

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA KRALJ

**SAMOASOCIIRANJE POLIELEKTROLITOV Z MODELNIM
PROTEINOM OVALBUMINOM**

**SELF-ASSEMBLY OF POLYELECTROLYTES WITH A MODEL
PROTEIN OVALBUMIN**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogu sem opravljala v laboratorijih Razvojnega centra Slovenija, Lek farmacevtska družba d.d., pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Mateje Cegnar, mag. farm.

Zahvala

Na tem mestu bi se najprej najlepše zahvalila celotnemu osebju Razvojnega centra v Leku, ki me je sprejelo medse in mi omogočilo prijetno delo v laboratorijih. Predvsem gre moja zahvala somentorici doc. dr. Mateji Cegnar za vodenje poteka mojega dela in neprecenljivo pomoč pri interpretaciji rezultatov.

Zahvaljujem se tudi asist. dr. Mihu Homarju za pomoč pri filtraciji in slikanju vzorcev ter gospe Tatjani Hrovatič, tehnični sodelavki na Fakulteti za farmacijo, za izvedbo HPLC analiz ovalbumina.

Nič manj pa seveda niste pomembni tudi vsi ostali, predvsem starši, sestra in brat, sošolci in prijatelji, skratka vsi, ki ste me na kakršenkoli način spremljali med študijem, me spodbujali, podrili in mi pomagali pozabiti marsikakšen neuspeh. Naloga, ki je pred vami, je tudi delo vaših prizadevanj in dobre volje.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogu samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Mateje Cegnar, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	4
ABSTRACT	5
SEZNAM OKRAJŠAV	6
1. UVOD	7
1.1. VLOGA NANOSISTEMOV V FARMACEVTSKI TEHNOLOGIJI	7
1.2. SAMOASOCIIRANJE BIOKOMPATIBILNIH POLIMEROV V PEK	7
1.2.1. Hitosan	7
1.2.2. Alginat	8
1.3. PRIPRAVA PEK S PRE-GELIRANJEM ALGINATA IN VPLIV PARAMETROV NA VELIKOST KOMPLEKSOV	9
1.4. PROTEINI	11
1.4.1. Temperatura denaturacije proteina	11
1.4.2. Ovalbumin- modelni protein	12
1.5. LIOFILIZACIJA	13
1.6. KRIOPROTEKTANTI IN LIOPROTEKTANTI	14
1.7. VREDNOTENJE POLIELEKTROLITNIH KOMPLEKSOV	15
1.7.1. Velikost in polidisperzni indeks	15
1.7.2. Število sipanja kot merilo koncentracije PEK v disperziji	18
1.7.3. Zeta potencial	19
1.8. KARAKTERIZACIJA PROTEINOV Z NEKOVALENNTNIMI EKSTRINZIČNIMI FLUORESTENTNIMI BARVILI	20
1.8.1. Mehanizem fluorescence barvil	21
1.8.2. Barvilo bis-ANS in določevanje površinske hidrofobnosti	22
2. NAMEN DELA	24
3. EKSPERIMENTALNI DEL	25
3.1. MATERIALI	25
3.2. APARATURE	26
3.3. METODE	27
3.3.1. DOLOČEVANJE OPTIMALNIH POGOJEV TVORBE PEK	27
3.3.2. VREDNOTENJE NANODELCEV GLEDE NA FIZIKALNE LASTNOSTI IN STABILNOST ..	30
3.3.3. ANALIZA OVALBUMINA	31
3.3.4. LIOFILIZACIJA	32
3.3.5. SPROŠČANJE OVALBUMINA	32
3.3.6. DOLOČANJE POVRSINSKE HIDROFOBNOSTI Z BARVILOM BIS-ANS	33
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	35
4.1. DOLOČITEV OPTIMALNIH POGOJEV ZA TVORBO POLIELEKTROLITNIH KOMPLEKSOV	35
4.2. LIOFILIZACIJA NANODELCEV	49
4.3. SPROŠČANJE OVALBUMINA	52
4.4. DOLOČANJE POVRSINSKE HIDROFOBNOSTI PROTEINA S POMOČJO BARVILA BIS-ANS	53
5. ZAKLJUČKI	58
6. LITERATURA	61

POVZETEK

Biorazgradljivi polimerni nanodelci (ND) predstavljajo obetaven sistem za zagotavljanje tarčne dostave učinkovin, izboljšanje biorazpoložljivosti pri peroralni aplikaciji, vzdrževanje koncentracije na tarčnem tkivu in povečanje stabilnosti učinkovin v primeru možnosti encimske razgradnje. V odvisnosti od narave polimera in lastnosti učinkovine, ki jo želimo vgraditi, se za izdelavo ND uporablja več različnih metod. Za vgradnjo proteinov je zelo primerno samoasociiranje polimerov v vodnih raztopinah, saj to ne vključuje uporabe organskih topil, močnega segrevanja ali agresivnega stresanja, ki so potencialno škodljivi za občutljive biomolekule.

V nalogi smo proučevali samoasociiranje dveh mukoadhezivnih biokompatibilnih polimerov alginata in hitosana s proteinom ovalbuminom. Določili smo optimalne pogoje tvorbe ND, preverili vpliv pregeliranja alginata s kalcijem na tvorbo polielektrolitnih kompleksov (PEK) in določili optimalne koncentracije posameznih komponent za pripravo disperzije z maksimalno koncentracijo PEK. Izdelanim ND smo izmerili fizikalne lastnosti (povprečni premer, polidisperzni indeks, zeta potencial) ter določili učinkovitost asociiranja in delež vgrajenega ovalbumina. Preverili smo stabilnost nastalih PEK v vodni raztopini in po pretvorbi v suho trdno obliko. Optimirali smo postopek liofilizacije in določili krioprotektante, ki med liofiliziranjem najbolje ohranijo velikost delcev in homogenost vzorca ter omogočajo čim boljše redispersiranje nanodelcev. Glede na profil sproščanja pri različnih pH, smo sklepali o ustreznosti zaščite proteina z biokompatibilnima polimeroma v območju nizkega pH in možnosti sproščanja ovalbumina pri višjem pH. Preučevali smo tudi vpliv kompleksiranja na površinsko hidrofobnost proteina v kompleksu.

Izdelali smo PEK s povprečnim premerom med 200 in 400 nm, polidisperznim indeksom 0,2-0,3, zeta potencialom med -45 in -30 mV, številom sisanja 150.000-250.000 kcps in visokim deležem vgrajenega ovalbumina (38%). Z dodatkom 2% manitola kot krioprotektanta smo ND liofilizirali in jih pretvorili v stabilnejšo obliko, ki hkrati zagotavlja hitro in učinkovito redispersiranje v vodi. Z metodo, ki je sposobna razlikovati med hidrofobnimi in hidrofilnimi površinami v raztopini, smo uspeli dokazati večjo hidrofobnost proteina v kompleksu. Slednje bi lahko doprineslo k večji možnosti za prehod proteina skozi lipidne hidrofobne membrane.

ABSTRACT

Biodegradable polymeric nanoparticles (ND) represent a promising system for targeted delivery of active substances, improvement of bioavailability after oral application, maintenance of activity on targeted tissue and improvement of drug stability in case of being exposed to enzymatic degradation. There are various methods used for production of nanoparticles and are chosen depending on the polymers nature and drug characteristics. For the entrapment of proteins into nanosystem self-assembly of polymers is most commonly used. Choosing this method we avoid the use of organic solvents, strong heating or aggressive agitation, which are potentially harmful for the sensitive biomolecules.

In our work we examined self-assembly of two mucoadhesive, biocompatible polymers alginate and chitosan with the model protein ovalbumin. We defined optimal conditions for the nanoparticles formation, checked the influence of ionotropic pre-gelation on polyelectrolyte complexation and determined optimal concentrations of components for the preparation of dispersion with the highest possible concentration of nanoparticles. We determined physical characteristics of nanoparticles (their mean size, polidispersity index, zeta potential), association efficiency and loading capacity of ovalbumin. The stability of water dispersions before and after lyophilization was checked. We optimised the process of lyophilization and selected the most appropriate cryoprotectant to protect nanoparticles against freezing and dehydration stress and to provide good redispersibility of the lyophilised product. According to the release profile at different pH values we predicted the possibility of protein protection with the two biocompatible polymers in the range of low pH and release of protein at higher pH. We examined also the influence of complexation on the surface hydrophobicity of protein.

The mean size of produced nanoparticles ranged between 200 and 400 nm, polidispersity index was between 0.2 and 0.3 and zeta potential between -45 and -30 mV. Derived count rate was between 150.000 and 250.000 kcps and the loading capacity was very high (38%). Using 2% mannitol nanoparticles were lyophilised and converted into more stable form, that provides fast and effective redispersibility in water. With the method that can distinguish between hydrophilic and hydrophobic surfaces in the water solutions we managed to prove higher surface hydrophobicity of the protein in the complex. This could improve the permeability of protein through hydrophobic lipid membranes.

SEZNAM OKRAJŠAV

AE - učinkovitost asociiranja proteina v polielektrolitne komplekse

ANS – 1-anilinonaftalen-8-sulfonat

Bis-ANS – 4,4'-bis-1- anilinonaftalen-8-sulfonat

d – povprečni premer delcev

DSL – dinamično sisanje svetlobe

F_A – delež acetiliranih amino skupin v verigah hitosana

F_G – delež guluronskih enot v verigah alginata

F_M – delež manuronskih enot v verigah alginata

ICT – intramolekularni prenos naboja

LC- delež vgrajenega proteina v nanodelce

LDV – lasersko Dopplersko merjenje hitrosti

ND – nanodelci

PBS – fosfatni pufer s solmi (phosphate bufer saline)

PdI – polidisperzni indeks

PEK – polielektrolitni kompleksi

Tc – temperatura kolapsa liofilizata

Tg – temperatura steklastega prehoda

Zp – zeta potencial

ϵ – dielektrična konstanta

λ - valovna dolžina

1. UVOD

1.1. VLOGA NANOSISTEMOV V FARMACEVTSKI TEHNOLOGIJI

Nanodelci so koloidni polimerni sistemi submikronskih velikosti. Zanimivi so predvsem z vidika dostavnih sistemov majhnih molekul ali makromolekularnih učinkovin kot so peptidi, proteini, cepiva in DNA. Uporablja se za zagotavljanje tarčne (celične/tkvne) dostave učinkovin, za izboljšanje biorazpoložljivosti pri peroralni aplikaciji, za vzdrževanje učinka na tarčnem tkivu, za izboljšanje raztopljanja učinkovin pri intravenski aplikaciji in za povečanje stabilnosti učinkovin v primeru dozvetnosti za encimsko razgradnjo (1,2). Glavna prednost nanodelcev pred sistemi mikrometrskih velikosti je v njihovi majhnosti, ki se kaže v večji prodornosti, prehodnosti skozi biološke membrane in vstopu v znotrajcelični prostor (3,4).

