. Da bi se čimbolj približali začetni velikosti ND, smo vzorce sonicirali po potrebi od 16 do 35 minut, vmes smo merili vmesne velikosti. Rezultati kažejo, da smo s pomočjo UZ kadičke razbili le največje agregate ND, saj je bila v več kot polovici primerov povprečna velikost delcev po liofilizaciji več kot dvakrat večja kot pred liofilizacijo. Tudi PI se je pri veliki večini vzorcev povečal, kar kaže na prisotnost agregatov različnih velikosti. So pa vsi delci tudi po liofilizaciji ostali v submikronskem območju in so tako še vedno primerni vsaj za dermalno uporabo.



Graf 8: Velikost SLN pred in po liofilizaciji. Rezultati predstavljajo povprečje treh paralel s standardno deviacijo.

Vzrok za povečanje delcev bi lahko bile močne hidrofozne povezave med površinami ND, ki niso popolnoma zaščitene s stabilizatorji. Med liofilizacijo se namreč zaradi odstranjevanja vode spremenijo lastnosti stabilizatorjevega ovoja, poveča pa se tudi koncentracija delcev, kar vodi v njihovo agregacijo. K temu pa bi lahko prispeval tudi poloksamer (Lutrol), ki lahko, podobno kot polimeri, prerazporedi svoje hidrofilne verige in poveže delce med sabo. V primeru *SLN(glu-C14-N)* smo, za razliko od ostalih, po liofilizaciji izmerili nekoliko manjše delce. K temu verjetno prispeva pozitiven naboj delcev, ki je prisoten edino v tem primeru.

4.3 TERMIČNA ANALIZA POSAMEZNIH KOMPONENT IN TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

S pomočjo diferenčne dinamične kalorimetrije lahko spremljamo obnašanje lipidnega ogrodja ND po izdelavi. Strukturne spremembe v snovi spremlja tok toplote v/iz vzorca. Med taljenjem vzorec toploto absorbira (endotermna reakcija), medtem ko jo med kristalizacijo sprošča (eksotermna reakcija). Analizirali smo tako posamezne sestavine ND kot tudi liofilizirane nanodelce *SLN(28)*, ki so po izdelavi med vsemi *SLN* izkazovali najboljše lastnosti. Opazovali smo vrhove krivulje, ki označujejo spremembo entalpije in območje temperature, v katerem je prišlo do spremembe. Metoda je uporabna za določanje interakcij med sestavinami, kristaliničnosti oziroma amorfnosti snovi, z njo pa lahko določimo tudi različne polimorfne oblike preiskovane snovi. Ta metoda sicer sama ne razkriva vzroka različnih termičnih dogodkov, lahko pa z njo razložimo in potrdimo številne rezultate, ki smo jih dobili z drugimi metodami.

4.3.1 TERMIČNA ANALIZA POSAMEZNIH KOMPONENT TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Spremljali smo termično obnašanje vseh komponent. Pri prvem segrevanju smo opazovali talilne vrhe spojin. Pri Compritolu smo opazili en sam oster signal, pri ostalih jih je bilo več. Pri Lutrolu smo opazili en glavni signal in enega manjšega, pri Phospholiponu in *glu-C14* enega glavnega in tri manjše, pri *lak-C14* enega glavnega in dva manjša ter pri *glu-HOL* in

glu-C14-N en glavni vrh in enega manjšega. Vzrok za to je najverjetneje obstoj različnih polimorfnih modifikacij snovi z več talilnimi signali. Po ohlajanju in pri 2. segrevanju dobimo Phospholipon v eni sami modifikaciji. Pri SPPjih, razen pri *glu-C14*, ne opazimo kristalizacijskih vrhov, pri drugem segrevanju pa manjše število talilnih vrhov kot pri prvem segrevanju. Pri *lak-HOL* ni bilo opaziti nobenega vrha niti pri prvem segrevanju, iz česar sklepamo na amorfnost stanja snovi.

4.3.2 TERMIČNA ANALIZA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

V literaturi so si avtorji enotni: endoterme SLN so v primerjavi s samim lipidom širše in pomaknjene proti nižjim temperaturam (9, 26, 36). Ta pojav razlagajo s spremembami v kristalni mreži. Glavna razloga za nižjo temperaturo tališča sta majhnost delcev, kar razlaga Gibbs-Thomsonova enačba (35), in interakcije s stabilizatorji (9, 26). Dolgoročne študije so pokazale, da se s časom vrh pomika nazaj proti višjim temperaturam. V tem času namreč pride do polimorfnih sprememb lipida in kristalna mreža se sčasoma popravi (20). Širši endotermni vrh razlagajo z dejstvom, da so disperzije SLN večinoma polidisperzne, frakcije različnih velikosti pa se talijo pri različnih temperaturah (35).

Naši rezultati se s temi podatki dobro ujemajo. Iz tabele 4 je razvidno, da se v vseh primerih razen pri *SLN(Ph)* vrh Compritola v nanodelcih pomakne k nižji temperaturi (za 1,5 – 5 °C), poveča pa se tudi širina vrha (za 2,5 – 5,5°C). Pri *SLN(Ph)* se vrh Compritola pomakne k višji temperaturi, za kar verjetno poskrbi amorfnost oblika Phospholipona. Tudi vrh Lutrola je v vseh primerih pomaknjen navzdol (za približno 5 – 7°C), širši pa je za 1,5 – 2°C. V splošnem znižanje tališča posamezne komponente v DSC krivulji nakazuje na interakcije med trdnimi snovmi. Večje kot je znižanje, večje so interakcije. Dejstvo, da se ND talijo pri nižji temperaturi kot sam lipid, moramo upoštevati pri izdelavi SLN s prirejenim sproščanjem, kjer želimo, da ND ohrani trdno stanje tudi po administraciji (26).

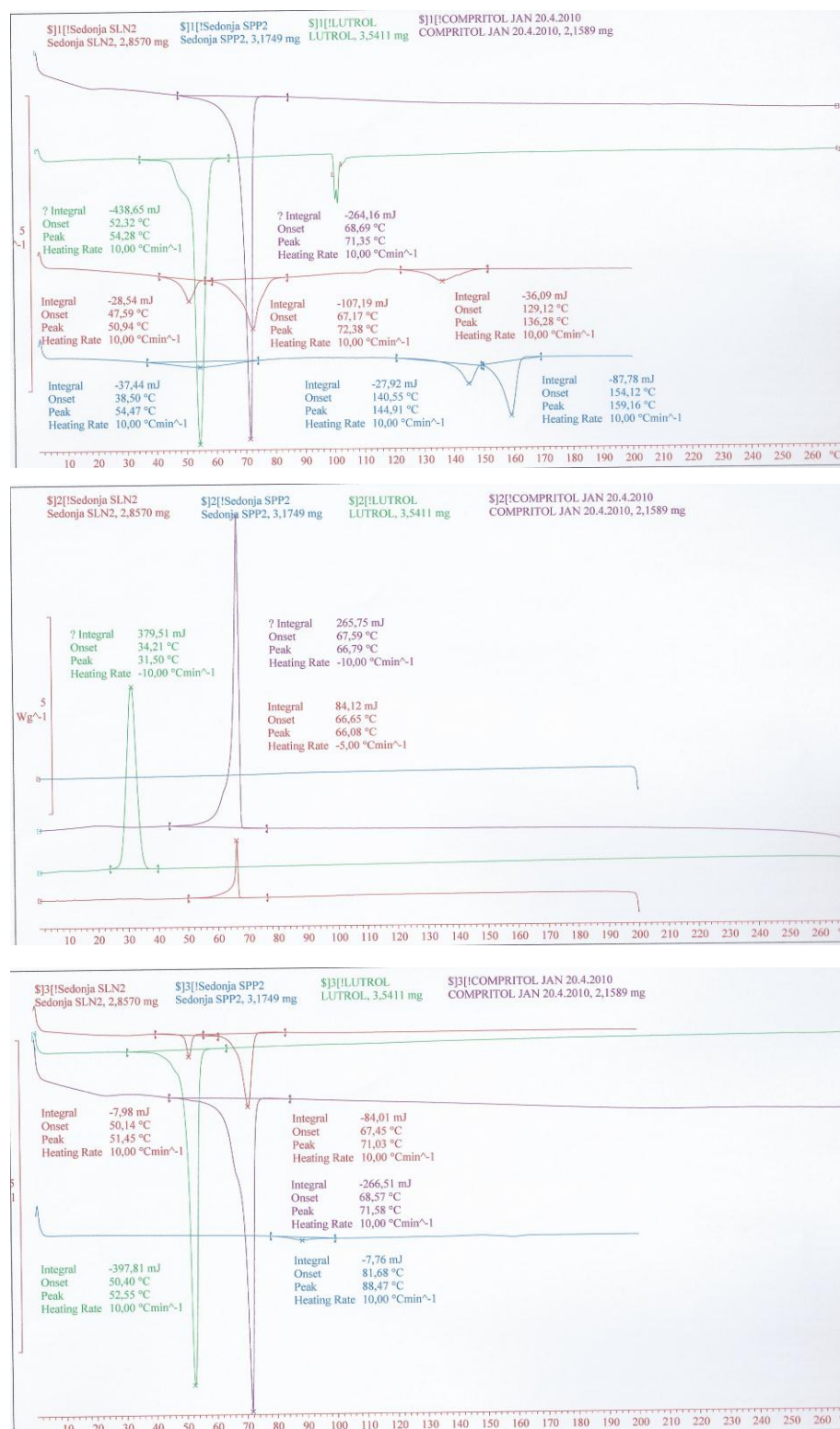
Talilni vrh Phospholipona v *SLN(Ph)* izgine. Sklepamo, da je med izdelavo SLN prešel v amorfnost oziroma da je nastala trdna raztopina (39). Enako se zgodi tudi z *glu-C14*. Pri *lak-C14* in *glu-HOL* je spet opazno znižanje temperature tališča, iz česar lahko sklepamo na

