



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIA ZEHATZAK ETA NATUR ZIENTZIAK

**Lipido Solidozko Nanopartikulak
substantzia liposolugarrien
garraio eta egonkortasuna
hobetzeko**

L. Arana, F.M. Goñi eta I. Alkorta

293-299 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.39>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



eman ta zabal zazu



LAGUNTZAILEAK:



UDALBILTZA



Lipido Solidozko Nanopartikulak substantzia liposolugarrien garraio eta egonkortasuna hobetzeko.

Arana L, Goñi FM, Alkorta I.

Biofisika Unitatea (CSIC, UPV/EHU) eta Biokimika eta Biologia Molekularra Saila (EHU)

[lide.arana@ehu.es](mailto:lde.arana@ehu.es)

Laburpena

Lipido solidozko nanopartikulak (SLN) farmakoen garraio bideratua lortzeko nanogarraiatzaile interesgarrietakoak bihurtu dira azken urteotan. Farmako hidrosolugarri nahiz liposolugarriak garraiatzeko gai dira, toxikotasun baxua dute, konposatuaren askapen kontrolatua lortzeko baliagarriak dira eta gorputzeko hainbat barrera zeharkatzeko gai dira. Ezaugarri hauen ondorioz garraiatzen duten farmakoaren bioeskuragarritasuna hobetzen dute terapia askoren efizientzia hobetuz. Lan honetan gantz-azido, soja lezitina eta behazun-gatzez osaturiko 5 konposizio ezberdin sortu eta karakterizatu ditugu. Gure emaitzen arabera konposizioa oso garrantzitsua da partikulen tamaina, homogeneotasun eta egonkortasunerako baina ez da hain garrantzitsua konposatu liposolugarrien barneraketarako.

Hitz gakoak: farmakoen nanogarraiatzaileak, lipido solidodun nanopartikulak, gantz-azidoak, behazun-gatzak, soja-lezitina, farmako liposolugarrien barneraketa.

Abstract

Solid Lipid Nanoparticles (SLN) have emerged as some of the most promising nanocarriers for controlled drug delivery because of their ability to incorporate hydrophilic and lipophilic drugs, low toxicity, the improvement in controlled drug release, and increased drug diffusion through some biological barriers. Therefore, SLN improve drug solubility and bioavailability improving the efficiency of many treatments. In this work we have tested solid lipid nanoparticles (SLN) composed of long-chain fatty acids, soy bean lecithin, and bile salts. A total of five different systems were prepared and characterized. Our results suggest that SLN composition is essential for particle size, polydispersity and stability but not for drug incorporation efficiency.

Keywords: drug nanocarriers, solid lipid nanoparticles, fatty acids, bile salt, soy lecithin, hydrophobic drug incorporation.

1. Sarrera eta motibazioa

Azken urteotan argi geratu da gaixotasun konplexuen tratamenduaren hobekuntzarako farmako berrien garapena ez dela nahikoa. Izan ere, farmako batzuk disolbagarritasun urria dute uretan eta ondorioz ezin dira gorputzaren ingurune urtsuan barneratu beren egonkortasuna hobetuko duen garraiatzaile baten laguntzarik gabe.

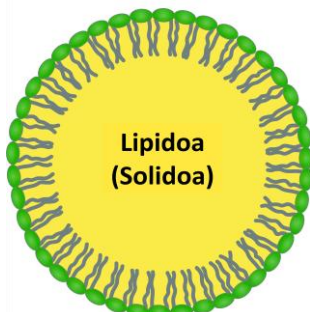
Beste batzuetan aldiz, tratamendu baten arrakasta gorputzaren barneko berezko barrerengatik murrizten da. Odola eta garuna bereizten dituen barrera hematoentzefalikoa esaterako garunera bideraturik dauden terapia askorentzat oztopo izaten da, odoleko kontzentrazioa izugarri handitu behar delarik garunean farmako kopuru zuzena lortu ahal izateko.

Ondorioz, farmako berrien sorrerarekin batera, substantzia hauen disolbagarritasuna, egonkortasuna, barreiadura eta askapen zinetika hobetuko dituzten garraiatzaileak garatzea ere behar beharrezkoa dela ikusi da.

