

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA JORDAN

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA JORDAN

**IZDELAVA IN VREDNOTENJE HITOSANSKIH NANODELCEV ZA VNOS
OLIGONUKLEOTIDOV V KOŽNE CELICE**

**PRODUCTION AND EVALUATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES FOR
OLIGONUCLEOTIDE DELIVERY INTO SKIN CELLS**

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedrah za farmacevtsko tehnologijo in farmacevtsko biologijo pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Matjaža Ravnikarja, mag. farm.

ZAHVALA

'Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar in somentorju asist. dr. Matjažu Ravnikarju za pomoč, potrpežljivost, strokovne nasvete in vodenje pri izdelavi te magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem prof. dr. Borutu Štruklju za izkazano zaupanje in priložnost ter kolegu Ireneju za družbo pri raziskovanju.

Posebna zahvala gre mojim staršem, ki so mi omogočili študij in me vsa leta šolanja podpirali in motivirali, sestri Klari za vso dodatno razlago in pomoč pri študiju ter vsem najbližjim, ki so mi v času študija stali ob strani.'

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm. in somentorja asist. dr. Matjaža Ravnikarja, mag. farm.

Nika Jordan

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Damjan Janeš, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK.....	iv
ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vii
1 UVOD.....	1
1.1 Naravni biopolimeri	1
1.1.1 Hitosan.....	1
1.2 Nanodelci	3
1.2.1 Izdelava nanodelcev	3
1.2.2 Vrednotenje nanodelcev	5
1.2.3 Nanodelci kot dostavni sistem.....	6
1.3 Protismiselni oligonukleotidi	7
1.3.1 Mehanizem delovanja.....	7
1.3.2 Modifikacije kemijske strukture	9
1.4 Dostavni sistemi za vnos oligonukleotidov v sesalske celice	11
1.4.1 Virusni vektorji.....	11
1.4.2 Nevirusni vektorji.....	12
1.5 Mehanizmi vstopa v sesalsko celico	13
1.5.1 Goli oligonukleotidi.....	13
1.5.2 Polipleksi	13
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Materiali.....	17
3.1.1 Reagenti.....	17
3.1.2 Oprema	18
3.1.3 Kiti	19
3.1.4 Medij za gojenje	19
3.1.5 Pufri	19
3.2 Metode	20
3.2.1 Izdelava in vrednotenje hitosanskih nanodelcev	20
3.2.2 Vgrajevanje oligonukleotidov v nanodelce	22
3.2.3 Vgrajevanje fluoresceina v nanodelce.....	22

3.2.4	Ugotavljanje učinkovitosti vgrajevanja oligonukleotidov	22
3.2.5	Gojenje keratinocitne celične linije HaCaT.....	23
3.2.6	Vnos nanodelcev z vgrajenimi oligonukleotidi v kožne celice.....	24
3.2.7	Fluorescenčna mikroskopija	24
3.2.8	Izolacija mRNA	24
3.2.9	Reverzna transkripcija	25
3.2.10	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času - qPCR	26
3.2.11	Analiza izražanja genov.....	28
4	REZULTATI	30
4.1	Vrednotenje hitosanskih nanodelcev	30
4.2	Vrednotenje hitosanskih nanodelcev z vgrajenimi oligonukleotidi.....	30
4.3	Ugotavljanje učinkovitosti vgrajevanja oligonukleotidov v nanodelce.....	31
4.4	Fluorescenčna mikroskopija	32
4.5	Izolacija mRNA	33
4.6	Reverzna transkripcija	33
4.7	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času - qPCR.....	34
4.8	Analiza izražanja.....	34
4.8.1	Imunska aktivacija.....	34
4.8.2	Izražanje tarčnih genov.....	34
5	DISKUSIJA	35
6	SKLEPI.....	40
7	LITERATURA	42

POVZETEK

Protismiselni oligonukleotidi imajo velik potencial za zdravljenje številnih bolezni, med drugim tudi kožnih. Njihova uporaba je omejena zaradi slabe stabilnosti v fizioloških medijih in slabega vstopa v sesalske celice. Z uporabo ustreznega polimernega dostavnega sistema nanometrskih velikosti lahko te slabosti omejimo. V zadnjih letih se za dostavo nukleinskih kislin v celice raziskujejo hitosanski nanodelci. Hitosan je netoksičen, biokompatibilen in biorazgradljiv naravni kationski polimer. Dostavni sistem iz hitosana mora preko elektrostatskih interakcij: nevtralizirati negativni naboj oligonukleotidov, da ne pride do odboja z negativno nabito celično membrano; dajati strukturo s primerno velikostjo, da zagotovimo vstop v celico; varovati oligonukleotide pred ekstracelularno in intracelularno nukleazno razgradnjo.

V okviru magistrske naloge smo z metodo ionskega geliranja izdelali hitosanske nanodelce in hitosanske nanodelce z vgrajenim 25-mernim protismiselnim oligonukleotidom proti interlevkinu 23 ter jih ovrednotili z merjenjem povprečnega premera, polidisperznega indeksa in zeta potenciala. Nanodelcem z oligonukleotidi smo spektrofotometrično ugotovili učinkovitost vgrajevanja, nato pa z njimi transficirali keratinocitno celično linijo HaCaT. Uspešnost transfekcije smo ocenili z opazovanjem tretiranih celic pod fluorescenčnim mikroskopom. V zadnjem delu naloge smo z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času spremljali utišanje izražanja gena za interlevkin 23, ki se pogosto prekomerno izraža pri vnetnih kožnih boleznih, kot je luskavica.

Ugotovili smo, da hitosanski nanodelci predstavljajo ustrezno velik dostavni sistem za oligonukleotide. Vgrajen oligonukleotid nekoliko poveča velikost delcev in zmanjša fizikalno stabilnost disperzij, vendar so ti parametri še vedno v mejah, ki zagotavljajo uspešno in varno transfekcijo sesalskih celic. Dosegli smo več kot 50 % učinkovitost vgrajevanja vseh oligonukleotidov, ki smo jih dodali med postopkom izdelave nanodelcev. Hitosanske nanodelce z vgrajenimi fluorescentno označenimi oligonukleotidi smo uspeli vnesti v kožne celice, saj so določene celice pod fluorescenčnim mikroskopom svetile intenzivno zeleno. Z metodo smo uspeli znižati izražanje provnetnega citokina interlevkin 23. Dobljeni rezultati so spodbudni za nadaljevanje raziskav na področju alternativnega zdravljenja kožnih bolezni s pomočjo nanodelcev z vgrajenim genskim materialom.

ABSTRACT

Antisense oligonucleotides have enormous potential for the treatment of a number of diseases, including inflammatory skin diseases. Unfortunately, their lack of stability in physiological fluids and poor penetration into mammalian cells prevent their widespread use. Polymer drug delivery systems could help solving these problems. In recent years chitosan nanoparticles have been studied for nucleic acids delivery into cells. Chitosan is a non-toxic, biocompatible and biodegradable natural cationic polymer. Its delivery system must be able to neutralize the negative charge of oligonucleotides to prevent charge repulsion against the anionic cell surface, to condense the structure to appropriate size scale for cellular entry, and to protect the oligonucleotides from degradation by extracellular and intracellular nucleases.

Within the master thesis chitosan nanoparticles and chitosan nanoparticles with incorporated 25 base pair antisense oligonucleotide against interleukin 23 were prepared. Nanoparticles were also evaluated by measuring their average diameter, polydispersity index and zeta potential. Then the entrapment efficiency of oligonucleotides was measured spectrophotometrically with Nanodrop spectrophotometer and the HaCaT keratinocyte cell line was transfected with nanoparticles with incorporated fluorescent oligonucleotides. Transfection efficiency of the cells was estimated under fluorescent microscope. In the last part of the thesis the real-time polymerase chain reaction has been used to monitor the antisense oligonucleotide's effect on keratinocyte expression of interleukin 23 gene, which is often over-expressed in inflammatory skin diseases such as psoriasis.

It was found that chitosan nanoparticles are delivery system of appropriate size. Incorporated oligonucleotides slightly increase the size and reduce the physical stability of dispersion, but these parameters are still within the limits which ensure safe and successful transfection into mammalian cells. Incorporation of oligonucleotides in the nanoparticle structure was successful; entrapment efficiency was higher than 50 %. Chitosan nanoparticles with incorporated fluorescent labeled oligonucleotides were able to enter skin cells. Individual cells were shining intensively green under a fluorescent microscope. With this method we were able to reduce the expression of pro-inflammatory cytokine interleukin 23.

The obtained results are encouraging for further research of alternative treatment for skin diseases with the help of nanoparticles with incorporated genetic material.

SEZNAM OKRAJŠAV

A ₂₆₀	absorbanca pri 260 nm
A ₂₈₀	absorbanca pri 280 nm
Ct	pražni cikel, angl. <i>threshold cycle</i>
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
DLS	dinamično sipanje laserske svetlobe, angl. <i>dynamic light scattering</i>
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid-trifosfat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
FBS	fetusni serum goveda, angl. <i>fetal bovine serum</i>
g	gravitacijski pospešek, angl. <i>standard gravity</i>
GAPDH	gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo
HaCaT	nesmrtna človeška linija keratinocitov
LAF	laminarni pretok zraka, angl. <i>laminar air flow</i>
LD ₅₀	srednja smrtna koncentracija, angl. <i>lethal dose, 50 %</i>
MF	morfolino-, angl. <i>morpholino-</i>
mRNA	sporočilna RNA, angl. <i>messenger RNA</i>
ND	nanodelci
PBS	fosfatni pufer, angl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija, angl. <i>photon correlation spectroscopy</i>

qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času, angl. <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
PDI	polidisperzni indeks
PEK	polielektrolitski kompleksi
PNA	peptidna nukleinska kislina, angl. <i>peptide nucleic acid</i>
PSO	protismiselni oligonukleotid
RNA	ribonukleinska kislina
RNaza H	ribonukleaza H
TGF- β	transformirajoči rastni faktor β , angl. <i>transforming growth factor β</i>
TPP	pentanatrijev tripolifosfat
TNF α	faktor tumorske nekroze alfa, angl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>
YWHAZ	gen za 14-3-3 protein zeta/delta
ZP	zeta-potencial
ZU	zdravilna učinkovina

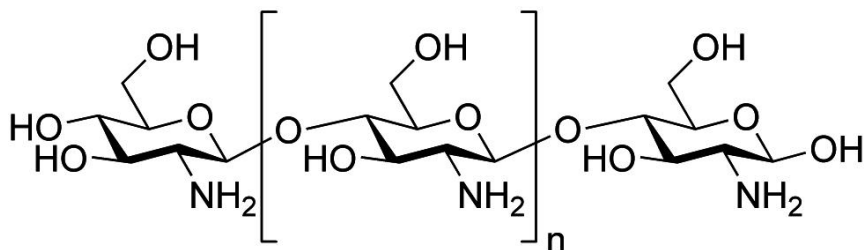
1 UVOD

1.1 Naravni biopolimeri

Polimere, ki jih uporabljamo kot pomožne snovi v dostavnih sistemih, lahko v grobem razdelimo na sintezne in naravne. Glede na njihovo razgradljivost, jih delimo na ne-biorazgradljive in biorazgradljive. Nerazgradljivi polimeri se v telesu nalagajo, zato so lahko za človeka toksični. Prav tako niso primerni za vgradnjo visokomolekulskih učinkovin, saj se mora zdravilna učinkovina iz nerazgradljivih materialov sprostiti z difuzijo, ki je odvisna od prepustnosti polimernega ogrodja. Zaradi teh pomanjkljivosti so biorazgradljivi polimeri primernejši za uporabo v dostavnih sistemih, saj se v organizmu razgradijo na biokompatibilne in netoksične metabolite, ki se po naravni poti izločijo iz telesa. Najpogosteje uporabljeni naravni biopolimeri so proteini (kolagen, albumin, želatina) in polisaharidi (agaroza, dekstran, hitosan) (1).

1.1.1 Hitosan

Hitosan je biokompatibilen in biorazgradljiv naravni kationski polisaharid. Kemijsko je kopolimer glukozamina in *N*-acetil glukozamina, ki sta med seboj povezana z $\beta(1-4)$ vezjo (slika 1). Je linearen polimer oziroma poliamin. Hitosan pridobivamo z delno deacetilacijo polimera hitina, ki je naravno prisoten v oklepu rakov, najdemo pa ga lahko tudi v celični steni nekaterih gliv, npr. kvasu, in zunanjem ogrodju insektov. Hitosan predstavlja vrsto polimerov z različno molekularno maso (50-200 kDa), viskoznostjo in stopnjo deacetilacije (40-98 %). Od stopnje deacetilacije hitina je odvisna stopnja pozitivnega naboja hitosana, za katerega so odgovorne številne protonirane aminoskupine ($-\text{NH}_3^+$). Ta fizikalna lastnost je pomembna predvsem zato, ker omogoča vezavo na anionske snovi in negativno nabite površine (2). Druga pomembna karakteristika hitosana je njegova topnost. Hitosan je netopen pri nevtralnih in alkalnih pH vrednostih in slabo topen v organskih topilih in vodi. Topen je v kislinskih raztopinah in v obliki soli, ki jih tvori z anorganskimi in organskimi kislinami, kot so glutaminska, klorovodikova, mlečna in očetna kislina. Njegova topnost je prav tako odvisna od stopnje deacetilacije. Tako je pri 40 % stopnji deacetilacije hitosan topen do pH 9, pri 85 % stopnji deacetilacije pa le do pH 6,5. Viskoznost disperzij hitosana narašča z nižanjem temperature in višanjem stopnje deacetilacije. Zaradi svoje velike molekularne mase in nerazvejane zgradbe lahko z večanjem koncentracije hitosana v disperzijah povečujemo tudi njihovo viskoznost (3).



Slika 1: Strukturna formula hitosana ($n =$ število sladkornih enot polimera) (4).

Študije so pokazale, da je hitosan netoksičen oziroma nizko toksičen polimer. Peroralna toksičnost hitosana je majhna, saj je LD_{50} pri miših (smrtni odmerek 50 %) večji od 16 g/kg telesne mase. Kljub temu obstajajo raziskave, ki so pokazale, da je hitosan *in vitro* lahko tudi toksičen, saj se je po njegovi aplikaciji zmanjšalo celično preživetje. Toksičnost hitosana je odvisna od njegove molekulske mase, čistosti, stopnje deacetilacije, odmerka in načina uporabe (2, 3). Poleg nizke citotoksičnosti hitosan izkazuje tudi minimalno imunogenost (5).

