



2023 - 2024

# ERRETINAREN TERAPIA ANTI-INFLAMATORIORAKO NANOPARTIKULA LIPIDIKOAK GARATZEA ETA EBALUATZEA

LEXURI GONZALEZ DE HEREDIA  
VADILLO

GRADU AMAIERAKO LANA - FARMAZIAKO GRADUA



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

FARMAZIA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE FARMACIA

## Aurkibidea

0. Laburpena.....	0
1. Sarrera .....	1
2. Helburuak .....	4
3. Materialak eta metodologia.....	5
3.1. Aurretiko prestakuntza.....	5
3.2. MCC950 inhibitzailearen egonkortasun termikoa aztertzea, kalorimetria bidez.....	5
3.3. Inflamasomaren inhibitzaileekin kargatutako NLC nanopartikulak elaboratzea.....	6
3.4. NLC nanopartikulen karakterizazio fisiko-kimikoa.....	7
3.5. MCC950 proteinaren kapsulazio-eraginkortasuna aztertzea.....	7
3.6. ARPE-19 zelulen <i>in vitro</i> hazkuntza .....	8
3.7. Estimulu pro-inflamatorioaren dosi-erantzun harremana aztertzea ARPE-19 zeluletan.....	8
3.8. ARPE-19 zeluletan NLC partikulak barneratzen diren aztertzea.....	9
3.9. MCC950-dun NLC-en eraginkortasun anti-inflamatorioa aztertzea.....	9
3.10. Analisi estatistikoa.....	9
4. Garapena: Emaitzak eta eztabaida.....	10
4.1. MCC950 inhibitzailearen egonkortasun termikoa aztertzea, kalorimetria bidez...	10
4.2. NLC nanopartikulen karakterizazio fisiko-kimikoa.....	11
4.3. MCC950 proteinaren kapsulazio-eraginkortasuna aztertzea.....	13
4.4. Estimulu pro-inflamatorioaren dosi-erantzun harremana aztertzea ARPE-19 zeluletan.....	13
4.5. ARPE-19 zeluletan NLC partikulak barneratzen diren aztertzea.....	14
4.6. MCC950-dun NLC-en eraginkortasun anti-inflamatorioa aztertzea .....	15
5. Ondorioak.....	18
6. Bibliografia .....	19

## Laburpena

Erretinako endekapen-gaixotasunak morbilidadate-kausa garrantzitsu bat bihurtu dira gaur egungo gizartean, ikusmen-urritasuna eragiten baitute. Inflamazioak rol garrantzitsua du gaixotasun hauen progresioan. Horregatik, lan honetan, erretinako zeluletan (RPE) inflamazioa inhibitzea proposatzen da, zelulen heriotza gutxitzeko. Arazoa da, begiek hainbat hesi fisiko eta fisiologiko dituztenez, ez dela batere erraza farmakoak begian mantentzea eta hesi biologiko horiek zeharkatzea, eraginkorrak izan daitezen. Azken urteetan, NLC-ek (*Nanostructured Lipid Carriers*) ospea hartu dute farmakoak banatzeko plataforma gisa. Hori dela-eta, MCC950 konposatua —NLRP3 inflamasomaren inhibitzailea dena— NLC nanopartikuletan kapsulatu da eta haren eragina aztertu da, TNF- $\alpha$  molekularen ondorio kaltegarriak ekiditeko neurri gisa. Emaitzek agerian utzi dute MCC950-dun NLC-ak, kontzentrazio baxuetan, eraginkorrak direla inflamazioa ekiditeko eta zelulen bideragarritasuna hobetzeko. Gainera, MCC950 puruarekin konparatuta dituzten abantailak kontuan hartuta, argi ikusten da jarraitu beharko litzatekeela NLC-en ikerketarekin eta erretinako endekapen-gaixotasunak tratatzeko terapia antiinflamatorioekin.

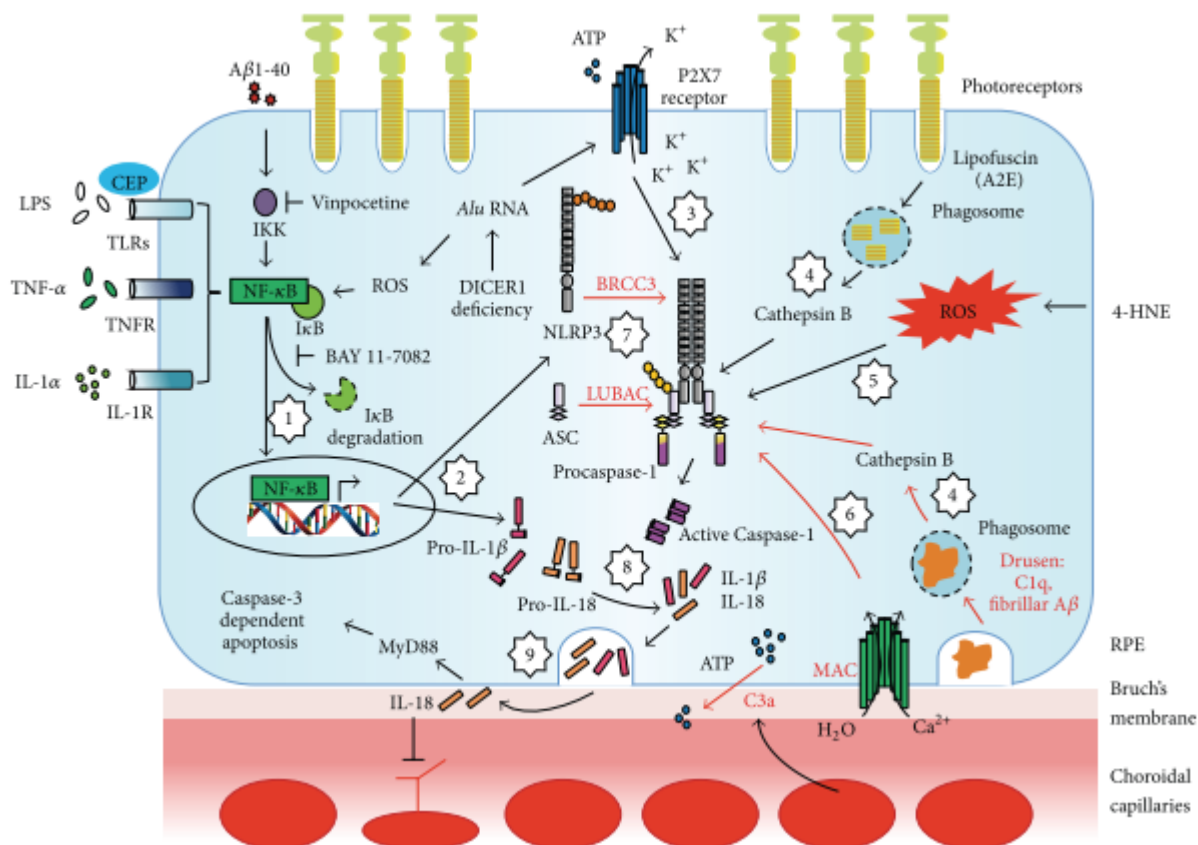
## 1. Sarrera

Egungo gizartean, erretinako endekapen-gaixotasunak morbiditate-kausa garrantzitsu bat dira, ikusmen-urritasunak pazienteen bizi-kalitatea nabarmenki murrizten baitu. Hori horrela, erronka handia da gaixotasun horiek eragindako itsutasuna prebenitzeko terapiak garatzea. Erronka da, gaixotasun horiek heterogeneotasun genetiko eta fenotipiko handia dutelako, eta patogenesisia oso era ezberdinetan ulertu izan delako (1).

Erretinako endekapen-gaixotasunen adibide ugari eman ahal ditugu: erretinosi pigmentarioa (RP), adinari lotutako endekapen makularra (AMD), erretinopatia diabetikoa (DR), Stargardt distrofia makularra (STGD) eta Leber anaurosi kongenitala (LCA), esate baterako. Horien guztien bereizgarria da erretina-pigmentuaren epitelio-zelulen (RPE) heriotza progresiboa. Erretina-pigmentuaren epitelio-zelulak giza-begiak dituen zelula ftohartzaileak dira, oso bereiztutakoak, erretina neurosensorialaren barruan kokatzen direnak (2).

Gaur egun, ebidentziak daude hanturak rol nabarmena duela gaixotasun hauetan. Izan ere, zahartzaroaren aldaketek, anormaltasun metabolikoek, perfusio baskular aldatuek edo endekapenezko baldintza genetikoengatik sortzen diren erretinako homeostasiaren alterazioek ur-jauzi erreakzio inflamatorioak eragin ditzakete (3).