1.2. SAMOASOCIIRANJE BIOKOMPATIBILNIH POLIMEROV V POLIELEKTROLITNE KOMPLEKSE

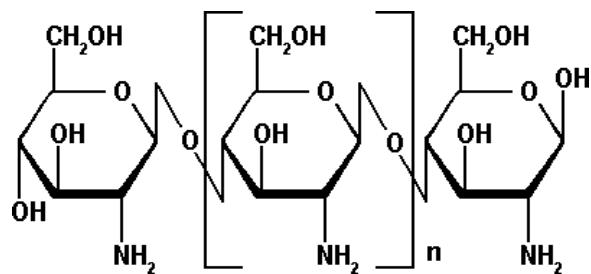
Poznamo polimerizacijske, emulzijske in obarjalne metode izdelave nanodelcev. Vendar pa večino teh pristopov vključuje uporabo organskih topil, močno segreganje ali agresivno stresanje, ki so potencialno škodljivi za občutljive biomolekule. Tem neugodnim okoliščinam se lahko izognemo z uporabo hidrofilnih polimerov in milejših metod, kot je samoasociiranje polimerov v polielektrolitne komplekse (PEK).

Nasprotno nabitih polimerov v razredčenih vodnih raztopinah namreč spontano interagirajo in ob mešanju tvorijo PEK. Glavna gonilna sila tvorbe kompleksov je najverjetneje porast entropije pri sproščanju protionov. Polisaharidi so še posebno zanimivi zaradi svojih biokompatibilnih, biorazgradljivih, hidrofilnih in zaščitnih lastnosti. Eden najbolj zanimivih sistemov za dostavo učinkovin so prav gotovo PEK s samoasociiranjem alginata in hitosana.

1.2.1. Hitosan

Hitosan je netoksičen, biokompatibilen kationski polisaharid, ki ga pridobivajo z delno deacetilacijo hitina izoliranega iz školjk in rakov. Ta linearen binaren kopolimer sestoji iz β

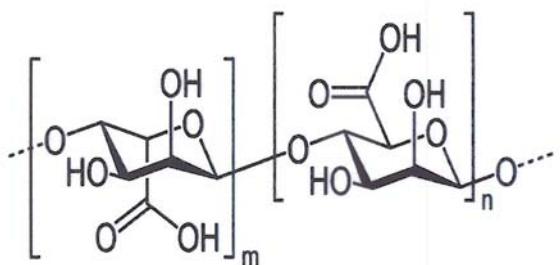
(1→4) vezanih enot 2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranoze (A-enota) in 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoze (D-enota) (slika 1). Posamezne enote so naključno razporejene vzdolž verige hitosana. Povprečna gostota naboja hitosana je definirana z deležem acetiliranih amino skupin v verigah (F_A) in s pH raztopine. Stopnja deacetilacije hitina določi število prostih amino skupin, ki lahko nosijo nabojo, koncentracija vodikovih ionov v raztopini pa določi, koliko teh amino skupin je protoniranih. Vseeno pa imajo hitosani različne kemijske zgradbe (F_A vrednosti med 0,01 in 0,49) zelo podobne dissociacijske konstante (pK_a) in sicer v območju 6,5- 6,6. Pri dostavi učinkovin služi hitosan predvsem kot pospeševalec absorpcije hidrofilnih makromolekularnih učinkovin. Z znižanjem transepitelne celične upornosti namreč omogoči začasno odprtje tesnih stikov med epitelijskimi celicami in poveča absorpcijo makromolekul. V številnih raziskavah so že uspeli dokazati povečanje biološke uporabnosti inzulina, vključenega v hitosanske nanodelce, tako pri intranasalni (5,6) kot tudi peroralni (7,8) aplikaciji. Poleg hitosana so kot pospeševalca absorpcije preučevali tudi polimera polietilen imin (PEI) in poli-L-lizin (PLL), vendar pa sta se ta dva izkazala za toksična.



Slika 1: Struktturna formula D enot hitosana

1.2.2. Alginat

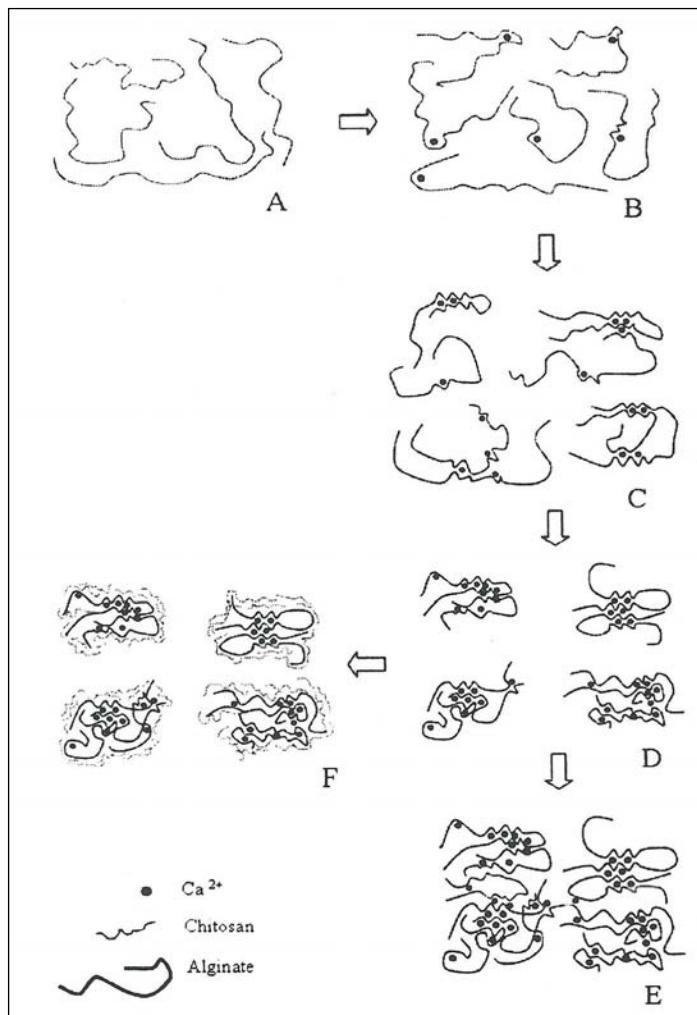
Alginat je naravni anionski polisaharid, ekstrahiran iz rjavih alg. Ta linearji binarni kopolimer sestoji iz (1→ 4)- vezanih enot β -D-manuronske (M) in α -L-guluronske (G) kisline (slika 2). Procent posameznih monomerov obeh uronskih kislin (F_G in F_M) in njihovo sekvenčno zaporedje vzdolž polimerne verige močno variirata v odvisnosti od izvora alginata. Verige sestojijo iz homopolimernih blokov G enot (G- bloki), M enot (M- bloki) in blokov, kjer se izmenjavajo M in G enote (MG- bloki). pK_a vrednosti monomernih enot manuronske in guluronske kisline sta 3,38 in 3,65. Ker se pod temi vrednostmi pH alginat pretvori v manj topno obliko, lahko zaščiti učinkovino vgrajeno v nanodelce pred škodljivim delovanjem nizkega pH želodčne kisline.



Slika 2: Strukturna formula alginata

1.3. PRIPRAVA PEK S PRE-GELIRANJEM ALGINATA IN VPLIV PARAMETROV NA VELIKOST KOMPLEKSOV

PEK z alginatom in hitosanom lahko tvorimo na dva načina. Dvostopenjski proces vključuje pre-geliranje alginata s CaCl_2 in nato postopno dodajanje hitosana (slika 3). Lahko pa nanodelce tvorimo samo v eni stopnji in sicer s počasnim vkapavanjem hitosana v raztopino alginata. Nekatere raziskave predvidevajo, da je pre-geliranje alginata ključnega pomena za tvorbo ionskih interakcij med alginatom in pozitivno nabitim polimerom (9). Afiniteta kalcijevih ionov do guluronskih in manuronskih enot alginata ni enaka. Posledično kalcij najprej reagira z alginatom na področju ponavljajočih se enot guluronske kisline in tvori gel tipa „škatle za jajca”, dodatni kalcijevi ioni pa nato reagirajo še s preostalimi manuronskimi in guluronskimi enotami (10). Poznavanje zgradbe alginata (relativna vsebnost enot guluronske in manuronske kisline) in koncentracija kalcijevih ionov v raztopini sta zato ključnega pomena pri predvidevanju trdnosti kompleksov in nekaterih lastnosti dostavnega sistema kot na primer hitrosti sproščanja učinkovine (11). Prejšnje raziskave so pokazale, da mora biti pri alginatu z razmerjem manuronske enote: guluronske enote = 1,5 za tvorbo ustreznega pre-gela masno razmerje kalcijevega klorida in natrijevega alginata manjše od 0,2. V območju med 0,2 in 0,6 namreč pride do sigmoidnega porasta turbidnosti, pri masnem razmerju 0,6 pa je doseženo maksimalno geliranje (12).



Slika 3: Shematski prikaz tvorbe alginatno-hitosanskih nanodelcev: nizka koncentracija alginata v raztopini (A), zvijanje verig pri nizkih koncentracijah kalcijevih ionov (B), povezovanje verig pri višjih koncentracijah kalcijevih ionov (C), pre-geliranje (D), nadaljnje dodajanje kalcijevih ionov ali prenehanje mešanja vodi v tvorbo alginatnega gela zaradi ionskih interakcij (E), dodatek hitosana povzroči tvorbo hitosanske membrane okoli alginatnega jedra ter tvorbo stabiliziranih nanodelcev (F)

Tvorba homogenih disperzij PEK ustreznih velikosti je pogojena s koncentracijo polimerov, njihovo zgradbo in ustreznimi pogoji izdelave.

Pomembni parametri polimerov sta delež acetiliranih amino skupin hitosana (F_A), ki vpliva na količino naboja, ter delež guluronskih enot pri alginatu (F_G), ki vpliva na pregeliranje alginata s kalcijem. Pomembni sta tudi molekulski masi obeh polimerov, ki vplivata na velikost izdelanih nanodelcev. V raziskavah, kjer so PEK pripravili po postopku pregeliranja alginata s CaCl_2 , so največje delce dobili v primeru uporabe alginata z visokim deležem F_G (13). Pri enostopenjski pripravi PEK pa delež F_G v verigah alginata ni značilno vplival na velikost delcev (14). Podobno tudi delež F_A hitosana ni imel značilnega vpliva na ta parameter. Glede primerne molekulske mase uporabljenih polimerov so mnenja deljena. V nekaterih raziskavah rezultati kažejo, da dobimo najmanše komplekse pri uporabi polimerov z nizkimi molekulskimi masami (14), spet druge raziskave pa kažejo, da je učinkovitost vezave proteina v komplekse z zelo nizkomolekularnim hitosanom značilno manjša. Poleg tega so pri večji molekulski masi hitosana verige daljše, kar pomeni več pozitivnih vezavnih mest za negativno

nabit alginat. To zmanjša število molekul hitosana, ki reagirajo z alginatnim jedrom in posledično je velikost delcev manjša (13). Prednost uporabe torej dajejo nizkomolekularnemu hitosanu pred zelo nizkomolekularnim ali visokomolekularnim.