Hitosan se je zaradi omenjenih lastnosti izkazal za nepogrešljivo pomožno snov v farmaciji. Poveča lahko prepustnost različnih sluznic v organizmu in s tem pospeši absorpcijo nanj vezanih učinkovin. Ta sposobnost je dokazana za številne učinkovine, kot so inzulin, lososov kalcitonin, hidrokortizol, rastni faktor TGF- β in aciklovir (3). Bowman in Leong sta leta 2006 dokazala, da je za pospeševanje absorpcije ZU hitosan v obliki nanodelcev bolj učinkovit od tistega v raztopini (6). Hitosan izkazuje tudi bioadhezivne lastnosti, saj pozitivni naboji na površini polimera tvorijo močne elektrostatske vezi z negativnimi naboji sialinske kisline v glikoproteinih in proteoglikanih. Tako je omogočen močan stik s sluznico in posledično podaljšan čas zadrževanja na mestu absorpcije. V zadnjih letih so v razvoju tudi številni dostavni sistemi s hitosanom v različnih oblikah, najpogosteje hitosan sestavlja mikro- in nanodelce ter liposome. V teh dostavnih sistemih so lahko vgrajene polarne učinkovine, proteini, antigeni in fragmenti DNA, hitosan pa služi kot ogrodni polimer ali sredstvo za oblaganje. Z bioadhezijo in pospeševanjem absorpcije poveča biološko uporabnost ZU. Hitosan daje dobre rezultate predvsem v razvoju dostavnih sistemov za vnos genskega materiala, saj lahko t.i. polipleksi med polimerom in molekulo DNA služijo kot nevirusni vektorji za prenos terapevtskih genov v sesalske celice. V prihodnosti bi nam tako metoda samopovezovanja *in vitro* lahko nudila številne možnosti za zdravljenje bolezni, kot so rak, dedne genetske bolezni, vnetne bolezni, itd. (2, 3).

1.2 Nanodelci

Nanodelci so trdni koloidni delci nanometrskih velikosti (10-1000 nm). Poznamo dve vrsti nanodelcev: nanosfere in nanokapsule. Nanosfere so matriksni sistem, kjer je ogrodje razporejeno po celotnem volumnu, nanokapsule pa predstavljajo rezervoarni sistem iz polimerne ovojnice in vodnega ali oljnega jedra. Poznamo več različnih nanosistemov, v splošnem pa jih lahko razdelimo na liposome, trdne lipidne nanodelce, polimerne in anorganske nanodelce, dendrimere, nanocevke ter nanokristale. Učinkovina je lahko v nanodelcu raztopljena, vključena ali adsorbirana na njegovo površino (7, 8, 9).

Nanodelci zaščitijo ZU pred kemično in encimsko razgradnjo in s tem povečajo učinkovitost zdravila, zmanjšujejo neželene učinke, vplivajo na topnost ter omogočajo kontrolirano sproščanje ZU (7, 8). Prednost sistemov nanometrskih velikosti pred makro- in mikrosistemi je tudi v drugačni interakciji z biološkim okoljem. Tako so nanosistemi prodornejši, potujejo globlje v tkiva, prehajajo skozi epitelij ali vstopajo v celice. Zaradi teh lastnosti nam lahko služijo kot učinkovit dostavni sistem za biomolekule in druge ZU (podpoglavje *Nanodelci kot dostavni sistem*) (1).

Leta 2012 je bilo registriranih preko trideset različnih nanozdravil, ki so v klinični uporabi, vendar njihovo število narašča relativno počasi. Razlog je zahtevno testiranje potencialno škodljivih učinkov nanodelcev. Njihove fizikalno-kemijske lastnosti, kot so velikost, oblika, površinske lastnosti, reaktivnost in težnja po agregiranju namreč porajajo številna vprašanja glede kakovosti in varnosti tovrstnih zdravil (9, 10).

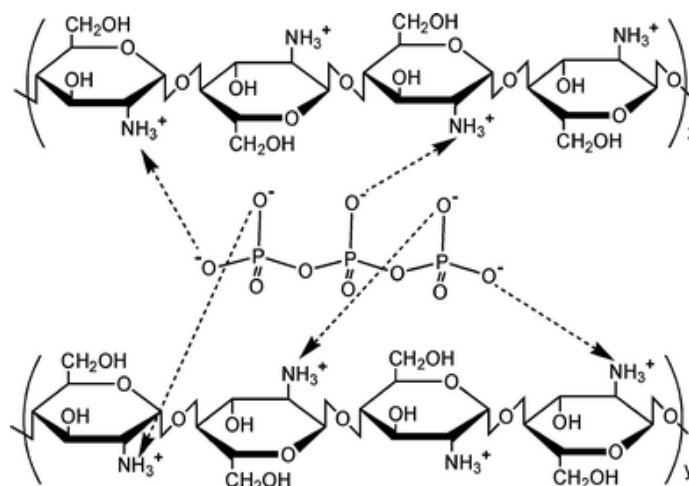
1.2.1 Izdelava nanodelcev

Metode za izdelavo nanodelcev lahko razdelimo v dve skupini glede na to, ali izdelava nanodelcev poteka skupaj s polimerizacijo monomerov polimera ali nastajajo nanodelci neposredno iz že nastalega polimera (7). Katero od metod bomo izbrali je odvisno od lastnosti polimera in ZU. Nanodelce iz naravnih polimerov izdelujemo z blagimi metodami, brez uporabe organskih topil in visokih strižnih sil. Za izdelavo nanodelcev iz hitosana je največkrat opisana metoda ionskega geliranja oziroma polielektrolitskega kompleksiranja. (11). Izraz *ionsko geliranje* uporabljamo, kadar za tvorbo nanodelcev uporabljamo majhne anionske molekule. Kadar namesto njih uporabljamo anionske makromolekule, govorimo o *polielektrolitskem kompleksiranju* (6).

Polielektrolitsko kompleksiranje in ionsko geliranje

Nanodelce iz hitosana lahko oblikujemo s fizikalnim ali kemičnim premreževanjem. Sprva so nanodelce pripravljali s kovalentnim premreževanjem - to lahko dosežemo s pomočjo glutaraldehida, ki s hitosansko amino skupino tvori Schiffovo bazo. Kovalentno prečno premreževanje se je večinoma opustilo zaradi toksičnosti samega glutaraldehida. Za razliko od kovalentnega prečnega povezovanja ima ionsko prečno povezovanje več prednosti, kot so blagi pogoji in enostaven postopek priprave nanodelcev (12).

Polielektrolitski kompleksi nastanejo spontano z združevanjem nasprotno nabitih polielektrolitov v raztopini. Pri tem pride do tvorbe intermolekularne ionske vezi. Na nastanek in stabilnost nanodelcev lahko vplivamo s spreminjanjem parametrov, kot so stopnja ionizacije, gostota naboja, koncentracija polimera, molekulska masa polimera, masno razmerje med izbranimi polimeri, ionska moč ter pH disperznega medija. Kot polianion pri izdelavi hitosanskih nanodelcev največ uporabljamo polianionski prečni premreževalec tripolifosfat (TPP). TPP je netoksičen multivalentni anion. S hitosanom tvori gel preko ionskih interakcij med pozitivno nabitimi amino skupinami hitosana in negativno nabitimi protiioni TPP, ter služi tudi kot stabilizator (slika 2). Nanodelce iz hitosana in TPP so prvič opisali Calvo in sodelavci leta 1997. Ugotovili so, da začnejo ob rahlem mešanju na sobni temperaturi nanodelci nastajati takoj, ko začnemo raztopini polimera dodajati TPP, vendar samo v določenem masnem razmerju hitosan/TPP (6, 13).



Slika 2: Nastanek kompleksa med polielektrolitom hitosanom in poliionom TPP (14).

1.2.2 Vrednotenje nanodelcev

Nanodelce lahko vrednotimo z različnimi fizikalno-kemijskimi tehnikami za karakterizacijo polimernih koloidov. Parametri, ki jih največkrat spremljamo oziroma merimo, so velikost, oblika, površinske lastnosti, gostota in koncentracija nanodelcev (7). V okviru eksperimentalnega dela naloge smo ugotavljali velikost, polidisperzni indeks (PDI) in zeta potencial (ZP) nanodelcev.

Velikost delcev

Velikost sistema je pomemben parameter, saj nam lahko pove, kako se bo koloidni sistem obnašal v *in vitro* in *in vivo* sistemih. Pri sistemih nanometrskih velikosti je tako nadvse pomembno, da pravilno ugotavljamo velikost delcev (9). Aparat Zetasizer Nano meri povprečen premer in PDI z metodo dinamičnega sipanja laserske svetlobe (DLS) ali s fotonsko korelacijsko spektroskopijo (PCS). DLS temelji na razprševanju laserske svetlobe na delcih, dispergiranih v tekoči fazi. Ti niso nikoli stacionarni, temveč se zaradi trkov z okoliškimi molekulami topila naključno gibljejo. Gibanje imenujemo Brownovo gibanje. Zetasizer Nano izračuna velikost delcev na podlagi stopnje nihanja intenzitete sipane svetlobe na delcih. Manjši delci se gibljejo hitreje, večji pa počasneje. Iz tega lahko predpostavimo, da bo hitrost nihanja intenzitete sipane svetlobe pri manjših delcih večja in obratno (11, 13, 15).

Zeta potencial (ZP)

S pomočjo merjenja zeta potenciala lahko ugotavljamo relativno fizikalno stabilnost koloidnih disperzij. Zeta potencial je potencial med delcem in raztopino elektrolita na strižni ploskvi. Ta se ustvari, ker se nabiti delec pod vplivom električnega polja v raztopini elektrolita giblje. ZP lahko merimo eksperimentalno z metodo, ki se imenuje lasersko Dopplerjevo merjenje hitrosti. Ta izkorišča elektroforezni elektrokinetični pojav. Na delce v disperziji apliciramo električno polje, v katerem nabiti delci potujejo proti elektrodi z nasprotnim nabojem. Hitrost gibanja je odvisna od moči električnega polja, dielektrične konstante, viskoznosti medija in ZP. To hitrost imenujemo tudi elektroforezna mobilnost. Na ZP vplivata predvsem ionska moč in pH vrednost medija, saj je od njiju odvisen naboj na delcih. V kislem mediju so delci bolj pozitivno nabiti, v alkalnem pa bolj prevladuje negativni naboj. Vrednosti ZP, ki so večje od +30 mV ali manjše od -30 mV, pomenijo, da se delci med seboj odbijajo in tako ne težijo k agregaciji.

Kadar je vrednost ZP blizu izoelektrične točke, torej blizu 0 mV, se fizikalna stabilnost disperzije zmanjša, saj je verjetnost agregacije večja (7, 13, 15).

1.2.3 Nanodelci kot dostavni sistem

Nanodelci so se v zgodnjih sedemdesetih letih začeli hitro razvijati kot potencialni dostavni sistemi, predvsem zaradi svoje sposobnosti dostave širokega spektra zdravilnih učinkovin, kot so antibiotiki, citostatiki, peptidi, proteini, nukleinske kisline, na različna področja človeškega telesa (7).

Takšni dostavni sistemi imajo veliko prednosti:

- Zaradi majhnega volumna lahko prehajajo skozi majhne kapilare in se izognejo hitremu očistku preko fagocitov, zato se dlje zadržujejo v krvnem obtoku.
- Prehajajo lahko skozi celice in tkivne pregrade, zato lahko omogočijo ciljano dostavo do organov, kot so jetra, vranica, pljuča, hrbtenjača in limfa.
- Zaradi biorazgradljivosti, pH, temperaturne in ionske občutljivosti materiala lahko dosežemo kontrolirano sproščanje ZU.
- Izboljšamo učinkovitost zdravila in zmanjšamo neželene oziroma toksične učinke zdravila (12).

Kljub temu obstaja kar nekaj omejitev pri uporabi nanodelcev kot dostavnih sistemov. Največji problemi so slaba peroralna razpoložljivost, nestabilnost v krvnem obtoku, pomanjkljiva dostava do tkiv in toksičnost. Njihova majhnost in velika površina lahko vodita do združevanja delcev, omejenega vgrajevanja in neenakomernega sproščanja učinkovine (16).

Raziskave trenutno potekajo predvsem na področjih izbire materiala oziroma kombinacij materialov, ki bi omogočali ustrezno hitrost sproščanja ZU; na področju površinskih lastnosti nanodelcev za doseg ciljane terapije; na področju optimizacije priprave nanodelcev za uporabo v kliniki in industrijski proizvodnji; ter na področju raziskovanja *in vivo* dinamičnih procesov za izključitev interakcij med nanodelci in krvnimi žilami oziroma tarčnimi tkivi in organi (12).

1.3 Protismiselni oligonukleotidi

Protismiselni oligonukleotidi so kratki enoverižni deoksinukleotidi, dolgi 13-25 baz, ki so komplementarni zaporedju na tarčnem mestu informacijske RNA (mRNA). Po modelu Watson-Cricka nastane po specifični hibridizaciji mRNA-oligonukleotid dupleks, ki onemogoča translacijo kodiranega proteina, s čimer utišamo izražanje tarčnega gena (17). Da je vezava res specifična, lahko trdimo z veliko verjetnostjo. V humanem genomu je namreč 3×10^9 baznih parov, zato se katerokoli zaporedje, ki je daljše od 17 nukleotidov, v genomu normalno pojavi samo enkrat (18, 19).

Čeprav je sinteza fosfodiesterskih oligonukleotidov relativno nekomplicirana, je njihova uporaba omejena, saj jih intracelularne endo- in eksonukleaze hitro razgradijo s svojo 3'→5' nukleazno aktivnostjo (20). Agrawal in sodelavci so leta 1995 dokazali, da je razpolovni čas 25-merne oligonukleotida v plazmi opice 5 min (17).

