

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA BLAŽIČ

**PROUČEVANJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z  
RESVERATROLOM IN VGRAJEVANJE V POLIMERNA  
NANOVLAKNA**

**INVESTIGATION OF SOLID LIPID NANOPARTICLES WITH  
RESVERATROL AND THEIR INCORPORATION IN POLYMERIC  
NANOFIBERS**

*Ljubljana, 2014*

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl.

Za strokovno pomoč, dosegljivost in usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Julijani Kristl in delovnemu mentorju dr. Janu Pelipenku. Iskrena hvala tudi ostalim članom Katedre za farmacevtsko tehnologijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri raziskovalnemu delu.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl.

Mojca Blažič

### **Komisija za zagovor magistrske naloge:**

Predsednik: prof. dr. Janko Kos

Mentorica: prof. dr. Julijana Kristl

Član: doc. dr. Janez Mravljak

<b>POVZETEK.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV.....</b>	<b>7</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>8</b>
1.1 NANOTEHNOLOGIJA .....	8
1.2 TRDNI LIPIDNI NANODELCI .....	8
1.3 NANOVLAKNA.....	10
1.4 ELEKTROSTATSKO SUKANJE .....	11
1.5 RANE .....	12
1.6 RESVERATROL .....	13
1.6.1 OBLOGE ZA CELJENJE RAN.....	14
<b>2 NAMEN DELA.....</b>	<b>17</b>
<b>3 EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>18</b>
3.1 MATERIALI .....	18
3.1.1 KOMPONENTE ZA IZDELAVO TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV .....	18
3.1.2 KOMPONENTE ZA IZDELAVO POLIMERNIH NANOVLAKEN .....	18
3.1.3 REAGENTI IN TOPILA.....	18
3.2 NAPRAVE .....	19
3.3 IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV .....	19
3.4 VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV .....	24
3.4.1 MERJENJE VELIKOSTI, POLIDISPERZNEGA INDEKSA IN ZETA POTENCIALA IZDELANIM SLN .....	24
3.4.2 DOLOČANJE RESVERATROLA .....	25
3.4.3 DOLOČANJE UČINKOVITOSTI VGRAJEVANJA RSV V SLN .....	25
3.4.4 SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ SLN .....	26
3.5 IZDELAVA IN VREDNOTENJE POLIMERNIH NANOVLAKEN.....	26
3.5.1 PRIPRAVA POLIMERNE RAZTOPINE .....	26
3.5.2 IZDELAVA POLIMERNIH NANOVLAKEN .....	27
3.5.3 STABILIZACIJA POLIMERNIH NANOVLAKEN .....	28
3.5.4 VREDNOTENJE POLIMERNIH NANOVLAKEN .....	28
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>30</b>

4.1 FIZIKALNE LASTNOSTI TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV .....	30
4.1.1 VELIKOST IN ZETA POTENCIAL TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV V ODVISNOSTI OD KOLIČINE RESVERATROLA.....	38
4.2 UČINKOVITOST VGRADNJE RESVERATROLA V SLN .....	44
4.3 SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ SLN.....	45
4.4 LASTNOSTI IZDELANIH NANOVLAKEN .....	47
4.4.1 KARAKTERIZACIJA NANOVLAKEN .....	47
4.5 STABILIZACIJA NANOVLAKEN .....	54
4.6 UČINKOVITOST VGRAJEVANJA RESVERATROLA V NANOVLAKNA .....	55
4.7 SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ NANOVLAKEN .....	56
4.8 OSTANEK RESVERATROLA V NANOVLAKNIH PO SPROŠČANJU .....	59
<b>5 SKLEP .....</b>	<b>61</b>
<b>6 LITERATURA .....</b>	<b>62</b>
<b>7 PRILOGE .....</b>	<b>65</b>

## POVZETEK

Nanotehnologija je hitro razvijajoče se področje 21. stoletja, ki zajema raziskovanje, izdelavo in uporabo materialov nanometrskih velikosti, katerih produkte zaradi svojih specifičnih lastnosti veliko raziskujejo v biomedicini, na področju tkivnih nadomestkov, sodobnih oblog za celjenje ran in dostavnih sistemov. Namen našega dela je bil izdelati kompoziten nanodostavni sistem, sestavljen iz polimernih nanovlaken z resveratrolom ali z trdnimi lipidnimi nanodelci z resveratrolom, ki bi omogočal podaljšano sproščanje.

Trdne lipidne nanodelce različnih receptur smo izdelali z metodo dispergiranja taline lipida z rotor-stator homogenizatorjem in vanje vgradili resveratrol. Trdnim lipidnim nanodelcem z resveratrolom smo določili velikost, polidisperzni indeks in vsebnost vgrajenega resveratrola in jih z metodo elektrostatskega sukanja vgradili v nanovlakna iz polivinil alkohola. Izdelali smo nanovlakna z vgrajenimi nanodelci z resveratrolom (kompoziten dostavni sistem) in za primerjavo, nanovlakna z vgrajenim samim resveratrolom (enostaven dostavni sistem). Primerjali smo morfologijo, učinkovitost vgradnje in sproščanje resveratrola. Le z optimizacijo eksperimentalnih parametrov elektrostatskega sukanja smo lahko izdelali homogena nanovlakna. Na homogenost nanovlaken vplivajo tako parametri elektrostatskega sukanja kot masni delež resveratrola v vlaknih. 0,94 % m/m RSV nam v primeru nanovlaken z nanodelci povzroči nastanek vozlov, v primeru nanovlaken z resveratrolom pa izoboritev kristalov resveratrola na površini nanovlaken izdelanih pri  $20 \pm 2$  % RH. Pokazali smo, da nam naš dostavni sistem zagotavlja podaljšano sproščanje učinkovine več dni in da z vgradnjo trdnih lipidnih nanodelcev z resveratrolom v nanovlakna dosežemo še bolj upočasnjeno sproščanje v primerjavi z vgradnjo samega resveratrola v nanovlakna.

Tak dostavni sistem, kot sodobna obloga za rane, bi se potencialno lahko uporabljal za zdravljenje kroničnih ran pri katerih pride do povečane tvorbe reaktivnih zvrsti, ki poleg ostalih dejavnikov, preprečujejo celjenje, zato bi lahko z dodatkom resveratrola kot antioksidanta pripomogli k uspešnejšemu celjenju. K temu pripomore predvsem sam dostavni sistem, saj nanovlakna s svojo strukturo posnemajo gradnike zunajceličnega ogrodja in s tem dodatno spodbujajo celično rast in obnovo tkiv.

**Ključne besede:** polimerna nanovlakna, elektrostatsko sukanje, trdni lipidni nanodelci, resveratrol, obloge za rane.

## **ABSTRACT**

Nanotechnology is a rapidly expanding science of 21st century, encompassing the research, production and use of materials of nanometric size. Due the unique physical characteristics of these products, they are of great research in the field of biomedical tissue substitutes, modern coatings for wound healing and drug delivery systems. The aim of our work was to produce a complex nanodelivery system consisting of polymeric nanofibres with incorporated solid lipid nanoparticles with resveratrol, which would allow sustained release of the active substance.

Solid lipid nanoparticles of various formulations were produced by melt-emulsification with a rotor-stator homogenizer. Resveratrol was incorporated in the nanoparticles which demonstrated the best physical properties. With incorporation of a 10 % (w/w) resveratrol, in proportion to the lipid, nanoparticles with the most appropriate physical properties were obtained. In order to achieve the prolonged release we used the method of electrospinning to incorporate nanoparticles into the PVA nanofibres. Nanofibers containing nanoparticles with resveratrol (complex delivery system) and nanofibres with incorporated pure resveratrol (simple delivery system) were produced for comparison. Nanofiber morphology, efficiency of incorporation and release of the resveratrol were compared. By optimizing the parametres of electrospinning homogeneous nanofibers were produced. The homogeneity of nanofibers is influenced both by electrospinning parameters and by the proportion of resveratrol in the fibers. When the 0,94 % m/m proportion of resveratrol in nanofibers is incorporated in the form of solid lipid nanoparticles, it results in the formation of nodules, while in the case of nanofibers with resveratrol this results in the precipitation of the crystals of resveratrol on the surface of the nanofibers. It has been shown that our delivery system provides prolonged release for several days. An even more prolonged release was achived by the incorporation of resveratrol in form of solid lipid nanoparticles. Such delivery system could be used for wound dressings and potentially also for the therapy of chronic wounds. In response to the oxidative stress occurring at the wound site, resveratrol can be used to quench free radicals and reestablish the necessary enviroment for wound healing. On the other hand nanofibers would, due to their morphological resemblance to extracellular matrix, offer suitable support for cell growth and therefore promote cell growth and tissue repair.

**Key words:** polymer nanofibers, electrospinning, solid lipid nanoparticles, resveratrol, wound dressings.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ECM – zunajcelično ogrodje (angl. *extracellular matrix*)

ND – nanodelci

NV – nanovlakna

NV-RSV – nanovlakna z resveratrolom

NV-SLN-RSV – nanovlakna s trdnimi lipidnimi nanodelci z resveratrolom

PAS – površinsko aktivna snov

PBS – fosfatni pufer (angl. *phosphate buffer saline*)

PDI – polidisperzni indeks

PVA – polivinil alkohol

RSV – resveratrol

RH – relativna vlažnost

SEM – vrstična elektronska mikroskopija (angl. *scanning electron microscopy*)

SLN – trdni lipidni nanodelci

SLN – RSV – trdni lipidni nanodelci z resveratrolom

ZP – zeta potencial

ZU – zdravilna učinkovina

# 1 UVOD

## 1.1 NANOTEHNOLOGIJA

Nanotehnologija je hitro razvijajoče se področje 21. stoletja, ki zajema raziskovanje, načrtovanje, izdelavo in uporabo materialov nanometrskih velikosti, to je od okoli 1 do 1000 nm, katerih produkti imajo uporabno vrednost v makroskopskem svetu. Zaradi nano-dimenzij imajo takšni materiali specifične fizikalno-kemijske in posledično tudi farmakokinetične lastnosti; to je porazdeljevanje nanosistema v organizmu. Izredna majhnost, velika specifična površina, posledično izboljšana topnost in multifunkcionalnost nanostruktur, odpira nove možnosti raziskovanja in razvoja novih farmacevtskih dostavnih sistemov in nadomestkov v tkivnem inženirstvu [1]. Nanotehnologija vključuje povezovanje različnih znanstvenih področij kot so kemija, fizika, farmacija, medicina ter številna druga, kar zagotavlja možnosti za razvoj ter oblikovanje multifunkcionalnih naprav in struktur, s katerimi lahko dosegamo ciljano dostavo učinkovin, diagnosticiramo in zdravimo nekatere najbolj razširjene in težko ozdravljive bolezni [2]. Kot posledica različnih tarč in učinkovin se je v zadnjih desetletjih pokazala potreba za razvoj številnih novih dostavnih sistemov, ki omogočajo dostavljanje na način, ki ga ni mogoče doseči z doslej razvitimi farmacevtskimi oblikami.

## 1.2 TRDNI LIPIDNI NANODELCI

Nanodelci (ND) so trdni, koloidni delci z velikostjo od 1 nm do 100 nm, vendar med nanodostavne sisteme prištevamo tudi ND z velikostjo do 1000 nm. Za ciljano dostavo učinkovin na mesto delovanja potekajo obsežne raziskave biorazgradljivih lipidnih ND [3]; prav tako pa tudi za doseganje kontroliranega sproščanja in stabilizacijo labilnih učinkovin (proteini, peptidi, DNA) ter zaščito pred njihovo razgradnjo. Učinkovina v ND je lahko raztopljena, suspendirana ali vezana na nano-ogrodje. Z izdelavo ND lahko vplivamo na različne lastnosti nanodostavnega sistema in na profil sproščanja vgrajene zdravilne učinkovine [2].

Poznamo več vrst ND. Glede na kemijsko strukturo lahko ND razdelimo na anorganske in organske. Med anorganske ND prištevamo predvsem ND raznih kovin (Ag, Au) in kovinskih oksidov ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ), ki se uporabljajo kot pomožne snovi, sredstva za diagnostiko in kot nosilci zdravilnih učinkovin (ZU). Med organske ND prištevamo



polimerne ND, trdne lipidne nanodelce (SLN), liposome, nanokristale, nanocevkke ter dendrimere [2]. Večina organskih ND predstavlja dostavne sisteme za prirejeno sproščanje in ciljano dostavo ZU v tarčna tkiva ali celice [3].

SLN so koloidni sistemi zasnovani na osnovi lipida. Prvi so bili izdelani v zgodnjih 90-ih letih kot alternativni dostavni sistem tradicionalnim koloidnim sistemom, kot so parenteralne O/V emulzije, liposomi in polimerni mikro- ter nanodelci, saj združujejo njihove prednosti in se obenem izogone njihovim večjim slabostim [2-4].

#### **Prednosti SLN:**

- možnost nadzorovanega sproščanja ZU,
- ciljana dostava ZU,
- povečana stabilnost ZU zaradi zaščite pred zunanjimi vplivi,
- visok delež vgrajene ZU,
- možnost vgradnje manjših hidrofilnih in lipofilnih ZU,
- manjša nevarnost akutne in kronične toksičnosti zaradi uporabe biorazgradljivih in biokompatibilnih komponent nosilnega sistema (lipidov, fosfolipidov),
- odsotnost organskih topil,
- možnost hitrega in učinkovitega procesa izdelave vključno s sterilizacijo in industrijsko proizvodnjo [5].

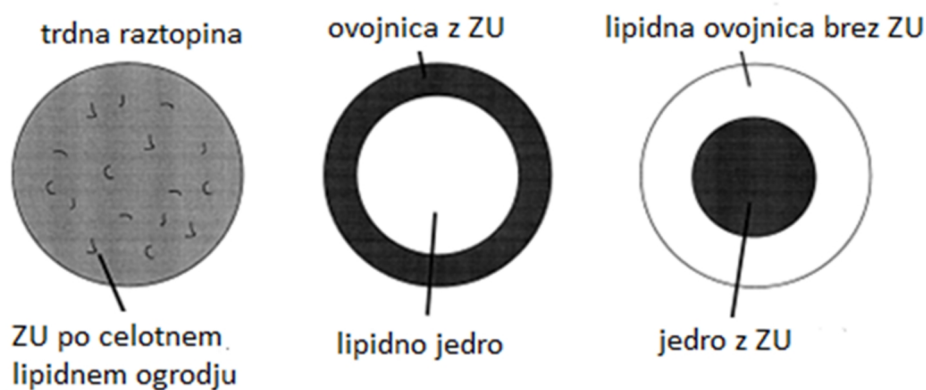
#### **Slabosti SLN:**

- prisotnost drugih koloidnih struktur (miceli, liposomi, mešani miceli, nanokristali učinkovine),
- kompleksnost fizikalnega stanja lipida (transformacija med različnimi kristalnimi modifikacijami), ki vpliva na stabilnost med shranjevanjem in dajanjem (geliranje, aglomeracija delcev),
- le delno primerni za termolabilne ZU, saj se najpogosteje izdelujejo s taljenjem lipida.

SLN so zgrajeni iz trdnega lipidnega jedra, ki je obdano s fosfolipidnim slojem, ter dodatno stabilizirani s površinsko aktivnimi snovmi (PAS) v disperznem mediju [2]. Lipidno ogrodje tvorijo biorazgradljivi in biokompatibilni lipidi med katere prištevamo trigliceride (npr. tristearat, tripalmitat, triglicerid behenojske kisline), parcialne trigliceride (npr. mono- in digliceridi), maščobne kisline (npr. stearinska kislina), steroide (npr.

holesterol) in voske (npr. cetil palmitat). Za stabilizacijo lipidne disperzije se uporabljajo različne PAS, vendar je njihov izbor odvisen od vrste aplikacije. Še posebej smo z izbiro omejeni pri parenteralni aplikaciji. PAS, ki so sprejemljive za i.v. aplikacijo so: lecitin, Tween 80, Poloxamer 188 in natrijev glikoholat [4]. Prav tako lahko z ustrežno kombinacijo PAS učinkoviteje preprečujemo agregiranje in aglomeriranje delcev, kar vpliva na fizikalno stabilnost disperzije SLN [5].

Za izdelavo SLN imamo na voljo več metod. Najbolj uporabljeni metodi v industriji sta homogenizacija pod visokim tlakom in visokostrižna homogenizacija. V majhnem merilu pa lahko izdelamo SLN z dispergiranjem taline lipida z rotor-stator homogenizatorjem, hladnim dispergiranjem, izparevanjem topila z obarjanjem v emulzijah tipa O/V ter razredčevanje vroče mikroemulzije [2]. Z izbiro metode vplivamo na način vgrajevanja ZU v SLN. Glede na mesto vgrajene ZU poznamo tri vrste SLN. ZU je lahko enakomerno porazdeljena po celotnem lipidnem ogrodju, lahko je le v ovojnici, ki obdaja lipidno jedro ali pa le v jedru, ki je obdano z lipidno ovojnico (Slika 1). Usoda ND *in vivo* je odvisna predvsem od načina dajanja ter od interakcij SLN z biološkim okoljem. SLN so primerni kot dostavni sistemi učinkovin za peroralno, transdermalno, pulmonalno ter parenteralno uporabo [2].



**Slika 1:** Vrste SLN glede na mesto vgrajene zdravilne učinkovine.

### 1.3 NANOVLAKNA

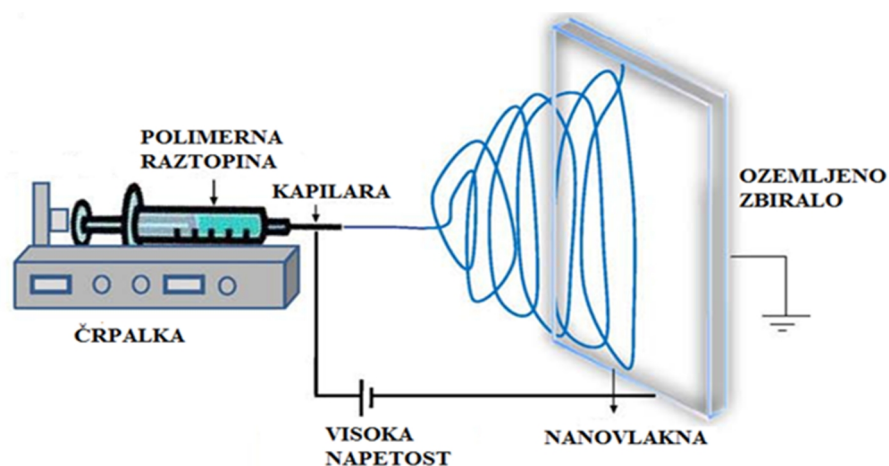
Nanovlakna (NV) so vlakna s premerom na nanometrski skali in teoretično z neomejeno dolžino [6]. Zaradi specifičnih lastnosti, kot so velika površina v primerjavi z volumnom in dobre mehanske lastnosti se uporabljajo in raziskujejo na številnih področjih. Produkti iz NV se veliko raziskujejo in uporabljajo v industriji (multifunkcionalne membrane, filtri, tekstilna in okoljevarstvena industrija, biotehnologija,...) in v biomedicini (umetni tkivni

nadomestki, obloge za celjenje ran, dostavni sistemi za ZU) [7]. Znanе so različne metode izdelave NV. Elektrostatsko sukanje je najbolj uporabljena in razširjena metoda zaradi relativno enostavnega procesa, stroškovne sprejemljivosti, uporabe enostavnih orodij ter aparatov in je ena redkih metod, ki omogoča izdelavo NV tudi v industrijskem merilu [8-10].

#### **1.4 ELEKTROSTATSKO SUKANJE**

Elektrostatsko sukanje je enostavna in vsestranska metoda, ki izkorišča elektrostatske sile za izdelavo polimernih NV iz različnih polimerov: sinteznih, naravnih, biorazgradljivih, nerazgradljivih ali iz kombinacij le teh. Napravo za elektrostatsko sukanje sestavljajo izvor visoke napetosti, injekcijska brizga in kapilara, skozi katero črpalka potiska polimerno raztopino in ozemljeno zbiralo, na katerem se zbirajo NV (Slika 2). Proces elektrostatskega sukanja uporablja izvor visoke napetosti, ki daje polimerni raztopini naboj. Ob priključitvi visoke napetosti na kovinsko kapilaro se elektrostatski privlak med nasprotno nabito polimerno raztopino in zbiralom ter elektrostatski odboj med enako nabitimi delci v polimerni raztopini povečata, zato se raztopina v obliki kapljice na koncu kapilare najprej preoblikuje v stožec (Taylorjev stožec) in nato razpotegne v curek, ko elektrostatske odbojne sile premagajo sile površinske napetosti raztopine. Med potovanjem curka polimerne raztopine od konice kapilare do zbirala topilo izhlapi, kar vodi do nalaganja suhih polimernih NV. Tako izdelana NV, imajo običajno premer od nekaj deset nanometrov do nekaj mikrometrov. Zmožnost dokaj enostavne izdelave NV, ki so morfološko primerljiva z elementi zunajceličnega ogrodja (ECM), je povzročila veliko zanimanje tudi na področju tkivnega inženirstva in razvoju dostavnih sistemov [11]. Čeprav je elektrostatsko sukanje enostavna metoda za izdelavo NV, pa vplivajo na sam proces izdelave in na lastnosti nastalih NV številni parametri. Te parametre lahko razdelimo v tri večje skupine:

- PROCESNI PARAMETRI: napetost, pretok polimerne raztopine, razdalja med konico igle ter zbiralom, vrsta zbirala [7, 11].
- PARAMETRI RAZTOPINE: narava, koncentracija in molekulska masa polimera, viskoznost in prevodnost raztopine, površinska napetost, hlapnost topila [11].
- PARAMETRI OKOLJA: temperatura in relativna vlažnost [7, 8, 11].



**Slika2:** Shema procesa elektrostatskega sukanja.

## 1.5 RANE

Rane definiramo kot poškodbe za katere je značilna prekinjena struktura kože ali sluznice, pri čemer pride do delne ali popolne poškodbe vrhnjih ali globljih tkiv. Glede na čas celjenja ločimo akutne in kronične rane. Akutne rane so poškodbe tkiva oz. kože, ki so običajno posledica poškodb in se zacelijo najkasneje v osmih tednih. Kronične rane so po definiciji vse sekundarno zdravljene rane, ki se v času osmih tednov ne zacelijo. Le te predstavljajo zadnji stadij napredujočega uničenja tkiva, ki ga povzročajo venozne, arterijske ali presnovne poškodbe ožilja, kot tudi poškodbe zaradi pritiska, sevanja ali tumorjev. Zanje je značilen moten proces celjenja v eni ali večih točkah v fazah hemostaze, vnetja, proliferacije in epitelizacije ter preoblikovanja in zorenja tkiva, kar se kaže v podaljšanem času celjenja rane, kot je pričakovano. Na neuspešnost celjenja rane vplivajo spremembe v delovanju mediatorjev, kot so rastni dejavniki, citokini, proteaze ter celične in izvencelične komponente, ki imajo pomembno vlogo v različnih fazah celjenja [12]. Poleg tega vplivajo na uspešnost celjenja še lokalni (stanje rane: prekrvavljenot, prisotnost mikroorganizmov, anatomsko lega ter velikost) in sistemski dejavniki (stanje pacienta: starost, presnovne bolezni, bolezni krvožilja, vpliv drugih zdravljenj) [13]. Med predispozicije za nastanek kronične rane prištevamo: spremembe v profilu in aktivnosti celic, spremembe v sestavi ECM, neuspešna epitelizacija, prisotnost radikalov in mikroorganizmov [12]. Kot že omenjeno je eden glavnih problemov pri kronični rani porušeno ravnovesje med razgradnjo in izgradnjo elementov ECM, ki pa je nujno potrebno za celično rast in s tem tudi za obnovo tkiva.