Nanoteknologiak farmakoen garraioa hobetzen lagundu du. Sortu berri diren estrategia ezberdinen artean, Lipido Solidozko Nanopartikulak (SLN) aurkitzen dira. SLNak lipido solidozko dispersioak dira, 50-1000 nm bitarteko diametroa duten partikulez osatuak. Nukleo

gisa gorputzaren tenperaturaren egoera solidoan dagoen lipido bat izaten dute (kate luzeko gantz-azidoak, triazilgliceridoak, argizariak, eta abar) eta lipido hau ingurune urtsu batetan egonkortzen duen surfaktante (eta kosurfaktante) batez inguratuta egoten da (1. Irudia).

1. Irudia. Lipido solidozko nanopatikula baten egitura orokorra. Barneko lipidoa solido egoeran dago (horiz) eta surfaktante molekulez inguraturik egoten da (berdez).



Lipido solidozko nanopartikulek hainbat abantaila eskaintzen dituzte nanogarriatzaile moduan. Konpostatu lipofiliko nahiz hidrofiliakoak barneratzeko gai direla ikusi da, toxikotasun baxua izaten dute eta produkzioa eskala handitan egitea erraza izaten da kostuak asko merketzen direlarik (Marengo, Cavalli et al. 2000; Kreuter 2001; Mehnert and Mader 2001; Sinha, Srivastava et al. 2010). Nukleo solidoa dutenez, farmakoaren askapena kontrola daiteke eta disolbatzailearen ondorioz gertatu ohi den farmakoaren degradazioa ekidin daiteke (Wissing, Kayser et al. 2004). Beren tamaina eta liposolugarritasunari esker gorputzeko zenbait mintz eta barrera gurutzatzeko gai dira, hala nola, barrera hematoentzefalikoa (Blasi, Giovagnoli et al. 2007; Sarin 2010) edo gibelego eta areko filtrazio prozesuak (Muller, Maassen et al. 1996). Zoritxarrez, ikerketa gutxi egin dira arlo honetan eta oraindik ez da oso ongi ezagutzen zein mekanismo bidez iristen diren SLNak garunera (Gastaldi, Battaglia et al. 2014).

Farmakoen garraioaren alorrean garrantzia handia hartu du garraio bideratuak. Izan ere, gorputzean barneratzen diren farmakoak gorputz osora barreiatzen dira efektu sekundarioak sortuz. Kimioterapiaren kasuan, adibidez, garbi geratu da farmakoaren garraioa itu-zeluletara soilik bideratzea lortuz gero albo-ondorioak asko murriztuko lirartekeela.

SLNek ezaugarri interesgarriak dituzte farmakoen garraio bideraturako, minbizien tratamenduan batez ere. Izan ere, minbizi solidoen ingurunean "iragazkortasun handipenaren efektua" gertatzen da, hau da, odoletik ehunera iragazten diren makromolekulen kopuruak gora egiten duela minbizi-zelulen inguruan (Maeda, Nakamura et al. 2012). Ondorioz, minbizi-zeluletara farmako bat bideratu nahi izanez gero, SLNetan barneratuta bertara iristeko aukerak handituko genituzke.

SLNen konposizioa kontu handiz hautatu behar da gure itu-ehunaren eta txeratu nahi den substantziaren arabera. Surfaktante batzuek eragina dute nanopartikulen gorputz barneko banaketan. Adibidez, surfaktante batzuk konposatu batzuen garunerako garraioa handitzen dutela ikusi da (Kreuter 2001; Goppert and Muller 2003). Honetaz gain, nanopartikulen gainazalean garraio bideratua errazten duten molekulak gehi daitezke, interesatzen den ehun edo zelulara selektiboki bideratu ahal izateko.