Pri izbiri pogojev izdelave PEK moramo biti pozorni predvsem na pH in ionsko moč končne disperzije. Glede na to da nosita tako alginat kot hitosan permanenten naboj, je izbira ustreznega pH pogojena predvsem z nabojem/ izoelektrično točko učinkovine/ proteina, ki jo/ ga želimo vgraditi v kompleks. Upoštevati pa moramo tudi slabo topnost hitosana pri $\text{pH} > 5$ in problem topnosti alginata pri $\text{pH} < 3$.

Vpliv ionske moči je morda pomembnejši pri sproščanju učinkovine/ proteina iz kompleksa, kot pri sami tvorbi kompleksov. Raziskave so namreč pokazale, da je sproščanje učinkovin iz kompleksov večje v raztopinah z višjo ionsko močjo. Šlo naj bi za podprtje elektrostatskih vezi med molekulami nasprotno nabitih polimerov. Pri pripravi kompleksov po postopku pre-geliranja alginata s CaCl_2 , so ugotovili logaritemsko padanje afinitete kalcijevih ionov do vezavnih mest na alginatu z naraščajočo koncentracijo natrijevih ionov v raztopini. To je dokaz, da so interakcije med kalcijem in alginatom elektrostatske in kompetitivno izpodrinjene z natrijevimi ioni. Podobno razlagajo tudi padec vezavne afinitete med alginatnim pre-gelom in pozitivno nabitim polimerom ter posledično podprtje kompleksov (12).

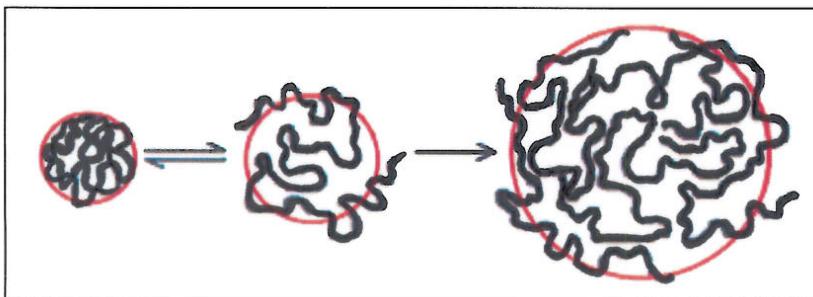
1.4. PROTEINI

Proteini so makromolekule sestavljene iz aminokislin povezanih v peptidno verigo in so sintetizirani znotrajcelično s kombiniranjem dvajsetih različnih tipov aminokislin. V nasprotju z umetno sintetiziranimi, naključno zvitimi polimeri, so v naravnem stanju proteinske polipeptidne verige zvite v unikatno tridimenzionalno strukturo. Te strukture so stabilizirane s kombinacijo elektrostatskih in hidrofobnih interakcij ter tvorbo multiplih vodikovih vezi med stranskimi verigani aminokislin.

1.4.1. Temperatura denaturacije proteina

Proteini izvajajo specifične funkcije znotraj bioloških sistemov, kot na primer katalizo reakcij in transport malih molekul ali ionov. Kot taki imajo natančno definirano zgradbo, ki pa mora vseeno omogočati visoko stopnjo fleksibilnosti. Interakcije, ki stabilizirajo proteinsko

strukturo so torej ravno zadostne za vzdrževanje ustreznega konformacije proteina znotraj ozkega območja danih okoliških pogojev. Če so pogoji v raztopini zunaj tega območja (sprememba pH ali temperature), hitro pride do entropijsko vodene denaturacije ali razvijanja verig. V tem primeru velikost proteina naraste na vrednost naključno zvitega polimera enake molekulske mase. Dodatno v odsotnosti kaotropnih snovi, hidrofobne interakcije lahko hitro vodijo v nespecifično agregacijo denaturiranih polipeptidnih verig (slika 4).



Slika 4: Shematski prikaz denaturacije proteina in agregacije polipeptidnih verig ter s tem povečanje velikosti delcev

Točka, pri kateri protein preide iz nativne v denaturirano obliko, je definirana kot temperatura denaturacije. Spremembo velikosti, ki spremišča denaturacijo, detektiramo z metodo dinamičnega sisanja svetlobe. Zaradi unikatnega primarnega zaporedja aminokislin posameznih proteinov obsegajo temperature denaturacije zelo različne vrednosti. Dodatno imajo tudi pogoji v raztopini (pH in ionska moč) ter posttranslacijske modifikacije (glikozilacija) opazen vpliv na stabilnost proteinskih struktur in s tem tudi na temperaturo denaturacije. Določitev te temperature je torej izrednega pomena pri celokupni karakterizaciji proteina, še posebej če je ta namenjen vgradnji v farmacevtski produkt.

1.4.2. Ovalbumin- modelni protein

Ovalbumin je glavni protein jajčnega beljaka. Sestavlja ga 385 aminokislin, njegova relativna molekulska masa pa je 45 kDa. Je glikoprotein s štirimi možnimi mestami glikozilacije. Glede na aminokislinsko zaporedje in tridimenzionalno strukturo je homologen inhibitorjem serinskih proteaz (15). Kljub temu pa v nasprotju z večino ostalih predstavnikov te skupine ne inhibira serinske proteaze in ne vpliva na procese kot sta fibrinoliza in koagulacija. Njegova vloga je neznana, domnevno pa je pomemben pri vezavi kovinskih ionov in kot zaloga aminokislin. V primeru zastrupitve s težkimi kovinami, kot je na primer železo, je sposoben kelirati kovinske

ione znotraj sulfhidrilnih vezi. Keliranje onemogoči absorpcijo težkih kovin v gastrointestinalnem traktu in prepreči zastrupitev (16).

V raziskavah je pomemben pri preučevanju proteinske strukture in lastnosti, ker je dostopen v velikih količinah. S primerjavo strukture ovalbumina in inhibitorjev serinskih proteaz ugotavljajo strukturne značilnosti pomembne za inhibitorni učinek. V proteomiki se običajno uporablja kot marker za kalibracijo elektroforeznih gelov, v imunologiji pa za stimulacijo alergijskih reakcij na testnih osebkih (17).

1.5. LIOFILIZACIJA

Nanodelci zaradi velike mejne površine in z njo povezane proste površinske energije z združevanjem skušajo doseči energijsko ugodnejše stanje. Stabilnost disperzij omogočajo elektrostatske odbojne sile, sterična stabilizacija in stabilnost filma stabilizatorja. Vendar pa dolgotrajno stabilnost ND lahko zagotovimo le s popolno odstranitvijo vode, s čimer onemogočimo hidrolitično razgradnjo polimera in učinkovine, sproščanje vgrajene učinkovine in rast mikroorganizmov. V ta namen se v farmaciji najpogosteje uporablja metoda liofilizacije.

Liofilizacija poteka v treh stopnjah: zamrzovanje, primarno in sekundarno sušenje. Z zamrzovanjem pretvorimo vodne raztopine v trdno zamrznjeno stanje. Disperzije lahko zamrznemo v tekočem dušiku, na mrzli plošči z možnostjo reguliranja temperature ali z razprševanjem v tok mrzlega plina. Hitrost zamrzovanja vpliva tako na poznejšo sublimacijo kot tudi na končno kakovost suhega produkta. Splošno velja, da počasno zamrzovanje skrajša čas sublimacije, ker se zaradi velikih ledenih kristalov pri sublimaciji tvorijo velike pore, s hitrim zamrzovanjem pa se izognemo agregaciji ND. S primarnim sušenjem omogočimo sublimacijo zamrznjenega topila. To dosežemo z znižanjem tlaka in temperature na vrednost pod trojno točko. Med sekundarnim sušenjem pa s postopnim dvigom temperature dovedemo energijo potrebno za desorpциjo vezane vode. Na tej stopnji sušenja je temperatura lahko višja od temperature tališča topila, a hkrati nižja od temperature steklastega prehoda matriksa. Tlak je lahko celo nižji kot v prvi stopnji sušenja. V določenih primerih pred primarnim sušenjem uvedemo še stopnjo inkubacije vzorcev pri temperaturi nad temperaturo steklastega prehoda a pod temperaturo tališča ledu. S tem omogočimo difuzijo nezmrznjene vode skozi zmrznen matriks in posledično rast ledenih kristalov. Ta inkubacija je priporočljiva zlasti pri uporabi krioprotektantov, saj omogoči popolno kristalizacijo le teh (18).

1.6. KRIOPROTEKTANTI IN LIOPROTEKTANTI

Pri liofilizaciji so nanodelci izpostavljeni stresnim pogojem (zamrzovanje, dehidracija), ki lahko destabilizirajo koloidne disperzije. Pri zamrzovanju pride do ločitve faz na led in kriokoncentrirano disperzijo, katera poleg nanodelcev vsebuje še soli pufrov in nevgrajeno učinkovino. Ta visokokoncentrirani sistem lahko povzroči agregacijo ali celo ireverzibilno združevanje delcev. Prav tako lahko kristalizacija ledu za nanodelce predstavlja mehanski stres in povzroči njihovo destabilizacijo. Zato pred zamrzovanjem disperzijam dodamo pomožne snovi za zaščito kompleksov pred stresom zamrzovanja (krioprotektanti) in stresom sušenja (lioprotektanti) ter za povečanje stabilnosti med shranjevanjem. Najpogosteje uporabljeni krioprotektanti pri liofilizaciji so sladkorji: trehaloza, saharoza, glukoza in manitol. Ti sladkorji pod temperaturo steklastega prehoda tvorijo steklast matriks, ki imobilizira nanodelce ter jih zaščiti pred aggregacijo in mehanskimi poškodbami z ledenimi kristali. Zamrzovanje naj bi bilo torej izvedeno pod temperaturo steklastega prehoda zmrznjenega amorfnega vzorca ali pod temperaturo kristalizacije eutektika, da zagotovimo popolno solidifikacijo vzorca. Trehaloza je krioprotektant za biomolekule z največ prednostmi. Je manj higroskopna, nima možnosti tvorbe notranjih vodikovih vezi, kar omogoči bolj fleksibilno tvorbo vodikovih vezi z nanodelci med liofilizacijo, kemično je nereaktivna in ima višjo temperaturo steklastega prehoda. V splošnem je stopnja stabilizacije disperzij s krioprotektanti odvisna od koncentracije le teh oziroma od masnega razmerja krioprotektant:nanodelci. Poleg tega je za uspeh liofilizacije odločilnega pomena tudi koncentracija nanodelcev. Učinkovitost lioprotektantov je namreč večja v disperzijah z višjo koncentracijo kompleksov (19).

Druga razlaga stabilizacije dispernih sistemov s krioprotektanti je izolacija posameznih delcev s sladkorji v nezmrznjeni frakciji in s tem preprečitev aggregacije med zamrzovanjem nad temperaturo steklastega prehoda.