Celjenje rane se prične takoj po poškodbi tkiva. Odvija se v več fazah, ki se medsebojno prepletajo. Najprej imamo fazo hemostaze, kateri sledi faza vnetja, tej sledi faza proliferacije ali epitelizacije ter na koncu faza preoblikovanja in zorenja tkiva [13]. Med fazo vnetja nevtrofilci ter citokini proizvajajo oksidante, kot so reaktivne kisikove zvrsti (ROS) ali reaktivne dušikove zvrsti (RNS). Pri kroničnem vnetju pride do porušenega ravnotežja med antioksidativno obrambo in oksidativnim stresom, kar vodi do možnih poškodb celic. Značilnost kroničnih ran je številčnost nevtrofilcev v rani, ki v preveliki meri sproščajo vnetne citokine ter encime, s čimer podaljšujejo vnetje. Zaradi povečane encimske aktivnosti se sestavine ECM razgrajujejo, njihovo nalaganje v koži je omejeno, povečano nastajanje reaktivnih zvrsti pa škodi celicam in nastajajočemu tkivu [13]. Kot odgovor na pojav oksidativnega stresa v rani, do katerega privede povečana tvorba reaktivnih zvrsti, bi lahko uporaba antioksidantov znižala njihovo koncentracijo in ponovno vzpostavila primerno okolje za celjenje. Znani so trije mehanizmi delovanja antioksidantov. Lahko so t.i.lovilci radikalov, ki delujejo tako, da reagirajo z radikali, jih nevtralizirajo, sami pa pri tem dobijo lastnosti radikalov. Lahko katalitično odstranjujejo radikale in druge ROS (superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaza,...) ali pa kompleksirajo kovinske ione (železove, bakrove,...) in s tem zmanjšajo njihovo razpoložljivost ter tako preprečijo nastanek predvsem hidroksilnega radikala in razgradnjo lipidnih peroksidov [14].

## 1.6 RESVERATROL

Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroksistilben) je neflavoidni polifenol, ki se nahaja v več kot 70-ih rastlinskih vrstah. Najdemo ga v grozdju, arašidih, v različnih vrstah jagod ter v nekaterih zeliščih. Polifenoli nastanejo v rastlinah kot odgovor na eksogene stresne dejavnike, kamor uvrščamo poškodbe, glivične okužbe ter ultravijolično sevanje [15]. RSV se pojavlja v dveh strukturnih oblikah, v *cis* in *trans* obliki, ki je stabilnejša in farmakološko bolj učinkovita. Prvič je bil izoliran iz korenin japonskega dresnika (*Fallopia japonica*) in opisan že več desetletij nazaj, vendar se je šele pred nekaj leti pojavilo zanj večje zanimanje zaradi njegovih številnih bioloških učinkov, kot so protitumorno, protivnetno, kardioprotektivno ter antioksidativno delovanje [16]. Slaba lastnost RSV je njegova nizka učinkovitost *in vivo* zaradi nizke biološke razpoložljivosti. Za izboljšanje biološke učinkovitosti *in vivo* poskušajo izboljšati nizko topnost, stabilnost ter velik in hiter obseg metabolizma. [17].

V zadnjih letih namenljajo antioksidantom veliko pozornost zaradi njihovega preventivnega in terapevtskega učinka pri oksidativnem stresu. Gre za patološko stanje, ko je povečana tvorba radikalov in/ali zmanjšana učinkovitost antioksidativne obrambe. Dodatna aplikacija antioksidantov nevtralizira reaktivne zvrsti preden te reagirajo z biološkimi tarčami in na ta način zmanjša oksidativen stres tkiva [15]. RSV zaradi njegove relativno enostavne molekulske strukture prispeva k odstranjevanju reaktivnih zvrsti pri povečani tvorbi reaktivnih zvrsti med patološkimi pogoji in s tem vpliva na regulacijo celičnih redoks signalnih poti [15]. Neposreden mehanizem delovanja RSV kot antioksidanta naj bi bil prenos vodikovega atoma radikalom. Vendar pa RSV lahko deluje tudi kot oksidant, torej kot pospeševalec oksidativnih in radikalskih verižnih procesov. RSV je v prisotnosti  $\text{Cu}^{2*}$  podvržen oksidaciji, katere produkt je dimer, ki najverjetneje nastane z dimerizacijo fenoksi radikala RSV. Kateri učinek bo prevladal, je odvisno od različnih dejavnikov, kot so redoks potencial in koncentracija RSV, pH, prisotnost oksidativnih encimov, kovinskih ionov in vrste celic. Zato je potrebno razviti dostavni sistem, ki omogoča kontrolirano in ciljano dostavo RSV in obenem določiti koncentracijsko območje za doseganje željene terapevtske učinkovitosti.

### ***1.6.1 OBLOGE ZA CELJENJE RAN***

Sodobne obloge predstavljajo nadomestek manjkajočega tkiva. Namen njihove uporabe je v pripravi ležišča rane za pospešeno optimalno celjenje, ki zajema odstranitev nekroz, zmanjšanje vnetja in obremenitve rane z bakterijami. Obloge za rane lahko razdelimo v tri skupine. Med pasivne oz. navadne obloge štejemo gaze, k interaktivnim oblogam, ki omogočajo izmenjavo plinov, prištevamo polimerne filme in pene. V zadnjo skupino uvrščamo bioaktivne obloge, ki aktivno posegajo v proces celjenja. Katera obloga bi bila najbolj primerna, se odločimo glede na vrsto in stanje rane. Sodobne obloge za celjenje ran naj bi imele naslednje lastnosti:

- zmožnost vzdrževanja hemostatskih pogojev,
- zaščita pred sekundarno okužbo,
- zmožnost absorpcije prekomernih izločkov/gnoja, bakterij in toksičnih sestavin iz rane,
- omogočena izmenjava plinov,
- ustrezna hidratacija in odstranjevanje nekroze, fibrinskih ostankov,

- ustrezna adhezija na rano, oprijem na nepoškodovano kožo in neoprijem na površino rane,
- manj pogosto in neboleče prevezovanje,
- netoksične in nealergene
- in cenovno sprejemljive [7, 13, 18, 19].

NV kot obloge za rane so postala zanimiva v tkivnem inženirstvu predvsem zaradi velike površine, visoke poroznosti, kontroliranih mehanskih lastnosti ter zmožnosti interakcij s celicami na način, ki posnema naraven ECM [20]. Kolagenska, elastinska in keratinska vlakna ECM zagotavljajo biološko in fizikalno podporo za pritrjevanje celic, proliferacijo, migracijo in diferenciacijo. Polimerna NV lahko uspešno nadomestijo vlogo ECM, saj oponašajo strukturne lastnosti ECM [9].

Polimerna NV so primerna za umetne tkivne nadomestke zaradi širokega nabora biokompatibilnih polimerov. Razni biorazgradljivi polimeri izkazujejo različne mehanske lastnosti, stopnjo razgradnje in tako omogočajo zanje značilne interakcije celic-nanovlakno. Pomembna lastnost je ta, da lahko izdelamo vlakna v celoti iz biofunkcionalnega polimera, ki je fiziološko prisoten v ECM in vanj vgradimo ZU med procesom izdelave NV ali pa NV kasneje obložimo z ZU.

Za celjenje ran so na razpolago različne obloge za rane. Izbira same obloge igra pomembno vlogo pri celjenju rane. Konvencionalno zdravljenje ran temelji na uporabi različnih mazilih, lokalnih antimikrobnih učinkovinah ter sterilnih obvezah. Polimerna NV nakazujejo nov pristop k celjenju ran, saj jih lahko uporabimo kot dostavni sistem za različne učinkovine, obenem pa se NV lahko obnašajo kot biorazgradljiva gaza [21]. Obloge za rane iz NV, ki jih izdelamo z elektrostatskim sukanjem imajo posebne značilnosti v primerjavi z oblogami, proizvedenimi na konvencionalne načine. Te lastnosti, ki vplivajo na posamezne faze celjenja so:

- Hemostaza: obloge iz NV zaradi poroznosti in velike aktivne površine lahko pospešijo fazo hemostaze, kar je posledica same strukture NV brez kakršnegakoli hemostatskega dejavnika/učinkovine [1, 9, 18].
- Absorpcija: zaradi velikega razmerja med površino in volumnom lahko NV absorbirajo do približno 100 % več vode v primerjavi z znanimi oblogami [1, 18].

- Polprepustnost: porozna struktura NV je odlična za izmenjavo plinov, ki pa ne dovoljuje, da bi se rana posušila, torej zagotavlja zaščito pred bakterijami in dehidracijo rane [1, 18].
- Tri-dimenzionalna zgradba NV: obloge, ki so narejene iz ultra tankih vlaken, lahko zagotovijo odlično prilagajanje, kar se odraža v boljši pokrivnosti in zaščiti rane pred infekcijami [1, 9, 18].
- Funkcionalne možnosti: multifunkcionalne bioaktivne obloge iz NV so hitro pripravljene zaradi možnosti vključevanja ZU med elektrostatskim sukanjem. Glede na vrsto rane in glede na željen učinek lahko vgrajujemo različne ZU, kot so antiseptiki, protimikrobne učinkovine, vazodilatatorji, rastni faktorji in celo celice. Pripravimo lahko oblogo z več plastmi z različnimi ZU, kar zmanjša pogostost menjavanja oblog in posledično zmanjša možnosti za poškodbe novonastalega tkiva [1, 18].
- Nebrazgotinjenje: zaradi posnemanja ECM imajo NV dobro celično prevodnost in lahko izboljšajo prehajanje krvi in drugih tkivnih tekočin, kar olajša celjenje in regeneracijo tkiva [1, 18].

Trenutna prizadevanja za uporabo polimernih membran iz NV kot medicinske obloge so še v razvojni fazi. Problem je zadostna poroznost in mehanska trdnost, ki sta potrebni za neovirano rast celic in rokovanje z NV. Kljub temu imajo produkti elektrostatskega sukanja večino zahtevanih lastnosti, saj zaradi njihove mikro in nanofibrilarne strukture zagotavljajo oblogo z željenimi lastnostmi.



## 2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je izdelati kompoziten nanodostavni sistem, sestavljen iz polimernih NV z vgrajenimi SLN z RSV, s ciljem zagotoviti podaljšano sproščanje RSV iz NV. Tak dostavni sistem bi se potencialno lahko uporabljal za zdravljenje kroničnih ran. Pri kroničnih ranah pride do povečane tvorbe reaktivnih zvrsti, ki poleg ostalih dejavnikov preprečujejo celjenje, zato bi lahko z dodatkom RSV pripomogli k njihovem zmanjševanju in s tem k uspešnejšemu celjenju. K temu pripomore že sam dostavni sistem, saj NV s posnemanjem strukturnih elementov ECM spodbujajo celično rast in obnovo tkiv, prav tako pa tudi RSV s svojim antioksidativnim delovanjem.

Prvi cilj naloge bo izdelati različne SLN brez in z RSV s tehnologijo dispergiranja taline lipida z rotor-stator homogenizatorjem. Nadalje bomo določili fizikalne lastnosti (velikost, polidisperzni indeks ter zeta potencial) izdelanih SLN, z namenom ugotoviti katera receptura, bi bila najprimernejša za vgradnjo RSV.

Drugi cilj naloge bo v SLN vgraditi RSV, preveriti vpliv masnega deleža RSV na fizikalne lastnosti nastalih SLN ter učinkovitost vgrajevanja RSV. Nato pa z dializno metodo določiti profil sproščanja vzorcem SLN-RSV, ki bodo izkazovali najboljše lastnosti.

Tretji cilj naloge bo izdelava polimernih NV z vgrajenim RSV z metodo elektrostatskega sukanja, pri čemer bomo poskusili vgraditi čim večjo količino samega ali vgrajenega v SLN. Kot osnovni polimer za izdelavo NV bomo izbrali biokompatibilni polimer, polivinil alkohol (PVA). RSV bomo vgrajevali v NV bodisi z dodatkom samega RSV, bodisi z dodatkom RSV, vgrajenega v SLN v polimerno raztopino. S spreminjanjem procesnih in okoljskih parametrov bomo izdelali NV z RSV in z vgrajenimi SLN-RSV ter jih ovrednotili in primerjali na osnovi SEM posnetkov. Izdelati želimo NV brez zadebelitev in vozlov na površini. Da bomo lahko ocenili, koliko RSV se vgradi v NV in kako hitro se RSV sprošča iz NV, bomo izvedli preizkuse vgrajevanja in sproščanja. Zanima nas predvsem razlika v profilih sproščanja med enostavnim in kompozitnim dostavnim sistemom (enostaven dostavni sistem predstavljajo NV-RSV, kompoziten dostavni sistem pa NV-SLN-RSV). Na ta način bomo proučili prednosti vgrajevanja RSV in SLN-RSV v NV z metodo elektrostatskega sukanja.

## **3 EKSPERIMENTALNI DEL**

### **3.1 MATERIALI**

#### ***3.1.1 KOMPONENTE ZA IZDELAVO TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV***

- Dynasan ®114 (Sasol, Nemčija)
- Compritol ® 888 ATO (Gattefosse, Francija)
- Phospholipon ® 90H (Rhône-Poulenc Rorer, Köln, Nemčija)
- Phospholipon ® 80H (Rhône-Poulenc Rorer, Köln, Nemčija)
- Phospholipon ® 80 (Rhône-Poulenc Rorer, Köln, Nemčija)
- Tween® 80 (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Tween® 60 (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Lutrol® F68 (Ludwigshofen, Nemčija)
- Resveratrol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Prečiščena voda (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Slovenija)
- Etanol 96% (Pharmachem, Slovenija)

#### ***3.1.2 KOMPONENTE ZA IZDELAVO POLIMERNIH NANOVLAKEN***

- Mowiol® 20-98 (PVA, M=125000 g/mol) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Triton® X-100 (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Prečiščena voda (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Slovenija)

#### ***3.1.3 REAGENTI IN TOPILA***

- Etanol 96% (Pharmachem, Slovenija)
- Metanol (Merck, Nemčija)
- Prečiščena voda (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Slovenija)
- Sestavine za izdelavo fosfatnega pufru s pH 7,4 (PBS pufer): NaCl (Merck, Nemčija), KCl (Merck, Nemčija), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (Merck, Nemčija), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Nemčija), HCl (Merck, Nemčija), NaOH (Merck, Nemčija)

### 3.2 NAPRAVE

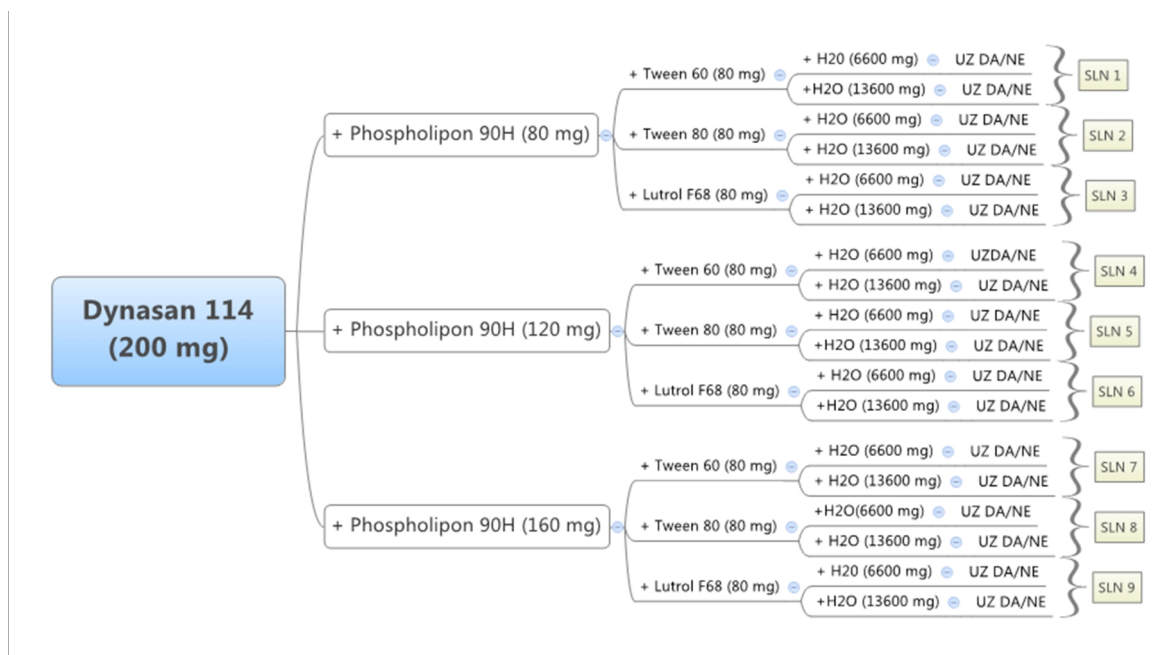
- Precizna tehtnica XS 205 (Mettler Toledo, ZDA)
- Tehtnica AJ – 1200CE (Tehtnica, Slovenija)
- Rotor-stator homogenizator, Labtek homogenizer (OMNI international, ZDA)
- Homogenizator Ultra Turrax T25 (IKA<sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG/ Nemčija)
- Zetasizer nano (Malvern UK)
- Ultrazvočna sonda (Sonics<sup>®</sup>, Model CV33, ZDA)
- Ultrazvočna kadička (Sonis 2, Iskra pio)
- Centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Slovenija)
- Magnetno mešalo in grelnik IKA RTC basic (IKA<sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG/ Nemčija)
- Magnetno mešalo in grelnik Rotamix 560 MMH (Tehtnica, Slovenija)
- Mešalne plošče (IKA<sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG/ Nemčija, RO-15P)
- pH meter-SevenCompact (Mettler Toledo, ZDA)
- Aparatura za elektrostatsko sukanje
  - Generator visoke napetosti (HVG-P60-R-EU, Linari Engineering, Italija)
  - Črpalka (R-99E, RazelTM, Italija)
  - Kovinska igla z nortanjim premerom 0,8 mm (Linari Engoneering, Italija)
  - Plastična brizga, 20 mL (B-Braun, ZDA)
  - Planarno kovinsko zbiralo
- Komora za elektrostatsko sukanje
- Silikagel
- Precizen merilec vlage (Ebro, THF620)
- SEM (Supra 35 VP, Carl Zeiss, Nemčija)
- Čitalec mikrotitrskih ploščic Safire<sup>™</sup> (Tecan, Švica)
- Plošče s 96 vdolbinami (TPP, Švica)
- Stresalnik Vibromix 403EVT (Tehtnica, Slovenija)

### 3.3 IZDELAVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

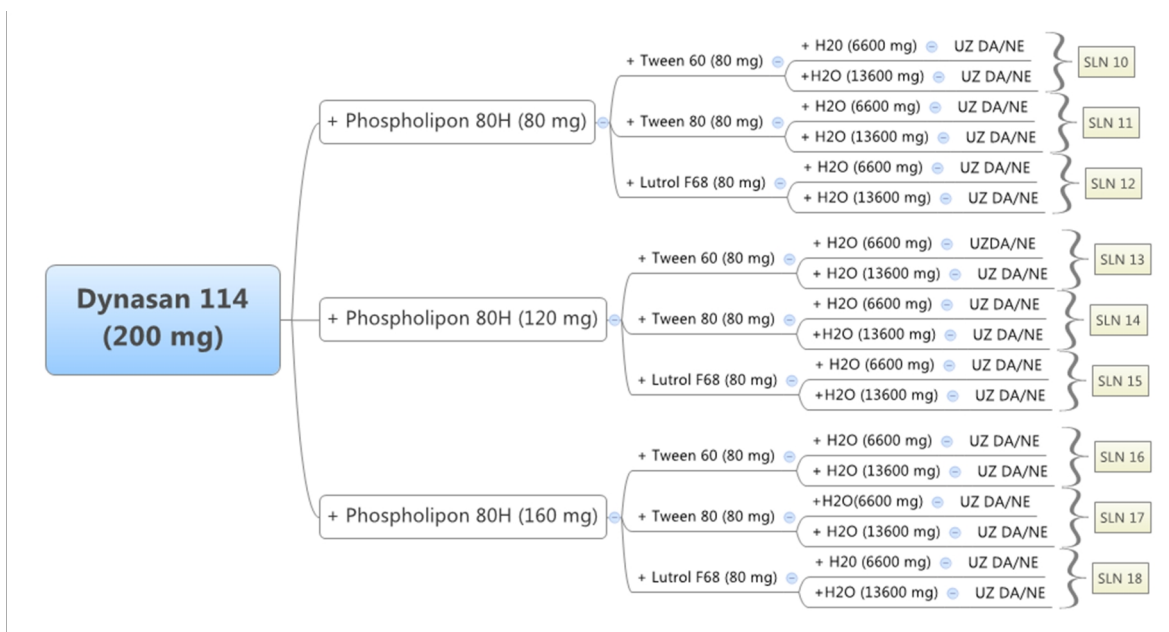
SLN smo izdelali z dispergiranjem taline lipida z rotor-stator homogenizatorjem. Izdelali smo SLN z različnimi komponentami in z različnimi deleži nekaterih komponent. Spreminjali smo masni delež fosfolipida in vode, medtem ko sta bila masna deleža lipida

in PAS konstantna. Recepture so prikazane na slikah od 3 do 10. Pogoje homogenizacije in hlajenja smo imeli vedno enake, temperaturo taljenja lipida in fosfolipida pa smo spreminjali glede na uporabljen lipid. Za vsak vzorec smo preverili vpliv ultrazvoka na fizikalne lastnosti izdelanih SLN.

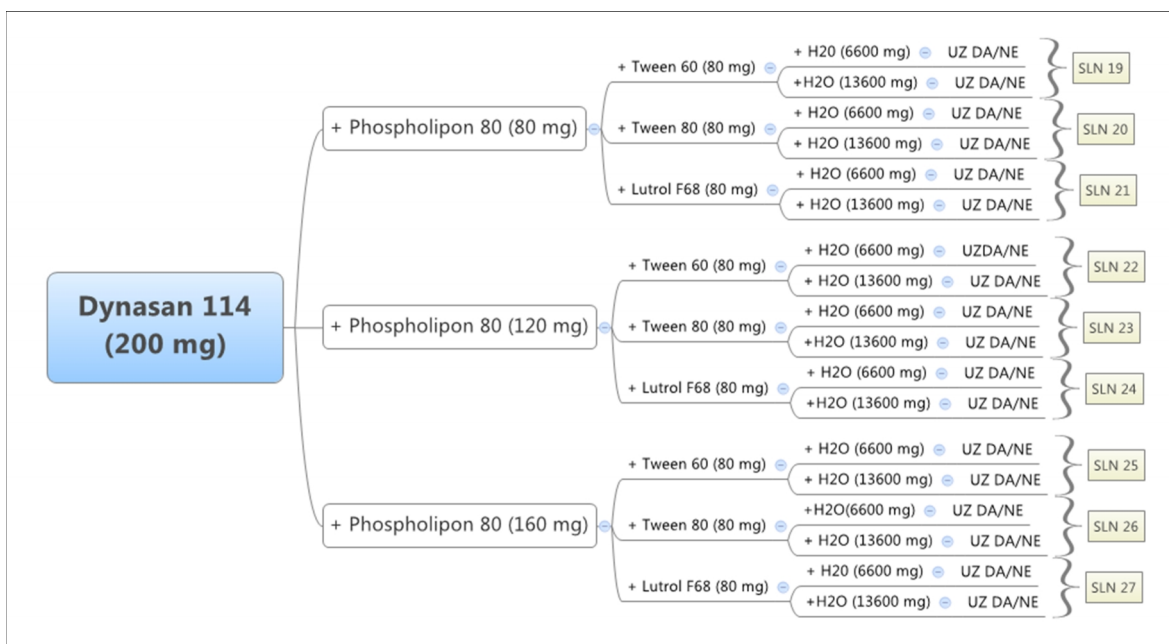
Testirali smo dva lipida (Dynasan® 114, Compritol® 888 ATO), tri fosfolipide (Phospholipon® 90H, Phospholipon® 80H, Phospholipon® 80,) in tri PAS (Tween® 60, Tween® 80, Lutrol® F68).



