

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



TANJA TAVČAR

**VREDNOTENJE STRUKTURE IN CITOTOKSIČNOSTI TEKOČIH  
KRISTALOV ZA DERMALNO UPORABO**

**STRUCTURE AND CYTOTOXICITY CHARACTERISATION OF  
LIQUID CRYSTALS FOR DERMAL APPLICATION**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin. Analizo ozkokotnega rentgenskega sipanja so opravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin ter delovni mentorici asist. Mirjam Gosenca za strokovno pomoč ter nasvete in vzpodbudo pri nastajanju diplomske naloge. Zahvala gre tudi prof. dr. Mariji Bešter Rogač za izvedbo SAXS analize, asist. dr. Alenki Zvonar za pomoč pri izvedbi in interpretaciji rezultatov DSC analize ter asist. Biljani Govedarici za pomoč pri izvedbi in interpretaciji rezultatov AFM analize. Nenazadnje hvala tudi staršem ter bratu in Boru za podporo in vzpodbudo v času študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin.

Tanja Tavčar

Ljubljana, 2011

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Danijel Kikelj

Član diplomske komisije: asist. dr. Miha Milek

# VSEBINA

<b>POVZETEK.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>7</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 TEKOČI KRISTALI.....</b>	<b>8</b>
1.1.1 LIOTROPNI TEKOČI KRISTALI.....	9
1.1.1.1 Fazni prehodi liotropnih tekočih kristalov .....	10
1.1.1.2 Heksagonalne faze.....	11
1.1.1.3 Lamelarne faze .....	12
1.1.1.4 Kubične faze .....	12
<b>1.2 METODE ZA DOLOČANJE FIZIKALNO–KEMIJSKIH                      LASTNOSTI</b>	
<b>TEKOČIH KRISTALOV .....</b>	<b>13</b>
1.2.1 POLARIZACIJSKA MIKROSKOPIJA .....	14
1.2.3 PRESEVNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA .....	15
1.2.4 RENTGENSKO SIPANJE.....	16
1.2.5 JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA .....	16
1.2.6 MIKROSKOPIJA NA ATOMSKO SILO .....	17
1.2.7 REOLOGIJA .....	17
1.2.8 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA .....	18
<b>1.3 KOŽA KOT MESTO DERMALNE APLIKACIJE.....</b>	<b>19</b>
1.3.1 ZGRADBA KOŽE .....	19
1.3.2 UPORABA TEKOČIH KRISTALOV ZA DERMALNO APLIKACIJO .....	20
<b>1.4 IRITACIJA KOŽE.....</b>	<b>21</b>
1.4.1 MEHANIZMI NASTANKA IRITACIJE.....	22
1.4.2 VREDNOTENJE IRITANTOV .....	23
1.4.3 SESTAVINE TEKOČIH KRISTALOV Z VIDIKA IRITACIJE KOŽE .....	24
<b>2 NAMEN DELA .....</b>	<b>26</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 MATERIALI.....</b>	<b>27</b>
3.1.1 SESTAVINE ZA IZDELAVO TEKOČIH KRISTALOV .....	27
3.1.2 GOJENJE CELIC IN REAGENTI.....	29
<b>3.2 PRIPRAVA TEKOČIH KRISTALOV .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 METODE ZA STRUKTURNO VREDNOTENJE TEKOČIH KRISTALOV .....</b>	<b>31</b>
3.3.1 OZKOKOTNO RENTGENSKO SIPANJE.....	31
3.3.2 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA .....	33
<b>3.4 METODE ZA VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI .....</b>	<b>33</b>

3.4.1 UPORABLJENA LABORATORIJSKA OPREMA .....	33
3.4.2 PRIPRAVA RAZTOPIN/DISPERZIJ TEKOČIH KRISTALOV ZA POSKUSE NA CELICAH .....	34
3.4.3 GOJENJE IN PRESAJANJE CELIC .....	35
3.4.4 UGOTAVLJANJE PROLIFERACIJE CELIC S TESTOM AKTIVNOSTI MITOHONDRIJSKE DEHIDROGENAZE.....	35
3.4.5 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV.....	37
3.4.6 SNEMANJE MORFOLOŠKIH SPREMEMB CELIČNE MEMBRANE KERATINOCITOV Z MIKROSKOPOM NA ATOMSKO SILO.....	37
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 STRUKTURNO VREDNOTENJE TEKOČIH KRISTALOV .....</b>	<b>39</b>
4.1.1 OZKOKOTNO RENTGENSKO SIPANJE.....	39
4.1.1.1 Razdalje med lamelami.....	43
4.1.2 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA .....	44
4.1.2.1 Ohlajanje.....	44
4.1.2.2 Segrevanje.....	48
<b>4.2 CITOTOKSIČNOST TEKOČIH KRISTALOV.....</b>	<b>51</b>
4.2.1 VREDNOTENJE VPLIVA TEKOČIH KRISTALOV NA PrOLIFERACIJO KERATINOCITOV S TESTOM AKTIVNOSTI MITOHONDRIJSKE DEHIDROGENAZE .....	52
4.2.1.1 Vpliv posameznih sestavin tekočih kristalov na keratinocite.....	52
4.2.1.2 Vpliv tekočih kristalov na keratinocite .....	54
4.2.2 VREDNOTENJE MORFOLOŠKIH SPREMEMB CELIČNE MEMBRANE KERATINOCITOV Z MIKROSKOPOM NA ATOMSKO SILO.....	56
4.2.2.1 Celice po 4h izpostavitve tekočim kristalom.....	56
4.2.2.2 Celice po 24h izpostavitve tekočim kristalom.....	63
<b>5 SKLEP.....</b>	<b>64</b>
<b>6 VIRI IN LITERATURA .....</b>	<b>66</b>

## POVZETEK

Liotropni tekoči kristali se v farmaciji uporabljajo kot nosilni sistemi za različne aplikacije. Tvorijo jih površinsko aktivne snovi oziroma natančneje njihovi hidrati ali solvati ob prisotnosti vodne in/ali oljne faze. Predvsem liotropni tekoči kristali z lamelarno strukturo so zaradi ugodne konsistence, velike sposobnosti solubilizacije, termodinamske stabilnosti in enostavne izdelave primerni sistemi za dermalno dostavo učinkovin.

Namen diplomskega dela je vrednotenje notranje strukture in potencialne citotoksičnosti tekočih kristalov, sestavljenih iz lecitina in Tweena 80 kot emulgatorske zmesi (v razmerju 1:1 in 1:2), izopropilmiristata kot oljne faze in bidestilirane vode kot hidrofilne faze. Kot učinkovino smo vgradili 1% (m/m) askorbilpalmitata, ki izkazuje številne ugodne lastnosti za dermalno uporabo (deluje antioksidativno, stimulira sintezo kolagena). Tako struktura kot citotoksičnost sta ključnega pomena pri razvoju nosilnega sistema za dermalno aplikacijo. Struktura pomembno vpliva na sproščanje in dermalno absorpcijo učinkovine. Tekoči kristali navadno vsebujejo velik delež površinsko aktivnih snovi, slednje pa lahko povzročijo iritacijo kože, zato je pomembno ovrednotiti potencialno citotoksičnost in s tem posredno iritabilnost.

Za vrednotenje strukture liotropnih tekočih kristalov lahko uporabimo različne komplementarne tehnike, v diplomskem delu smo strukturiranost vrednotili z ozkokotnim rentgenskim sipanjem in diferenčno dinamično kalorimetrijo.

Analizo z ozkokotnim rentgenskim sipanjem smo izvedli pri 25°C (sobna temperatura), 32°C (temperatura na površini kože) in 37°C (telesna temperatura). Pri vseh treh temperaturah smo potrdili lamelarno strukturo tekočih kristalov, ki se je ohranila tudi po vgradnji askorbilpalmitata pri 25°C. Izjema so sistemi z razmerjem Tween 80:lecitin=1:1, kjer se pojavijo dodatne oblike urejenosti. Pri 37°C je pri večini vzorcev z vgrajenim askorbilpalmitatom lamelarna struktura izginila in iz difraktogramov so bile ponovno razvidne nove strukture, predvidevamo da miceli zaradi amfifilnih lastnosti askorbilpalmitata.

Z diferenčno dinamično kalorimetrijo smo posneli termograme pri ohlajanju sistemov iz 20°C na -60°C in nato pri segrevanju nazaj na 20°C. Med tekočimi kristali z različnim razmerjem sestavin so opazne razlike pri temperaturi zamrzovanja vode, ker se voda

močnejše veže na polarne glave Tweena 80 kot lecitina. Po vgradnji askorbilpalmitata nismo opazili bistvenih vplivov na strukturo, so pa opazni manjši premiki vrha zamrznitve vode.

Vpliv tekočih kristalov na proliferacijo celic smo določali na celični liniji keratinocitov s testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze ter z mikroskopijo na atomsko silo proučevali vpliv na morfologijo.

S testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze smo določili proliferacijo celic po izpostavitvi posameznim sestavinam, tekočim kristalom ter raztopini natrijevega lavrilsulfata (pozitivna kontrola) pri treh različnih koncentracijah. Pri vseh treh koncentracijah so celice izkazovale signifikantno večjo proliferacijo v primerjavi s pozitivno kontrolo, predvsem pri sistemih z največjim deležem vode in razmerjem Tween 80: lecitin=1:1. Z mikroskopom na atomsko silo smo proučevali morfologijo keratinocitov po izpostavitvi tekočim kristalom in ugotovili, da pride že pri izpostavljenosti subtoksičnim koncentracijam tekočih kristalov do prepoznavnih učinkov na morfologijo celice. Pojavijo se morfološke spremembe kot so jasno definirani psevdopodiji in decentralizirano postavljeno jedro, v membrani nastanejo vdolbine. Z večanjem koncentracije se ti učinki še stopnjujejo.

Iz rezultatov diplomskega dela sklepamo, da predstavljajo tekoči kristali potencialen nosilni sistem za dermalno dostavo askorbilpalmitata, ki je kljub učinkom na celice že pri subtoksični koncentraciji, sprejemljiv tudi z vidika iritacije kože.

## ABSTRACT

Lyotropic liquid crystals are used as drug delivery systems for different pharmaceutical applications. They are formed by surfactants, precisely by their hydrates and solvates, in the presence of water and/or oil phase. Lyotropic liquid crystals with lamellar structure are especially suitable for dermal application due to their appropriate consistency, great solubilization properties, thermodynamic stability and easy preparation.

The purpose of this diploma is structure and potential cytotoxicity characterisation of liquid crystals consisting of lecithin and Tween 80 as surfactants (at ratio 1:1 and 1:2), isopropyl myristate as oil phase and bidistilled water as hydrophilic phase. 1% (w/w) of ascorbyl palmitate was incorporated into this systems as active substance due to its numerous beneficial properties for dermal application (antioxidant properties, induces collagen synthesis). Both structure and cytotoxicity aspects are crucial for development of drug delivery systems for dermal application. Structure has great influence on release and dermal absorption of the active substance. Liquid crystals usually contain large proportion of surfactants which could be potential skin irritants. Therefore it is important to evaluate potential cytotoxicity and with that indirectly their irritability.

Different complementary techniques are used for structure evaluation of lyotropic liquid crystals. In diploma small angle x-ray scattering and differential scanning calorimetry were used.

Small angle X-ray scattering analysis was conducted at 25°C (room temperature), 32°C (temperature on skin surface) and 37°C (body temperature). We confirmed lamellar structure at all three temperatures and after incorporation of ascorbyl palmitate at 25°C for all systems except for those with ratio Tween 80: lecithin=1:1 where additional structures appeared. At 37°C lamellar structure of samples containing ascorbyl palmitate disappeared and formation of new structures was shown on diffractograms. We assume that micelles were formed due to the amphiphilic properties of ascorbyl palmitate.

Thermograms of cooling systems from 20°C to -60°C and then heating them back to 20°C were obtained with differential scanning calorimetry. Differences in water freezing temperature between liquid crystals with different components content occurred due to stronger water interactions with Tween 80 polar heads than with lecithin polar heads. The

structure was not significantly affected by incorporation of ascorbyl palmitate. However there were slight shifts of water freezing peak position.

Effect of liquid crystals on proliferation of cells was determined on keratinocyte cell line with mitochondrial dehydrogenase activity assay. Effect on cell morphology was studied with atomic force microscopy.

Cell proliferation was determined with mitochondrial dehydrogenase activity assay after exposing cells to three different concentrations of components, liquid crystals and sodium lauryl sulfate (positive control). Cell proliferation was significantly higher at all three concentrations compared to positive control, especially the proliferation of cells exposed to liquid crystals with higher water content and ratio Tween 80: lecithin=1:1. Morphology of keratinocytes after exposure to liquid crystals was observed under the atomic force microscope. Yet at subtoxic concentrations of liquid crystals effects on morphology of cells were observed. Morphology changes such as clearly defined pseudopodia and decentralised position of the nucleus as well as dents in the membrane appeared. These effects potentiate by increasing concentration.

From our results we conclude that liquid crystals are potential delivery systems for dermal application of ascorbyl palmitate, exceptable also from skin irritation point of view despite effects on cell at subtoxic concentrations.



## SEZNAM OKRAJŠAV

AFM	mikroskopija na atomsko silo ( <i>ang.: Atomic Force Microscopy</i> )
AP	askorbilpalmitat
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija ( <i>ang.: Differential Scanning Calorimetry</i> )
FF TEM	presevna elektronska mikroskopija z zamrzovalnim lomljenjem ( <i>ang.: Freeze Fracture Transmission Electron Microscopy</i> )
GRAS status	status varne snovi ( <i>ang.: Generally Recognised As Safe</i> )
IKD	iritativni kontaktni dermatitis
IL	interlevkin
IPM	izopropilmiristat
IPP	izopropilpalmitat
LAF	laminarni pretok zraka ( <i>ang.: Laminar Air Flow</i> )
MTT, MTS test	test aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze
NMR	jedrsko magnetna resonanca ( <i>ang.: Nuclear Magnetic Resonance</i> )
PAS	površinsko aktivne snovi
PBS	fosfatni pufer ( <i>ang.: Phosphate Buffered Saline</i> )
SAXS	ozkokotno rentgensko sipanje ( <i>ang.: Small Angle X-Ray Scattering</i> )
SDS	natrijev lavrilsulfat
T	temperatura
TEM	presevna elektronska mikroskopija ( <i>ang.: Transmission Electron Microscopy</i> )
TK	tekoči kristali
TNF $\alpha$	tumorje-nekrotizirajoči faktor
WAXS	širokokotno rentgensko sipanje ( <i>ang.: Wide Angle X-ray Scattering</i> )

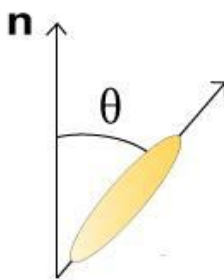
# 1 UVOD

## 1.1 TEKOČI KRISTALI

Tekoči kristali (TK) predstavljajo vmesno stanje snovi med trdnim in tekočim. Zanje so značilne različne strukture oziroma faze, imenujemo jih mezofaze, med katerimi lahko prehajajo v specifičnem zaporedju in pod določenimi pogoji. Molekule, ki tvorijo TK, imenujemo mezogeni. Čeprav izraz »tekoči kristal« sestavljata dva nasprotujoča si pojma, le-ta dobro opisuje stanje snovi, ki združuje tako lastnosti kristalinične trdne snovi (anizotropnost, dvolomnost, urejenost, mehanska stabilnost) kot tekočine (tok) (1). Kristalinična snov izkazuje urejenost tako na kratke (v neposredni okolici posamezne molekule) kot dolge razdalje glede na pozicijsko (urejenost molekul v mrežo) in orientacijsko urejenost (orientacija molekul). Tekočine so v osnovi neurejene, vendar lahko izkazujejo urejenost na kratke razdalje glede na orientacijsko in/ali pozicijsko urejenost molekul. TK izkazujejo najmanj orientacijsko urejenost na dolge razdalje, lahko tudi na kratke, ne izkazujejo pa pozicijske urejenosti na dolge razdalje (2). Za opis orientacijske urejenosti potrebujemo dva podatka: ureditveni parameter  $S$  in ureditveni normalni vektor  $\mathbf{n}$ . Slednji odraža smer, v katero so v povprečju orientirane molekule v sistemu. Nasprotno usmerjena vektorja  $\mathbf{n}$  in  $-\mathbf{n}$  sta enakovredna. Ureditveni parameter  $S$  nam pove stopnjo urejenosti molekul in je definiran kot:

$$S = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \vartheta(t) - 1 \rangle \quad \text{Enačba 1}$$

kjer je kot  $\vartheta$  kot med trenutno smerjo vzdolžne molekule in normalnim vektorjem  $\mathbf{n}$  (slika 1).



**Slika 1:** Smer orientiranosti molekule je podana z ureditvenim vektorjem  $\mathbf{n}$ .  $\vartheta$  je kot med trenutno smerjo posamezne molekule in ureditvenim vektorjem  $\mathbf{n}$  (3).

V trdnem kristalu je vrednost  $S$  blizu 1, kar pomeni skoraj popolno urejenost, medtem ko

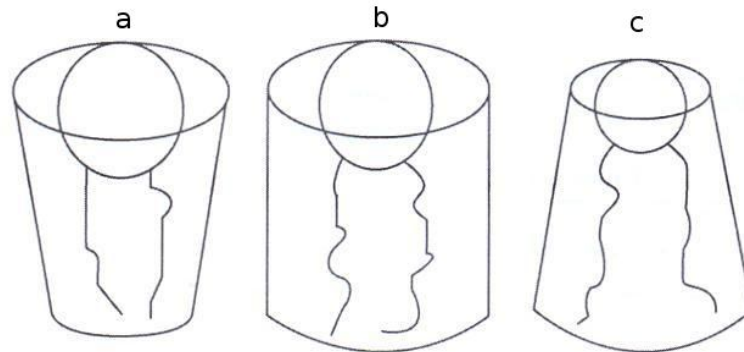
imajo TK vrednost parametra navadno med 0,3 in 0,9. Prav tako smer ureditvenega vektorja ni enaka za celoten kristal. So pa TK bolj stabilni, kadar imajo vse molekule smer vektorja  $\mathbf{n}$ , torej je  $\vartheta$  enak 0. Enotno urejeno območje, znotraj katerega je smer vektorja povsod enaka, je veliko le nekaj mikrometrov, sčasoma pa se območja združujejo in snov je večinoma enakomerno orientirana. Tudi zunanji dejavniki (npr. električno/magnetno polje, površine vsebnikov) lahko vplivajo na spremembo smeri vektorja. V primeru, da smeri vektorja na meji med dvema območjema ne moremo določiti, govorimo o defektu orientacije vektorja oziroma defektu tekočega kristala (3, 4).

Glede na nastanek delimo TK na termotropne in liotropne. Termotropni TK nastanejo s segrevanjem trdne snovi, ki je značilno sestavljena iz izrazito podolgovatih molekul, ki imajo osrednji del molekule bolj tog, na straneh pa sta gibljivi alkilni verigi. Liotropni TK nastanejo z dodajanjem topila trdni snovi in jih tvorijo amfifilne molekule, ki so podolgovate in sestavljene iz polarne glave in nepolarnega repa, prehod med različnimi fazami pa lahko nastopi tudi s spreminjanjem temperature (2, 5).

### **1.1.1 LIOTROPNI TEKOČI KRISTALI**

Liotropni TK nastanejo z dodajanjem topila trdni snovi in jih navadno tvorijo površinsko aktivne snovi (PAS) oziroma natančneje njihovi hidrati ali solvati ob prisotnosti vodne in/ali oljne faze. V odsotnosti oljne faze se PAS raztapljajo in pri točno določeni koncentraciji, imenovani kritična micelarna koncentracija (KMK), spontano urejajo v skupke koloidnih velikosti oz. micle, pri čemer se hidrofilni deli obrnejo navzven, hidrofobni pa navznoter. Obratno velja pri reverzih micelih, ki nastanejo v lipofilnem topilu v odsotnosti vode. Z naraščanjem koncentracije PAS nastajajo specifične strukture z značilno tridimenzionalno urejenostjo; izotropna micelarna raztopina se spremeni v anizotropno, viskoznost se poveča, nastanejo TK. Le-ti nastanejo v določenem koncentracijskem in temperaturnem območju. Za razliko od termotropnih TK imajo torej liotropni TK dodatne prostostne stopnje, ki jih predstavljajo koncentracije posameznih komponent v sistemu, kar jim omogoča urejanje v specifične strukture: lamelarne, heksagonalne in kubične, kar zavisi od oblike hidratiranih molekul PAS. Hidrati ali solvati PAS, ki so gradniki liotropnih TK, imajo obliko stožca ali valja, in sicer se molekule v obliki valja urejajo v lamelarne plasti, stožčaste molekule tvorijo heksagonalne faze, obrnjeni stožci pa inverzne heksagonalne faze (slika 2). Kubične mezofaze sestavljajo agregati sferične ali paličaste oblike, ki so urejeni v kubično rešetko v obliki preproste,

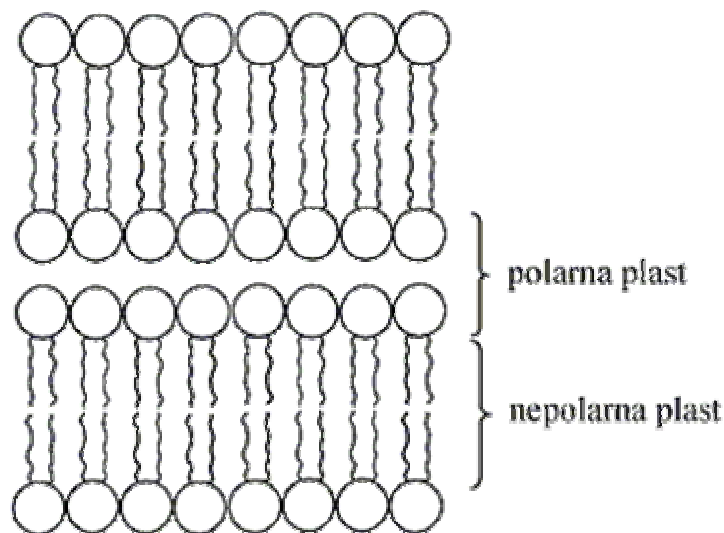
prostorsko ali ploskovno centrirane rešetke. (2, 6, 7).



**Slika 2:** Geometrija hidratiranih molekul PAS: a) stožec, b) valj, c) obrnjen stožec (2).

### 1.1.1.1 Fazni prehodi liotropnih tekočih kristalov

Molekule v obliki valja se urejajo v plasti (izmenjaje polarne in nepolarne (slika 3)) in tvorijo lamelarne faze.



**Slika 3:** Osnovna struktura lamelarnih faz z označenimi plastmi.

Voda oz. vodne raztopine se vežejo na polarne glave PAS oziroma se vključijo med plasti, zaradi česar se poveča njihova debelina, medtem ko se nepolarne molekule vključijo med lipofilne repe PAS. Z večanjem količine topila oziroma debeline lamelarnih faz se lahko molekule topila začnejo vključevati tudi med posamezne molekule PAS, kar povzroči

spremembo njihove oblike iz valjaste v stožčasto, kadar je topilo voda, oz. v obrnjen stožec v primeru lipofilnega topila. Posledično pride do spremembe asociacijskih struktur iz lamelarnih v heksagonalne oziroma reverzne heksagonalne strukture. Heksagonalne faze lahko sprejmejo le omejeno količino topila. Z nadaljnjim dodajanjem topila pride do nastanka kubičnih faz tipa I ali obrnjenih kubičnih faz tipa IV, ki jih sestavljajo sferični oziroma inverzni miceli. Med lamelarnimi in heksagonalnimi fazami pa lahko nastane še ena vrsta TK, in sicer kubična faza tipa II, kadar je topilo polarno, in kubična faza tipa III, kadar je topilo nepolarno. Prehodi med posameznimi fazami so predstavljeni na sliki 4. Nastanejo lahko tudi nematične (med strukturami TK in izotropno micelarno raztopino), holestrične in še nekatere druge vmesne faze. Pričakujemo lahko torej nastanek več različnih tipov liotropnih mezofaz, odvisno od koncentracije mezogena, lipofilnih oz. hidrofilnih lastnosti topila ter od lastnosti same molekule PAS, vsi naštetni tipi mezofaz pa ne nastanejo vedno (2, 6, 7). S spreminjanjem temperature lahko pride tudi do termotropnih faznih prehodov, posledično poleg liotropnih mezofaz hkrati nastanejo tudi različne faze termotropnih TK (8).