interakcije med stabilizatorjem in ostalimi komponentami ND. Te interakcije so nekoliko večje pri *lak-C14*, kar je morda povezano z nastankom najmanjših SLN.

Razlika med *SLN(Ph)* in SLN z novimi stabilizatorji je predvsem v številu modifikacij, v katerih kristalizirajo ND, pa tudi v vrednosti talilne entalpije. Taljenje manj urejenih kristalov ali amorfnih snovi zahteva manj energije kot taljenje popolnoma kristaliničnih substanc, kjer je potrebno premagati mrežno energijo. Zato višje vrednosti talilne entalpije nakazujejo na bolj urejeno mrežno strukturo (41). Nanodelci z novimi stabilizatorji v tem pogledu vsi zaostajajo za *SLN(Ph)*, temu se najbolj približajo *SLN(lak-C14)*, najnižjo talilno entalpijo pa opazimo pri *SLN(lak-HOL)* (Tabela 4). V splošnem je rekristalizacijski indeks SLN nižji od kristaliničnosti samega lipida, glede na podatke iz literature pa lahko pričakujemo povečanje kristaliničnosti s časom. Pri shranjevanju pri nižji temperaturi je dvig kristaliničnosti manjši, zato lahko sklepamo, da se pri teh pogojih dalj časa ohrani prvotna polimorfna oblika formulacije (6, 20).

Tabela 4: Primerjava temperatur tališč čistih komponent in komponent v SLN.

		Čista snov				SLN(Ph)	SLN(glu-C14)	SLN(lak-C14)	SLN(glu-HOL)	SLN(lak-HOL)	SLN(glu-C14-N)	
Compritol	Onset [°C]	68,70				71,67	63,44	67,17	65,67	65,42	64,93	
	Peak [°C]	71,35				76,40	71,53	72,38	70,90	71,41	71,34	
	Entalpija [J/g]	256,18				194,23	138,65	107,19	87,45	84,84	119,12	
Lutrol	Onset [°C]	52,32	99,83			47,61	Signal se ne pojavi	47,59	47,31	46,48	45,60	
	Peak [°C]	54,28	101,22			51,15		50,94	50,77	50,44	49,91	
	Entalpija [J/g]	432,26	32,18			81,68		28,54	36,62	31,53	32,90	
Phospholipon	Onset [°C]	67,12	114,21	175,08	230,48	Signal se ne pojavi						
	Peak [°C]	69,27	121,22	178,71	233,71							
	Entalpija [J/g]	5,49	204,01	15,41	4,13							
glu-C14	Onset [°C]	60,07	68,88	89,17	187,90	Signal se ne pojavi	Signal se ne pojavi					
	Peak [°C]	63,59	72,08	96,16	188,67							
	Entalpija [J/g]	7,63	11,46	342,54	15,38							
lak-C14	Onset [°C]	38,50	140,55	154,12				129,12				
	Peak [°C]	54,47	144,91	159,16				136,28				
	Entalpija [J/g]	37,44	27,92	87,78				36,09				
glu-HOL	Onset [°C]	39,59	175,51						169,48			
	Peak [°C]	57,97	178,97						178,33			
	Entalpija [J/g]	39,60	0,96						10,31			
lak-HOL	Onset [°C]	Signal se ne pojavi							Signal se ne pojavi			
	Peak [°C]											
	Entalpija [J/g]											
glu-C14-N	Onset [°C]	93,29	115,14									190,73
	Peak [°C]	98,79	125,22									196,46
	Entalpija [J/g]	1,18	128,45									14,01



Slika 13: Primer DSC krivulj za SLN(lak-C14) in pripadajoče komponente. Na vrhu: 1. segrevanje, v sredini: ohlajanje, spodaj: 2. segrevanje.

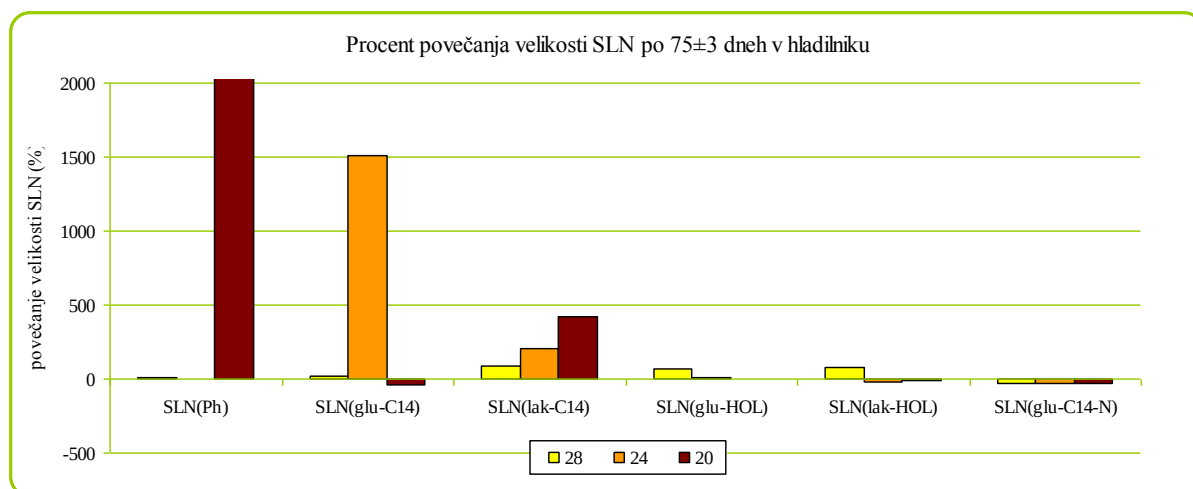
4.4 STABILNOST

SLN, izdelanim z različnimi stabilizatorji v različnih koncentracijah, smo vrednotili fizikalne lastnosti skozi 75 ± 3 dni. Shranjevali smo jih pri dveh različnih pogojih, pri sobni temperaturi in dnevni svetlobi, ter na temi v hladilniku. Viale, ki smo jih shranjevali v hladilniku, niso bile posebej svetlobno izolirane, tako da smo primarno preverjali razliko v shranjevanju pri dveh različnih temperaturah. Ob različnih časih smo ND izmerili velikost in PI, ZP pa smo izmerili takoj po izdelavi in ob končnem času meritev. Po tem času smo za vsako skupino SLN izračunali spremembo vrednosti teh količin.