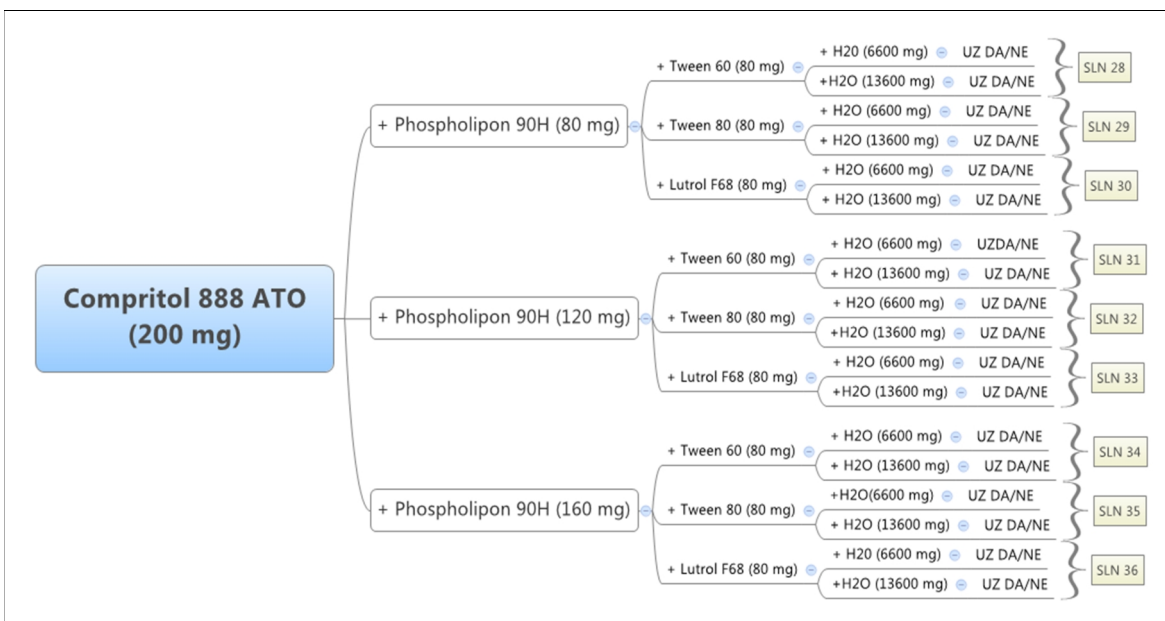
**Slika 3:** Sestava receptur z Dynasanom 114 z različnimi masnimi deleži Phospholipona 90H in kombinacije z vsemi PAS (Tween 60, Tween 80, Lutrol F68). H<sub>2</sub>O – prečiščena voda, UZ – ultrazvok.



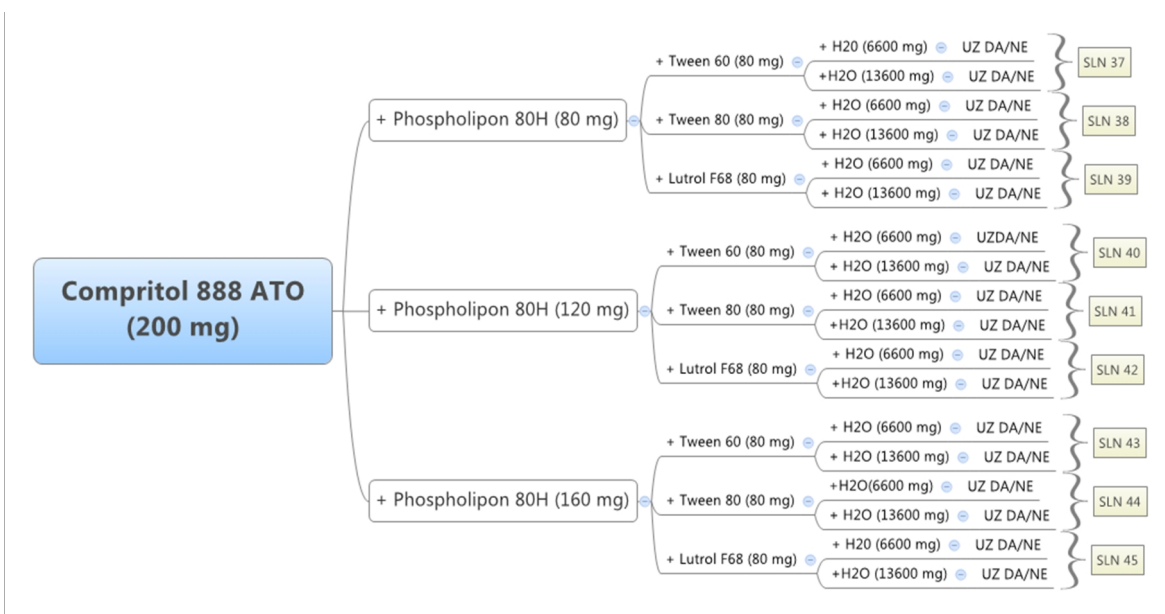
**Slika 4:** Sestava receptur z Dynasanom 114 z različnimi masnimi deleži Phospholipona 80H in kombinacije z vsemi PAS (Tween 60, Tween 80, Lutrol F68). H<sub>2</sub>O – prečiščena voda, UZ – ultrazvok.



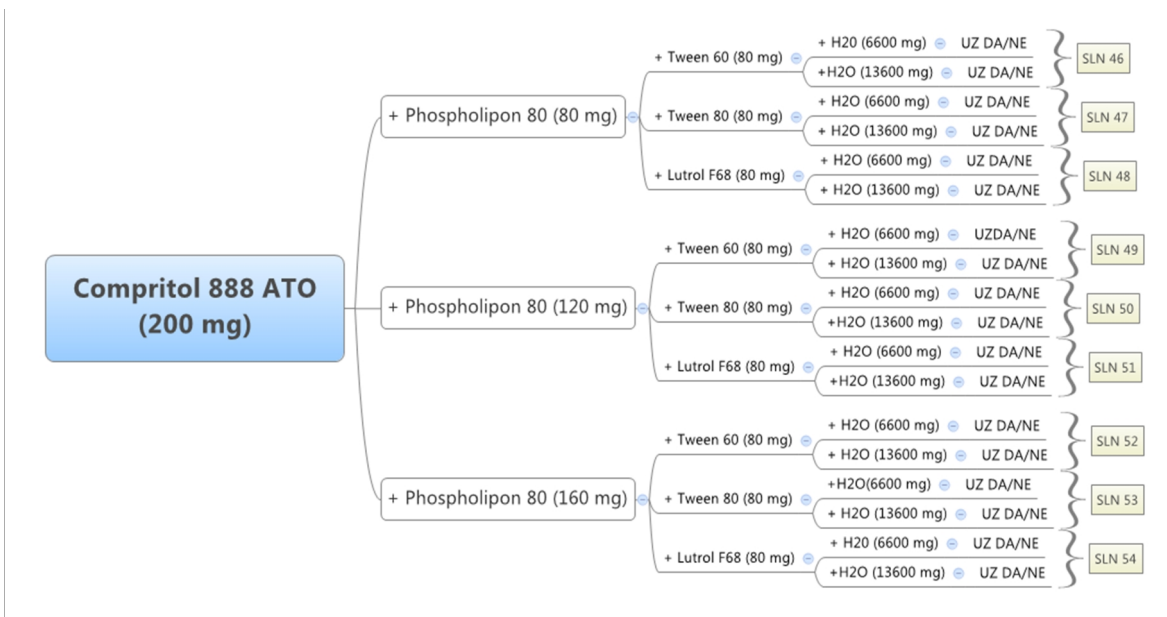
**Slika 5:** Sestava receptur z Dynasanom 114 z različnimi masnimi deleži Phospholipona 80 in kombinacije z vsemi PAS (Tween 60, Tween 80, Lutrol F68). H<sub>2</sub>O – prečiščena voda, UZ – ultrazvok.



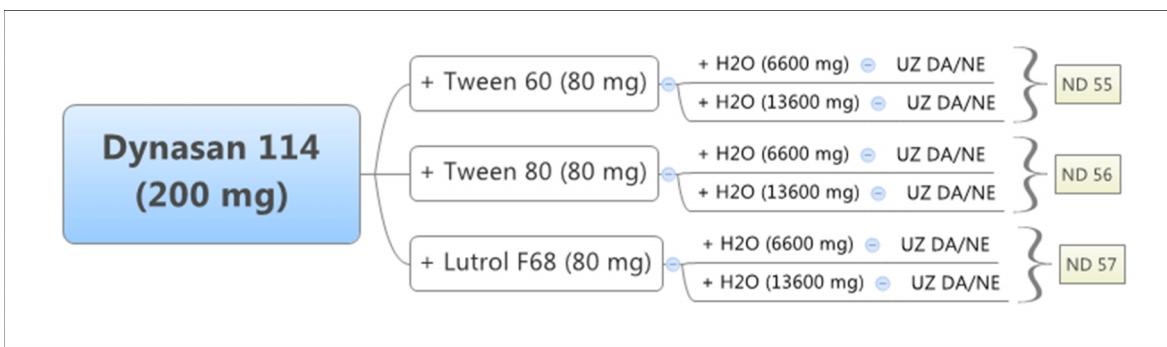
**Slika 6:** Sestava receptur z Compritolom 888 ATO z različnimi masnimi deleži Phospholipona 90H in kombinacije z vsemi PAS (Tween 60, Tween 80, Lutrol F68). H<sub>2</sub>O – prečiščena voda, UZ – ultrazvok.



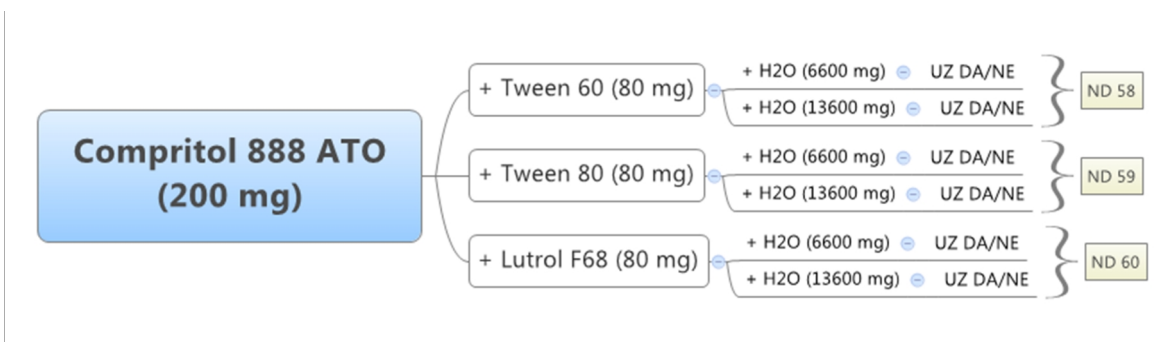
**Slika 7:** Sestava receptur z Compritolom 888 ATO z različnimi masnimi deleži Phospholipona 80H in kombinacije z vsemi PAS (Tween 60, Tween 80, Lutrol F68). H<sub>2</sub>O – prečiščena voda, UZ – ultrazvok.



**Slika 8:** Sestava receptur z Compritolom 888 ATO z različnimi masnimi deleži Phospholipona 80 in kombinacije z vsemi PAS (Tween 60, Tween 80, Lutrol F68). H<sub>2</sub>O – prečiščena voda, UZ – ultrazvok.



**Slika 9:** Sestava receptur z Dynasanom 114 s kombinacijo različnih PAS (Tween 60, Tween 80, Lutrol F68) (brez fosfolipida). H<sub>2</sub>O – prečiščena voda, UZ – ultrazvok.



**Slika 10:** Sestava receptur z Compritolom 888 ATO s kombinacijo različnih PAS (Tween 60, Tween 80, Lutrol F68) (brez fosfolipida). H<sub>2</sub>O – prečiščena voda, UZ – ultrazvok.

Na precizni tehnici smo natehtali komponente za izdelavo disperzije SLN. V epruveti smo združili lipidne komponente (lipid, fosfolipid). Lipidne komponente smo talili na vodni kopeli, katere temperatura je bila za približno 10 °C višja od temperature tališča uporabljenega lipida. V 15 mL centrifugirko smo natehtali PAS in jo raztopili v prečiščeni vodi na vodni kopeli. Tako pripravljeno talino in raztopino smo segreli na vodni kopeli na enako temperaturo, ju združili in homogenizirali z rotor-stator homogenizatorjem 10 min pri 20000 vrtljajih/min. Nastalo disperzijo smo prelili v centrifugirko in za 10 min postavili v zamrzovalnik, da se disperzija ohladi. Pri tem lipidne kapljice otrdijo in nastanejo SLN. Vzoredno smo izdelali vzorce, katere smo izpostavili ultrazvočni sondi pri pogojih: amplituda 30 %, čas 30 s, sobna temperatura, pulziranje 1 s ON, 1 s OFF, da smo preverili vpliv ultrazvoka na fizikalne lastnosti SLN. Nastale SLN smo ovrednotili tako, da smo jim izmerili velikost, polidisperzni indeks (PDI) in zeta potencial (ZP).

SLN z ZU smo izdelali po enakem postopku kot SLN brez ZU s to razliko, da smo dodali RSV v dveh oblikah, v obliki prahu ali raztopljenega v etanolu. V primeru, ko smo RSV dodali v obliki prahu, smo ga dodali v epruveto k lipidnim komponentam. RSV se nam tako dispergira v talini lipidov ( $T_T(\text{RSV}) = 260\text{ °C}$ ) in nato združili s segreto vodono fazo tik pred homogenizacijo. V primeru RSV raztopljenega v etanolni raztopini pa smo RSV dodali k lipidnim komponentam po končanem taljenju lipidov in takoj zatem združili z vodno fazo ter homogenizirali.

### **3.4 VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV**

#### ***3.4.1 MERJENJE VELIKOSTI, POLIDISPERZNEGA INDEKSA IN ZETA POTENCIALA IZDELANIM SLN***

Z ustrezno karakterizacijo SLN v disperziji preverimo kakovost produkta. S fotonsko korelacijsko spektroskopijo (PCS) na napravi Zetasizer nano izdelanim SLN določimo velikost in polidisperzni indeks (PDI). Z lasersko Dopplerjevo elektroforezo na napravi Zetasizer nano pa preverimo naboj na delcih, ZP.

Vzorec za merjenje velikosti in PDI smo pripravili tako, da smo izdelano disperzijo SLN redčili s prečiščeno vodo v razmerju 1:1, premešali in napolnili v kiveto, ki smo jo nato vstavili v aparaturo. Pogoji pri katerih smo izvajali meritve velikosti SLN in PDI so bili:

- Temperatura: 25°C
- Kot merjenja: 133°
- Viskoznost disperznega medija (voda): 0,890 mPa.s



- $\lambda$  laserske svetlobe (He-Ne laser): 633 nm
- Lomni količnik medija: 1,330

Vzorec za merjenje ZP smo pripravili tako, da smo disperzijo SLN redčili s prečiščeno vodo v razmerju 1:6. Tako pripravljeno disperzijo smo s pomočjo brizge polnili v posebno kiveto z elektrodami. Pri polnjenju te kivete smo bili pozorni, da v njej ni bilo zračnih mehurčkov in da so bile elektrode ob strani kivete suhe, kar bi lahko vplivalo na pravilnost meritve.

Pogoji pri katerih smo izvajali meritve ZP so bili:

- Temperatura: 25°C
- Kot merjenja: 173°
- Viskoznost disperznega medija (voda): 0,890 mPa.s
- Dielektrična konstanta disperznega medija: 79,0

### **3.4.2 DOLOČANJE RESVERATROLA**

Kot analizno metodo za določanje koncentracije RSV smo uporabili UV-VIS spektrofotometrijo. Zaradi omejene količine vzorca smo meritve izvajali na čitalcu mikrotitrskih ploščic Safire™ z uporabo plošč z 96 vdolbinami. Pripravili smo umeritvene krivulje v metanolu in PBS pufru (Sliki v prilogi, P1 in P2). Absorbanco RSV smo merili pri 306 nm, kjer ima RSV absorpcijski maksimum [15, 22]. Umeritveni krivulji nam podata povezavo med absorbanco in koncentracijo RSV v vzorcu, na osnovi katerih smo izračunali koncentracije RSV v preizkovanih vzorcih.

### **3.4.3 DOLOČANJE UČINKOVITOSTI VGRAJEVANJA RSV V SLN**

Učinkovitost vgrajevanja RSV v SLN smo določili tako, da smo SLN-RSV raztopili v metanolu, v katerem sta lipid in RSV dobro topna, na vodni kopeli ogreti na približno 85 °C. Izdelano disperzijo SLN smo centrifugirali 15 min, na 4000 vrtljajev/min, da so večji delci sedimentirali. Količino RSV smo določili v supernatantu, kjer nam ostanejo SLN in v usedlini. Usedlino in supernatant smo ločili v dve centrifugirki. Usedlini smo nato dodali 6 mL metanola, postavili na vodno kopel za 30 min, ogreto na približno 85 °C, da se je sediment raztalil. Nato smo počakali, da se disperzija ohladila na sobno temperaturo, da se lipid strdil, medtem ko je RSV ostal raztopljen v metanolu. Nastalo disperzijo smo ustrezno redčili z metanolom, da smo dobili odzive znotraj umerjenega območja.

Absorbanco smo pomerili na čitalcu mikrotitrskih ploščic. Za vsak vzorec smo naredili 3 paralelke.

Absorbanca SLN brez učinkovine je zanemarljivo majhna in je ne upoštevamo pri izračunih.

$$\begin{aligned} \text{Učinkovitost vgrajevanja } \left( \% \frac{w}{w} \right) \\ = \frac{\text{masa RSV v usedlini}}{\text{celotna količina RSV uporabljena za izdelavo SLN}} \times 100 \end{aligned}$$

#### **3.4.4 SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ SLN**

Sproščanje RSV iz SLN smo spremljali z dializno metodo z uporabo dializne membrane Spectra/Por (Thomas scientific, USA) s širino (FLAT Width (mm)) 25 mm, premerom 16 mm, volumnom/dolžino 2 mL/cm in MWCO (molecular weight cut-off) 12-14.000. Kot dializni medij smo uporabili PBS pufer. Dializne vrečke smo najprej čez noč hidratirali v dializnem mediju, nato pa vanje vbrizgali 2,5 mL pripravljene disperzije SLN, jih na koncih zapeli s sponko, potopili v čašo z dializnim medijem in postavili na magnetno mešalo (20 vrtljajev/min). Čaše smo zatesnili z parafilmom, da smo preprečili izhlapevanje medija in jih zaščitili pred svetlobo z aluminijasto folijo, saj je RSV občutljiv na svetlobo. Ob določenih časovnih točkah smo vzorčili 3 x 290 µL medija, ki smo ga nato analizirali na čitalcu mikrotitrskih ploščic. Odvzeti medij smo nadomeščali s svežim medijem. Kot dializni medij smo uporabljali PBS pufer, ki smo ga pripravili po naslednji recepturi: 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> na 1 liter destilirane vode. pH smo umerili z NaOH ali HCl na vrednost 7,4. Za vsak vzorec smo naredili 3 paralelke. Enak preskus smo izvedli z referenčnim vzorcem, to je disperzija samih SLN brez RSV.

### **3.5 IZDELAVA IN VREDNOTENJE POLIMERNIH NANOVLAKEN**

#### **3.5.1 PRIPRAVA POLIMERNE RAZTOPINE**

12 % (w/w) raztopino PVA smo pripravili z raztapljanjem PVA v prečiščeni vodi s segrevanjem na približno 90 °C in konstantnim mešanjem približno 6 ur, da se je PVA popolnoma raztopil. Nato smo raztopino PVA med konstantnim mešanjem ohladili na sobno temperaturo in dodali izhlapelo vodo.

Suspencije za elektrostatsko sukanje z RSV oz. RSV-SLN smo pripravili z različnimi (m/m) deleži RSV glede na PVA za izdelavo NV pri  $(20,0 \pm 2)$  % relativni vlažnosti (RH) ter z nižjimi (m/m) deleži RSV glede na PVA za izdelavo NV pri  $(5,5 \pm 1)$  % RH. (m/m) % RSV glede na PVA za različne suspencije so podani v preglednici I.

Suspencijo z RSV smo pripravili tako, da smo RSV dispergirali v 5 mL destilirane vode in dodali 20 g 12 % raztopine PVA, premešali na magnetnem mešalu ter homogenizirali 2 min pri 10000 vrtljajih/min na homogenizatorju Ultra turrax T25. Nastalo disperzijo smo ponovno 10 min mešali na magnetnem mešalu, da smo se znebili nastalih zračnih mehurčkov med homogenizacijo. Tik pred elektrostatskim sukanjem smo disperziji dodali še 80  $\mu$ L Tritona ter ponovno premešali na magnetnem mešalu, da smo dobili homogeno disperzijo. Suspencijo z SLN-RSV pa smo pripravili tako, da smo ustrezno količino suspencije SLN (preračunano glede na vsebnost RSV v suspenciji SLN), ki je vsebovala enak masni delež RSV glede na PVA kot suspencija z samim RSV, redčili na 5 mL s prečiščeno vodo, dodali 20 g 12 % raztopine PVA in s pripravo nadaljevali po istem postopku kot pri pripravi suspencije z RSV.

Preglednica I: Prikaz (m/m) deleža RSV v suspenciji za elektrostatsko sukanje.

	(m/m) % RSV glede na PVA v suspenciji za elektrostatsko sukanje		
Relativna vlažnost	Suspencija 1	Suspencija 2	Suspencija 3
$(20,0 \pm 2)$ %	0,24	0,47	0,94
$(5,5 \pm 1)$ %	0,09	0,26	0,43

### 3.5.2 IZDELAVA POLIMERNIH NANOVLAKEN

Polimerno suspencijo za elektrostatsko sukanje smo napolnili v 20 mL brizgo, nanjo namestili kovinsko iglo in jo vpeli v črpalko, ki nam zagotavlja stalen pretok. Konico igle smo priklopili na visoko napetost, ki jo je proizvajal generator visoke napetosti. Kot zbiralo smo uporabili ravno kovinsko stojalo, prevlečeno z aluminijasto folijo. Celoten proces elektrostatskega sukanja smo izvajali v zrakotesni komori, v kateri smo lahko nadzorovali RH. Nadzorovani procesni dejavniki pri izdelavi NV so bili: razdalja med konico igle in zbiralom, premer kovinske igle, hitrost pretoka polimerne suspencije in napetost. Nadzorovana parametra okolja sta bila RH in temperatura zraka. Premer kovinske igle in razdalja med konico igle ter zbiralom sta bila vedno enaka in sicer premer

igle 0,8 mm in razdalja 15 cm. V komori za elektrostatsko sukanje smo s pomočjo suhega silikagela vzdrževali določeno RH ( $5,5 \pm 1$  oz.  $20,0 \pm 2$ ) % in temperaturo ( $26 \pm 2$ ) °C. Komoro smo opremili z ventilatorjem, s pomočjo katerega smo hitreje zagotovili bolj homogeno ozračje. Pretok polimerne disperzije in napetost smo prilagajali vrsti vzorcev, za katere smo predhodno optimirali pogoje elektrostatskega sukanja. Nastala NV smo shranjevali pri sobni temperaturi, zaščitena pred svetlobo.

### **3.5.3 STABILIZACIJA POLIMERNIH NANOVLAKEN**

Polimerna NV smo stabilizirali s fizikalno metodo, z namakanjem v netopilu. NV smo 12 ur namakali v metanolu, nato smo metanol odstranili in pustili, da so se NV na sobni temperaturi in zaščitena pred svetlobo čez noč posušila.

### **3.5.4 VREDNOTENJE POLIMERNIH NANOVLAKEN**

#### **3.5.4.1 MORFOLOGIJA**

Morfologijo izdelanih NV smo ovrednotili s SEM (*scanning electron microscopy*). Vzorce NV, zbrane na aluminijasti foliji smo z dvostranskim prevodnim trakom prilepili na kovinske nosilce. Slike vzorcev smo posneli pri pospeševalni napetosti 1 kV z uporabo sekundarnega detektorja. Povprečni premer NV smo določili s programom ImageJ tako, da smo izmerili premer 30-im naključno izbranim NV na posameznem vzorcu.