Naslednja stopnja (dehidracija) vključuje odstranjevanje ledu in vezane vode. Odstranitev na trdno fazo adsorbirane vode pa lahko destabilizira nezaščitene nanodelce. Stabilizacijo dosežemo z lioprotektanti (manitol, glicin), ki nadomestijo molekule vode. Mehanizem predpostavlja tvorbo vodikovih vezi med lioprotektantom in polarnimi deli nanodelcev ob koncu dehidracije. Lioprotektant namreč predstavlja zamenjavo za molekule vode in ohrani prvotno zgradbo kompleksov.

1.7. VREDNOTENJE POLIELEKTROLITNIH KOMPLEKSOV

1.7.1. Velikost in polidisperzni indeks

Velikost PEK je ključnega pomena pri vgradnji in določanju mesta dostave učinkovine.

Naprava Zetasizer meri velikost delcev na podlagi dinamičnega sipanja svetlobe (DSL) imenovanega tudi fotonska korelacijska spektroskopija (20). Naprava določi velikost delcev na podlagi Brownovega gibanja. Delce osvetlimo z lasersko svetlogo in analiziramo spremenjanje intenzitete sipane svetlobe. Če blizu delca postavimo zaslon, bo ta osvetljen s sipano svetlogo. Če pa zamenjamo en delec s tisočimi, se bo na zaslonu pojavil vzorec belih pik in temnih področij, kjer ni detektirane svetlobe. Svetle lise dobimo tam, kjer svetlobni valovi padajo na zaslon v isti fazi in interferirajo konstruktivno, medtem ko so fazni prispevki na temnih področjih medsebojno destruktivni in se izničijo. Če bi bili delci negibljivi, se tudi vzorec svetlečih pik na zaslonu ne bi spremenjal niti v poziciji niti v velikosti.

Dejansko pa delci suspendirani v tekočini nikoli niso stacionarni. Zaradi naključnih trkov z molekulami topila so stalno podvrženi takojimenovanemu Brownovemu gibanju. Pomembno dejstvo za DSL je, da se majhni delci gibljejo hitreje kot veliki. Razmerje med velikostjo delca in njegovo hitrostjo, kot posledico Brownovega gibanja, je podano v Stokes-Einsteinovi enačbi (21). Ker se delci neprestano gibljejo, se spreminja tudi vzorec svetlih pik na zaslonu. Z gibanjem delca konstruktivni in destruktivni fazni prispevki valov sipane svetlobe vodijo v naraščanje in upadanje intenzitete osvetljenih in neosvetljenih predelov na zaslonu.

Zetasizer Nano meri stopnjo nihanja intenzitete sipane svetlobe in na podlagi teh meritev izračuna velikost delcev.

1.7.1.1. Interpretacija podatkov o stopnji nihanja intenzitete sipane svetlobe

Komponenta naprave Zetasizer, imenovana digitalni kolerator, meri stopnjo podobnosti dveh signalov na zaslonu skozi neko časovno obdobje. Če primerjamo intenziteti signala določenega dela vzorca na zaslonu v dveh časovnih točkah (t in $t + dt$), vidimo, da sta si signala zelo podobna oziroma močno korelirata. Če primerjamo nato prvotni signal z malo poznejšim signalom ($t + 2dt$), dobimo še vedno relativno dobro primerjavo dveh signalov, ki

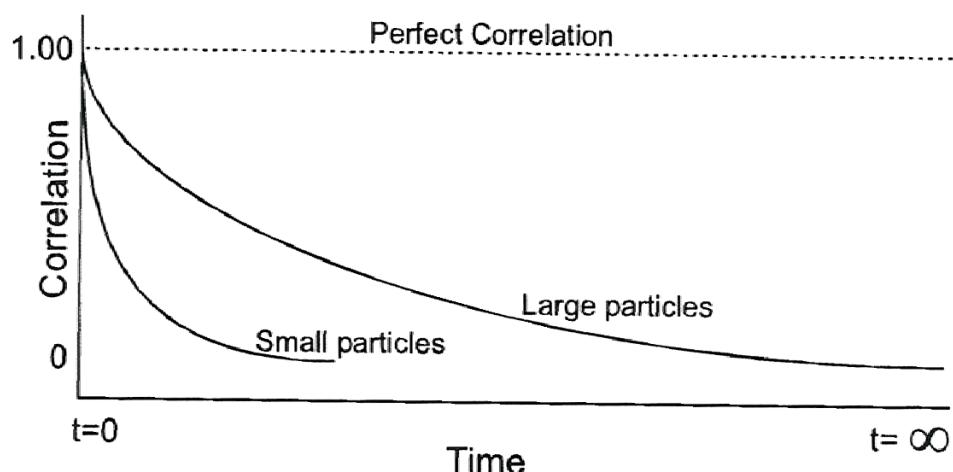
pa ne bo tako dobra kot v času ($t + dt$). Korelacija torej s časom pada. Veliko kasneje v času t' bosta signalna popolnoma različna. Pravimo, da med signaloma ni korelacije.

Pri DLS imamo opravka z zelo kratkimi intervali merjenja. Za tipičen vzorec je čas, ki je potreben, da korelacija med dvema signaloma pade na ničlo, v območju 1 do 10 milisekund, časovni intervali (dt) pa sodijo v območje nanosekund ali mikrosekund.

Če bi primerjali signal intenzitete v času t s samim seboj, bi ugotovili popolno korelacijo, ker sta signala identična. Popolno korelacijo označimo z 1, odsotnost korelacije pa z 0.

1.7.1.2. Uporaba korelacijske funkcije

Ko merimo velikost večjih delcev, ki se gibljejo počasneje, se tudi intenziteta signala spreminja počasneje. Podobno se intenziteta signala pri manjših delcih, ki se gibljejo hitreje, spreminja hitreje.



Slika 5: Graf korelacijske funkcije za velike in manjše delce

Kot lahko vidimo, je hitrost padanja korelacijske funkcije povezana z velikostjo delcev, saj je le ta veliko večja za manjše delce kot za velike (slika 5).

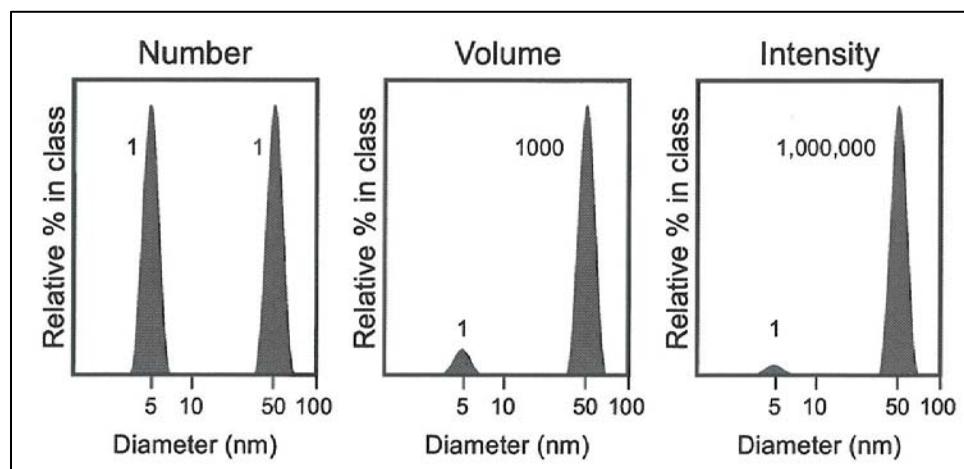
Software naprave Zetasizer Nano nato na podlagi izmerjene korelacijske funkcije in algoritmov za določitev velikosti izračuna porazdelitev velikosti delcev v posameznih velikostnih razredih.

Tipičen graf porazdelitve velikosti delcev prikazuje na osi X velikostne razrede, medtem ko Y os prikazuje relativno intenziteto sipane svetlobe. Zato tu govorimo o porazdelitvi velikosti

delcev na podlagi intenzitete. To pa lahko po Mie teoriji pretvorimo v volumsko porazdelitev in nadalje v porazdelitev na podlagi števila delcev. Vendar pa je uporaba slednje omejena, saj že majhne napake pri pridobivanju podatkov za izris korelacijske funkcije vodijo v velike napake v funkciji porazdelitve velikosti na podlagi števila delcev. Prav tako je potreben vnos refrakcijskega indeksa in absorbance.

1.7.1.3. Porazdelitev velikosti delcev na podlagi intenzitete sipane svetlobe, volumna in števila delcev

Razliko med posameznimi porazdelitvami najlaže razložimo z vzorcem, ki vsebuje le dve velikosti delcev (5 nm in 50 nm) a enako število delcev obeh velikosti (slika 6).



Slika 6: Porazdelitev velikosti delcev na podlagi števila in volumna delcev in intenzitete sipane svetlobe

Prvi graf prikazuje porazdelitev velikosti na podlagi števila delcev. Pika sta enakih velikosti (1:1), saj imamo enako število delcev obeh velikosti.

Drugi graf prikazuje porazdelitev velikosti na podlagi volumna delcev. Površina pika za delce velikosti 50 nm je 1000 krat večja kot za delce velikosti 5 nm (razmerje 1:1000). Volumen delcev velikih 50 nm je namreč 1000 krat večji od volumna delcev velikosti 5 nm (volumen krogle je $1/6\pi d^3$).

Tretji graf prikazuje porazdelitev velikosti na podlagi intenzitete sipane svetlobe. Površina pika za delce velikosti 50 nm je 1,000,000 krat večja kot za delce velikosti 5 nm (razmerje 1:1000000). Veliki delci namreč sipajo veliko več svetlobe kot majhni in sicer je po Rayleighjevi aproksimaciji sisanje sorazmerno 10^6 krat velikost delcev.

Problem tega principa merjenja je torej v tem, da prisotnost velikih delcev v raztopini močno zmanjša možnost detekcije manjših delcev. Na podlagi te teorije tudi lahko pojasnimo, zakaj je povprečna velikost delcev, ki jo izračuna digitalni kolerator, manjša od velikosti, kjer se nahaja pik intenzitete sipane svetlobe. Manjši delci, pa čeprav jih je več, namreč manj sipajo svetlobo in pik se pomakne k večjim vrednostim. Rezultati so torej zanesljivi šele, ko je velikost delcev v disperziji dovolj homogena. Naprava sama oceni kakovost rezultatov na podlagi ustreznosti števila sipanja in polidisperznega indeksa.