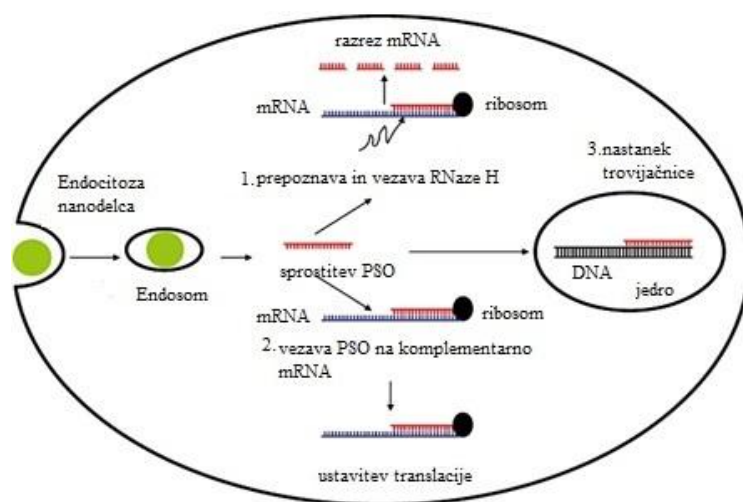
1.3.1 Mehanizem delovanja

Razumevanje mehanizma delovanja protismiselnih oligonukleotidov je ključno za oblikovanje učinkovitega in varnega terapevtskega sistema. Mehanizme delovanja protismiselnih oligonukleotidov lahko razdelimo na RNaza H odvisne in RNaza H neodvisne. RNaza H je endogeni encim ribonukleaza H, ki hidrolizira RNA verigo. Kateri od mehanizmov bo prevladal, je odvisno od kemijske strukture oligonukleotida (18, 20).

RNaza H neodvisne oligonukleotide lahko glede na mehanizem razdelimo v dve skupini. Prvi opisan mehanizem blokiranja sinteze proteinov je bil sterična blokada procesa translacije, pri čemer prisotnost protismiselnih oligonukleotidov preprečuje povezovanje translacijskih faktorjev in modulatorjev ter ovira gibanje ribosomov vzdolž verige mRNA (Baker et al. 1997, Dias et al., 1999) (17). Tarčno mesto je tako lahko mesto izrezovanja intronov, mesto interakcije z izrezovalno-povezovalnim kompleksom v zaporedju pre-mRNA ali translacijsko iniciacijski kodon v zaporedju mRNA. Drugi mehanizem pa temelji na destabilizaciji mRNA po vezavi oligonukleotida. Po hibridizaciji na 3' ali 5' regijo pre-mRNA onemogočijo ključno doseganje stabilnosti mRNA v procesu zorenja. Tako je preprečeno pripenjanje 5'-kapa ali poliadenilacija na 3' mRNA (18).

Najpomembnejši mehanizem poteka preko aktivacije endogenega encima ribonukleaze H, ki po hibridizaciji specifično cepi mRNA molekulo v dupleksu mRNA-oligonukleotid. Ta mehanizem je katalizen. Protismiselni oligonukleotid po cepitvi ostane ohranjen in se sprostí iz RNaze H ter se lahko pritrdi na novo tarčno verigo mRNA. Recikliranje protismiselnega oligonukleotida nam tako zagotavlja daljši učinek in znižanje terapevtske koncentracije na nanomolarno območje. RNaza H odvisni oligonukleotidi lahko zavirajo ekspresijo proteinov na kateremkoli tarčnem mestu mRNA. Encim aktivirajo samo fosfodiestrski in fosforotioatni oligonukleotidi (podpoglavje *Modifikacije kemijske strukture*) (17, 18).

Zgoraj opisani mehanizmi se dogajajo v citoplazmi, vendar protismiselni oligonukleotidi lahko izvajajo dejavnosti tudi v celičnem jedru. Oligonukleotid se lahko vsidra v veliki žleb dvovertižne DNA in z njo tvori trovertičnico. Njen nastanek vodi do cepitve DNA in posledične inhibicije ekspresije tarčnega gena na stopnji transkripcije (17). Opisani mehanizmi so prikazani na sliki 3.



Slika 3: Slika prikazuje intracelularni vstop protismiselnega oligonukleotida (PSO) v dostavnem sistemu in različne mehanizme delovanja protismiselnega oligonukleotida v celici po njegovi sprostitvi v citoplazmo (17).

Terapevtski potencial protismiselnih oligonukleotidov lahko izboljšamo na dva načina. Pri prvem kemijskem načinu gre za različne spremembe v njihovi naravni strukturi, kar izboljša njihovo stabilnost v fiziološkem mediju, obenem pa ohranja afiniteto vezave na tarčo (podpoglavje *Modifikacije kemijske strukture*). Drugi pristop je tehnološki, katerega cilj je tvorba ustreznega dostavnega sistema, ki fizično varuje genski material pred razgradnjo (podpoglavje *Dostavni sistemi za vnos oligonukleotidov v sesalske celice*) (17).

1.3.2 Modifikacije kemijske strukture

Modifikacija fosfatne skupine

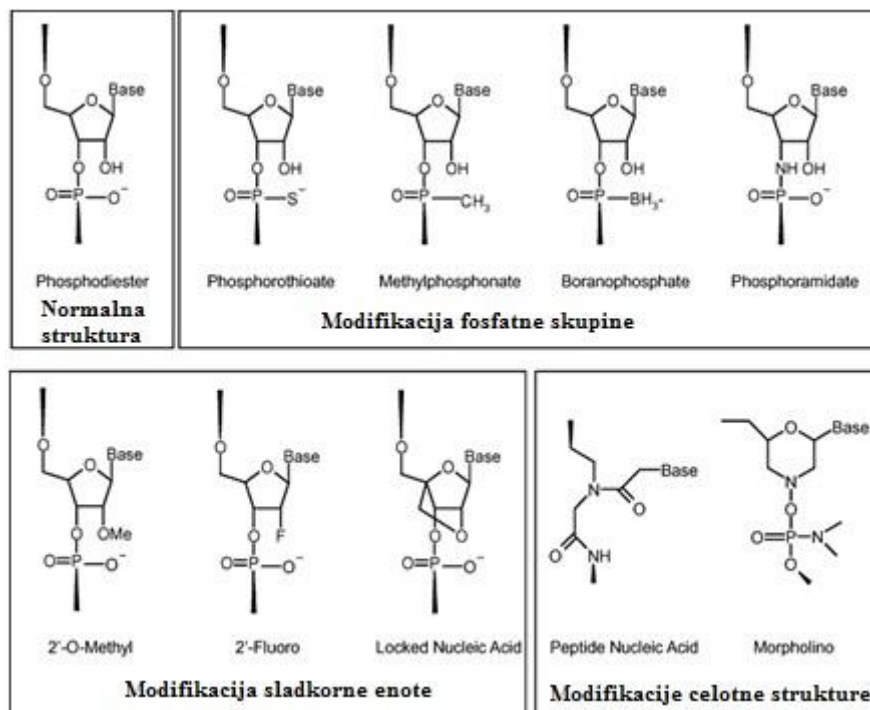
Prva modifikacija je bila sprememba fosfodiesterske vezi. Kisikov atom, ki ni udeležen v diesterski vezi največkrat zamenjamo z žveplom (fosforotioat). S takšno modifikacijo zagotovimo odpornost na nukleaze in ohranimo dovzetnost za RNazo H. Raziskave so pokazale podaljšan plazemski razpolovni čas fosforotioatnih oligonukleotidov na 30-60 minut (17). Izkazujejo tudi dobre rezultate *in vitro* ter *in vivo*, so široko dostopni in relativno poceni. Kljub temu *in vivo* izkazujejo nespecifične neželene učinke, kot so imunska stimulacija, aktivacija komplementa in celična toksičnost. Poleg tega je dupleks med fosforotioatnim oligonukleotidom in mRNA manj stabilen zaradi sterične blokade žveplovega atoma (18). Poleg žvepla lahko za zamenjavo uporabimo tudi metilno skupino (metilfosfonat) ali boran (boranofosfat). Takšne strukture so bolj hidrofobne in kažejo zmanjšano aktivnost RNaze H, kar zmanjša učinkovitost oligonukleotidov. Slabost metilfosfonatov je nenabita struktura, kar zmanjša njihovo topnost v vodi (17).

Modifikacija sladkorne enote

Stabilnost oligonukleotidov so raziskovalci poizkušali izboljšati tudi s substitucijo hidroksilne skupine na 2' mestu riboze z *O*-alkilno skupino. Najpogostejše uporabljeni so 2'-*O*-metilni (2'-OME) in 2'-*O*-metoksietilni oligonukleotidi (2'-MOE). Takšne modifikacije povečajo odpornost na nukleaze in stabilnost kompleksov z nativno RNA, vendar substitucija prepreči cepitev tarčne mRNA z RNazo H. Iz sledečega lahko sklepamo, da je protismiselni efekt posledica steričnega oviranja pri procesu translacije. Sladkorne enote lahko tvorijo tudi zaklenjen oligonukleotid (LNA, *angl. Locked Nucleic Acid*), kjer se tvori metilenski most med 2'-*O* in 4'-*C* na ribozi. Takšne strukture so zelo stabilne v biološkem mediju, sposobne so aktivacije RNaze H in tvorijo hibride s komplementarno RNA (17).

Modifikacija celotne strukture

Pomembnejša predstavnika sta peptidna nukleinska kislina (PNA, *angl. Peptide Nucleic Acid*) in morfolino fosforoamidat (MF, *angl. Morpholino*). Pri PNA je fosfodiesterska vez popolnoma zamenjana s peptidno vezjo, ki vsebuje (2-aminoetil)-glicinske ostanke. Prednosti takšnih struktur so močna hibridizacija, nizka toksičnost in dobra fiziološka stabilnost, med slabosti lahko prištejemo nizko topnost v vodi ter slabo penetracijo v celice. Pri MF je ribeza zamenjana z morfolinskim delom in fosfodiesterska vez s fosforoamidatno vezjo. MF ima nizko toksičnost in izkazuje enako stopnjo afinitete do tarčne molekule kot nespremenjena struktura. Tudi protismiselni oligonukleotidi tretje generacije niso sposobni aktivacije RNaze H, vendar visoka afiniteta omogoča sterično blokado translacije. Gre za nenabite molekule, s čimer se zmanjša verjetnost nespecifičnih interakcij s proteini in posledično pojavnost stranskih učinkov (17, 18). Opisane spremembe kemijske strukture protismiselnih oligonukleotidov so prikazane na sliki 4.



Slika 4: Strukture kemijsko spremenjenih protismiselnih oligonukleotidov (17).

1.4 Dostavni sistemi za vnos oligonukleotidov v sesalske celice

Če želimo regulirati ekspresijo genov s protismiselnimi oligonukleotidi, moramo zagotoviti njihov vstop v tarčno celico in kemijsko integriteto fragmentov nukleinskih kislin. To lahko dosežemo z dostavnimi sistemi, ki morajo biti v prvi vrsti varni, netoksični in neimunogeni. Preden dosežejo svojo tarčo v notranjosti celice, morajo premostiti številne encimske in fizikalne pregrade. Omogočiti morajo zaščito, prenos in vstop genskega materiala do tarčnih celic ter sprostitev na mestu delovanja (1).

Veliko raziskav kaže, da goli oligonukleotidi slabo vstopajo v notranjost celice. Negativno nabita celična membrana namreč preprečuje vstop genskega materiala v celico zaradi elektronegativnosti molekule pri fizioloških pogojih. Prav tako bi se nezaščiteni oligonukleotidi v citoplazmi zaradi prisotnih nukleaz hitro razgradili. Poleg vseh ovir, bi bili oligonukleotidi po potencialno uspešnem vnosu v notranjost celice najverjetneje v endosomih ali lizosomih, kjer ne bi služili svojemu namenu, saj se njihovo mesto delovanja nahaja v citoplazmi oziroma celičnem jedru (20).

Da bi izboljšali vnos oligonukleotidov v celice, njihovo stabilnost in posledično uporabo manjših koncentracij oligonukleotidov, je bilo razvitih veliko različnih vektorjev in metod vnosa. Vektorji so sistemi za vnos genskega materiala v telo. Delimo jih lahko na virusne, nevirusne in hibridne (21).

1.4.1 Virusni vektorji

Za vnos terapevtskih genov, kamor spadajo tudi protismiselni oligonukleotidi, so se prvi razvili virusni vektorji. Izdelujejo jih tako, da gene v virusu, ki kodirajo za virusne proteine, zamenjajo s terapevtskimi. Največ se uporabljajo retrovirusni, adenovirusni, adenoasociacijski in lentivirusni vektorji. Vsi od naštetih virusov imajo svoje prednosti in slabosti, saj se razlikujejo po velikosti, obliki verige DNA ali RNA, kapaciteti dednega materiala ter učinkovitosti okužbe tarčnih celic. Virusni vektorji so bili predmet številnih kliničnih raziskav, vendar so bili izidi večinoma slabi. Sistemi so namreč problematični zaradi varnosti. Kot neželeni učinki so se pojavile različne infekcije, mutageneze, kancerogeneze ter inducirane imunske reakcije. Zaradi tega so virusni vektorji manj primerni za uporabo v terapevtske namene pri človeku in se raziskave večinoma opuščajo. Čedalje bolj se razvijajo in raziskujejo nevirusni vektorji (21).

1.4.2 Nevirusni vektorji

Nevirusne načine vnosa tujega genskega materiala imenujemo transfekcija (22). Poleg večje varnosti v *in vivo* pogojih, so nevirusni vektorji enostavnejši za izdelavo, proizvodnjo lahko prenesemo v večje merilo, izboljšana je tudi uporabnost obsežnejšega dednega materiala. Njihova slabost je manjša učinkovitost pri okužbi celic (21).

Liposomi in lipidni kompleksi – lipopleksi

Prva generacija nevirusnih vektorjev so kationski liposomi. Ti so sestavljeni iz dvosloja kationskih fosfolipidov in holesterola (20). Oligonukleotidi so v liposomih lahko enkapsulirani ali preko elektrostatskih vezi adsorbirani na njihovo površje. Slednje imenujemo lipopleksi. Primera kationskih lipidov sta DOTAP (1,2-dioleoiloksi-3-trimetilamino propan) in DOTMA (*N*-[1-(2,3-dioleil)propil]-*N,N,N*-trimetilamonijev klorid). To so amfifilne molekule z dvema lipofilnima repoma in kationsko glavo (21). Prednosti lipofekcije so manjša omejenost z velikostjo genskega materiala, transfekcija večih različnih celičnih linij in možnost *in vivo* aplikacije v žival ali človeka (22).