Ondorioz, erabilpenaren, itu-zelulen edota gainditu behar diren gorputzeko mintzen arabera nanopartikulen konposizioa kontu handiz hautatu beharreko zerbait da.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gorputzean zeharreko konposatuen garraio bideratuak ikerketa farmakologikoa irauli du, farmakoentzat garriatzaile egokiak garatzeak tratamendu ugariaren efizientzia hobetu duelarik. Nanogarriatzaileen alorrean SLNak alternatiba ez-toxiko egokiak dira, gorputzarentzat ezagun

diren molekulaz osaturik baitaude. Orokorrean, osagaiak lipido solidoak, surfaktantea eta ura izaten dira

Bestalde, toxikotasuna murrizte aldera, nanopartikulak osatzeko metodologia ere egoki hautatu behar da. SLN sortzeko erabil daitezkeen metodo ezberdinen artean mikroemultsioaren teknika (Morel, Terreno et al. 1998; Cavalli, Gasco et al. 2002) jarraitzea erabaki genuen abantaila ugari eskaintzen dituelako. Teknika hau disolbatzaile organikorik gabe burutu daiteke (toxikotasuna murriztuz) eta agregazio-joera (partikulak elkarren artean itsasteko joera) murrizten duela ere ikusi da (Mehnert and Mader 2001).

SLNak nanogarraiatazile egokiak izateko hainbat baldintza bete behar dituztela onartu da. Hala nola, lipidoak solido egoeran egon behar du gorputzeko tenperaturan, eta nanopartikulek agregazio joera murrizta, polidispersitate txikia (homogeneotasun handia) eta tamaina aproposa izan behar dituzte (Cavalli, Gasco et al. 2002; Gastaldi, Battaglia et al. 2014).

Honenbestez, lan honen helburu nagusiak ondorengoak dira:

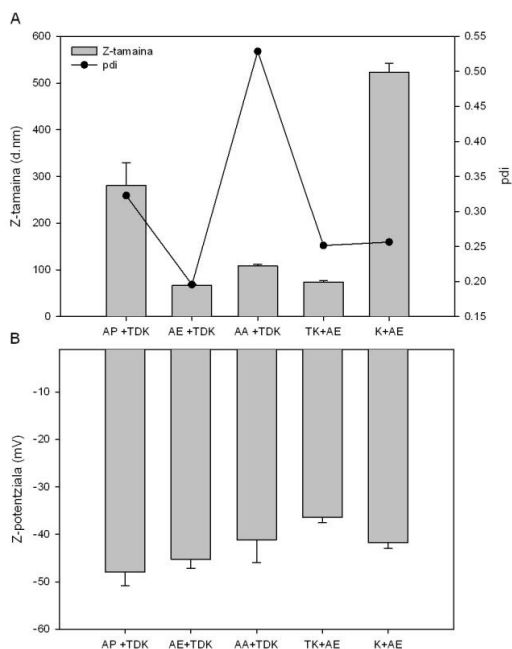
- Konposatu liposolugarriak garraiatzeko gai izango diren SLN egonkor eta aproposak garatzea mikroemultsioaren teknika erabiliz.
- Ezaugarri egokiak mantentzen dituztela ziurtatzea beren tamaina, polidispersitatea, agregatzeko joera eta lipidoaren egoera aztertuz.
- SLNek zeluletan barneratzeko duten joera aztertzea.

3. Ikerketaren muina

Lan honetan kate luzera ezberdineko gantz-azido aseak (palmitikoa C16:0, AP; estearikoa C18:0, AE; edo arakidikoa C20:0, AA) erabili dira lipido solido gisa, Epikuron 200 (soja-lezitina, fosfatidilkolina gehienbat) surfaktante moduan eta behazun-gatzak (kolatoa, K; taurokolatoa, TK; edo taurodesoxikolatoa, TDK) kosurfaktante moduan. Osagai guztiak sistema biologikoen parte dira.