#### **3.5.4.2 UČINKOVITOST VGRAJEVANJA RSV V POLIMERNA NANOVLAKNA**

Učinkovitost vgrajevanja RSV v NV (NV-RSV) oz. NV-SLN-RSV smo določili s pomočjo raztapljanja stabiliziranih NV v PBS pufri na vodni kopeli. Vzorce smo pripravili tako, da smo v 15 mL centrifugirke zatehtali znano maso NV in dodali 6 mL PBS pufra, jih postavili na vodno kopel pri približno 85 °C za 30 min, da so se NV raztopila. Nastalo disperzijo smo ohladili na sobno temperaturo in jo centrifugirali 15 min pri 4000 vrtljajih/min. Supernatant smo analizirali na čitalcu mikrotitrskih ploščic in s pomočjo umeritvene krivulje izračunali vsebnost RSV. Pred merjenjem absorbanc smo vzorce še ustrezno redčili s PBS pufrom, da so bili odzivi znotraj umerjenega območja. Za referenčna vzorca so služila NV in NV-SLN brez RSV. To absorbenco upoštevamo pri izračunih tako, da od absorbance vzorcev odštejemo absorbenco praznih NV oz. NV-SLN.

$$\text{Učinkovitost vgrajevanja } \left( \% \frac{w}{w} \right) = \frac{\text{masa RSV v NV}}{\text{teoretična masa RSV v NV}} \times 100$$

*Teoretična masa RSV v izdelanih NV (mg)*

$$= \text{masa NV} \times \text{masni delež RSV glede na maso suhega polimera}$$

#### 3.5.4.3 SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ POLIMERNIH NANOVLAKEN

Sproščanje RSV iz NV-RSV oz. iz NV-SLN-RSV smo spremljali spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 306 nm v mediju. Da bi posnemali fiziološke pogoje, smo uporabili PBS pufer z pH 7,4. Vzorce smo pripravili tako, da smo v čaše zatehtali znano maso stabiliziranih NV in s polnilno pipeto dodali 5 mL PBS pufru. Čaše smo zatesnili z parafilmom, da smo preprečili izhlapevanje medija in jih ovili v aluminijasto folijo za zaščito RSV pred svetlobo. Tako pripravljene čaše smo postavili na stresalnik Vibromix 403EVT s hitrostjo stresanja 100 rpm. Ob določenih časovnih točkah smo vzorčili 3 x 290 µL in vzorce analizirali na čitalcu mikrotitrskih ploščic. Odvzet medij smo nadomeščali s svežim medijem. Poizkus sproščanja smo izvajali v treh paralelkah.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 FIZIKALNE LASTNOSTI TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Pri načrtovanju SLN je potrebno ugotoviti vrsto in razmerje komponent, ki naj sestavljajo nosilni sistem in določiti optimalne procesne dejavnike (temperaturo taljenja komponent, čas in hitrost homogenizacije, temperaturo ohlajanja), da dobimo SLN z ustreznimi fizikalnimi lastnostmi. V magistrski nalogi smo izdelali SLN s postopkom dispergiranja taline lipida z rotor-stator homogenizatorjem in se usmerili predvsem na vrsto izbranih komponent in njihova razmerja. Naš prvi cilj je bil izdelati čim manjše SLN, z nizkim PDI in visoko absolutno vrednostjo ZP, ki bi jih kasneje uporabili kot nosilni sistem za RSV. Testirali smo dva lipida, Dynasan 114, Compritol 888 ATO, tri fosfolipide, Phospholipon 90H, Phospholipon 80H in Phospholipon 80, ter tri PAS, Tween 80, Tween 60 in Lutrol F68. Izmerjene velikosti, PDI ter ZP izdelanih SLN so prikazne v preglednica II.

Preglednica II: Fizikalne lastnosti izdelanih SLN po različnih recepturah (na slikah 3-10), glede na sestavo komponent, volumna medija za dispergiranje in uporabo UZ oz. ne. Z rdečo barvo so označeni SLN z najboljšimi fizikalnimi lastnostmi.

Vrsta SLN	Volumen medija za dispergiranje [mg]	Uporaba ultrazvoka	Velikost [nm]	PDI	Zeta Potencial [mV]
SLN 1	6600	-	281,1	1,000	-7,80
	6600	+	358,5	0,958	-17,20
	13600	-	1000,0	1,000	-17,30
	13600	+	533,3	1,000	-22,60
SLN 2	6600	-	640,3	1,000	-13,10
	6600	+	447,6	0,531	-13,70
	13600	-	3989,0	0,709	-6,95
	13600	+	913,0	1,000	-15,00
SLN 3	6600	-	3689,0	1,000	-0,74
	6600	+	2938,0	1,000	-0,57
	13600	-	3039,0	1,000	-1,70
	13600	+	3001,0	0,604	-0,60
SLN 4	6600	-	254,5	0,857	-11,00
	6600	+	254,7	0,839	-9,57
	13600	-	1412,0	1,000	-21,00
	13600	+	575,6	1,000	-21,50

SLN 5	6600	-	657,2	0,964	-10,20
	6600	+	657,5	1,000	-11,40
	13600	-	6835,0	0,684	-4,10
	13600	+	2071,0	0,841	-5,83
SLN 6	6600	-	1898,0	1,000	-0,23
	6600	+	3023,0	1,000	-0,19
	13600	-	4138,0	1,000	-1,50
	13600	+	3511,0	1,000	-0,11
SLN 7	6600	-	1635,0	1,000	-13,80
	6600	+	1586,0	1,000	-13,60
	13600	-	1082,0	1,000	-20,30
	13600	+	848,5	1,000	-13,70
SLN 8	6600	-	559,1	1,000	-1,17
	6600	+	566,2	1,000	-5,52
	13600	-	1033,0	1,000	-1,43
	13600	+	478,0	0,924	-3,33
SLN 9	6600	-	3771,0	1,000	-0,78
	6600	+	3418,0	1,000	-0,02
	13600	-	5876,0	1,683	-0,09
	13600	+	4626,0	1,760	-0,69
SLN10	6600	-	556,0	1,000	-24,40
	6600	+	647,9	1,000	-20,10
	13600	-	330,9	0,731	-21,00
	13600	+	347,6	0,496	-28,30
SLN 11	6600	-	334,8	0,763	-36,90
	6600	+	376,9	0,726	-43,20
	13600	-	776,7	0,937	-39,50
	13600	+	765,4	0,909	-39,30
SLN 12	6600	-	351,3	0,470	-3,82
	6600	+	577,9	0,513	-3,96
	13600	-	552,8	0,945	-8,92
	13600	+	506,9	0,531	-37,60
SLN 13	6600	-	113,5	0,310	-29,46
	6600	+	237,8	0,316	-31,90
	13600	-	711,4	0,934	-41,00
	13600	+	936,4	1,000	-44,40
SLN 14	6600	-	440,7	0,929	-40,20
	6600	+	427,5	0,871	-43,60
	13600	-	346,6	0,753	-52,90
	13600	+	459,8	0,682	-41,70
SLN 15	6600	-	300,2	1,456	-6,58

	6600	+	439,0	1,478	-11,30
	13600	-	1162,0	1,865	-14,20
	13600	+	878,5	1,808	-46,90
SLN 16	6600	-	392,0	0,802	-43,10
	6600	+	481,0	0,844	-44,40
	13600	-	672,3	0,880	-43,50
	13600	+	392,0	0,802	-43,10
SLN 17	6600	-	952,7	0,942	-44,00
	6600	+	987,9	0,811	-45,30
	13600	-	1246,0	1,000	-43,00
	13600	+	789,5	0,907	-42,40
SLN 18	6600	-	861,1	1,876	-32,30
	6600	+	800,9	1,959	-34,00
	13600	-	751,2	1,000	-34,20
	13600	+	575,8	1,742	-43,40
SLN 21	6600	-	549,7	0,939	-57,50
	6600	+	612,0	0,923	-47,40
	13600	-	1898,0	1,000	-65,00
	13600	+	1304,0	1,000	-50,40
SLN 24	6600	-	1035,0	1,000	-48,30
	6600	+	1130,0	1,000	-43,80
	13600	-	519,2	0,889	-74,30
	13600	+	379,0	0,499	-62,90
SLN 27	6600	-	1330,0	1,918	-60,50
	6600	+	1063,0	1,885	-53,40
	13600	-	646,3	0,860	-73,40
	13600	+	451,2	0,500	-66,40
SLN 30	6600	-	443,1	1,439	-17,90
	6600	+	536,9	1,468	-18,20
	13600	-	907,6	1,802	-23,30
	13600	+	400,7	1,745	-26,50
SLN 33	6600	-	528,7	1,541	-12,50
	6600	+	488,9	1,475	-13,30
	13600	-	789,7	1,954	-21,80
	13600	+	635,4	1,565	-21,50
SLN 36	6600	-	623,7	1,535	-8,55
	6600	+	586,7	1,468	-13,60
	13600	-	1760,0	1,596	-8,67
	13600	+	958,3	1,515	-13,60
SLN 39	6600	-	443,1	1,439	-17,90
	6600	+	536,9	1,468	-18,20



	13600	-	907,6	1,802	-23,30
	13600	+	400,7	1,745	-26,50
SLN 42	6600	-	528,7	1,541	-12,50
	6600	+	488,9	1,475	-13,30
	13600	-	789,7	1,954	-21,80
	13600	+	635,4	1,565	-21,50
SLN 45	6600	-	623,7	1,535	-8,55
	6600	+	586,7	1,468	-13,60
	13600	-	1760,0	1,596	-8,67
	13600	+	958,3	1,515	-13,60
SLN 48	6600	-	443,1	1,439	-17,90
	6600	+	536,9	1,468	-18,20
	13600	-	907,6	1,802	-23,30
	13600	+	400,7	1,745	-26,50
SLN 51	6600	-	528,7	1,541	-12,50
	6600	+	488,9	1,475	-13,30
	13600	-	789,7	1,954	-21,80
	13600	+	635,4	1,565	-21,50
SLN 54	6600	-	623,7	1,535	-8,55
	6600	+	586,7	1,468	-13,60
	13600	-	1760,0	1,596	-8,67
	13600	+	958,3	1,515	-13,60
SLN 55	6600	-	443,1	1,439	-17,90
	6600	+	536,9	1,468	-18,20
	13600	-	907,6	1,802	-23,30
	13600	+	400,7	1,745	-26,50
SLN 56	6600	-	528,7	1,541	-12,50
	6600	+	488,9	1,475	-13,30
	13600	-	789,7	1,954	-21,80
	13600	+	635,4	1,565	-21,50
SLN 57	6600	-	623,7	1,535	-8,55
	6600	+	443,1	1,439	-17,90
	13600	-	536,9	1,468	-18,20
	13600	+	907,6	1,802	-23,30
SLN 60	6600	-	400,7	1,745	-26,50
	6600	+	528,7	1,541	-12,50
	13600	-	488,9	1,475	-13,30
	13600	+	789,7	1,954	-21,80

V preglednici so zbrane vrednosti velikosti, PDI ter ZP različnih receptur SLN in vpliv volumna disperznega medija ter ultrazvoka na fizikalne lastnosti SLN. +/- pod rubriko ultrazvok pomeni ali je bil vzorec tretiran z ultrazvokom ali ne.

V večini primerov dobimo delce v območju 500 nm do 1000 nm in velikim polidisperznim indeksom. Za nadaljno vgradnjo ZU so primerni čim manjši SLN in homogena disperzija (nizek PDI) ter ustrezna stabilnost (ZP nad  $\pm 30$  mV). Iz dobljenih rezultatov vidimo, da na fizikalne lastnosti SLN vplivajo tako sestavine kot tudi deleži nekaterih sestavin.

**Vpliv lipida:** Lipid tvori trdno lipidno ogrodje, (v katerega je vključena ZU ali pa je adsorbirana nanj). Testirali smo Dynasan 114, ki je triglicerid miristinske kisline in Compritol 888 ATO, ki je parcialni glicerid behenojske kisline. Če primerjamo SLN iz Compritola s SLN iz Dynasana opazimo v povprečju manjše delce pri Compritolu. Compritol vsebuje precejšnje količine mono- in di-gliceridov, ki imajo površinsko aktivne lastnosti, ki pripomorejo k nastanku manjših delcev.

**Vpliv fosfolipidov:** Fosfolipidi dajejo SLN negativen naboj in s tem elektrostatsko stabilizirajo disperzije SLN. Testirali smo Phospholipid 90H, Phospholipid 80H in Phospholipid 80. Phospholipid 80 je nehidrogeniran, Phospholipon 80H vsebuje min. 60,0 % hidrogeniranega fosfatidilholina, Phospholipon 90H pa min. 90,0 % hidrogeniranega fosfatidilholina [23-25]. Razlika v vrsti in hidrogeniranosti Phospholipona v naših primerih ne vpliva na velikost in PDI SLN. Večji vpliv na velikost SLN ima delež fosfolipida. Testirali smo 40 %, 60 % in 80 % delež fosfolipida glede na lipid. Ugotovili smo, da pri 80 % deležu fosfolipida pride v večini primerov do nastanka večjih delcev, medtem ko pa pri 40 % in 60% deležu fosfolipida ni konstantnih rezultatov. Sklepamo, da na velikost vpliva kombinacija sestavin. Pri nižjih koncentracijah fosfolipida se la ta močno veže na površino delcev, medtem ko pride pri prevladovanju fosfolipida do tvorbe liposomov, ali večplastnega nalaganja fosfolipida na površino delcev, kar se kaže v povečanju velikosti SLN in večji heterogenosti vzorca (višji PDI) [26]. Rezultati ZP kažejo, da ima Phospholipon 90H najmanjši doprinos k negativnemu naboju delcev (SLN 3, 6, 9 in SLN 30, 33, 36) Phospholipon 80 pa največji (SLN 21, 24, 27). Prav tako višji deleži Phospholipona 90H ne vplivajo na ZP, medtem ko višji deleži Phospholipona 80H in 80 pri recepturah z obema testiranima lipidoma nekoliko zvišajo ZP izdelanih SLN.

**Vpliv PAS:** Testirali smo Tween 60, Tween 80 in Lutrol F68. Vse tri uvrščamo med neionogene PAS. Iz primerjave receptur z enako sestavo glede na lipid, fosfolipid in

različnimi PAS lahko povzamemo, da izbira PAS vpliva na velikost delcev in sicer kombinacija s Tweeni vodi do nastanka manjših delcev v primerjavi z Lutrolom F68. PAS imajo vlogo steričnega stabilizatorja pri izdelavi SLN, ker mehansko preprečujejo združevanje delcev. Molekule PAS se s hidrofobnim delom adsorbirajo na površino SLN, s hidrofilnim delom pa so usmerjene v medij in tako preprečijo združevanje delcev. Visoke koncentracije PAS zmanjšajo površinsko energijo in olajšajo porazdelitev delcev med homogenizacijo. Zmanjšanje velikosti delcev je povezano z velikim povečanjem površine delcev. Molekule PAS morajo hitro pokriti novonastale površine delcev. Presežne molekule PAS so lahko prisotne v različnih oblikah, glede na vrsto PAS (posamezne molekule, miceli, liposomi).

**Vpliv ultrazvoka:** Z uporabo ultrazvoka skušamo povzročiti deagregacijo in deaglomeracijo ND v vodnih disperzijah. Ultrazvok deluje po principu kavitacije, tako da lokalno proizvede velik stres na delce (agregate in aglomerate) in posledično povzroči njihovo deaglomeracijo [27, 28]. Iz naših rezultatov lahko razberemo, da ultrazvok nima konstantnega vpliva na velikost SLN, saj na vzorce z velikostjo okoli 500 nm vpliva tako, da poveča velikost delcev, na vzorce z velikostjo okoli 1000 nm in več, pa tako da nekoliko zmanjša velikost delcev, vendar še vedno ne dobimo SLN v območju pod 300 nm. Tudi na PDI ter ZP nima konstantnega vpliva. Sklepamo, da ima na velikost SLN večji vpliv izbira sestavin, ki omogočajo ustrezno tvorbo SLN.

**Vpliv vode:** Pri večini vzorcev se kaže trend naraščanja velikosti SLN s povečanim volumnom medija za dispergiranje. Volumen medija vpliva na velikost nastalih SLN, ker so delci v različnih volumnih izpostavljeni različnim silam dispergiranja [5].

Pri recepturah SLN 19, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 41, 43, 44, 58 in 59 ne dobimo ustrezne disperzije SLN, saj se nam le-ta takoj po začetku homogenizacije obarva sivo, kar kaže na kemijsko nestabilnost sestavin oz. na neustrezne pogoje izdelave. Do tega pride, ko med seboj kombiniramo Compritol z in brez fosfolipidov s Tweenom 60 in s Tweenom 80, ne pa pri kombinaciji z Lutrolom F68. Iz tega lahko sklepamo, da je Compritol s Tweeni nekompatibilen oz. da imamo neustrezne pogoje izdelave (previsoka T, preveliki obrati homogenizacije). Tudi pri kombinaciji Dynasana 114 s Phospholiponom 80 in Tweenom 60 ter Tweenom 80 pride do sivega obarvanja iz česar sklepamo, da so

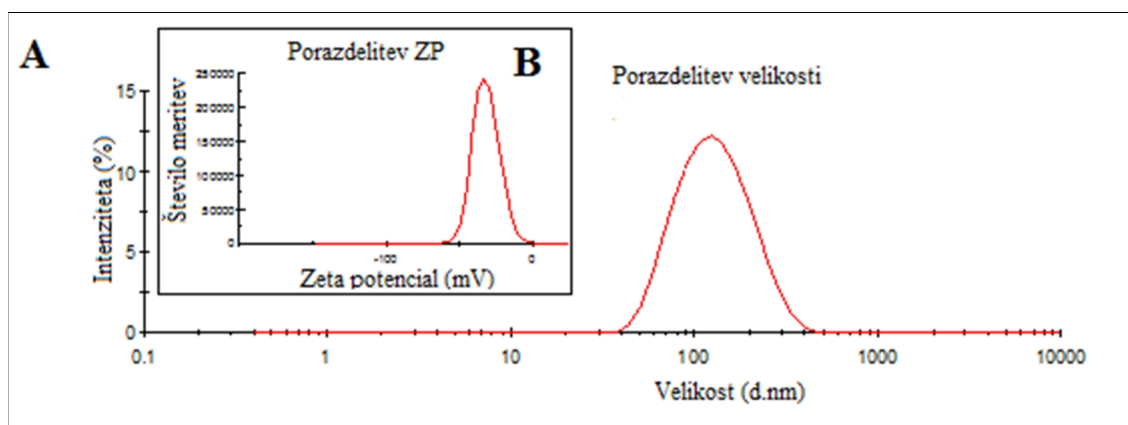
kombinacije Phospholipona 80 in Tweena 60 ter 80 nekompatibilne, saj v kombinaciji Dynasana 114 z ostalima fosfolipidoma in Tweeni ne pride do obarvanja disperzije.

Za nadaljno vgradnjo RSV v SLN, smo za izdelavo SLN izbrali recepturo podano v Preglednici III. SLN izdelani po tej recepturi izkazujejo najboljše fizikalne lastnosti (velikost delcev  $113,54 \pm 13,02$ , PDI  $0,310 \pm 0,031$  in ZP  $29,46 \pm 2,21$ ). Slika 11 nam kaže, da imamo homogen vzorec disperzije SLN glede na velikost kot tudi glede na ZP. Tej SLN so najprimernejši za nadaljno vgradnjo RSV.

RSV smo v SLN vgrajevali v obliki etanolne raztopine s koncentracijo 50 mg/mL in v obliki prahu z namenom ugotoviti katera oblika vgradnje RSV v SLN manj vpliva na fizikalne lastnosti SLN. S povečevanjem mase RSV smo sorazmerno zmanjševali količino lipida (Dynasan 114), mase ostalih komponent pa so ostale nespremenjene. Recepture posameznih vzorcev SLN-RSV so podane v Preglednici IV.

Preglednica III: Sestava recepture SLN z najboljšimi fizikalnimi lastnostmi v katero smo nato vgradili RSV.

	SESTAVA	MASA [mg]
<b>Lipid</b>	Dynasan 114	200
<b>Fosfolipid</b>	Phospholipon 80H	120
<b>PAS</b>	Tween 60	80
<b>Voda</b>	Prečiščena voda	6600



**Slika 11:** Prikaz porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 0.

Preglednica IV: Izbrane recepture z različnim masnim deležem RSV glede na lipid in različno obliko vgrajevanega RSV, v obliki prašnih delcev ali etanolne raztopine.

VRSTA SLN (% (m/m) RSV vgrajevanega glede na lipid)	Lipid (Dynasan 114) [mg]	Fosfolipid (Phospholipon 80H) [mg]	Resveratrol		PAS (Tween 60) [mg]	Voda [mg]
			Oblika prahu [mg]	Etanolna raztopina [mL]		
SLN-RSV 0 ( 0 % m/m RSV)	200	120	0	0	80	6600
SLN-RSV 1 ( 5 % m/m RSV)	190	120	10		80	6600
SLN-RSV1– EtOH ( 5 % m/m RSV)	190	120		0,2	80	6600
SLN-RSV 2 ( 10 % m/m RSV)	180	120	20		80	6600
SLN-RSV2 –EtOH ( 10 % m/m RSV)	180	120		0,4	80	6600
SLN-RSV 3 ( 20 % m/m RSV)	160	120	40		80	6600
SLN-RSV3– EtOH ( 20 % m/m RSV)	160	120		0,8	80	6600
SLN-RSV 4 ( 30 % m/m RSV)	140	120	60		80	6600
SLN-RSV4– EtOH ( 30 % m/m RSV)	140	120		1,2	80	6600
SLN-RSV 5 ( 40 % m/m RSV)	120	120	80		80	6600
SLN-RSV5– EtOH ( 40 % m/m RSV)	120	120		1,6	80	6600
SLN-RSV 6 ( 50 % m/m RSV)	100	120	100		80	6600
SLN-RSV6 –EtOH ( 50 % m/m RSV)	100	120		2,0	80	6600

V preglednici »SLN-RSV« pomeni dodatek RSV v obliki prahu; »SLN-RSV EtOH« pa RSV, dodan z etanolno raztopino RSV s koncentracijo 50 mg/mL. Le-to smo pripravili tako, da smo 250 mg RSV natehtali v 5 mL bučko in dopolnili z 96 % etanolom. Tako pripravljeno raztopino smo postavili še 5 min v ultrazvočno kadičko, da smo zagotovili popolno raztapljanje RSV v etanolu, ker je v vodi slabo topen. S tem smo preverili, če v primeru raztopljenega RSV dobimo SLN z boljšimi fizikalnimi lastnostmi, kot v primeru, ko RSV ni raztopljen.

#### **4.1.1 VELIKOST IN ZETA POTENCIAL TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV V ODVISNOSTI OD KOLIČINE RESVERATROLA**

Velikost delcev in njihova porazdelitev sta najpomembnejši značilnosti ND. Z velikostjo delcev, njihovo porazdelitvijo v disperznem mediju in nabojem na delcih vplivamo na fizikalno stabilnost nastale disperzije SLN.

Vzorec SLN-RSV 2 EtOH (z vgrajevanim 10 % m/m deležem RSV glede na lipid) ima najboljše fizikalne lastnosti, velikost  $139,77 \pm 17,35$ , PDI  $0,363 \pm 0,050$  in ZP  $39,13 \pm 2,22$ . S tem ko v SLN vgradimo RSV, se velikost, PDI in ZP SLN nekoliko povečajo, vendar imajo SLN še vedno ustrezne fizikalne lastnosti. Na sliki 19 (A) vidimo, da se pri vgrajevanju RSV v SLN pojavi dodaten pik pri porazdelitvi velikosti okoli 10 nm, kar nakazuje na prisotnost micelov in se odraža v večji heterogenosti vzorca.

Iz rezultatov v preglednici V je razvidno, da se SLN z vgrajenim RSV povečuje povprečna velikost delcev v odvisnosti od količine vgrajevanega RSV. Pri vzorcih SLN-RSV opazimo, da se povprečna velikost delcev najprej povečuje do vzorca s 30 % (m/m) deležem vgrajevanega RSV glede na lipid, nato pa začne povprečna velikost delcev padati. Vzrok temu je nastanek micelov, ki znižujejo izmerjeno povprečno velikost. Iz slik 12 do 17 vidimo pik pod 100 nm, ki prikazuje intenziteto nastalih micelov. Že pri vzorcu SLN-RSV 3 pride do pojava usedline, ki nastane zaradi aglomeracije večjih delcev (omejena količina lipida ni več sposobna sprejeti vedno večje količine RSV). Pri vzorcih SLN-RSV 4 in 5 (Slika 15 in 16) se to pokaže s pikom okoli 5000 nm, ki predstavlja večje agregate (pri vzorcih SLN-RSV 3 in 6 se pik okoli 5000 nm ne pojavi, vendar tudi tu pride do aglomeracije delcev in nastanka usedline).

Pri vzorcih z SLN-RSV EtOH se povprečna velikost delcev z vgrajevanjem večjega deleža RSV glede na lipid povečuje. Tudi pri teh vzorcih se nam že pri vgrajevanem 10 % (m/m) deležu RSV pojavi pik pod 100 nm, ki prikazuje nastanek micelov (Slike 18 do 23). Obenem pa z vzorcem SLN-RSV 3 EtOH pride do nastanka usedline, ki je prav tako posledica aglomeracije večjih delcev (pojavi se piki nad 1000 nm, ki prikazujejo večje aglomerate).