**Slika 4 :** Fazni prehodi liotropnih tekočih kristalov (2).

### 1.1.1.2 Heksagonalne faze

Heksagonalne faze nastanejo v širokem temperaturnem območju, kadar je koncentracija PAS 30–50%. Sestavljene so iz tesno zloženih paličastih agregatov heksagonalne oblike (slika 5b). Viskoznost sistema se z nastankom heksagonalnih struktur močno poveča, kar je posledica njihove dvodimenzionalne ureditve; gibljejo se lahko le vzdolž svoje dolžine. Glede na polarnost zunanje faze lahko nastanejo poleg heksagonalnih faz ( $H_1$ ) tudi reverzne heksagonalne faze ( $H_2$ ), kjer so polarne glave molekul PAS usmerjene v notranjost heksagonalnih struktur (slika 5c). Vmesni prostor med sosednjimi cilindri je zapolnjen s hidrofobnimi verigami, zato pride do tesnejšega urejanja, posledično pa je

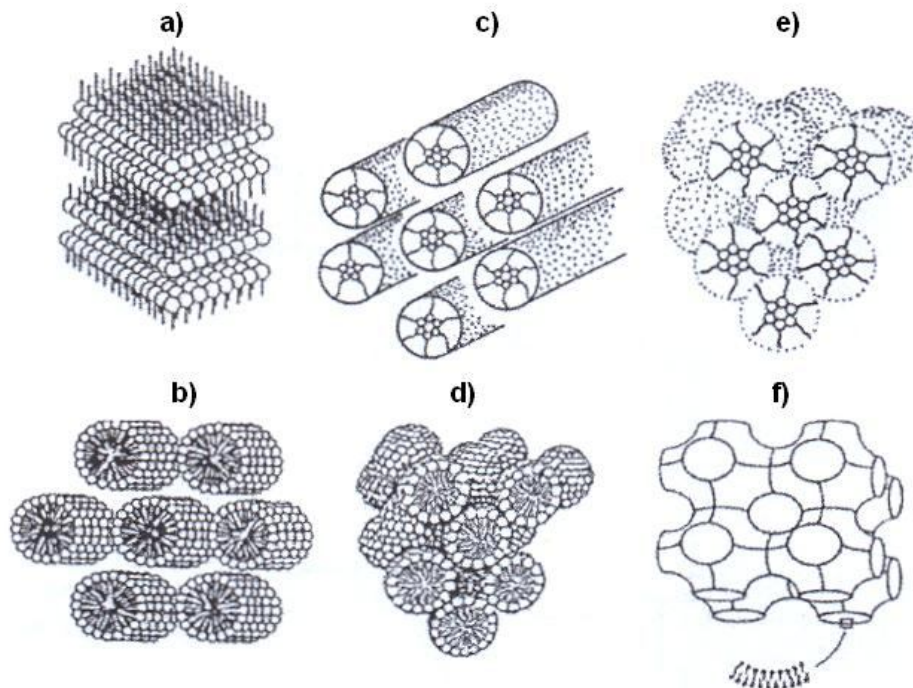
koncentracijsko območje nastanka reverzних heksagonalnih faz v primerjavi z normalnimi heksagonalnimi fazami manjše.

### **1.1.1.3 Lamelarne faze**

Lamelarne faze nastanejo pri višjih koncentracijah PAS kot heksagonalne faze, njihov nastanek pa označuje drastičen padec viskoznosti v primerjavi s heksagonalnimi strukturami. Navadno nastanejo v najširšem koncentracijskem in temperaturnem območju. Sestavljene so iz dvoplasti PAS, ki niso lateralno omejene (slika 5a). Njihova debelina je približno enaka eni do dvema dolžinama PAS, ki jo tvori. Plasti lahko drsijo druga ob drugi, njihovo gibanje je omejeno le z ravnino plasti, kar pojasnjuje nižjo viskoznost teh struktur. Glede na urejanje molekul delimo lamelarne strukture na tri podskupine. Tekoče lamelarne faze ( $L\alpha$ ) so najmanj urejene. Gibanje znotraj plasti ni omejeno, saj so lipofilne verige gibljive, prihaja do interakcij med molekulami v posamezni plasti, možni, čeprav redki, pa so tudi premiki molekul med posameznimi plastmi. Pod temperaturo »taljenja« lipofilnih verig je gibljivost lipofilnih verig omejena, kar omogoča urejanje v lamelarne gelske faze ( $L\beta$ ) in lamelarne kristalinične faze ( $L_c$ ). Pri  $L\beta$  fazah so verige v trans konfiguraciji in delno urejene.  $L\beta$  faze delimo na tiste, pri katerih so lipofilne verige pravokotne na ravnino plasti ( $L\beta$ ) in tiste, pri katerih verige izkazujejo določen odklon od pravokotnice na ravnino plasti ( $L\beta'$  in  $L\beta_I$ ). V  $L_c$  fazah so verige »zamrznjene« v rešetko in so najbolj urejena oblika lamelarnih faz.

### **1.1.1.4 Kubične faze**

Kubične faze so izotropne, posledično edine ne izkazujejo dvolomnosti. Zanje je značilna visoka viskoznost, ki je posledica tridimenzionalne ureditve agregatov. Prav zaradi tega razloga jih lahko opredelimo kot TK, čeprav nimajo orientacijske urejenosti. Sferični agregati tvorijo fazo tipa I (slika 5d) oziroma v primeru reverzних micelov fazo tipa IV (slika 5e), le-ta je vmesna faza med izotropno micelarno raztopino in heksagonalno fazo. Faza tipa II (slika 5f) oziroma reverzna faza tipa III sta sestavljeni iz agregatov paličaste oblike in nastaneta med heksagonalno in lamelarno fazo. Za razliko od diskontinuiranih kubičnih faz tipa I in IV so kubične faze tipa II in III bikontinuirane (2, 6, 7, 9).



**Slika 5:** Molekularne strukture liotropnih tekočih kristalov: a) lamelarna; b) heksagonalna; c) inverzna heksagonalna; d) kubična tip I; e) inverzna kubična tip IV; f) kubična tip II (2).

## 1.2 METODE ZA DOLOČANJE FIZIKALNO–KEMIJSKIH LASTNOSTI TEKOČIH KRISTALOV

Za določitev tipičnih struktur TK so na voljo različne metode, ki skupaj dajejo komplementarne rezultate. Ključne informacije o strukturi dobimo z neposrednimi metodami kot so polarizacijska in presečna elektronska mikroskopija, rentgensko sipanje, mikroskopija na atomsko silo, jedrska magnetna resonanca ter posrednimi metodami kot so reologija in diferenčna dinamična kalorimetrija. Pri načrtovanju TK kot dostavnih sistemov lahko z omenjenimi metodami dobimo informacije o vplivu vgrajene zdravilne učinkovine na strukturo sistema.

Makai in sodelavci so proučevali lamelarne TK, ki jih tvori Brij 96 ob dodatku vode v določenem koncentracijskem območju. Z namenom razvoja sistemov z relativno nizko vsebnostjo emulgatorja so TK dodali kratkoverižni alkohol glicerol ter dodatno še tekoči parafin za povečanje solubilizacijske kapacitete. Glicerol in tekoči parafin nista povzročila signifikantne razlike v strukturi lamelarnih TK, kar so dokazali s polarizacijsko in presevno

elektronsko mikroskopijo ter reološkimi meritvami. Ugotovitve so potrdili tudi z metodo ozkokotnega rentgenskega sipanja, s katero so ugotovili, da se razdalja med plastmi veča z večanjem koncentracije glicerola. Nadalje so v TK vgradili modelni učinkovini, ki se bistveno razlikujeta v topnosti, in sicer skoraj netopen tenoksikam ali zelo topen efedrinijev klorid, oba v koncentraciji 1%. Vzorci z vgrajeno zdravilno učinkovino so prav tako obdržali lamelarno strukturo, kar so potrdili z ozkokotnim rentgenskim sipanjem in reološkimi meritvami (10).

Harms in sodelavci so preučevali vpliv temperature in vsebnosti vode na fazne prehode sistema s sestavo lecitin/izopropil miristat/voda. Ugotovili so, da s segrevanjem pride do spremembe strukture sistema iz lamelarnih tekočih kristalov v reverzno micelarno raztopino. Pri tem so uporabili različne tehnike kot so ozkokotno rentgensko sipanje, presečna elektronska mikroskopija in polarizacijska mikroskopija (8).

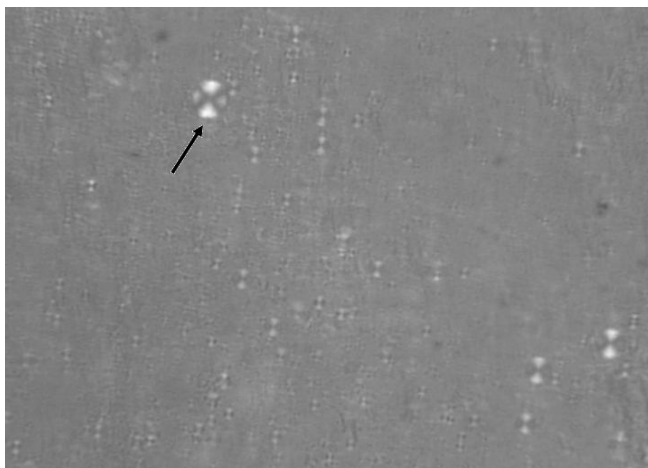
### **1.2.1 POLARIZACIJSKA MIKROSKOPIJA**

Tako kot kristali so tudi TK, z izjemo kubičnih mezofaz, optično anizotropni in zato izkazujejo dvolomnost, ki jo opazujemo pod polarizacijskim mikroskopom. Optična anizotropija pomeni, da se svetloba različno obnaša pri prehodu skozi snov v različnih smereh.

Pri polarizacijskem mikroskopu imamo dva polarizatorja, med katera vstavimo preiskovani vzorec. Če polarizirana svetloba potuje skozi optično izotropni vzorec se njena polarizacija ne spremeni in skozi drug polarizator (analizator), ki je pravokoten na prvega, ne preide nič svetlobe, vidimo črno. V primeru anizotropnega vzorca pa del svetlobe lahko preide drugi polarizator, ker vzorec rotira polariziran žarek svetlobe, vidimo svetlo.

Ker skozi vzorec pošiljamo belo svetlobo, izkazujejo vsi tekoči kristali pod polarizacijskim mikroskopom tipično črno - belo teksturo. Heksagonalne mezofaze prepoznamo po pahljačasti teksturi, ki je posledica stožčaste oblike PAS v osnovni strukturi stolpca. Za lamelarne mezofaze so značilne oljne črte z malteškimi križi. Ti nastanejo zaradi defektov imenovanih konfokalna področja, ki se pojavijo zaradi koncentrične razporeditve vodoravnih plasti. V nekaterih lamelarnih mezofazah ti defekti prevladujejo in takrat ne pride do pojava oljnih črt, ampak so malteški križi prevladujoča struktura (2).





**Slika 6:** Malteški križi (primer nakazan s puščico), ki so značilni za lamelarne tekoče kristale pod polarizacijskim mikroskopom.

### 1.2.3 PRESEVNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Presevna elektronska mikroskopija (TEM) vzorec presvetli in omogoča proučevanje notranjosti sistema oziroma mikrostrukture TK. Zaradi visokega vakuuma v elektronskem mikroskopu pride pri vodnih vzorcih do izgube vode in s tem do sprememb v mikrostrukturi, zato so potrebne posebne tehnike priprave vzorcev. Za uspešno se je izkazala tehnika zamrzovalnega lomljenja, kjer naredimo repliko vzorca in le-to opazujemo pod elektronskim mikroskopom (FF-TEM).

Vzorec najprej hitro zamrznemo pri zelo nizki temperaturi (s tekočim propanom pri  $-196^{\circ}\text{C}$  ali tekočim dušikom pri  $-210^{\circ}\text{C}$ ), nato izvedemo lomljenje. Pri homogenem vzorcu se lom zgodi naključno, ker imajo vsi strukturni elementi enake možnosti lomljenja. Vendar ima pogosto tudi homogen vzorec področja z različno polarnostjo. Lom je bolj verjeten med nepolarnimi kot med polarnimi področji, ker so med slednjimi močnejše interakcije zaradi vodikovih vezi, ki preprečujejo lom. Profil vzorca po lomljenju zato predstavlja njegovo mikrostrukturo samo kvalitativno ne pa tudi kvantitativno. Po lomljenju površino vzorca naparimo s platino in ogljikom pod kotom  $45^{\circ}$ . Zaradi neravne površine struktur je pod kotom  $45^{\circ}$  naparjena plast platine ponekod debelejša, drugod tanjša. Različne debeline platine pod presevnim elektronskim mikroskopom različno absorbirajo elektrone kar da kontrastno sliko.

S FF-TEM tehniko lahko natančno proučujemo prehode med različnimi fazami liotropnih TK in tako dobimo komplementarne podatke z ostalimi metodami, predvsem z vidika notranje strukture in potencialno prisotnih defektov, bistven prispevek pa je bil narejen na

področju detekcije različnih kubičnih faz (2, 11).

#### **1.2.4 RENTGENSKO SIPANJE**

Metode sipanja so ene izmed najpogosteje uporabljenih metod pri strukturnih raziskavah koloidnih sistemov. Z dobljenimi rezultati pogosto nadgradimo informacije o strukturi, ki jih dobimo z ostalimi metodami (12). V TK zaznamo Braggovo sipanje, če je valovna dolžina svetlobe primerljiva z velikostjo molekul oziroma z razdaljo med plastmi, zato uporabljamo rentgensko sipanje, saj so tipične valovne dolžine rentgenske svetlobe okoli 0,1 nm.

Pri rentgenskem sipanju beležimo kotno odvisnost intenzitete sipane svetlobe, kjer urejena mikrostruktura TK daje značilne interference. Tipični interferenčni vzorec nastane zaradi značilnih ponovitev razdalj med plastmi.

Večje razdalje med plastmi v širšem območju zaznamo s tehniko ozkokotnega rentgenskega sipanja (SAXS) medtem ko manjše razdalje med plastmi v ožjem območju zaznamo s tehniko širokokotnega rentgenskega sipanja (WAXS). SAXS je pomemben za natančno določanje razdalj med plastmi v TK, z WAXS pa lahko pri TK ugotovimo izgubo urejenosti v ožjem območju, ki se kaže kot odsotnost interferenc, značilnih za kristalno stanje (2). Pri lamelarnih liotropnih TK je navadno razdalja med posameznimi plastmi 3-4 nm, širina vrinjenih plasti vode pa 2 nm, v odvisnosti od temperature in koncentracije v mejnih področjih lamelarnih plasti. Konfiguracija molekul PAS oz. verig ter nagnjenost molekul znotraj plasti pa vplivata na odklon od določene vrednosti. Premer cilindrov heksagonalne faze je za faktor 1,3-2 večji od dolžine verige PAS, medtem ko je vmesna razdalja med sosednjimi cilindri 5 nm oziroma 0,8-3 nm v primeru reverzних faz (7).

SAXS metoda ne samo, da zazna interference iz katerih izračunamo razdalje med plastmi, ampak tudi omogoča, da se iz zaporedja interferenc določi tip tekočih kristalov. Zaporedja za različne TK so:

- lamelarni:  $1:1/2:1/3:1/4...$
- heksagonalni:  $1:1/\sqrt{3}:1/\sqrt{4}:1/\sqrt{7}...$
- kubični:  $1:1/\sqrt{2}:1/\sqrt{3}:1/\sqrt{4}...$  oziroma  $1:1/\sqrt{4}:1/\sqrt{5}:1/\sqrt{6}...$  (2).

#### **1.2.5 JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA**

Ena najbolj pomembnih lastnosti TK je njihova orientacijska urejenost. Za določitev

ureditvenega parametra se uporabljajo različne metode, vendar daje jedrska magnetna resonanca (NMR) najbolj natančne informacije, saj lahko jasno ločimo med prispevki različnih molekularnih segmentov. Pogosto uporabljane NMR tehnike so  $^1\text{H}$  NMR,  $^2\text{H}$  NMR in  $^{13}\text{C}$  NMR (13).

### **1.2.6 MIKROSKOPIJA NA ATOMSKO SILO**

Princip delovanja mikroskopa na atomsko silo temelji na merjenju medatomske sile med ostro preiskovalno konico nanometerskih dimenzij in površino vzorca. Prednosti mikroskopije na atomsko silo (AFM) so visoka ločljivost in enostavna priprava vzorcev, ker za delo ne potrebujemo vakuumu. Obstaja več načinov delovanja AFM: pri kontaktnem načinu je konica v stiku s površino vzorca, pri nekontaktnem načinu pa konica in vzorec nista v neposrednem fizičnem stiku, kar omogoča snemanje zelo občutljivih vzorcev. Obstaja še način snemanja s kontaktom v presledkih, ki je prav tako primeren za občutljive materiale, vendar so mehke površine lahko problematične, možna je kontaminacija konice (14).

AFM se predvsem uporablja za preučevanje lipidnih dvoslojev, za katere je značilno urejanje v različne lamelarne faze. Mnogo biološko pomembnih procesov namreč poteka v tekočerkristalnih fazah, zato so pomembne študije strukturnih in mehanskih lastnosti teh faz, kjer AFM omogoča opredelitev topografskih lastnosti v tekočem mediju (15).

### **1.2.7 REOLOGIJA**

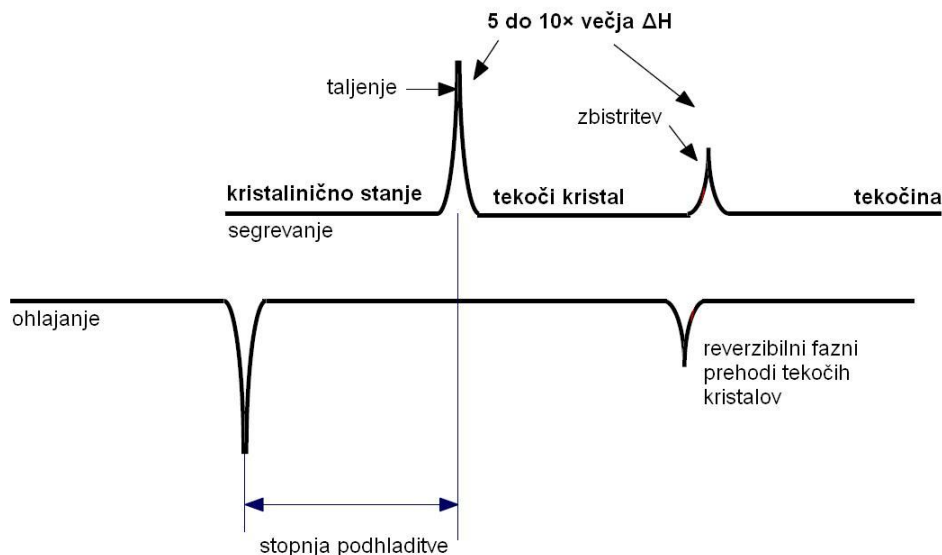
Sisteme v grobem delimo na idealne ali Newtonske in realne ali ne-Newtonske. Newtonski sistemi so idealizirane tekočine (plini, voda, raztopine topljencev z nizko molekulsko maso, mineralna olja), pri katerih je viskoznost neodvisna od delovanja sile na sistem in njenega trajanja. Realne kapljevine, poltrdni in trdni sistemi pa se v glavnem obnašajo ne-Newtonsko in so bolj kompleksni. Njihova viskoznost je odvisna od obremenitve, kar pomeni od delovanja mehanske sile na sistem, za nekatere sisteme pa tudi od časa delovanja le-te (16).

Različni tipi TK izkazujejo različne reološke lastnosti. Z večanjem urejenosti v mikrostrukturi TK se povečuje tudi viskoznost. Koefficient dinamične viskoznosti  $\eta$ , ki opisuje viskoznost Newtonskih sistemov, je velik za kubične in heksagonalne mezofaze in nižji za lamelarne. Viskoznost kubičnih in heksagonalnih mezofaz je velika zaradi

tridimenzionalne in dvodimenzionalne urejenosti, medtem ko imajo lamelarne mezofaze zaradi enodimenzionalne urejenosti na dolge razdalje manjšo viskoznost. Vendar je treba opozoriti, da ti sistemi izkazujejo pretočne lastnosti, ki niso Newtonske ampak plastične v primeru kubičnih in heksagonalnih mezofaz ter psevdoplastične v primeru lamelarnih mezofaz (6).

### 1.2.8 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

Termična analiza meri toplotne ali temperaturne spremembe vzorca pri segrevanju ali ohlajanju. Predvsem diferencialna dinamična kalorimetrija (DSC) je zelo primerna metoda zaradi svoje enostavnosti in cene izvedbe. Fazne prehode spremlja sprememba v prosti energiji in so posledica spremembe v entalpiji ( $\Delta H$ ) ali entropiji ( $\Delta S$ ) sistema. Spremembe v entalpiji se kažejo kot endotermni ali eksotermni signali v odvisnosti od tega, ali pride do porabljanja energije (npr. taljenje trdne snovi) ali sproščanja energije (npr. rekristalizacija izotropne taline). Prehod iz kristalnega v amorfno stanje zahteva veliko energije. Prehod iz kristalnega v tekoče kristale ali iz tekočih kristalov v amorfno stanje pa tako kot prehod med različnimi kristalnimi stanji porabi majhne količine energije. Zato moramo biti pozorni, da ima merilna naprava primerno občutljivost in dovolj nizko mejo detekcije.



**Slika 7:** DSC krivulja tekočih kristalov.

Entropijsko povzročene fazne prehode lahko prepoznamo s spremembo naklona bazne linije, kateri nastane zaradi spremembe specifične toplotne kapacitete. Takšni fazni prehodi so zlasti opazni pri polimernih tekočih kristalih: so entropijsko odvisni in jih smatramo za

prehode drugega reda, kar običajno imenujemo steklasti prehod. Spremlja jih lahko entalpijski efekt, ki otežuje njihovo detekcijo (6).

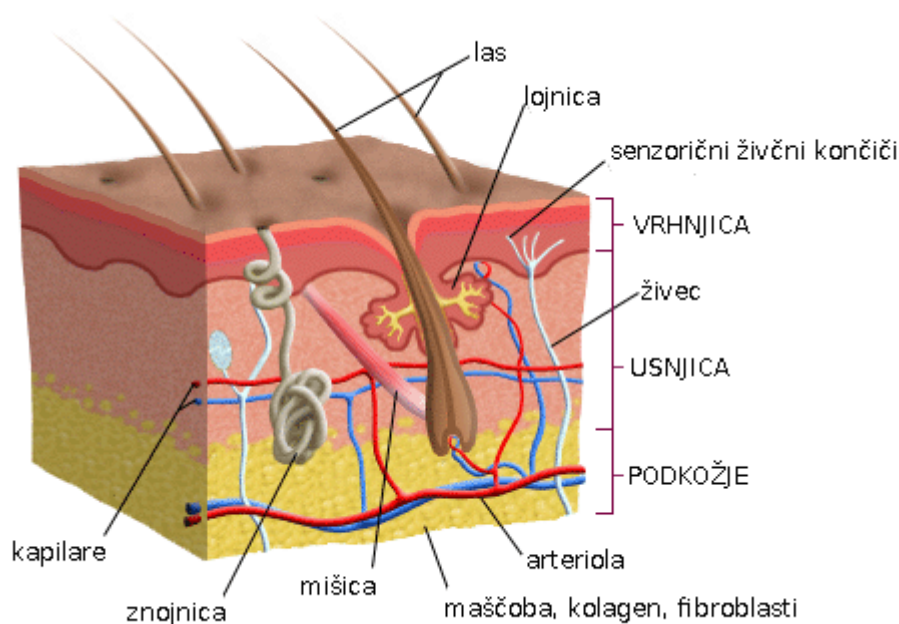
### 1.3 KOŽA KOT MESTO DERMALNE APLIKACIJE

Koža je največji organ človeškega telesa. Ima več življenjsko pomembnih funkcij in sicer služi kot zaščita pred škodljivimi zunanjimi vplivi (fizikalnim, kemičnim, mikrobiološkim) ter skrbi za termoregulacijo in izločanje snovi.

#### 1.3.1 ZGRADBA KOŽE

Sestavljajo jo tri plasti:

- zunanja plast - povrhnjica (epidermis)
- srednja plast – usnjica (dermis)
- spodnja plast – podkožje (subcutis) (17).