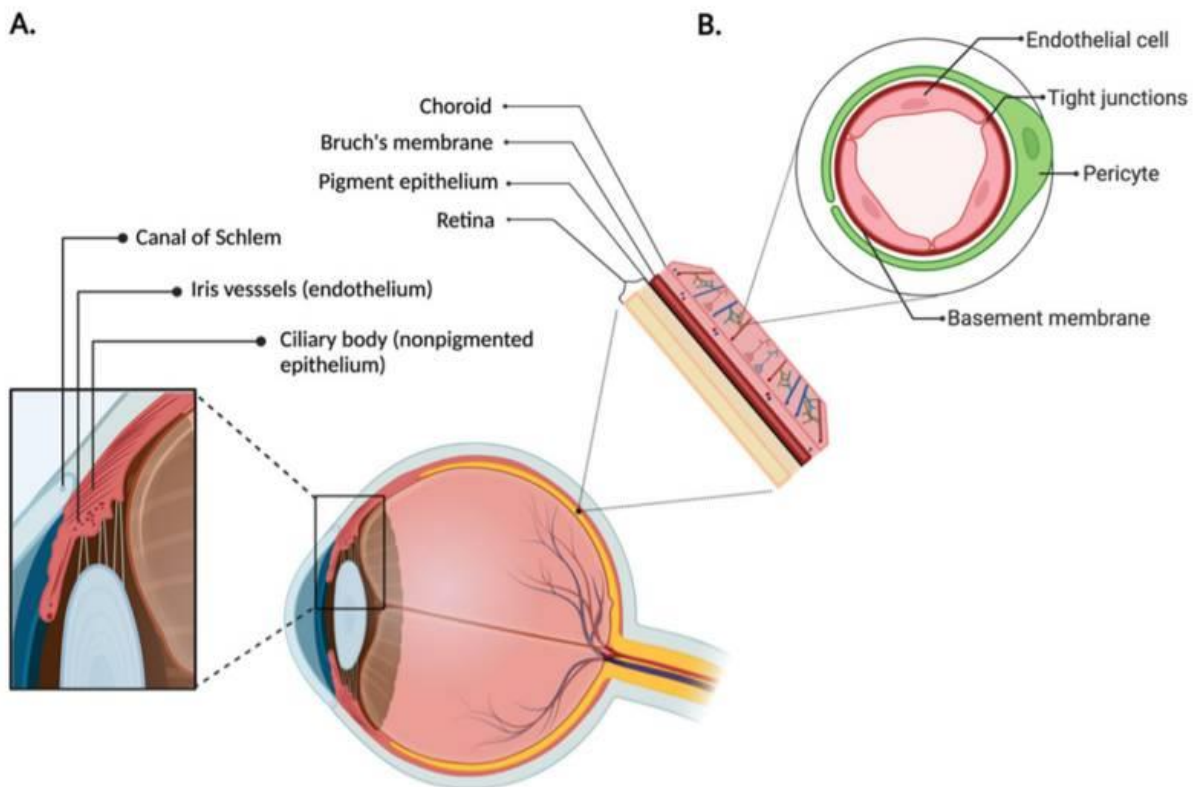
Adinari lotutako endekapen makularra (AMD) da erretinako endekapen-gaixotasunen artean gehien ikertu denetako bat (2). Horren bereizgarria da drusak agertzen direla erretina-pigmentuaren epitelioaren (RPE) eta Bruchen mintzaren (BM) artean, eta BM barruan. Drusak proteina-metaketak dira, zelularen bi mintz horien artean agertzen direnak (4). Beren konposizioan, besteak beste, osagarri erregulatzailak (amiloide-beta) eta oxidazio-azpi produktuak dituzte. Osagai horiek NLRP3 inflamasomarekin interakzionatzeko joera dute. Gehiegizko aktibazio inflamasomikoak gure zelulak kaltetu ditzake, eta gaixoaren egoera okertu. Horregatik, funtsezkoa da 1. irudian ageri den jarduera inflamasomikoa kontrolpean edukitzea (5).



1. irudia. RPEn NLRP3 inflammasomaren aktibazioaren eredua (5).

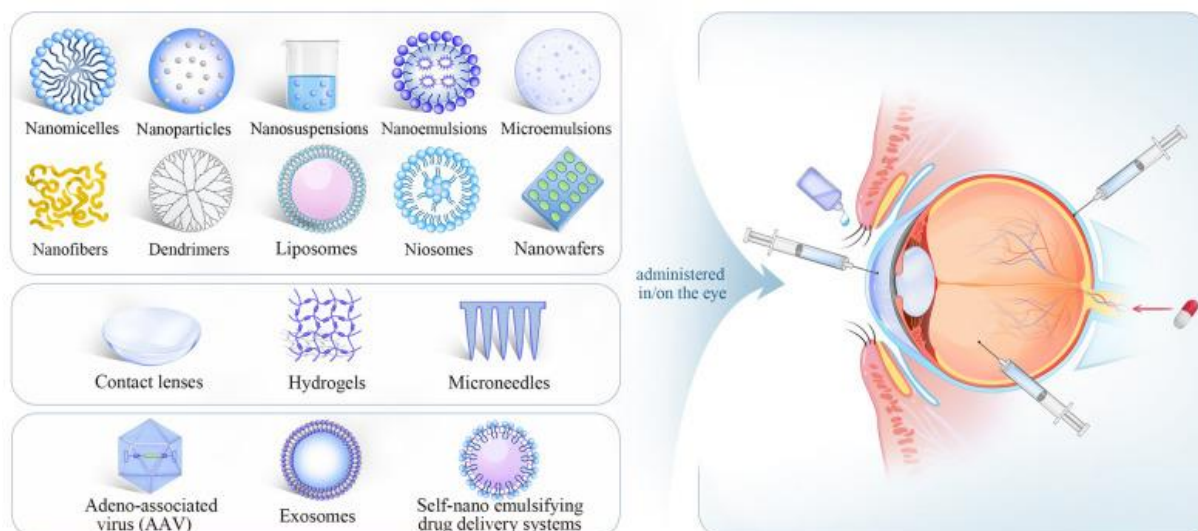
Hori horrela, hipotetizatu egin da, erretinako endekapen-gaixotasunen bilakaera hobetu daitekeela, hantura inhibituz gero. Tumorearen  $\alpha$  nekrosi-faktorea (TNF- $\alpha$ ) NLRP3 inflammasoma aktibatzen duen zitokin proinflamatorio bat da, T zelulek eta sortzetiko zelula immuneek sortzen dutena. Rol garrantzitsua dauka modulazio immunologikoan, zelulen proliferazioan, desberdintzean eta apoptosian. TNF- $\alpha$  molekulak ur-jauzi erreakzioa abiatzen du haren hartzaileekin lotzean: TNFR1 eta TNFR2. Alde batetik, TNF- $\alpha$  molekulak TNFR1-i lotzean, TNFR1 molekula moldatzailea erreklutatzen du, hau da, TNFR1-i elkartutako herio-domeinu proteina. Horrek I, IIa, IIb eta IIc bezala ezagutzen diren konplexuak osatzera darama. I konplexuak B kappa faktore nuklearra (NF- $\kappa$ B) eta mitogenoek aktibatutako proteina kinasak (MAPKs) estimulatzen ditu. IIa eta IIb konplexuek kaspasa-8 aktibatzen dute eta apoptosia errazten dute. IIc konplexuak kinasak antzeko proteinak aktibatzen ditu eta nekroptosia eta inflamazioa eragiten ditu. Bestetik, TNFR2 estimulazioak NF- $\kappa$ B, MAPKs eta B proteina kinasak aktibatzen ditu (6). Lan hau NLRP3 inflammasomaren inhibizioan zentratuko da, MCC950 erabiliz. Hain zuzen ere, MCC950 NLRP3 eta ondorengo zitokinen ur-jauzi erreakzioa inhibitzeko gai den molekula txiki bat da (7).

Hala ere, begia bereziki sistema zaila da farmakoak banatzeko; izan ere, oztopo fisikoak daude, horiek begian sartzea eta bioerabilgarritasuna mugatzen dutenak (2. irudian daude ikusgai), besteak beste: mukosa, epitelio korneala, fenestrazio gabeko iriseko odol-hodiak, epitelio ziliarraren geruza ez-pigmentatua, RPE eta erretinaleko odol-hodien epitelioa. Gainera, zenbait prozesu fisiologikoek —begiak kliskatzea eta drainatzea, esaterako— murriztu egiten dute farmakoek sistema okularren banatzeko behar duten egote-denbora (8).



**2. irudia.** Begiaren hesi anatomikoak. **(A)** Begiaren aurrealdean, odol-hesi akuosoek (odol-hodi iris/ziliarrak eta epitelio ziliar ez-pigmentatuak osatuak) farmakoak begi barruko ingurunera modu terapeutikoan sartzea eragozten dute. **(B)** Begiaren atzeko aldean, erretinako zelula endotelialek eta erretina-pigmentuko epitelio-zelulek osatzen duten hesiak eragotzi egiten du farmakoak odol-korrontetik ondorengo segmentuan sartzea (9).

Dosifikazio-forma konbentzionalak eta beste formulazio-planteamendu batzuk erabili izan dira farmakoa begi-barneko ehunetan hobeto baneratzeko, baina emaitza eskasekin (farmakoen % 5-10 baino gutxiago iristen da begi-barneko ehunetara). Probatu diren formulazio-estrategien artean honako hauek daude (3. irudia): soluzioak, dispersioak, nanopartikula polimerikoak, tentsioaktiboetan oinarritutako sistemak, inplanteak, nanomizelak, emultsioak eta gelifikazio-sistemak (10).