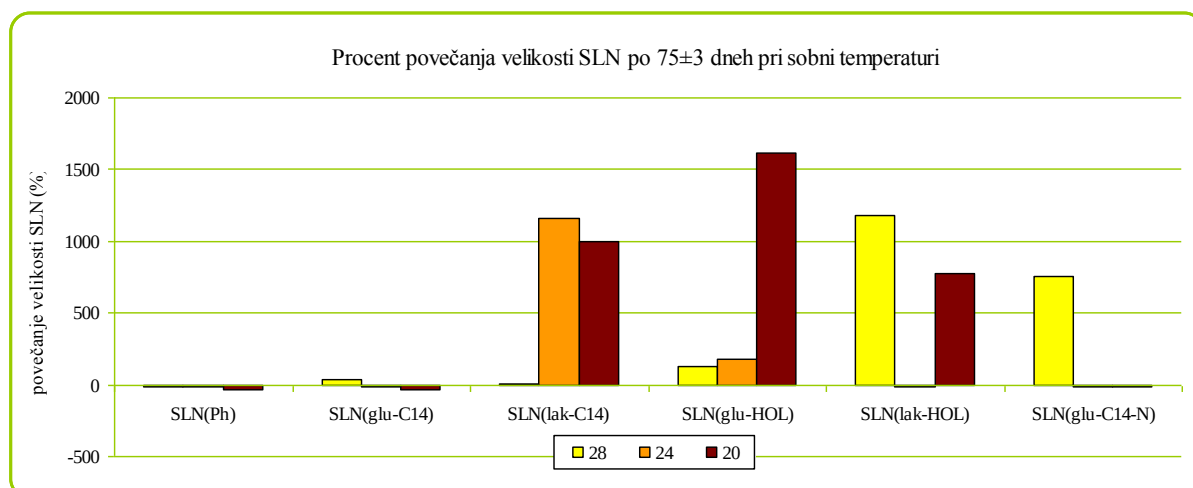
4.4.1 SPREMEMBE V VELIKOSTI

Iz Grafov 9 in 10 vidimo, da v splošnem pride do večjega povečanja delcev pri sobni temperaturi. V hladilniku sicer opazimo največje povečanje posamezne formulacije (*SLN(Ph)20*) iz 184,1 na 9494 nm), izstopa tudi *SLN(glu-C14)24*, ostali delci pa ostanejo v nanometerskem območju. Nekoliko bolj od ostalih se povečajo *SLN(lak-C14)*, ki so po izdelavi najmanjši, kar drugi avtorji pojasnjujejo z mehanizmom Ostwaldove rasti velikih delcev na račun malih. Pri SLN to pomeni, da se manjši kristali raztopijo, material pa se nalaga na večjih površinah (4).

Pri sobni temperaturi se poveča nekoliko več različnih formulacij, trenda rasti glede na vrsto ali koncentracijo stabilizatorja pa ne opazimo. Logično bi bilo izrazitejše povečanje delcev v formulaciji z manjšo koncentracijo stabilizatorja, vendar je očitno le-ta dovolj velika tudi v *SLN(28)*. Povečevanje velikosti formulacij z večjo koncentracijo stabilizatorja pa v literaturi pojasnjujejo s povečano mobilnostjo molekul emulgatorja (fosfolipid ali SPP) pri večjih koncentracijah. Dokler je emulgator vgrajen na površino SLN v monosloju, so delci stabilni. S povečevanjem koncentracije v disperziji nastanejo liposomi in dvoslojne strukture okoli ND. Ko zaradi Brownovega gibanja pride do kontakta delcev, lahko pričakujemo zlitje molekul emulgatorja in aglomeracijo delcev (38). Za potrditev te teorije bi bilo potrebno opraviti nadaljnje eksperimente z NMR ali elektronsko spinsko resonanco.



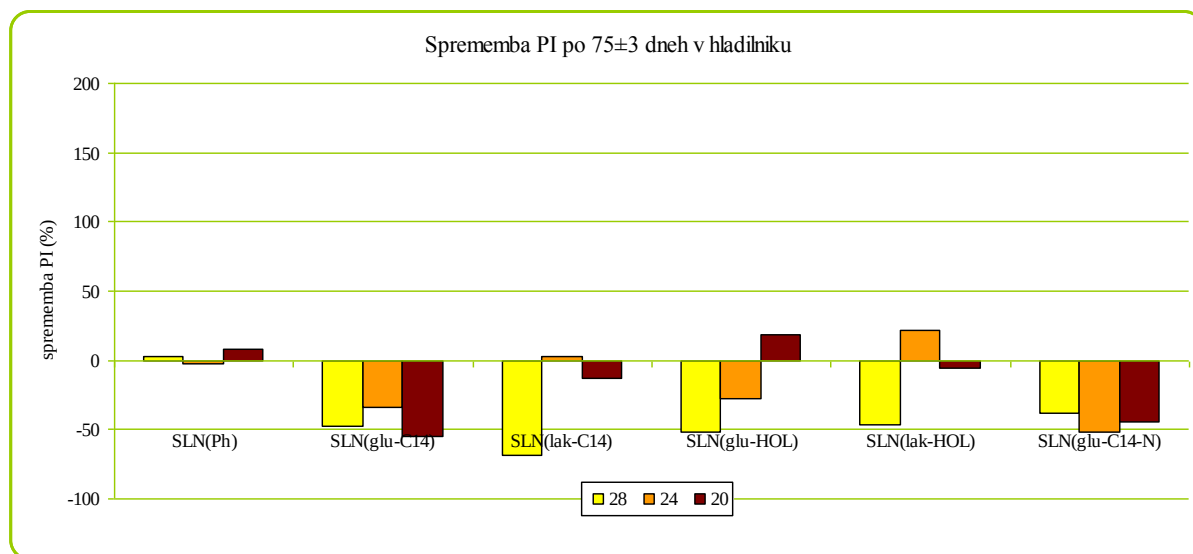
Graf 9: Relativno povečanje velikosti SLN po 75±3 dneh v hladilniku glede na začetno vrednost.



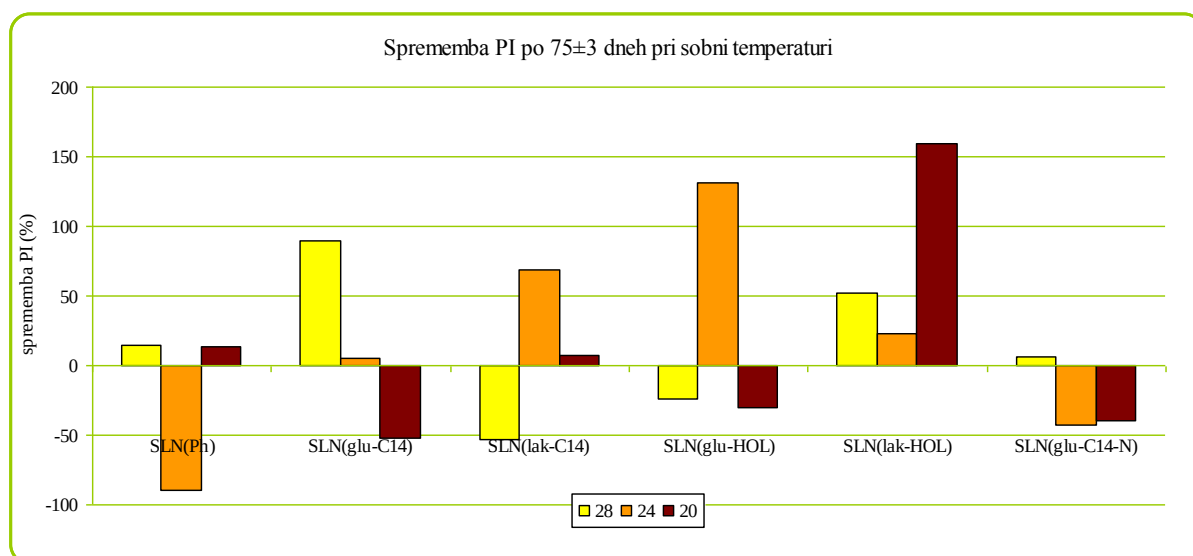
Graf 10: Relativno povečanje velikosti SLN po 75±3 dneh pri sobni temperaturi glede na začetno vrednost.

S to ponazoritvijo izgubimo informacijo o dogajanju ob posameznih časih med začetno in končno vrednostjo. ND v nekaterih kombinacijah sestavin izkazujejo nihanja v velikosti skozi čas. Vzrok temu so verjetno spremembe polimorfnih modifikacij skozi čas, radij se namreč lahko poveča tudi zaradi modifikacije iz okroglih ND v ploščate (42). Za potrditev tega bi morali stanje ND spremljati pod elektronskim mikroskopom. Vendar pa običajno ND z več nihanji izkazujejo tudi trend splošnega povečevanja delcev, ki je skladen s prikazanimi grafi.