Polipleksi

Polipleksi so kompleksi med negativno nabitim genskim materialom in pozitivno nabitim polimerom. Kot pomožne snovi se uporabljajo različni kationski polimeri, tako sintezni kot naravni. Najpogosteje uporabljena naravna polimera sta kolagen in hitosan, med sintezni pa se največkrat omenjajo polilizin, polietilenimin, poliamidoamin in polimetakrilati. Polimeri so lahko linearni, razvejani ali dendrimeri. Oligonukleotide imajo lahko enkapsulirane ali adsorbirane, ali pa so povezani preko elektrostatskih interakcij (21). Polipleksi so primerni za transfekcijo različnih celičnih linij (22).

1.4.3 Hibridni vektorji

Hibridni vektorji so kombinacija nevirusnih in virusnih vektorjev. Nevirusnemu vektorju je dodana določena virusna komponenta, ki posnema lastnosti virusov in na ta način omogoča učinkovitejšo transfekcijo kot sam nevirusni vektor (21).

1.5 Mehanizmi vstopa v sesalsko celico

1.5.1 Goli oligonukleotidi

Natančnega mehanizma vstopa do danes še ne poznamo. Oligonukleotidi vstopajo v celice preko aktivnega transporta, ki je odvisen od temperature, strukture in koncentracije oligonukleotida ter celične linije. Adsorpcijska endocitoza in pinocitoza trenutno veljata za glavna možna mehanizma vnosa. Pri nizki koncentraciji oligonukleotida vstop poteka preko interakcije z membranskim receptorjem, pri višjih koncentracijah pa so ti receptorji zasičeni in prevladuje vstop s pinocitozo (20). Po potencialnem vstopu oligonukleotida skozi celično membrano, je ta podvržen lizosomski razgradnji preko hidroliznih encimov in nizkega pH (17).

1.5.2 Polipleksi

»Pakiranje« oligonukleotidov

Za vstop v celico je zaželeno, da so nosilci večvalentni, saj to zagotavlja boljšo povezanost s polianionsko molekulo in boljšo kompaktnost sistema. Presežek pozitivnega naboja, ki ga prispeva polimer, omogoča vezavo polipleksa na negativno nabito celično membrano (22). Sistemi morajo biti nanometrskih velikosti. Raziskave kažejo, da morajo biti za uspešen vnos nanodelcev v celice ti manjši od 200 nm (17).

Če kot nosilec uporabljamo hitosan, moramo za uspešno transfekcijo zagotoviti ustrezno molekulsko maso, stopnjo deacetilacije in pH polimera. Transfekcija je učinkovitejša pri višjih molekulskih masah in zmerni stopnji deacetilacije hitosana, optimalen pH je med 6,8 in 7 (16).

Vstop skozi celično membrano

Dostavni sistemi nanometrskih velikosti lahko vstopajo v celice po fagocitoznih ali nefagocitoznih poteh. Vstop v celico mora biti reguliran, da skupaj s terapevtskim polipleksom ne vstopajo v celico tudi drugi neželeni delci. Polipleksi nanometrskih velikosti najverjetneje vstopajo v celice z endocitozo, ki lahko poteka po štirih kontroliranih mehanizmih - ti mehanizmi so makropinocitoza, s klaritini posredovana endocitoza, s kaveolini posredovana endocitoza ter od klaritinov in kaveolinov neodvisna endocitoza.

Dejavniki, ki določajo vrsto mehanizma endocitoze, niso popolnoma razjasnjeni, vendar lahko z lastnostmi nanodelcev, kot so velikost, oblika in površinske lastnosti, vsaj delno opredelimo način njihovega prihoda v celice (21, 23).

Endosomski in lizosomski pobeg

Polipleksi, ki vstopajo v celice z endocitozo, so v notranjosti celice ujeti v endosomski mehurček in tako podvrženi endo/lizosomski poti. Pobeg polipleksa iz vezikla je bistvenega pomena, saj bi bil drugače podvržen encimski razgradnji znotraj lizosoma. Polimerni nosilec ima zaradi polikationskega značaja veliko pufrno kapaciteto. V nastalem endo/lizosomu veže veliko protonov in onemogoči padeč pH. To prepreči razgradnjo polipleksa v lizosomu in zagotavlja razpad endo/lizosoma. Protonom namreč sledijo kloridni ioni, ki povečajo osmolarnost v veziklu in povzročijo vdor vode v endo/lizosom, zato ta nabrekne in počí. Po razpadu se polipleks sprosti v citoplazmo, kjer se tudi sam razgradi (1, 23).

Razgradnja polipleksa

Za učinkovito delovanje terapevtskega oligonukleotida je potrebna njegova disociacija od kompleksa s polimerom. Zaradi tega je smiselna uporaba polimerov, ki so biorazgradljivi in se v organizmu kemijsko razgradijo s hidrolizo in/ali encimolizo. Polikationski polimeri so lahko za celice tudi toksični, kar je povezano z njihovo razgradnjo. Toksičnost narašča z molekulsko maso, razvejanostjo in nabojem polimera. Citotoksičnost lahko zmanjšamo tako, da na nabito površino vežemo nenabite polimere, ki zakrijejo kationski značaj in nudijo sterično zaščito. V ta namen se največ uporablja polietilenglikol (1).

Hitosan se razgradi z encimi, kot sta lizocim in hitosanaza. Njegova razgradnja je odvisna od temperature, ionske moči in pH medija *in vitro* (24).

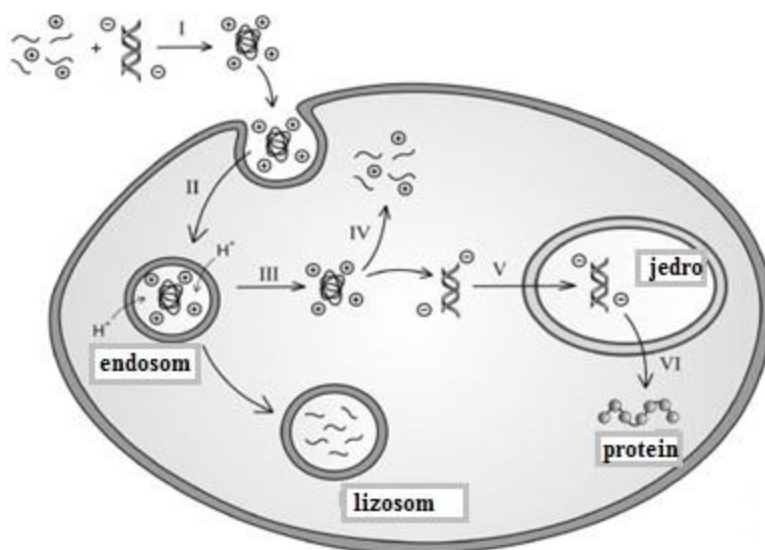
Vstop v jedro

Jedro lahko dosežejo le majhne molekule, saj ga ščiti dvojna membrana s porami velikimi do 9 nm (1). Oligonukleotidi dosežejo jedro s pasivno difuzijo (24), večje molekule pa lahko vstopajo le z aktivnim transportom, s pomočjo kompleksa, ki je ob njegovih porah. Kompleks odpira pore le preko vezave z določeno signalno molekulo, ki mora biti vezana na nevirusni vektor (1).

Ekspresija genov

Z uspešno dostavo protismiselnih oligonukleotidov v celično jedro lahko znižamo izražanje specifičnih genov s preprečevanjem translacije pripadajoče mRNA (18). Uspešnost je odvisna od lastnosti oziroma kemijske zgradbe oligonukleotida (24). Znižanje ekspresije genov lahko uporabljamo kot terapevtsko orodje za zdravljenje različnih bolezni, kjer igra ključno vlogo v patofiziologiji prevelika produkcija identificiranega proteina, ali za raziskovanje funkcije specifičnih genov in ugotavljanje njihove vloge v patologiji bolezni (18, 20). Leta 1998 je Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) kot zdravilo odobrila prvi protismiselni oligonukleotid – fomivirsen (Vitravene[®]). Uporablja se kot antivirusno zdravilo, za zdravljenje citomegalovirusnega retinitisa pri pacientih z AIDS-om (20, 25). Protismiselni oligonukleotidi so danes predmet številnih kliničnih študij za zdravljenje kardiovaskularnih bolezni, rakavih obolenj, virusnih infekcij in vnetnih bolezni (18).

Poti od vstopa polipleksa v sesalsko celico preko njegove razgradnje do vnosa genskega materiala v jedro so prikazane na sliki 5.



Slika 5: Bariere genskega vnosa v celico - pri načrtovanju genskega dostavnega sistema moramo upoštevati: »pakiranje« genskega materiala (I), omogočanje vstopa v celico (II), izogibanje endo/lizo-somski poti (III), doseganje sprostitve DNA/vektor (IV), vnos genskega materiala skozi citoplazmo v jedro in spremembo ekspresije proteina (V) (23).

2 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je:

- Izdelava hitosanskih nanodelcev in njihovo vrednotenje,
- vgrajevanje oligonukleotidov v hitosanske nanodelce in ugotavljanje učinkovitosti vgrajevanja,
- vnos nanodelcev z vgrajenimi oligonukleotidi v sesalske kožne celice.

V prvem delu magistrske naloge bomo z metodo ionskega geliranja izdelali hitosanske nanodelce. Pripravili bomo nanodelce z različnim masnim razmerjem hitosan/TPP in jih vrednotili s pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS. Merili bomo njihovo velikost, zeta potencial in polidisperzni indeks ter na podlagi parametrov ugotovili optimalno masno razmerje hitosan/TPP.

V drugem delu bomo v hitosanske nanodelce z optimalnim masnim razmerjem hitosan/TPP vgradili protismiselni oligonukleotid in ugotavljali vpliv vgrajenega oligonukleotida na parametre nanodelcev. Učinkovitost vgrajevanja oligonukleotidov v nanodelce bomo ugotovili spektrofotometrično tako, da bomo pri 260 nm merili absorbanco necentrifugiranega in centrifugiranega vzorca disperzij nanodelcev z vgrajenimi oligonukleotidi in njuni razliki odšteli absorbanco vzorca disperzije »praznih« nanodelcev.

V tretjem delu bomo omenjeni dostavni sistem preizkusili za vnos protismiselnih oligonukleotidov v trajno celično linijo keratinocitov in uspešnost vstopa v celice ocenili s pomočjo uporabe fluorescenčno označenih oligonukleotidov in fluorescenčne mikroskopije.

Nazadnje bomo preko izolacije mRNA iz celic in reverzne transkripcije v stabilno cDNA, s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) relativno kvantificirali izražanje genov. Kot vzorce bomo uporabljali kontrolne celice, imunsko aktivirane celice, celice z dodanimi nanodelci z vgrajenim protismiselnim oligonukleotidom in fluorescenčno označenim protismiselnim oligonukleotidom.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti

Reagent	Proizvajalec
celična kultura HaCaT keratinocitov	ICGEB, Italija
dinatrijev hidrogenfosfat	Merck, Nemčija
EDTA	Promega, ZDA
etanol 96%	Kefo, Slovenija
FBS	Gibco - Invitrogen, Nemčija
HCl	Merck, Nemčija
hitosanijev klorid (MM 30 - 400 kDa, stopnja deacetilacije 88,8 %)	Kraeber & Co GmbH, Nemčija
KCl	Merck, Nemčija
kalijev dihidrogenfosfat	Merck, Nemčija
medij DMEM	Gibco - Invitrogen, Nemčija
β -merkaptoetanol	Sigma – Aldrich, ZDA
NaCl	Merck, Nemčija
0,02 % vodotopni nigrozin	Sigma – Aldrich, ZDA
penicilin/streptomicin	Euroclone, VB
pentanatrijev tripolifosfat (90-95 %)	Sigma – Aldrich, ZDA
prečiščena voda brez nukleaz	Ambion – Invitrogen, Nemčija
protismiselni oligonukleotid IL-23, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (5-CATTACAGCTCTGCTCCCCAGCATC-3)	IDT, ZDA
SYBR Green qPCR Master Mix	Fermentas Life Sciences, ZDA
tripsin (10 \times redčen)	Sigma – Aldrich, ZDA

3.1.2 Oprema

Oprema	Proizvajalec
analizna tehtnica	Mettler – Toledo, ZDA
aparati ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems, ZDA
aparati Thermomixer comfort	Eppendorf, Nemčija
aparati Zetasizer Nano ZS	Malvern, VB
aseptična komora z laminarnim pretokom zraka	Iskra PIO, Slovenija
avtoklav	Systec, Nemčija
avtoklav	Kambič, Slovenija
centrifuge 5415R, 5804R	Eppendorf, Nemčija
dializno črevo	Serva, Nemčija
fluorescenčni mikroskop EVOS Flouid Cell Imaging Station	Invitrogen, Nemčija
fluorescenčni mikroskop IX81	Olympus, Japonska
hemocitimeter	Neubauer, Nemčija
hladilnik (0-4°C)	Gorenje, Slovenija
inkubatorji	Equip
magnetno mešalo	Tehtnica, Slovenija
mikrotitrna plošča z 96 vdolbinicami	Applied Biosystems, ZDA
namizna centrifuga	Dainah Labtech, Indija
optično lepljiva prevleka za mikrotitrsko ploščo	Applied Biosystems, ZDA
parafilm M Neenah WI54956,	Bemis, ZDA
pipetni nastavki	Sarstedt, Nemčija
plastenke za gojenje celic T75	TPP, Švica
plošča z 6 vdolbinicami	Sigma- Aldrich, ZDA
polavtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
rokavice	Shield scientific, Nizozemska
spektrofotometer NanoDrop 1000	Thermo scientific, ZDA

stresalnik Vibromix 104EV	Binder, Nemčija
ultrazvočna kadička	Iskra PIO, Slovenija
zamrzovalnik (-20 °C)	Gorenje, Slovenija
zamrzovalnik (-86°C)	Sanyo, Japonska

3.1.3 Kiti

- Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija)
- OmniScript Reverse Transcriptase (Qiagen, Hilden, Nemčija)

3.1.4 Medij za gojenje

100 ml medija za gojenje vsebuje:

- 89 ml Dulbecco's Modified eagle Medium (DMEM)
- 10 ml fetusnega seruma goveda (FBS)
- 1 ml vodne raztopine antibiotika (penicilin/streptomycin)
 - 10.000 i.e. penicilina
 - 10.000 µg/ml streptomicina

3.1.5 Pufri

- **Fosfatni pufer (PBS) s pH 7,4**

1l fosfatnega pufra vsebuje:

- 80 g NaCl
- 36,3 g Na₂HPO₄*12H₂O
- 2,4 g KH₂PO₄
- 2 g KCl
- HCl do pH 7,4
- bidestilirana voda do 1 l

3.2 Metode

3.2.1 Izdelava in vrednotenje hitosanskih nanodelcev

- **Priprava raztopine hitosana**

Pripravili smo osnovno raztopino hitosana s koncentracijo 0,6 mg/ml. Zatehtali smo 30 mg hitosanijevega klorida in ga kvantitativno prenesli v 50 ml bučko ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Raztopino smo mešali na magnetnem mešalu in počakali, da se je ves hitosan raztopil. Kadar so bili opazni drobni delci neraztopljenega hitosana, smo bučko postavili v ultrazvočno kadičko in sonicirali, dokler nismo dobili bistre raztopine.