1.7.2. Število sipanja kot merilo koncentracije PEK v disperziji

Detektor naprave Zetasizer izkazuje linearen odziv v širokem območju intenzitete sipane svetlobe. Vseeno pa obstaja meja, nad katero odziv postane nelinearen in končno doseže nasičenje. Pri metodi dinamičnega sisanja svetlobe (DLS) se časovna odvisnost nihanja intenzitete sipane svetlobe uporablja za izračun difuzijskih koeficientov delcev v disperziji. Zato je zelo pomembno, da se meritve izvajajo pri pogojih, kjer detektor izkazuje optimalno občutljivost na nihanje intenzitete sipane svetlobe. Pri vzorcih z visokim sisanjem svetlobe je pogosto treba zmanjšati količino svetlobe, ki pade na detektor z namenom obdržati signal znotraj območja linearnega odziva detektorja. Običajen pristop zmanjševanja signala sisanja je zmanjšanje intenzitete laserske svetlobe s katero osvetljujemo vzorec. V ta namen naprava Zetasizer uporablja svetlobne filtre, katere programska oprema izbere avtomatično in zagotovi, da je intenziteta sipane svetlobe znotraj območja linearnega odziva detektorja. Ta optična konfiguracija napravi Zetasizer omogoča meritev velikosti in zeta potenciala delcev v širokem razponu koncentracij vzorcev. Vseeno pa je primerjava koncentriranih in razredčenih vzorcev možna le ob upoštevanju filtriranja laserske svetlobe.

Število sipanja je parameter, ki ga izračuna programska oprema naprave Zetasizer in predstavlja intenziteto sipane svetlobe, ki bi bila izmerjena na detektorju v odsotnosti laserskih svetlobnih filtrov, če predpostavimo linearen odziv v celotnem koncentracijskem območju. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo o koncentraciji PEK v disperziji. Pri bolj koncentriranih vzorcih je namreč izračunano število sipanja večje.

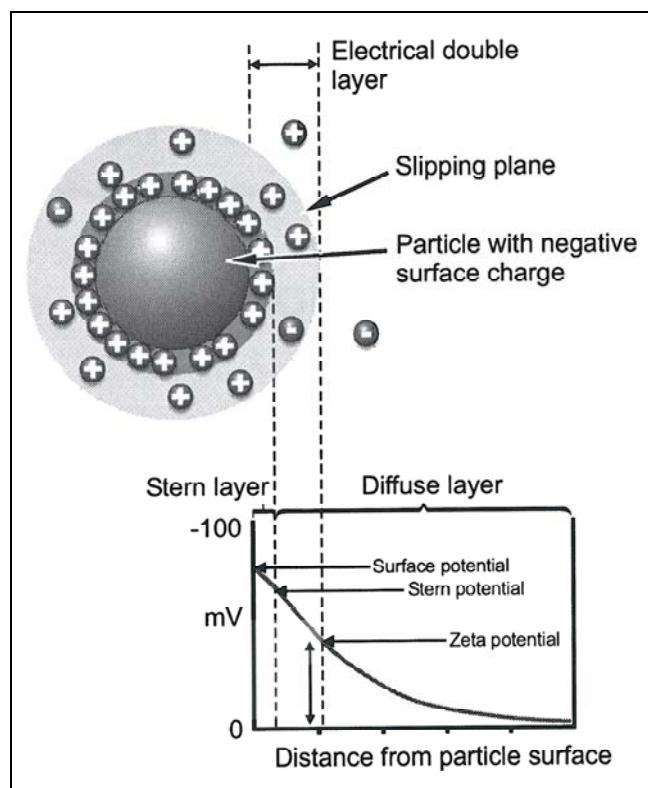
1.7.3. Zeta potencial

Zetasizer Nano izračuna zeta potencial na podlagi elektroforetske gibljivosti z uporabo Henryjeve enačbe. Na vzorcu izvedemo elektroforetski eksperiment in določimo hitrost gibanja delcev v električnem polju z merjenjem Dopplerjevega premika laserske svetlobe, ki jo sipajo ti gibajočih se delci. Princip je imenovan lasersko Dopplersko merjenje hitrosti (LDV) (22).

1.7.3.1. Električni dvosloj

Površinski naboj delca vpliva na porazdelitev ionov v okoliški raztopini. Posledično se v bližnji okolini delca poveča koncentracija protionov.

Sloj, ki obdaja delce, sestoji iz dveh delov: notranjega Sternovega sloja, kjer so ioni močno vezani na površino delca in zunanjega difuznega sloja, kjer je povečana koncentracija prosto gibajočih se ionov v tekočini (slika 7). Znotraj difuznega sloja obstaja meja, do katere delec in ioni tvorijo stabilno entiteto. Ko se delec giblje, se ioni do te meje gibljejo z njim, ostali pa se odstranijo. Potencial, ki obstaja na tej meji se imenuje zeta potencial.



Slika 7: Prikaz površinskega naboja delcev v raztopini

Vrednost zeta potenciala podaja informacijo o stabilnosti koloidnih sistemov. Če imajo vsi delci v suspenziji močno negativen oziroma močno pozitiven zeta potencial, potem se med seboj odbijajo in ne težijo k flokulaciji. Za splošno mejo med stabilno in nestabilno disperzijo običajno velja zeta potencial ± 30 mV. Za suspenzije, katerih delci imajo zeta potencial bolj pozitiven od $+ 30$ mV oziroma bolj negativen od $- 30$ mV, pravimo, da so stabilne.

Najbolj pomemben faktor, ki vpliva na vrednost zeta potenciala, je pH. Pri nižjih vrednostih pH so delci bolj pozitivno nabiti, pri višjih pa bolj negativno. pH vrednost, pri kateri je zeta potencial nič, imenujemo izoelektrična točka. Tu je koloidni sistem običajno najmanj stabilen.

1.7.3.2. Elektroforeza

Če raztopino elektrolita postavimo v električno polje, bodo nabiti delci potovali k nasprotno nabiti elektrodi. Viskozne sile na delec bodo nasprotovale temu gibanju. Ko pa bo doseženo ravnotežje med temi nasprotujočimi silama, bo delec potoval s konstantno hitrostjo. Hitrosti delca v električnem polju pravimo tudi elektroforetska mobilnost in je odvisna od moči električnega polja, dielektrične konstante in viskoznosti medija ter zeta potenciala. Slednjega lahko na podlagi meritve elektroforetskega gibanja izračunamo po Henryjevi enačbi (21).

Elektroforetsko gibanje merimo z laserskim Dopplerskim merjenjem hitrosti (LDV). Gre pravzaprav za gibanje majhnih delcev, ki se gibljejo s hitrostjo tekočine, katere hitrost merimo. Laserski žarek, ki se na delcih lomi pod kotom 17° , združimo z referenčnim žarkom. Dobimo signal nihanja intenzitete, kjer je stopnja nihanja sorazmerna hitrosti delcev. Digitalni kolerator signala okarakterizira nihanje sipane svetlobe.

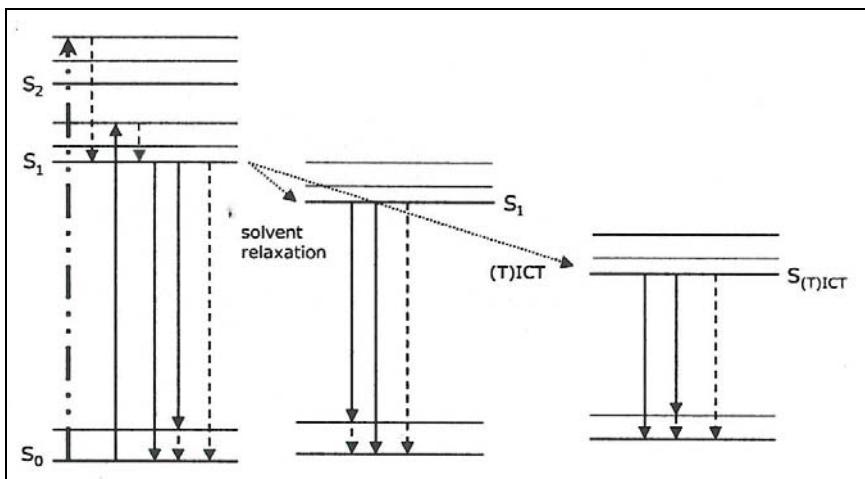
1.8. KARAKTERIZACIJA PROTEINOV Z NEKOVALENTNIMI EKSTRINZIČNIMI FLUORESTENTNIMI BARVILI

Predpogoj za klinično uporabnost proteinov je razvoj stabilnih sistemov, saj so proteini kompleksne molekule podvržene najrazličnejšim razgradnim reakcijam (23, 24). Pri zagotavljanju integritete proteinov med biopresiranjem, pripravo formulacij, shranjevanjem in uporabo le teh, je ključnega pomena razvoj analitičnih tehnik za detekcijo in kvantifikacijo konformacijskih sprememb oziroma razgradnih produktov proteina.

Fluorescenčna spektroskopija je visoko občutljiva metoda za karakterizacijo proteinov. Intrinzična fluorescencija proteina, ki izvira iz aminokisline triptofan in tirozin, podaja informacije o konformacijskih spremembah proteinov (25, 26). Dodatno pa ekstrinzična fluorescentna barvila nudijo možnost natančnejše karakterizacije proteinov. Ta barvila se lahko kovalentno vežejo na proteine, na primer preko ϵ -amino skupine lisina, α -amino skupine N-konca verige ali tiolne skupine cisteina. Še bolj zanimiva so nekovalentna ekstrinzična barvila. Ta s proteini in njihovimi razgradnimi produkti vzpostavijo hidrofobne in elektrostatične interakcije. Danes se ekstrinzična fluorescentna barvila uporabljajo pri spremljanju procesov razvijanja in ponovnega zvijanja proteinov, detekciji delno zvitih intermediantov, ocenjevanju površinske hidrofobnosti (27), preizkušanju aktivnih mest encimov, karakterizaciji agregacije in fibrilacije, spremljanju konformacijskih sprememb povzročenih s kemično razgradnjo, preizkušanju interakcij protein- surfaktant in pri analizi proteinskih kristalov.

1.8.1. Mehanizem fluorescence barvil

Fluorescencia temelji na elektronskih prehodih znotraj molekule barvila (slika 8). Ekscitacija pri absorpciji svetlobe dvigne elektrone v času femtosekund iz osnovnega (S_0) v višja singletna vzbujena stanja (S_1, S_2, \dots), znotraj katerih obstajajo še vibracijski nivoji. Ko elektroni dosežajo najnižji vibracijski nivo vzbujenega stanja, se lahko relaksirajo v osnovno stanje s fluorescenco ali brez sevanja v primeru notranje konverzije. Ko izgubi energije in s tem zmanjšanju fluorescence prispevajo še vibracijska relaksacija (prehod elektronov z višjih vibracijskih nivojev na nižje znotraj enega vzbujenega stanja, npr. znotraj S_1), relaksacija s topilom in intramolekularni prenos naboja. Elektronske premike pri ekscitaciji namreč spremišča tudi spremembu dipolnega momenta barvila. Če imajo dipolni moment tudi molekule topila, pride v okolici ekscitiranega barvila do energetsko favorizirane reorientacije molekul topila. Pri tem se energijski nivo stanja S_1 v molekuli barvila zniža, dvigne pa se energija stanja S_0 . Ta proces, ki vodi v znižanje fluorescence, imenujemo relaksacija s topilom in je odvisen od polarnosti topila.