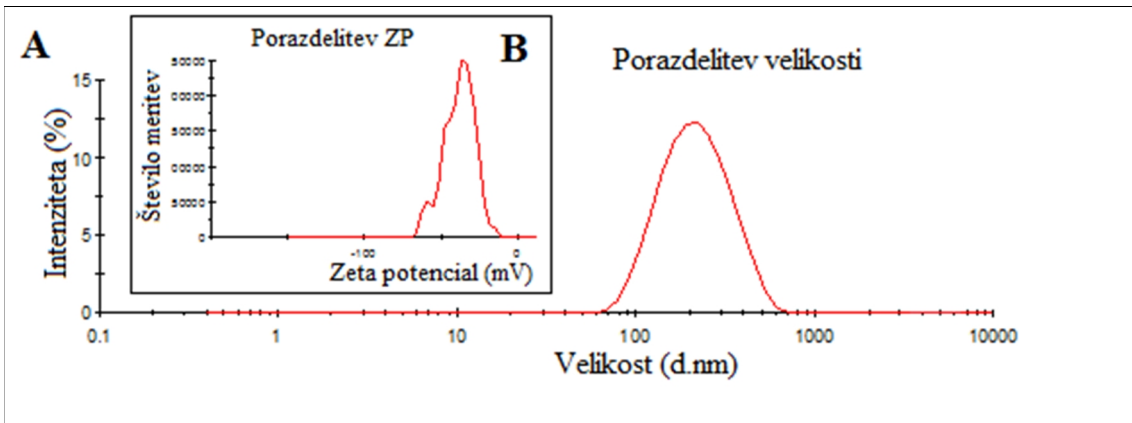
S PDI ovrednotimo homogenost oz. heterogenost našega vzorca. Vrednosti PDI pod 0,3 nakazujejo homogenost vzorca, vrednosti nad 0,3 pa večjo heterogenost. Tako pri vzorcih SLN-RSV kot SLN-RSV EtOH se nam PDI s povečevanjem masnega deleža RSV načeloma povečuje (Preglednica VI). Prevelika količina RSV v sistemu, onemogoča

izdelavo SLN ustreznih velikosti in nizkim PDI, ker prihaja do tvorbe različnih agregatov, micelov.

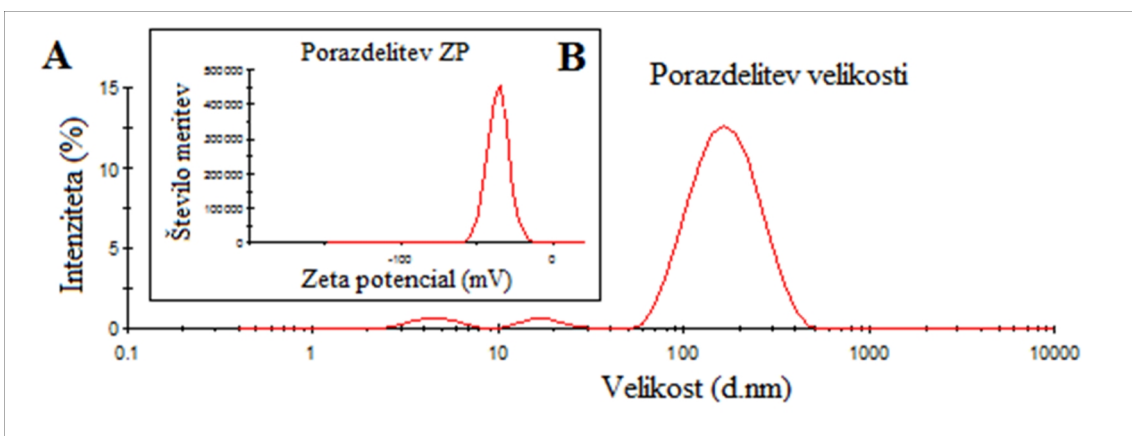
Glede na vrednosti ZP lahko sklepamo na fizikalno stabilnost koloidnih disperzij. V splošnem velja, da je agregacija pri nabitih delcih zaradi večjega odboja manjša [17, 29]. Iz rezultatov razberemo, da nam izbrana metoda izdelave SLN daje stabilno disperzijo (glede na ZP), saj so vrednosti ZP izdelanih praznih SLN približno -29 mV, z RSV pa nad -30 mV. Vrednosti ZP  $\pm 30$  mV izkazujejo fizikalno stabilnost disperzij [30]. Prazni SLN (SLN-RSV 0) imajo nekoliko manjši ZP v primerjavi z SLN z vgrajenim RSV (Preglednica V). Opazimo trend naraščanja ZP s povečevanjem količine vgrajevanega RSV, predvidevamo, da zaradi večjega deleža fosfolipida, na račun zmanjšane deleža lipida, ki ima nižji ZP kot fosfolipid, ki bolj prispeva k odbojnim silam.

Preglednica V: Fizikalne lastnosti različnih SLN z različni masnimi deleži RSV s sestavo iz Preglednice IV. Z rdečo barvo je označena receptura, ki smo jo uporabili v nadaljnjih poizkusih pri vgradnji SLN-RSV v NV.

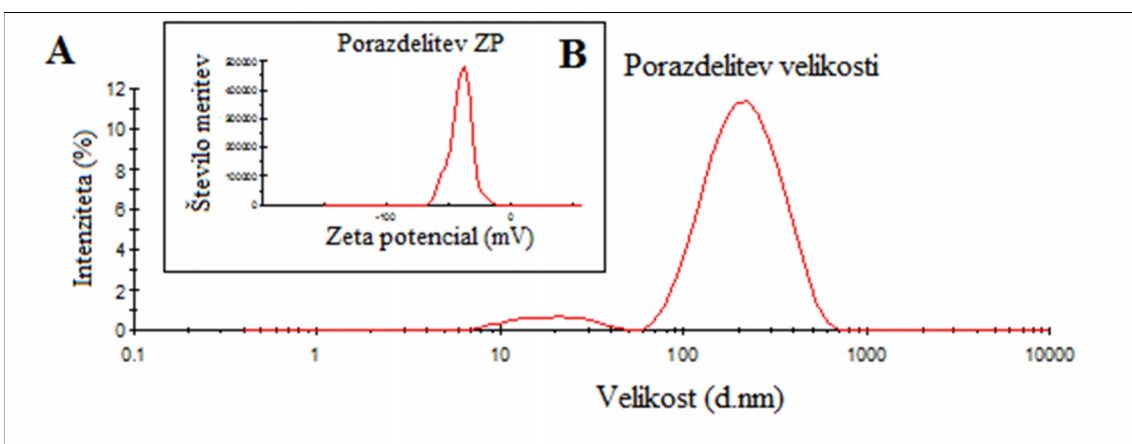
<b>Vrsta SLN</b>	<b>%(m/m) RSV glede na lipid</b>	<b>Velikost (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>ZP (mV)</b>	<b>Usedli na</b>
SLN-RSV0	0,00	113,54 $\pm$ 13,02	0,310 $\pm$ 0,031	-29,46 $\pm$ 2,21	NE
SLN-RSV1 EtOH	5,00	125,20 $\pm$ 14,35	0,411 $\pm$ 0,039	-36,90 $\pm$ 2,35	NE
SLN- RSV 1	5,00	149,31 $\pm$ 9,47	0,482 $\pm$ 0,054	-38,6 $\pm$ 3,05	NE
<b>SLN-RSV2 EtOH</b>	<b>10,00</b>	<b>139,77 <math>\pm</math> 17,53</b>	<b>0,363 <math>\pm</math> 0,050</b>	<b>-39,13 <math>\pm</math> 2,22</b>	<b>NE</b>
SLN-RSV2	10,00	155,93 $\pm$ 6,43	0,561 $\pm$ 0,031	-37,10 $\pm$ 2,36	NE
SLN-RSV3 EtOH	20,00	211,51 $\pm$ 17,53	0,583 $\pm$ 0,159	-40,33 $\pm$ 1,98	DA
SLN- RSV 3	20,00	220,4 $\pm$ 23,67	0,448 $\pm$ 0,231	-45,4 $\pm$ 2,71	DA
SLN-RSV4 EtOH	30,00	266,16 $\pm$ 75,27	0,314 $\pm$ 0,143	-42,3 $\pm$ 4,41	DA
SLN- RSV 4	30,00	177,4 $\pm$ 49,56	0,322 $\pm$ 0,198	-45,9 $\pm$ 4,01	DA
SLN-RSV5 EtOH	40,00	249,9 $\pm$ 90,45	0,648 $\pm$ 0,178	-41,5 $\pm$ 3,98	DA
SLN- RSV5	40,00	153,8 $\pm$ 46,34	0,329 $\pm$ 0,141	-40,2 $\pm$ 4,11	DA
SLN- RSV6 EtOH	50,00	694,0 $\pm$ 78,67	0,796 $\pm$ 0,187	-43,2 $\pm$ 3,76	DA
SLN- RSV6	50,00	137,3 $\pm$ 54,98	0,593 $\pm$ 0,163	-45,7 $\pm$ 3,49	DA



Slika12: Porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 1.

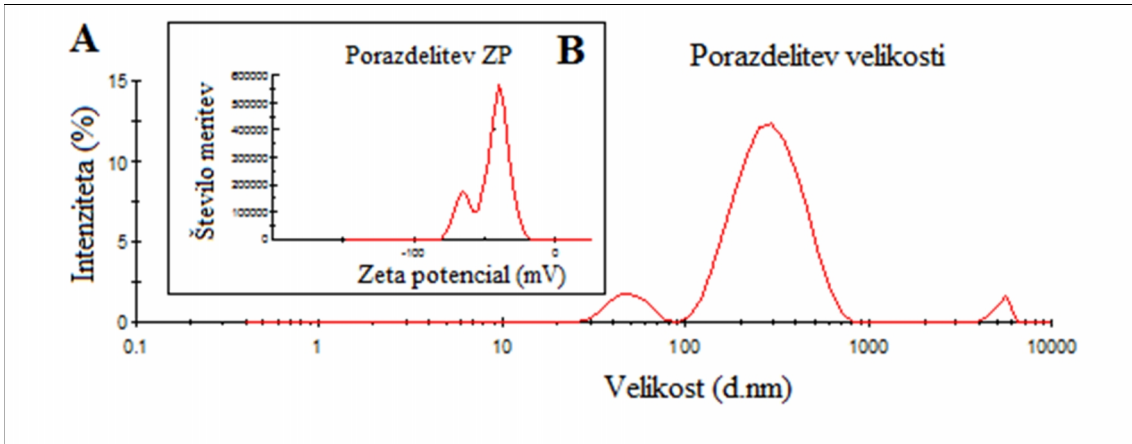


Slika13: Porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 2.

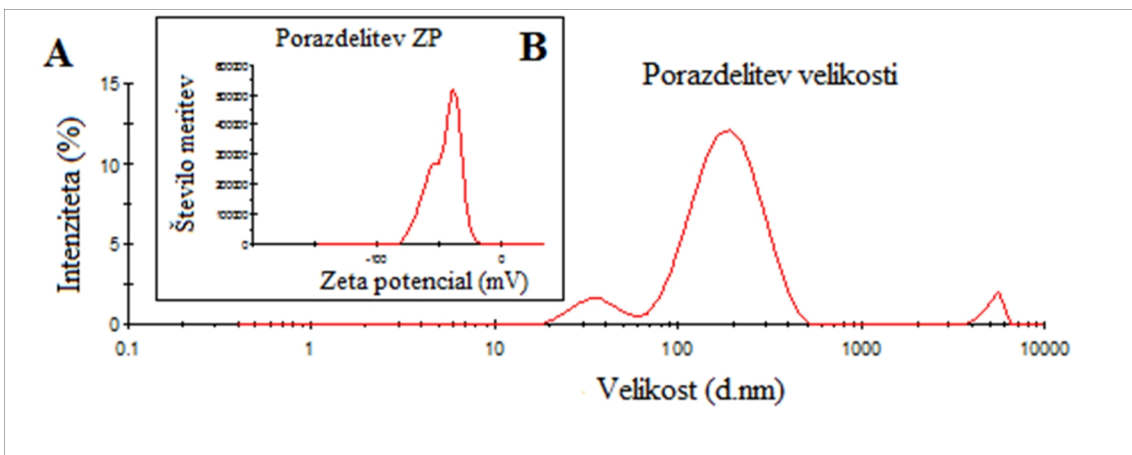


Slika14: Porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 3.

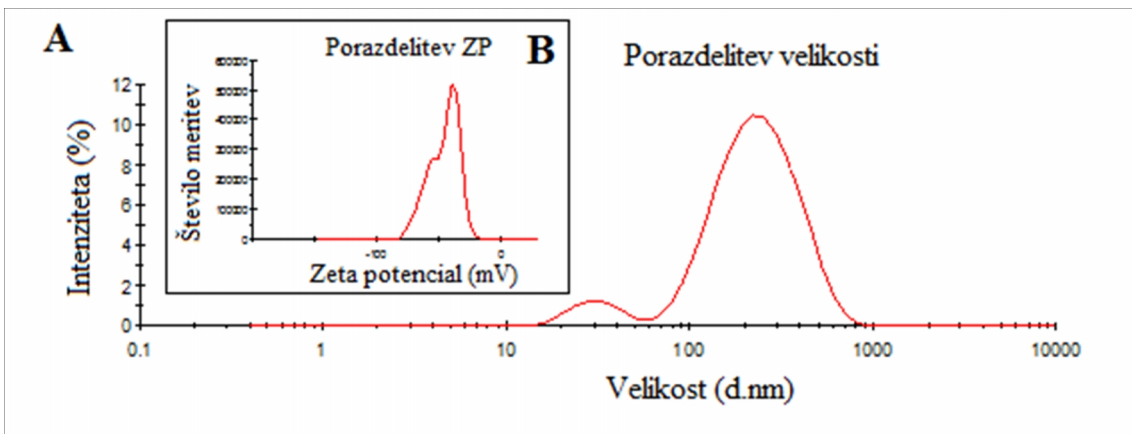




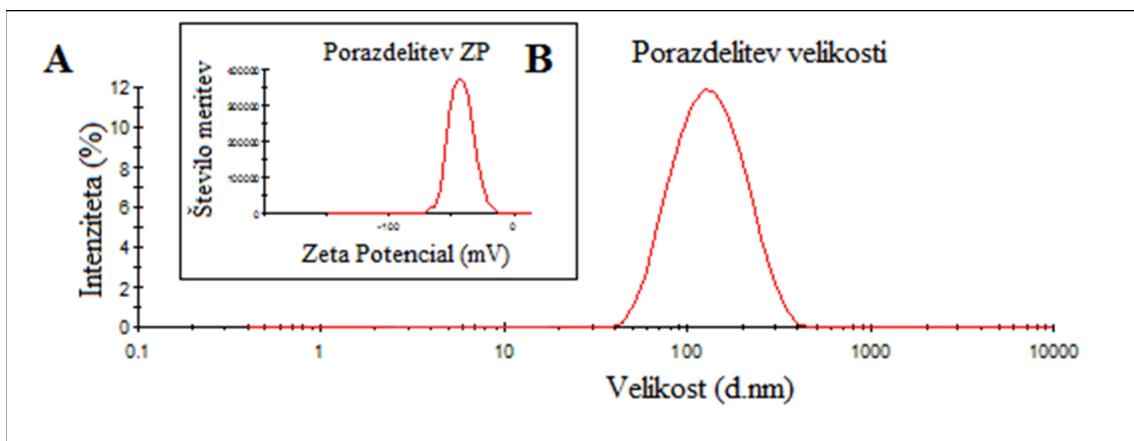
Slika 15: Porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 4.



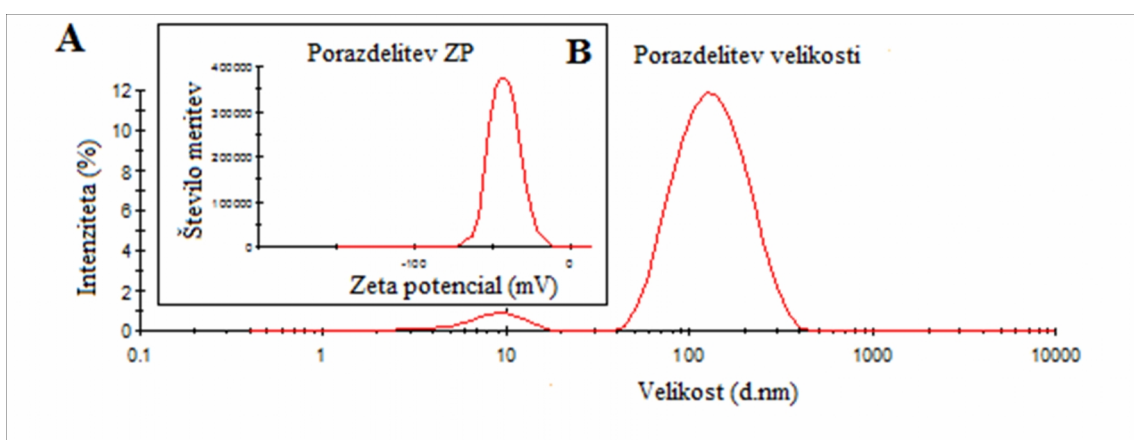
Slika 16: Porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 5.



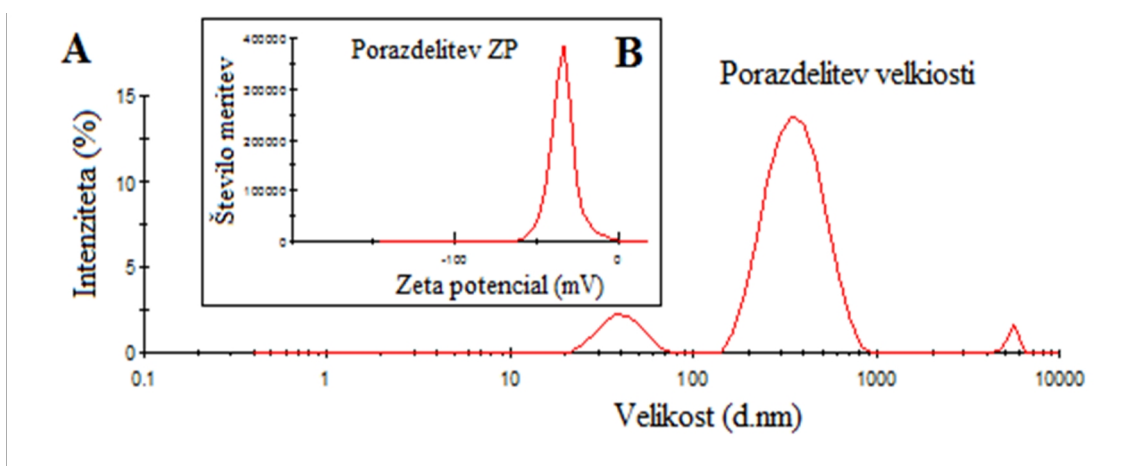
Slika 17: Porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 6.



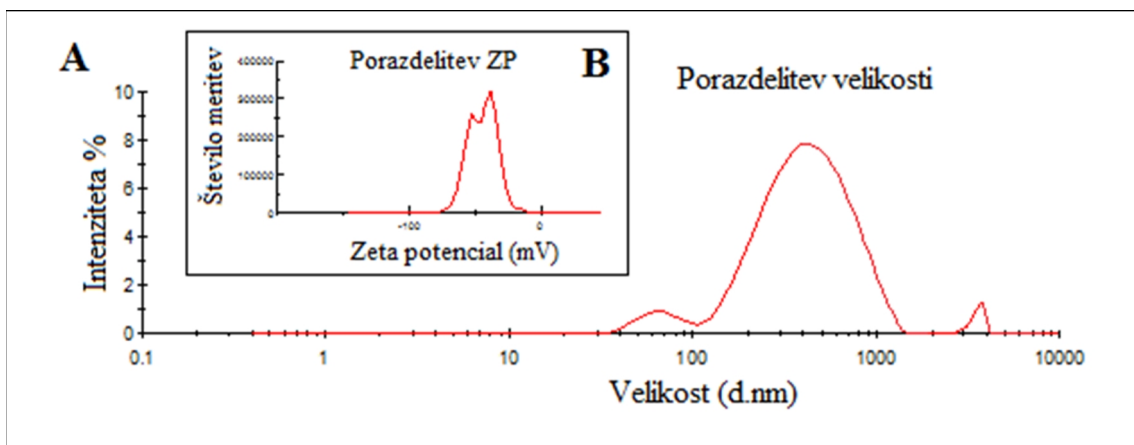
Slika 18: Porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 1 EtOH.



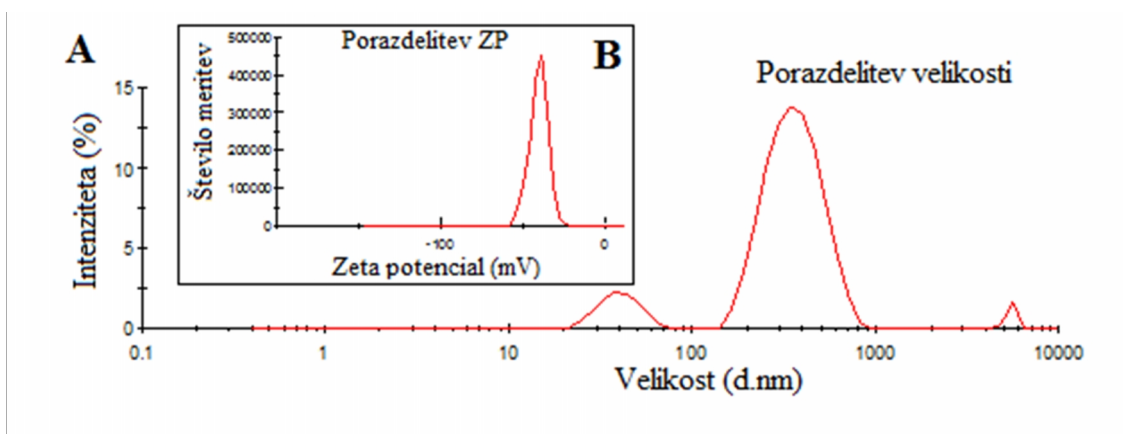
Slika 19: Porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 2 EtOH.



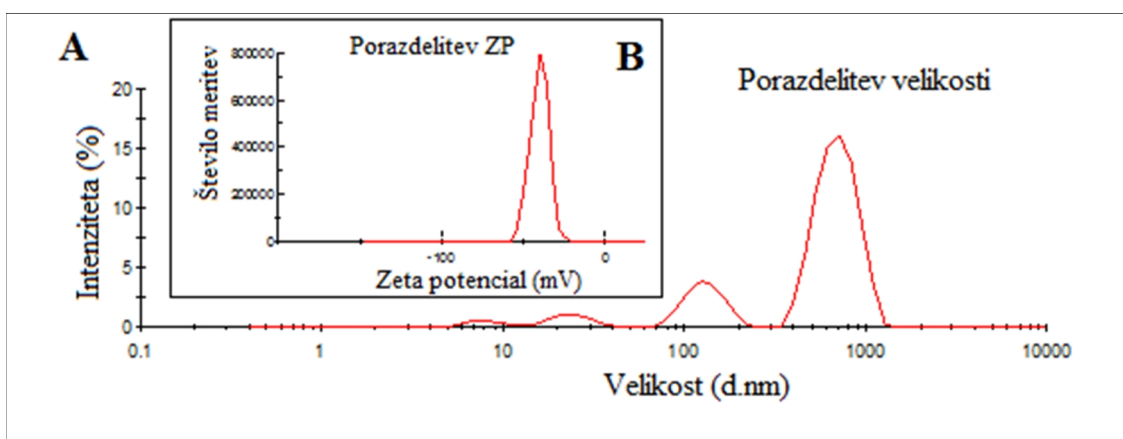
Slika 20: Porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 3 EtOH.



Slika 21: Porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 4 EtOH.



Slika 22: Porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 5 EtOH.



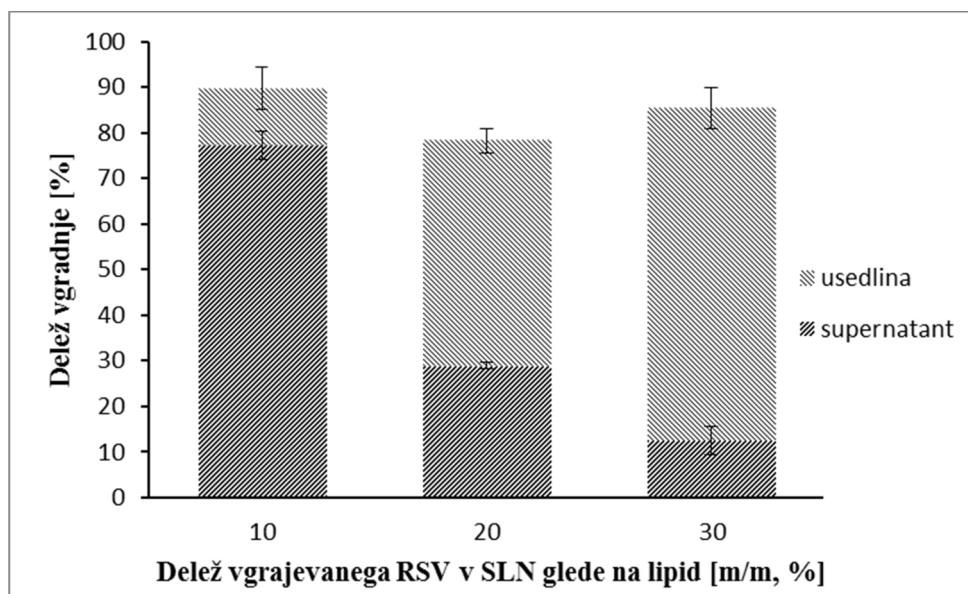
Slika 23: Porazdelitve velikosti (A) in ZP (B) za vzorec SLN-RSV 6 EtOH.