4.4.2 SPREMEMBE V POLIDISPERZNEM INDEKSU



Graf 11: Relativna sprememba PI po 75±3 dne v hladilniku glede na začetno vrednost.

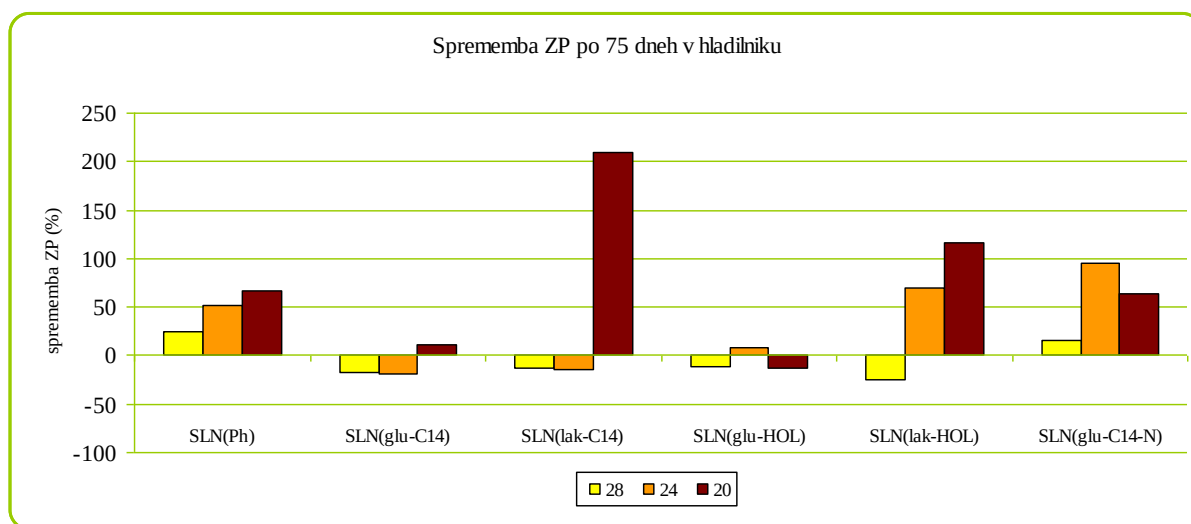


Graf 12: Relativna sprememba PI po 75±3 dne pri sobni temperaturi glede na začetno vrednost.

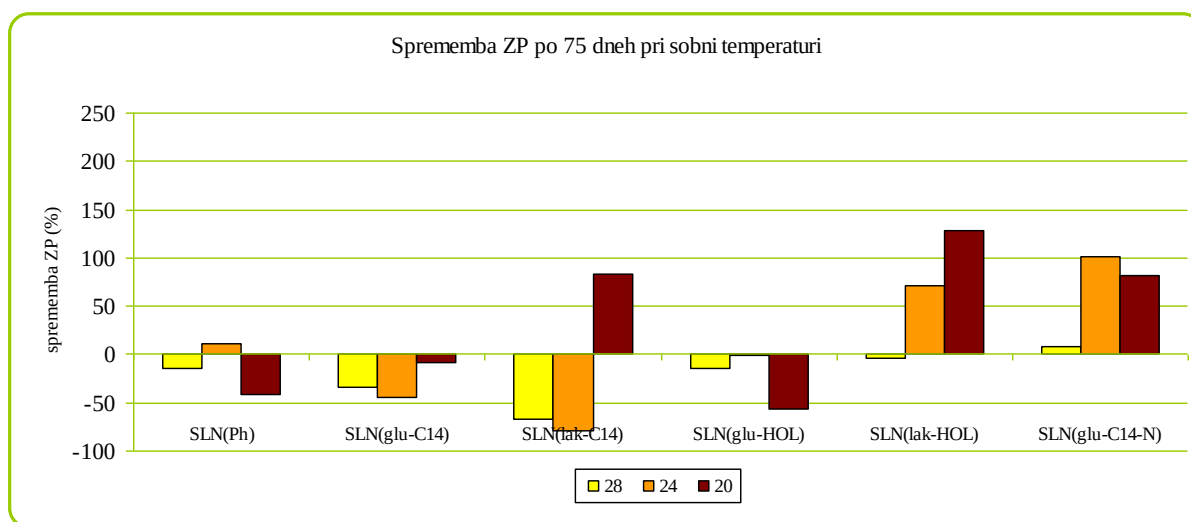
Kot je opazno iz grafov 11 in 12, je prišlo do večjih sprememb v PI pri sobni temperaturi, čeprav statistično pomembnih razlik ni opaziti. V hladilniku se je PI v večini primerov zmanjšal, kar pomeni da so po 75±3 distribucije velikosti SLN bolj homogene kot ob izdelavi. Pri sobni temperaturi opazimo poleg pomanjšanja, v nekaterih primerih tudi povečanje PI,

najbolj izrazito v primeru *SLN(lak-HOL)20* za 159,5%. Sprememba PI ni vrstno ali koncentracijsko značilna.

4.4.3 SPREMEMBE V ZETA POTENCIALU



Graf 13: Relativna sprememba ZP po 75 ± 3 dneh v hladilniku glede na začetno vrednost.



Graf 14: Relativna sprememba ZP po 75 ± 3 dneh pri sobni temperaturi glede na začetno vrednost.

Glede spremembe ZP med SLN ni bistvene razlike med vzorci, shranjenimi pri sobni temperaturi ali v hladilniku. Absolutna vrednost ZP se pri obeh pogojih dvigne za vse

koncentracije *SLN(glu-C14-N)*, *SLN(lak-HOL)* z višjima koncentracijama stabilizatorja, ter za *SLN(lak-C14)20*, v hladilniku pa nekoliko še pri vseh koncentracijah *SLN(Ph)*.

ZP je 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. Načeloma večja absolutna vrednost ZP pomeni večjo stabilnost koloidnega sistema. Izjema so sistemi, stabilizirani (tudi) s steričnimi stabilizatorji, katerega adsorpcija zniža vrednost ZP (14). V našem primeru nismo opazili povezave med stabilnostjo ND in vrednostjo ZP, niti začetno niti končno.

4.5 VREDNOTENJE UČINKOV NOVIH STABILIZATORJEV ZA IZDELAVO TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV NA KERATINOCITIH

ND se po liofilizaciji niso redispergirali do začetne velikosti, nekateri vzorci so ostali tudi v mikrometrskih velikostih. Sklepamo, da jih celice niso mogle internalizirati. Ker pa se stabilizatorji nahajajo na zunanji površini ND, nas je bolj kot internalizacija zanimalo dogajanje ob stiku ND s celico. Preverjali smo toksičnost SPP in *SLN(SPP)*, saj je za vse ostale komponente (Compritol, Lutrol, Phospholipon) že bilo dokazano, da so za celice netoksične (16). Za delo na celicah smo zato uporabili tiste ND, ki so imeli vgrajenega največ stabilizatorja, torej *SLN(20)*.

Želeli smo ugotoviti ali imajo novi stabilizatorji škodljive učinke na celice, kakšna je razlika med njimi in ali se ti učinki razlikujejo za stabilizatorje v raztopini in ko so vezani na *SLN*. V literaturi smo zasledili kar nekaj raziskav s podobnim namenom, njihovi izsledki pa so si nasprotujoči. Potrjena je bila tako hipoteza, da je sam surfaktant bolj citotoksičen kot surfaktant vezan na *SLN* (7), kot tudi obratno, da so *SLN* s surfaktantom bolj citotoksični kot sam surfaktant (38). Pri tem gre za to, da je po vezavi PAS na površino *SLN* pomembna konformacija molekule PAS – za celice nevarne skupine so lahko odkrite ali zasenčene. V