- **Priprava raztopine TPP**

Pripravili smo raztopino TPP s koncentracijo 1 mg/ml, tako da smo na analizni tehtnici zatehtali 10 mg TPP in ga kvantitativno prenesli v 50 ml čašo ter dodali 10 ml prečiščene vode. Raztopino smo mešali na magnetnem mešalu, dokler se ni ves TPP raztopil.

- **Izdelava nanodelcev iz hitosana in TPP**

Nanodelce smo pripravili s pomočjo metode ionskega geliranja, ki temelji na ionskih interakcijah med nasprotno nabitim polielektrolitom in polianionom. Pripravili smo tri različne disperzije nanodelcev z različnimi masnimi razmerji hitosan/TPP. Razmerja so bila 4:1, 5:1 in 6:1 v prid hitosanu. Nanodelce smo izdelali tako, da smo določenemu volumnu raztopine hitosana (0,6 mg/ml), ki smo jo mešali na magnetnem mešalu s hitrostjo 900 vrtljajev na minuto, z avtomatsko pipeto počasi dodajali izračunan volumen raztopine TPP (1 mg/ml). Odmerjeni volumni raztopin obeh sestavin so podani v tabeli 1.

Tabela 1: Volumni raztopin hitosana in TPP pri različnih masnih razmerjih.

Masna razmerja hitosan/TPP	Volumen raztopine hitosana (0,6 mg/ml) [ml]	Volumen raztopine TPP (1 mg/ml) [ml]
4:1	6,667	1
5:1	6,667	0,8
6:1	6,667	0,67

Čaše smo prekrili s parafilmom, da smo zaščitili raztopine pred kontaminacijo iz okolja. Vzorce smo nato mešali na magnetnem mešalu pri isti hitrosti eno uro.

- **Vrednotenje hitosanskih nanodelcev**

Disperzije nanodelcev smo vrednotili z merjenjem povprečne velikosti nanodelcev, zeta potenciala in polidisperznega indeksa s pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS. Pred vsako meritvijo smo vzorce vizualno pregledali, da smo se prepričali, da ne vsebujejo vidnih delcev oziroma, da ni prišlo do obarjanja.

Velikost delcev in PDI smo merili z metodo fotonske korelacijske spektroskopije (Zetasizer Nano ZS).

Pogoji merjenja:

- temperatura: 25°C
- viskoznost disperznega medija (voda): $\eta = 0,8872$ mPas
- lomni količnik disperznega medija (voda): $RI = 1,330$
- valovna dolžina laserske svetlobe (He-Ne laser): $\lambda = 633$ nm
- kot merjenja: 173°
- kiveta: DTS0012

Zeta potencial pa smo merili z metodo laserske Dopplerjeve elektroforeze (Zetasizer Nano ZS).

Pogoji merjenja:

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

3.2.2 Vgrajevanje oligonukleotidov v nanodelce

Pripravili smo delovni raztopini hitosana in TPP. Raztopini TPP s koncentracijo 1 mg/ml smo dodali 50 μ l fluorescentno označenega protismiselnega oligonukleotida IL-23 s koncentracijo 1 μ g/ μ l. Nanodelce smo pripravili po enakem postopku kot je opisano v podpoglavju *Izdelava nanodelcev iz hitosana*. Edina razlika v postopku je bila ta, da smo kot medij uporabili vodo, ki ni vsebovala nukleaz.

- **Vrednotenje hitosanskih nanodelcev z vgrajenimi oligonukleotidi**

Nanodelce z vgrajenimi oligonukleotidi smo vrednotili s pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS. Merili smo velikost nanodelcev, zeta potencial ter polidisperzni indeks. Postopek in pogoji merjenja so bili enaki kot v podpoglavju *Vrednotenje hitosanskih nanodelcev*.

3.2.3 Vgrajevanje fluoresceina v nanodelce

Pripravili smo delovni raztopini hitosana in TPP. Raztopini TPP smo dodali 500 μ l raztopine fluoresceina (0,5 mg/ml) in mešali na magnetnem mešalu dokler se fluorescin ni raztopil, oziroma dokler nismo dobili čiste rumene raztopine. Raztopino TPP in fluoresceina smo nato počasi z avtomatsko pipeto dodajali raztopini hitosana in tako izdelali nanodelce, ki so služili kot pozitivna kontrola transfekcije kožnih celic. Postopek izdelave in vrednotenje nanodelcev s fluorescinom je potekalo pod istimi pogoji, kot je opisano v podpoglavjih *Izdelava nanodelcev iz hitosana* in *TPP in Vrednotenje hitosanskih nanodelcev*. Nanodelce z vgrajenim fluoresceinom smo čez noč dializirali proti 2l fosfatnega pufru pri temperaturi 4°C, ob konstantnem mešanju na magnetnem mešalu.

3.2.4 Ugotavljanje učinkovitosti vgrajevanja oligonukleotidov

Učinkovitost vgrajevanja oligonukleotidov v nanodelce smo ugotovili s pomočjo merjenja absorbance pri 260 nm (A_{260}) na NanoDrop spektrofotometru, saj imajo nukleinske kisline svoj absorpcijski maksimum pri tej valovni dolžini. Merili smo absorbance treh vzorcev. Prvi vzorec so predstavljali kontrolni hitosanski nanodelci, brez vgrajenega oligonukleotida. Drugi vzorec so bili nanodelci z vgrajenim protismiselnim oligonukleotidom. Tretji vzorec smo pripravili tako, da smo drugi vzorec centrifugirali 10 minut pri 10.000 g in ugotovili absorbanco v supernatantu.

3.2.5 Gojenje keratinocitne celične linije HaCaT

Delo s celicami je potekalo v aseptičnem okolju celičnega laboratorija. Poleg osnovnih varnostnih ukrepov, kot so nošenje zaščitne halje, očal in rokavic, smo se držali še drugih navodil dela v celičnem laboratoriju. Rokavice, ves material in opremo, ki smo jo vnašali v aseptično komoro z laminarnim pretokom zraka, smo še dodatno prebrisali s 70 % etanolom.

Sekundarno keratinocitno celično linijo HaCaT smo gojili v 75 cm² TPP platenkah za gojenje celic. Kot medij za gojenje smo uporabljali 89 % DMEM (*Dulbecco's Modified Medium*), obogaten z 10 % fetalnim govejim serumom (FBS angl. *fetal bovine serum*) in 1 % raztopino antibiotika (penicilin/streptomycin).

Celično kulturo smo gojili pritrjeno v monosloju v inkubatorju pri pogojih:

- Temperatura: 37 °C
- Vsebnost CO₂: 5 %
- 95 % vlažnost

Dvakrat na teden smo celicam zamenjali medij in jih spirali z 2 ml izotoničnega fosfatnega pufra (PBS angl. *phosphate buffered saline*). Ko smo dosegli 70-90 % konfluentnost (t.j. stopnja razraščeniosti), smo celice presejali v razmerju 1:10. Iz platenke smo najprej odstranili medij in površino spirali z 2 ml PBS pufra. Nato smo celicam dodali 2 ml 0,02 % EDTA/PBS in 20 µl 0,025 % tripsina ter inkubirali pri istih pogojih 20 minut. Če je bilo treba, smo platenko rahlo pretresli. S tem korakom smo adherirane celice odlepili od podlage. Ko smo to dosegli, smo dodali 2 ml svežega medija za rast in tako nevtralizirali delovanje tripsina. Celično suspenzijo smo prenesli v 5 ml centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 2000 g. Po centrifugiranju smo s pipeto odstranili supernatant in celice resuspendirali v 1 ml svežega medija za gojenje, ki smo ga predhodno inkubirali na 37 °C. Na tej stopnji smo vzeli 50 µl suspenzije celic in ji dodali 50 µl barvila nigrozina ter premešali. Ustrezno količino smo nanесли na hemocitometer, t.j. posebno objektno steklo za štetje celic pod svetlobnim mikroskopom. Celice smo prešteli na presečišču črt in rezultat preračunali na celoten volumen suspenzije. Pod svetlobnim mikroskopom smo spremljali tudi morfologijo celic. V novo gojilno platenko smo nasadili 1×10^5 celic, dodali 2 ml medija za gojenje, pomešali in inkubirali.

- **Imunska aktivacija**

HaCaT keratinocitno linijo smo pred transfekcijo s protismiselnimi oligonukleotidi imunsko aktivirali z dodatkom mediatorja vnetja TNF- α . Aktivacijo smo izvajali v plošči s 6 vdolbinicami, v katere smo nasadili po 5×10^4 celic v 2 ml medija, kateremu smo dodali raztopino TNF- α , koncentracije 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Celice smo inkubirali 24 ur do 50 % konfluentnosti pri temperaturi 37°C.

3.2.6 Vnos nanodelcev z vgrajenimi oligonukleotidi v kožne celice

Transfekcijo HaCaT celic z genskim materialom, natančneje IL-23 protismiselnimi oligonukleotidi, s pomočjo nanodelcev smo izvajali v plošči s 6 vdolbinicami. Imunsko aktiviranim celicam smo dodali 250 μl disperzije nanodelcev, ki smo jo predhodno inkubirali na sobni temperaturi 15 minut. Celice smo nato inkubirali 2 uri pri 37°C. Po končani transfekciji smo celice dvakrat sprali s PBS pufrom, dodali svež medij s serumom in gojili 2-48 ur.

3.2.7 Fluorescenčna mikroskopija

S fluorescenčno mikroskopijo smo preverili uspešnost transfekcije. Za potrebe fluorescenčnega mikroskopiranja smo izvedli transfekcijo po zgoraj opisanem postopku. Celice smo po dvakratnem spiranju z 2 ml PBS pufra opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom. Osvetlili smo jih s svetlobo valovne dolžine 488 nm. Če so nanodelci z vgrajenimi fluorescenčno označenimi oligonukleotidi prišli v celice, smo to lahko videli kot zeleno obarvane celice na temnem ozadju.

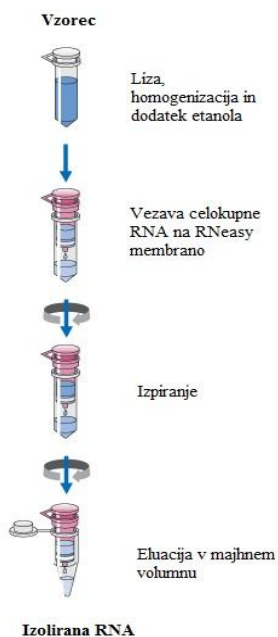
Kot negativno kontrolo smo uporabili kontrolne hitosanske nanodelce, brez vgrajenega oligonukleotida, kot pozitivno kontrolo pa nanodelce z vgrajenim fluoresceinom.

3.2.8 Izolacija mRNA

Izolacijo mRNA smo izvedli po protokolu zapisanem v priročniku »Rneasy Mini Handbook« za čiščenje celokupne RNA iz živalskih celic, ki ga predlaga Qiagen (slika 6). Pred začetkom izolacije smo pufri RTL dodali 10 μl β -merkaptetoetanol na 1 ml pufra, saj ta ireverzibilno denaturira ribonukleaze, ki se sproščajo pri lizi celic. Puffer RPE smo pred uporabo razredčili s štirikratnim volumnom 96 % raztopine etanola.

- **Merjenje količine RNA**

Absorbanco smo merili pri 260 nm na NanoDrop spektrofotometru. Čistost izolirane RNA smo ocenili iz razmerja absorbanc pri 260 in 280 nm (A_{260}/A_{280}).



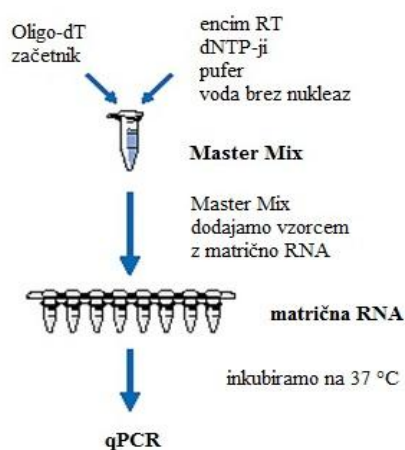
Slika 6: Postopek izolacije RNA po priročniku »Rneasy Mini Handbook« (26).

3.2.9 Reverzna transkripcija

Pred postopkom reverzne transkripcije smo izoliran vzorec RNA 5 minut segrevali na 65 °C. Nato smo reakcijo izvedli po protokolu »Omniscrypt Reverse Transcription Handbook« (slika 7). Reakcijsko mešanico smo pripravili tako, da smo zmešali predpisane volumne raztopin pufra RT (Buffer RT), deoksinukleotidov, olido-dT začetnikov in encima reverzne transkriptaze. Količino dodanega vzorca RNA smo izračunali glede na koncentracije RNA, ki smo jih izmerili na NanoDrop spektrofotometru. Upoštevali smo, da je količina vzorca RNA v 20 µl reakcijske zmesi lahko največ 2 µg. Z vodo brez RNaz smo dopolnili do končnega volumna 20 µl. Reakcijsko zmes smo rahlo premešali in jo inkubirali 60 minut pri 37°C. Sestava reakcijske mešanice je predstavljena v tabeli 2.