### 3. irudia. Begi aplikaziorako nanoteknologian oinarritutako farmakoak banatzeko sistemak (11).

Azken urteetan, sistema nanopartikulatu koloidalek ospea hartu dute farmakoak banatzeko plataforma oparo gisa. Dispersioen abantaila da begi-tanta gisa formulatu daitezkeela. Horrez gain, begiko geruzak zeharkatu ditzakete eta epitelioko zelulek bere baitan har ditzakete (10). SLN-ek (*Solid Lipid Nanoparticles*) zenbait abantaila dituzte: prestaketan zehar disolbatzaile organiko bat saihestea, egonkortasun handia izatea eta gorputzeko tenperaturaren solido mantentzea. Hala ere, SLN-ek eragozpen garrantzitsu bat ere badute: farmakoak kargatzeko ahalmen urria. Nanopartikularen matrize solidoari lipido likido bat gehitzen zaionean, nukleoaren inperfekzio kopurua handitzen da. Horrela, farmako kopuru handiago bat sartuko da, egonkortasuna galdu gabe. Egitura hauek NLC-ak (*Nanostructured Lipid Carriers*) izango dira (8).

Beraz, MCC950 inhibitzailea NLC nanopartikuletan kapsulatu da, eta, karakterizatu ostean, inflamazioaren ondorioak ekiditeko eraginkortasuna aztertu da. Gradu Amaierako Lan (GRAL) hau "Erretinako distrofia hereditarioen tratamendurako mikrogliaen aktibazioa inhibitzen zuzendutako nanoterapiak" (MICRORET) izeneko proiektuaren barruan kokatzen da. PI22/00082. Proiektua Zientzia eta Berrikuntza Ministerioaren ISCIIIk finantzatua dago, Regina Rodrigo proiektuaren IPrekin lankidetzan (Príncipe Felipe Ikerketa Zentroa, Valentzia).

## 2. Helburuak

Lan honen helburu nagusia da MCC950-ekin kargatutako NLC nanopartikulak garatzea, karakterizatzea eta biologikoki ebaluatzea. Horien bidez NLRP3 inflamasoma inhibititu nahi da eta erretinaren inflamazioari aurre egin.

## 3. Materialak eta metodologia

### 3.1. Aurretiko prestakuntza

GRAL honetarako prestatzeko, eta laborategian behar bezala lan egiten dela ziurtatzeko, Euskal Herriko Unibertsitateak (UPV/EHU) antolatutako bi formazio-ikastaro hauek gauzatu dira: “Jardunbide egokiak laborategian (I): Arriskuen prebentzioa” eta “Jardunbide egokiak laborategian (II): Hondakinen kudeaketa”. Lehenengo ikastaroan, laborategian jardunbide profesional egokia modu seguruan, eraginkorren eta efizientean gauzatzeko ezinbestekoak diren gaitasunak eta trebetasunak irakasten dira, hala nola laborategiko lanarekin erlazionatutako arrisku orokorrak eta espezifikoak ezagutzea, eta larrialdietan edo istripuetan jarduteko neurriak barneratzea. Bigarren ikastaroan hondakin arriskutsuen arloko legedia eta UPV/EHUko kudeaketa-prozedura bereziak interpretatzen ikasten da, baita gehiegizko hondakinak ez sortzeko estrategiak proposatu ere.

Gainera, ikerketa hau aurrera eramateko eta ARPE-19 zelulekin lan egiteko Agente Biologikoen eta GEOen Etika Batzordearen (ABIEB) baimena eskuratu da, M30/2024/024 kodearekin.

### 3.2. MCC950 inhibitzailearen egonkortasun termikoa aztertzea, kalorimetria bidez

MCC950 inhibitzailearen egonkortasun termikoaren karakterizazioa kalorimetria diferentzialaren bidez egin da, Nano DSC gailua erabiliz (TA Instruments, New Castle, DE, USA). MCC950 inhibitzaileek, NLC nanopartikuletan kapsulatzeko, temperatura altuak jasan behar dituzte (60 °C inguru). Hori dela eta, MCC950 inhibitzaileen desnaturalizazio-profila aztertu da, 0 °C-tik 80 °C-ra (minutuko 1°C igoz). Bai erreferentziaren ganberan, bai laginarenean, etanola sartu da buffer lerroa lortzeko. MCC950-aren neurketa egiteko 1 mg/ml kontzentrazioan sartu da ganberan. Emaitzak DSC Run 4.6 eta Launch Nano Analyze 3.11 (TA instrumentuak, New Castle, DE, AEB) softwarearen bidez jaso eta aztertu dira. Nano DSC-ren ganberak MilliQ® urarekin, % 2 DECON™ 90rarekin eta etanolarekin garbitu dira.

Lagina beste unibertsitate batera ere bidali da egonkortasun termikoaren karakterizazioa egiteko: Granadako Unibertsitatera (UGR), Egiturak Analizatzeko eta Determinatzeko Zerbitzura. Han DSC gailua erabili da. 20 °C-tik 400 °C-ra (malda 20 °C/ 2 min) ikertu da MCC950-ren desnaturalizazio-profila, atmosfera normala izanik (airea).



### 3.3. Inflamasomaren inhibitzaileekin kargatutako NLC nanopartikulak elaboratzea

Jakina denez, NLCak lipido likidoen (LL), lipido solidoen (LS) eta tentsioaktibo desberdinez osatuta daude, proportzio espezifikoetan nahastuta eta disoluzio urtsuan banatuta (12).

Hiru NLC formulazio desberdin egin dira: MCC950 inhibitzailea dutenak (**a**), hutsik daudenak (**b**), eta kumarinadunak (**c**). **a** eta **b** formulazioen fase lipidikoan, % 6.6 (w/v) Precirol ATO<sup>®</sup>5 eta % 0.6 (w/v) Miglyol<sup>®</sup>812N erabili dira. Horrez gain, **a** emultsioan % 0.05 (w/v) MCC950 gehitu da fase lipidikoan. Fase urtsuan, aldiz, Tween<sup>®</sup>80 (%1,3an w/v), % 0.6 (w/v) Poloxamer 188 (Kolliphor<sup>®</sup>) ur MilliQ-an<sup>®</sup> gehitu dira. **c** formulazioan, konposatuen proportzio berdina mantenduko da eta % 0.05 (w/v) kumarina-6 gehitu da fase lipidikoan.

Emultsioa lortzeko, bi faseak fusio-tenperaturaren gainetik (60 °C - 70 °C) berotu behar dira. Gero, nahastu eta 30 segunduz sonifikatu dira (Branson Sonifier 250; Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CO, USA), 50 W-etan. Segidan, emultsioak agitazio magnetikoaren eraginpean utzi dira, ordu batez, giro-tenperaturan. Gutxienez 18 orduz hozkailuan egon behar dira (4 °C-tan), lipidoen birkristalizazioa eta NLC-en eraketa ahalbidetzeko. Gero, garbiketak gauzatu dira, filtrodun zentrifugazio-hodietan (Ultracel 100k, Ref = UFC910024) zentrifugatuz (2.500 rpm, 15 minutuz, hiru aldiz). Gainjalkina gorde egin da, kapsulatu ez den MCC950 neurtu ahal izateko.

NLC-en erronketako bat da egonkortasuna mantentzea biltegitratzean. Horretarako, suspentsioak liofilizatu egin dira; hau da, nanopartikulen suspentsiotik ura kendu da, solido bihurtzeko (freeze-drying). Hala ere, liofilizatutako nanopartikula lipidikoek agregazioak sortzen dituzte kriobabesle baten ausentzian. NLC horiek suspentsioan jartzen direnean, trealosa da agregazioak prebenitzeko gai den bakarra (8). Beraz, %15 (w/w) trealosa erabili da kriobabesle moduan (15 mg trealosa disolbatu da, lipido solido 100 mg bakoitzeko). Horretarako, Telstar Lyobeta izozgailu lehorgailua (Terrassa, Spain) erabili da. Liofilizazioaren ondoren, NLCak zituzten bidoiak zigilatu eta 4°C-tan gorde ziren erabili arte.

### 3.4. NLC nanopartikulen karakterizazio fisiko-kimikoa

NLC-en morfologia transmisiozko mikroskopia elektronikoaren (TEM) bidez zehaztu da, UPV/EHUko SGIker zerbitzuaren bidez, tindaketa negatiborako %2 uranilo azetatoa erabiliz. Diametro hidrodinamikoa adierazteko, partikulen tamaina ere barne hartzen duena, partikulen batez besteko intentsitate eta banaketa erabili dira. Hori argi-dispertsio dinamikoaren (DLS) bidez egin da. Aldi berean, partikulen tamainaren banaketa neurtu da polisakabanatze-mailaren bidez (PDI). Lasser Doppler belozimetriak (LDV) zeta-potentziala neurtzen du. Nano ZS zetazizer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) erabili da neurketak egiteko. Lagin liofilizatu bakoitzeko 1 mg 100 µL ur MilliQ®-an disolbatu dira. Disoluzio horren 10 µL hartu eta 990 µL-tan diluitu dira. Neurketa bakoitza hiru aldiz errepikatu da.

### 3.5. MCC950 proteinaren kapsulazio-eraginkortasuna aztertzea

Micro BCA™ (Thermo Scientific™) disoluzio batek duen proteina-kantitate totala detektatzeko erabiltzen den analisi-kit bat da. Azido bikinkoninikoak (BCA) proteinekin erreakzionatzen duenean, kolore moreko produktu bat ematen du. Horrek 0,5 eta 20 µg/mL arteko proteina-soluzioak neurtzen ditu. Kasu honetan, NLC-ak garbitzean jasotako gainjalkina ikertu da; izan ere, hor ageriko da kapsulatu ez den MCC950-a. Beraz, kapsulatu ez den MCC950 kantitatea neurtuz, kapsulatze-eraginkortasuna (%) kalkulatu ahal da. Honako ekuazio hau erabili da horretarako:

$$\% EE = \left[ \frac{W_i - W_f}{W_i} \right] \times 100$$

Ekuazio honetan  $W_i$  MCC950-aren kantitate totala da (5 mg) eta  $W_f$  gainjalkinean neurtutako proteina librearen kantitatea (mg).