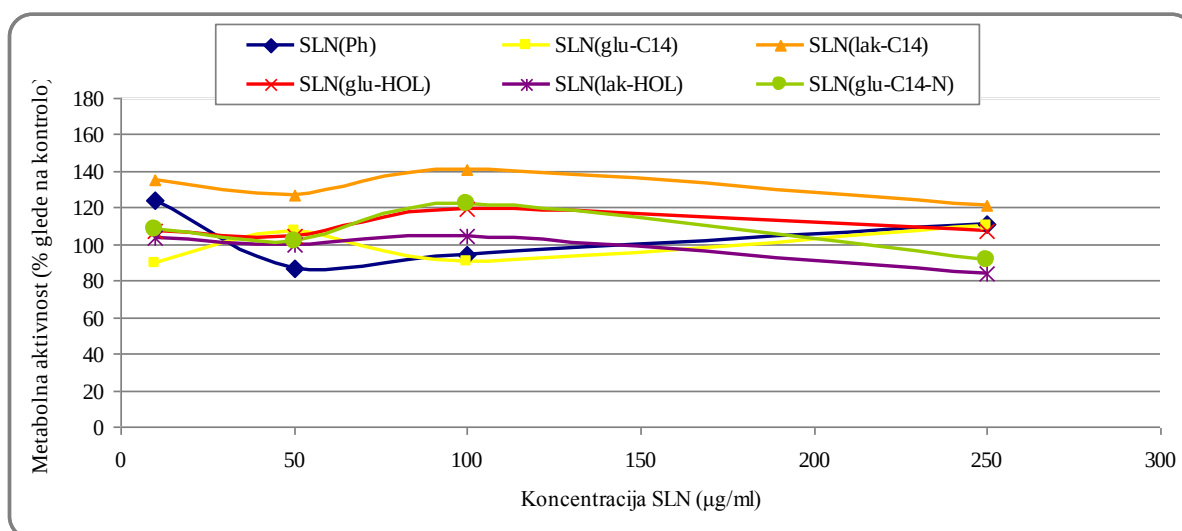
primeru neionskih stabilizatorjev (Tweeni, poloxameri) se toksičnost PAS z vezavo na SLN zmanjša, sklepamo, da je prišlo do senčenja škodljivih delov molekule. Dodatno se toksičnost zmanjša zaradi manjšega privzema ND v celice, kar povzročijo PEG skupine stabilizatorjev (7). Po drugi strani pa so nevarne skupine lecitina na površini ND bolj izražene kot v raztopini, kjer so združene v micelle. Večjo toksičnost po vezavi na SLN pa avtorji pojasnjujejo tudi s sinergističnim citotoksičnim delovanjem večih stabilizatorjev hkrati prisotnih na površini SLN (38).

Keratinocyte smo inkubirali z naraščajočimi koncentracijami stabilizatorjev (Phospholipon 90H ter SPPji), samih ali vgrajenih v SLN. Kontrolni vzorci niso bili tretirani. Po 24 urah smo spremembe na celični kulturi opazovali neposredno pod mikroskopom ter jim določili metabolno aktivnost, ki je posredni kazalec vitalnosti celic.

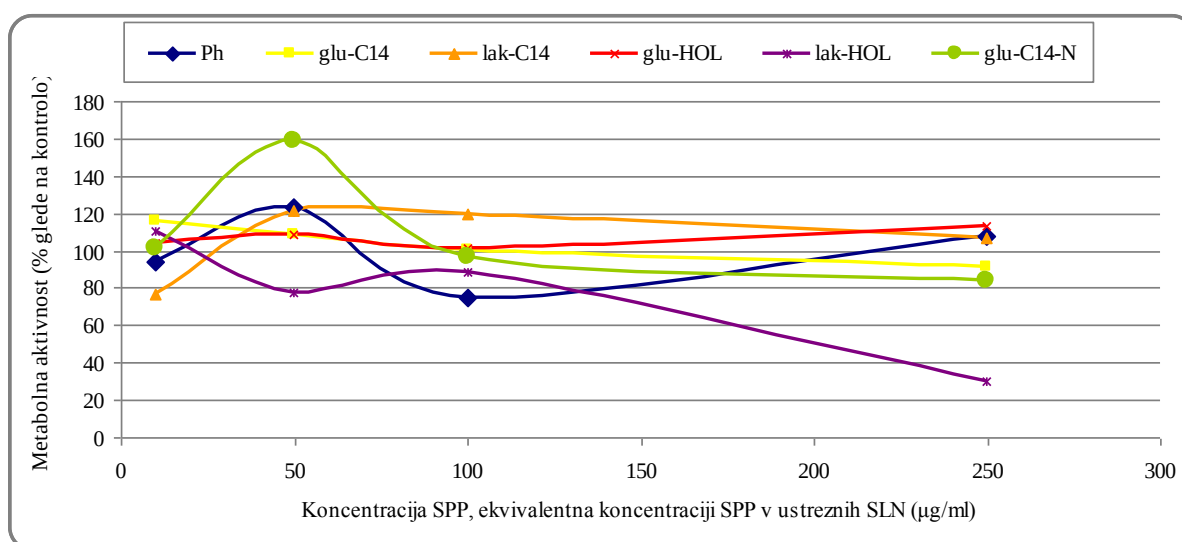
4.5.1 METABOLNA AKTIVNOST TRETIRANIH CELIC

Vpliv naraščajočih koncentracij različnih novih stabilizatorjev (samih in vgrajenih v SLN) smo določali z MTS testom. Celice smo 24 ur inkubirali z naraščajočimi koncentracijami SLN in SPP ter spektrofotometrično posredno, preko merjenja aktivnosti encima mitohondrijske dehidrogenaze, določili njihovo preživetje.

Rezultati kažejo, da se po 24 urah inkubacije z ND oziroma raztopinami SPPjev v nekaterih primerih aktivnost mitohondrijske dehidrogenaze poveča, v drugih pa zmanjša glede na kontrolo. Povečano vrednost absorbance bi sicer lahko pripisali tudi večji motnosti disperzij zaradi dodatka SLN, vendar bi v tem primeru absorbanca naraščala linearno s koncentracijo disperzije SLN (43). V našem primeru se to ni zgodilo, zato lahko sklepamo na stimulativen efekt določenih stabilizatorjev v nekaterih koncentracijah. Še posebej je to izrazito pri *SLN(glu-HOL)* in *glu-HOL*, kjer je metabolna aktivnost zvišana pri vseh koncentracijah, prav tako pri *SLN(lak-C14)* ter pri *lak-C14* pri koncentracijah od 50 µg/ml naprej. Pri *glu-C14* in *SLN(glu-C14-N)* je metabolna aktivnost višja od kontrole pri koncentracijah do 100 µg/ml, nato se zmanjša.



Graf 15: Metabolna aktivnost celic po 24-urni inkubaciji s SLNji(20).



Graf 16: Metabolna aktivnost celic po 24-urni inkubaciji z raztopinami SPPjev. Koncentracija SPP je ekvivalentna koncentraciji SPP v ustreznih SLN.

Povečano celično vitalnost opisujejo tudi avtorji članka o vplivu liposomov na celice (44). Opazili so povečano celično aktivnost v primeru tretiranja celic s praznimi liposomi. To pojasnjujejo s tem, da lahko liposomi povzročijo povečan privzem ekstracelularnih hranil v celico, kakor tudi enkapsulacijo (in zato izolacijo) odpadnih produktov celičnega metabolizma. Omenili smo že, da je problem SLN med drugim tudi soobstoj različnih koloidnih vrst. Površinsko aktivne snovi najdemo v disperziji SLN v treh različnih oblikah: na

površini lipidnih delcev, kot micele in kot monomere surfaktanta (2). Drugi možni asociati PAS v vodni disperziji so še liposomi, surfaktant v lamelarni fazi in različne kubično urejene strukture. Lecitin lahko tvori liposome (2). Predvidevamo, da bi lahko bil to vzrok za povečano vitalnost celic po inkubaciji s Phospholiponom 90H oziroma *SLN(Ph)*. Podobno bi lahko ostali neionski surfaktanti tvorili niosome, ki so še bolj stabilni od liposomov, in na ta način povečali preživetje celic. Vendar pa je ta teorija malo verjetna, saj novi surfaktanti z enoverižnim lipofilnim repom nimajo strukturnih lastnosti, potrebnih za tvorbo liposomov. Preprosti surfaktanti z enojno lipofilno verigo in relativno veliko polarno glavo najverjetneje v vodnem mediju tvorijo sferične ali elipsoidne micele (3).

Na prvi pogled je očitno, da so večje razlike v vplivu na metabolno aktivnost celic med SPPji kot med SLNji. Najbolj stimulirajoč učinek na vitalnost celic ima *glu-C14-N* pri koncentraciji 50 µg/ml (158,8%), najbolj škodljiv je za celice *lak-HOL* pri koncentraciji 250 µg/ml, kjer vrednost pade na 29,7%. V splošnem metabolno aktivnost celic v celotnem testiranem koncentracijskem območju najbolj dvigne *glu-C14-N* (povprečje 110,3%), najbolj zniža pa *lak-HOL* (povprečje 76,5%). Vendar pa, glede na statistično obdelavo, razlike med šestimi uporabljenimi stabilizatorji niso bile signifikantne. So se pa razlike izkazale kot signifikantne med SLNji (ANOVA, $p < 0,05$). Najbolj ugodno so na vitalnost celic vplivali *SLN(lak-C14)* (povprečje 131,0%), najbolj škodljivo pa *SLN(lak-HOL)* (povprečje 97,9%). Med posameznimi koncentracijami ni bilo signifikantnih razlik v vplivu na celice, ne pri SLN niti pri SPP.