**Slika 8:** Zgradba kože (18).

Povrhnjica je najtanjša plast kože, sestavljena pretežno iz keratinocitov (80%). Poleg njih jo sestavljajo še melanociti, Langerhansove celice, Merkllove celice in druga tipalna

telesca. Povrhnjico delimo na štiri plasti, ki si od notranjosti proti zunanosti sledijo v naslednjem vrstnem redu: bazalna plast (*stratum basale*), trnasta plast (*stratum spinosum*), zrnata plast (*stratum granulosum*) in rožena plast (*stratum corneum*) (17). Vsaka od teh plasti predstavlja različno stopnjo razvoja v življenju keratinocitov. Ti kontinuirano nastajajo v bazalni plasti, migrirajo proti zunanosti in se v trnasti plasti diferencirajo. Keratinociti v trnasti plasti imajo jedro in proizvajajo keratin, celične delitve v tej plasti ni več. V granularni plasti so celice precej ploščate, vendar še imajo razpoznavno jedro in proizvajajo velike količine keratina, polisaharidov, glikoproteinov in lipidov, ki povezujejo celice zunanje plasti kože med seboj. V roženi plasti celice nimajo jedra in niso metabolično aktivne. Ima pa ta plast pomembno barierno funkcijo in veliko vlogo pri preprečevanju transepidermalne izgube vode iz telesa (19).

Za keratinocite je značilno, da vsebujejo submikroskopske keratinske niti in dezmosome, ki imajo nastavke tako zunaj kot znotraj celic. Dezmosomi na zunanji strani celične membrane služijo medsebojnim povezavam sosednjih celic, znotrajcelični del pa je povezan s keratinskimi vlakni in služi kot sidrišče znotrajceličnega ogrodja. Te povezave znotraj in zunaj celice tvorijo močno nadcelično mrežo vlaken, ki je bistvena za celovitost zgradbe epidermisa. Usnjica leži pod povrhnjico in se deli na papilarno plast (*stratum papillare*) in retikularno plast (*stratum reticulare*). Glavne celice usnjice so fibroblasti, ki so metabolično zelo aktivni in proizvajajo kolagen, elastin in osnovno substanco. Usnjica je tudi bogata s krvnim in limfnim žiljem, prisotne so žleze lojnice in znojnice, živci in čutilna telesca ter koreninske čebulice las. Pod usnjico se nahaja podkožje, ki sestoji iz rahlega veziva in maščobnih celic (17).

### **1.3.2 UPORABA TEKOČIH KRISTALOV ZA DERMALNO APLIKACIJO**

TK se v farmaciji uporabljajo kot koloidni nosilni sistemi za različne aplikacije, in sicer oralno, nazalno, rektalno, parenteralno in dermalno. Predvsem za slednjo izkazuje veliko prednosti. Specifična struktura PAS, ki se klasično uporabljajo kot solubilizatorji, emulgatorji ali močljivci v farmacevtskih oblikah za dermalno uporabo, omogoča nastanek TK pri višjih koncentracijah. Za dermalno uporabo so primerni predvsem liotropni TK z lamelarno strukturo. Njihove prednosti so velika sposobnost solubilizacije, enostavna izdelava, termodinamska stabilnost, medtem ko strukturna podobnost z medceličnimi lipidi v povrhnjici omogoča povečano sproščanje in dermalno absorpcijo učinkovin brez iritacije kože. Povečano dermalno absorpcijo poleg interakcij z intercelularnimi lipidi omogoča

tudi nizka medfazna napetost TK, ki jo dosežemo z uporabo neionskih PAS. Nadalje, lamelarna struktura TK omogoča vključitev vode v hidrofilna področja dvoslojev. Na ta način se v primerjavi s hidrofilnimi emulzijami zmanjša izhlapevanje vode in poveča hidratacija kože. Posledično so pogosta sestavina dermalnih in kozmetičnih izdelkov z vlažilnim delovanjem, saj imajo ugodno konsistenco in puščajo prijeten občutek na koži. V dermalnih pripravkih se prav tako uporabljajo za zaščito občutljivih snovi kot so vitamini in antioksidanti (10, 20, 21, 22). TK so zelo pomembni tudi za stabilizacijo hidrofilnih emulzij in krem, saj zaradi presežka PAS (pogosto zaradi dodatka maščobnih alkoholov) okrog kapljic notranje faze nastanejo področja TK, kar poveča viskoznost in ovira gibanje kapljic, ter tako posledično poveča fizikalno stabilnost sistema (22, 23).

Makai in sodelavci so dokazali, da so lamelarni TK s sestavo Brij 96/glicerol/tekoči parafin/destilirana voda primerni za vgradnjo tako lipofilne (tenoksikam) kot tudi hidrofilne (efedrinjev hidroklorid) učinkovine; za slednjo so dokazali tudi podaljšano sproščanje (10).

Nesseem je v svoji študiji dokazala, da so tekoči kristali primeren sistem za dermalno dostavo itrakonazola. Itrakonazol, vgrajen v kremo z lamelarnimi TK, je izkazoval boljšo protimikrobno aktivnost v primerjavi s hidrofilnim gelom (enofazni sistem) ali hidrofilno kremo (dvofazni sistem) (21).

Libster in sodelavci so preučevali vpliv vgradnje večje količine ciklosporina A in pospeševalcev dermalne absorpcije kot so Labrasol, etanol in fosfatidilholin na strukturo heksagonalnih faz TK za dermalno uporabo s sestavo monoolein/trikaprilin/voda. Za ugotavljanje mikrostrukturnih karakteristik so uporabili reološka merjenja, DSC in SAXS. Dokazali so, da fosfatidilholin izboljša elastične lastnosti reverzних heksagonalnih faz in poveča njihovo termično stabilnost. Nasprotno pa vgradnja ciklosporina A reverzne heksagonalne faze destabilizira, posledično se bistveno spremenijo reološke lastnosti sistema. Destabilizacijski efekt ima tudi vgradnja večjih količin Labrasola, medtem ko etanol, v kolikor masno razmerje etanol/voda ni večje od 0,20, strukture ne poruši (24).

## **1.4 IRITACIJA KOŽE**

Kontaktni dermatitis je nespecifičen izraz za vsako vnetje kože, do katerega pride zaradi stika z iritantom ali alergenom. V osnovi ločimo dve vrsti kontaktnega dermatitisa: iritativni kontaktni dermatitis (IKD) in alergijski kontaktni dermatitis. Nadalje lahko IKD razdelimo na akutni IKD, kronični oziroma kumulativni IKD in zakasneni akutni IKD.

Tako pri alergijskem kot pri iritativnem kontaktnem dermatitisu je klinična slika podobna in sicer se pri obeh pojavijo srbečica, rdečica in kožne spremembe.

IKD je vnetna reakcija kože, ki nastane kot odgovor na zunanje dražeče dejavnike (kemične ali fizikalne) medtem, ko je za nastanek alergijskega kontaktnega dermatitisa potrebna predhodna senzibilizacija imunskega sistema na alergen (25). Akutni IKD nastane kmalu, v nekaj urah ali celo minutah, po enkratni izpostavitvi kože močnemu iritantu. Nekateri kemikalije povzročijo akutno iritacijo z zakasnjnim učinkom, kjer se znaki in simptomi pojavijo 12 do 24 ali celo več ur po enkratni izpostavitvi iritantu. Kronični IKD se razvije po dolgotrajnem ali ponavljajočem izpostavljanju kože blagim iritantom (26).

#### **1.4.1 MEHANIZMI NASTANKA IRITACIJE**

Iritant je katerakoli snov, ki lahko poškoduje celice kože, če je v stiku z njimi dovolj dolgo in v zadostni koncentraciji (25). Dejansko je vsaka snov potencialen iritant, po dolgotrajni izpostavitvi celo voda (28).

Iritanti povzročijo iritacijo kože po najmanj dveh poteh, in sicer z zmanjšanjem barijerne funkcije rožene plasti in z direktnim vplivom na keratinocite. V roženi plasti pride do denaturacije proteinov, poruši se razmerje lipidov in pride do povečane transepidermalne izgube vode. Vse te spremembe privedejo do povečane penetracije iritantov v globlje plasti kože, kjer vplivajo na celice. Učinek iritantov na celice je najbolj raziskan za PAS, predvsem zaradi uporabe natrijevega lavrilsulfata (SDS) kot referenčne substance za določanje iritacije. PAS poškodujejo celično membrano in tako sprostijo citoplazmo, ki vsebuje pro-vnetni citokin IL-1 $\alpha$ , ki ima pomembno vlogo pri nastanku vnetja zaradi indukcije ekspresije ostalih citokinov ter aktivacije fosfolipaze A2, ki je ključni encim v kaskadi arahidonske kisline (28). Ti mediatorji so pomembni za kemotakso in aktivacijo vnetnih celic v usnjici, zlasti limfocitov T in s tem v razvoj IKD vpletejo tudi imunske mehanizme (29). Iritanti vplivajo na celično membrano tudi tako, da modulirajo lipidni dvosloj in s tem spremenijo fluidnost membrane ter tako vplivajo na transdukcijo, kar podpira oziroma inicira vnetni odgovor. Tisti iritanti, ki ne poškodujejo celične membrane, vnetnega procesa ne inicirajo zgolj s sproščanjem IL-1 $\alpha$ , temveč povzročijo spremembe v fiziologiji keratinocitov. Določeni iritanti lahko povzročijo oksidacijski stres s tem, ko povečajo količino reaktivnih kisikovih snovi, ki se sicer v manjših količinah tvorijo v keratinocitih že v fizioloških pogojih. Reaktivne kisikove spojine v večji količini povzročijo oksidacijo nukleinskih kislin, proteinov in membranskih lipidov, kar vodi v



spremenjeno ekspresijo genov in citotoksičnost (28).

#### 1.4.2 VREDNOTENJE IRITANTOV

Za zagotavljanje varnosti izdelkov za dermalno uporabo je potrebno vsako substanco in pripravke, ki so namenjeni uporabi na koži, opredeliti z vidika iritacije kože. Tradicionalno so iritante določali z Draize-ovim testom na živalih (kuncih), ki pa ni več v uporabi od marca 2009, ko je v veljavo stopil sedmi amandma k direktivi o kozmetičnih izdelkih, ki prepoveduje preskušanje sestavin ali kombinacije sestavin na živalih in prodajo izdelkov testiranih na živalih (30). Še pred prepovedjo testiranja na živalih so razvili alternativne metode za določanje iritantov, tako *in vitro* kot tudi *in vivo* na ljudeh.

Epikutani test je bil razvit kot del strategije za nadomestitev testiranja na živalih. Je relevantna alternativa Draize testu, uporablja se isti tarčni organ (živo kožo) in opazuje isti toksični vpliv (iritacijo). Izvedemo ga tako, da 30-im prostovoljcem s posebnimi obliži naneseemo testne substance na kožo nadlakti in pustimo delovati v časovnem intervalu 15 in 30 minut ter 1, 2, 3 in 4 ure. S tem se izognemo potencialnim zelo hudim reakcijam na koži. Po odstranitvi obliža vrednotimo spremembe na koži po 24ih, 48ih in 72ih urah. Reakcijo vrednotimo s štiristopenjsko lestvico, kjer 0 pomeni odsotnost reakcije s +, ++ in +++ pa opredelimo jakost vnetne reakcije. Kot pozitivna kontrola se uporablja 20% raztopina SDS, kar je minimalna koncentracija SDS, ki je še klasificirana kot iritant z oznako R38; s slednjo označujemo spojine, ki dokazano povzročajo iritacijo kože. Če je stopnja vnetne reakcije pri testni substanci signifikantno manjša kot pri 20% SDS te substance ne opredelimo kot iritabilno (31).

Pri določanju iritacije *in vitro* so se pri razvoju metod osredotočili na keratinocite zaradi njihove pomembne vloge pri iniciaciji, modulaciji in regulaciji iritacije kože; razvili so rekonstruirane kožne modele sestavljene iz keratinocitov. Prednost rekonstruiranih kožnih modelov pred uporabo keratinocitov kot celičnih kultur je v tem, da lahko testiramo tudi slabo vodotopne in končne formulacije. Pri celičnih kulturah keratinocitov je tudi težja interpretacija rezultatov in korelacija z *in vivo* sistemom, ker iritacijo izzovejo nekaj stopenj nižje koncentracije kot na koži (28). Evropski center za validacijo alternativnih metod (EVCAM) je do sedaj priznal 3 rekonstruirane kožne modele za vrednotenje iritacije, ki so ustrezna alternativa Draize testu in sicer: EpiDerm™, EpiSkin™ in SkinEthic™ (32).

Rekonstruirani kožni modeli v primerjavi s človeško kožo izkazujejo večjo stopnjo

penetracije, kar je lahko pozitivno pri testiranju spojin, ki so blagi iritanti. Glavna pomanjkljivost teh modelov je odsotnost klinične slike. Za nastanek le-te je namreč potrebna prisotnost kožnega krvnega obtoka, imunskih celic, živcev, ki pri *in vitro* modeli manjkajo. Raziskovalci so za oceno iritacije tako primorani uporabiti bolj prefinjene parametre, kot so določanje celične proliferacije (npr. z MTT oz. MTS testom), sproščanje IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , metabolitov arahidonske kisline,...(28).

### **1.4.3 SESTAVINE TEKOČIH KRISTALOV Z VIDIKA IRITACIJE KOŽE**

Pri TK je zaradi visoke vsebnosti PAS in nepolarnih topil še posebej pomembno, da uporabimo biokompatibilne, biorazgradljive in neimunogene sestavine, ki so varne in ne povzročajo iritacije tudi pri dolgotrajni uporabi (27).

PAS so amfifilne spojine, sestavljene iz polarne glave in nepolarnega repa, ki lahko zaradi svoje specifične zgradbe izzovejo iritacijo kože po različnih mehanizmih. Iritacijski potencial je odvisen od kemijske strukture PAS (28). Glede na njihovo polarno glavo jih delimo na: anionske (negativno nabita glava), kationske (pozitivno nabita glava), neionske (brez naboja) in zwitterionske (pozitiven in negativen naboj na glavi). Kationske PAS so bolj iritabilne kot ostale skupine PAS, včasih celo toksične, zato jih tudi manj uporabljamo v farmacevtskih pripravkih. Neionske (npr. Tween<sup>®</sup>) in zwitterionske (npr. fosfatidilholin oz. lecitin) PAS so v primerjavi z ionskimi PAS, tako kationskimi kot anionskimi, manj iritabilne in posledično najpogosteje uporabljane PAS v farmacevtskih pripravkih (9).

Lecitin je z vidika varnosti in nizke stopnje iritacije primeren za uporabo kot emulgator v TK. Je biokompatibilen in biorazgradljiv. Dreher in sodelavci so proučevali stopnjo iritacije mikroemulzijskih gelov s sestavo lecitin/izopropilpalmitat (IPP)/voda ter liposomov iz lecitina in dokazali, da imajo zelo nizek potencial tako za akutno kot kumulativno iritacijo kože. Akutno iritacijo kože so testirali na 151 prostovoljcih v 48 urnem epikutanem testu. Samo pri 1-2% prostovoljcev se je pojavil manjši eritem kar kaže na zelo nizko iritabilnost. Za ovrednotenje iritacije kože pri dolgotrajni uporabi so izvedli kumulativni epikutani test iritacije. Pri tem so, tako kot pri določanju akutne iritacije, s posebnim obližem na kožo nanесли testirani vzorec, vendar so ga po 23,5 h odstranili in po 30 min ovrednotili reakcije na koži. Eritem so opredelili na skali od 0 do 4, luščenje na skali od 0 do 3 in ravno tako razpakanost; 0 je pomenila brez reakcije, 4 oziroma 3 najhujšo reakcijo. Nato so na isto mesto dali nov obliž z vzorcem in to ponavljali do ocene skupne iritacije (eritem + luščenje + razpakanost)  $\geq 5$ , oziroma največ 21 dni. Čas, po

katerem so ustavili testiranje, se imenuje iritacijski čas (IT). Iz njega so izračunali  $IT_{50}$ , tj. čas, ko je 50% ljudi imelo skupno iritacijo  $\geq 5$ .  $IT_{50}$  je bil 13 dni za mikroemulzijski gel, 14 dni za liposome in 17 dni za IPP, kar kaže na nizko kumulativno iritacijo kože za vse testirane vzorce (33).

Z vidika sprejemljivosti za kožo so med komponentami, ki imajo v TK vlogo lipofilne faze, najbolj primerni estri maščobnih kislin (npr. IPP, izopropilmiristat (IPM)). So namreč biokompatibilni in biorazgradljivi, poleg tega na koži delujejo kot pospeševalci penetracije (27). IPP in IPM uporabljamo tudi kot oljno fazo pri mikroemulzijah za parenteralno uporabo (34), kar še dodatno potrjuje njihovo primernost za dermalno uporabo.

## 2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela bo vrednotenje notranje strukture in potencialne citotoksičnosti tekočih kristalov z in brez askorbilpalmitata. Tekoči kristali, sestavljeni iz lecitina, Tweena<sup>®</sup> 80, izopropilmiristata in bidestilirane vode, so bili izdelani v okviru predhodnih raziskav na Katedri za farmacevtsko tehnologijo kot novi nosilni sistemi za dermalno dostavo. Kot učinkovino so vanje tudi že vgradili askorbilpalmitat v koncentraciji 1%(m/m).

Najprej bomo s komplementarnima tehnikama, in sicer diferenčno dinamično kalorimetrijo in ozkokotnim rentgenskim sipanjem, ovrednotili strukturo tekočih kristalov z ali brez askorbilpalmitata. Predvsem s tehniko ozkokotnega rentgenskega sipanja želimo potrditi lamelarno strukturo tekočih kristalov in določiti razdaljo med posameznimi plastmi. Difraktograme bomo posneli pri različnih temperaturah in tako pridobili podatke o potencialni spremembi notranje strukture tekočih kristalov pri temperaturi na površini kože (32°C) in telesni temperaturi (37°C) v primerjavi s temperaturo shranjevanja (25°C). Z omenjenima tehnikama bomo tudi ocenili vpliv vgradnje askorbilpalmitata na strukturo.

Nadalje bomo ovrednotili potencialno citotoksičnosti tekočih kristalov z *in vitro* testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze. Uporabili bomo celično linijo keratinocitov, saj so keratinociti prve celice, ki pridejo v stik s tekočimi kristali kot nosilnim sistemom po nanosu na kožo. Učinke tekočih kristalov in posameznih sestavin bomo proučevali v koncentracijskem območju 0,45 – 4,5 mg/ml po štiriurni izpostavitvi. Na podlagi dobljenih rezultatov proliferacije celic bomo izbrali koncentracijo tekočih kristalov, ki se bo izkazala za relativno varno (subtoksično) in preverili vpliv tekočih kristalov na morfologijo keratinocitov pod mikroskopom na atomsko silo. Spremljali bomo obliko in topografske lastnosti ter tako pridobili poglobljene informacije o delovanju tekočih kristalov na keratinocite.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

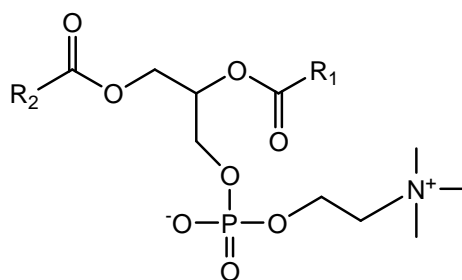
#### 3.1.1 SESTAVINE ZA IZDELAVO TEKOČIH KRISTALOV

##### Lipoid S-100<sup>®</sup> (Lipoid GmbH, Nemčija)

Izraz lecitin označuje kompleksno zmes fosfatidov (fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin in fosfatidilinozitol) v kombinaciji z različnimi količinami drugih sestavin kot so trigliceridi, maščobne kisline in ogljikovi hidrati (35). Pogosto pa se izraz lecitin uporablja kot sinonim za fosfatidilholin. Delež posameznih sestavin je odvisen od izvora lecitina in stopnje čistote. Sestava vpliva tudi na izgled lecitinov. Lecitin je komponenta celičnih membran, pridobivamo ga iz naravnih virov, predvsem iz sojinih semen in jajčnega rumenjaka (35).

Lipoid S-100<sup>®</sup> je prečiščena vrsta sojinega lecitina, ki ne vsebuje manj kot 94% fosfatidilholina. V manjših količinah vsebuje tudi fosfatidiletanolamin, lizofosfatidilholin, trigliceride, D1- $\alpha$ -tokoferol ter vodo (36). Po izgledu je rumenkasta snov voskaste konsistence z značilnim vonjem.

Ima GRAS status kar pomeni, da je opredeljen kot varna snov. Zaradi svoje biokompatibilnosti in biorazgradljivosti se široko uporablja v farmaciji ter tudi kozmetični in prehranski industriji. V farmaciji se večinoma uporablja kot emulgator in stabilizator v peroralnih, intravenskih, intramuskularnih in dermalnih pripravkih (35).

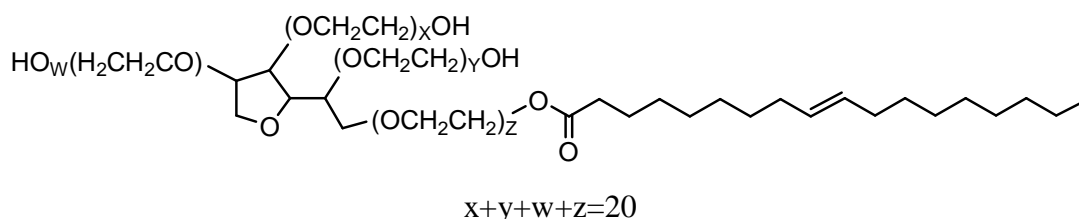


**Slika 9:** Kemijska formula fosfatidilholina; R<sub>1</sub> in R<sub>2</sub> sta maščobni kislini.

##### Tween<sup>®</sup> 80 (Sigma-Aldrich, Nemčija)

Tween 80 (polisorbat 80) je rumena, viskozna, higroskopna tekočina. Kemijsko je polioksietilen (20) sorbitan monooleat. Dobro je topen v vodi, topen je v etanolu, etil

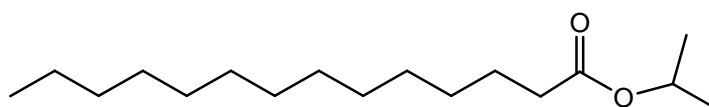
acetatu, metanolu in toluenu. Netopen je v mineralnih oljih. Je hidrofilni neionski emulgator s HLB (hidrofilno–lipofilno ravnotežje) vrednostjo 15. Velja za netoksično snov, ki ne povzroča iritacij. Ima GRAS status. Pogosto se uporablja za izdelavo peroralnih, parenteralnih in dermalnih farmacevtskih pripravkov ter v kozmetiki in prehrabeni industriji (35, 37).



**Slika 10:** Kemijska formula Tweena® 80

### **Izopropilmiristat (Sigma-Aldrich, Nemčija)**

Izopropilmiristat je bistra, brezbarvna tekočina z nizko viskoznostjo. Kemijsko je ester propan-2-ola in miristinske kisline. Topen je v maščobnih oljih, etanolu, acetonu, kloroformu, tekočem parafinu, netopen je v vodi in glicerolu. Odporen je na oksidacijo in hidrolizo. Na koži deluje emolientno. Zaradi svoje netoksičnosti in ker ne povzroča iritacij se široko uporablja v kozmetičnih in dermalnih farmacevtskih pripravkih kot komponenta poltrdnih sistemov ali kot topilo. V transdermalnih pripravkih se uporablja tudi kot pospeševalec absorpcije (35, 37).



**Slika 11:** Kemijska formula izopropilmiristata.

### **Bidestilirana voda**

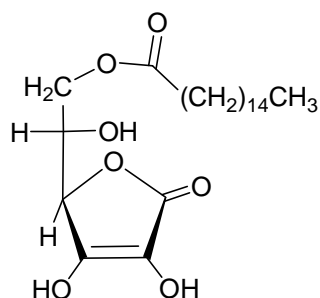
Bidestilirana voda je pridobljena s postopkom dvojne destilacije na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo.

### **Askorbilpalmitat (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)**

Askorbilpalmitat je bel do rumenkast prašek brez vonja. Kemijsko je ester askorbinske in palmitinske kisline in ima tako kot askorbinska kislina antioksidativno delovanje. V

farmacevtski in prehrambeni industriji se uporablja kot učinkovina ali pa kot pomožna snov za antioksidativno zaščito pripravkov in učinkovin. V kombinaciji z  $\alpha$  tokoferolom izkazuje sinergizem in se uporablja kot stabilizator olj v peroralnih farmacevtskih pripravkih (35).

Uporablja se tudi v dermalnih pripravkih, saj zaradi nevtralnega pH ne povzroča iritacije kože, zaradi svoje lipofilnosti pa zlahka prehaja roženo plast kože (38).