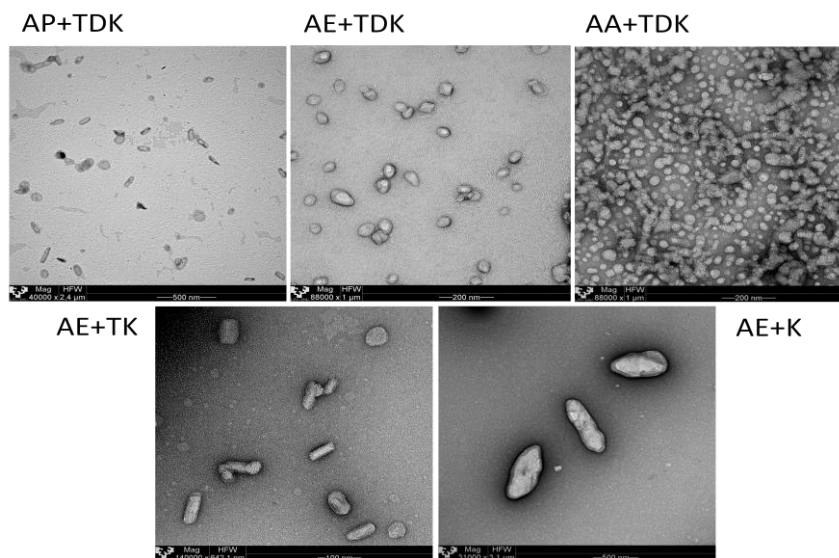
Bi esperimentu sorta burutu ziren, batetan taurodesoxikolatoa kosurfaktante gisa mantenduz eta gantz-azidoa aldatu zen eta bestean azido estearikoa gantz-azido moduan erabiliz eta kosurfaktantea aldatu zen guztira 5 nahaste ezberdin lortu zirelarik. Nanopartikula suspentsio bakoitzaren ezaugarri fisiko-kimikoak determinatu ziren partikulek eragindako argiaren dispersioa aztertuz (fotoi korrelazio espektroskopia bidez). Hala nola, nanopartikulen batzbesteko diametroa, polidispersitate indizea (pdi, dispersioaren homogeneotasuna adierazten duen faktorea) eta z-potentziala (partikulek agregaziorako duten joera determinatzen duen faktorea). 2. Irudian ikus daitezkeen moduan, ezaugarri aproposenak aurkezten dituen nanopartikula mota azido estearikoz, Epikuron 200-ez eta taurodesoxikolatoaz osaturikoa da. Batz best 70 nm inguruko diametroan partikulez osaturik dago (diametroa < 200 nm izan behar da gorputzean barneratu nahi direnean), nahaste homogeneoa da (pdi < 0,2) eta egonkortasun maila ona erakusten dute (z-potentziala > |40 mV| denean agregazio joera txikia dutela kontsideratzen da).

2. Irudia. Hautatutako lipido konposizio ezberdinek dituzten ezaugarriak. A. Partikulen batz besteko diametroa eta polidispersitate indizea. **B.** Partikulen z-potentziala.



Nanopartikulen forma mikroskopio elektronikoz aztertu genuen, argiaren dispersioa aztertuz lorturiko emaitzak zuzenak zirela egiaztatzen. Mikroskopio bidez lortutako irudiak bat datoz aurreko irudian azaltzen diren datuekin (3. Irudia).

3. Irudia. SLN dispersio ezberdinen transmisiozko mikroskopio elektronikoko bidezko irudiak.



SLNek bete behar duten beste ezaugarri garrantzitsu bat gorputzeko tenperaturan (37°C) solido egoeran egotea da. Hau ziurtatzeko nanopartikulak kalorimetria bidez aztertu genituen. Teknika honi esker, lipido solidoaren egoera aldaketa (solidotik likidora) zein tenperaturatan ematen den jakin daiteke. 1. Taulan ikus daitezkeen moduan, erabilitako lipido nahaste guztien trantsizio tenperatura (Tm) 37°C baino altuagoa da. Ondorioz, nahaste guztiek betetzen dute baldintza hau.

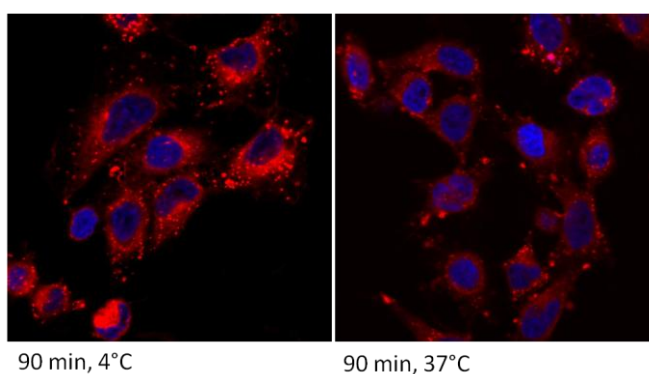
1. taula. Aztertutako dispersioen solido-likido trantsizio tenperatura.