Proba hau egiteko, alde batetik, BCA kontzentrazio jakinak dituzten diluzio estandarrak prestatu dira, 0,5-200 µg/mL tartean. Bestetik, Micro BCA erreaktiboak (25:24:1, MA:MB:MC erreaktiboak) eta gure laginaren kontzentrazio desberdinak prestatu dira (250 µg/mL, 500 µg/mL eta 750 µg/mL); izan ere, proteina kantitatea neurtu ahal izateko lerro estandarraren barne sartu behar da laginaren kontzentrazioa (0,5-200 µg/mL tartean). Prozedura 96 putzuko plakan gauzatu da. Putzuetan estandarren edo laginen 150 µL eta Micro BCA erreaktiboaren 150 µL-rekin nahastu dira. Tapatu eta 2 orduz inkubatu da plaka 37 °C-tan. Jarraian, absorbantzia neurtu da (562 nm). Lerro estandarraren kurba erabili da laginen proteina kontzentrazioa eta horrela, kapsulatu ez den MCC950 kantitatea, kalkulatzeko.

### 3.6. ARPE-19 zelulen *in vitro* hazkuntza

ARPE-19 zelulen hazkuntza egin da. ARPE-19 gizakiaren erretina-pigmentuaren lerro epiteliala da, American Type Culture Collection (ATCC) bildumatik lortu dena. Horretarako, DMEM:F12 hazkuntza-medioa (Dulbecco's modified Eagle's medium: nutrient mixture F12, 1:1) erabili da (ATCC), % 10 behi-fetu serumarekin (FBS; Corning) eta % 1 antibiotikoarekin (100 U/mL penizilina - 100 µg/mL estreptomizina) osatuta. Zelulak % 5 CO<sub>2</sub>-dun atmosfera hezean inkubatu dira, 37° C-tan. Hazkuntza-medioaren aldaketa 2 egunetan behin egin da eta azpikultiboak 3 - 4 egunetan behin egin dira, konfluentzia egoki batera iristean (% 80 - 90). Azpikultiboa egiteko orduan 2 mL % 0,05 (w/v) Tripsina - 0,53 mM EDTA (Gibco, San Diego, CA, USA) erabili da. Ondoren, tripsina neutralizatu da, 6 ml hazkuntza-medio erabilia. Tripsina-EDTA disoluzioa kentzeko, zentrifugo-hodi batera transferitu da, eta 125 g-ko zentrifugazioa egin da 5 minutuz. Gainjalkina baztertu eta zelulak kultibo-medioan berreraikitzen dira. Azpikultiboa 1:3 ratioan egin da.

### 3.7. Estimulu pro-inflamatorioaren dosi-erantzuna aztertzea ARPE-19 zeluletan

Zelulen heriotza minimoa eta proteina intrazelularren liberazio minimoa bermatzeko, ARPE-19 zelulak 96 putzuko plakan erein dira, putzu bakoitzean  $9 \times 10^3$  zelula jarriz. 24 orduz inkubatu eta gero, hazkuntza-medioa kendu eta TNF- $\alpha$ -ren kontzentrazio desberdinekin tratatu dira (200 ng/ml, 150 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml). TNF- $\alpha$  inflamazioan eragiten duen proteina denez, inflamazioak erretinako zeluletan duen eragina aztertu nahi da. Gero, beste 24 orduz inkubatu ondoren, zelulen bideragarritasuna aztertu da. Honetarako, medioa kendu, putzuak PBS-rekin garbitu eta CCK-8 (*Cell Counting Kit-8*) erreaktiboaren 1:10 diluzioa gehitu da, plakako putzuen aktibitate metabolikoa aztertzeko. Kit honek WST-8 erabiltzen du; izan ere, zelulen deshidrogenasek molekula hori erreduzitu egiten dute, kolore horixka duen produktu bat emanez (formazan), ehunen hazkuntza-medioan disolbagarria dena. 2-3 ordu pasa ondoren, putzuen absorbantzia neurtu da, tindaketa zuzenki proportzionala izango baita zelula bizidunen kopuruarekiko.

### 3.8. ARPE-19 zeluen NLC partikulen barneratzea aztertzea

ARPE-19 zelulak 12 putzuko 3 plaketan erein dira, putzu bakoitzean  $2,8 \times 10^5$  zelula jarritz. 24 orduz inkubatu eta gero, putzu bakoitzean kumarina-6dun NLC-ak dituen disoluzioaren 1 ml gehitu da (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kontzentrazioan). Denbora desberdinetan (30 min eta 2 ordu) aztertu nahi da ea ARPE-19 zelulek NLC-ak barneratzen dituzten. Fluoreszentzia bidez egingo da hau, kumarina fluoreszentea baita. Horrela, plaka bakoitzari dagokion denbora igarotakoan, disoluzioa kendu, PBS-rekin garbitu eta hazkuntza-medioaren 1 ml gehitu zaie. NLC-en barneratzearen analisi kualitatiboa egiteko, bright-field argazkiak eta argazki fluoreszenteak atera dira. Horretarako Cytation™ 1 gailua (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) erabili da.

### 3.9. MCC950-dun NLC-en eraginkortasun antiinflamatorioa aztertzea

ARPE-19 zelulak 96 putzuko plakan erein dira, putzu bakoitzean  $9 \times 10^3$  zelula jarritz, eta 24 orduz inkubatuz. MCC950-en eraginkortasun antiinflamatorioa aztertzeko, forma desberdinak (NLC-etan eta forma purua) eta bakoitzean kontzentrazio desberdinak (0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  eta 100  $\mu\text{M}$ ) aztertu dira. Diluzio horien 100  $\mu\text{L}$ -z gain, ARPE-19 zeluletan estimulu pro-inflamatorioa aztertzean (3.7. *Estimulu pro-inflamatorioaren dosi-erantzun harremana aztertzea ARPE-19 zeluletan*) aukeratutako TNF- $\alpha$  kontzentrazioaren 100  $\mu\text{L}$  gehitu dira putzu bakoitzean. Hurrengo 24 orduetan kontaktuan utzi ondoren, zelulen jarduera metabolikoa neurtu da, aurretik azaldu dugun CCK-8 (*Cell Counting Kit-8*) probaren bidez.

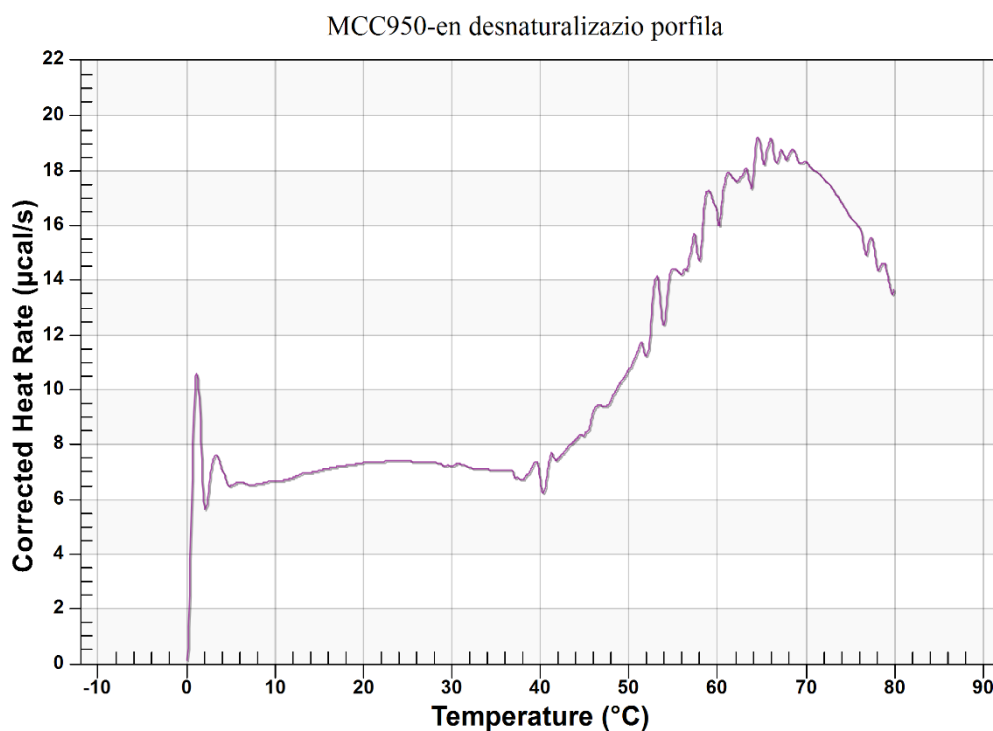
### 3.10. Analisi estatistikoa

Analisi estatistikoa IBM SPSS Statistics 25 software-a erabiliz egin da. Banaketa normala ebaluatzeko, Shapiro-Wilk testa erabili da; bariantzaren homogeneotasuna ebaluatzeko, aldiz, Levene testa. Baldintza parametrikotan, Student's t testa erabili da. Baldintza ez parametrikotan, Mann-Whitney U probak egin dira, parekatu gabeko konparazioetarako. Kasu guztietan, p balioa estatistikoki adierazgarritzat jo da  $\leq 0,05$  bada. Datuen batez bestekoa eman da,  $\pm$  desbideratze estandarra (SD).