## 4.2 UČINKOVITOST VGRADNJE RESVERATROLA V SLN

Učinkovitost vgradnje smo določili SLN z 10 % (m/m), 20 % (m/m) in 30 % (m/m) deležem vgrajevanega RSV glede na količino lipida, dodanim v obliki etanolne raztopine (50 mg/mL). Izbrali smo SLN z vgrajenim RSV v obliki etanolne raztopine, ker so le-ti izkazovali boljše fizikalne lastnosti (velikost, PDI, ZP). Določili smo količino RSV vgrajenega v SLN, ki ostanejo v supernatantu ter količino RSV, ki ostane v usedlini po centrifugiranju disperzije SLN.

Največjo učinkovitost vgradnje izkazuje vzorec SLN-RSV 2 EtOH z 10 % m/m deležem vgrajevanega RSV glede na lipid. V SLN se nam vgradi  $77,2 \pm 3,1$  % vgrajevanega RSV. Pri tem deležu RSV glede na lipid še ne pride do pojava usedline takoj po homogeniziranju (do pojava usedline pride po centrifugiranju izdelane disperzije SLN) in disperzija izkazuje homogen izgled. Ti SLN izkazujejo najboljše lastnosti, zato so najprimernejši za nadaljno vgradnjo v polimerna NV.

Iz rezultatov je razvidno (Preglednica VI, Slika 24), da se učinkovitost vgradnje RSV v SLN zmanjšuje s povečevanjem masnega deleža RSV v SLN. Sklepamo, da nastali koloidni sistem sprejme le določeno količino RSV, preostali RSV pa se ne uspe vgraditi in ostane v usedlini. Z zmanjševanjem vsebnosti RSV v supernatantu se povečuje vsebnost RSV v usedlini, kar potrjuje zgornjo trditev. Seštevek deležev RSV v supernatantu in v usedlini je blizu 90 %, kar potrjuje pravilnost naše metode.



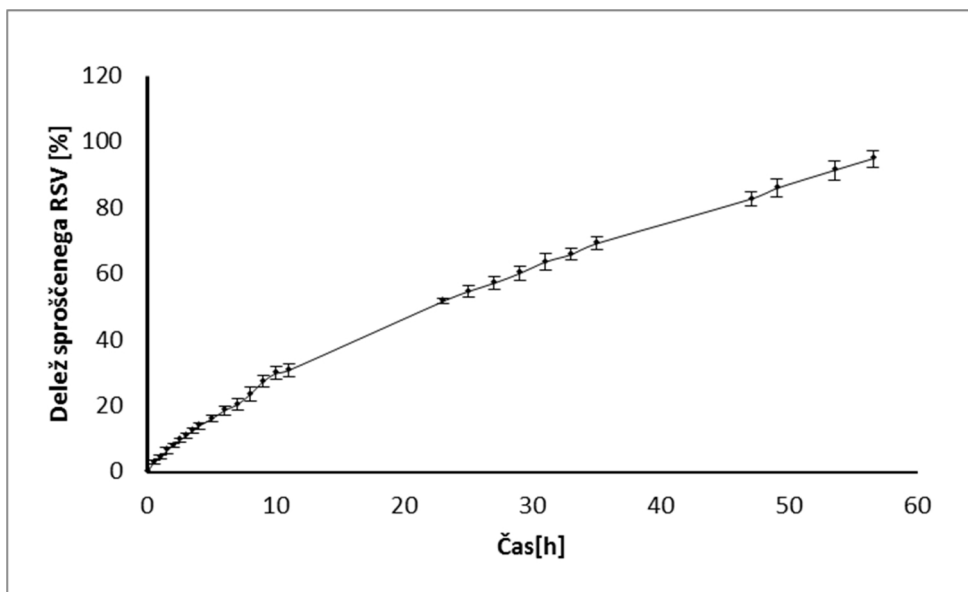
**Slika 24:** Delež vgradnje RSV v SLN z vgrajevanim 10,0, 20,0 in 30,0 % (m/m) deležem vgrajevanega RSV glede na lipid.

Preglednica VI: Deleži in mase RSV v supernatantu/usedlini po centrifugiranju disperzije SLN

Vrsta SLN	Vsebnost: Usedlina		Vsebnost: Supernatant		Skupaj	
	% RSV	(mg) RSV	% RSV	(mg) RSV	% RSV	(mg) RSV
SLN-RSV 2 EtOH (10 % m/m) RSV	12,5 ± 4,6	2,5 ± 0,9	77,2 ± 3,1	15,44 ± 0,6	89,7 ± 3,6	17,9 ± 0,7
SLN-RSV 3 EtOH (20 % m/m) RSV	49,3 ± 2,7	19,7 ± 1,1	28,9 ± 0,7	11,56 ± 0,3	78,2 ± 1,4	31,3 ± 0,6
SLN-RSV 4 EtOH (30 % m/m) RSV	72,8 ± 4,4	43,7 ± 2,6	12,6 ± 3,1	7,56 ± 1,9	85,4 ± 5,6	51,2 ± 1,6

### 4.3 SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ SLN

Dokazano je, da se RSV iz etanolne raztopine RSV polnjene v dializno vrečko sprosti v medij v manj kot 3 urah in da dializna vrečka ne reagira z RSV, zato je kot takšna primerna za uporabo pri naši metodi sproščanja [22]. Vgraditev RSV v SLN naj bi povečala njegovo topnost, stabilnost in podaljšano sproščanje. Proučevali smo profil sproščanja vzorca SLN-RSV 2 EtOH z vgrajevanim 10 % (m/m) deležem RSV glede na lipid. Iz slike 25 lahko razberemo, da smo dosegli podaljšano sproščanje. RSV se enakomerno sprošča iz SLN skozi celoten čas spremljanja, vseh 53 ur. V tem času se sprosti 91 % vgrajenega RSV. Opazimo lahko, da znotraj iste vrste SLN pride do majših odstopanj, ki so posledica izvedbe same dialize. Možni vzroki za odstopanja so lahko razlike v volumnih injicirane disperzije SLN v dializno vrečko, saj smo volumen odmerjali z injekcijsko brizgo, katera nam ne zagotavlja najbolj točnega volumna, prav tako pa je lahko del disperzije SLN ostal v končkih dializne vrečke, ki ni bil zapet s sponkami. Dodatno lahko na odstopanja vplivata stična površina na kateri poteka dializa, saj nismo uspeli vedno enako zapreti dializne vrečke, in morebitni mehurčki zraka, ki so se ujeli v disperzijo SLN. Na velikost stične površine lahko vpliva tudi zamašitev por membrane dializne vrečke, do katere lahko pride med izvedbo samega poizkusa. Za kontrolo smo merili absorbance vzorca SLN-RSV 0, pri valovni dolžini 306 nm.



**Slika 25:** Profil sproščanja RSV iz SLN-RSV 2 EtOH v PBS pufer.

## 4.4 LASTNOSTI IZDELANIH NANOVLAKEN

Z metodo elektrostatskega sukanja smo izdelali NV iz PVA, ki nam predstavljajo dostavni sistem s kontroliranim sproščanjem ter vanje vgradili RSV ter SLN-RSV. Primerjali smo morfološke lastnosti in profile sproščanja RSV iz dveh dostavnih sistemov, iz NV-RSV in NV-SLN-RSV. PVA je zaradi svojih lastnosti eden izmed najbolj raziskanih in uporabljenih polimerov za izdelavo NV. Je netoksičen, nekancerogen, biokompatibilen, biorazgradljiv in hidrofilen polihidroksi polimer z dobrimi mehanskimi lastnostmi in ustreznimi karakteristikami za elektrostatsko sukanje [32].

### 4.4.1 KARAKTERIZACIJA NANOVLAKEN

S SEM mikroskopijo smo ovrednotili izdelana NV, tako da smo jim določili povprečen premer in morfologijo. Pri izdelavi NV je bila naša primarna naloga določiti procesne pogoje, z namenom izdelati NV brez vozlov in nepravilnosti na površini NV. Spreminjali smo pretok polimerne raztopine od 0,9 mL/h do 2,2 mL/h in napetost od 15,0 kV do 18,35 kV. Optimalne procesne parametre smo določili tako, da smo vizualno opazovali curek polimerne raztopine, za katerega smo želeli, da je neprekinjen in da so NV na zbiralu čim bolj homogena, kar smo kasneje ovrednotili na SEM posnetkih NV s programom ImageJ. Najprej smo izdelali NV pri  $(20,0 \pm 2) \% \text{ RH}$  z 0,24, 0,47 in 0,94 m/m % RSV glede na maso PVA v suspenziji za elektrostatsko sukanje. Zaradi pojave nepravilnosti v morfologiji NV in izoboritvi RSV na površini NV smo nato izdelali NV pri nižji RH,  $(5,5 \pm 1) \%$ , ter z 0,09, 0,26, in 0,43 m/m % RSV glede na maso PVA.

- **MORFOLOGIJA NANOVLAKEN IZDELANIH PRI  $(20,0 \pm 2) \% \text{ RELATIVNI VLAGI}$**

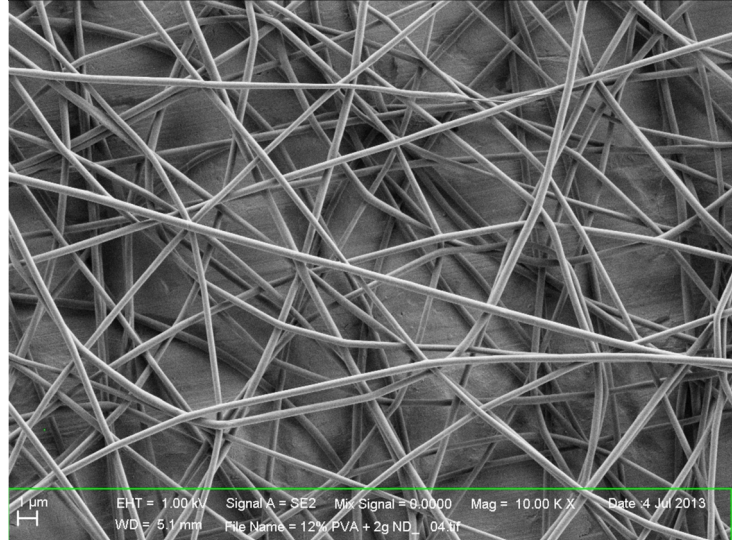
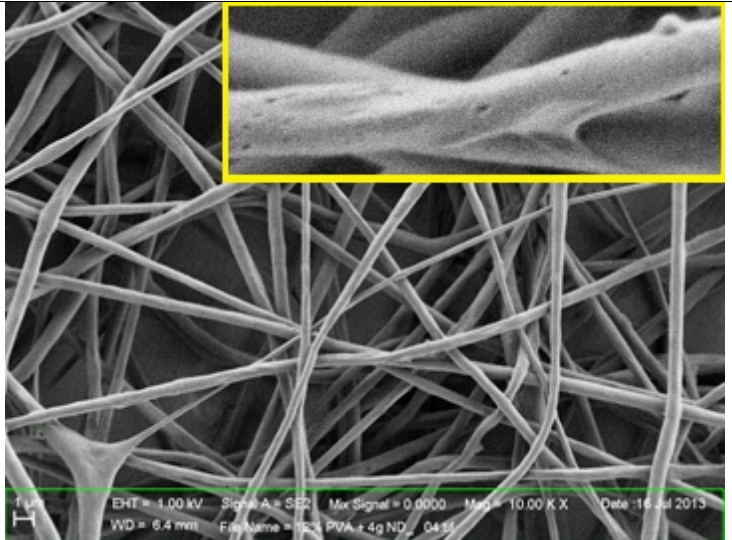
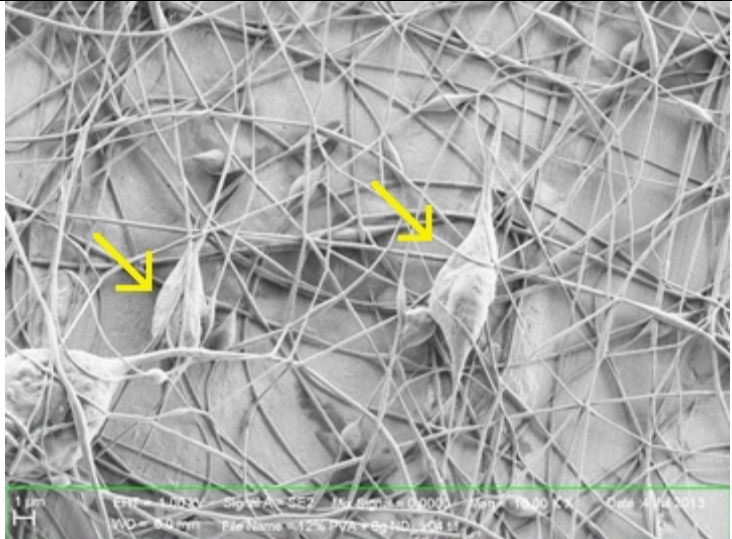
Iz SEM slik 26 in 27 vidimo, da je nastanek gladkih NV-RSV in NV-SLN-RSV brez nepravilnosti na površini odvisen od (m/m) % in oblike vgradnje RSV (RSV oz. SLN-RSV). S povečevanjem (m/m) % RSV v dostavnem sistemu NV-SLN-RSV (Slika 26) prihaja do nepravilnosti v morfologiji in sprememb v premeru NV. Pri prvem vzorcu (Slika 26;1A), z 0,24 % (m/m) RSV v NV-SLN-RSV dobimo gladka in homogena NV s premerom  $315,28 \pm 58,83 \text{ nm}$ . Ko povečamo količino vgrajevanih SLN na 0,47 % (m/m) RSV se premer NV poveča na  $421,53 \pm 98,47 \text{ nm}$  (Slika 26; 2A), hkrati pa opazimo, da NV niso več popolnoma gladka, a še vedno brez vozlov. V zadnjem primeru, ko imamo največji (m/m) % RSV pa pride do nastanka NV z vozli in drugimi nepravilnostmi ter do

padca premera NV na  $225,96 \pm 79,23$  nm (Slika 26; 3A). Velika količina dodanih SLN več kot očitno zmoti ureditev polimernih verig v polimerni suspenziji, ki posledično ne zagotavlja več zadostnega števila prepletanj med polimernimi verigami, kar pa se odraža v tanjših NV in pojavljanju zadebelitev (vozlov) v strukturi. Porušena ureditev polimernih verig pa bi lahko vodila tudi do zmanjšane sposobnosti sprejemanja SLN in s tem do zmanjšane učinkovitosti vgradnje RSV.

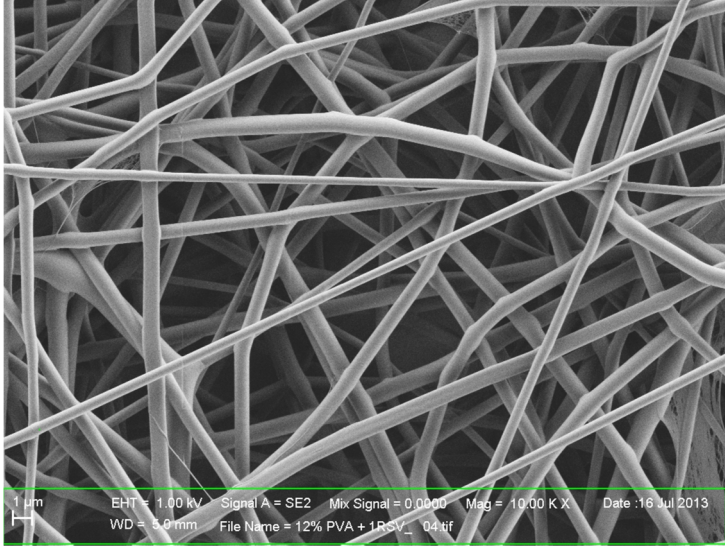
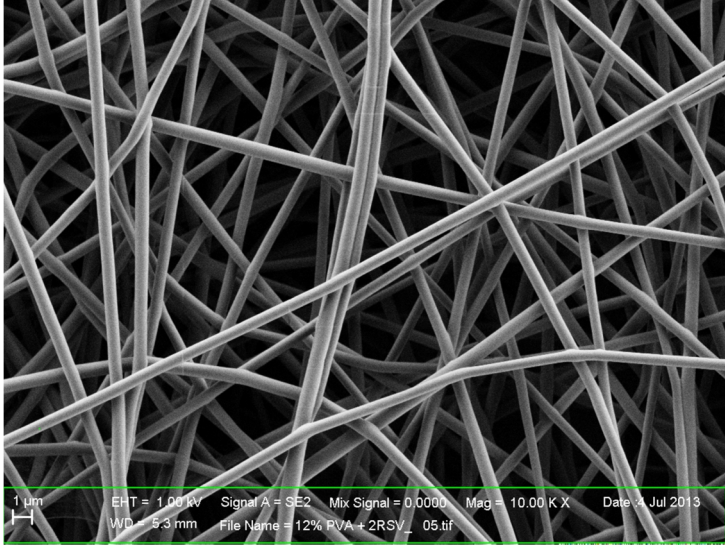
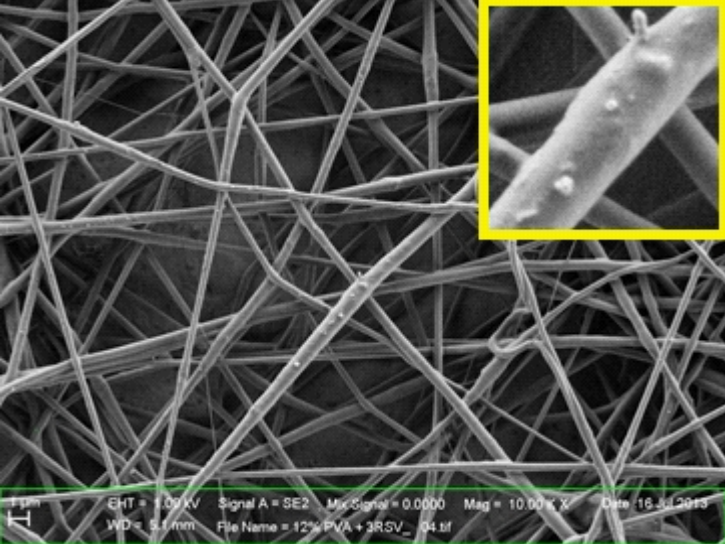
Pri vzorcih dostavnega sistema NV-RSV (Slika 27) opazimo manjši vpliv količine (m/m) % RSV, saj pri vzorcu z 0,47 (m/m) % RSV (Slika 27; 2B) še ni zaznati nepravilnosti v strukturi NV. Vzrok za manjše spremembe v odvisnosti od količine RSV je v tem, da v tem primeru vgrajujemo sam RSV, medtem ko je v primeru vgrajevanja RSV-SLN, količina dodanih snovi, ki jih morajo NV sprejeti v svojo strukturo, približno 20 krat večja. Pri vzorcu z 0,94 (m/m) % RSV (Slika 27; 3B) pa na površini NV opazimo izoboritev RSV. Iz tega sklepamo na manjšo učinkovitost vgradnje RSV v notranjost NV, oz. na preseženo količino RSV, ki ga PVA NV lahko sprejmejo v svojo strukturo. Presežna količina RSV kristalizirala na površini NV. S povečevanjem (m/m) % RSV se poveča tudi standardna deviacija premera NV (zmanjšala se je homogenost vročca), kar nakazuje motnje v prepletanjih med polimernimi verigami.

Na morfologijo NV vpliva tudi oblika vgrajevanega RSV. NV-RSV so debelejša od NV-SLN-RSV za približno 200 nm, kar kaže, da vgradnja SLN bolj moti prepletanje polimernih verig, kar se odraža v tanjših NV.



1A		<p><b>Sestava:</b> 20 g 12 % PVA + 2 mL SLN</p> <p><b>w RSV v NV (teoretično):</b> 0,24 % (m/m)</p> <p><b>Pogoji el. sukanja:</b> U = 18,35 kV, l = 15,0 cm, <math>\phi = 0,9</math> mL/h</p> <p><b>Pogoji okolja:</b> T = 27,4 °C, RH = 20,3 %</p> <p><b>Premjer NV:</b> 315,28 ± 58,83 nm</p>
2A		<p><b>Sestava:</b> 20 g 12 % PVA + 4 mL SLN</p> <p><b>w (RSV) v NV (teoretično):</b> 0,47 % (m/m)</p> <p><b>Pogoji el. sukanja:</b> U = 18,05 kV, l = 15,0 cm, <math>\phi = 0,9</math> mL/h</p> <p><b>Pogoji okolja:</b> T = 27,0 °C, RH = 20,0 %</p> <p><b>Premjer NV:</b> 421,53 ± 98,47 nm</p>
3A		<p><b>Sestava:</b> 20 g 12 % PVA + 8 mL SLN</p> <p><b>w (RSV) v NV (teoretično):</b> 0,94 % (m/m)</p> <p><b>Pogoji el. sukanja:</b> U = 18,05 kV, l = 15,0 cm, <math>\phi = 0,9</math> mL/h</p> <p><b>Pogoji okolja:</b> T = 27,3 °C, RH = 21,3 %</p> <p><b>Premjer NV:</b> 225,96 ± 79,23 nm</p>

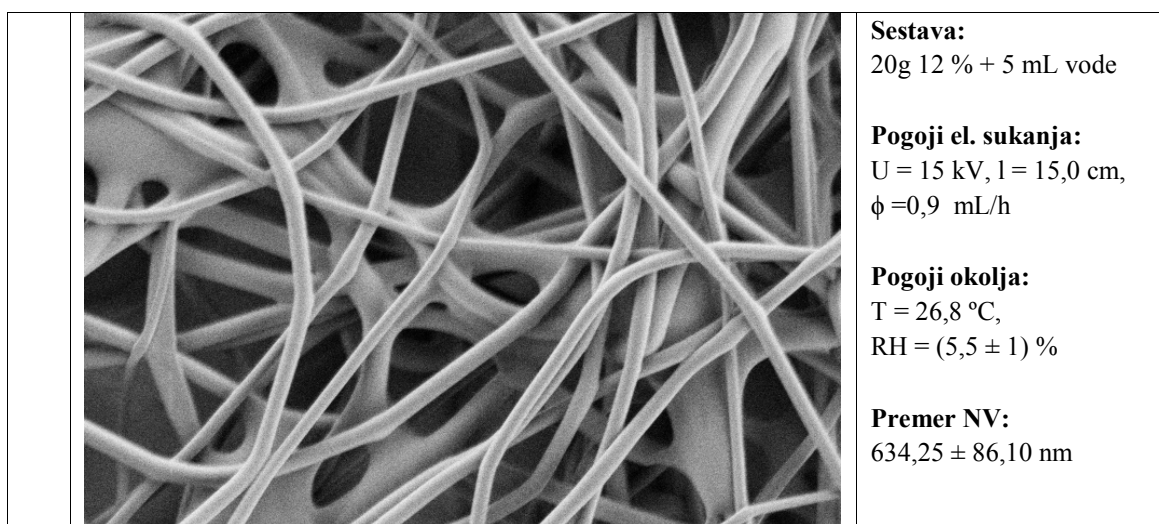
**Slika 26:** SEM slike vzorcev NV-SLN-RSV izdelanih pri  $(20,0 \pm 2)$  % RH.