Nanopartikulen osagaiak (Epikuron 200z gain)	T _m (°C)
(A) Az. palimitikoa + taurodesoxikolatoa	60.3
(B) Az. Estearikoa + taurodesozikolatoa	67.4
(C) Az. arakidikoa + taurodesoxikolatoa	60.6
	72.5
(D) Az. estearikoa + taurokolatoa	66.5
(E) Az. estearikoa + kolatoa	67.5

Zunda fluoreszente liposolugarri baten laguntzarekin hautatutako nanopartikulek substantzia liposolugarriak barneratzeko duten gaitasuna aztertu genuen. Nahaste guztiek zunda barneratzeko antzeko gaitasuna zutela ikusi genuen (erakutsi gabeko datuak). Eraitza hau ez da harritzekoa, izan ere, substantziak barneratzeko gaitasuna barneko lipidoak substantzia hori disolbatzeko duen gaitasunaren araberakoa da eta erabilitako gantz-azidoen kateen luzera ezberdina izan arren zunda disolbatzeko antzeko gaitasuna dute.

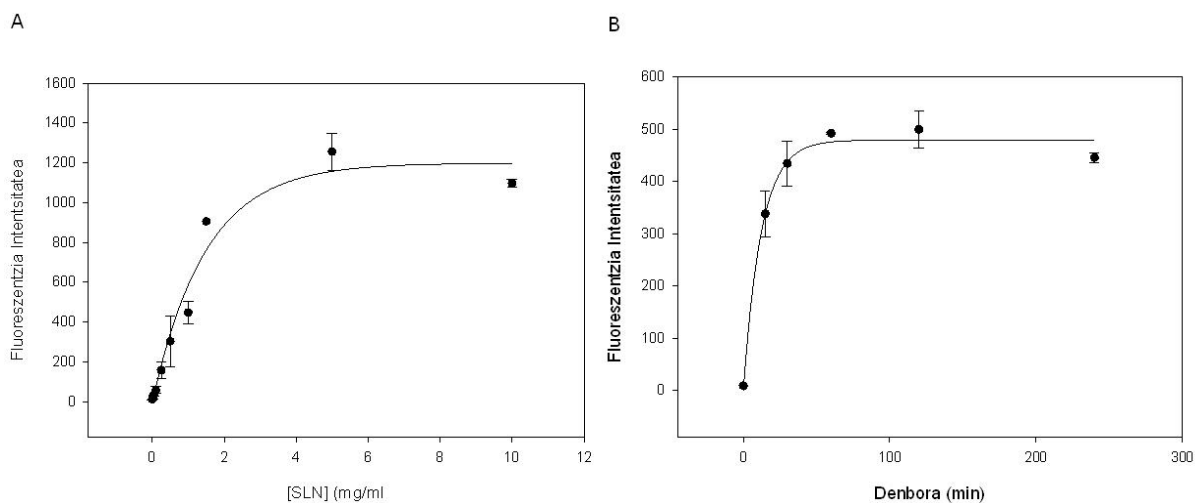
Zundaren txertaketa tresna erabilgarria da nanopartikulen kokapena aztertzeko, zundak igortzen duen argia mikroskopio bidez detekta baitaiteke. Baliabide honi esker, zelula kultura baten presentzian nanopartikulen joera azter daiteke. Ezaugarri egokienak eskaintzen dituzten nanopartikula nahastea azido esteariko, Epikuron 200 eta taurodesoxikolato osaturik daudenak direnez, nahaste hau erabili genuen saio hau egiteko. Zelula kultura bati nanopartikula fluoreszenteak gehitu genizkien gorputzeko tenperaturan (37°C) eta 4°Ctan. Bi egoeretan nanopartikulak zelula barnera sartzen direla ikusi genuen oso denbora laburrean (4. irudia).