### 3. Garapena: Emaitzak eta eztabaida

#### 4.1. MCC950 inhibitzailearen egonkortasun termikoa aztertzea, kalorimetria bidez

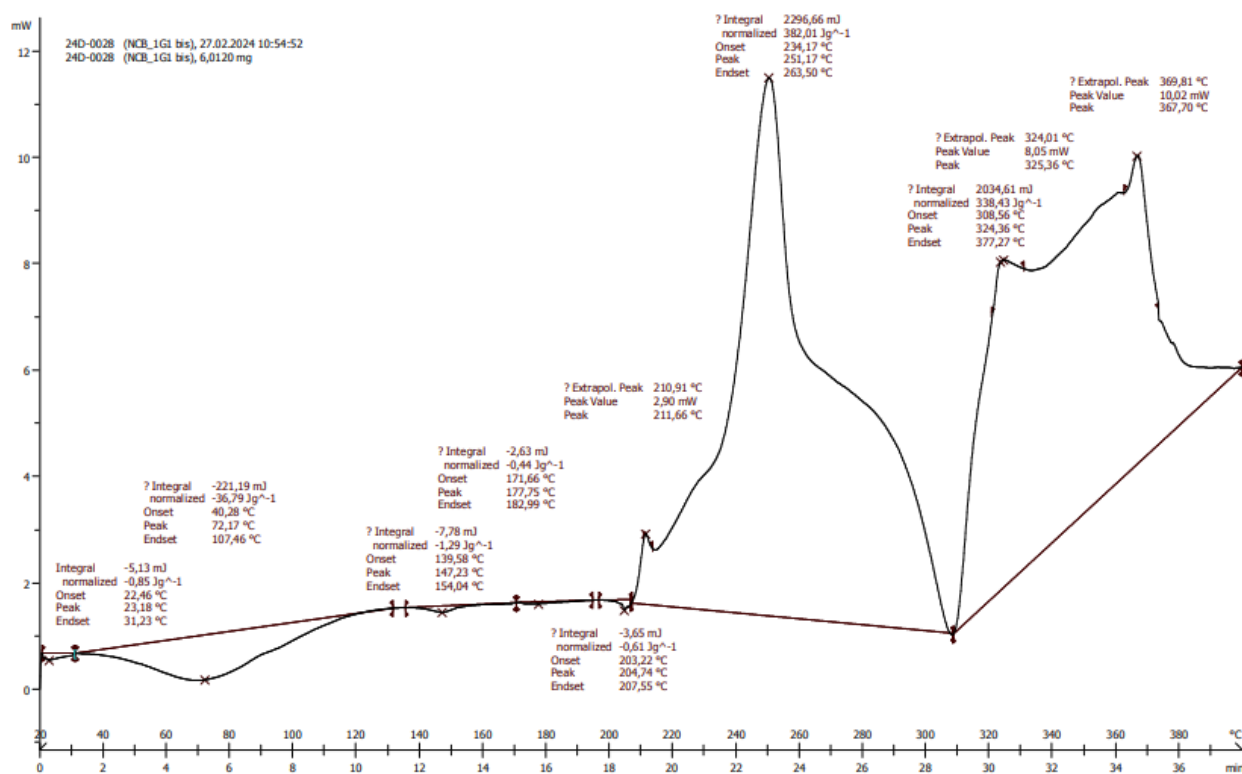
MCC950 inhibitzailearen egonkortasun kimikoa aztertu da 0 °C-tik 80 °C-ra (temperatura 1°C igoz minuturo). 4. irudian ikus daitekeenez, 60-70 °C artean dago grafikoaren gailurra. Beraz, MCC950 inhibitzailea egokia izango litzateke, baldin eta NLC nanopartikuletan kapsulatzeko prozesuan tenperatura gertutik zaintzen bada. NLC-en elaborazioan azaldu den bezala (3.3. *Inflamasomaren inhibitzaileekin kargatutako NLC nanopartikulak elaboratzea*), beharrezkoa da fase lipidikoaren eta fase urtsuaren nahasketa fusio-tenperatura horretatik gora egitea (60 °C-tik gora, alegia). Beraz, datu hauek kontuan hartuta, faseen tenperatura 70 °C-tik pasatzen ez dela ziurtatu behar da, MCC950 kapsulatu ahal izateko, desnaturalizatu gabe.



4. irudia. MCC950 inhibitzaileen desnaturalizazio profila, Nano DSC-aren bidez.

Hala ere, Nano DSC gailuak (TA Instruments, New Castle, DE, USA) arazoak eman ditu esperimentuan zehar; ezin izan dira, beraz, emaitza hauek errepikatu laborategian. Hortaz, lagina beste unibertsitate batera bidali da: Granadako Unibertsitatera (UGR), Egiturak Analizatzeko eta Determinatzeko Zerbitzura.

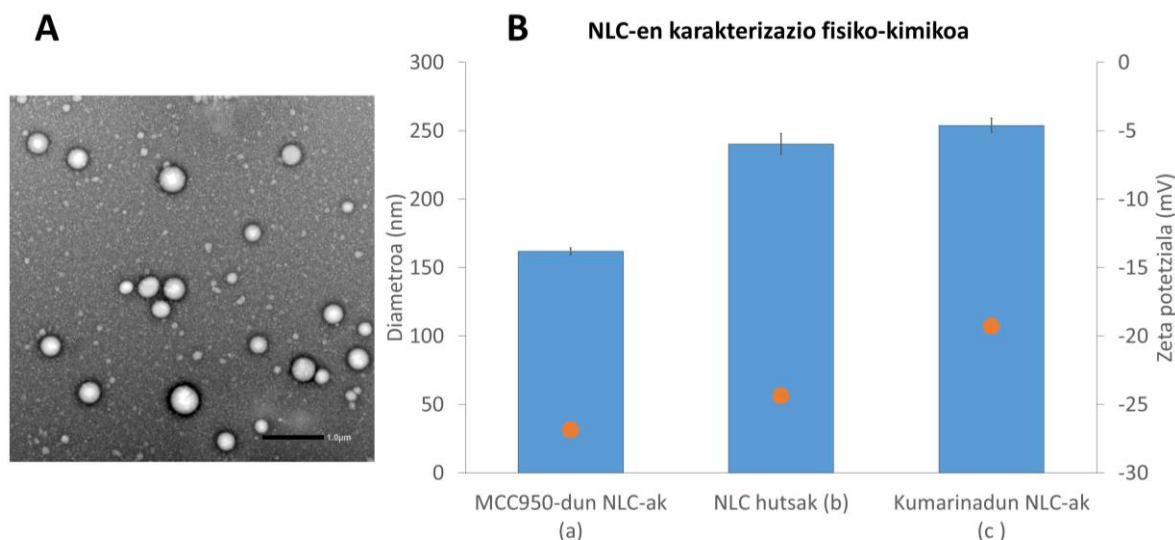
5. irudian MCC950 konposatuaren kalorimetria-analisia ikusten da, DSC bidez egina. Bertan, lurrunketa txiki bat (gertaera endotermikoa) ikusten da 72 °C-tan, ziurrenik lagineko hondakin-uraren ondorioz. 200 °C-tan konposatuaren degradazioa ikusten da. Beraz, DSC-an ez da 100 °C-tik beherako degradaziorik ikusten, eta, MCC950-ak eutsi egiten dio NLC-ak egiteko eta konposatua kapsulatze behar den lipido solidoaren fusio-tenperaturari.



5. irudia. MCC950 inhibitzaileen desnaturalizazio profila, DSC-ren bidez.

## 4.2. NLC nanopartikulen karakterizazio fisiko-kimikoa

NLC formulazioek forma esferiko argia erakutsi dute, partikulen agregaziorik gabe (6.A. irudia). 6.B. irudian ikusi daitekeen bezala, **a**, **b** eta **c** formulazioen batez besteko partikulen tamainak hauek dira:  $161,93 \pm 2,63$  nm,  $240,37 \pm 7,48$  nm eta  $253,90 \pm 5,14$  nm. Kumarinadun nanopartikulak nabarmenki handiagoak dira, beste NLC-ekin alderatuta. **a**, **b** eta **c** formulazioen zeta-potentzialak  $-26,87 \pm 0,15$  mV,  $-24,40 \pm 0,36$  mV eta  $-19,30 \pm 0,36$  mV dira, hurrenez hurren (6.B. irudia). Polisakabanatze-mailari (PDI) dagokionez, **a** ( $0,25 \pm 0,01$ ), **b** ( $0,33 \pm 0,04$ ) eta **c** ( $0,32 \pm 0,07$ ) formulazioek 0,4 baino balio txikiagoa ematen dute; beraz, farmakoak emateko beharrezkoak diren nanopartikulen onarpenerako balioak betetzen dituzte (13). NLC bakoitzeko neurketak hiru aldiz errepikatu direnez, errore-tarteetan horien desbideratze estandarrak adierazten dira ( $n = 3$ ).