**Slika 12:** Strukturna formula askorbilpalmitata.

### 3.1.2 GOJENJE CELIC IN REAGENTI

Celična kultura: Keratinociti (NCTC2544), ICLC, (Univerza v Genovi, Italija)

Medij za gojenje keratinocitov: MEM (Minimum essential medium) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija) z dodatki:

- 10% (v/v) fetalni goveji serum (Gibco® - Invittogen, ZDA)
- 1% (v/v) neesencialne aminokisliline (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- 1% 2mM L-glutamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- 1% antibiotik (penicilin in streptomycin) in antimikotik (amfotericin B) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)

Pufer: fosfatni pufer (PBS) s pH 7,4. Pripravili smo ga tako, da smo natehtali 8g NaCl, 0,2g KCl, 3,63g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  in 0,24g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , soli raztopili v 800ml bidestilirane vode in s HCl uravnali pH na 7,4. Nato smo dopolnili z bidestilirano vodo do 1L, razdelili na alikvote in sterilizirali v avtoklavu (Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija) 20 minut pri 121°C .

Tripsin(0,25% (v/v)) x EDTA (Promega Corporation, ZDA)

MTS reagent: CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Reagent (Promega Corporation, ZDA)

4% paraformaldehid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)

### 3.2 PRIPRAVA TEKOČIH KRISTALOV

V erlenmajerico smo na analitski tehtnici (AG245, Mettler Toledo, Švica) natehtali lecitin, Tween 80 in IPM ter mešali na magnetnem mešalu do nastanka homogene zmesi. Nato smo dodali bidestilirano vodo in ponovno mešali na magnetnem mešalu do homogene zmesi oziroma TK.

Sestava izdelanih TK je prikazana v preglednici I. Pri TK z oznako 4 do 10 je masno razmerje med emulgatorjema Tween 80: lecitin = 1:1, pri TK z oznako 15 do 20 pa je razmerje Tween 80: lecitin = 2:1.

V te sisteme smo vgradili 1% (m/m) AP. AP smo natehtali v zmes emulgatorjev in lipofilne faze in po nastanku homogene zmesi dodali bidestilirano vodo ter mešali do nastanka TK.

**Preglednica I:** Sestava posameznih TK brez AP.

TK	lecitin (%(m/m))	Tween 80 (%(m/m))	IPM (%(m/m))	bidestilirana voda (%(m/m))
4	26,34	26,34	22,56	24,76
5	22,50	22,50	30,00	25,00
7	23,72	23,72	25,56	27,00
8	26,25	26,25	17,50	30,00
9	22,75	22,75	19,50	35,00
10	23,63	23,63	15,74	37,00
15	17,56	35,12	22,56	24,76
16	15,00	30,00	30,00	25,00
17	15,81	31,63	25,56	27,00
18	17,50	35,00	17,50	30,00
19	15,17	30,33	19,50	35,00
20	15,75	31,51	15,74	37,00



### 3.3 METODE ZA STRUKTURNO VREDNOTENJE TEKOČIH KRISTALOV

#### 3.3.1 OZKOKOTNO RENTGENSKO SIPANJE

V tekočih kristalih zaznamo sipanje, če je valovna dolžina svetlobe primerljiva z velikostjo molekul oziroma z razdaljo med plastmi. Zato uporabljamo rentgensko sipanje, saj ima rentgenska svetloba valovno dolžino okoli 0,1 nm.

Po Braggovi enačbi se razdalja med plastmi ( $d$ ) izračuna:

$$d = \frac{n \lambda}{2 \sin \theta} \quad \text{Enačba 2}$$

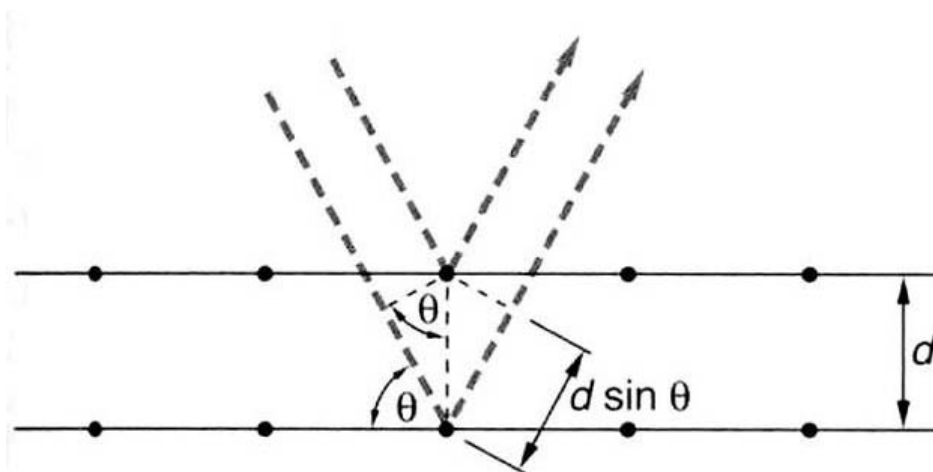
$d$  razdalja med plastmi

$\lambda$  valovna dolžina rentgenskih žarkov

$n$  celo število, ki pove red interference

$\theta$  kot pri katerem se interferenca pojavi

Iz enačbe 2 je razvidno, da je razdalja med plastmi obratno sorazmerna  $\sin \theta$ , kar pomeni, da večja kot je razdalja, manjši je kot, pri katerem se pojavi interferenca (2).



**Slika 13:** Shematski prikaz Braggovega pogoja (39).

Pri difraktogramih imamo na abscisni osi velikost sipalnega vektorja ( $q$ ), ki je predstavljen z enačbo 3.

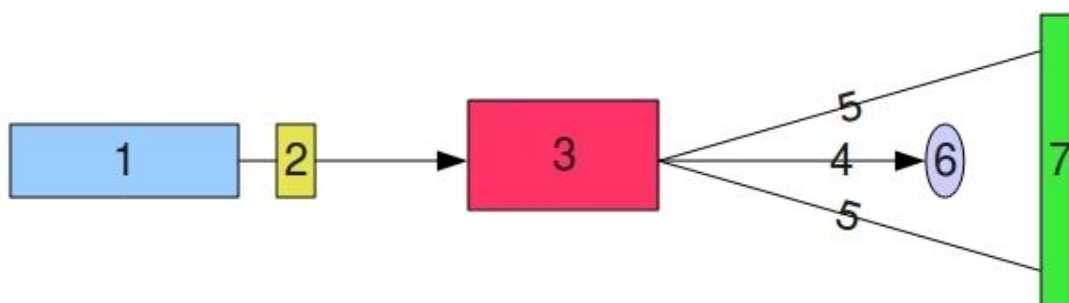
$$q = 4\pi \frac{\sin \theta}{\lambda} \quad \text{Enačba 3}$$

Velikost sipalnega vektorja predstavlja ti. recipročni prostor, ki je obratno sorazmeren realnemu prostoru, oziroma velja recipročna odvisnost med razdaljo  $d$  in velikostjo sipalnega vektorja  $q$ . Informacije o velikih dimenzijah so zato izražene pri majhnih sipalnih kotih in obratno. Sipalna krivulja za večji delec je potisnjena k manjšim sipalnim kotom oziroma k manjšim vrednostim sipalnega vektorja  $q$ . Porazdelitev intenzitete sipanja v recipročnem prostoru je enolično določena z geometrijo sipajočih delcev v realnem prostoru, tj. z njihovo obliko, velikostjo in notranjo strukturo (40).

Pri lamelarnih TK se pojavi Braggovo sipanje z značilnim razmerjem pozicij vrhov, ki je 1:2:3... Iz  $q$  prvega reda ( $q_1, n=1$ ) izračunamo razdaljo med lamelami ( $d$ ) po enačbi 4, ki je kombinacija enačbe 2 in enačbe 3 (41).

$$d = \frac{2\pi}{q_1} \quad \text{Enačba 4}$$

Aparatura za SAXS je shematsko prikazana na sliki 14.



- 1 – izvor rentgenskih žarkov
- 2 – monokromator
- 3 – vzorec
- 4 – prepuščeni žarek
- 5 – sipani žarek
- 6 – blokada prepuščenega žarka
- 7 – detektor

**Slika 14:** Shematski prikaz aparature za ozkokotno rentgensko sipanje.

Meritve smo izvedli s Kratkyjevo kompaktno kamero (Anton Paar, Gradec, Avstrija) z blokovnim kolimacijskim sistemom. Kamera je bila pritrjena na konvencionalni generator rentgenskih žarkov (Bruker AXS, Karlsruhe, Nemčija), opremljen z rentgensko cevjo z bakrovo anodo (z nikljevimi filtrom), katera izseva rentgensko svetlobo  $\text{CuK}_\alpha$  črte z

valovno dolžino 0,154 nm. Generator je deloval pri 35 kV in 35 mA. Vzorce smo prenesli v standarde kapilare iz kvarčnega stekla, postavljene v termostatiran nosilec za kapilaro in umeščene v središče primarnega rentgenskega žarka. Sibalno intenziteto smo detektirali simultano po celotnem območju z linearnim pozicijsko občutljivim detektorjem (PSD 50m, M. Braun, Garsching, Nemčija). Meritve smo izvedli pri 25°C, 32°C in 37°C. Za ustrezno statistiko meritev smo za vsak vzorec posneli 5 SAXS krivulj, čas posamezne meritve je znašal 15000 sekund.

### **3.3.2 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA**

Pri DSC merimo toplotni tok iz ali v vzorec kot funkcijo temperature in časa in opazujemo fizikalne in kemijske spremembe, ki medtem potekajo. Za izvedbo analize namestimo v celico en aluminijast lonček z natančno natehtanim vzorcem in en prazen aluminijast lonček. Merimo razliko v toplotnem toku, ki ga moramo dovajati, da dosežeta oba lončka enako temperaturo. Vzorec lahko energijo porablja (endotermna reakcija) ali sprošča (eksotermna reakcija). Pri endotermnih procesih se temperatura vzorca zniža glede na referenco in je zato potrebno vzorec bolj segrevati, da ohranimo enako temperaturo kot pri referenci. Obratno je pri eksotermnih procesih. Rezultat merjenja je krivulja odvisnosti toplotnega toka od temperature ali časa (42, 43).

DSC analizo (DSC aparatura Mettler Toledo, Švica) smo izvedli tako, da smo v aluminijaste lončke za DSC natehtali približno 10mg vzorca – TK brez in z AP. Vzorce smo nato ohlajali do -60°C s hitrostjo 5K/minuto, jih pustili na -60°C 15 minut in nato segrevali do 20°C z enako hitrostjo, kot smo jih prej ohlajali. Kot referenco smo uporabili prazen aluminijast lonček. Posamezne komponente TK smo prav tako natehtali (približno 3mg) v aluminijaste lončke in posneli DSC po enakem programu kot TK.

## **3.4 METODE ZA VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI**

### **3.4.1 UPORABLJENA LABORATORIJSKA OPREMA**

- inkubator (Sorvall® Heraeus, Kendro Laboratory Products, Nemčija)
- invertni svetlobni mikroskop (Olympus CKX41, Japonska)
- hemocitometer (Neubauer 0,0025 mm<sup>2</sup>, BRAND, Nemčija)
- komora z laminarnim pretokom zraka (LAF) (Iskra PIO, tip M 12 (pretok zraka 0,4 m/s, dimenzija filtra 1220x610x69 mm, zagotavlja čiste pogoje dela razreda 4 po

ISO 14644-1)

- mikrotitrski čitalec Safire2™ (Tecan, Švica)
- centrifuga CENTRIC 322A (Tehtnica, Slovenija)
- mikrotitrne plošče s 96-imi vdolbinicami (TPP® Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)
- polistirenske plošče za gojenje celičnih kultur s 6 vdolbinicami (TPP® Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)
- polistirenske plošče za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm<sup>2</sup> (TPP® Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)
- AFM mikroskop (Agilent 5500, Agilent Technologies, ZDA)
- konice za kontaktni način delovanja AFM mikroskopa (PPP-CONT Au, nominalna konstanta elastičnosti 0,02-0,77 N/m, Nanosensors, Nemčija)

### **3.4.2 PRIPRAVA RAZTOPIN/DISPERZIJ TEKOČIH KRISTALOV ZA POSKUSE NA CELICAH**

Vzorci za poskuse na celicah smo pripravili tako, da smo TK redčili z medijem za gojenje keratinocitov (v nadaljevanju medij) do želene koncentracije.

Za vrednotenje z MTS testom smo izbrali TK z najvišjo vsebnostjo vode (TK10 in 20), najvišjo vsebnostjo IPM (TK5 in 16) ali najvišjo vsebnostjo PAS (TK4 in 15) ter posamezne komponente TK. Vpliva TK z vgrajenim AP na celice z MTS testom nismo določali; AP kot antioksidant namreč reducira MTS reagent in posledično ne dobimo realnih rezultatov. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili SDS.

Končna koncentracija vzorcev na celicah je bila: 4,5 mg/ml, 0,9 mg/ml in 0,45 mg/ml. Ker smo k 50 µl medija s celicami dodali 50 µl raztopine vzorca, smo le-te pripravili v ustrezno večji koncentraciji in sicer: 9 mg/ml, 1,8 mg/ml in 0,9 mg/ml. Raztopino s koncentracijo 9 mg/ml smo pripravili tako, da smo natehtali 45 mg posameznega vzorca v 5 ml bučko in dopolnili do oznake. Nato smo 400 µl oziroma 200 µl te raztopine redčili z medijem do 2 ml, do končne koncentracije 1,8 mg/ml oziroma 0,9 mg/ml.

Celice za proučevanje z AFM mikroskopom smo izpostavili enaki koncentraciji (najvišji in najnižji) vzorca (TK10, TK10+AP in SDS kot pozitivna kontrola) kot pri MTS testu. Ker smo k 2 ml medija s celicami dodali 0,5 ml raztopine, smo pripravili ustrezno višje koncentracije raztopine TK, tako da je bila končna koncentracija na celicah 4,5 mg/ml in

0,45 mg/ml. Raztopino vzorca s koncentracijo 4,5 mg/ml na celicah smo pripravili tako, da smo natehtali 112,5 mg vzorca v 5 ml bučko in z medijem dopolnili do oznake. 0,5 ml te raztopine smo redčili do 5 ml in dobili raztopino za končno koncentracijo 0,45 mg/ml.

### **3.4.3 GOJENJE IN PRESAJANJE CELIC**

Za delo s celicami moramo zagotoviti ustrezne aseptične pogoje prostorov in površin. Delo poteka v LAF komori, ki je postavljena v prostoru s posebnim režimom čistoče in zagotavlja delo v aseptičnih pogojih. Pred začetkom dela notranje površine komore ter vse stvari, ki jih potrebujemo za delo, očistimo s 70% etanolom.

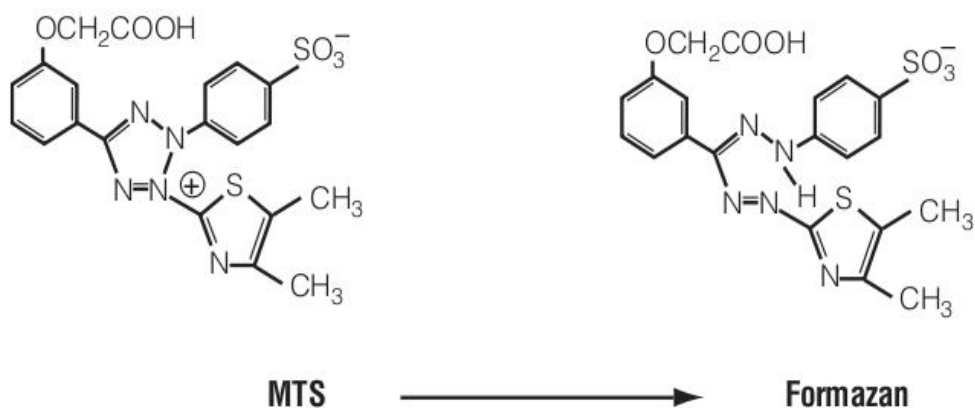
Keratinocite smo inkubirali v mediju za gojenje keratinocitov v polistirenski plošči s površino 75 cm<sup>2</sup> pri 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Ko so zasedle približno 80-90% razpoložljive površine, smo jih presadili (dvakrat tedensko). S celične kulture keratinocitov, ki je rasla pritrjena na podlago, smo odlili medij ter površino dvakrat sprali s 2 ml PBS. Nato smo dodali 1 ml tripsina, ki je celice ločil od podlage in porušil medcelične povezave (inkubacija približno 1 min), kar smo spremljali pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Tripsin smo deaktivirali z dodatkom 4 ml medija z dodanim fetalnim govejim serumom, ki inaktivira tripsin. Celice smo prešteli s pomočjo hemocitometra pod invertnim svetlobnim mikroskopom in tako izračunali koncentracijo celic (število celic/ml). Celice smo nato kvantitativno prenesli v 15 ml centrifugirke in disperzijo celic centrifugirali 5 min pri 1300 obratov/min. Po centrifugiranju smo zavrgli supernatant, celice resuspendirali v 1,5 ml medija ter jih nasadili ali v novo polistirensko ploščo za gojenje celic ali v vdolbinice ustreznih plošč za poskuse. Pod invertnim svetlobnim mikroskopom smo preverili, ali je število celic ustrezno (ustrezno število celic na površino smo izračunali glede na predhodno določeno koncentracijo celic).

### **3.4.4 UGOTAVLJANJE PROLIFERACIJE CELIC S TESTOM AKTIVNOSTI MITOHONDRIJSKE DEHIDROGENAZE**

S testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze (testom MTS) smo proučevali proliferacijo keratinocitov po štiriurni izpostavitvi posameznim sestavinam, TK in SDS v različnih koncentracijah.

MTS test temelji na kolorimetričnem določanju števila živih celic pri študijah citotoksičnosti in proliferacije. Žive celice reducirajo MTS reagent, ki je kemijsko 3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol, v obarvan formazan. Pretvorbo omogočata NADPH ali NADH, ki ju tvorijo dehidrogenazni encimi v metabolno aktivnih celicah. Izmerjena absorbanca je tako premosorazmerna številu živih celic v kulturi (44).



**Slika 15:** Kemijski formuli reagenta MTS in formazana, ki nastane po pretvorbi.

V mikrotitrsko ploščo s 96-imi vdolbinicami smo za vsak vzorec nasadili 3 vdolbinice s  $0,5 \times 10^4$  celicami v 50  $\mu\text{l}$  medija; isto koncentracijo smo nasadili v 6 vdolbinic za določitev absorbance celic, za absorbanco posameznega vzorca in medija smo v 3 vdolbinice odpipetirali 50  $\mu\text{l}$  medija (brez celic). Celotno ploščo smo inkubirali 24 h pri 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ , da so se celice pritrdile na podlago. Nato smo v vse vdolbinice – tiste s celicami in brez – dodali po 50  $\mu\text{l}$  raztopine vzorca oziroma medija in po eni uri v vsako vdolbinico 10  $\mu\text{l}$  MTS reagenta. Po 4 h od dodatka vzorcev smo z mikrotitrskim čitalcem izmerili absorbanco pri valovni dolžini 490 nm. Rezultate proliferacije celic smo podali relativno glede na kontrolo tj. celice, ki jih nismo izpostavili testiranim sistemom (Enačba 5). MTS test smo izvedli v treh tehničnih ponovitvah.

Proliferacijo celic smo izračunali po enačbi:

$$\text{proliferacija celic} = \frac{(A_S - A_{S0})}{(A_C - A_{C0})} \quad \text{Enačba 5}$$

$A_S$       absorbanca celic po dodatku vzorca

$A_{S0}$  absorbanca medija po dodatku vzorca  
 $A_C$  absorbanca kontrolnih celic  
 $A_{C0}$  absorbanca medija

### **3.4.5 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV**

Rezultate proliferacije celic smo statistično ovrednotili, in sicer smo primerjali citotoksičnost posameznih TK ter glede na SDS. Poskus smo izvedli v eni biološki in treh tehničnih replikah. S F-testom smo preverili podobnost varianc, nato pa izvedli enostranski oziroma dvostranski Studentov t-test s stopnjo tveganja  $\alpha=0,05$ .

### **3.4.6 SNEMANJE MORFOLOŠKIH SPREMEMB CELIČNE MEMBRANE KERATINOCITOV Z MIKROSKOPOM NA ATOMSKO SILO**

Mikroskop na atomsko silo je sestavljen iz tipala (konica in ročica), piezoelektričnega stojala za vzorec, optičnega sistema za detekcijo odklona ročice ter sistema povratne zanke in računalniške podpore.

Obstaja več načinov delovanja AFM. Pri kontaktnem načinu (contact mode) snemanja privedemo konico v stik s površino vzorca. Med njima delujejo medatomske odbojne sile. Ko vzorec premikamo vzporedno glede na površino vzorca, konica sledi topografskim potezam vzorca, rezultat pa je odmikanje konice oziroma upogibanje tipala. S spremljanjem lege ročice glede na položaj vzorca dobimo sliko površine vzorca. Poleg višine vzorca pa nam kontaktni način omogoča tudi določanje nekaterih drugih lastnosti kot so trenje, prevodnost in elastičnost.

Pri tipalnem načinu (tapping mode) uporabljamo trše ročice, ki oscilirajo pri njihovi resonančni frekvenci. Med nihalnim ciklom se konica dotakne površine vzorca in amplituda nihanja se zmanjša, kar uporabimo kot merilo za to, da ohranjamo konstantno razdaljo med tipalom in površino. Ta metoda je primerna za občutljive materiale, vendar so mehke površine lahko problematične, ker se lahko konica kontaminira.

Pri nekontaktnem načinu (non-contact mode) snemanja konica in vzorec nista v neposrednem fizičnem stiku, pač pa tipalo niha z majhno amplitudo na majhni oddaljenosti od površine. Tipalo pri tem načinu ne pride v neposredni stik s površino, kar omogoča snemanje zelo občutljivih vzorcev, hkrati pa se izognemo kontaminaciji tipala. Da dosežemo dovolj visoke frekvence, ki omogočajo večjo občutljivost, za snemanje v

nekontaktnem načinu uporabljamo trše konice kot za snemanje v kontaktnem načinu (14).

Keratinocite smo za proučevanje pod AFM mikroskopom pripravili podobno kot za MTS test, z razliko, da smo jih po centrifugiranju in odlitju redčili tako, da smo imeli 5000 celic v 50  $\mu\text{l}$  ( $1 \times 10^5/\text{ml}$ ). V ploščo s 6 vdolbinicami smo dali v vsako vdolbinico krovno stekelce (predhodno sterilizirano v sterilizatorju z vročim suhim zrakom (SE-02, Elektromedicina); 2 h pri 160°C). Dodali smo 1950  $\mu\text{l}$  medija in 50  $\mu\text{l}$  medija s celicami. Celice smo nato inkubirali en dan pri 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, da so se pritrdele na krovna stekelca. Po enem dnevu smo na celice dodali 0,5 ml raztopine vzorca.

Vzorci smo na celicah pustili 4 oziroma 24 h. Po tem času smo medij z vzorcem odstranili in celice trikrat sprali z 0,5 ml PBS, ter fiksirali z dodatkom 4% formaldehida. Po 10-ih minutah smo formaldehid odstranili, celice sprali najprej s PBS in nato z bidestilirano vodo ter pustili krovna stekelca, da so se posušila. Na ta način smo zmanjšali vpliv kristalov soli, ki sestavljajo PBS, na povečanje strukturiranosti celične membrane keratinocitov. Tako pripravljene celice smo opazovali z mikroskopom na atomsko silo. Morfološke spremembe celične membrane keratinocitov smo snemali s kontaktnim načinom v zraku pri 25°C, pri čemer smo uporabili silikon-nitridne pirimidalne konice, ki so na zgornji površini prevlečene z zlatom (PPP-CONT Au, nominalna konstanta elastičnosti 0,02-0,77 N/m, Nanosensors, Nemčija). Krovno stekelce s fiksiranimi celicami smo z obojestransko lepljivim trakom pripeli na podstavek za vzorce, le tega vstavili v AFM mikroskop in s pomočjo integrirane video kamere poiskali celice. Hitrost skeniranja je bila 2,0 liniji/sekundo. Za vse vzorce smo hkrati posneli slike topografije, strmine in trenja ter jih shranili v formatu 512x512 točk. Za obdelavo slik smo uporabili program PicoImage<sup>®</sup>, ki nam ponuja možnost za boljše definiranje strukturnih sprememb s pomočjo programskih opcij kot sta »thresholding« ter »resampling«.