Tabela 2: Sestava reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo (27).

Sestavine	Volumen	Končna koncentracija
Master Mix		
Pufer RT	2 μ l	1x
Mešanica dNTP-jev (5 mM posameznega dNTP)	2 μ l	0,5 mM posameznega dNTP
Oligo-dT začetnik	2 μ l	1 μ M
Reverzna transkriptaza (Omniscript)	1 μ l	4 U v 20 μ l
Voda brez RNaz	Izračunano	
Vzorec RNA	Izračunano	Do 2 μ g v 20 μ l reakcije
Skupni volumen	20 μ l	



Slika 7: Postopek reverzne transkripcije po protokolu »Omniscript Reverse Transcription Handbook« (27).

3.2.10 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času - qPCR

Predhodno smo pripravili raztopino matične cDNA koncentracije 2 ng/ μ l. Za izvedbo reakcije smo uporabljali mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami. V vsako vdolbinico smo odpipetirali 15 μ l Master Mix reakcijske zmesi in 5 μ l raztopine matične cDNA ali 5 μ l vode. Za vsak vzorec smo naredili 2-3 paralele in negativno kontrolo z vodo. Master Mixa za hišni in tarčni gen se količinsko razlikujeta. Sestavi obeh sta podani v tabelah 3 in 4.

Tabela 3: Sestava Master Mixa za PCR hišni gen.

Komponenta	Volumen (μ l)
SYBR Green	10
5' začetni oligonukleotid (10nM)	0,4
3' začetni oligonukleotid (10nM)	0,4
voda brez RNaz	4,2
Skupni volumen	15

Tabela 4: Sestava Master Mixa za PCR tarčnih genov.

Komponenta	Volumen (μ l)
SYBR Green	10
5' začetni oligonukleotid (20nM)	0,2
3' začetni oligonukleotid (20nM)	0,2
voda brez RNaz	4,6
Skupni volumen	15

Po pipetiranju smo mikrotitrsko ploščico pokrili z zaščitno optično lepljivo folijo in ploščo za 5 minut vstavili v centrifugo na 1900 obratov/minuto. Po centrifugiranju, s katerim smo se znebili morebitnih mehurčkov, smo ploščo prekrili z gumijasto folijo in jo vstavili v aparat ABI Prism 7000 SDS. Nastavili smo program s cikli, podanimi v tabeli 5. Glede na nastavljen program aparat v določenih časovnih intervalih avtomatsko spreminja temperaturo.

Tabela 5: Program za izvedbo qPCR.

Potek reakcije	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Časovni interval
Začetni program	50	2 min
	95	10 min
Denaturacija	95	15 s (40X)
Prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje	60	1 min

3.2.11 Analiza izražanja genov

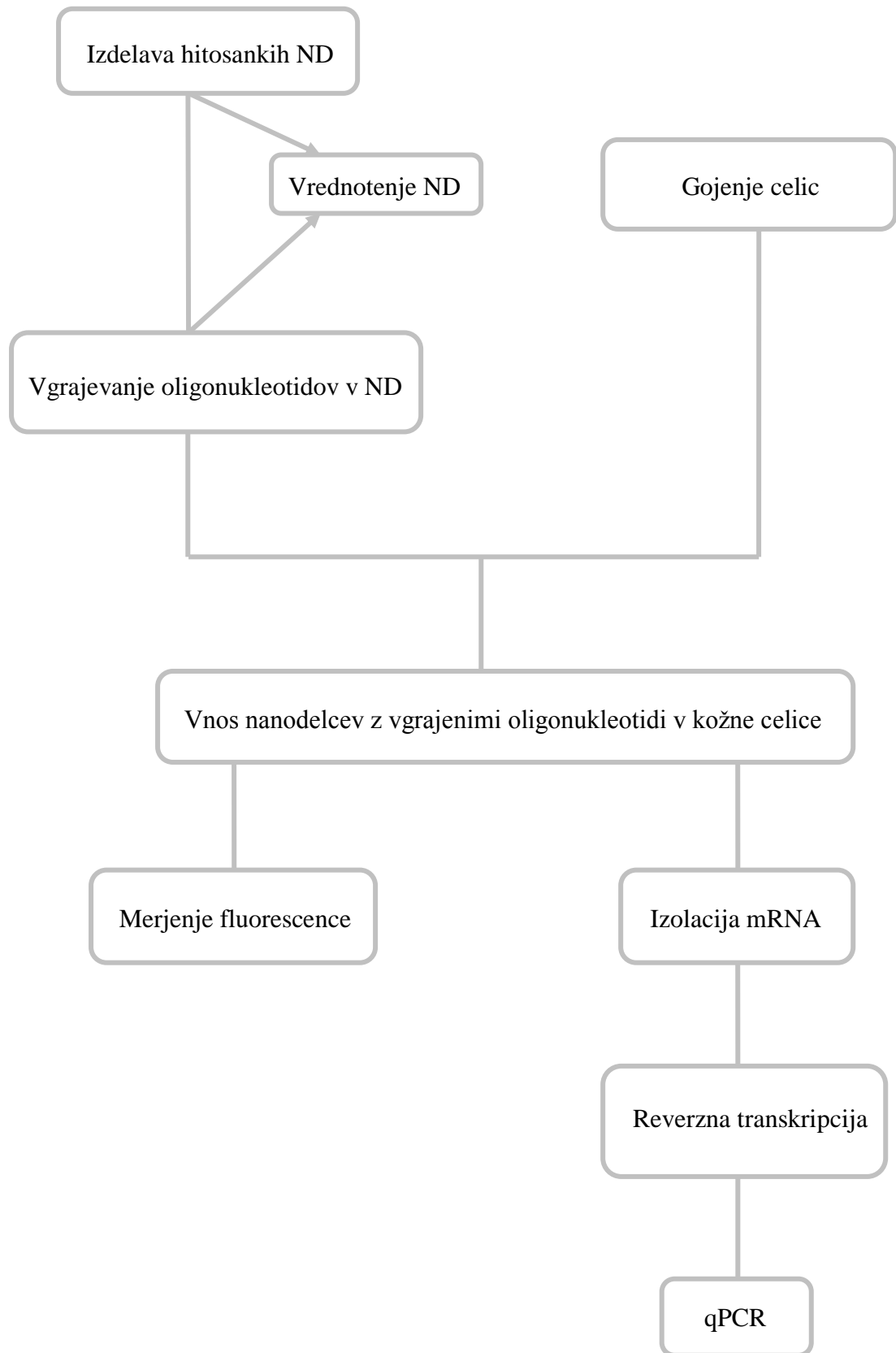
Za izračun relativnega izražanja genov smo uporabljali Livakovo metodo (t.i. metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Najprej smo izračunali razliko Ct-jev tarčnega gena in Ct-jev hišnega gena za testirane in kontrolne celice. V drugem koraku smo izračunali razliko razlik in v tretjem koraku dobljeno vrednost potencirali na 2. Glede na dobljen rezultat smo lahko interpretirali, kolikokrat se je zvišalo ali znižalo izražanje izbranega gena, relativno na kalibrator.

Postopek:

- $\Delta Ct_{(test)} = Ct_{(tarčni\ gen,\ test)} - Ct_{(hišni\ gen,\ test)}$
 $\Delta Ct_{(kalibrator)} = Ct_{(tarčni\ gen,\ kalibrator)} - Ct_{(hišni\ gen,\ kalibrator)}$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(test)} - \Delta Ct_{(kalibrator)}$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{standardizirana razlika v izražanju genov (28)}$.

Rezultate smo standardizirali na izbran hišni gen, s čimer smo dosegli izničitve vpliva različnega števila analiziranih celic. Vrednotili smo izražanje dveh hišnih genov, YWAZ in GAPDH. Oba se pogosto uporabljata pri celični liniji keratinocitov HaCaT. Izbira referenčnega hišnega gena je zelo pomembna, saj le tako dobimo zanesljive in primerljive rezultate. V našem primeru smo za standardizacijo izbrali hišni gen GAPDH, ki kodira gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo.

HEMA EKSPERIMENTALNEGA DELA



4 REZULTATI

4.1 Vrednotenje hitosanskih nanodelcev

Masne koncentracije:

- TPP: 1 mg/ml
- Hitosan: 0,6 mg/ml

Tabela 6: Vpliv masnega razmerja hitosan/TPP na povprečni premer (d), zeta potencial (ZP) in polidisperzni indeks (PDI) nanodelcev.

Masna razmerja hitosan/TPP	d (nm)	ZP (mV)	PDI
4:1	128,6	35,9 ± 6,2	0,14
5:1	135,2	37,3 ± 4,68	0,23
6:1	136,8	44,1 ± 6,51	0,13

4.2 Vrednotenje hitosanskih nanodelcev z vgrajenimi oligonukleotidi

Protismiselni oligonukleotid: IL-23 v koncentraciji 1 µg/µl

Količina dodanega protismiselnega oligonukleotida: 50 µl

Tabela 7: Povprečni premer (d), zeta potencial (ZP) in polidisperzni indeks (PDI) kontrolnih nanodelcev in nanodelcev z vgrajenimi oligonukleotidi (masno razmerje hitosan/TPP = 6:1)

	d (nm)	ZP (mV)	PDI
Prazni nanodelci	136,8	44,6 ± 6,3	0,2
Nanodelci z oligonukleotidom	168,25	38,2 ± 4,8	0,14

4.3 Ugotavljanje učinkovitosti vgrajevanja oligonukleotidov v nanodelce

Tabela 8: Masne koncentracije merjenega genskega materiala pri necentrifugiranih, centrifugiranih in kontrolnih (»praznih«) nanodelcih.

	Necentrifugirani nanodelci	Centrifugirani nanodelci	Kontrolni nanodelci
	62,2 ng/μl	21 ng/μl	12,8 ng/μl
	62 ng/μl	20,1 ng/μl	13,2 ng/μl
	62,7 ng/μl	21,2 ng/μl	12,7 ng/μl
Povprečna vrednost meritev	62,3 ng/μl	20,8 ng/μl	12,9 ng/μl

- **Koncentracija vgrajenega oligonukleotida v disperziji nanodelcev:**

$$C_{(\text{oligonukleotidov})} = C_{(\text{necentrifugirani nanodelci})} - C_{(\text{centrifugirani nanodelci})} - C_{(\text{prazni nanodelci})} =$$

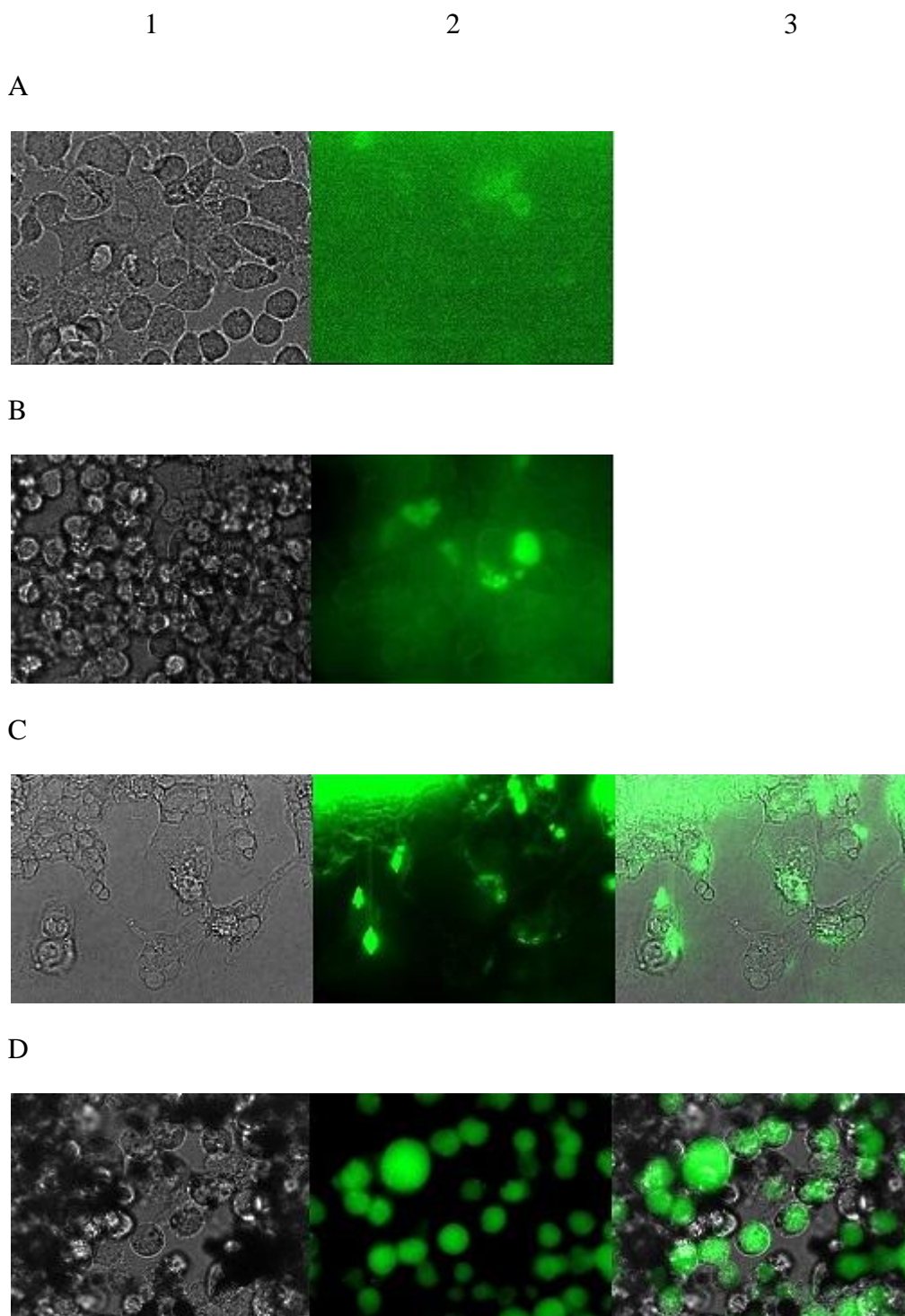
$$= (62,3 - 20,8 - 12,9) \text{ ng}/\mu\text{l} = \underline{28,9 \text{ ng}/\mu\text{l}}$$

- **Učinkovitost vgrajevanja oligonukleotidov v nanodelce:**

Uč. vgrajevanja (%) = masna koncentracija vgrajenega oligonukleotida/masna koncentracija apliciranih oligonukleotidov

$$\text{Uč. vgrajevanja (\%)} = 28,9 \text{ ng}/\mu\text{l} / (62,3 - 12,9) \text{ ng}/\mu\text{l} * 100 = \underline{58,5 \%}$$

4.4 Fluorescenčna mikroskopija



Slika 8: HaCaT celice pod fluorescenčnim mikroskopom po transfekciji s fluorescentno označenim protismiselnim oligonukleotidom proti IL-23; A) kontrolne celice: prazni ND, B) ND z vgrajenim fluorescentno označenim protismiselnim oligonukleotidom, C) ND z vgrajenim fluorescentno označenim protismiselnim oligonukleotidom, manjša gostota celic, D) pozitivna kontrola: ND z vgrajenim fluoresceinom. Stolpec 1 predstavlja celice osvetljene z belo svetlobo, stolpec 2 pa z vzbujevalno svetlobo valovne dolžine 488 nm (FITC filter). Stolpec 3 v vrstici C in D prikazuje združitev slik stolpca 1 in 2.