**6. irudia.** NLC formulazioen (a, b, c) karakterizazio fisiko-kimikoa. (A) Transmisiozko mikroskopia elektronikoaren (TEM) bidezko NLC hutsen irudia. Eskala barra: 1,0 µm. (B) NLC-en diametroa (nm, barretan adierazita) eta zeta-potentziala (mV, puntuekin adierazita) ageri dira irudikatuta, hiru neurketen batez bestekoa, ± desbideratze estandarra adierazita. Ez dago desberdintasun estadistikorik MCC950-dun NLC-en eta hutsen artean.

Partikulen tamainak eta tamaina horien banaketak eragin nabarmena dute NLC-en egonkortasunean. Partikula txikiagoak eta tamaina-banaketa txikiagoa dutenak egonkorragoak dira biltegitzerakoan. Gainera, partikulen tamainak haien azalerari, disolbagarritasunari, biobateragarritasunari eta molekularen askapen-tasari ere eragiten die. NLC-en diametroa 50 eta 300 nm bitartekoa izan beharko litzateke zeluletan barneratuak izateko (14). Gainazaleko kargari dagokionez, eragin handia izan dezake NLC-en formulazioan, partikulen agregazioari, sakabanatzeari eta epe luzerako egonkortasunari buruzko informazio kritikoa ematen baitu. Gainazal-karga handiagoek alderatze elektrostatikoa eragiten du partikulen artean, eta agregazio gutxiago ere bai. Oro har, NLC egonkorrek gutxienez ± 20 mV-ko ZP izan beharko lukete (14). Hiru formulazioek baldintza hauek betetzen dituzte. Beraz, egokiak dira hurrengo esperimenduetan erabiltzeko.

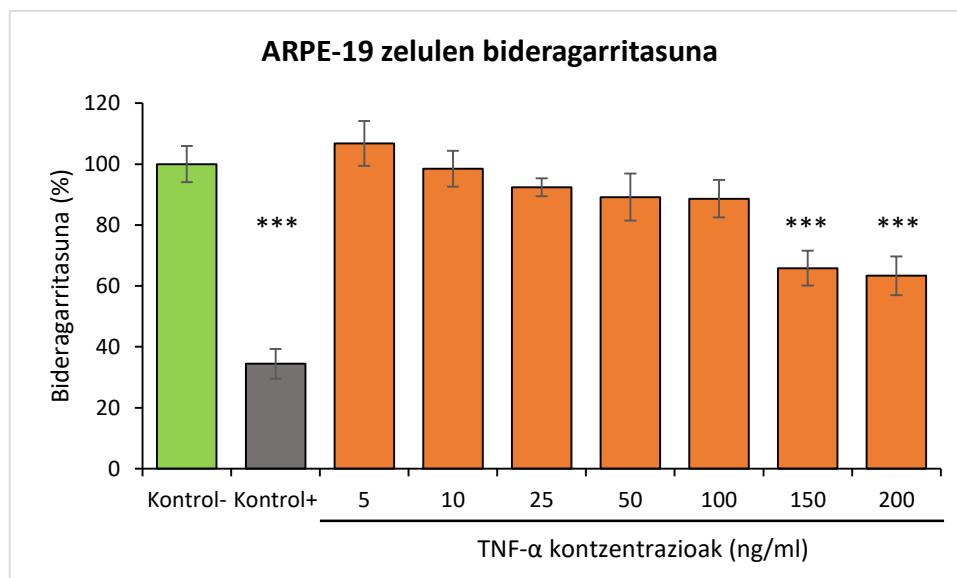
Hala ere, harritzekoa da MCC950-dun NLC-ak hutsak baino txikiagoak direla diametroari dagokionez. NLC-ak egiteko erabili diren lipido eta tentsioakbioez gain, lan-baldintzek (ultrasoinuan erabiltzen diren rpm-ak, denbora...) eragin handia daukate NLC-en tamainan (14). Kasu honetan, NLC-ak hutsak kargatuak baino txikiagoak izatea sonifikazio teknikaren ondorio dela esan daiteke.

### 4.3. MCC950 proteinaren kapsulazio-eraginkortasuna aztertzea

MicroBCA saiakuntzaren bidez, MCC950 konposatuaren kapsulazio-eraginkortasuna honako hau dela determinatu da: %  $99,83 \pm 0,07$ . Hala ere, beste ikerketa batzuetan ikusi da errendimendu handiko tandem kromatografia likidoa/ masa-espektrometria (HPLC-MS/MS) metodo egokiagoa dela MCC950 konposatua detektatzeko eta kuantifikatzeko (15). Teknika hau laborategian ez dagoenez, ezin izan da MCC950 inhibitzailearen kaleratze-profila aztertu.

### 4.4. Estimulu pro-inflamatorioaren dosi-erantzun harremana aztertzea ARPE-19 zeluletan

ARPE-19 zelulak TNF- $\alpha$  molekulen kontzentrazio desberdinekin (7 kontzentrazio desberdin 5-200 ng/mL tartean) tratatu dira inflamazioak ARPE-19 zeluletan izango lukeen eragina ikertzeko. 24 orduz inkubatu ondoren, zelulen bideragarritasuna aztertu da, CCK-8 erreaktiboaren bidez. Absorbantzia neurtu ostean, kontrol negatiboarekin (zelula basalekin, tratatu gabeak) konparatu dira (%100). Emaitzak 7. irudian irudikatu dira. Errore-tarteetan, TNF- $\alpha$  dosi bakoitzeko, lau aldiz errepikatu diren esperimendutik lortutako desbideratze estandarrak adierazi dira (n = 4).



**7. irudia.** Zelulen bideragarritasuna TNF- $\alpha$  kontzentrazioaren arabera. Barra berdea (kontrol -) tratatu gabeko zelulei dagokie, barra grisa (kontrol +) zelula-heriotzaren kontrol positiboarekin (Triton X-100 %1) tratatutako zelulei dagokie; barra laranja TNF- $\alpha$  estimulu pro-inflamatorioari dagozkie, hainbat kontzentrazioetan. \*\*\*, p < 0.001 vs. Kontrol - .

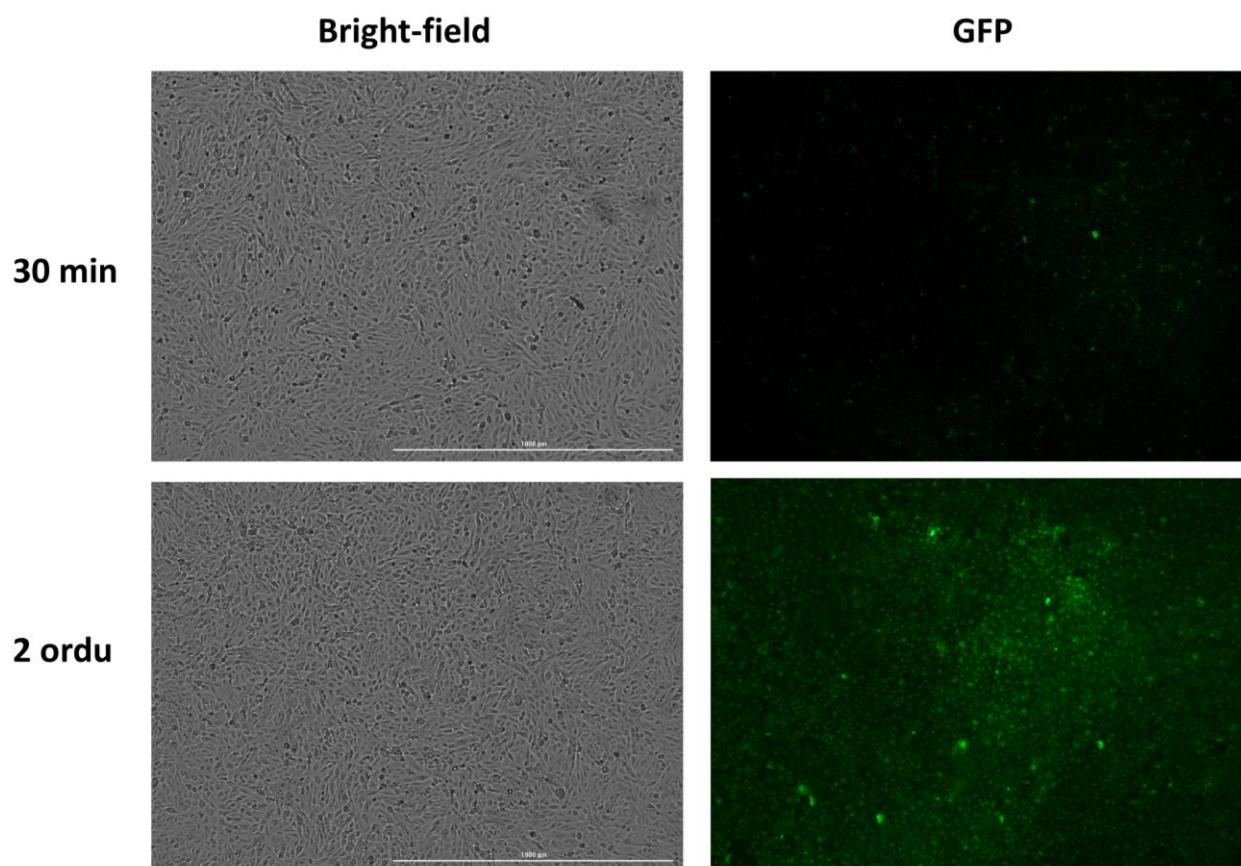
Basalarekin (kontrol negatiboarekin) konparatuta, bi dira desberdintasun estatistikoa erakusten duten TNF- $\alpha$  kontzentrazioak: 150 ng/ml eta 200 ng/ml. Hurrengo esperimenduetan, horietatik zelulen heriotza gutxien eragin duena hautatu da; hau da, 150 ng/ml.