## **4 REZULTATI IN RAZPRAVA**

### **4.1 STRUKTURNO VREDNOTENJE TEKOČIH KRISTALOV**

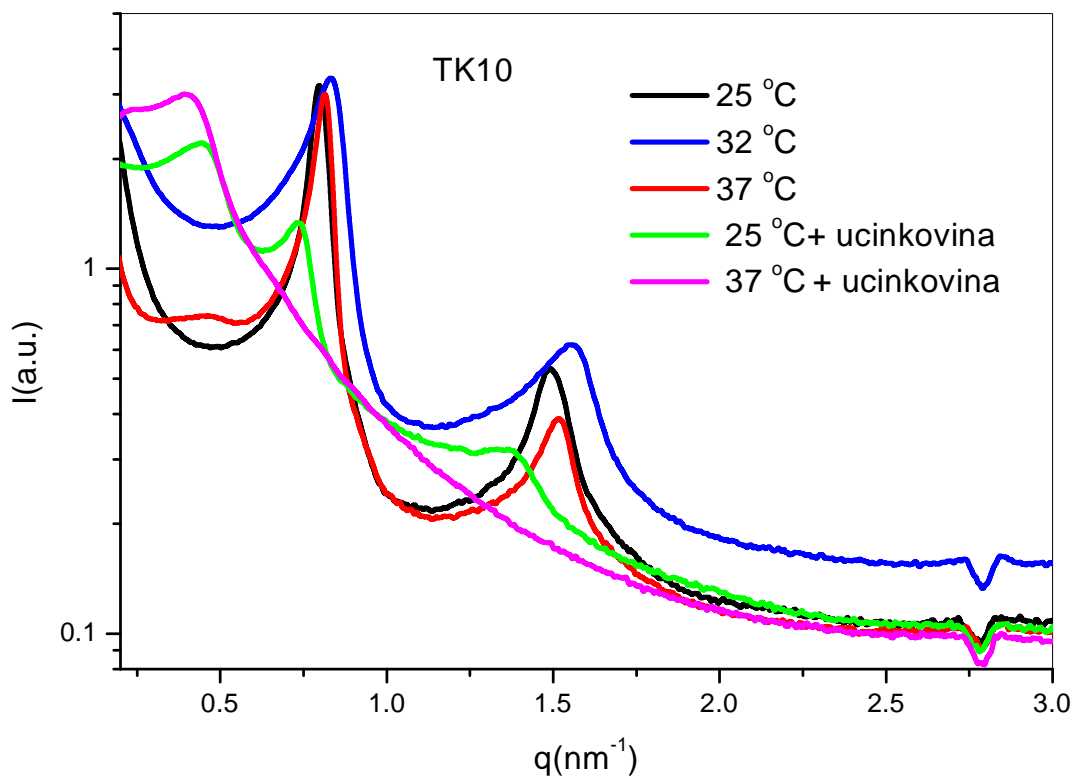
Že v preliminarnih raziskavah so s polarizacijsko mikroskopijo kot temeljno tehniko za vrednotenje strukture TK proučevali izdelane TK iz lecitina, Tweena 80, IPM in vode. Vidni so bili malteški križi, ki so značilni za lamelarne faze (45). Z uporabo komplementarnih tehnik kot sta SAXS in DSC smo želeli natančneje ovrednotiti strukturo TK.

#### **4.1.1 OZKOKOTNO RENTGENSKO SIPANJE**

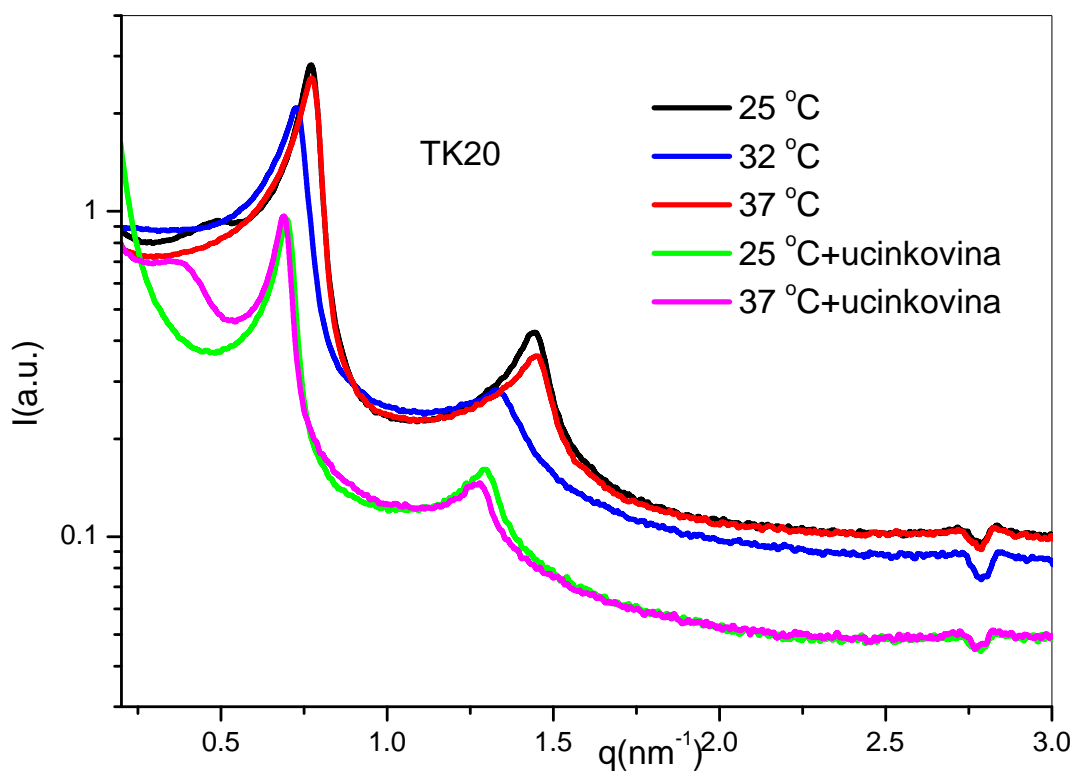
Z uporabo SAXS kot komplementarne metode smo želeli potrditi, da so naši sistemi lamelarni TK in nadgraditi informacije preko dobljenih razdalj med plastmi. Sestava preiskovanih sistemov, ki se med seboj razlikujejo v razmerju med posameznimi sestavinami, je podana v preglednici I. Ugotoviti smo želeli tudi vpliv vgradnje AP ter vpliv temperature na strukturo TK. Difraktograme sistemov smo posneli pri treh temperaturah in sicer pri sobni T (25°C), pri T na površini kože (32°C) in pri telesni T (37°C). Difraktograme sistemov z vgrajenim AP smo posneli pri 25°C in 37°C. Položaji vrhov ter razdalje med plastmi so podane v preglednici II, reprezentativni difraktogrami pa na sliki 16 za TK10 ter na sliki 17 za TK20.

**Preglednica II:** Položaji vrhov (q) pri ozkokotnem rentgenskem sipanju in razdalje med plastmi (d).

	(q)	q <sub>1</sub> (nm <sup>-1</sup> )	d (nm)	q <sub>2</sub> (nm <sup>-1</sup> )
<b>25 °C</b>				
TK4		0,929	6,76	1,757
TK4+AP	(0,608)	0,864	7,27	1,632
TK 5		0,891	7,05	1,680
TK5+AP	(0,339)	(0,686)	9,16	(1,363)
TK 10		0,795	7,90	1,480
TK10+AP	(0,434)	0,734	8,56	1,371
TK15		0,708	8,87	1,423
TK15+AP		0,704	8,92	1,411
TK16		0,700	8,96	-
TK16+AP		0,561	11,20	-
TK20		0,764	8,22	1,441
TK20+AP		0,689	9,12	1,296
<b>32 °C</b>				
TK4		0,938	6,70	1,748
TK5		0,868	7,24	(1,636)
TK10		0,830	7,57	1,559
TK15		0,825	7,62	1,745
TK16		0,704	8,92	-
TK20		0,730	8,61	1,331
<b>37°C</b>				
TK4		0,938	6,70	1,771
TK4+AP	(0,513)	-		-
TK5		0,847	7,42	(1,602)
TK5+AP	(0,370)	-		-
TK10		0,808	7,78	1,520
TK10+AP	(0,404)	-		-
TK15		0,821	7,65	1,537
TK15+AP	(0,469)			
TK16		0,708	8,87	-
TK16+AP		0,630	9,97	
TK20		0,769	8,17	1,450
TK20+AP	(0,382)	0,689	9,12	1,273



**Slika 16:** Difraktogram TK10, posnet pri treh različnih temperaturah ter z vgrajenim askorbilpalmitatom pri dveh temperaturah. Na abscisni osi je podana velikost sipalnega vektorja ( $q$ ), iz katere izračunamo razdaljo med lamelami, na ordinati pa intenziteta sipanja (I).



**Slika 17:** Difraktogram TK20, posnet pri treh različnih temperaturah ter z vgrajenim askorbilpalmitatom pri dveh temperaturah. Na abscisni osi je podana velikost sipalnega vektorja ( $q$ ), iz katere izračunamo razdaljo med lamelami, na ordinati pa intenziteta sipanja ( $I$ ).

Na difraktogramih, posnetih pri 25°C, sta opazna dva vrhova, razen pri vzorcu TK 16, kjer je nastal samo en vrh. Razmerje pozicij vrhov, ki znaša 1:2, je značilno za lamelarne faze TK, kar smo tudi pričakovali. Tudi pri 32°C in 37°C se je lamelarna struktura TK ohranila; še vedno sta bila prisotna dva vrhova s pozicijami v razmerju 1:2, razen pri vzorcu TK16, kjer je tako kot pri 25°C nastal samo en vrh. Iz rezultatov lahko zaključimo, da se lamelarna struktura pri fiziološki temperaturi in temperaturi na površini kože ohrani, kar je izrednega pomena za dermalno aplikacijo lamelarnih TK kot dermalnih nosilnih sistemov. Struktura lamelarnih faz se, po vgradnji AP kot učinkovine, ohrani (pri 25°C), vendar se pri vzorcih z razmerjem Tween 80: lecitin=1:1 pojavi dodaten vrh, ki poleg ureditve PAS v lamelarne faze nakazuje na prisotnost dodatnih struktur. Ker je AP amfifilna molekula, predvsem pa zaradi široke oblike dodatnega vrha predvidevamo, da gre za micelarne strukture. To možnost potrjujejo tudi raziskave Zhuanga in sodelavcev, ki so pri sistemih s

sestavo Brij 30/voda/1-butil-3-metilimidazolijeva sol, v primeru micelarne faze dobili difraktogram s širokim vrhom. Dodatno je iz njihovega faznega diagrama razvidno, da so s povečevanjem koncentracije PAS prešli iz prvotnega področja micelarne raztopine v področje tekočih kristalov in nato pri najvišji koncentraciji PAS ponovno v micelarno območje (41). Nastanek micelov nam nakazujejo tudi meritve viskoznosti za sistem TK5, ki so bile narejene v okviru prejšnjih raziskav; po vgradnji 1% AP je viskoznost drastično padla (46).

Pri 37°C za vzorce TK4+AP, TK5+AP, TK10+AP in TK15+AP ne dobimo več vrhov značilnih za lamelarne faze TK. Prisoten je samo vrh, ki nakazuje prisotnost drugačnih struktur (ponovno najverjetneje miceli). Izjema je TK20+AP, kjer je pri 37°C še vedno ohranjena struktura lamelarnih faz TK, vendar so tudi tu dodatno nastale druge strukture. Pri TK16+AP je tako pri 25°C kot pri 37°C samo en vrh v difraktogramu, enako kot v primeru praznega sistema.

Na osnovi rezultatov SAXS meritev vzorcev TK z vgrajenim AP lahko sklepamo, da se AP kot amfifilna molekula lahko vgradi v lipidne dvosloje, ter tako vpliva na lamelarno strukturno urejenost testiranih sistemov oziroma se slednja pri 37°C poruši. V nadaljevanju je potrebno meritve nujno izvesti še pri 32°C, kar bo omogočilo opredelitev strukture po nanosu na kožo.

#### **4.1.1.1 Razdalje med lamelami**

Razdalje med lamelami ( $d$ ) posameznih TK, ki smo jih izračunali iz položajev vrhov, so navedene v preglednici II. Naslednjo primerjavo smo izvedli med vzorci, ki imajo enako sestavo glede na vsebnosti IPM, vode in PAS, razlikujejo pa se v razmerju Tween 80:lecitin. Pri vzorcih z razmerjem 2:1 v prid Tweenu 80 (TK15, TK16 in TK20) opazimo večjo razdaljo med lamelami kot pri vzorcih z razmerjem 1:1 (TK4, TK5 in TK10). To si razlagamo z dejstvom, da se na polarne glave Tweena 80 voda močneje veže kot na polarne glave lecitina, kar smo ugotovili z DSC analizo. Največja razlika v razdalji je pri vzorcih z največjo vsebnostjo PAS (TK15 ima za 2,11 nm večji  $d$  kot TK4) medtem ko je razlika pri vzorcih z največjo vsebnostjo vode najmanjša (TK20 ima za 0,32 nm večji  $d$  kot TK10).

Na razdaljo med lamelami je vplivala tudi vgradnja AP. TK5 in TK16, ki vsebujeta največji delež IPM, imata po vgradnji AP (pri 25°C) za 2,11 nm oziroma 2,24 nm večjo razdaljo med lamelami kot pred vgradnjo. Tudi pri TK z največjo vsebnostjo vode je po vgradnji AP

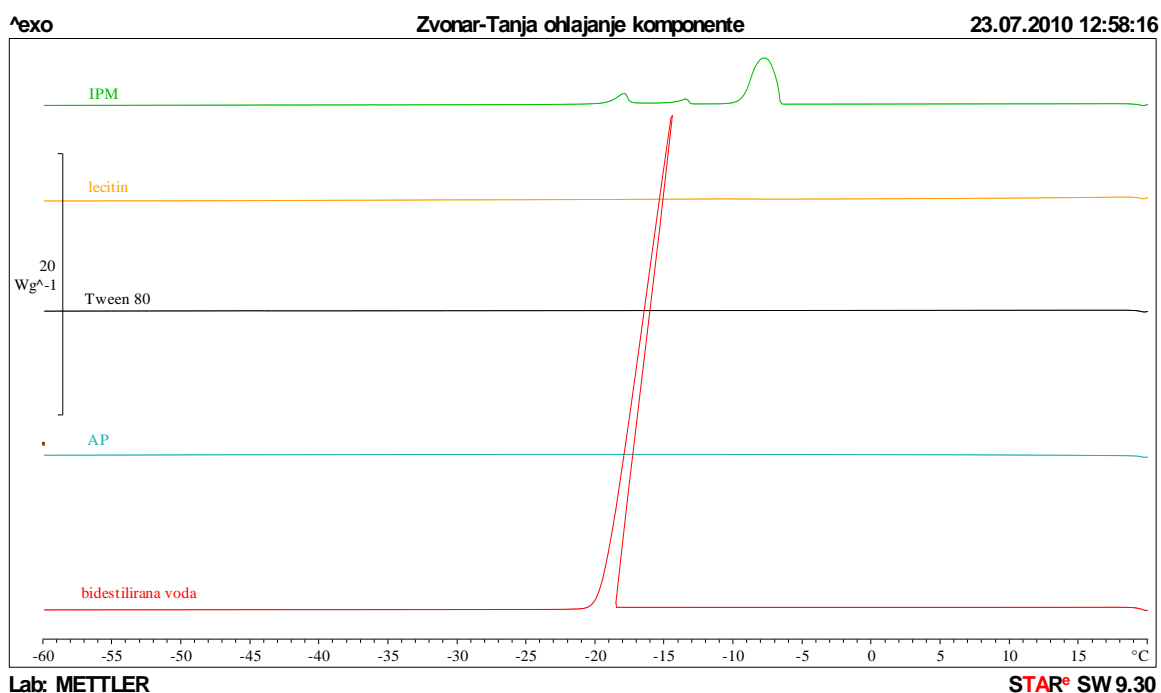
prišlo do povečanja te razdalje (za 0,66 nm pri TK10 oziroma za 0,9 nm pri TK20). Pri TK z največjo vsebnostjo PAS je do povečanja d po vgradnji AP prišlo le pri TK4 (za 0,51 nm), ki ima razmerje Tween 80:lecitin=1:1, medtem ko pri TK15, ki ima omenjeno razmerje 2:1, do povečanja d ni prišlo (razlika je bila minimalna, in sicer 0,05nm).

#### 4.1.2 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

Z DSC analizo smo želeli ovrednotiti strukturo TK ter oceniti vpliv vgradnje AP na strukturo TK. Spremembe v vzorcih smo spremljali med ohlajanjem iz 20°C na -60°C ter s segrevanjem teh vzorcev iz -60°C nazaj na 20°C.

##### 4.1.2.1 Ohlajanje

Na sliki 18 so prikazani DSC termogrami posameznih sestavin TK. Pri ohlajanju vzorcev od 20°C do -60°C sta razvidna eksotermna vrhova pri vodi in IPM. Pri vodi se eksotermni vrh pojavi pri približno -19°C, kar kaže na to, da pride pri tej temperaturi (T) do zamrznitve vode, ki je v podhlajenem stanju (47). Pri ohlajanju IPM so razvidni trije eksotermni vrhovi v temperaturnem intervalu med približno -7 in -20°C, ki ustrezajo kristalizaciji IPM.



**Slika 18:** DSC krivulje ohlajanja posameznih sestavin tekočih kristalov v temperaturnem intervalu od 20°C do -60°C.

DSC termogrami posameznih TK, katerih sestava je navedena v preglednici I, so prikazani na slikah 19 in 20.

Tako na sliki 19 kot tudi sliki 20 lahko opazimo, da je na krivuljah ohlajanja pri vseh TK izražen trojni eksotermni vrh v temperaturnem intervalu med  $-7^{\circ}\text{C}$  in  $-25^{\circ}\text{C}$ , ki ustreza kristalizaciji IPM. Iz slik je nadalje razvidno, da je oblika omenjenega eksotermnega vrha odvisna od razmerja med Tweenom 80 in lecitinom v emulgatorski zmesi TK. Pri TK z razmerjem Tween 80: lecitin = 1:1 je oblika trojnega vrha primerljiva z obliko le tega pri ohlajanju samega IPM, medtem ko se pri TK z razmerjem Tween 80: lecitin = 2:1 oblika vrha spremeni. Slednje bi lahko bilo posledica močnejših interakcij IPM z emulgatorsko zmesjo.

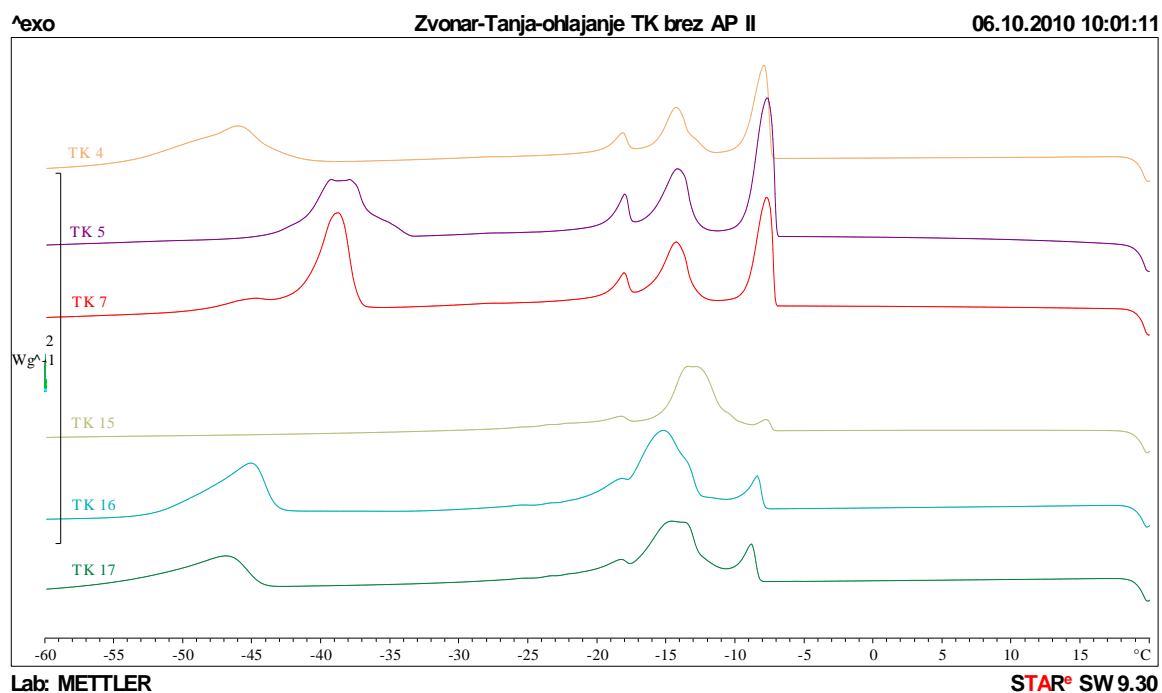
Na vseh krivuljah ohlajanja TK (razen pri TK15) je razviden še eksotermni vrh pri nižjih temperaturah (med približno  $-20^{\circ}\text{C}$  in  $-55^{\circ}\text{C}$ ), ki ustreza kristalizaciji vodne faze. Voda se v disperznih sistemih lahko nahaja v dveh oblikah in sicer kot prosta voda in kot vezana voda. Voda, ki močno interagira s polarnimi glavami PAS, zamrzne pri nižji T, kot če so interakcije šibkejše. Da bi se pojavil vrh kristalizacije proste vode, bi morale biti PAS nasičene z vodo (48). Zaradi omenjenih interakcij ti. vezana voda v vseh TK zamrzne pri nižji T kot prosta voda, ki je zmrznila pri  $-19^{\circ}\text{C}$ . T, pri kateri zamrzne voda v TK, pa je odvisna od količine vode in PAS ter posledično od jakosti interakcij.

Iz slik 19 in 20 vidimo, da pri TK 4-10, za katere je značilno razmerje Tween 80: lecitin = 1:1, pri najnižji T kristalizira vodna faza v TK4, ki ima najnižji delež vode in najvišjo vsebnost PAS. Z večanjem razmerja voda/PAS se T zamrznitve vode pomika proti manj negativnim, to je višjim vrednostim. Vodna faza v TK10, ki vsebuje največ vode in najmanj PAS tako zamrzne pri približno  $-25^{\circ}\text{C}$ . Vendar tudi v tem primeru voda zamrzne pri nižji T kot sama voda, zato lahko sklepamo, da je voda v TK10 sicer vezana na polarne glave PAS, a bistveno šibkeje kot pri TK4.

Tudi pri TK 15-20, kjer je razmerje Tween 80:lecitin = 2:1, sicer pa je sestava enaka kot pri TK 4-10, ima sistem z največjim razmerjem voda: PAS (TK20) vrh kristalizacije vode pri višji T kot ostali TK; pri TK z najmanj vode in največ PAS pa vrha kristalizacije vode ni moč opaziti, kar pomeni, da je v tem primeru voda tako močno vezana na polarne glave PAS, da ne zamrzne v temperaturnem območju do  $-60^{\circ}\text{C}$  (49).

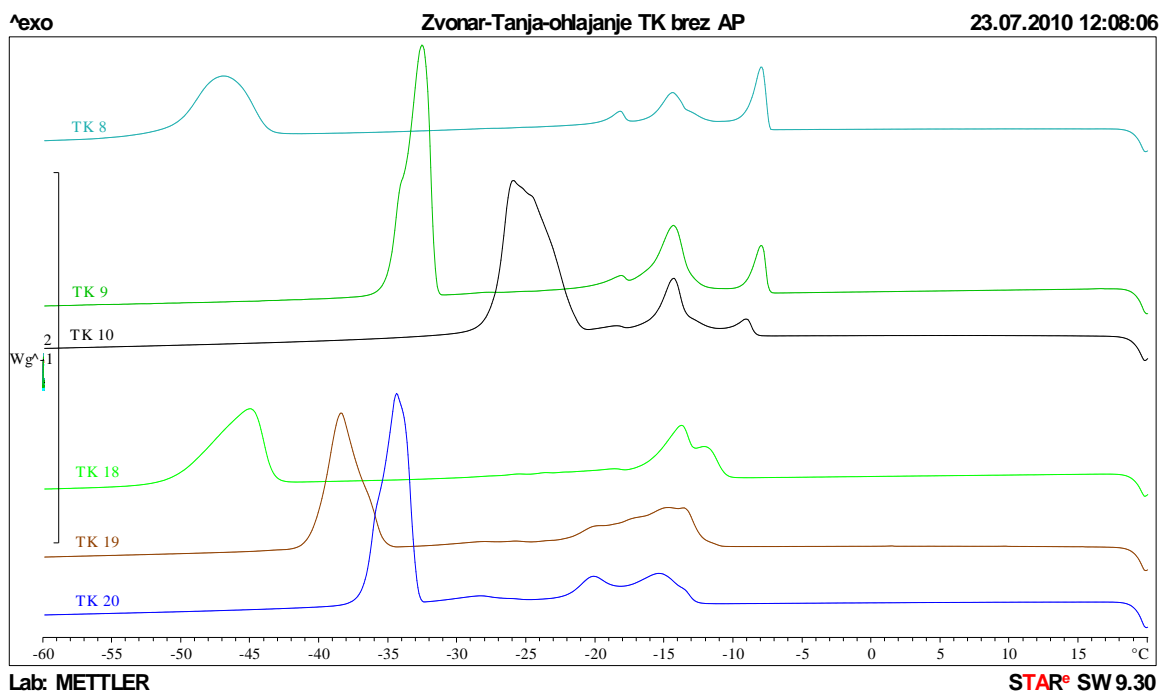
Iz slik 19 in 20 je nadalje razvidno, da voda v TK 4-10 zamrzne pri višji T kot v TK 15-20, ki imajo sicer enako sestavo kot TK 4-10, a vsebujejo v emulgatorski zmesi večji delež

Tweena 80 (Tween 80: lecitin = 2:1). Možna razlaga je, da voda močnejše interagira s Tweenom 80 kot z lecitinom, kar se odraža s pomikom kristalizacijskega vrha vode proti nižjim T. Pri ohlajanju TK15, kjer imamo najmanjši delež vode in največji delež PAS z razmerjem Tween 80: lecitin = 2:1, se kristalizacijski vrh vode niti ne pojavi. Predvidevamo, da je zaradi velike vsebnosti PAS voda z njimi močno interagirala in se je znižala T zamrznitve do T nižjih od  $-60^{\circ}\text{C}$ .