4.5 Izolacija mRNA

- **Rezultati na Nanodrop spektrofotometru:**

Tabela 9: Koncentracije (ng/ μ l) izolirane mRNA iz HaCaT celic, izmerjene na Nanodrop spektrofotometru, pri različnih vzorcih. K – kontrolne celice, TNF- α – imunsko aktivirane celice s TNF- α , ND/IL-23 – celice tretirane z nanodelci s protismiselnim oligonukleotidom IL-23, ND/IL-23/F – celice tretirane z nanodelci s fluoroforjem označenim protismiselnim oligonukleotidom IL-23.

Poskus	K	TNF- α	ND/ IL-23	ND / IL-23/F
1	400,9	318,1	81,6	6,8
2	397,5	260,2	99,7	7,5
3		287,9		
Povprečje	399,2	288,7	90,65	7,15

4.6 Reverzna transkripcija

Za izračun volumnov raztopine RNA, smo uporabili enačbo:

$$V = \frac{m}{C}$$

V = volumen raztopine RNA, ki ga potrebujemo za reakcijo (μ l)

m = največja dovoljena masa za reverzno transkripcijo (ng)

C = povprečje koncentracij izolirane mRNA (ng/ μ l)

Tabela 10: Izračunan volumen RNA, ki ga potrebujemo za izvedbo reakcije reverzne transkripcije. K – kontrolne celice, TNF- α – imunsko aktivirane celice s TNF- α , ND/IL-23 – celice tretirane z nanodelci s protismiselnim oligonukleotidom IL-23, ND/IL-23/F – celice tretirane z nanodelci s fluoroforjem označenim protismiselnim oligonukleotidom IL-23.

	Kontrola	TNF- α	ND/ ICAM-1	ND / ICAM-1/F
Izračunan volumen RNA (μl)	5,01	6,93	22,06	279,72

4.7 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času - qPCR

Nastavljen program na aparatu ABI Prism SDS 700 nam je rezultate podal kot krivulje pomnoževanja in kot prazne cikle (Ct).

Tabela 11: Rezultati izražanja (Ct) dveh hišnih (GADPH in YWAZ) in tarčnega gena (IL-23) pri HaCaT celicah pri različnih vzorcih. K – kontrolne celice, TNF- α – imunsko aktivirane celice s TNF- α , ND/IL-23 – celice tretirane z nanodelci s protismiselnim oligonukleotidom IL-23.

	K	voda	TNF- α	voda	ND/IL-23	voda
GADPH	17,67	35,79	17,72	nezaznano	16	38,17
	17,44		17,46		15,81	
	17,10		17,31		15,8	
IL-23	29,86	nezaznano	30,54	nezaznano	30,24	nezaznano
	30,79		30,38		30,29	
	31,07		30,43		30,29	
YWAZ	21,63	nezaznano	19,29	nezaznano	18,92	nezaznano
	19,25		19,08		19,16	
	18,98		18,46		19,37	

4.8 Analiza izražanja

4.8.1 Imunska aktivacija

- $\Delta Ct_{(test)} = Ct_{(tarčni\ gen,\ test)} - Ct_{(hišni\ gen,\ test)} = 30,45 - 17,50 = 12,95$

$$\Delta Ct_{(kalibrator)} = Ct_{(tarčni\ gen,\ kalibrator)} - Ct_{(hišni\ gen,\ kalibrator)} = 30,57 - 17,40 = 13,17$$

- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(test)} - \Delta Ct_{(kalibrator)} = 12,95 - 13,17 = -0,22$

- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,22} = \underline{1,17}$

4.8.2 Izražanje tarčnih genov

- $\Delta Ct_{(test)} = Ct_{(tarčni\ gen,\ test)} - Ct_{(hišni\ gen,\ test)} = 30,25 - 15,87 = 14,40$

$$\Delta Ct_{(kalibrator)} = Ct_{(tarčni\ gen,\ kalibrator)} - Ct_{(hišni\ gen,\ kalibrator)} = 30,45 - 17,50 = 12,95$$

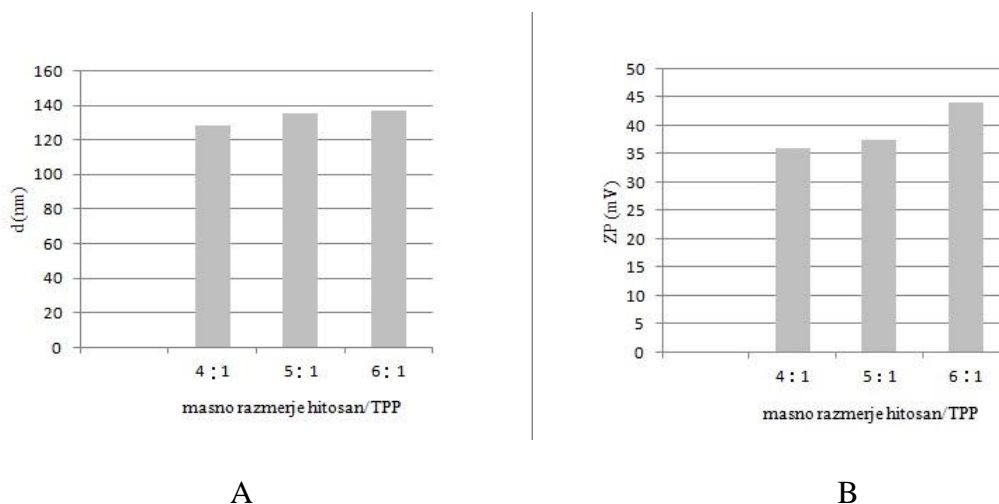
- $\Delta\Delta Ct = 1,45$

- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-1,45} = \underline{0,37}$

5 DISKUSIJA

Uspešna transfekcija genskega materiala v sesalske celice s pomočjo nanodelcev je v veliki meri odvisna od velikosti dostavnega sistema. Na začetku eksperimentalnega dela smo z metodo ionskega geliranja izdelali hitosanske nanodelce s TPP in jih fizikalno-kemijsko ovrednotili. Za ionsko geliranje smo se odločili, ker nanodelci pri tej metodi nastajajo pri sobni temperaturi in brez uporabe posebne opreme. Zaradi milih pogojev izdelave je metoda primerna za vgrajevanje makromolekul, kot so oligonukleotidi (29). Tvorbo nanodelcev smo spremljali vizualno. Kadar je bila tvorba nanodelcev uspešna, smo iz bistre raztopine opazovali nastanek opalescentne koloidne disperzije. Kot polimer za izdelavo nanodelcev smo uporabili hitosanijev klorid, ki ima visoko stopnjo deacetilacije. Po podatkih proizvajalca naj bi ta znašala 88,8 % (30). Višja stopnja deacetilacije pomeni večjo gostoto pozitivnega naboja, ki jo potrebujemo za boljšo kompleksacijo oligonukleotidov in hitosana v nanodelce. Prečni premreževalec oziroma stabilizator TPP poveča število ionskih interakcij in zmanjša velikost delcev. Z njegovim dodatkom smo med drugim zagotovili fizikalno stabilnost disperzij v širšem pH območju. Iz tabele 6 je razvidno, da so delci v vseh treh vzorcih, ki se razlikujejo med seboj v masnem razmerju hitosan/TPP, v nanometriškem območju. Z višanjem masnega razmerja hitosan/TPP se hidrodinamski premer delcev nekoliko poveča. Iz tega lahko sklepamo, da se pri nižjih masnih koncentracijah TPP tvori manj interakcij med nasprotno nabitima poliiionoma, posledično ostane tudi več prostih ioniziranih amino skupin hitosana. Ker se hitosan in TPP manj premrežita, so delci posledično večji. Zeta potencial je merilo fizikalne stabilnosti disperzij. Iz rezultatov lahko predpostavimo, da so vse merjene disperzije vzorcev pri danih pogojih fizikalno stabilne, saj je njihov ZP dovolj pozitiven (višji od +30 mV) in delci ne bodo težili k aglomeraciji oziroma agregaciji. Tako kot velikost se tudi ZP zvišuje z nižanjem masnega deleža TPP (slika 9). Pri vrednotenju hitosanskih nanodelcev s TPP smo prišli do podobnih zaključkov kot H.Liu in C.Gao v svojem raziskovalnem članku iz leta 2009 (31). Polidisperzni indeks je merilo porazdelitve velikosti delcev v vzorcu. Bolj se vrednost približuje 0, bolj so delci enakih velikosti. Takšnemu sistemu pravimo, da je monodisperzen. Sprejemljiva vrednost PDI mora biti manjša od 0,3, kar je bilo doseženo pri vseh treh razmerjih hitosan/TPP.

Slika 9: Grafični prikaz vpliva masnega razmerja hitosan/TPP na: A) povprečni premer (d) in B) ZP nanodelcev.



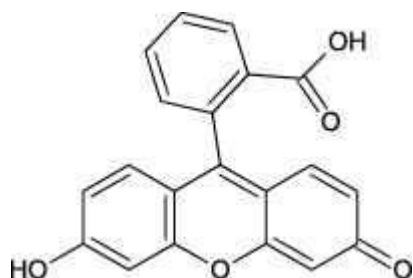
Glede na to, da bistvenih razlik v povprečnem premeru delcev pri vseh treh vzorcih ni bilo, smo kot optimalno masno razmerje hitosan/TPP izbrali razmerje 6:1. Takšna disperzija je bila fizikalno najbolj stabilna (najvišji ZP) in delci najbolj enakomernih velikosti (najmanjši PDI). Nanodelce, pripravljene v tem masnem razmerju smo uporabljali tudi v nadaljnjih poskusih.

Po vgradnji oligonukleotidov v nanodelce, smo tudi te fizikalno-kemijsko ovrednotili in jih primerjali s praznimi nanodelci. Opazili smo, da se velikost nanodelcev z vgrajenim oligonukleotidom poveča, vendar so bili delci še vedno manjši od 200 nm. Glede na podatke iz literature smo sklepali, da bi nanodelci s takšno velikostjo lahko vstopali v sesalske celice. V raziskavi objavljeni leta 2004 so raziskovalci dokazali, da delci velikosti 50-200 nm prehajajo v celice z endocitozo, posredovano s klaritini. Večji delci bi verjetno vstopali v celice preko fagocitoze, kar pa ni najbolj zaželeno, saj bi bila s tem zmanjšana farmakološka aktivnost oligonukleotidov, vgrajenih v nanodelce. Fagocitoza je namreč pot, ki varuje celice pred vdorom tujkov, kot so virusi, bakterije in drugi delci iz okolja (32). Mehanizem vstopa je poleg omenjenih faktorjev odvisen tudi od oblike in površinskih lastnosti nanodelcev. Disperzija nanodelcev z vgrajenim oligonukleotidom je bila fizikalno stabilna ($ZP = 38$ mV) in delci niso težili k agregaciji. Stabilnost nanodelcev je treba zagotoviti med samo izdelavo zdravila in med aplikacijo farmacevtske oblike z nanodelci. To je predvsem pomembno pri parenteralnih farmacevtskih oblikah, saj bi agregacija nanodelcev lahko privedla do številnih neželenih zapletov.

Za uspešen vnos oligonukleotidov v celico s pomočjo nanodelcev je poleg fizikalne stabilnosti in velikosti delcev ključnega pomena tudi uspešna vgraditev oligonukleotidov v nanodelce. Po spektrofotometrični meritvi koncentracije genskega materiala smo izračunali, da se v nanodelce vgradi 58,5 % pri tehnološkem postopku uporabljenih oligonukleotidov. Glede na dobljen rezultat lahko potrdimo, da so hitosanski nanodelci primeren dostavni sistem za vgrajevanje in dostavo oligonukleotidov.

Raziskovalcem je v preteklosti največ težav povzročala nizka stopnja transfekcije celic s hitosanskimi nanodelci. Učinkovito *in vitro* transfekcijo so dokazali na celičnih linijah, kot so melanomske celice (B16), človeške embrionske ledvične celice (HEK293), kolorektalne adenokarcinomske celice (Caco-2), človeške osteosarkomske celice (MG63), človeške pljučne karcinomske celice (A549) in epitelijske celice materničnega vratu (HeLa). Najbolj uspešni so bili, v primerjavi z drugimi celičnimi tipi, pri transfekciji HEK293 celic (5). V naši raziskavi smo z oligonukleotidi transficirali sekundarno keratinocitno celično linijo HaCaT, ki jo tvorijo spontano transformirane kožne celice odraslega človeka. Dobimo jo po uspešni presaditvi primarne celične linije. Primarne celične kulture bolje posnemajo naravno tkivo, saj jih pripravimo neposredno iz tkiva organizma, vendar imajo omejen rastni potencial. HaCaT celčna linija ima dobro ohranjene tkivno-specifične lastnosti (sposobnost diferenciacije in proliferacije) in zato velja za dober *in vitro* model povrhnjice kože. Po transfekciji celic z različnimi vzorci nanodelcev smo celice opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom. Iz slik 8-B in 8-C lahko vidimo, da smo s pomočjo hitosanskih nanodelcev uspešno vnesli fluorescentno označen protismiselni oligonukleotid proti IL-23, saj so določene celice pri vzbujevalni svetlobi z valovno dolžino 488 nm svetile z intenzivno zeleno barvo. Kljub uspešnosti transfekcije smo ugotovili, da je veliko celic, ki so svetile najbrž mrtvih. Možno je, da sama transfekcija ubije celice, ali pa samo mrtve celice sprejmejo nanodelce z oligonukleotidom. Lahko tudi, da so kationski razgradni produkti hitosana toksični za celice. Iz slik nismo jasno razločili, ali sveti jedro ali citoplazma.