Beste ikerketa batzuetan dosi ez-hilgarriak erabili dira, besteak beste, zitokin pro-inflamatorioen adierazpena aztertzeko. Konkretuki, ikerketa batean 4 eta 50 ng/mL tarteko TNF- $\alpha$  dosiak erabili dira. IL-1 $\beta$  proteinaren adierazpena aztertu da, 24 ordutan eta 48 ordutan. Ikusi da 50 ng/mL dela zitokin horren jariaketa gehien aktibatzen duen kontzentrazioa, batez ere 48 ordutan (16). Horregatik, arrazoizkoa da 24 ordutan efektu zitotoxikoa duten TNF- $\alpha$  dosiak aztertzeko dosi altuagoa behar izatea (heriotza zelularra da aztertu behar dena, ez hanturazko zitokinen aktibazioa).

#### 4.5. ARPE-19 zeluletan NLC partikulak barneratzen diren aztertzea

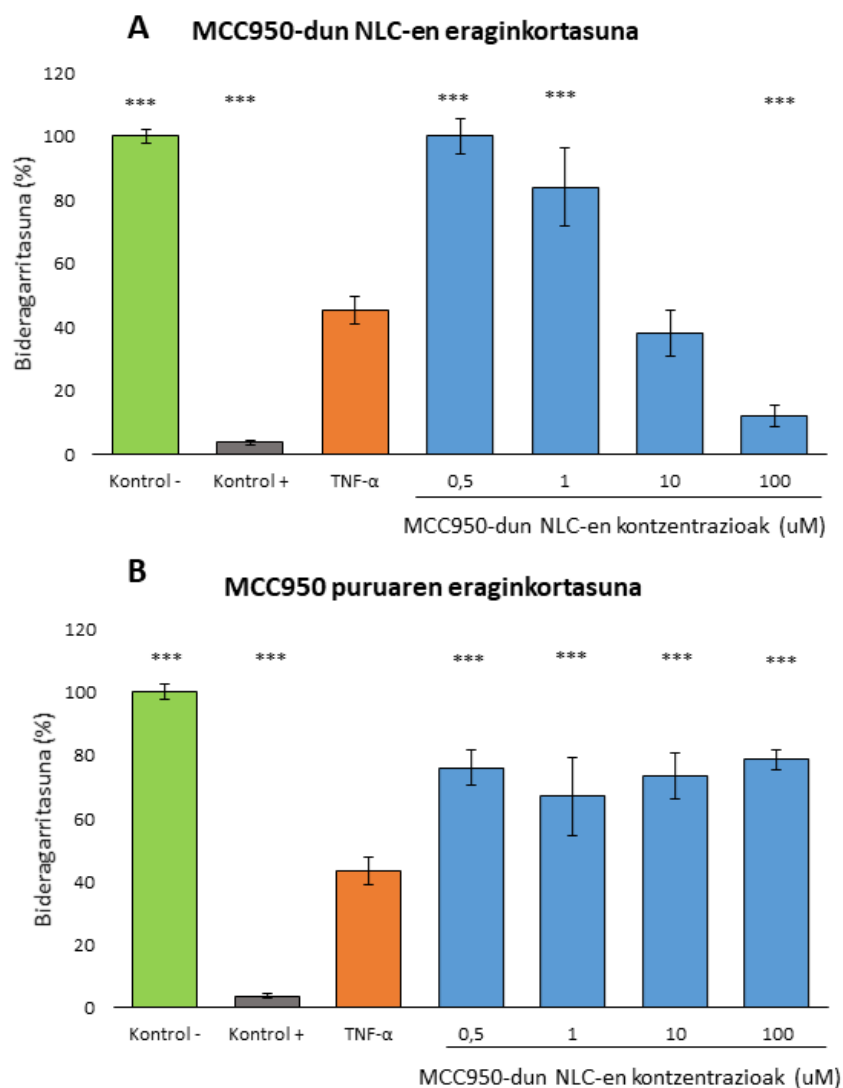
8. irudian ikusi dezakegu denbora desberdinetan (30 min eta 2 ordu) ARPE-19 zeluletan NLC-ak barneratzen diren ala ez. 30 minututan fluoreszentzia zelula gutxi batzuek erakusten duten arren, NLC-en barneratzea adierazgarria da 2 ordutan. Hala ere, ikertzeke dago NLC-ek zelulara sartzeko erabiltzen duten mekanismoa.



**8. irudia.** Cytation™ bidez ateratako argazkiak. ARPE-19 zelulak kumarina-6dun NCL-ekin kontaktuan 30 minutu eta 2 ordu egon eta gero. Eskala barra: 100  $\mu$ m.

#### 4.6. MCC950-dun NLC-en eraginkortasun anti-inflamatorioa aztertzea

ARPE-19 zelulak, 150 ng/ml kontzentrazioa duen TNF- $\alpha$  konposatuaren disoluzioarekin tratatzeaz gain, MCC950 inhibitzailearekin tratatu dira, forma (enkapsulatuta edo librea) eta kontzentrazio desberdinetan (0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M eta 100  $\mu$ M). Kontzentrazio desberdinak erabili dira, inflamazioak ARPE-19 zeluletan izango lukeen eragina ikertzeko. Metodo kolorimetrikoaren bidez jarduera metabolikoa neurtu ostean, kontrol negatiboarekin konparatu dira (% 100). Emaitzak 9. irudian irudikatu dira. Errore-tarteetan, MCC950 kontzentrazio bakoitzeko, lau aldiz errepikatutako esperimendutik ateratako desbideratze estandarrak adierazten dira (n = 4).



**9. irudia.** MCC950 duten NLC-en (A) eta MCC950 puruaren (B) eraginkortasunaren azterketa, TNF- $\alpha$  konposatuaren eragina ekiditeko. \*\*\*, p < 0.001 vs. TNF- $\alpha$

9.A. irudian ikusi daitekeenez, MCC950 duten NLC-en kasuan, 0,5  $\mu\text{M}$  eta 1  $\mu\text{M}$  kontzentrazioek erakutsi dute eragin nabarmenki onuragarria, TNF- $\alpha$  150 ng/mL kontzentrazioarekin bakarrik tratatutako zelulekin alderatuta. Batez ere, 0,5  $\mu\text{M}$  kontzentrazioak guztiz ekiditen du TNF- $\alpha$ -ren efektu zitotoxikoa. MCC950 puruaren kasuan, aldiz, kontzentrazio guztiek (0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) eragin nabarmenki onuragarria dute, baina modu neurritsuagoan (% 80-ko bideragarritasun zelularra) (9.B. irudia). Efektu hau NLC-ek eragindako toxikotasunaren ondorio izan daiteke. Beste ikerketa batean, ARPE-19 zelulak mangiferinadun NLC-kin eta hutsekin tratatuko dira. Egiaztatuta dago NLC-en kontzentrazio gero eta handiagoek eragin zitotoxikoa izan dezaketela (19).

Beraz, zelulen bideragarritasuna askoz handiagoa da farmakoa nanopartikula lipidikoetan ematen dugunean eta kontzentrazio baxuagoak eraginkorrak direnez inflamazioa inhibitzeko, hauek erabiliz, farmakoaren toxikotasun potentziala murriztuko da.

Hala ere, datu hauek kontuan hartuta, planteatu genezake ea benetan merezi duen MCC950 NLC-etan formulatzea, bere forma puruan aplikatu beharrean. NLC-ek une eta kontzentrazio egokian kanporatzen dute farmakoa, estimulu baten aurrean egiten baitute (10. irudiko marra urdina). Adibidez, eramaile baten polimero-kateak zabaldu egin daitezke tenperatura igotzearen ondorioz, farmakoa barreiatzeko eta garraiatzailearengandik askatzeko (18). Hau horrela izanda, MCC950 NLC-etan formulatuta baldin badugu, haren askapena kontrolatua izango da eta farmakoaren administrazioaren maiztasuna gutxitu ahalko da.



**10. irudia.** Farmakoaren kontzentrazioa denboran zehar. Farmakoaren maila toxikoa marra gorriak adierazten du, eta maila minimo eraginkorra berdeak. Farmakoaren askapen desiragarria edo/eta kontrolatua urdinez dago adierazita. Grisez erakusten dira bi kasu arazotsu. Horietan farmakoaren askapena azkarregi amaitzen da. Gainera, batzuetan, ez da gutxienerako maila eraginkorrera iristen edo maila toxikoa gainditzen du (18).

Gaur egun, hau bezalako beste hainbat ikerketa daude terapia antiinflamatorioekin erretinako endekapen-gaixotasunak tratatzeko. Efektu hori lortzeko mekanismo desberdinak erabiltzen dituzte. Jarraian, horietako batzuk azalduko dira.