<p><b>1B</b></p>		<p><b>Sestava:</b> 20 g 12 % PVA + 5,71 mg RSV <b>w (RSV) v NV (teoretično):</b> 0,24 % (m/m)</p> <p><b>Pogoji el. sukanja:</b> U = 18,035 kV, l = 15,0 cm, <math>\phi</math> = 0,9 mL/h</p> <p><b>Pogoji okolja:</b> T = 26,4 °C, RH = 20,3 %</p> <p><b>Premer NV:</b> 566,01 ± 56,25 nm</p>
<p><b>2B</b></p>		<p><b>Sestava:</b> 20 g 12 % PVA + 11,43 mg RSV <b>w (RSV) v NV (teoretično):</b> 0,47 % (m/m)</p> <p><b>Pogoji el. sukanja:</b> U = 18,00 kV, l = 15,0 cm, <math>\phi</math> = 0,9 mL/h</p> <p><b>Pogoji okolja:</b> T = 26,5 °C, RH = 20,3 %</p> <p><b>Premer NV:</b> 512,99 ± 87,71 nm</p>
<p><b>3B</b></p>		<p><b>Sestava:</b> 20 g 12 % PVA + 22,85 mg RSV <b>w (RSV) v NV (teoretično):</b> 0,94 % (m/m)</p> <p><b>Pogoji el. sukanja:</b> U = 18,35 kV, l = 15,0 cm, <math>\phi</math> = 0,9 mL/h</p> <p><b>Pogoji okolja:</b> T = 27,1 °C, RH = 21,1 %</p> <p><b>Premer NV:</b> 437,03 ± 107,81 nm</p>

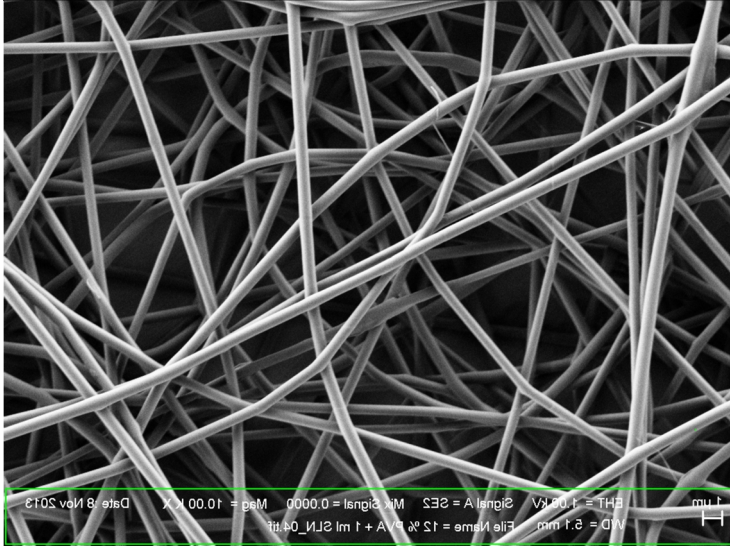
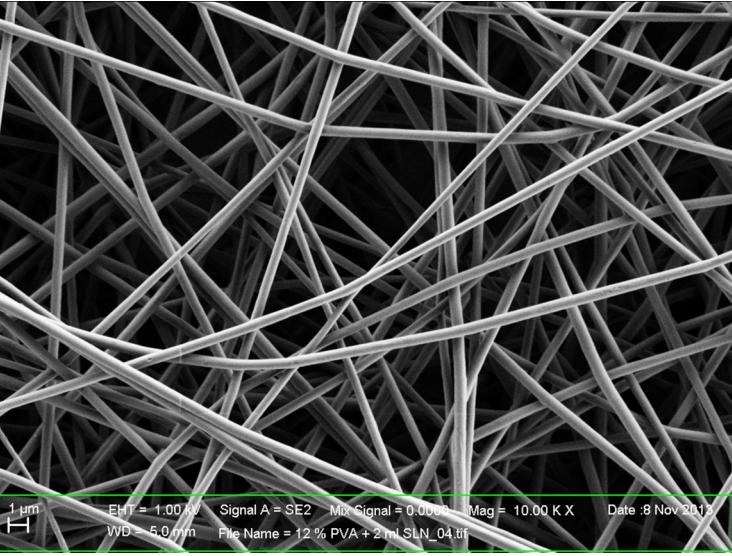
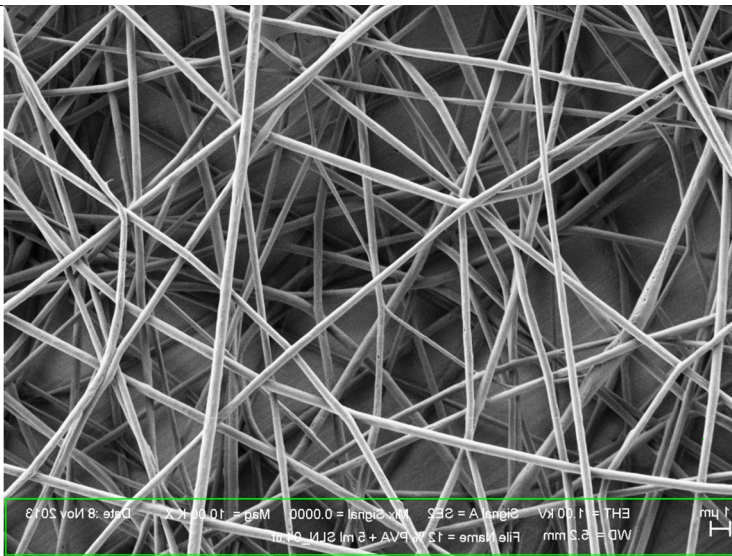
Slika 27: SEM slike vzorcev NV-RSV izdelanih pri  $(20,0 \pm 2)$  % RH.

- **MORFOLOGIJA NANOVLAKEN IZDELANIH PRI  $(5,5 \pm 1) \%$  RELATIVNI VLAGI**

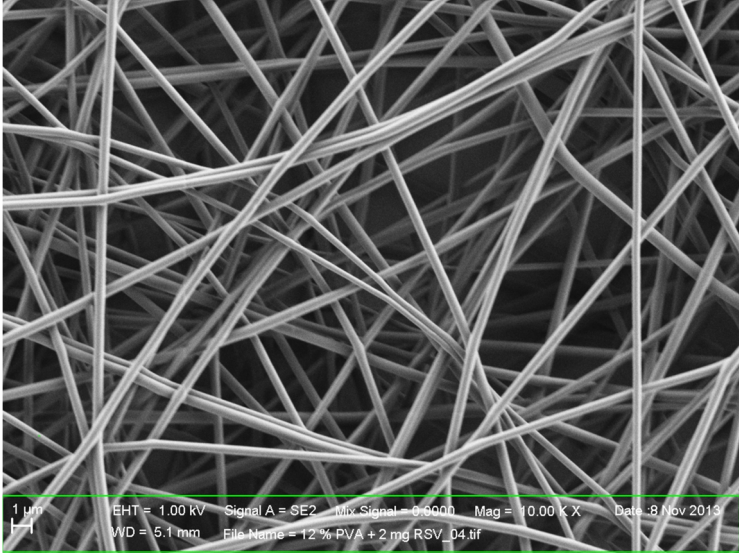
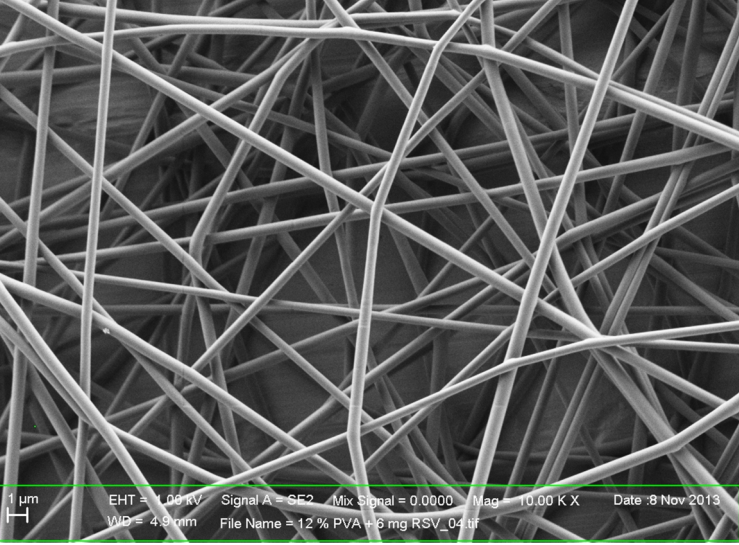
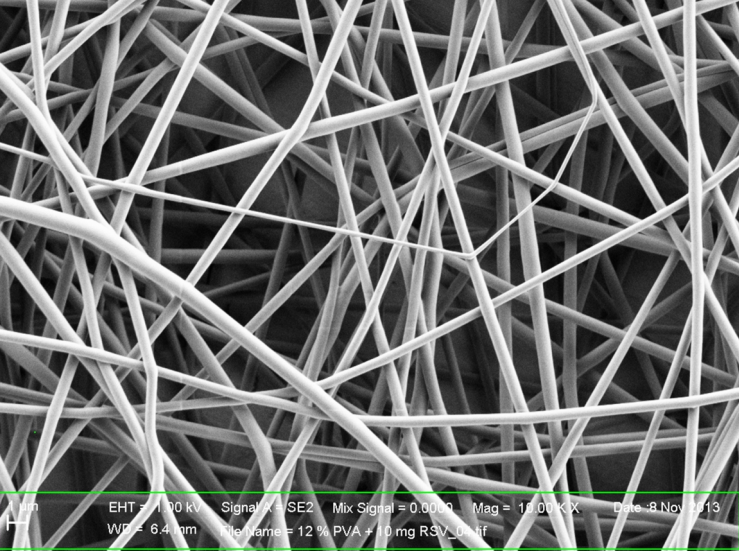
Z namenom izdelave NV brez nepravilnosti smo poleg nižjih m/m % RSV v suspenziji za elektrostatsko sukanje zmanjšali tudi RH v prostoru izdelave NV in s tem povečali debelino NV. Pri nižji RH je izhlapevanje medija hitrejša, zato se curek polimerne raztopine po prihodu iz igle začne hitreje strjevati čim pride iz igle, posledično je le kratek čas izpostavljen raztezanju pod vplivom aplicirane napetosti, kar se odraža v debelejših NV [6]. Z izdelavo NV pri  $(5,5 \pm 1) \%$  RH smo izdelali gladka NV brez nepravilnosti. S tem smo dosegli boljšo vgradnjo RSV in SLN-RSV v notranjost NV. Iz SEM slik vidimo (Sliki 29 in 30), da smo pri vseh vzorcih dobili gladka NV. Rezultati premera in širine porazdelitve premera nam pokažejo razlike med dostavnima sistemoma NV-RSV (Slika 30) in NV-SLN-RSV (Slika 29). Pri NV-RSV opazimo, da se z naraščanjem masnega deleža RSV v NV povečuje premer in širina porazdelitve premera. Premer pri NV-SLN-RSV pa s povečevanjem masnega deleža RSV nekoliko pada, porazdelitev premera pa se nekoliko povečuje. V primerjavi z NV brez učinkovine (Slika 28) opazimo, da vgrajevanje samega RSV kot SLN-RSV vpliva na morfologijo vlaken s spremembo v premeru NV, tako da zmanjša premer NV za približno 50-100 nm. Oblika vgradnje RSV v NV pri  $(5,5 \pm 1) \%$  RH bistveno ne vpliva na premer NV. S tem smo pokazali, da z znižanjem RH zagotovimo ustrezno debelino NV, ki je še sposobna sprejeti RSV v obeh oblikah, tako RSV kot tudi SLN-RSV. Z izdelavo NV pri  $(5,5 \pm 1) \%$  RH dobimo debelejša NV v primerjavi z izdelavo NV pri  $(20,0 \pm 2) \%$  RH, vendar smo prilagodili tudi pretok polimerne suspenzije, da smo zagotovili kontinuiran curek med elektrostatskim sukanjem.



**Slika 28:** SEM slika praznih NV izdelanih pri  $(5,5 \pm 1) \%$  RH.

1C		<p><b>Sestava:</b> 20 g 12 % PVA + 1 mL SLN</p> <p><b>w RSV v NV (teoretično):</b> 0,09 % (m/m)</p> <p><b>Pogoji el. sukanja:</b> U = 18,00 kV, l = 15,0 cm, <math>\phi</math> = 1,5 mL/h</p> <p><b>Pogoji okolja:</b> T = 27,1 °C, RH = (5,5 ± 1) %</p> <p><b>Premjer NV:</b> 597,00 ± 47,80 nm</p>
2C		<p><b>Sestava:</b> 20 g 12 % PVA + 3 mL SLN</p> <p><b>w RSV v NV (teoretično):</b> 0,26 % (m/m)</p> <p><b>Pogoji el. sukanja:</b> U = 18,05 kV, l = 15,0 cm, <math>\phi</math> = 1,6 mL/h</p> <p><b>Pogoji okolja:</b> T = 27,5 °C, RH = (5,5 ± 1) %</p> <p><b>Premjer NV:</b> 542,80 ± 62,61 nm</p>
3C		<p><b>Sestava:</b> 20 g 12 % PVA + 5 mL SLN</p> <p><b>w (RSV) v NV (teoretično):</b> 0,43 % (m/m)</p> <p><b>Pogoji el. sukanja:</b> U = 18,00 kV, l = 15,0 cm, <math>\phi</math> = 2,0 mL/h</p> <p><b>Pogoji okolja:</b> T = 26,5 °C, RH = (5,5 ± 1) %</p> <p><b>Premjer NV:</b> 505,50 ± 68,15 nm</p>

Slika 29: SEM slike vzorcev NV z SLN-RSV izdelanih pri (5,5 ± 1) % RH

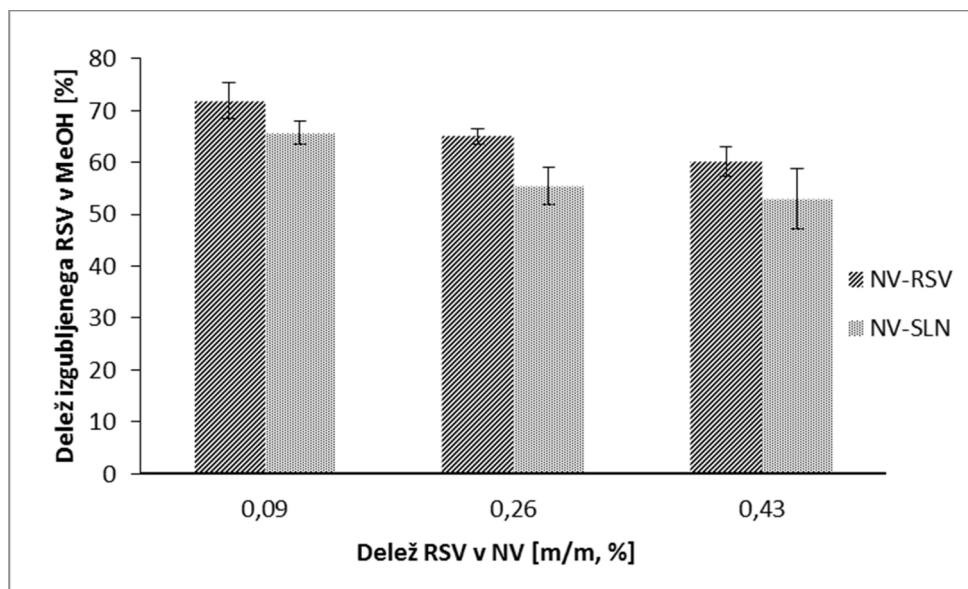
<p><b>1D</b></p>	 <p>1 μm EHT = 1,00 kV Signal A = SE2 Mix Signal = 0,0000 Mag = 10,00 K X Date : 8 Nov 2013 WD = 5,1 mm File Name = 12 % PVA + 2 mg RSV_04.tif</p>	<p><b>Sestava:</b> 20 g 12 % PVA + 2,08 mg RSV</p> <p><b>w (RSV) v NV (teoretično):</b> 0,09 % (m/m)</p> <p><b>Pogoji el. sukanja:</b> U = 18,0 kV, l = 15,0 cm, φ = 1,4 mL/h</p> <p><b>Pogoji okolja:</b> T = 26,7 °C, RH =(5,5 ± 1) %</p> <p><b>Premjer NV:</b> 525,95 ± 56,29 nm</p>
<p><b>2D</b></p>	 <p>1 μm EHT = 1,00 kV Signal A = SE2 Mix Signal = 0,0000 Mag = 10,00 K X Date : 8 Nov 2013 WD = 4,9 mm File Name = 12 % PVA + 6 mg RSV_04.tif</p>	<p><b>Sestava:</b> 20 g 12 % PVA + 6,25 mg RSV</p> <p><b>w (RSV) v NV (teoretično):</b> 0,26 % (m/m)</p> <p><b>Pogoji el. sukanja:</b> U = 18,0 kV, l = 15,0 cm, φ = 1,6 mL/h</p> <p><b>Pogoji okolja:</b> T = 27,1 °C, RH =(5,5 ± 1) %</p> <p><b>Premjer NV:</b> 580,19 ± 91,61 nm</p>
<p><b>3D</b></p>	 <p>1 μm EHT = 1,00 kV Signal A = SE2 Mix Signal = 0,0000 Mag = 10,00 K X Date : 8 Nov 2013 WD = 6,4 mm File Name = 12 % PVA + 10 mg RSV_04.tif</p>	<p><b>Sestava:</b> 20 g 12 % PVA + 10,42 mg RSV</p> <p><b>w (RSV) v NV (teoretično):</b> 0,43 % (m/m)</p> <p><b>Pogoji el. sukanja:</b> U = 18,035 kV, l = 15,0 cm, φ = 2,0 mL/h</p> <p><b>Pogoji okolja:</b> T = 27,1 °C, RH =(5,5 ± 1) %</p> <p><b>Premjer NV:</b> 619,593 ± 92,50 nm</p>

**Slika 30:** SEM slike vzorcev NV z RSV izdelanih pri (5,5 ± 1) % RH

Glede na morfološke lastnosti izdelanih NV, smo poizkuse učinkovitosti vgradnje in sproščanja nadaljevali na NV izdelanih pri  $(5,5 \pm 1) \% \text{ RH}$ , ker pri teh pogojih izdelave izdelamo NV brez nepravilnosti in z ustreznim premerom v nanometriškem območju.

#### 4.5 STABILIZACIJA NANOVLAKEN

NV smo stabilizirali z namakanjem v metanolu, da smo izboljšali mehanske lastnosti in preprečili njihovo raztapljanje v vodnem mediju [31, 33]. Z rezultati smo pokazali (Slika 31, Preglednica VII), da se nam velik delež vgrajenega RSV v NV izgubi pri stabilizaciji v metanol, tako v primeru ko smo v NV vgradili sam RSV, kot v primeru vgradnje SLN-RSV. Izguba RSV v metanol je posledica dobre topnosti RSV v metanolu. Kljub temu smo s predhodno vgradnjo SLN-RSV dosegli manjšo izgubo RSV pri stabilizaciji, kot v primeru vgraditve samega RSV v NV. Dokazali smo tudi, da se s povečevanjem masnega deleža RSV v NV zmanjšuje delež izgubljenega RSV med stabilizacijo. Predvidevamo, da se nam pri NV z večjo količino vgrajenega RSV, več RSV porazdeli bolj v notranjost NV, zaradi česar ga manj difundira v metanol med stabilizacijo. Metanol poveča stopnjo kristaliničnosti in posledično število povezav med samimi polimernimi verigami v NV. Do tega pride ker alkohol odtegne vodo iz NV in tako se vodikove vezi med PVA in vodo nadomestijo z intramolekularnimi vodikovimi vezmi v polimeru, kar se odraža v povečani odpornosti na raztapljanje v vodnem mediju.



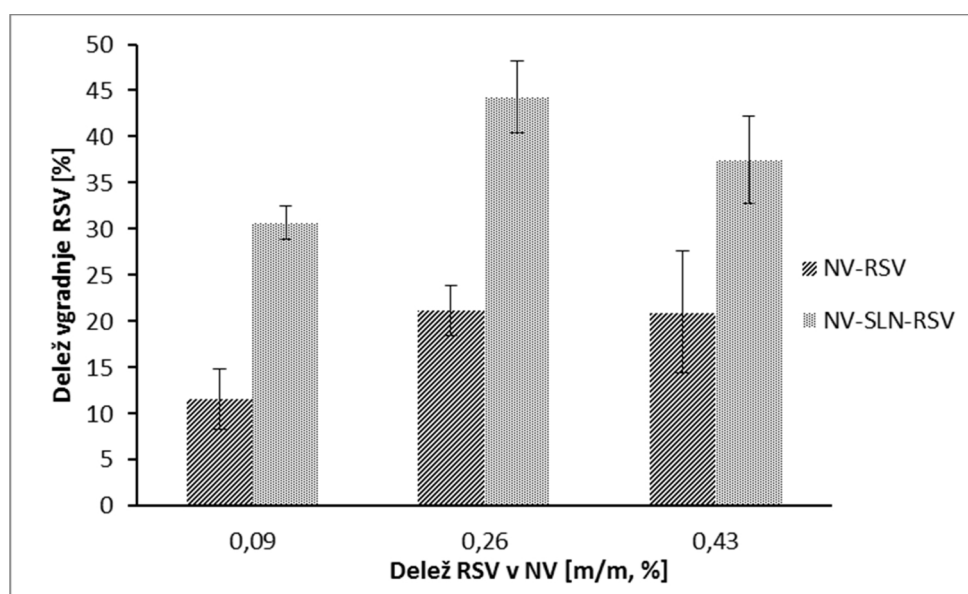
**Slika 31:** Delež izgubljenega RSV v metanol med 12 urno stabilizacijo NV. Primerjava med enakim masnim deležem RSV med sistemoma NV-RSV in NV-SLN-RSV.

Preglednica VII: Deleži izgubljenega RSV v metanol med stabilizacijo NV.

	NV-RSV (%)	NV-SLN-RSV (%)
NV z 0,09 (m/m) % RSV	71,83 ± 3,47	65,77 ± 2,28
NV z 0,26 (m/m) % RSV	65,06 ± 1,45	55,42 ± 3,62
NV z 0,43 (m/m) % RSV	60,21 ± 2,90	53,02 ± 5,80

#### 4.6 UČINKOVITOST VGRAJEVANJA RESVERATROLA V NANOVLAKNA

Učinkovitost vgradnje RSV v NV smo določili za oba dostavna sistema, NV-RSV in NV-SLN-RSV. Iz rezultatov je razvidno (Slika 32, Preglednica VIII), da smo v primerih, ko je bil RSV dodan v polimerno suspenzijo v obliki SLN-RSV (NV-SLN-RSV) dosegli večjo učinkovitost vgradnje v NV kot v primeru dispergirane RSV v suspenziji za elektrostatsko sukanje (NV-RSV). V vseh primerih k nižjim deležem vgradnje prispeva dejstvo, da izdelava NV ni potekala v popolni temi (elektrostatsko sukanje posameznega vzorca poteka več ur), kar se odraža na tem, da ne dosegamo popolne vgradnje RSV v NV, saj je RSV fotosensitivna spojina [17]. Trans-RSV se pri izpostavitvi svetlobi pretvarja v manj stabilno cis-obliko, ki pa je nismo merili. Glede na fotosensitivnost RSV in rezultate učinkovitosti vgradnje RSV v NV lahko sklepamo, da lipidno ogrodje vsaj deloma zaščiti RSV, saj je bil delež vgradnje v primeru SLN-RSV večji kot v primeru vgradnje samega RSV.



Slika 32: Primerjava učinkovitosti vgradnje RSV v NV-RSV in NV-SLN-RSV.

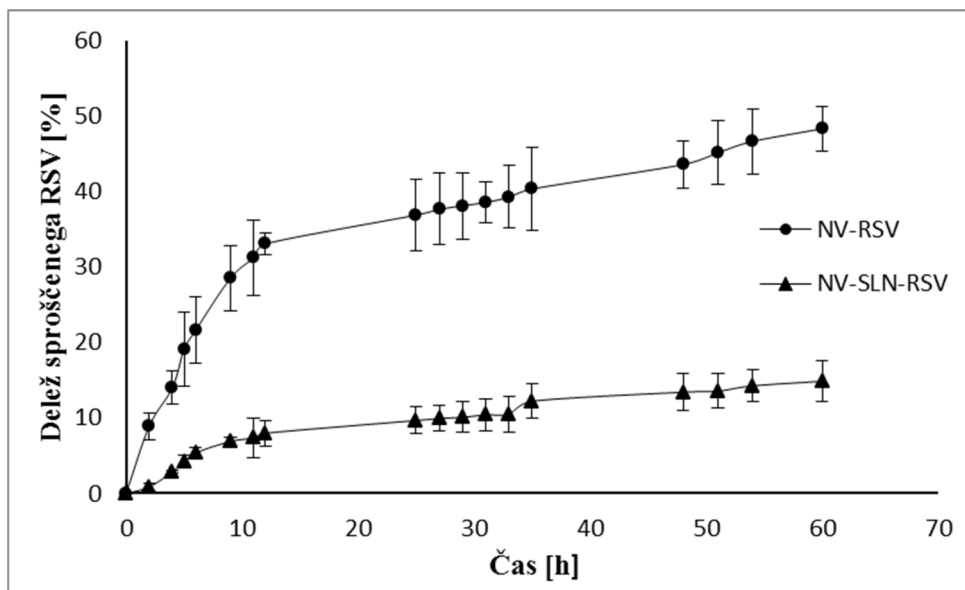
Preglednica VIII: Deleži vgradnje RSV v NV-RSV oz. NV-SLN-RSV.