Kot pozitivno kontrolo vstopa nanodelcev v celice smo pripravili vzorec nanodelcev z vgrajenim fluoresceinom (slika 9). Vzorec nanodelcev z vgrajenim fluoresceinom smo dializirali, da smo se znebili nevezanega fluoresceina. Fluorescein mora biti pri delovnih pogojih negativno nabit, da lahko nastane elektrostatska vez med amino skupinami hitosana in negativno karboksilno skupino fluoresceina. Celice z nanosenimi nanodelci s fluoresceinom so svetile, kar pomeni, da so nanodelci lahko prehajali v celice (slika 8-D).



Slika 9: Kemijska struktura fluoresceina (33).

Z negativno kontrolo, praznimi nanodelci, smo izključili možnost, da bi ogrodje nanodelcev svetilo (slika 8-A).

Genska terapija se je v preteklosti že izkazala kot obetaven pristop k zdravljenju kožnih bolezni. Koža je lahko idealna tarča za *in vivo* in *ex vivo* genski vnos, saj je lahko dosegljiva za aplikacijo. Prav tako lahko lažje nadzorujemo in reguliramo potencialne neželene učinke. Lahko se izognemo sistemski toksičnosti. Ker je koža dobro prekrvavljen organ, lahko z aplikacijo zdravil nanjo, poleg lokalnih bolezni zdravimo tudi sistemske bolezni. Genska terapija s protismiselnimi oligonukleotidi bi se v prihodnosti lahko uporabljala za zdravljenje različnih kožnih bolezni, ki so posledica genetske napake ali pretiranega izražanja določenih genov. Takšne bolezni so predvsem dedne bolezni kože, kot so različne ihtioze, dermatoze, pigmentne bolezni, bolezni mutacije genov za keratin, itd. Vendar je pri večini kožnih bolezni težava v tem, da je potrebno zdravljenje velikih površin kože. Pri bolj lokaliziranih boleznih kot je luskavica pa bi bilo zdravljenje z gensko terapijo mogoče. Luskavica je kronična avtoimuna vnetna bolezen kože. Zanja so značilne lezije z luskami. Bolezen je pogojena s številnimi genetskimi in imunološkimi dejavniki. Pri patogenezi kroničnih avtoimunih bolezni je značilno povečano izločanje provnetnih citokinov. *In vitro* in *in vivo* študije na miših in ljudeh so v lezijah pokazale povišane vrednosti IL-23, IL-17 in IL-22. Dokazano je tudi, da intradermalna injekcija IL-23 povzroči v miših simptome, podobne luskavici (18).

Zaradi teh dejstev smo predpostavili, da bi lahko s pomočjo protismiselnega oligonukleotida IL-23 zmanjšali izražanje tega citokina na nivoju translacije in s tem zavirali vnetno reakcijo v lezijah.

Pri eksperimentalnem delu smo želeli ustvariti vnetju podobno stanje *in vitro*, zato smo celice imunsko aktivirali z dodatkom TNF- α . Ta inducira vnetno reakcijo in poveča izražanje provnetnih citokinov. Iz rezultatov lahko vidimo, da je bila aktivacija celic s TNF- α uspešna, saj smo zvišali izražanje tarčnega gena za IL-23 za 17 % v primerjavi z neaktiviranimi celicami.

Imunsko aktivirane celice smo tretirali z nanodelci s protismiselnim oligonukleotidom IL-23 in nanodelci s fluorescentno označenim protismiselnim oligonukleotidom IL-23. Ker smo dokazali uspešno transfekcijo protismiselnega oligonukleotida v celice, nas je zanimalo, kolikšno je znižanje izražanja gena za IL-23 pri transficiranih celicah v primerjavi s kontrolnimi celicami. Iz vseh vzorcev celic smo izolirali mRNA, jo prepisali v stabilnejšo cDNA in pomnožili s PCR reakcijo. Iz vzorca celic s fluorescentno označenim protismiselnim oligonukleotidom IL-23 smo izolirali premalo RNA, zato smo ta vzorec zavrgli. Uspešno vnešeni protismiselni oligonukleotid se v celici komplementarno veže na mRNA, ki kodira za citokin IL-23. Nukleaze nato dupleks razgradijo, kar se kaže kot znižano izražanje citokina. Slednje smo z analizo izražanja gena tudi potrdili, saj se je izražanje tarčnega gena glede na kontrolno celično linijo znižalo za 37 %. Rezultat je standardiziran na hišni gen GAPDH. Poleg GAPDH smo merili še izražanje hišnega gena YWAZ. Pri hišnih genih je pomembno, da so stabilni pri vseh pogojih. V našem primeru je boljšo ponovljivost izkazal gen GAPDH, saj so bili Ct-ji bolj enakomerni pri vseh pogojih. Kljub obetavnim rezultatom, bi za primerjavo in bolj zanesljive rezultate potrebovali več uspešnih qPCR reakcij.

6 SKLEPI

V prvem delu magistrske naloge, kjer smo izdelali in vrednotili kontrolne hitosanske nanodelce brez oligonukleotidov, smo prišli do sledečih sklepov:

- S kompleksacijo kationskega polimera hitosana in polivalentnega aniona TPP lahko izdelamo fizikalno stabilne dostavne sisteme nanometrskih velikosti.
- Med analiziranimi vzorci masnih razmerij hitosan/TPP 4:1, 5:1 in 6:1, je najbolj optimalno razmerje 6:1, pri katerem so nastali nanodelci s povprečnim premerom 137 nm. Fizikalna stabilnost disperzij nanodelcev je pri takšnem razmerju največja, polidisperznost vzorcev pa najmanjša.
- Z višanjem masnega razmerja hitosan/TPP se povprečna velikost delcev povečuje.
- Z višanjem masnega razmerja hitosan/TPP se povečuje vrednost ZP, kar pomeni večjo fizikalno stabilnost disperzij nanodelcev.

Po vgradnji protismiselnih oligonukleotidov proti IL-23 v nanodelce, lahko zapišemo naslednje ugotovitve:

- Velikost nanodelcev z vgrajenim oligonukleotidom se v primerjavi s kontrolnimi nanodelci v povprečju poveča na 168 nm.
- Zeta potencial disperzij nanodelcev z vgrajenim oligonukleotidom se v primerjavi s kontrolnimi nanodelci v povprečju zniža.
- Disperzije nanodelcev z vgrajenim oligonukleotidom so fizikalno stabilne, delci pa optimalnih velikosti za uspešen vstop v sesalske celice.
- Učinkovitost vgrajevanja protismiselnih oligonukleotidov proti IL-23 v nanodelce je 58,5 %.

S transfekcijo keratinocitne celične linije HaCaT z različnimi vzorci smo prišli do sledečih ugotovitev:

- Kožne celice lahko sprejmejo nanodelce s fluorescentno označenimi oligonukleotidi. Stopnja transfekcije je vprašljiva.

- Nanodelci s fluoresceinom (pozitivna kontrola transfekcije) so uspešno vstopali v celice. S tem potrdimo, da imajo nanodelci ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti za vstop skozi celično membrano.
- Prazni nanodelci pri vzbujevalni svetlobi fluorescenčnega mikroskopa ne svetijo, zato ne motijo ocene transfekcije celic z genskim materialom.

V zadnjem delu smo kvantificirali izražanje gena za provnetni citokin IL-23 pri kontrolnih, imunsko aktiviranih celicah in celicah transficiranih z nanodelci s protismiselnim oligonukleotidom proti IL-23.

- Z aktivacijo celic s TNF- α smo v primerjavi z neaktiviranimi celicami zvišali izražanje tarčnega gena za IL-23 za 17 %.
- Izražanje tarčnega gena se je po transfekciji z nanodelci s protismiselnim oligonukleotidom proti IL-23 glede na kontrolno celično linijo znižalo za 37 %.

Z nadaljnjo optimizacijo bi bila dostava krajših segmentov genskega materiala v sesalske kožne celice s hitosanskim polimernim nosilcem nanometrskih velikosti primerna alternativa drugim uveljavljenim transfekcijskim metodam. V naslednjih raziskavah bi lahko analizirali izražanje ostalih tarčnih genov za provnetne citokine. Če bi ugotovili konstantno in signifikantno zmanjšanje izražanja provnetnih citokinov, bi lahko nanodelce z vgrajenimi oligonukleotidi vključili v pripravek za lokalno uporabo ter z njegovo aplikacijo izboljšali klinično sliko vnetnih bolezni kože. Ključnega pomena bi bilo izključiti toksičnost samega pripravka (tako polimernega nosilca kot oligonukleotida) za celice in opraviti predklinične in klinične študije. Poleg tega, bi bilo potrebno bolje opredeliti mehanizem vstopa tovrstnih zdravil v celice, saj bi s tem bistveno povečali učinkovitost zdravila. Mehanizmi vstopa so za vsako celično linijo specifični, tako da bi le-te morali testirati na keratinocitni celični liniji. Transfekcijo bi lahko izboljšali s spreminjanjem površinskih lastnosti, velikosti in oblik dostavnega sistema, ali pa z vezavo ligandov za vezavo na specifične receptorje, ki bi določevali natančen mehanizem vstopa nanodelcev v celice. Kljub temu, da je do izdelave in razširjene uporabe varnega, kakovostnega ter učinkovitega zdravila potrebno opraviti še veliko raziskav, ima tovrstno zdravljenje velik potencial v prihodnosti.

7 LITERATURA

1. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 210, 211, 218, 225, 230.
2. Erman A: Hitosan in možna uporaba v medicini. Zdravn Vestn 2011; 80: 489-498.
3. Kerec Kos M: Uporaba hitosana v farmaciji. Farm Vestn 2006; 57: 287-289.
4. Chitosan: <http://en.wikipedia.org/wiki/Chitosan>; Dostop: 6.10.2013.
5. Saranya N, Moorthi A, Saravanan S, Pandima M, Selvamurugan N: Chitosan and its derivatives for gene delivery. Int J Biol Macromol 2011; 48: 234.
6. Grenha A: Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. J Drug Target 2012; 20: 291-300.
7. Swarbrick J: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 3^{ed}, Vol 1, Informa Healthcare 2007, ZDA; 1183, 1188, 1189, 1193.
8. Baumgartner S, Ahlin Grabnar P, Kocbek P, Gašperlin M, Kristl J: Vaje iz farmacevtske tehnologije I, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009.
9. Lojk J, Pavlin M, Kreft M E: Vloga endocitotskih poti pri razvoju in zdravljenju bolezni. Med Razgl 2013; 52: 381.
10. M. Cegnar, J. Kerč: Nanozdravila. Farm Vestn 2012; 63: 85-86
11. Hočevnar L: Izdelava in fizikalno-kemijsko vrednotenje hitosanskih nanodelcev s heparinom. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
12. Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z: Polysaccharides-based nanoparticles as a drug delivery systems. Adv Drug Deliver Rev 2008; 60: 1650-1654.
13. Kolar M: Izdelava in karakterizacija hitozanskih nanodelcev za medicinski uporabo. Diplomsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, 2010.
14. Chitosan-polyion complex: <http://www.rsc.org/ej/LC/2009/b807454b/b807454b-f2.gif>; Dostop: 6.10.2013.

15. Malvern Instruments Ltd. Size theory. Zetasizer Nano User Manual; 2004: 14-1, 14-2
<http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20Manual.pdf>;
Dostop: 3.10.2013.
16. Sonia T A, Shama C P: Chitosan and its Derivates for Drug Delivery Perspective. Adv in Polym Sci 2011; 243: 25, 42.
17. Fattal E, Barratt G: Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA. Br Journal of Pharmacol 2009; 157: 179-194.
18. Gašperlin M, Lužar K: Utišanje genov za provnetne citokine v keratinocitni celični liniji. Raziskovalna naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012.
19. Brown T, Brown T Jr.: Oligonucleotides as Drugs. Nucleic Acid Book (e-book)
<http://www.atdbio.com/content/13/Oligonucleotides-as-drugs>; Dostop: 6.10.2013.
20. Dias N, Stein C A: Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. Mol Cancer Ther 2002; 1: 347-355.
21. Cegnar M, Kristl J: Dostavni sistemi nanometrskih velikosti za vnos proteinov in genov. Med Razgl 2005; 44:447-462.
22. Pečar Fonović U, Obermajer N, Jevnikar Z, Mirković B, Rojnik M, Kos J: Vaje iz farmacevtske biokemije, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009.
23. Wonga S Y, Peletb J M, Putnam D: Polymer systems for gene delivery—Past, present, and future. Prog Polym Sci 2007; 32: 799-837.
24. Lee K Y: Chitosan and Its Derivates for Gene Delivery. Macromol Res 2007; 15: 196.
25. Fomivirsen: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fomivirsen>; Dostop: 6.10.2013.
26. RNeasy® Mini Handbook, Qiagen 2010, 4th Ed:11.
27. Omniscript® Reverse Transcription Handbook, Qiagen 203.
<http://www.qiagen.com/products/catalog/assay-technologies/end-point-pcr-and-rt-pcr-reagents/omniscript-rt-kit#productdetails>; Dostop: 7.10.2013.

28. Real-Time PCR Applications Guide

<http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>; Dostop: 30.09.2013.

29. Ahlin Grabnar P, Kristl J: The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers. *J Microencapsul* 2011; 28: 326.

30. Kraeber & Co. GmbH, Certificate of analysis, Chitosan Hydrochloride, Nemčija, september 2013.

31. Liu H, Gao C: Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. *Polym Adv Technol* 2009; 20: 615-616.

32. Teskač Plajnšek K, Kocbek P, Erdani Kreft M, Kristl J: Mehanizmi vstopa nanodelcev v celice in njihov vpliv na dostavljanje učinkovin. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 225-235.

33. Fluorescein: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Fluorescein>; Dostop: 16.10.2013.