Slika 8: Poenostavljena shema elektronskih prehodov: krepko tiskana črtkano pikčasta puščica prikazuje prehod elektronov v vzbujeno stanje po absorpciji svetlobe, črtkane puščice predstavljajo izgubo energije brez sevanja zaradi vibracijske relaksacije in notranje konverzije, pikčaste puščice nakazujejo znižanje energije vzbujenega stanja kot posledica relaksacije s topilom in intramolekularnega prenosa naboja, neprekinjene puščice predstavljajo prehode, ki povzročijo fluorescenco

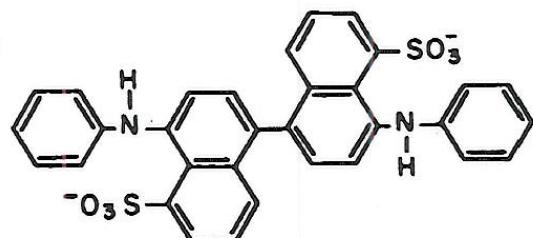
Pri intramolekularnem prenosu naboja (ICT) pa pride do prehoda elektrona z donorske skupine (npr. amino skupina) na akceptorsko skupino (npr. aromatski sistem) znotraj vzbujene molekule barvila. Ta separacija naboja povzroči povečanje dipolnega momenta in znižanje energije ekskitiranega stanja ($S_{(T)ICT}$) v primerjavi s stanjem S_1 . Pojav ICT je favoriziran v polarnih topilih in vodi v povečano relaksacijo s topilom. Poleg tega je za elektrone v stanju $S_{(T)ICT}$ značilnejša relaksacija brez sevanja, kar dodatno povzroči zmanjšanje fluorescence (28).

Poleg polarnosti topila vplivajo na spremembo fluorescence barvila še viskoznost topila, temperatura in vodikove vezi med topilom in barvilom. Na podoben način tudi interakcije med barvili in topljenci (npr. proteini) vplivajo na fluorescenco s spremembami načina relaksacije vzbujenih elektronov v molekulah barvila. Prav to je razlog za uporabo ekstrinzičnih fluorescentnih barvil pri karakterizaciji proteinov.

1.8.2. Barvilo bis-ANS in določevanje površinske hidrofobnosti

ANS (1-anilinonaftalen-8-sulfonat) in njegov dimerni analog bis-ANS (4,4'-bis-1-anilinonaftalen-8-sulfonat) (slika 9) sodita med najpogosteje uporabljeni barvili za karakterizacijo proteinov. Fluorescanca teh dveh barvil je odvisna predvsem od polarnosti, viskoznosti in temperature okolja, v katerem se nahajata. Z znižanjem dielektrične konstante

topila se močno poveča intenziteta fluorescirane svetlobe. Prav tako interakcije barvil z molekulami proteina povzročijo spremembe polarnosti in viskoznosti okolja. Pri ANS in Bis-ANS gre za hidrofobne in elektrostatske interakcije s proteinom. Natančneje, gre za interakcije med negativno nabitim skupinami barvil ANS in bis-ANS in pozitivno nabitim skupinami aminokislin proteina kot so histidin, lizin, arginin in N-terminalni del proteina. Vseeno pa so potrebne tudi komplementarne (na primer van der Waalsove) interakcije za stabilizacijo ionskih parov. Pastukhov in Ropson ugotovljata, da je bis-ANS ustrezniji za karakterizacijo nekaterih proteinov kot ANS, saj vstopa v močnejše interakcije s proteini in posledično intenzivneje fluorescira (29, 30). Pri barviliu bis-ANS prevladujejo hidrofobne interakcije s proteinom nad elektrostatskimi. Gre namreč za interakcije med aromatskimi obroči barvila in hidrofobnimi deli proteina (31).



Slika 9: Strukturna formula barvila bis-ANS

Barvilo pokaže površinske lastnosti molekul, predvsem površinsko hidrofobnost in njene spremembe v primeru tvorbe kompleksov. Protein se zaradi elektrostatskih interakcij samoasociira z nasprotno nabitim bioaktivnim polimerom in na površino tvorjenih delcev izpostavi svoje hidrofobne dele. V raztopini polielektrolitnih kompleksov torej ob dodatku barvila bis-ANS pride do povečanja fluorescence glede na raztopino samega proteina. To so že uspeli dokazati v primeru vezave inzulina z N-[8-(2-hidroksibenzoil)amino]kaprilatom (SNAC) (32).

Sprememba površinskih lastnosti, predvsem povečanje hidrofobnosti lahko pomembno vpliva na interakcije z biološkimi membranami in prehodnost skoznje.

2.NAMEN DELA

V prvem delu naloge bomo s pomočjo titratorja in Zetasizerja določili optimalne pogoje za tvorbo nanodelcev. Ugotavljali bomo zeta potencial posameznih polimerov v raztopinah z različnim pH in določili izoelektrično točko ter temperaturo denaturacije ovalbumina. S pomočjo naprave Zetasizer bomo stopenjsko spremljali tvorbo kompleksov (njihovo velikost in zeta potencial) ob dodajanju ovalbumina alginatu ter hitosana k predhodno nastalemu kompleksu alginat-ovalbumin. Na podlagi teh rezultatov bomo določili optimalne koncentracije posameznih polimerov, pri katerih dobimo delce primerne velikosti z največjo možno koncentracijo v disperziji. Preverili bomo tudi vpliv pregeliranja alginata s Ca^{2+} na tvorbo nanodelcev. Z merjenjem števila sipanja, ki je pokazatelj koncentracije nanodelcev v raztopini, bomo določili vpliv elektrolitov in neelektrolitov na medsebojne interakcije polimerov. Določili bomo tudi pogoje za pripravo disperzije z maksimalno koncentracijo nanodelcev.

V drugem delu bomo z izbranim postopkom in pod izbranimi pogoji pripravili nanodelce z optimalno sestavo, določeno v prvem delu naloge. Disperziji bomo neposredno po izdelavi določili fizikalne lastnosti (povprečni premer, polidisperzni indeks, zeta potencial ND in število sipanja preiskovane disperzije) ter učinkovitost asociiranja in delež vgrajenega ovalbumina. Preverili bomo vpliv časa mešanja na asociiranje polimerov in vpliv elektrolitov in neelektrolitov na stabilnost ND. Optimirali bomo postopek liofilizacije in določili krioprotektante, ki med liofiliziranjem najbolje zaščitijo delce pred agregiranjem in omogočijo njihovo ponovno redispergiranje. Liofilizirane vzorce bomo raztapljali v pufrih s pH 1, 3 in 7 ter določili profil sproščanja in delež vgrajenega proteina v PEK.

Z merjenjem fluorescence ob dodatku barvila bis-ANS bomo primerjali površinske lastnosti prostega ovalbumina z lastnostmi ovalbumina v sistemu polielektrolitnih kompleksov.

Končni cilj naloge je vgraditi čimveč ovalbumina v komplekse z alginatom in hitosanom ter disperzijo nanodelcev pretvoriti v suho, stabilnejšo obliko z možnostjo hitrega redispergiranja. Protein želimo zaščititi pred proteolizo in ga vgraditi v sistem, ki bi potencialno lahko izboljšal prehod skozi biološke bariere.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1. MATERIALI

Protein:

- Ovalbumin Grade VI A2512-1G albumin iz jajčnega beljaka (Sigma- Aldrich, USA)

Polimeri:

- Chitosan Aldrich® 448869-50G ($C_{12}H_{24}N_2O_9$) nizkomolekularni hitosan (Sigma- Aldrich, USA)
- Protanal® LF 10/60LS natrijeva sol alginata, 35-45% guluronske kisline, 55-65% manuronske kisline (FMC BioPolymer, Norveška)

Organska topila:

- 100% brezvodna ocetna kislina MM= 60,05 g/mol (Merck, Nemčija)

Krioprotektanti:

- D- manitol (Fluka, Švica)
- D (+) – Glukoza (Merck Nemčija)
- Glikokol SM-3605 glicin (Merck Nemčija)

Reagent za zamrzovanje disperzij ND:

- Tekoči dušik

Reagent za pripravo alginatnega pre-gela:

- kalcijev klorid dihidrat (Merck, Nemčija)

Reagenti za pripravo pufernih raztopin:

- 37% klorovodikova kislina (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid (Merck, Nemčija)
- kalijev klorid (Merck, Nemčija)

- kalijev dihidrogen fosfat (Merck, Nemčija)
- natrijev dihidrogen fosfat monohidrat (Merck, Nemčija)
- dinatrijev hidrogen fosfat dihidrat (Merck, Nemčija)
- natrijev fosfat dvanajst hidrat (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid (Merck, Nemčija)

Mediji za raztpljanje ND:

- 2N HCl pH 1,2:
V približno 750ml vode dodamo 7ml 37% HCl in 8,77 g NaCl ter dopolnimo z vodo do enega litra.
- Fosfatni puferufer pH 7,4 (PBS pufer):
V enem litru vode raztopimo 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g KH₂PO₄ in 1,8 g Na₂HPO₄·2H₂O.
- Fosfatni pufer pH 7,0- medij za raztpljanje ovalbumina:
V 991 g vode dodamo 3,237 ml 32% NaOH, 7,798 g NaH₂PO₄·H₂O in 8,766 g NaCl.

Raztopine za umerjanje pH:

- 9M in 6M klorovodikova kislina (Merck, Nemčija)
- 5M natrijev hidroksid (Merck, Nemčija)

Nekovalentno ekstrinzično fluorescentno barvilo:

- 4,4'-bis-1-anilinonaftalen-8-sulfonat (Molecular Probes, USA)

Polarna topila za ugotavljanje fluorescence bis-ANS barvila:

- 100% metanol (Merck, Nemčija)
- 100% etanol (Merck, Nemčija)
- aceton (Merck, Nemčija)

3.2.APARATURE

- Precizna tehtnica XP 205 (Mettler Toledo, Švica)
- Magnetno mešalo in grelec (IKA Labortechnik, Nemčija)

- Ultrazvočna kadička UZ 10R (Iskra, Slovenija)
- Zetasizer Nano ZS 3600 („rdeči“ laser, 633 nm), titrator in degazer (Malvern, UK)
- Liofilizator DW3 (Heto Holten A/S, Danska)
- Filtri ALBET PTFE, AC membrana, premer por 0,20 µm, 0,45 µm, 5,0 µm (Filalbet, Španija)
- pH meter MP 220-K (Mettler Toledo, Švica)
- centrifuga AvantiTM 30 Centrifuge (Beckman, USA)
- centrifuga 2-15 (Sigma, Nemčija)
- UV-VIS spektrofotometer Safire2 (Tecan Austria GmbH, Avstrija)
- HPLC instrument (Agilent, 1100 Series, Hewlet Packard, Nemčija) s kolono za gelsko filtracijo s stabilizirano hidrofilno stacionarno fazo (4-4,5 µm; 25 cm × 9,4 mm; Zobrax GF-250, Agilent technology, ZDA) in predkolono (Diol Guard Column 4,6 mm × 12,5 mm)

3.3. METODE

Dinamično sisanje svetlobe (DSL)

Velikost kompleksov smo določili s pomočjo naprave Zetasizer. Sipano svetlobo smo detektirali pod kotom 173° pri temperaturi 25°C. Pri analizi podatkov smo uporabili viskoznost (0,88 mPas) in refrakcijski indeks (1,33) za destilirano vodo pri 25°C. Izmerili smo tudi število sipanja (kcps), ki je merilo za koncentracijo nanokompleksov v vzorcu.