**Slika 19:** DSC krivulje ohlajanja tekočih kristalov v temperaturnem intervalu od  $20^{\circ}\text{C}$  do  $-60^{\circ}\text{C}$ .

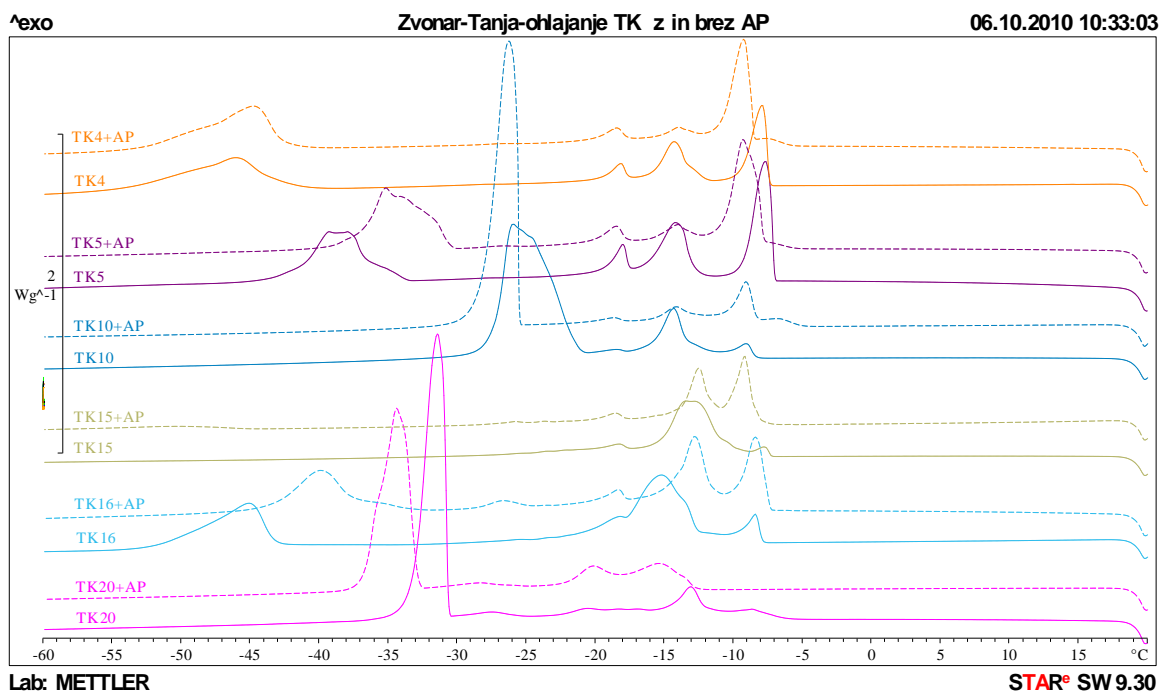




**Slika 20:** DSC krivulje ohlajanja tekočih kristalov v temperaturnem intervalu od 20°C do -60°C.

Proučevali smo tudi proces ohlajanja TK z vgrajenim 1% (m/m) AP. Dobljene termograme smo primerjali s termogrami odgovarjajočih TK brez vgrajenega AP (rezultate prikazuje slika 21). Razvidno je, da vgrajeni AP ni bistveno vplival na  $T$  zamrznitve vode v TK. Vrh kristalizacije vode se je pri TK z AP pomaknil nekoliko proti višjim  $T$  pri sistemih z najvišjim deležem vode (TK10 in TK20), medtem ko se je pri sistemih z nižjim deležem vode (TK4, TK5 in TK16) pomaknil nekoliko proti nižjim  $T$ .

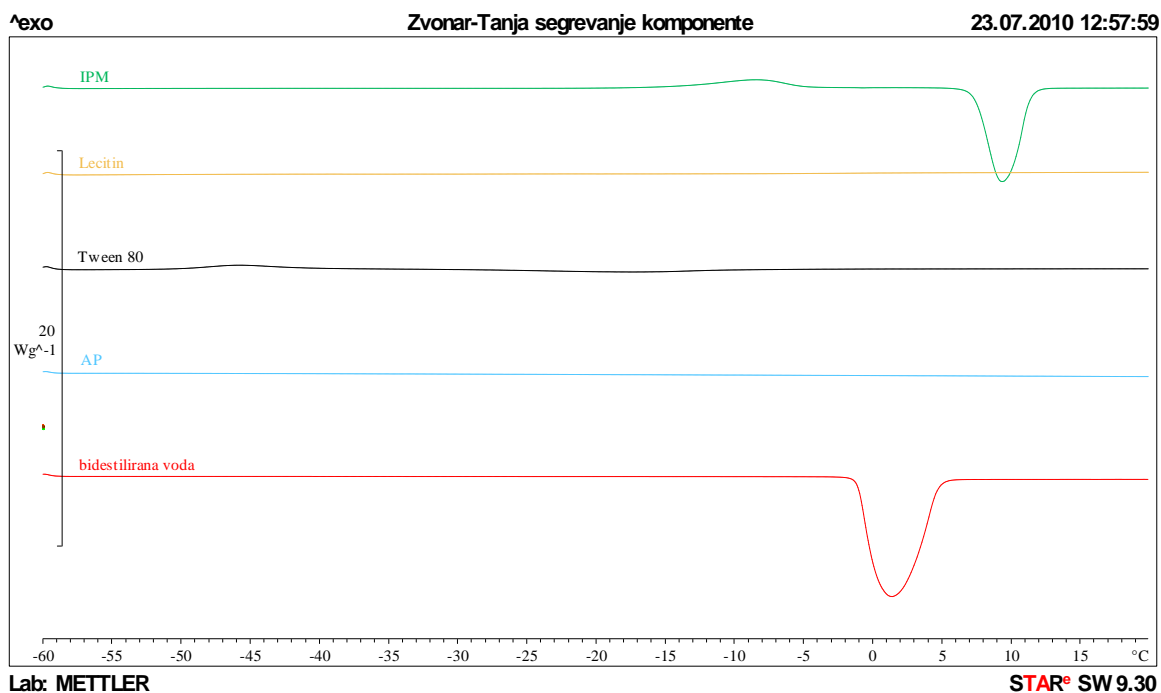
Če primerjamo različne TK z vgrajenim AP med sabo, pridemo do enakih ugotovitev kot pri TK brez AP. Voda je zamrznila pri višji temperaturi, če je bilo razmerje voda: PAS večje in obratno. Kjer je bilo razmerje Tween 80:lecitin = 2:1 je prišlo do premika vrha zamrznitve vode proti nižjim  $T$  v primerjavi s tistimi TK, ki so imeli enak delež Tweena 80 in lecitina. Ravno tako ni moč opaziti eksotermnega vrha, ki ustreza zamrznitvi vode v TK15 z AP.



**Slika 21:** DSC krivulje ohlajanja tekočih kristalov z (prekinjena črta) in brez vgrajenega askorbilpalmitata (neprekinjena črta) v temperaturnem intervalu od 20°C do -60°C.

#### 4.1.2.2 Segrevanje

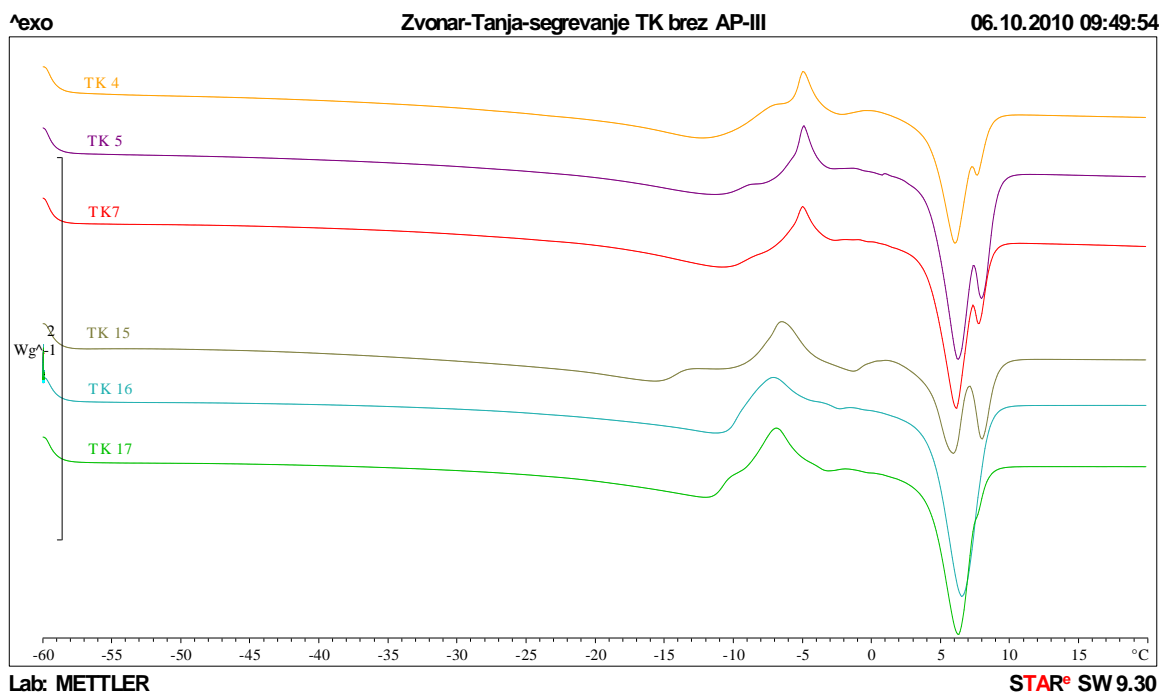
Po ohlajanju smo vzorce pustili termostimirati 15 min pri -60°C in nato v nadaljevanju spremljali segrevanje TK v temperaturnem intervalu od -60°C do 20°C. Termogrami, ki opisujejo segrevaje posameznih sestavin TK, so prikazani na sliki 22. Na krivulji segrevanja vode je razviden endotermen vrh pri približno 1,5°C, ki ustreza taljenju vode. Iz krivulje segrevanja IPM sta razvidna dva vrhova, in sicer manjši eksotermni vrh pri približno -8°C in endotermni vrh pri 9,5°C. Slednji ustreza taljenju kristalov IPM. Majhen eksotermni vrh je moč opaziti tudi pri segrevanju Tweena 80; slednji verjetno odraža kristalizacijo prej podhlajenega Tweena 80.



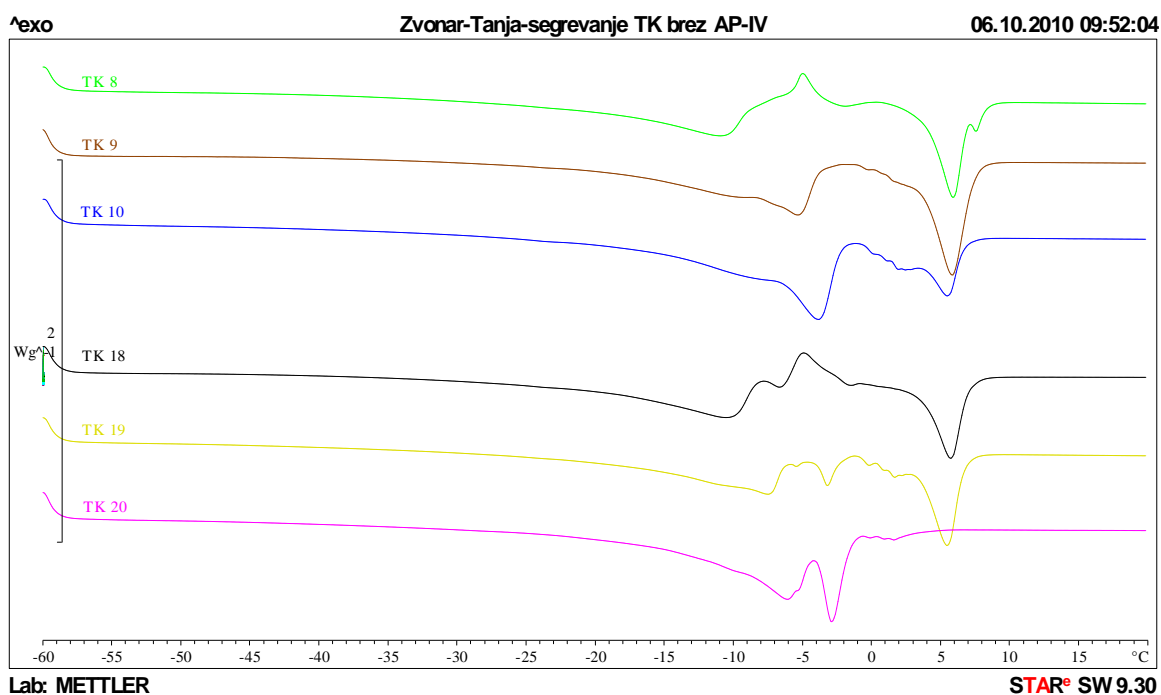
**Slika 22:** DSC krivulje segrevanja posameznih sestavin tekočih kristalov v temperaturnem intervalu od  $-60^{\circ}\text{C}$  do  $20^{\circ}\text{C}$ .

Iz DSC krivulj segrevanja vseh TK, ki so prikazane na slikah 23 in 24, je razviden širok endotermni vrh med  $-40^{\circ}\text{C}$  in  $-10^{\circ}\text{C}$  oziroma  $-7^{\circ}\text{C}$ , ki se pri večini proučevanih vzorcev (razen pri TK10 in TK20) nadaljuje v eksotermni vrh v temperaturnem območju med  $-7^{\circ}\text{C}$  in  $-5^{\circ}\text{C}$ . Pri temperaturi med  $5^{\circ}\text{C}$  in  $10^{\circ}\text{C}$  je nato razviden še en endotermni vrh. Opisani endotermni vrh najverjetneje ustreza taljenju IPM in vode, eksotermni vrh pa kristalizaciji določenih sestavin v IPM.

Iz rezultatov segrevanja TK nismo mogli priti do nobenih zaključkov glede strukture TK, ker smo dobili preširoke vrhe, ki niso ločeni in prehajajo eden v drugega. Potrebno bi bilo izvesti dodatne obsežne raziskave, tudi binarnih in ternarnih zmesi posameznih sestavin. Te raziskave bodo predmet nadaljnjega raziskovalnega dela na Katedri za farmacevtsko tehnologijo.



**Slika 23:** DSC krivulje segrevanja tekočih kristalov v temperaturnem intervalu od -60°C do 20°C.

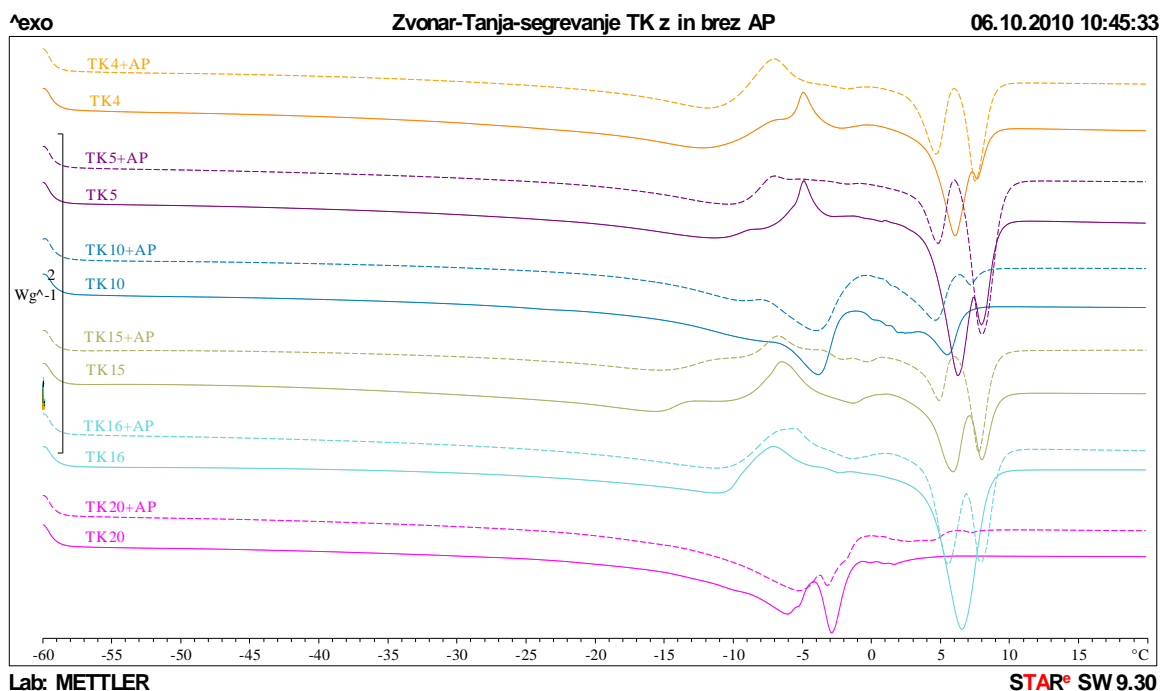


**Slika 24:** DSC krivulje segrevanja tekočih kristalov v temperaturnem intervalu od -60°C do 20°C.

Primerjava DSC krivulj segrevanja TK z vgrajenim AP in TK brez AP je prikazana na sliki

25. Vidimo, da ostane pozicija endotermnih vrhov po vgradnji AP nespremenjena. Se pa pri nekaterih TK spremeni oblika vrha pri približno 6°C, ki se po dodatku AP razcepi v dva vrhova. Pri TK, ki pa že imajo dva vrhova, se slednja po vgradnji AP bolj ločita.

Tako kot pri segrevanju TK tudi pri segrevanju TK z vgrajenim AP iz rezultatov ni mogoče potegniti zaključkov o strukturi.



**Slika 25:** DSC krivulje ohlajanja tekočih kristalov z (prekinjena črta) in brez vgrajenega askorbilpalmitata (neprekinjena črta) v temperaturnem intervalu od -60°C do 20°C.

## 4.2 CITOTOKSIČNOST TEKOČIH KRISTALOV

Po definiciji je delež PAS v TK velik, in ravno PAS, predvsem v visokih koncentracijah, lahko povzročijo iritacijo kože (50). Izbor sestavin za TK, ki smo jih vrednotili v okviru diplomske naloge, je zato že predhodno temeljil na biokompatibilnih in biorazgradljivih PAS. Emulgatorska zmes je bila sestavljena iz lecitina kot predstavnika zwitterionskih PAS ter Tweena 80 kot predstavnika neionskih PAS, ki imajo manjši iritacijski potencial v primerjavi z ionskimi PAS. Navedena emulgatorja sta primerna celo za parenteralno aplikacijo. Tudi IPM v vlogi lipofilne faze je bil izbran na podlagi svoje netoksičnosti. Na ta način je bil narejen prvi korak pri izdelavi sprejemljivega nosilnega sistema za dermalno uporabo z vidika iritacije kože. Seveda pa zgolj izbor ustreznih komponent ni zagotovilo,

da po aplikaciji ne bo prišlo do iritacije, zato moramo ovrednotiti tudi in predvsem nosilni sistem kot tak (9, 45). V okviru diplomske naloge smo vpliv TK na keratinocite ugotavljali z MTS testom in s pomočjo AFM.

#### **4.2.1 VREDNOTENJE VPLIVA TEKOČIH KRISTALOV NA PROLIFERACIJO KERATINOCITOV S TESTOM AKTIVNOSTI MITOHONDRIJSKE DEHIDROGENAZE**

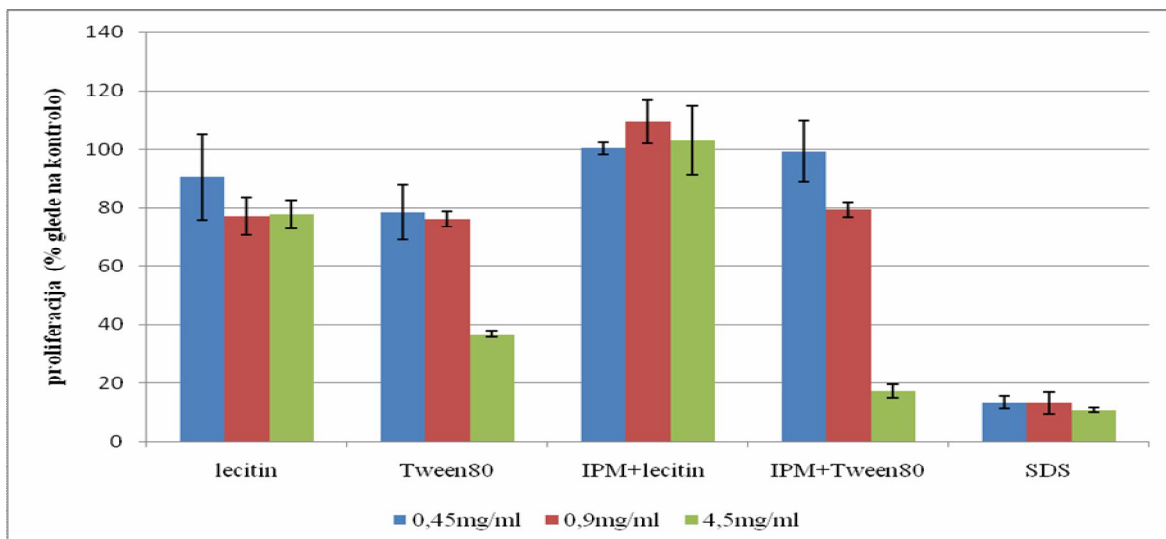
Z MTS testom smo želeli *in vitro* ovrednotiti citotoksičnost oziroma vpliv na proliferacijo keratinocitov in s tem potencialno iritabilnost TK in posameznih sestavin TK.

Proliferacijo smo določali po izpostavitvi celic posameznim sestavinam TK ter TK z različnim razmerjem sestavin pri treh različnih koncentracijah. Izbrali smo TK z največjo vsebnostjo vode (TK 10 in 20), IPM (TK 5 in 16) ali PAS (TK 4 in 15). TK z enako vsebnostjo posameznih komponent (voda, IPM ali PAS) se dodatno razlikujejo v razmerju Tween 80:lecitin, ki je ali 1:1 ali 2:1 (sestava podana v preglednici I). Ker za določanje citotoksičnosti z MTS testom na celičnih kulturah ne obstaja standardni protokol, smo za testiranje na celicah izbrali širok koncentracijski razpon, tj. od 4,5 mg/ml do 0,45 mg/ml, tako da je bil pri največji koncentraciji opazen očiten padec proliferacije celic, pri najnižji oziroma subtoksični koncentraciji pa je bila proliferacija celic primerljiva z negativno kontrolo (keratinociti v mediju) (51). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili raztopino SDS v ujemajočih se koncentracijah; SDS se namreč uporablja kot referenčni iritant v študijah določanja iritacije kože (52).

Proliferacijo celic po izpostavitvi posameznim sestavinam ali TK smo nato ovrednotili glede na proliferacijo celic po izpostavitvi SDS z uporabo Studentovega t-testa z enostranskim tveganjem ( $p < 0,05$ ). Če je bila proliferacija signifikantno večje glede na proliferacijo po izpostavljenosti SDS, smo predpostavili, da ima posamezna sestavina oziroma TK nizko stopnjo iritacije.