	NV-RSV (%)	NV-SLN-RSV (%)
NV z 0,09 (m/m) % RSV	11,57 ± 3,26	30,66 ± 1,84
NV z 0,26 (m/m) % RSV	21,18 ± 2,71	44,35 ± 3,89
NV z 0,43 (m/m) % RSV	20,98 ± 6,63	37,50 ± 4,71

#### 4.7 SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ NANOVLAKEN

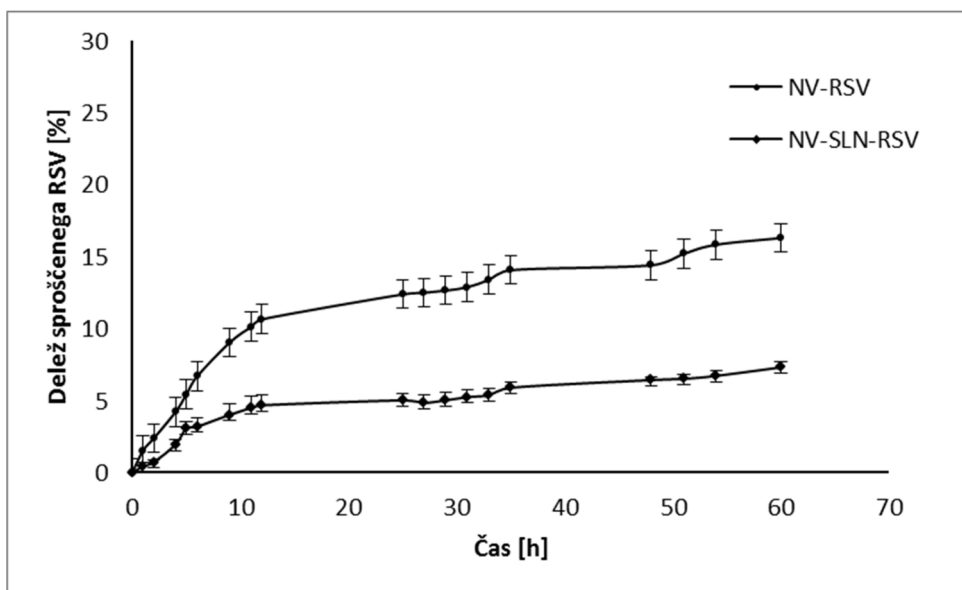
Določili smo časovni profil sproščanja RSV iz dostavnih sistemov NV-RSV in iz NV-SLN-RSV. Primerjali smo vpliv masnega deleža RSV v NV ter obliko vgradnje RSV v NV. Sproščanje RSV iz NV smo izvajali na stabiliziranih NV, saj smo s tem preprečili začetni hiter porast sproščenega RSV kot tudi razpad oz. raztapljanje PVA v PBS pufru. Profil sproščanja RSV v odvisnosti od časa (Slika 33) nam kaže, da se iz NV-RSV z 0,09 (m/m) % RSV, le ta v prvih 12 urah sprošča hitreje, nato pa se sproščanje upočasni. Iz grafa razberemo, da se RSV iz NV-RSV sprošča v prvih 12-ih urah štirikrat hitreje v primerjavi z RSV v NV-SLN-RSV. Nato pa pri obeh dostavnih sistemih sledi minimalno sproščanje, ki pa je v primeru NV-RSV hitrejše. Začetno hitrejše sproščanje RSV iz NV lahko pripišemo veliki specifični površini NV (velika površina stika med NV in medijem) in hidrofilitnosti PVA. Polimer v stiku z medijem nabreka, pride do nastanka por v strukturi NV, katere omogočajo difuzijo molekul RSV v medij. Glede na profile sproščanja sklepamo, da smo v obeh primerih dosegli upočasnjeno sproščanje skozi daljše časovno obdobje. Z vgradnjo RSV v NV kot SLN-RSV dosežemo še bolj upočasnjeno sproščanje RSV iz NV v primerjavi s sproščanjem RSV iz NV-RSV.





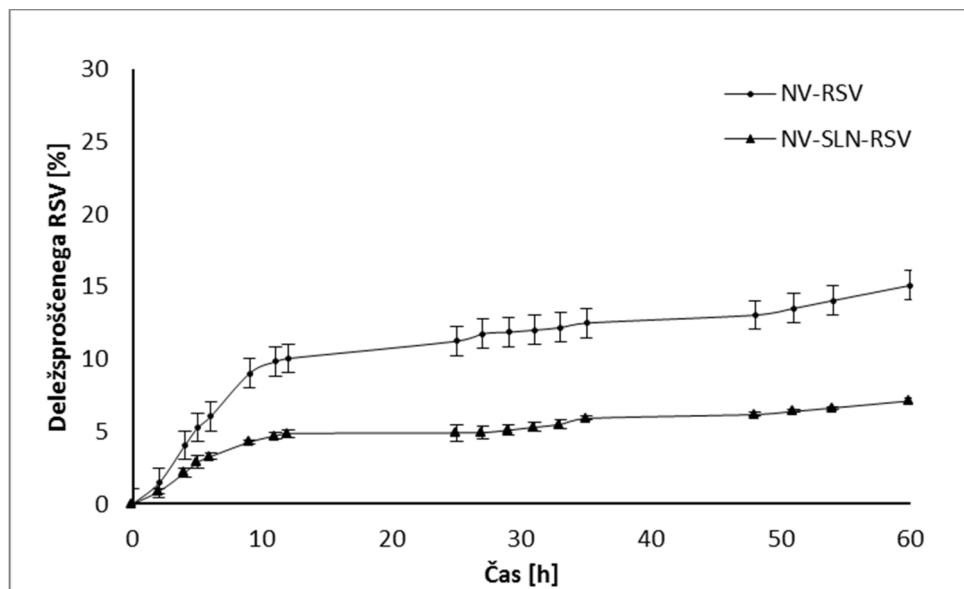
**Slika 33:** Časovni profil sproščanja RSV iz NV-RSV in NV-SLN-RSV z vgrajenim 0,09 (m/m) % RSV.

Pri NV z vgrajenim 0,26 (m/m) % deležem RSV opazimo manjšo razliko med deležem sproščene RSV iz NV-RSV in NV-SLN-RSV (Slika 34). Tudi v tem primeru imamo hitrejši porast sproščene RSV v prvih 12-ih urah, nato pa se sproščanje RSV zelo upočasni. Vzrok manjši razliki med deležem sproščene RSV iz NV-RSV in NV-SLN-RSV je lahko večji masni delež RSV, kar lahko vpliva na nastanek agregatov in ti zaradi večje velikosti težje prehajajo iz NV oz. sploh ne, saj je difuzija omejena tudi z velikostjo nastalih por v strukturi NV.



**Slika 34:** Časovni profil sproščanja RSV iz NV-RSV in NV-SLN-RSV z vgrajenim 0,26 (m/m) % RSV.

Tudi pri NV z vgrajenim 0,43 (m/m) % RSV nam graf prikazuje (Slika 35) upočasnjeno sproščanje pri obeh sistemih. Primerjava z NV z vgrajenim 0,26 (m/m) % RSV nam pokaže minimalno razliko v časovnem profilu sproščanja RSV med NV-RSV in NV-SLN-RSV. Iz tega lahko zaključimo, da oblika vgraditve RSV v NV (sam RSV ali SLN-RSV) vpliva na profil sproščanja le pri vzorcih z nižjim masnim deležem RSV. Opazili smo tudi, da je v primeru vgraditve večje količine RSV v NV (tako v obliki samega RSV kot v obliki SLN-RSV) sproščanje bolj upočasnjeno, kar bi lahko pripisali morebitnim agregatom (večjemu številu agregatov) med samimi delci ali pa temu, da se zaradi večje koncentracije delcev poveča tudi njihovo razporejanje v notranjost NV.



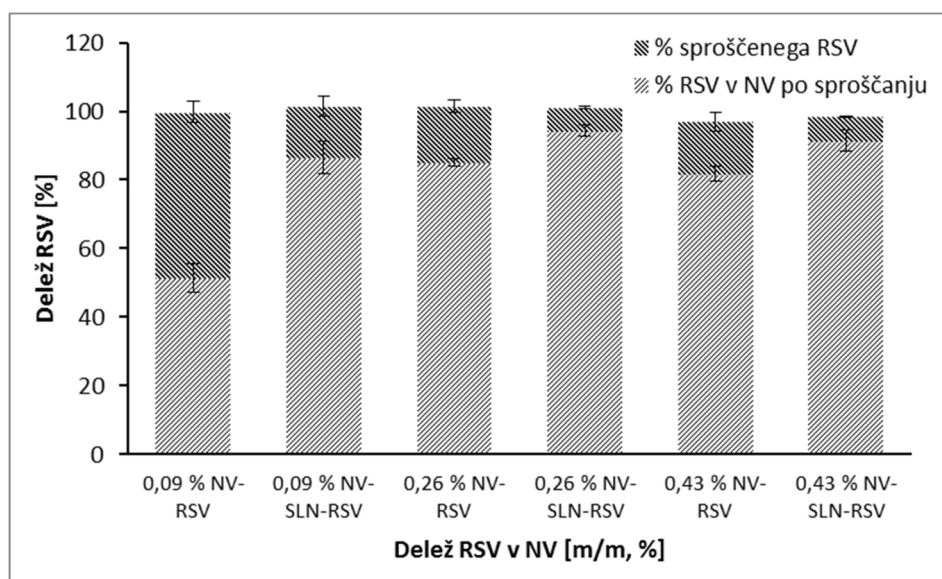
**Slika 35:** Časovni profil sproščanja RSV iz NV-RSV in NV-SLN-RSV z vgrajenim 0,43 (m/m) % RSV.

Iz profilov sproščanja RSV iz NV pri vseh vzorcih obeh dostavnih sistemov (NV-RSV in NV-SLN-RSV) vidimo, da nimamo začetnega pika »burst release« sproščene ZU, kljub temu pa lahko v prvih desetih urah opazimo hitrejše sproščanje. Sklepamo, da se RSV vgradi v notranjost NV, kar potrjujejo tudi SEM slike (Sliki 29 in 30), ki prikazujejo gladka NV brez kristalov RSV oz. nepravilnosti na površini NV. K hitrejšemu začetnemu sproščanju prispeva hitro nabrekanje polimera in hitrejše sproščanje RSV, ki se nahaja na oz. tik pod površjem NV. Pri nobenem vzorcu nismo dosegli popolne sprostitve RSV v času 60-ih ur, kolikor smo izvajali poizkus, temveč imamo dokaj nizke celokupne količine sproščenega RSV. Povzamemo lahko, da se že sam RSV iz NV-RSV sprošča zelo počasi, s

tem ko pa RSV predhodno vgradimo v SLN, sproščanje še dodatno upočasnimo. V našem primeru je poizkus sproščanja temeljil na difuziji RSV skozi nastale pore v strukturi NV. Takoj ko začne polimer nabrekati, pride do solvatacije molekul RSV oz. SLN in le ti lahko začnejo difundirati iz polimernega ogrodja. Na sproščanje vpliva tudi čas stabilizacije PVA NV v metanolu, saj se s podaljševanjem namakanja NV v alkoholu povečuje stopnja premreženosti NV, kar otežuje difuzijo učinkovine iz notranjosti NV v medij [31], vendar v magistrski nalogi vpliva časa stabilizacije nismo proučevali.

#### 4.8 OSTANEK RESVERATROLA V NANOVLAKNIH PO SPROŠČANJU

Zaradi nizkih celokupnih količin sproščenega RSV iz NV smo po končanem 60 urnem sproščanju preverili količino RSV, ki ostane v NV. S tem poizkusom smo dokazali, da nam večina RSV po končanem sproščanju ostane v NV (Slika 36, Preglednica IX). Če primerjamo deleže RSV, paralelnih vzorcev (NV-RSV in NV-SLN-RSV), ki ostanejo v NV opazimo, da nam več RSV ostane v NV-SLN-RSV, kot v NV-RSV. Že sama polimerna NV upočasnijo sproščanje, ko pa imamo RSV še dodatno vgrajen v SLN, dobimo še dodatno upočasnjeno sproščanje. Glede na profil sproščanja sistem NV-SLN-RSV zagotavlja zelo upočasnjeno sproščanje, vendar imamo hitrejši začetni porast RSV, kar je zaželjeno, da zaustavimo začetne radikalske reakcije, nato pa sistem omogoča dolgotrajno nadzorovano sproščanje in s tem nadzorovano koncentracijo RSV več dni.



**Slika 36:** Prikaz deležev sproščenega RSV med sproščanjem in deleža RSV, ki ostane v NV po končanem sproščanju.

Preglednica IX: Vrednosti sproščene RSV in RSV, ki ostane v NV po sproščanju.

Vrsta NV	% RSV v NV po sproščanju	% sproščene RSV	Skupaj %
0,09 % NV-RSV	51,48 ± 4,26	48,29 ± 2,97	99,77 ± 1,53
0,09 % NV-SLN-RSV	86,60 ± 4,80	14,87 ± 2,86	101,47 ± 4,36
0,26 % NV-RSV	85,09 ± 1,19	16,30 ± 1,87	101,39 ± 0,89
0,26 % NV-SLN-RSV	94,26 ± 1,16	6,77 ± 0,42	101,03 ± 1,79
0,43 % NV-RSV	81,91 ± 2,16	15,07 ± 2,71	96,98 ± 0,45
0,43 % NV-SLN-RSV	91,37 ± 3,02	7,10 ± 0,18	98,47 ± 2,79

## 5 SKLEP

Izdelali in primerjali smo enostaven (NV-RSV) in kompoziten nano-dostavni sistem (NV-SLN-RSV). Najprej smo izdelali SLN. Pri testiranu različnih receptur za izdelavo SLN smo ugotovili, da na fizikalne lastnosti disperzije SLN, kot so velikost delcev, PDI in ZP, vpliva sestava recepture za SLN. Nato smo v izbrane SLN z najustreznejšimi fizikalnimi lastnostmi vgradili RSV, ter ponovno ovrednotili fizikalne lastnosti SLN-RSV, učinkovitost vgradnje in profil sproščanja. Ugotovili smo, da nam disperzija z 10 % (m/m) deležem vgrajevanega RSV glede na lipid daje še ustrezne lastnosti SLN. Iz profila sproščanja razberemo, da nam ta sistem zagotavlja podaljšano sproščanje nekaj več kot 60 ur. Nadalje smo te SLN z RSV vgradili v NV iz PVA. Za primerjavo smo izdelali NV z vgrajenim RSV. Ugotovili smo, da na pojav morfoloških nepravilnosti NV vplivata masni delež in oblika vgrajenega RSV ter RH. V primeru 0,94 % m/m RSV v NV-RSV pride do pojava kristalov na površini NV, pri NV-SLN-RSV pa do nastanka vozlov in padca premera pri NV izdelanih pri  $20 \pm 2$  % RH. NV z različnimi (m/m) % RSV smo stabilizirali z namakanjem v metanolu, s čimer smo izboljšali mehanske lastnosti NV, vendar s tem izgubili velik delež RSV zaradi dobre topnosti RSV v metanolu. Če primerjamo sistema NV-RSV in NV-SLN-RSV pa v primeru SLN-RSV izgubimo za približno 10 % manj RSV. Prav tako imamo v primeru SLN-RSV za približno 20 % boljšo učinkovitost vgradnje RSV, ne glede na (m/m) % RSV v NV. Primerjava profilov sproščanja pokaže razlike v sproščanju RSV glede na (m/m) % RSV v NV in predvsem glede na obliko vgrajenega RSV. Sproščanje iz NV z SLN-RSV je počasnejše v primerjavi z vgrajenim samim RSV v NV. Glede na rezultate lahko povzamemo, da je vgradnja RSV v SLN in nato le-te v polimerna NV smiselna za podaljšano sproščanje. Da bi bila NV z RSV, kot antioksidantom, primerna za zdravljenje kroničnih ran, bi morala zagotavljati takšno koncentracijo RSV na rani, ki bi bila sposobna vzpostaviti ravnotežje med tvorbo reaktivnih snovi in antioksidativno obrambo. Tako bi s skrajšano fazo vnetja pripomogla k hitrejšemu celjenju rane, kamor prispeva predvsem struktura NV, ki s posnemanjem zunajceličnega ogrodja spodbuja celično rast in obnovo tkiv.

## 6 LITERATURA

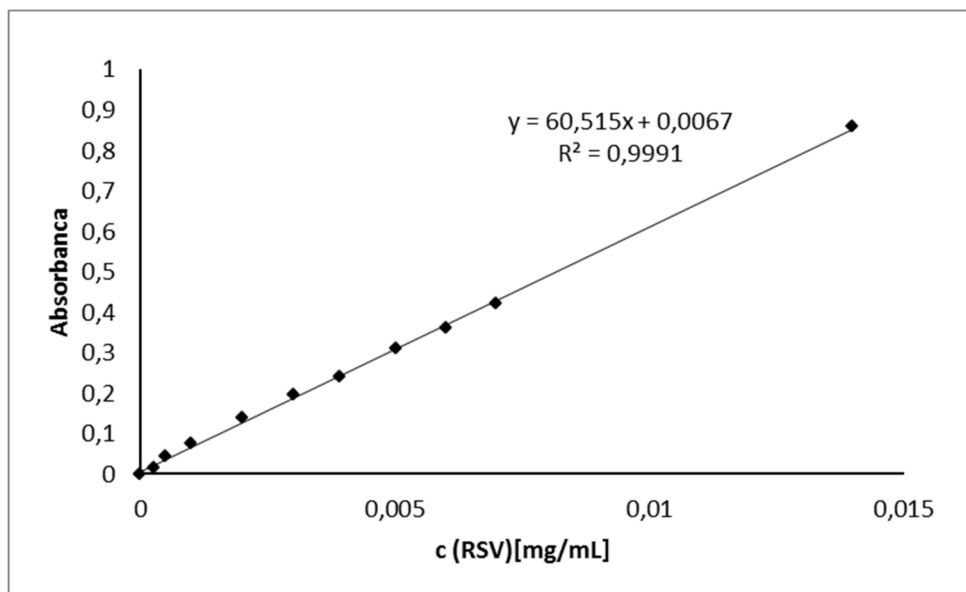
1. Zhang, Y., et al., Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2005. 16(10): p. 933-946.
2. Faraji, A.H. and P. Wipf, Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009. 17(8): p. 2950-2962.
3. Singh, R. and J.W. Lillard, Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 2009. 86(3): p. 215-223.
4. Müller, R.H., K. Mäder, and S. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000. 50(1): p. 161-177.
5. Mehnert, W. and K. Mäder, Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012. 64, Supplement(0): p. 83-101.
6. Pelipenko, J., et al., The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013. 456(1): p. 125-134.
7. Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 2010. 28(3): p. 325-347.
8. Pillay, V., et al., A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2013. 2013: p. 1-22.
9. Beachley, V. and X. Wen, Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Progress in Polymer Science*, 2010. 35(7): p. 868-892.
10. Huang, Z.-M., et al., A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 2003. 63(15): p. 2223-2253.
11. Sill, T.J. and H.A. von Recum, Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 2008. 29(13): p. 1989-2006.
12. Enoch, S. and D.J. Leaper, Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 2005. 23(2): p. 37-42.

13. Cegnar M, B.S., Kristl J.: Vlažna oskrba rane s sodobnimi oblogami. Medicinski razgledi, 2007. 46: p. 235-247.
14. Underdown, Mary Jane : "Antioxidants and Wound Healing" (2013). Undergraduate Honors Thesis Series. Paper 65. <http://dc.etsu.edu/honors/65>
15. Kristl, J., et al., Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009. 73(2): p. 253-259.
16. Shakibaei, M., K.B. Harikumar, and B.B. Aggarwal, Resveratrol addiction: To die or not to die. Molecular Nutrition & Food Research, 2009. 53(1): p. 115-128.
17. Amri, A., et al., Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? Journal of Controlled Release, 2012. 158(2): p. 182-193.
18. Zahedi, P., et al., A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. Polymers for Advanced Technologies, 2010. 21(2): p. 77-95.
19. Thakur, R.A., et al., Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. International Journal of Pharmaceutics, 2008. 364(1): p. 87-93.
20. Lee, K.Y., et al., Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009. 61(12): p. 1020-1032.
21. Katti, D.S., et al., Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2004. 70B(2): p. 286-296.
22. Teskač, K. and J. Kristl, The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. International Journal of Pharmaceutics, 2010. 390(1): p. 61-69.
23. [http://www.americanlecithin.com/TDS/TDS\\_90H.PDF](http://www.americanlecithin.com/TDS/TDS_90H.PDF) (dostop marec 2014).
24. [http://www.americanlecithin.com/TDS/TDS\\_80H.PDF](http://www.americanlecithin.com/TDS/TDS_80H.PDF) (dostop marec 2014).
25. [http://www.americanlecithin.com/TDS/TDS\\_80.PDF](http://www.americanlecithin.com/TDS/TDS_80.PDF) (dostop marec 2014).
26. Schubert, M.A. and C.C. Müller-Goymann, Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2005. 61(1-2): p. 77-86.

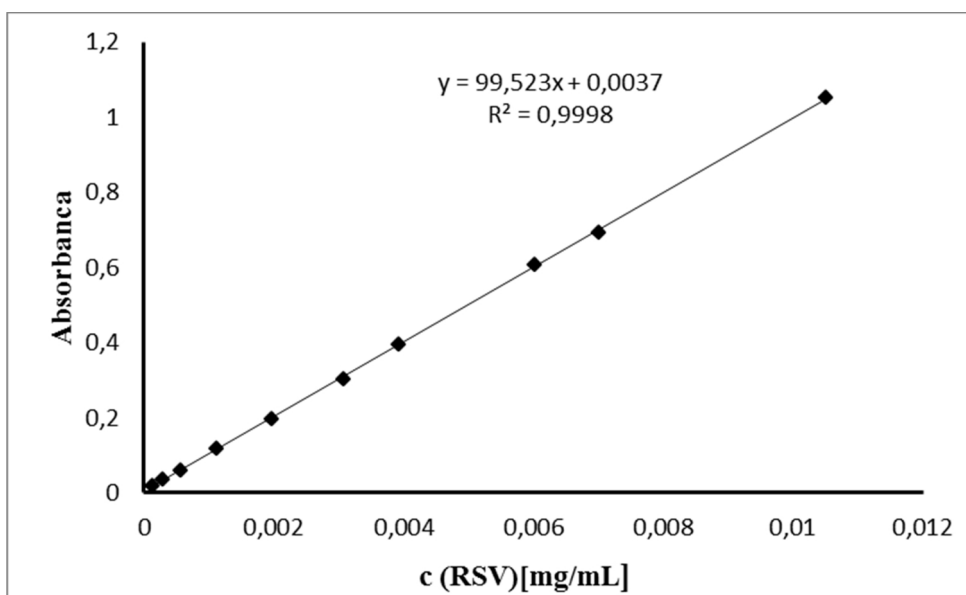
27. Lee, C.T., et al., Water-in-Carbon Dioxide Emulsions: Formation and Stability. *Langmuir*, 1999. 15(20): p. 6781-6791.
28. Sauter, C., et al., Influence of hydrostatic pressure and sound amplitude on the ultrasound induced dispersion and de-agglomeration of nanoparticles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2008. 15(4): p. 517-523.
29. Camont, L., et al., Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta*, 2009. 634(1): p. 121-128.
30. Westesen, K. and H. Bunjes, Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? *International Journal of Pharmaceutics*, 1995. 115(1): p. 129-131.
31. Kenawy, E.-R., et al., Controlled release of ketoprofen from electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers. *Materials Science and Engineering: A*, 2007. 459(1-2): p. 390-396.
32. Rošić, R., et al., Physical characteristics of poly (vinyl alcohol) solutions in relation to electrospun nanofiber formation. *European Polymer Journal*, 2013. 49(2): p. 290-298.
33. Ding, B., et al., Preparation and characterization of a nanoscale poly(vinyl alcohol) fiber aggregate produced by an electrospinning method. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2002. 40(13): p. 1261-1268.



## 7 PRILOGE



Slika P1: Umeritvena krivulja za spektrofotometrično določanje količine RSV v metanolu.



Slika P2: Umeritvena krivulja za spektrofotometrično določitev koncentracije RSV v PBS pufri.