Berberina (BBR) artelatzetik (*Quercus suber*) eratorritako alkaloidea da. Aspalditik erabili izan da beherakoaren eta urdail-hesteetako beste nahasmendu batzuen tratamendu bezala. Beste ikerketa batzuek iradoki dute, eragin antitumoral eta antimikrobianoa izateaz gain, eraginkorra izan daitekeela I motako diabetesa eta entzefalomielitis autoimmunea (EAE) tratatzeko (gaixotasun autoimmunen tratamendu gisa). RPE zelulek TNF- $\alpha$  estimuluaren aurrean, zenbait zitokin (IL-6, IL-8) eta monozitoen proteina kimioerakartzailea 1 (MCP-1) jariatzen ditu. IL-6 zitokin pro-inflamatorioak rol garrantzitsua dauka begiko inflamazioa eragiten duten gaixotasunetan. IL-8 eta MCP-1, aldiz, bitartekariak dira neutrofiloen eta monozitoen infiltrazioan, erretinako gaixotasun inflamatorioen kasuan. Ikusi da BBRk horien espresioa nabarmenki inhibitu ditzakeela, beherantz erregulatutako fosforilazioarekin batera (19). BBR NLC-etan kapsulatuz, tratamenduaren eraginkortasuna hobetzen den ikertu beharko litzateke.

Beste mekanismo posible bat antigorputz monoklonalak erabiltzea da. Adalimumab TNF- $\alpha$  hartzaileari lotzen zaio afinitatea handiarekin eta bere funtzio biologikoa neutralizatzen du (inflamazioaren erreakzio ur-jauzia inhibitzen du). Ubeitisa tratatzeko erabili izan da efektu antiinflamarioarengatik (20). Adalimumab-a ere NLC-etan barneratuta ikertu ahalko litzateke farmako antiinflamatorio gisa erretinako endekapen-gaixotasunetan.

Ikusi den bezala, hainbat mekanismo eta molekula daude erretinako endekapen-gaixotasunetan inflamazioa inhibitzeko. Aurretik aipatutako NLC-en abantailak kontuan hartuta, merezi du hauen kapsulazioa aztertzea farmakoen banaketa optimizatzeko.

## 4. Ondorioak

GRAL honen emaitza nagusiak MCC950 purua eta MCC950 molekulaz kargatutako NLC-ak alderatuz lortu dira. Ikusi da biek daukatela inflamazioak eragiten duen zelulen heriotza ekiditeko ahalmena. Hori horrela, MCC950 bidezko tratamendua eraginkorra izango litzateke erretinako endekapen-gaixotasunen progresioa ekiditeko edo moteltzeko.

MCC950 NLC-etan kapsulatzen badugu, inhibitzaile kantitate txikiagoa beharko dugu efektu onuragarria izan dezan. Gainera, nanopartikula mota horiek farmakoa (modu kontrolatuan) etengabe askatzen dutenez, horrek administrazio gutxiago behar izatea ekarriko luke. Ondorioz, albo-ondorio posibleak murriztea eta pazientearen tratamenduari hobeto atxikitzea lortu genuke. Dena den, oraindik ere beharrezkoa da ikerketa gehiago, farmakoa modu eraginkorrean administratzea nahi badugu, eta batez ere kornea-azalean egote-denbora luzatzea nahi badugu, horrela errazago barneratuko baita (21). MCC950 konposatuaren askapen-profila hurrengo ikerketetan aztertu beharko da, baita zelulek NLC-ak barneratzeko erabiltzen duten mekanismoa ere. Horrez gain, komenigarria izango litzateke administrazio inbaditzaile (injekzio intrarretiniarra) edo ez-inbaditzaile (tanta bidezko administrazio topikoa) moduan eman ondoren, haren *in vivo* eraginkortasuna ikertzea.

NLC-etatik farmakoen askapen-profila *in vitro* ikertzea tresna erabilgarria da haien *in vivo* jokaera aurreikusteko. NLC-etatik askatutako farmakoaren kopuru metatua zehazteko dialisi metodoa erabiltzen da. Prozedura honetan, farmakoz kargatutako NLC-ak dialisi-poltsetan sartzen dira, disoluzio indargetzaile batean sartuta (adibidez, fosfato buferra), eta 37 °C-tan gordetzen dira, agitazioaren menpe. Denbora-tarte jakinetan, buffer horren laginak hartuko dira eta hartu dugun soluzio kantitate berdina gehituko dugu. Bestela, Franz difusio-zelulak ere farmakoen askapena *in vitro* neurtzeko erabil daitezke, non zelulosazko mintz bat jartzen den NLC-dun buffera dagoen eta jasoko dugu buffera aurkitzen den konpartimentuen artean. Buffer horretara askatu den farmako kantitatea kalkulatu, askapen-profila atera ahalko da (12).

Beraz, hau guztia kontuan hartuta, MCC950-rekin kargatutako NLC nanopartikulak garatzea eraginkorra izango litzateke NLRP3 inflamasoma inhibitzeko eta erretinaren inflamazioari aurre egiteko. Gainera, erretinako endekapen-gaixotasunen beste faktore garrantzitsu bat oxigenoaren espezie erreaktiboen (ROS) gainproduktzioa denez, azterketa gehiago egin beharko dira kargatutako NLC-en eragin antioxidatzailea ebaluatzeko (22). Horrela, erretinako endekapen-gaixotasunen bilakaera hobetu daiteke. Dena den, oraindik ere bada zer ikertu, tratamendu hau eraginkortasunez ezarri nahi badugu.

## 5. Bibliografía

1. Lin JB, Apte RS. NAD<sup>+</sup> and sirtuins in retinal degenerative diseases: A look at future therapies. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2018;67:118-29.
2. Kaur G, Singh NK. The role of inflammation in retinal neurodegeneration and degenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(1):386.
3. Whitcup SM, Nussenblatt RB, Lightman SL, Hollander DA. Inflammation in retinal disease. *International Journal of Inflammation*. 2013;2013:724648.
4. Tseng WA, Thein T, Kinnunen K, Lashkari K, Gregory MS, D'Amore PA, et al. NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells by lysosomal destabilization: Implications for age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2013;54(1):110-20.
5. Gao J, Liu RT, Cao S, Cui JZ, Wang A, To E, et al. NLRP3 Inflammasome: Activation and Regulation in Age-Related Macular Degeneration. *Mediators of Inflammation*. 2015;2015:690243.
6. Zhao L, Hou C, Yan N. Neuroinflammation in retinitis pigmentosa: Therapies targeting the innate immune system. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:1059947.
7. Bakhshi S, Shamsi S. MCC950 in the treatment of NLRP3-mediated inflammatory diseases: Latest evidence and therapeutic outcomes. *International Immunopharmacology*. 2022;106:108595.
8. Beloqui A, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A, Almeida AJ, Préat V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2016;12(1):143-61.
9. Tian B, Bilsbury E, Doherty S, Teebagy S, Wood E, Su W, et al. Ocular Drug Delivery: Advancements and Innovations. *Pharmaceutics*. 2022;14(9):1931.
10. Balguri SP, Adelli GR, Majumdar S. Topical ophthalmic lipid nanoparticle formulations (SLN, NLC) of indomethacin for delivery to the posterior segment ocular tissues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;109:224-35.
11. Li S, Chen L, Fu Y. Nanotechnology-based ocular drug delivery systems: recent advances and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*. 2023;21:232.
12. Haider M, Abdin SM, Kamal L, Orive G. Nanostructured lipid carriers for delivery of chemotherapeutics: A review. *Pharmaceutics*. 2020;12(3):288.
13. Smith J, Petrovic P, Rose M, De Souza C, Muller L, Nowak B, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(2):57.

14. Gonzalez-Mira E, Egea MA, Souto EB, Calpena AC, García ML. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. *Nanotechnology*. 2011;22(4):045101.
15. Boice AG, Poklis JL, Guo C, Wang XY, Zhang S, Halquist MS. High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for detection and quantification of select NLRP3 inhibitors from brain tissue. *Chemical Data Collections*. 2021;35:100761.
16. Tseng WA, Thein T, Kinnunen K, Lashkari K, Gregory MS, D'Amore PA, et al. NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells by lysosomal destabilization: Implications for age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2013;54(1):110-20.
17. Santonocito D, Barbagallo I, Distefano A, Sferrazzo G, Vivero-Lopez M, Sarpietro MG, et al. Nanostructured Lipid Carriers Aimed to the Ocular Delivery of Mangiferin: In Vitro Evidence. *Pharmaceutics*. 2013;15(3):951.
18. Ward MA, Georgiou TK. Thermoresponsive polymers for biomedical applications. *Polymers (Basel)*. 2011;3(3):1215-42
19. Wang Q, Qi J, Hu R, Chen Y, Kijlstra A, Yang P. Effect of berberine on proinflammatory cytokine production by ARPE-19 cells following stimulation with tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2012;53(4):2395-402.
20. Cordero-Coma M, Sobrin L. Antitumor necrosis factor- $\alpha$  therapy in uveitis. In *Survey of Ophthalmology*. 2015;60(6):575-89.
21. Tian B, Luo Q, Song S, Liu D, Pan H, Zhang W, et al. Novel surface-modified nanostructured lipid carriers with partially deacetylated water-soluble chitosan for efficient ocular delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;101(3):1040-9.
22. Zingale E, Rizzo S, Bonaccorso A, Consoli V, Vanella L, Musumeci T, et al. Optimization of Lipid Nanoparticles by Response Surface Methodology to Improve the Ocular Delivery of Diosmin: Characterization and In-Vitro Anti-Inflammatory Assessment. *Pharmaceutics*. 2022;14(9):1961.