##### **4.2.1.1 Vpliv posameznih sestavin tekočih kristalov na keratinocite**

Na sliki 26 so predstavljeni rezultati MTS testa (povprečje treh tehničnih ponovitev za posamezni vzorec) za posamezne sestavine ter za pozitivno kontrolo (SDS) pri treh različnih koncentracijah.



**Slika 26:** % proliferacije keratinocitov po izpostavitvi posameznim sestavinam tekočih kristalov in SDS (pozitivna kontrola) pri različnih koncentracijah po 4h.

Po izpostavitvi celic raztopini lecitina je bila proliferacija pri vseh treh koncentracijah dokaj visoka, tudi pri najvišji koncentraciji 4,5 mg/ml, kjer je znašala 77,76%. Pri Tweenu 80 je bila situacija nekoliko drugačna. Pri nižjih dveh koncentracijah (0,45 mg/ml in 0,9 mg/ml) je bila proliferacija 78,34% oziroma 76,16%, medtem ko je pri največji koncentraciji (4,5 mg/ml) prišlo do opaznega padca proliferacije na 36,72%.

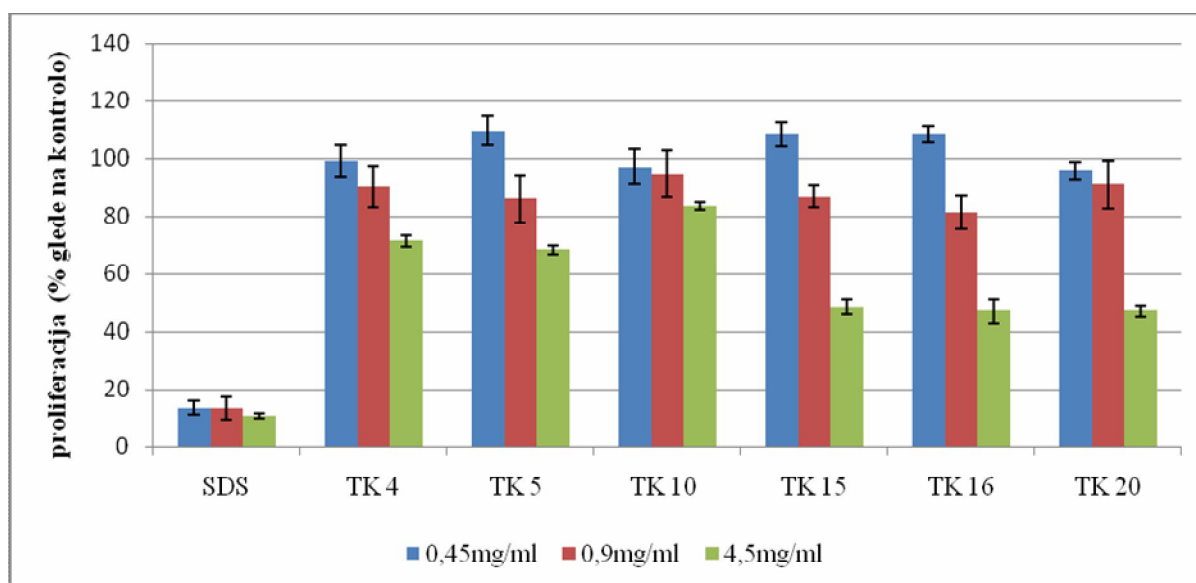
IPM se zaradi lipofilnega značaja ne meša z vodnim medijem. Zato smo poskusili posredno ovrednotiti vpliv IPM na proliferacijo celic, in sicer smo mu dodali Tween 80 ali lecitin, ki sta kot PAS emulgirala IPM. Masno razmerje med IPM in posamezno PAS je bilo 1:1, končna koncentracija posamezne sestavine na celicah pa enaka kot v primeru PAS. Domnevali smo namreč, da bomo rezultate proliferacije po dodatku IPM in PAS lažje ovrednotili, v kolikor bo koncentracija PAS enaka kot pri posamičnem testiranju. Posledično smo tudi pričakovali, da bomo pri kombinaciji IPM in PAS dobili manjšo proliferacijo kot pri posamezni PAS, saj je bila skupna končna koncentracija testiranega sistema večja za faktor 2. Vendar smo ugotovili nasprotno; pri kombinaciji lecitina in IPM smo pri vseh treh koncentracijah dokazali večjo proliferacijo v primerjavi s samim lecitinom. Prav tako je bila proliferacija celic pri kombinaciji Tweena 80 in IPM pri nižjih dveh koncentracijah večja kot pri samem Tweenu 80. Izjema je najvišja koncentracija 4,5 mg/ml, kjer je opazen padec v proliferaciji celic, ki znaša le 19,02%. Enak pojav upada proliferacije pri največji koncentraciji smo opazili že pri samem Tweenu 80, iz česar lahko sklepamo, da je citotoksičen oziroma citostatičen vpliv na celice posledica delovanja

Tweena 80. Iz dobljenih rezultatov tako ne moremo neposredno ovrednotiti vpliva IPM, kljub temu pa je razvidno, da kot notranja faza emulzije ni citotoksičen. V nadaljevanju eksperimentalnega dela pri ovrednotenju vpliva TK na celice sta lecitin in Tween 80 prav tako emulgirala IPM, dejansko pa je podobna situacija tudi v lamelarnih TK kot nosilnih sistemih; IPM je namreč porazdeljen med dvosloje PAS.

Proliferacija celic pri posameznih sestavinah je bila pri vseh koncentracijah signifikantno večja v primerjavi s SDS, kjer je bila proliferacija 13,52% pri 0,45 mg/ml ter 10,83% pri 4,5 mg/ml.

#### 4.2.1.2 Vpliv tekočih kristalov na keratinocite

V nadaljevanju smo želeli ovrednotiti vpliv TK na celice, zato smo jih izpostavili posameznim TK v enakih koncentracijah kot pri testiranju posameznih sestavin. Kot negativno kontrolo smo ponovno uporabili SDS. Na sliki 27 je grafičen prikaz z MTS testom dobljene proliferacije celic po izpostavitvi le teh posameznim TK in SDS.



**Slika 27:** % proliferacije keratinocitov po izpostavitvi tekočim kristalom in SDS (pozitivna kontrola) pri različnih koncentracijah po 4h.

Pri najnižji koncentraciji, tj. 0,45 mg/ml, še ni bilo opaznih bistvenih vplivov na celično proliferacijo, ki je bila pri vseh testiranih TK okoli 100% (od 95,92% pri TK 20 do 109,42% pri TK5). Posledično lahko to koncentracijo opredelimo kot subtoksično koncentracijo.



Pri koncentraciji 0,9 mg/ml je prišlo do padca proliferacije glede na negativno kontrolo, vrednosti se gibljejo od 81,32% pri TK16 do 94,68% pri TK10, vendar razlike med posameznimi TK niso signifikantne.

Pri koncentraciji 4,5 mg/ml smo zaznali citotoksične učinke TK, razvidne so tudi razlike med posameznimi TK oziroma vpliv različnih razmerij med sestavinami na proliferacijo celic. Pri TK, kjer je masno razmerje Tween 80: lecitin=1:1 (TK4, TK5 in TK10), je proliferacija celic signifikantno večja v primerjavi s TK z enako sestavo vendar z razmerjem Tween 80: lecitin=2:1 (TK15, TK16 in TK20). To sovпада z rezultati proliferacije celic po izpostavljenosti posameznim sestavinam, kjer so imele celice pri koncentraciji 4,5 mg/ml signifikantno boljšo proliferacijo po izpostavitvi raztopini lecitina (77,76%) kot po izpostavitvi Tweenu 80 (36,72%). Nadalje, razlike so opazne tudi med TK z razmerjem Tween 80: lecitin=1:1. TK z največjim deležem vode (TK10) izkazuje tudi največjo proliferacijo (83,45%), ki je signifikantno večja glede na TK z največjo vsebnostjo PAS (TK4, proliferacija 68,40%) in TK z največjo vsebnostjo IPM (TK5, proliferacija 71,38%).

Pri vseh treh preskušanih koncentracijah je bila proliferacija pri vseh TK signifikantno večja v primerjavi z SDS (pozitivna kontrola), iz česar lahko sklepamo na nizko stopnjo iritacije naših sistemov. Izmed sestavin je imel, pri vseh preiskovanih sistemih, največji vpliv na proliferacijo Tween 80.

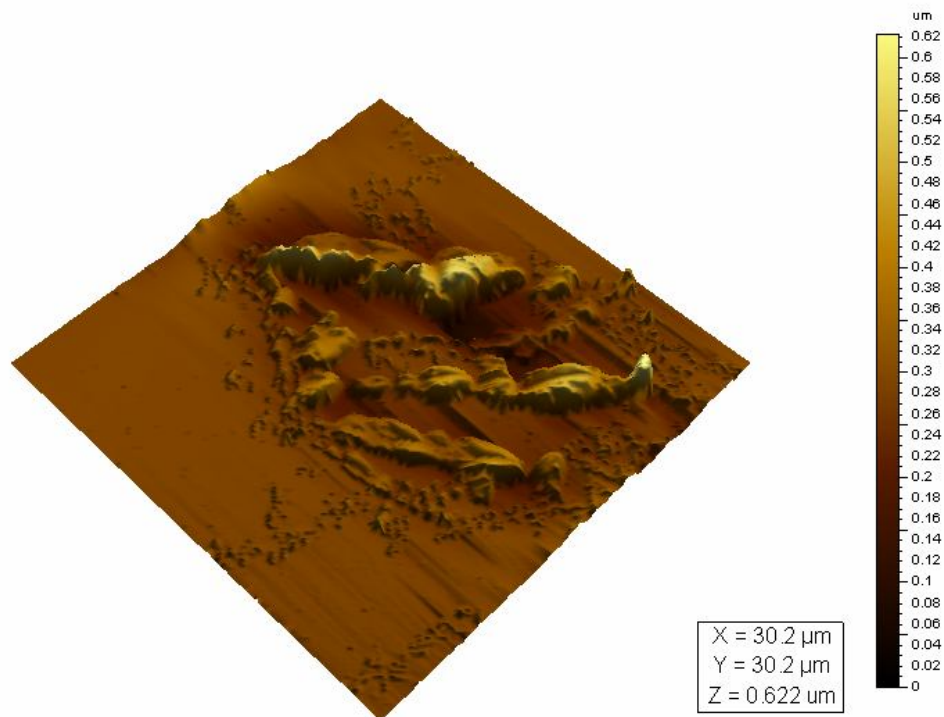
Z vrednotenjem citotoksičnosti oziroma citostatičnosti z MTS testom smo pridobili osnovne informacije o sprejemljivosti TK kot nosilnih sistemov za dermalno uporabo. Dobljeni rezultati so potrdili pričakovanja o majhnem vplivu TK na proliferacijo celic, osnovana na predhodni izbiri biološko sprejemljivih sestavin, tj. signifikantno večjo proliferacijo keratinocitov po izpostavitvi TK v primerjavi s SDS, referenčnim iritantom. Dejstvo pa ostaja, da na celičnih kulturah že nižje koncentracije izzovejo odgovor v primerjavi z rekonstruiranimi celičnimi kožnimi modeli, ki imajo razvit *stratum corneum* in posledično barierno funkcijo, prav tako testiranje na celičnih kulturah zahteva redčenje formulacije. Kljub temu pa z ugotavljanjem proliferacije keratinocitov po izpostavitvi posameznim komponentam oziroma TK dobimo prvi vtis o potencialni citotoksičnosti testiranih spojin oziroma sistemov.

## **4.2.2 VREDNOTENJE MORFOLOŠKIH SPREMEMB CELIČNE MEMBRANE KERATINOCITOV Z MIKROSKOPOM NA ATOMSKO SILO**

S proučevanjem keratinocitov z AFM mikroskopom smo želeli preveriti vpliv TK na morfologijo celične membrane keratinocitov. Celice smo vzorcem izpostavili 4h oziroma 24h. Vzorce za AFM analizo smo izbrali glede na rezultate MTS testa in sicer smo izbrali TK10 pri katerem smo dokazali najvišjo proliferacijo celic ter dodatno formulacijo TK10 z vgrajenim AP. Nadalje smo se odločili za koncentracijo 0,45 mg/ml, ki se je pri MTS testu izkazala za subtoksično in za primerjavo še koncentracijo 4,5 mg/ml, kjer so bili razvidni citotoksični učinki. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili celice izpostavljene SDS, za negativno kontrolo pa so nam služile celice, ki niso bile izpostavljene TK. Za testiranje pri subtoksični koncentraciji smo se odločili na podlagi rezultatov, ki so jih objavili Lastella in sodelavci. Pri določanju vpliva  $\text{HgCl}_2$  na keratinocite so najprej z ugotavljanjem proliferacije celic pri izpostavitvi različnim koncentracijam  $\text{HgCl}_2$  določili njegovo subtoksično koncentracijo, nato celice izpostavili tej koncentraciji in jih snemali z AFM. Opazili so, da je že pri subtoksičnih koncentracijah prišlo do morfoloških sprememb celične membrane (53).

### **4.2.2.1 Celice po 4h izpostavitve tekočim kristalom**

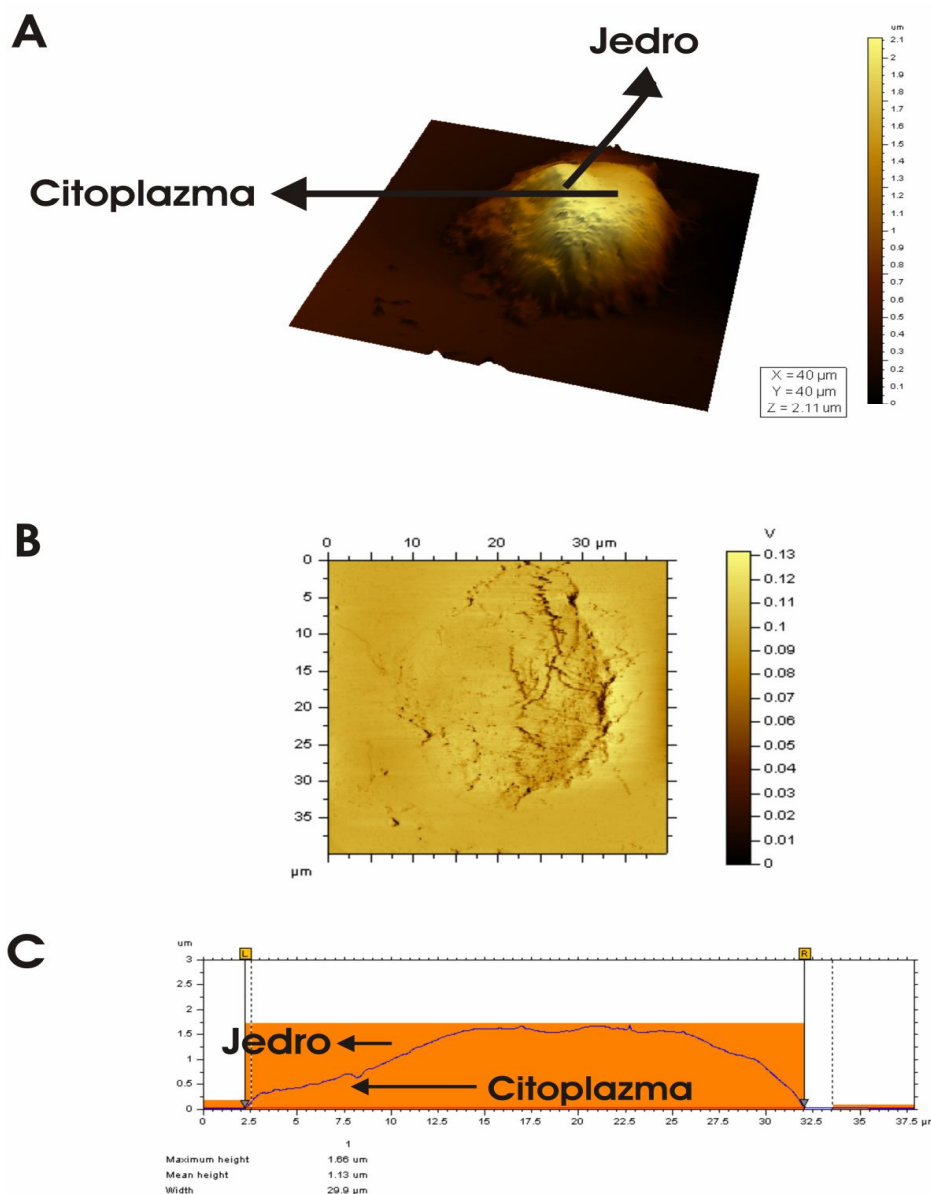
Pri pozitivni kontroli (SDS) so keratinociti že po 4h fragmentirali (slika 28), celična membrana je bila uničena.



**Slika 28:** 3D topografija površine keratinocitov izpostavljenim SDS (0,45 mg/ml) po 4h.

Velikost snemalne površine je 30x30 µm, ločljivost je 512x512 točk. X, Y in Z predstavljajo velikosti vseh treh dimenzij na sliki, se pravi širino, dožino in višino. Ob robu slike je barvna lestvica s pomočjo katere določimo višino objektov na sliki (v µm).

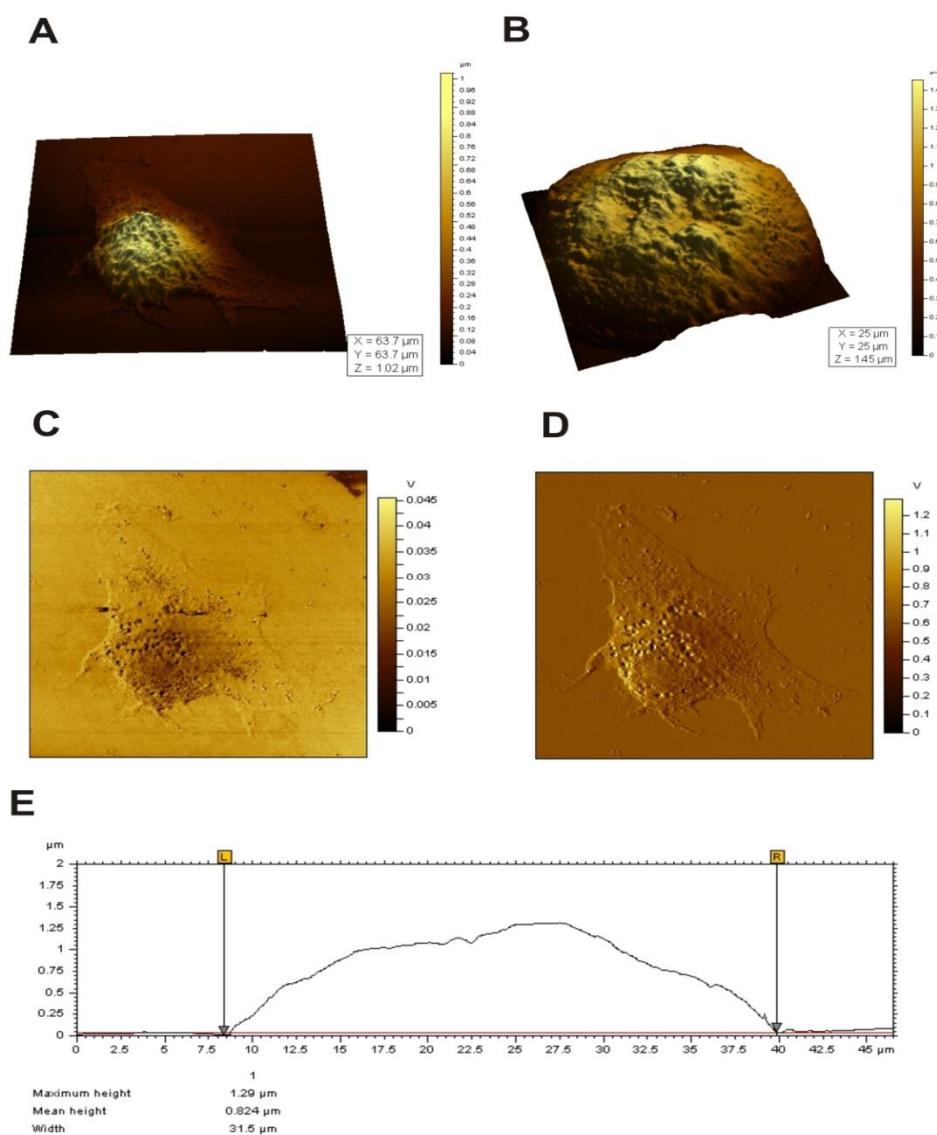
Celice negativne kontrole (slika 29) so bile okrogle do poligonalne oblike z jasno definiranim jedrom in citoplazmo (slika 29A). Višina celice je znašala  $1,36 \pm 0,29$  µm širina pa  $36,0 \pm 2,59$  µm. Ob robovih celic ni bilo razvidnih psevdopodijev. Slika trenja (slika 29B) je pokazala homogeno površino celične membrane kot tudi odsotnost vdolbin (slika 29C).



**Slika 29:** **A** – 3D topografija celic negativne kontrole. Velikost snemalne površine je 40x40  $\mu\text{m}$ , ločljivost je 512x512 točk; **B** – Slika trenja površine celic negativne kontrole (V so volti). Strukture na površini so bolj izrazite v primerjavi s topografskimi slikami; **C** – Profil višine celice (ordinata predstavlja višino, abscisa širino celice v  $\mu\text{m}$ ), iz katerega je razvidno območje jedra in citoplazme.

Celice, ki smo jih izpostavili TK10 v subtoksični koncentraciji, so bile bolj sploščene, kar smo potrdili z manjšo višino ( $0,93 \pm 0,24 \mu\text{m}$ ) v primerjavi s kontrolnimi celicami. Na celicah smo opazili značilne morfološke spremembe kot so jasno definirani pseudopodiji

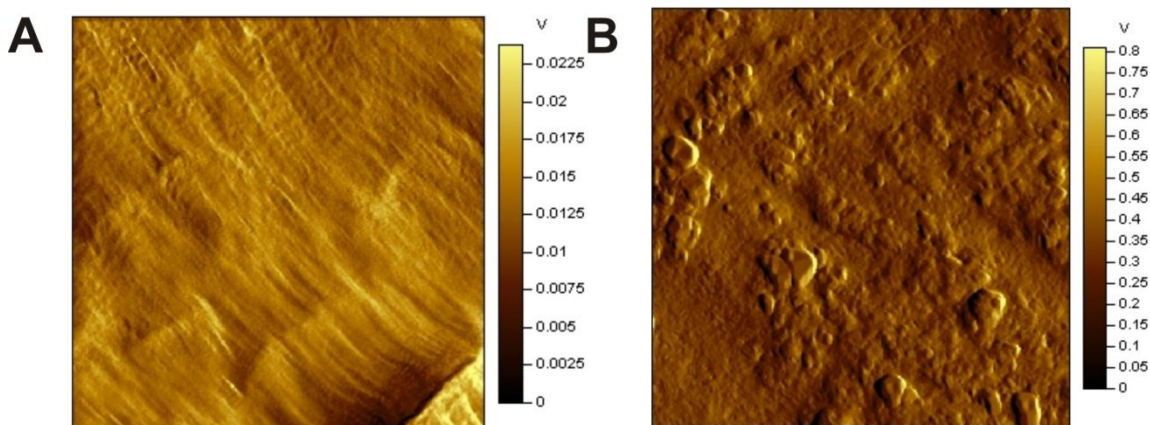
ter decentralizirano postavljeno jedro. Iz slike 30 je razvidno, da je tako območje jedra kot tudi citoplazme zrnatega videza. Slike trenja odražajo heterogeno strukturo površine celične membrane v primerjavi s kontrolo, kar je v povezavi z aktivacijo celic oziroma z možno razliko v rigidnosti celične membrane.



**Slika 30:** **A** – 3D topografija celic izpostavljenih TK10 (0,45 mg/ml, 4h). Velikost snemane površine je 40x40  $\mu\text{m}$ , ločljivost je 512x512 točk; **B** – 3D topografija površine območja jedra (povečava). Velikost snemane površine je 25x25  $\mu\text{m}$ , ločljivost je 512x512 točk; **C** – Slika strmine površine celice. Morfološke strukture celic so bolj izrazite v primerjavi s topografskimi slikami; **D** - Slika trenja površine celice. Razvidna je heterogenost v teksturi celične membrane, kar se opisuje s temnejšimi deli (manjše trenje, mehkejša struktura) ter

svetlejšimi deli (večje trenje, trša struktura); **E** – Profil višine celice iz katerega je razvidno decentralizirano postavljeno jedro.