Z istim statističnim testom smo ovrednotili tudi razmerje med pari stabilizatorjev v raztopini in vezanih na SLN. Pri nobenem izmed šestih parov ni pri nobeni koncentraciji zaznati statistično pomembnih razlik. Opazimo pa, da je povprečna vrednost metabolne aktivnosti v primerih stabilizatorjev *glu-C14* in *glu-C14-N* večja v primeru raztopine kot SLN, pri ostalih je obratno. Da bi bolj natančno ovrednotili vpliv vezave stabilizatorja na SLN pri učinku na celice, smo po zgledu iz literature izračunali TRF faktorje za posamezne stabilizatorje in koncentracije (7). TRF (toxicity reducing factor) je razmerje med vitalnostjo celic (%) po inkubaciji s SLN s stabilizatorji in vitalnostjo celic po inkubaciji s samimi stabilizatorji v enaki koncentraciji kot so v SLN.

$$TRF = \frac{\text{vitalnost celic po(SLN(SPP))}}{\text{vitalnost celic po(SPP)}}$$

Največje zmanjšanje toksičnosti stabilizatorja po vezavi na SLN smo določili pri *lak-HOL* pri koncentraciji 250 µg/ml, kar je razvidno tudi iz grafov 15 in 16. V nekaterih primerih je učinek raztopine stabilizatorja bolj ugoden za rast celic kot po vezavi na SLN. V primerih *SLN(Ph)* pri 50 µg/ml, *SLN(glu-C14)* pri 10 µg/ml in pri 100 µg/ml ter pri *SLN(glu-C14-N)* pri 50 µg/ml pa celo pride do povečanja toksičnosti v primeru vezave stabilizatorja na SLN.

Tudi te podatke smo statistično ovrednotili. Signifikantnih razlik med njimi ni, ugotovili pa smo, da so pri 50 µg/ml stabilizatorji nekoliko manj škodljivi (oziroma bolj stimulatívni) v obliki raztopine, medtem ko pri 250 µg/ml opazimo najbolj izražen učinek zmanjšanja toksičnosti po vezavi na SLN (Tabela 5 ter Grafa 15 in 16). Rezultati tudi v našem primeru ne dajo enoznačnega odgovora ali vezava stabilizatorjev na SLN poveča ali zmanjša njihovo potencialno toksičnost. Opazimo, da je tudi tu, podobno kot v literaturi, toksičnost (kot funkcija vezave na površino ND) odvisna od vrste stabilizatorja ter od njegove koncentracije. Povprečna vrednost TRF se večinoma giblje okrog 1 (ni razlike med vezanim in nevezanim stabilizatorjem), nekoliko višja od 1 pa je v primeru stabilizatorjev z laktozo – *lak-C14* (1,28) in *lak-HOL* (1,56).

Tabela 5: Faktor zmanjšanja toksičnosti stabilizatorjev po vezavi na ND. Obarvane vrednosti označujejo povečanje toksičnosti SPP po vezavi v SLN. Neobarvane vrednosti označujejo večjo toksičnost SPP v raztopini.

Stabilizator	TRF za SLN v koncentracijah (µg/µl)			
	10	50	100	250
<i>Phospholipon 90H</i>	1,32	0,70	1,25	1,02
<i>glu-C14</i>	0,77	0,99	0,90	1,20
<i>lak-C14</i>	1,77	1,04	1,18	1,13
<i>glu-HOL</i>	1,03	0,96	1,18	0,95
<i>lak-HOL</i>	0,94	1,29	1,18	2,81
<i>glu-C14-N</i>	1,07	0,64	1,26	1,08

Prav tako so se naši zaključki od omenjene raziskave razlikovali v primeru *glu-C14-N*. Avtorji članka namreč trdijo, da imajo kationski stabilizatorji bolj izražen toksičen učinek na celice kot neionski. Kot že napisano, med našimi stabilizatorji nismo opazili signifikantnih razlik v vplivu na celice.

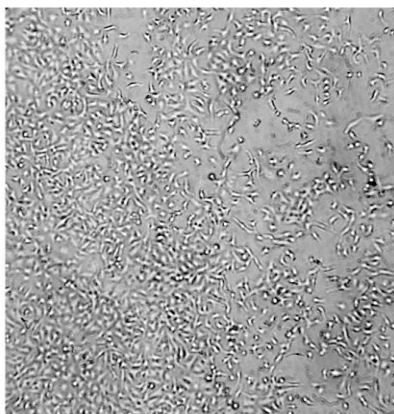
Določali smo samo vitalnost celic, gledano relativno na kontrolo. Znižana vitalnost pomeni citotoksičen učinek testiranih nanodelcev, medtem ko v primeru ohranjene vitalnosti še vedno ne moremo izključiti citostatičnega učinka. Da bi prišli do teh rezultatov, bi morali narediti še test proliferacije.

4.5.2 MORFOLOŠKE SPREMEMBE KERATINOCITOV PO INKUBACIJI Z NOVIMI STABILIZATORJI IN TRDNIMI LIPIDNIMI NANODELCI

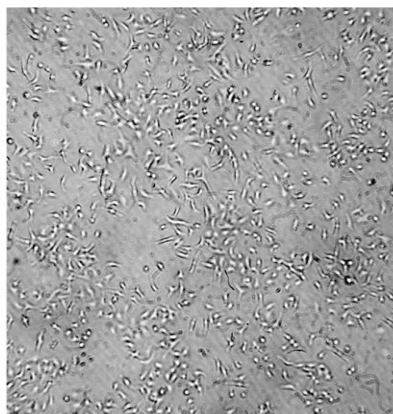
Celice smo opazovali pod invertnim mikroskopom. Rezultati opazovanj dobro sovpadajo z rezultati MTS testa. Tudi po dodatku najvišjih koncentracij ND je v večini primerov poraščenost podobna poraščenosti kontrolnega vzorca. Celice so še vedno dobro pritrjene na površino, tudi velikost in morfologija sta popolnoma primerljivi netretiranim celicam. Vse to dokazuje, da ni bilo citotoksičnih vplivov na celice in je v skladu z dokazano metabolno aktivnostjo celic. Po drugi strani, tudi stimulativnega učinka ND in samih stabilizatorjev, na katere nakazuje MTS test, na slikah ni opaziti.

Nekoliko redkejšo poraščenost opazimo edino v primeru, ko vitalnost celic po MTS testu pade pod 85%, torej v primeru *SLN(lak-HOL)* in *lak-HOL* ter *glu-C14-N*, vendar *lak-HOL* z metabolno aktivnostjo 29,7% ne izstopa. Metabolna aktivnost je torej v tem primeru le navidezno zmanjšana, verjetno kot posledica dejavnikov, ki motijo meritev.

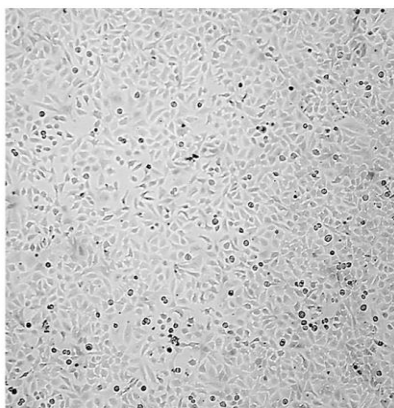
Odrpto pa ostaja vprašanje časovno pogojene citotoksičnosti. Dokazano je bilo namreč, da so škodljivi učinki nekaterih stabilizatorjev (npr. tiloksapola) funkcija časa (16). Za ta namen bi morali spremljati viabilnost celic skozi daljši čas.