4. Irudia. Denbora gutxiren buruan nanopartikulak zeluletan sartzen dira. Zunda fluoreszentedun nanopartikulak (gorriz) eta zelulen nukleoak (urdinez).



Azkenik, nanopartikula mota berdinak erabiliz zelulako barneraketa kuantifikatu genuen beste teknika bati esker (fluxu zitometria). Eraitza hauei esker ondorioztatu genuen nanopartikulen barneraketa denboraren eta kontzentrazioaren araberakoa dela eta gainera baldintza batzuetan linealtasuna galdu egiten dela (saturaziora iristen garela) (5. Irudia).

5. Irudia. Zunda fluoreszentedun naopartikulek denboraren eta kontzentrazioaren arabera sarrera joera dute zeluletan.



4. Ondorioak

Burututako esperimentuetatik ondoriozta dezakegu Epikuron 200, gantz-azido eta behazungatzez osaturiko nanopartikuletan gantz-azidoaren katearen luzerak eragina duela partikulen tamainuan, forman eta ezaugarri termikoetan. Bestalde, azido estearikoz eta taurodesoxikoloz osaturiko dispersioak nanopartikula txikiagoak, homogeneousagoak (tamaina eta formari dagokionez) eta egonkorragoak osatzen ditu. Gainera konposizio hau zelulek erraz barneratzen dute sarrera denboraren eta kontzentrazioaren arabera delarik.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lortutako SLNak tresna interesgarriak dira uretan disolbatzen ez diren substantziak disoluzio urtsuetan egonkortzeko eta zelulen mintz-plasmatikoa gurutzatzea errazteko. Dena den, nanopartikula hauek modu ez selektibo batean barneratzen dira zeluletan eta aurrez aipatu arrazoiengatik, farmakoen garraio bideratua lortu ahal izateko ezinbestekoa da garatutako nanopartikulak gure itu-zelulei modu zehatz batean lotzea. Honetarako nanopartikulen gainazalean azaltzen diren molekulak eralda ditzakegu, interesatzen zaizkigun zelulei soilik itsasteko eta ondorioz modu aktibo batetan barneratuak izateko.

Ondorioz, lan honen hurrengo pausua helburu honetan lagunduko digun molekulak hautatu eta nanopartikulen gainazalean txertatzea izango da.

6. Erreferentziak

Blasi, P., et al. (2007), Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 59(6): 454-77.

Cavalli, R., et al. (2002), Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int J Pharm* 238(1-2): 241-5.

Gastaldi, L., et al. (2014), Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: Current state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.*

Goppert, T. M. and R. H. Muller (2003), Plasma protein adsorption of Tween 80- and poloxamer 188-stabilized solid lipid nanoparticles. *J Drug Target* 11(4): 225-31.

- Kreuter, J. (2001), Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 47(1): 65-81.
- Maeda, H., et al. (2012), The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 65(1): 71-9.
- Marengo, E., et al. (2000), Scale-up of the preparation process of solid lipid nanospheres. Part I. *Int J Pharm* 205(1-2): 3-13.
- Mehnert, W. and K. Mader (2001), Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 47(2-3): 165-96.
- Morel, S., et al. (1998), NMR relaxometric investigations of solid lipid nanoparticles (SLN) containing gadolinium(III) complexes. *Eur J Pharm Biopharm* 45(2): 157-63.
- Muller, R. H., et al. (1996), Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. *J Drug Target* 4(3): 161-70.
- Sarin, H. (2010), Overcoming the challenges in the effective delivery of chemotherapies to CNS solid tumors. *Ther Deliv* 1(2): 289-305.
- Sinha, V. R., et al. (2010), Solid Lipid Nanoparticles (SLN'S) – Trends and Implications in Drug Targeting. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences* 1: 212-238.
- Wissing, S. A., et al. (2004), Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 56(9): 1257-72.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan honek Bizkaiko Foru Aldundiaren laguntza jaso du 6/12/TK/2012/00026 proiektuaren bidez. Egileek eskerrak ematen dizkie Prof. J.L. Pedraz eta Dr. Jon Zarateri z-potentziala neurtzeko egindako saioetan emandako laguntzagatik.