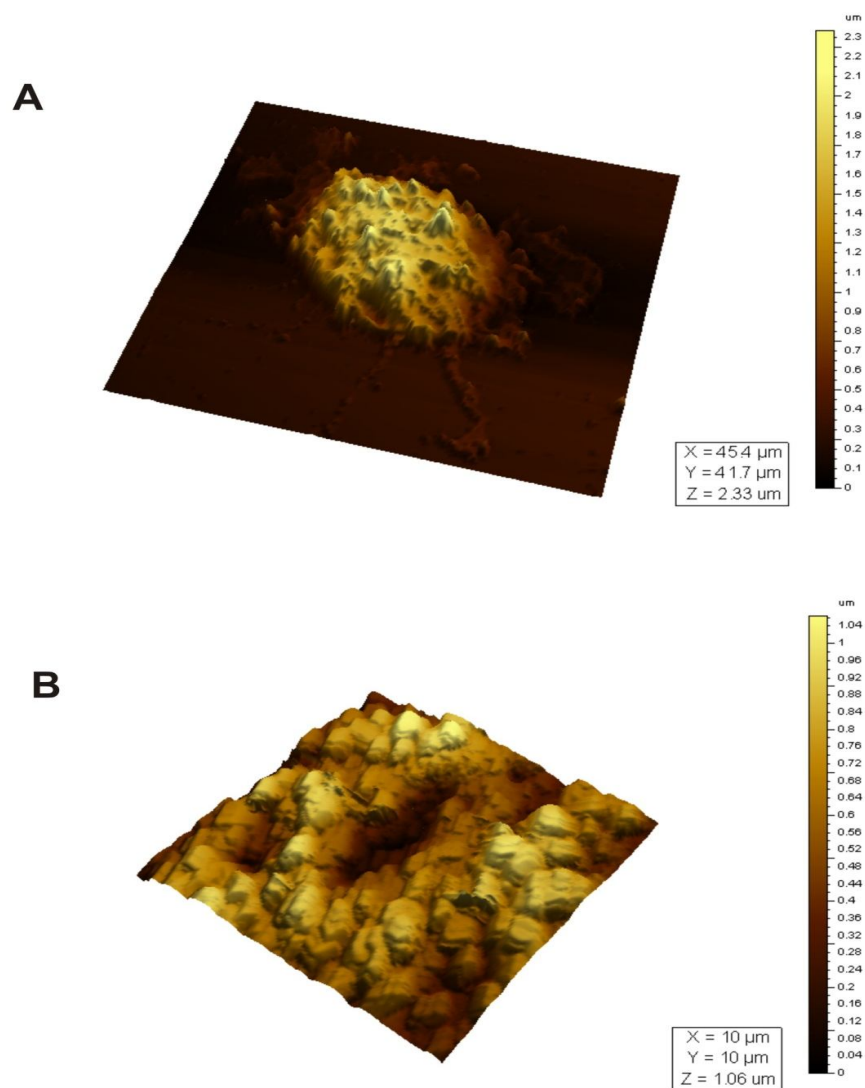
Naši rezultati kažejo tudi na večjo hrapavost celic negativne kontrole (Ra (aritmetična sredina profila hrapavosti)  $0,122 \pm 0,05 \mu\text{m}$ ; Rq (kvadratni koren Ra)  $0,176 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ) v primerjavi s celicami izpostavljenimi TK10 (Ra  $0,079 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ; Rq  $0,099 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ). Razlike v hrapavosti celične membrane lahko razložimo z nastalimi razlikami v morfoloških strukturah, ki so razvidne na sliki 31.



**Slika 31:** Sliki strmine površine celične membrane celic izpostavljenim TK10 v koncentraciji 0,45 mg/ml (**A**) ter celic negativne kontrole (**B**). Fibrilarna struktura celic, ki so bile izpostavljene TK10, v primerjavi z zrnato površino celic negativne kontrole je osnovni razlog zmanjšanja hrapavosti celične membrane.

Kot je znano iz literaturnih podatkov se aktivacija celic izraža tudi v povečanju gostote citoskeletnih elementov (fibrilarna struktura) ter zmanjšani hrapavosti celične membrane (slika 31A) (54). Pri celicah negativne kontrole je razvidna granularna celična membrana (slika 31B), kar vpliva na povečanje parametrov hrapavosti. Po drugi strani pa je TK10 tudi pri subtoksični koncentraciji (koncentracija 0,45 mg/ml, na podlagi MTS testa) delno poškodoval membrano keratinocitov, tako da so posledično nastale vdolbine v celični membrani (slika 29). Lastella in sodelavci so nastanek poram podobnih vdolbin v celični membrani keratinocitov pripisali delni poškodbi celic v primeru izpostavitve celic subtoksičnim koncentracijam  $\text{HgCl}_2$  (53). Na osnovi tega ugotavljamo, da smo, za razliko od bioloških testov kot je MTS test, s pomočjo AFM uspeli zaznati morfološke spremembe celične membrane kot začetek strukturnih sprememb pri subtoksičnih koncentracijah TK.

Enak čas (4h) izpostavitve celic TK10 v višji koncentraciji (4,5 mg/ml) je rezultiral tako v nespremenjeni obliki celic kot tudi z nastankom psevdopodijev (slika 32A). Po drugi strani pa je povečana hrapavost celične membrane (Ra 0,191  $\mu\text{m}$ ; Rq 0,238  $\mu\text{m}$ ) izhajala iz bolj zrnate površine celic, kar je prikazano na sliki 32B. Povprečna višina celic je znašala  $1,69 \pm 0,15 \mu\text{m}$  povprečna širina pa  $33,5 \pm 8,34 \mu\text{m}$ .

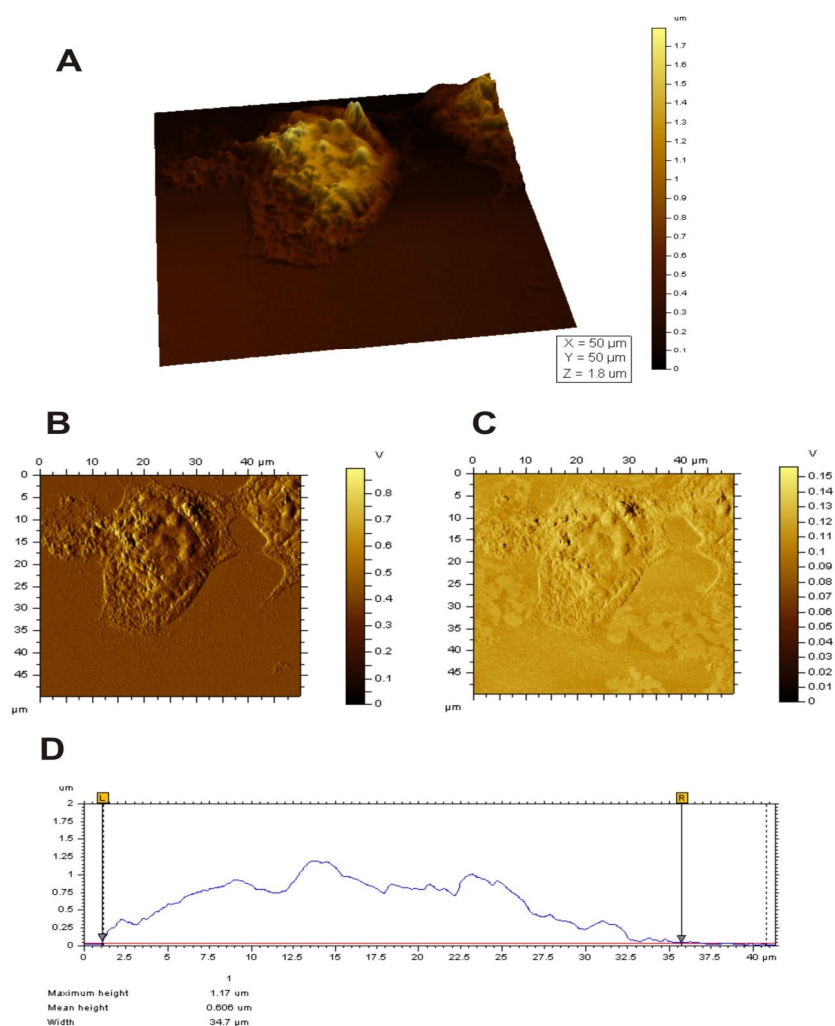


**Slika 32: A** – 3D topografija keratinocitov, ki so bili 4h izpostavljeni TK10 v koncentraciji 4,5 mg/ml. Velikost snemalne površine je  $45,5 \times 41,7 \mu\text{m}$ , ločljivost je  $512 \times 512$  točk; **B** – 3D topografija površine celične membrane (povečava) na kateri je razvidna zrnata tekstura površine. Velikost snemane površine je  $10 \times 10 \mu\text{m}$ , ločljivost je  $512 \times 512$  točk.



Zrnata struktura celične membrane je po literaturnih podatkih v povezavi s staranjem celic (54) in je lahko tudi parameter, ki potrjuje toksičen učinek TK10 v višji koncentraciji. To dodatno potrjujejo rezultati MTS testa, ki kažejo zmanjšano proliferacijo celic, ki so bile 4h izpostavljene TK10 v koncentraciji 4,5 mg/ml.

Na enak način smo vrednotili tudi sistem TK10 z vgrajenim AP. Pri izpostavitvi celic sistemu s koncentracijo 4,5 mg/ml je prišlo do izrazitih sprememb na površini celice kot je fragmentirano jedro ter bolj zrnat videz citoplazme (slika 33).



**Slika 33:** **A** – 3D topografija površine keratinocitov, ki so bili 4h izpostavljeni TK10+AP v koncentraciji 4,5 mg/ml; **B** – Slika strmine površine celične membrane; **C** – Slika trenja celične membrane keratinocitov; **D** – Profil višine, ki opisuje zrnato strukturo površine celične membrane.



#### **4.2.2.2 Celice po 24h izpostavitve tekočim kristalom**

Celice negativne kontrole so bile po 24h, tako kot po 4h, okrogle do poligonalne oblike z jasno definiranim jedrom in citoplazmo, ob robovih ni bilo razvidnih psevdopodijev (podatki niso prikazani). Pri pozitivni kontroli, TK 10 in TK 10+AP pa smo že pri koncentraciji 0,45 mg/ml pod invertnim svetlobnim mikroskopom videli, da so celice večinoma mrtve (niso bile pritrjene, so plavale v mediju) in jih zato nismo mogli gledati z AFM.

AFM se je, kot metoda za določanje citotoksičnosti, izkazala kot koristna saj smo ugotovili, da pride do učinkov na celico oziroma celično membrano že pri subtoksični koncentraciji TK, z večanjem koncentracije pa so učinki bolj izraziti. Po izpostavitvi celic TK so nastale morfološke spremembe celične membrane v obliki nastanka vdolbin ter zrnat videz celične membrane, ki so verjetno povezane s preurejanjem citoskeletnih elementov (55, 56). Vgradnja AP v TK ni vplivala na morfološke spremembe celic glede na sisteme brez vgrajenega AP.

Nadaljne študije bodo usmerjene k preverjanju razlik v rigidnosti celične membrane ter ugotavljanju možnega mehanizma delovanja TK na celice s pomočjo AFM kot tudi drugih komplementarnih tehnik.

## 5 SKLEP

V diplomskem delu smo vrednotili TK za dermalno aplikacijo iz lecitina in Tweena 80 kot emulgatorske zmesi, IPM kot oljne faze in bidestilirane vode, kot učinkovino smo vanje vgradili 1% (m/m) AP. Z uporabo SAXS in DSC smo proučevali notranjo strukturo TK, z uporabo MTS testa in AFM pa potencialno citotoksičnost in primernost za uporabo na koži.

S SAXS smo potrdili lamelarno strukturo TK, ki se ohrani tudi pri temperaturi na površini kože (32°C) in pri telesni temperaturi (37°C). Po vgradnji AP se lamelarna struktura TK pri 25°C ohrani, vendar se pri TK, ki imajo razmerje Tween 80:lecitin= 1:1 že pojavijo dodatne strukture, na osnovi oblike vrhov predpostavljamo, da gre za micelle. Pri 37°C smo pri večini sistemov z vgrajenim AP ugotovili izgubo lamelarne strukture, zato bi bilo v nadaljevanju raziskovalnega dela nujno posneti še difraktograme pri 32°C za določitev strukture pri temperaturi na površini kože.

Z DSC analizo smo z ohlajanjem iz 20°C na -60°C potrdili, da se voda v TK nahaja v obliki t.i. vezane vode. Nadalje smo ugotovili, da se voda močnejše veže na polarne glave Tweena 80 kot pa na polarne glave lecitina. Po vgradnji AP pride do manjših sprememb v termogramih. AP ne vpliva bistveno na temperaturo zamrznitve vode, se pa premakne vrh proti nekoliko višjim T (sistemi z najvišjim deležem vode) oziroma nižjim T (sistemi z nižjim deležem vode).

Pri določanju potencialne citotoksičnosti TK in njihovih posameznih sestavin *in vitro* z MTS testom na celičnih kulturah keratinocitov smo ugotovili, da je proliferacija celic po izpostavitvi tako TK kot posameznim sestavinam pri vseh treh preskušanih koncentracijah (0,45 mg/ml, 0,9 mg/ml in 4,5 mg/ml) signifikantno večja kot pri izpostavitvi celic SDS v odgovarjajočih koncentracijah. Nadalje smo ugotovili, da pri najnižji koncentraciji TK (0,45 mg/ml) ni bistvenih vplivov sestave sistemov na celično proliferacijo, medtem ko smo pri koncentraciji 4,5 mg/ml že zaznali učinke TK na proliferacijo celic. Pri tej koncentraciji so se tudi pokazale razlike med TK z različnim razmerjem sestavin. Ugotovili smo nižjo proliferacijo celic, ki so bile izpostavljene TK z razmerjem Tween 80:lecitin=2:1 v primerjavi s TK z razmerjem Tween 80:lecitin=1:1. Najboljšo proliferacijo so izkazovale celice po izpostavitvi TK z največjim deležem vode. Moramo pa se zavedati, da na celičnih kulturah že nižje koncentracije izzovejo odgovor v primerjavi z rekonstruiranimi kožnimi

modeli, kljub temu pa s testiranjem na celičnih kulturah dobimo prvi vtis o potencialni citotoksičnosti testiranih sistemov.

Z AFM smo ugotovili, da imajo TK že pri subtoksični koncentraciji (0,45 mg/ml, določena z MTS testom) vpliv na morfologijo keratinocitov. Pojavili so se jasno definirani psevdopodiji ter decentralizirano postavljeno jedro, nastale so vdolbine v celični membrani. Zaradi fibrilarne strukture, ki nastane kot posledica aktivacije celic, se je zmanjšala hrapavost celic v primerjavi z negativno kontrolo. Z večanjem koncentracije so bili po pričakovanju učinki TK na celico še bolj izraziti. Zaradi zrnate strukture, ki nakazuje na citotoksične učinke TK, so imele celice večjo hrapavost. Tudi po vgradnji AP je prišlo do izrazitih sprememb na površini celice.

Rezultati diplomskega dela nakazujejo, da so TK s sestavo lecitin/Tween 80/IPM/voda zaradi lamelarne strukture, ki se ohrani tudi pri 32°C in nizkega potenciala iritacije primerni za dermalno uporabo. Seveda pa bo potrebno nadaljnjo raziskovalno delo z natančnim ovrednotenjem TK za dostavo AP; potrebno bi bilo izvesti še SAXS meritve pri 32°C, prav tako je z vidika iritacije nadaljnje *in vitro* testiranje na rekonstruiranih kožnih modelih in/ali *in vivo* epikutani test logično nadaljevanje.

## 6 VIRI IN LITERATURA

1. Martin A: Physical pharmacy 4<sup>th</sup> ed. Lea&Febriger, London 1993: 36-37
2. Müller-Goymann CC: Drug Delivery: Liquid crystals. In: Swarbrick J: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3<sup>th</sup> ed. Informa Healthcare, New York 2007, vol.2: 1115-1131.
3. University of Cambridge. Liquid Crystals: [http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/liquid\\_crystals/index.php](http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/liquid_crystals/index.php). Dostop: 10-06-2010.
4. Senyuk B: Liquid crystals: A simple view on a complex matter. <http://www.dept.kent.edu/spie/liquidcrystals/>. Dostop: 22-06-2010.
5. Vilfan M, Muševič I: Tekoči kristali. DMFA – založništvo, Ljubljana 2002: 10-15, 102-110
6. Müller-Goymann CC: Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. Eur J Pharm and Biopharm 2004; 58: 343-356.
7. Burducea G: Lyotropic liquid crystals I. Specific structures. Rom Rep Phys 2004; 56(I): 66-86.
8. Harms M, Mackeben S, Müller-Goymann CC: Thermotropic transition structures in the ternary system lecithin/ isopropyl myristate/water. Coll Surf A: Physicochem Eng Asp 2005; 259: 81-87.
9. Malmsten M: Surfactants and Polymers in drug delivery. Marcel Dekker, Inc., New York 2002.
10. Makai M, Csányi E, Németh ZS, Pálinkás J, Erős I: Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. Int J Pharm 2003; 256: 95-107.
11. Mondain-Monval O: Freeze fracture TEM investigations in liquid crystals. Curr Opin Coll Int Sci 2005; 10: 250-255.
12. Fukada K, Matsuzaka Y, Fujii M, kato T, Seimiya T: Phase behaviour and lyotropic-liquid crystal structure of alkyltrimethylammonium bromide-water mixtures around freezing temperature of water. Therm Acta 1998; 308: 159-164
13. Fung BM: <sup>13</sup>C NMR studies of liquid crystals. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc 2002; 41: 171-186.
14. Tivadar A, Kočevar K, Muševič I, Srčič S: Mikroskopija na atomsko silo. Farm Vestn 2002; 53: 277-291.

15. Garcia-Manyes S, Oncins G, Sanz F: Effect of temperature on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophys J* 2005; 89: 4261-4274.
16. Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2007; 21-22.
17. Kristl J, Gašperlin M, Jeras M: Izbrane vsebine iz kozmetologije (učbenik za kozmetologijo). Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2005; 3-16.
18. Spletni vir: <http://www.healthhype.com/2007/11>. Dostop: 25.10.2010.
19. Trojak A, Kristl J: Antioksidanti: aktivne sestavine kozmetičnih izdelkov. *Farm Vest* 1999; 50: 443-453.
20. Vyas SP, Jaitely V, Kanaujia P: Self-assembling supramolecular biovectors. A new dimension in a novel drug delivery system. *Pharmazie* 1997; 52: 259-267.
21. Nesseem DI: Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 26: 387-399.
22. Junginger HE: Ointments and creams as colloidal drug Delivery Systems. In: Kreuter J. *Colloidal drug Delivery Systems*. Marcel dekker, Inc., New York 1994, vol.66: 1-30.
23. Klein K. Liquid Crystals and Emulsions: A Wonderful Marriage. In: Wiechers JW. *Skin Barrier: chemistry of Skin delivery systems*. Allured Publishing Corporation, 265-271.
24. Libster D, Aserin A, Wachtel E, Shoham G, Garti N: An HII liquid crystal-based delivery system for cyclosporin A: Physical characterization. *J Coll Int Sci* 2007; 308: 514-524.
25. Schliemann S, Breternitz M, Elsner P: Principles and mechanisms of skin irritation. In: Barel AO, Paye M, Mainbach HI: *Handbook of cosmetic science and technology 3<sup>rd</sup> ed.*, Informa Healthcare USA, Inc. 2009: 443-453.
26. Kopčavar Guček N: Kontaktni dermatitisin urtikarija v družinski medicine. In: Zbornik predavanj: V. Fajdigovi dnevi, Združenje zdravnikov družinske medicine – SZD, 2003: 33-40.
27. Kumar R, Katare OP: Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: A review. *AAPS PharmSciTech* 2005; 6 (2): 298-310.
28. Welss T, Basketter DA, Schröder KR: In vitro skon irritation: facts and future. *State of art review of mechanisms and models, Toxicol Vitro* 2004; 18: 231-243.

29. Lunder T: Alergijske in reaktivne kožne bolezni. In: Kansky A: kožne in spolne bolezni, Združenje slovenskih dermatovenerologov, Ljubljana 2002: 137-150.
30. Evropska komisija: [http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/animal-testing/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/animal-testing/index_en.htm). Dostop: 7.12.2010.
31. Basketter DA, Chamberlain M, Griffiths HA, Rowson M, Whittle E, York M: The classification of skin irritants by human patch test. *Food Chem Toxicol* 1997; 35: 845-852.
32. Evropski center za validacijo alternativnih metod: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>. Dostop: 7.12.2010.
33. Dreher F, Walde P, Luisi PL, Elsner P: Human skin irritation studies of a lecithin microemulsion gel and of lecithin liposomes. *Skin Pharmacol* 1996; 9: 124-129.
34. Date AA, Nagarsenker MS: Parenteral microemulsions: An overview. *Int J Pharm* 2008; 355: 19-30.
35. Rowe C, Sheskey PJ, Owen SC: *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 5<sup>th</sup> Ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association 2006: 51-52, 374-375, 409-411, 580-584.
36. Lipoid S-100 specifikacija, Lipoid Nemčija
37. O'Neill JM, Smith A, Heckelman E: *The Merck Index* 13<sup>th</sup> ed., Merck&Co. Inc., Whitehouse Station 2001: 933, 1362.
38. Špiclin P, Gašperlin M: Vitamin C in koža. *Farm Vestn* 2001; 52: 287-293.
39. Spletni vir: <http://www.farmfak.uu.se/farm/farmfyskem-web/instrumentation/saxs.shtml>. Dostop: 26.10.2010
40. Tomšič M: Strukturne raziskave mikroemulzij z metodo ozkokotnega rentgenskega sipanja. Doktorska disertacija, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 2004.
41. Zhuang W, Chen X, Cai J, Zhang G, Qiu H: Characterisation of lamellar phases fabricated from Brij-30/water/1-butyl-3-methylimidazolium salts ternary systems by small-angle X-ray scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 2008; 318: 175-183.
42. Planinšek O, Zajc N, Srčič S: Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji. *Farm Vest* 2001; 52: 173-185.
43. Atkins P, de Paula J: *Physical Chemistry* 7<sup>th</sup> Ed. W. H. Freeman and Company, New York 2002: 46-47.

44. Promega Technical Bulletin: CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Instructions for use of products G3580, G3581 and G3582, ZDA, 2009.
45. Kralj L: Kvarterni sistemi z lecitinom: opredelitev fizikalno-kemijskih lastnosti in izdelava faznega diagrama. Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2009.
46. Čerpnjak K: Vrednotenje koloidnih sistemov z lecitinom za dermalno aplikacijo askorbilpalmitata. Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.
47. Podlogar F, Gašperlin M, Tomšič M, Jamnik A, Bešter Rogač M: Structural characterisation of water-Tween 40<sup>®</sup>/Imwitor 308<sup>®</sup>-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *Int J Pharm* 2004; 276: 115-128.
48. Garti N, Aserin A, Tiunova I, Fanun M: A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp* 2000; 170: 1-18.
49. Garti N, Aserin A, Ezrahi S, Tiunova I, Berkovic G: Water behavior in nonionic surfactant systems I: Subzero temperature behavior of water in nonionic microemulsions studied by DSC. *J Colloid Interface Sci* 1996; 178: 60-68.
50. Date AA, Patravale VB: Microemulsions: Applications in transdermal and dermal delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2007; 24 (6): 547-596.
51. Gosenca M, Obreza A, Pečar S, Gašperlin M: A new approach for increasing ascorbyl palmitate stability by addition of non-irritant co-antioxydant. *AAPS PharmSciTech* 2010; 11 (3): 1485-1492.
52. Effendy I, Maibach HI: Detergent and skin irritation. *Clinics in Dermatology* 1996; 14: 15-21.
53. Lastella M, Lasalvia M, Perna G, Biagi PF, Capozzi V: Atomic force microscopy study on human keratinocytes treated with HgCl<sub>2</sub>. *J Phys: Conf Ser* 2007; 61: 920-925.
54. Berdyeva TK, Woodworth CD, Sokolov I: Human epitelial cells increase their rigidity with ageing in vitro: direct measurments. *Phys Med Biol* 2005; 50: 81-92.

55. Wu Y, Lu H, Cai J, He X, Hu Y, Zhao HX, Wang X: Membrane surface nanostructures and adhesion property of T lymphocytes exploited by AFM. *Nanoscale Res Lett* 2009; 4 (8): 942–947.
56. Rieti S, Manni V, Lisi A, Giuliani L, Sacco D, D'Emilia E, Cricenti A, Generosi R, Luce M, Grimaldi S: SNOM and AFM microscopy techniques to study the effect of non-ionizing radiation on the morphological and biochemical properties of human keratinocytes cell line (HaCaT). *J Microsc* 2004; 213 (1): 20-28.