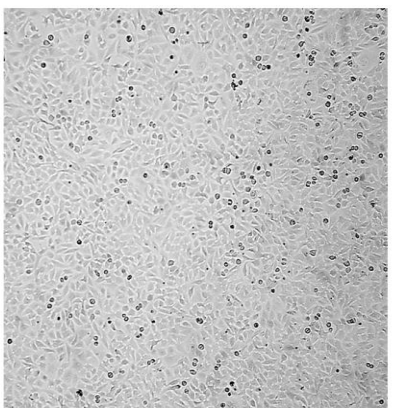
Kontrolna skupina



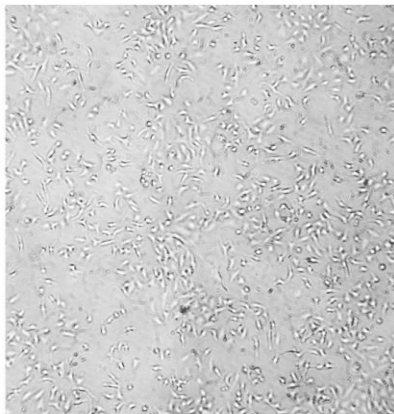
Lutrol



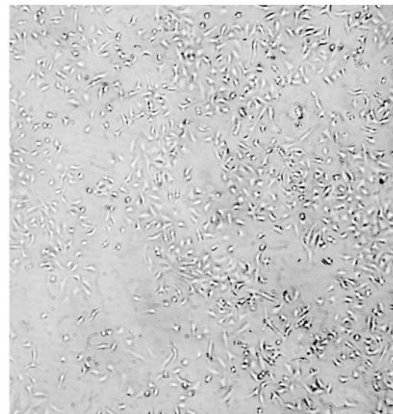
SLN(Ph)



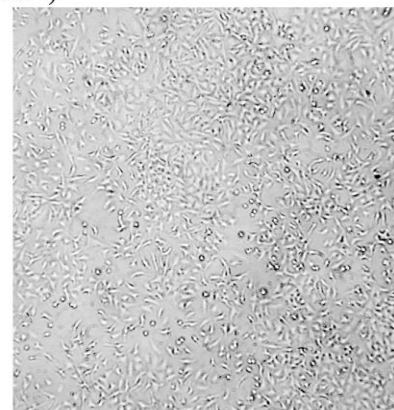
Phospholipon 90H



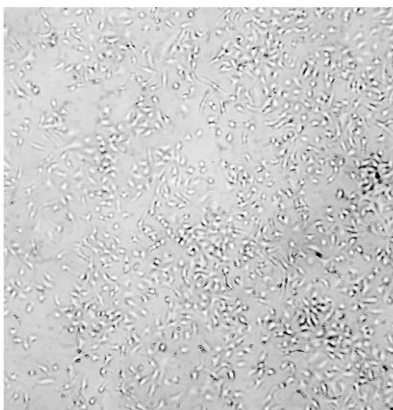
SLN(glu-C14)



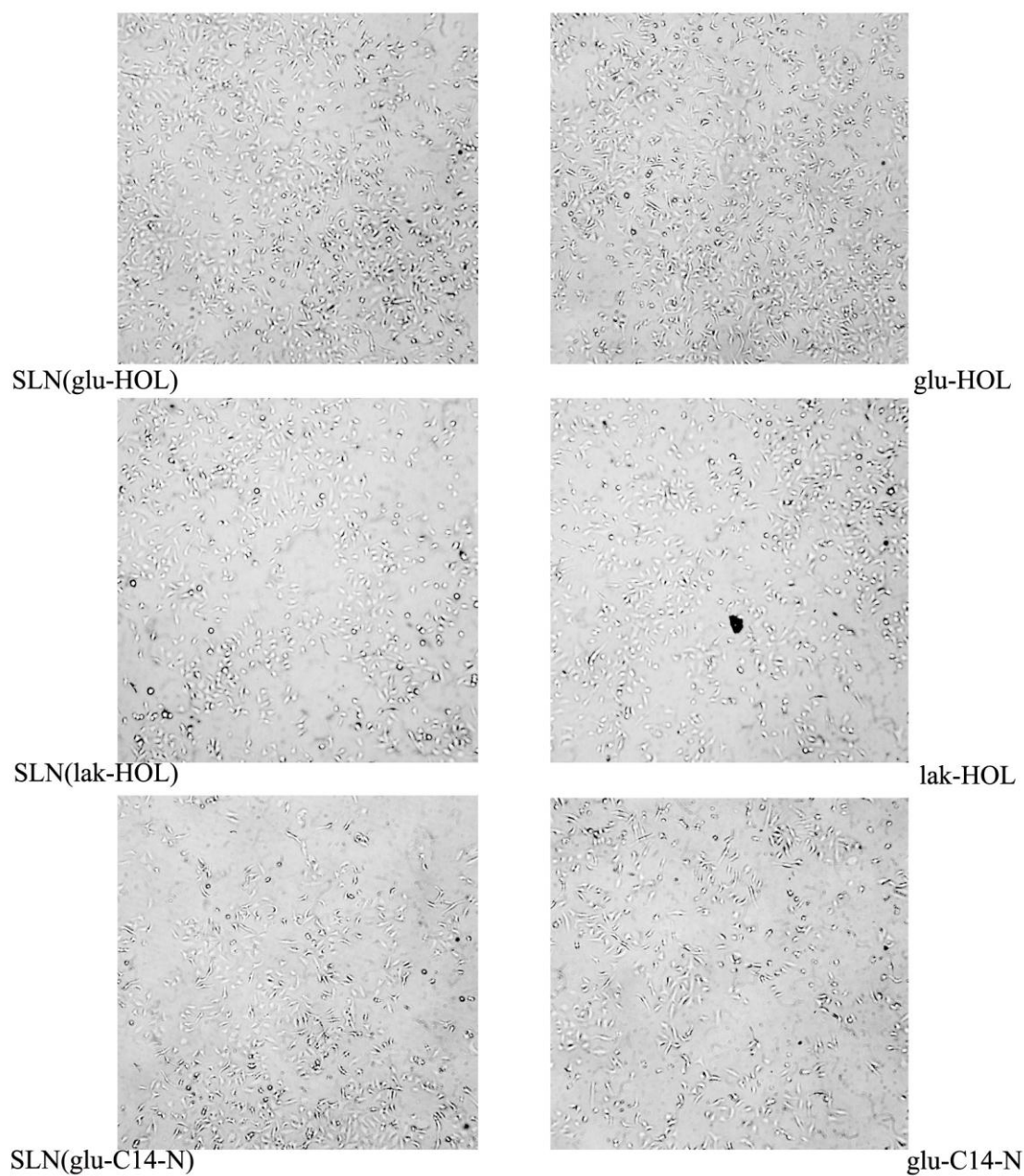
glu-C14



SLN(lak-C14)



lak-C14



Slika 13: Mikroskopski posnetki celic po 24-urni inkubaciji z najvišjimi koncentracijami (250 µg/ml) nanodelcev oziroma raztopin stabilizatorjev.

5. SKLEP

V diplomski nalogi smo preverjali primernost petih novih stabilizatorjev pri izdelovanju SLN. Želeli smo izdelati ND s čim boljšimi fizikalnimi lastnostmi, kot referenca pa so nam služili ND, izdelani s preverjenim emulgatorjem Phospholiponom 90H. Med novimi stabilizatorji so bili štirje (*glu-C14*, *lak-C14*, *glu-HOL*, *lak-HOL*) neionski in en (*glu-C14-N*) kationski.

V prvem delu naloge smo s postopkom dispergiranja taline lipida z rotor-stator homogenizatorjem izdelali SLN z različnimi stabilizatorji v različnih koncentracijah. Ugotovili smo, da vsi novi stabilizatorji v vseh testiranih koncentracijah omogočajo nastanek ND, ter da so razlike med njimi statistično značilne. Najmanjše ND smo izdelali s stabilizatorjem *lak-C14*, največje pa z *glu-C14-N*, so pa bili tudi ti veliki manj kot 400 nm. Nove stabilizatorje smo ovrednostili s stališča KMK, vednar nismo zasledili povezave med dobljenimi vrednostmi in učinkovitostjo stabilizacije SLN. Velikost delcev je bila v vseh primerih heterogena, kar smo pripisali soobstoju drugih koloidnih vrst ter povezovanju delcev zaradi prevelike koncentracije stabilizatorjev. ZP, večji od 30 mV so imeli edino *SLN(glu-C14-N)*, ki so posledično izkazovali tudi najboljšo stabilnost.

Za zagotavljanje stabilnosti skozi daljše časovno obdobje smo disperzije SLN liofilizirali ob prisotnosti trehaloze dihidrata kot krioprotektanta. Fizikalne lastnosti ND so se po tem postopku drastično poslabšale za vse SLN, razen za *SLN(glu-C14-N)*, kjer so se celo nekoliko izboljšale. So pa ostali vsi SLN v nanometrskem območju.