Lasersko Dopplersko merjenje hitrosti (LDV)

Zeta potencial kompleksov smo izmerili v standardnih kapilarnih elektroforetskih celicah na napravi Zetasizer pri 25°C. Raztopinam smo pomerili tudi pH.

3.3.1. DOLOČEVANJE OPTIMALNIH POGOJEV TVORBE PEK

3.3.1.1. Spremljanje zeta potenciala posameznih polimerov v raztopinah z različnim pH

Alginat smo raztopili v vodi v koncentraciji 2 mg/ml in ga titrirali z 0,5 M, 0,25 M in 0,025 M HCl. Pri različnih pH smo pomerili zeta potencial polimernih verig.

Hitosan smo raztopili v vodi, nakisani s HCl na vrednost pH=2,5, v koncentraciji 2 mg/ml in ga nato titrirali z 0,5 M, 0,25 M in 0,025 M NaOH. Pri različnih pH smo pomerili zeta potencial polimernih verig.

3.3.1.2. Določitev izoelektrične točke ovalbumina

Ovalbumin smo raztopili v vodi v koncentraciji 1 mg/ml in ga titrirali z 0,5 M, 0,25 M in 0,025 M HCl. Pri različnih pH smo pomerili zeta potencial in velikost peptidnih verig. pH, pri katerem je zeta potencial preskočil iz negativne na pozitivno vrednost, smo označili kot izoelektrično točko.

3.3.1.3. Določitev temperature denaturacije ovalbumina

Ovalbumin smo raztopili v fosfatnem pufru s pH 7,0 in ga postopno segrevali iz 30°C na 80°C. Na temperaturnih razmikih 5°C smo pomerili velikost polipeptidnih verig. Temperaturo, pri kateri je velikost proteina začela signifikantno naraščati, smo označili kot temperaturo denaturacije. Poskus smo ponovili še z ovalbuminom raztopljenim v PBS pufru.

3.3.1.4. Titrimetrično spremljanje tvorbe kompleksov

Vrednotili smo vpliv koncentracije alginata, ovalbumina in hitosana ter vpliv elektrolitov, neelektrolitov, pH in pregeliranja alginata s kalcijem na tvorbo kompleksov.

Alginat in hitosan smo pripravili v 0,25% ocetni kislini, ovalbumin pa smo najprej raztopili v 5 ml pufra s pH 7,0 in ga nato počasi kapljali v 10 ml 0,25% ocetne kisline. Vsem raztopinam smo z raztopinami za umerjanje umerili pH na 4 in jih filtrirali skozi filter z velikostjo por 5 µm. Koncentracije polimerov v začetnih raztopinah za posamezen poskus so navedene v preglednici 1.

Preglednica 1: Koncentracije polimerov v začetnih raztopinah pri posameznem poskusu

poskus	konc. alginata	konc. ovalbumina	konc. hitosan
1	2 mg/ml	2 mg/ml	0,1 mg/ml
2*	2 mg/ml	2 mg/ml	1,0 mg/ml
3**	2 mg/ml	2 mg/ml	0,1 mg/ml
4***	2 mg/ml	2 mg/ml	0,1 mg/ml
5****	2 mg/ml	2 mg/ml	0,1 mg/ml
6	2 mg/ml	1 mg/ml	0,1 mg/ml
7	3 mg/ml	3 mg/ml	0,5 mg/ml

*dve paralelki: z dodatkom CaCl₂ in brez dodatka CaCl₂

**raztopine umerjene na pH=5

***v 0,25% ocetni kislini raztopljane soli PBS pufra

****titracija v 5% raztopini glukoze

Določitev optimalne koncentracije polimerov za pripravo nanodelcev (poskus 1)

Raztopino alginata smo titrirali z ovalbuminom in nadalje s hitosanom. Ko smo alginatu dodali dovolj ovalbumina za tvorbo ND ustrezne velikosti, smo titracijo nadaljevali s hitosanom. Tvorbo kompleksov smo spremljali s pomočjo avtotitratorja, ki omogoča meritve parametrov ND (velikost, zeta potencial, število sipanja) v posameznih korakih titracije.

Vpliv pregeliranja alginata s kalcijem na tvorbo nanodelcev (poskus 2)

Vzporedno smo naredili dve titraciji, tako, da smo v eni paralelki 8 ml raztopine alginata dodali še 3,2 mg CaCl₂ (masno razmerje CaCl₂:alginat = 0,2) kot sredstvo za premreževanje-geliranje.

Izvedli smo tudi titracijo 8 ml alginata (c=1 mg/ml) v 0,25% ocetni kislini z enakim volumnom vodne raztopine CaCl₂ (c=1 mg/ml) in spremljali velikost in zeta potencial delcev.

Vpliv pH, na tvorbo kompleksov (poskus 3)

Izvedli smo ponovitev poskusa 1, le da smo vse raztopine umerili na pH 5.

Vpliv elektrolitov na tvorbo kompleksov (poskus 4)

Izvedli smo ponovitev poskusa 1 s tem, da smo uporabili 0,25% ocetno kislino, v kateri smo predhodno raztopili soli PBS pufra.

Vpliv neelektrolitov (krioprotektantov) na tvorbo kompleksov (poskus 5)

V začetne raztopine alginata in ovalbumina smo natehtali 400 mg glukoze. Titracijo smo torej spremljali v 5% raztopinah glukoze na enak način kot pri poskusu 1.

Vpliv variiranja koncentracije ovalbumina na sestavo končne formulacije (poskus 6)

Izvedli smo paralelko poskusa 1, le da smo začetno koncentracijo ovalbumina znižali z 2 mg/ml na 1 mg/ml.

Vpliv celokupne koncentracije polimerov (poskus 7)

Ponovili smo poskus 1 s tem, da smo začetni koncentraciji alginata in ovalbumina dvignili na 3 mg/ml, začetno koncentracijo hitosana pa na 0,5 mg/ml.

3.3.2. VREDNOTENJE NANODELCEV GLEDE NA FIZIKALNE LASTNOSTI IN STABILNOST

Na podlagi rezultatov poskusov 1 in 7 pod točko 3.3.1.4., smo definirali dve izbrani sestavi.

Priprava disperzij za karakterizacijo ND- sestava 1

V 16 ml raztopine alginata ($c = 0,625 \text{ mg/ml}$) v 0,25% ocetni kislini pri pH 3,9 smo po kapljicah dodali 2 ml ovalbumina ($c = 5 \text{ mg/ml}$) v pufru pH 7.0. Disperzijo smo pustili mešati 30 min na magnetnem mešalu nato smo po kapljicah dodali še 2 ml raztopine hitosana ($c = 0,5 \text{ mg/ml}$) v 0,25% ocetni kislini umerjene na pH 3,9. Končno disperzijo PEK smo na magnetnem mešalu mešali še 45 min in nato ND ovrednotili s pomočjo naprave Zetasizer.

Disperzija z višjo celokupno koncentracijo polimerov v raztopini- sestava 2

V 16 ml raztopine alginata ($c = 1,125 \text{ mg/ml}$) v 0,25% ocetni kislini pri pH 3,9 smo po kapljicah dodali 2 ml ovalbumina ($c = 9 \text{ mg/ml}$) v pufru pH 7,0. Disperzijo smo mešali 30 min na magnetnem mešalu nato smo po kapljicah dodali še 2 ml raztopine hitosana ($c = 2,0 \text{ mg/ml}$) v 0,25% ocetni kislini umerjene na pH 3,9. Končno disperzijo PEK smo na magnetnem mešalu mešali še 45 min in nato ND ovrednotili s pomočjo naprave Zetasizer.

3.3.2.1. Učinkovitost asociiranja in delež vgrajenega ovalbumina

Učinkovitost asociiranja (AE) smo izračunali kot razliko med celokupno količino ovalbumina v raztopini in količino neasociiranega ovalbumina, ki je po centrifugiranju ostal redispergiran v supernatantu. Disperzijo PEK smo centrifugirali 30 minut pri 14.000 rpm in temperaturi 25°C. Koncentracijo ovalbumina v supernatantu smo izmerili s HPLC metodo.

$$AE = \frac{m(alb)_{zač} - m(alb)_{supernatant}}{m(alb)_{zač}}$$

Izračunali smo tudi teoretični in eksperimentalni delež vgrajenega ovalbumina (LC), ki je definiran kot razmerje med količino vgrajenega ovalbumina in celokupno suho maso nanodelcev.

$$LC = \frac{m(alb)_{zač} - m(alb)_{supernatant}}{m_{ND}}$$

3.3.2.2. Vpliv koncentracije ovalbumina na učinkovitost asociiranja in delež vgrajenega ovalbumina

Disperzije ND smo pripravili po že opisanem postopku, le da so bile koncentracije ovalbumina v dodanih 2 ml pufra pH 7,0 5,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,0 mg/ml in 0,5 mg/ml. Koncentracije ovalbumina v končni disperziji so bile torej 0,50 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,10 mg/ml in 0,05 mg/ml. Za vsak vzorec smo nato na podlagi dveh meritev izračunali povprečni LC in AE.

3.3.2.3. Vpliv časa mešanja in neelektrolitov (krioprotektantov) na stabilnost kompleksov

Pripravili smo dva vzorca ND po sestavi 1 in jima pomerili velikost, polidisperzni indeks in število sisanja. Prvemu vzorcu smo nato dodali manitol in takoj spet pomerili vse parametre. Oba vzorca smo nato mešali en dan na magnetnem mešalu in ju ponovno ovrednotili. Nato smo dodali manitol še drugemu vzorcu in mu ponovno določili vse parametre.

3.3.2.4. Vpliv časa mešanja in elektrolitov na stabilnost kompleksov

8 ml sveže pripravljenega vzorca po sestavi 1 smo titrirali z 8 ml raztopine NaCl s koncentracijo 18,3 mg/ml. Ob koncu titracije smo torej dobili komplekse v 0,9% raztopini NaCl.

Enako titracijo smo izvedli še z vzorcem, ki smo ga predhodno en dan mešali na magnetnem mešalu. Na posameznih stopnjah titracije smo izmerili velikost, polidisperzni indeks in število sisanja disperzije.

Ali se število sisanja zmanjšuje le zaradi redčenja disperzije ali nanj dejansko vplivajo tudi soli, smo preverili tako, da smo en vzorec ($V= 1 \text{ ml}$) redčili z 1 ml vode, drugi vzorec ($V= 1 \text{ ml}$) pa z 1 ml PBS pufra. Obema dobljenima disperzijama smo pomerili parametre kot v primeru titracije z NaCl.