S termično analizo posameznih komponent in liofiliziranih SLN smo dokazali, da so tako Compritol kot novi stabilizatorji sposobni tvoriti kristalinični lipidni matriks trdnih ND ter da med posameznimi komponentami SLN obstajajo interakcije.

Po pričakovanjih so bili ND bolj stabilni pri nižji temperaturi. Velikost delcev se je najbolj povečala v primeru *SLN(lak-C14)*, ki so bili v osnovi najmanjši, *SLN(glu-C14-N)*, ki so bili po izdelavi največji pa so se v 75 dneh na hladnem nekoliko zmanjšali. Glede na to, da izmed 18 testiranih kombinacij ND velikost preraste nanometrsko območje samo pri 5 kombinacijah pri sobni temperaturi in 2 kombinacijah v hladilniku, lahko zaključimo, da so novi stabilizatorji, kar se stabilnosti tiče, primerni za izdelavo SLN. Za najuspešnejšega se je izkazal ionski stabilizator *glu-C14-N*, pri ostalih pa bi bilo treba razmisliti o prilagoditvi sestave.

V drugem delu naloge smo vpliv SLN opazovali na keratinocitih. Na podlagi slik, posnetih s svetlobnim mikroskopom, lahko zaključimo, da niti stabilizatorji v raztopini niti vezani na SLN nimajo citotoksičnega učinka na celice, niti v najvišji testirani koncentraciji. Z MTS testom smo ugotovili še, da nekateri stabilizatorji delujejo celo stimulatивно na metabolno aktivnost celic in dvignejo procent vitalnih celic glede na kontrolo. Na vprašanje, ali je vezava novih stabilizatorjev na SLN za celice ugodna, ne moremo odgovoriti enoznačno, saj se je izkazalo, da je to odvisno tako od posameznega stabilizatorja kot tudi od koncentracije, s katero smo inkubirali celice. Na splošno se je izkazalo, da vezava stabilizatorjev na SLN lahko zmanjša negativne učinke na celice predvsem pri višjih koncentracijah.

To so prvi rezultati raziskav o proučevanih novih PAS. Kot najuspešnejši med vsemi se je izkazal *glu-C14-N*. *SLN(glu-C14-N)* so bili ob izdelavi sicer nekoliko večji kot ostali SLN, vendar so izkazovali tudi največji ZP, kar se je kot prednost izkazalo pri stabilnostnih študijah. Med shranjevanjem v hladilniku so se delci zmanjšali, PI se je zmanjšal pri obeh temperaturah, ZP pa povečal. Po liofilizaciji so se zlahka redispergirali, končna velikost je bila celo manjša kot v disperziji po izdelavi. V nižjih koncentracijah so na metabolno aktivnost celic delovali stimulatorno, pri višjih koncentracijah se je pojavilo manjše znižanje vitalnosti, vendar razlika z ostalimi SPP ni bila signifikantna.

6. LITERATURA

1. Ahlin P. Razvoj in proučevanje trdnih lipidnih nanodelcev z EPR metodo. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2000.
2. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and application. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 47: 165 – 196.
3. Myers D. Surfaces, Interfaces and Colloids. Principles and Applications. Second Edition. John Wiley & Sons; 216-219 in 373 – 396.
4. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003; 24: 4283 – 4300.
5. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002; 54, Suppl. 1: S131 – S155.
6. Ali F, Wissing SA, Müller RH, Fadda AM. *Artemisia arborescens* L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech*, 2006; 7 (1) Article 2.
7. Müller RH, Rühl D, Runge S, Schulze-Forster K, Mehnert W. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharmaceutical Research*, Vol. 14, 1997; 4: 458 – 462.
8. Vivek K, Reddy H, Murthy RSR. Investigation of the effect of the lipid matrix on drug entrapment, in vitro release and physical stability of Olanzapine-loaded solid lipid nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* 2007; 8 (4) Article 83.
9. Reddy LH, Murthy RSR. Etoposide-loaded nanoparticles made from glyceride lipids: formulation, characterization, in vitro drug release, and stability evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 2005; 6 (2) Article 24.
10. Glavinič N. Vstop trdnih lipidnih nanodelcev z resveratrolom v keratinocyte in njihov vpliv na mitohondrijsko aktivnost. Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011.
11. Schubert MA, Schicke BC, Müller-Goymann CC. Thermal analysis of the crystallization and melting behavior of lipid matrices and lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 298: 242 – 254.
12. Rebolj N, Kozjek F, Kristl J. Fizikalno kemične osnove nestabilnosti emulzij. *Farmacevtski vestnik* 1997; 48: 478 – 486.

13. Kristl J, Kokol D, Šmid-Korbar J. Trdni lipidni nanodelci: izdelava vrednotenje in možnosti za dostavo učinkovin. *Farmacevtski vestnik* 1997; 48: 123 – 131.
14. 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.
15. Torchilin VP. Nanoparticulates as drug carriers. *Solid lipid nanoparticles as drug carriers*. Imperial College Press: 187 – 212.
16. Kristl J, Teskac K, Milek M, Mlinaric-Rascan I. Surface active stabilizer Tyloxapol in colloidal dispersions exerts cytostatic effects and apoptotic dismissal of cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008; 232: 218 – 225.
17. Müller RH, Mehnert W, Lucks JS, Schwarz C, Mühlen A, Weyhers H, Freitas C, Rühl D. Solid lipid nanoparticles (SLN) - An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1995; 41: 62-69.
18. Westesen K, Bunjes H. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? *International Journal of Pharmaceutics* 1995; 115: 129 – 131.
19. Planinšek O, Zajc N, Srčič S. Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji. . *Farmacevtski vestnik* 2001; 52: 173 – 185.
20. Freitas C, Müller RH. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1999; 47: 125 – 132.
21. Siekmann B, Westesen K. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. *Colloids Surfaces B* 1994; 3: 157 – 175.
22. Schwarz C, Mehnert W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics* 1997; 157: 171 – 179.
23. Konan Y, Gurny R, Allemann E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 233: 239 – 252.
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. Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000; 50: 161 – 177.

26. Bunjes H, Westesen K, Koch MHJ. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 1996; 129: 159 – 173.
27. Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 366: 170 – 184.
28. Veranič P, Romih R, Pšeničnik M. Praktični pouk celične biologije, 1. natis. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2003: 12 – 22 in 32 – 33.
29. Batista U. Gojenje sesalskih celic v in vitro pogojih. Študentska založba, Ljubljana, 2005: 11 – 17.
30. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Fourth Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, 2003: 447 – 449.
31. Phospholipon 90H, Phospholipid.
<http://www.phospholipid.de/pdf/Phospholipon%2090%20H.pdf>
32. Špiclin P, Gašperlin M, Kmetec V. Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 222: 271 – 279.
33. Varga V. Vpliv stabilizatorjev na značilnosti lipidnih nanodelcev z askorbilpalmitatom. *Diplomska naloga*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2003.
34. Weyenberg W, Filev P, Van den Plas D, Vandervoort J, De Smet K, Sollie P, Ludwig A. Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 337: 291 – 298.
35. Bunjes H, Unruh T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 379 – 402.
36. IBMI, podiplomsko izobraževanje, temelji biostatistike.
<http://ibmi.mf.uni-lj.si/ibmi/izobrazevanje/podipl-stat/vaja5.pdf>
37. Pelipenko J. Izdelava trdnih lipidnih nanodelcev z resveratrolom za terapijo revmatoidnega artritisa. *Diplomska naloga*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
38. Schubert MA, Müller-Goymann CC. Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and non-ionic emulsifier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2005; 61: 77 – 86.
39. Pajk S. Vplivi nekaterih produktov oksidacije holesterola na strukturiranost modelnih membran. *Doktorska disertacija*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.

40. Kralj L. Kvarterni sistemi z lecitinom: opredelitev fizikalno-kemijskih lastnosti in izdelava faznega diagrama. Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2009.
41. Hou DZ, Xie SC, Huang KJ, Zhu CH. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials* 2003; 24: 1781 – 1785.
42. Helgason T, Awad TS, Kristbergsson K, McClements DJ, Weiss J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of Colloid and Interface Science* 2009; 334: 75 – 81.
43. Švelc T. Vpliv sestave nanodelcev na preživetje in funkcijo celic. Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006.
44. 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.