3.3.3. ANALIZA OVALBUMINA

Koncentracijo ovalbumina v vzorčnih raztopinah smo izmerili s HPLC metodo.

Za zaščito kolone pred morebitnimi agregati v vzorcih smo uporabili predkolono. Ovalumin smo eluirali 30 minut pri 23°C s fosfatnim pufom pH 7,0 (0,13 M NaCl in 20 mM Na₂HPO₄) s pretokom 1,0 ml/min. Eluent smo merili z UV detektorjem pri 210 nm.

3.3.4. LIOFILIZACIJA

Vzorce po 20 ml disperzije ND smo najprej centrifugirali 30 min pri 13.000 rpm in temperaturi 4°C ter oddekantirali supernatant. Sediment smo redispersirali v 20 ml deionizirane vode najprej ročno nato pa še 3 min s pomočjo ultrazvočne kadičke. Tako pripravljene disperzije ND smo nato prelili v 100 ml bučke z obrusom in jim dodali krioprotektante (glukoza, manitol, glicin) v različnih masnih odstotkih (2%, 1%, 0,5%). Bučke z vzorci smo nato potopili v tekoči dušik ($T = -70^{\circ}\text{C}$). Vzorce smo hitro zamrznili ob neprestanem vrtenju bučke okoli osi. Disperzija ND je zmrznila v obliki tankega filma razporejenega po površini bučke. Zamrznjene vzorce smo pustili v zamrzovalniku pri -20°C 18 ur in jih nato liofilizirali s pomočjo posebnega nastavka za bučke 24 ur pri temperaturi -51°C in tlaku 0,40 mbar. Dobljeni liofilizat smo z namenom določanja fizikalnih lastnosti liofiliziranih ND najprej ročno redispersirali v 20 ml deionizirane vode, nato pa še 3 min s pomočjo ultrazvočne kadičke.

3.3.5. SPROŠČANJE OVALBUMINA

Sproščanje ovalbumina iz PEK smo izvajali 2 uri v mediju s pH 1 in nato 3 ure v mediju s pH 7. Poskus smo ponovili s sproščanjem ovalbumina 5 ur pri pH 7 in sproščanjem ovalbumina 5 ur pri pH 3.

6 mg liofiliziranih ND smo redispersirali v 6 ml 0,1 M HCl. Disperzijo smo mešali na magnetnem mešalu pri temperaturi 37°C . V časovnih intervalih 0,1; 0,5; 1; 1,5 in 2 uri smo jemali vzorce po 0,5 ml in jih centrifugirali 10 min pri 13.500 rpm. Supernatant smo odvzeli za analizo, sediment pa redispersirali v enakem volumnu sveže 0,1 M HCl in ga vračali nazaj v vzorčno disperzijo. Po 2 urah smo v vialo z vzorcem dodali 2 ml 0,2 M Na_3PO_4 in tako dvignili pH na 6,8. Od tega trenutka dalje smo ponovno v časovnih intervalih 0,1; 0,5; 1; 2 in 3 ure jemali vzorce po 0,5 ml in jih 10 min centrifugirali pri 13.500 rpm. Supernatant smo odvzeli za analizo, sediment pa redispersirali v 0,5 ml sveže mešanice 0,1 M HCl in 0,2 M Na_3PO_4 (volumsko razmerje= 75: 25) in ga vračali nazaj v vzorčno disperzijo.

Sproščanje smo izvedli tudi v pufru PBS (pH= 7). Vzorce smo jemali v časovnih intervalih 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 4 in 5 ur, jih centrifugirali ter sediment vračali s PBS pufrom.

Enak poskus smo izvedli še v pufru s pH 3,0 (pufru s pH 1,2 smo dodali NaOH).

Na podlagi izmerjenih koncentracij ovalbumina smo izračunali kumulativne mase sproščenega ovalbumina v posameznem časovnem intervalu (preglednica 2). Odstotek sproščenega ovalbumina smo izračunali tako, da smo kumulativne mase posameznih časov delili z maso vgrajenega ovalbumina ($m_{vgraj} = (c_{zač} - c_{supernatant}) \times V_{disperzije}$).

Preglednica 2: Izračun kumulativne mase sproščenega ovalbumina v posameznem časovnem intervalu (V -volumen medija za sproščanje; V_1 -volumen vzorca)

čas (h)	konc. (mg/ml)	masa (mg)	odvzetki (mg)	kum. odvz. (mg)	kum. masa (mg)
0,1	$c_{0,1}$	$c_{0,1} \cdot V = M_{0,1}$			$M_{0,1}$
0,5	$c_{0,5}$	$c_{0,5} \cdot V = M_{0,5}$	$c_{0,1} \cdot V_1 = m_{0,1}$	$m_{0,1}$	$M_{0,5} + m_{0,1}$
1	c_1	$c_1 \cdot V = M_1$	$c_{0,5} \cdot V_1 = m_{0,5}$	$m_{0,1} + m_{0,5}$	$M_1 + m_{0,1} + m_{0,5}$
2	c_2	$c_2 \cdot V = M_2$	$c_1 \cdot V_1 = m_1$	$m_{0,1} + m_{0,5} + m_1$	$M_2 + m_{0,1} + m_{0,5} + m_1$
3	c_3	$c_3 \cdot V = M_3$	$c_2 \cdot V_1 = m_2$	$m_{0,1} + m_{0,5} + m_1 + m_2$	$M_3 + m_{0,1} + m_{0,5} + m_1 + m_2$
4	c_4	$c_4 \cdot V = M_4$	$c_3 \cdot V_1 = m_3$	$m_{0,1} + m_{0,5} + m_1 + m_2 + m_3$	$M_4 + m_{0,1} + m_{0,5} + m_1 + m_2 + m_3$
5	c_5	$c_5 \cdot V = M_5$	$c_4 \cdot V_1 = m_4$	$m_{0,1} + m_{0,2} + m_1 + m_2 + m_3 + m_4$	$M_5 + m_{0,1} + m_{0,2} + m_1 + m_2 + m_3 + m_4$

3.3.6. DOLOČANJE POVRŠINSKE HIDROFOBNOSTI Z BARVILOM BIS-ANS

180 μ l vzorca smo dodali 20 μ l 50 μ M vodne raztopine 4,4'-bis-1-anilinonaftalen-8-sulfonata (bis-ANS). Elektrone smo vzbujali z valovno dolžino $\lambda = 385$ nm in merili intenziteto emitirane svetlobe v območju od 430- 600 nm z UV-VIS spektrofotometrom.

3.3.6.1. Vpliv topila na fluorescenco barvila bis-ANS

Pripravili smo po 180 μ l vzorca sledečih topil: vode, 0,25% ocetne kisline, fosfatnega pufra s pH= 7,0, metanola, 50% etanola, 100% etanola, acetona in izmerili fluorescenco barvila.

3.3.6.2. Vpliv koncentracije ovalbumina na fluorescenco barvila bis-ANS

Pripravili smo po 180 μ l vzorca vodnih raztopin ovalbumina v koncentracijah 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5,0 mg/ml in izmerili fluorescenco barvila.

3.3.6.3. Vpliv zeta potenciala ovalbumina na fluorescenco barvila bis-ANS

Pripravili smo po 180 µl vzorca raztopin ovalbumina (koncentracija 0,5 mg/ml) v vodi, fosfatnem pufru s pH= 7,0, 0,25% ocetni kislini in mešanici topil 0,25% ocetna kislina: fosfatni pufer s pH 7,0= 4,4: 1 (medij izdelanih nanodelcev) in izmerili fluorescenco barvila. Vsem raztopinam smo izmerili še pH po dodatku ovalbumina in določili zeta potencial raztopljnega proteina.

3.3.6.4. Vpliv tvorbe kompleksov na fluorescenco barvila bis-ANS

Pripravili smo po 180 µl vzorca raztopin s komponentami navedenimi v preglednici 3 in izmerili fluorescenco barvila. Posameznim raztopinam smo izmerili tudi zeta potencial.

Preglednica 3: Sestava vzorcev za določanje fluorescence barvila bis-ANS

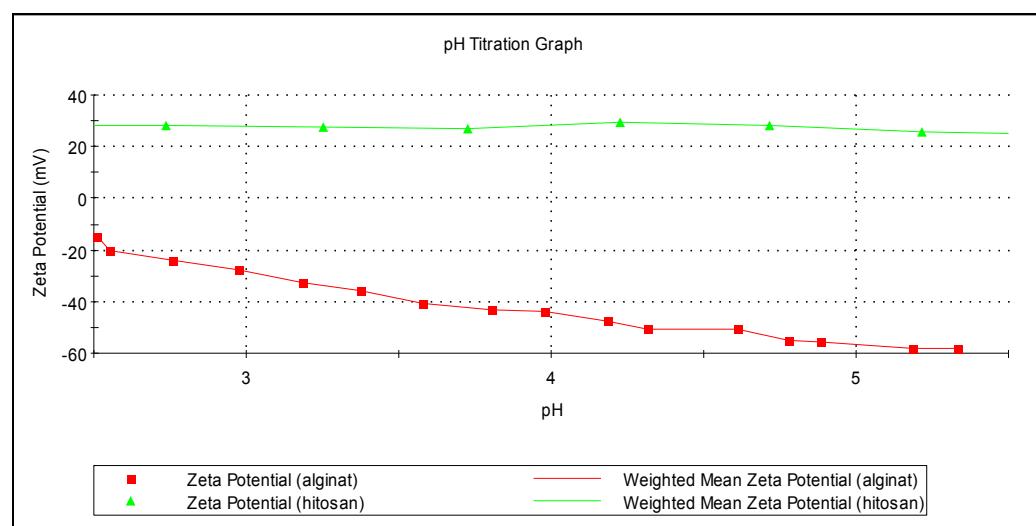
vzorec\volumen	4 ml	1 ml	0.4 ml
ovalbumin	0.25% ocetna kislina	2.7 mg/ml ovalbumina v pufru	0.25% ocetna kislina
alginat	0.675 mg/ml alginata v ocet. kis.	fosfatni pufer pH 0.7	0.25% ocetna kislina
hitosan	0.25% ocetna kislina	fosfatni pufer pH 0.7	0.675 mg/ml hitosana v ocet. kis.
alginat-ovalbumin	0.675 mg/ml alginata v ocet. kis.	2.7 mg/ml ovalbumina v pufru	0.25% ocetna kislina
alginat-ovalbumin-hitosan	0.675 mg/ml alginata v ocet. kis.	2.7 mg/ml ovalbumina v pufru	0.675 mg/ml hitosana v ocet. kis.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. DOLOČITEV OPTIMALNIH POGOJEV ZA TVORBO POLIELEKTROLITNIH KOMPLEKSOV

4.1.1. Spremljanje zeta potenciala posameznih polimerov v raztopinah z različnim pH

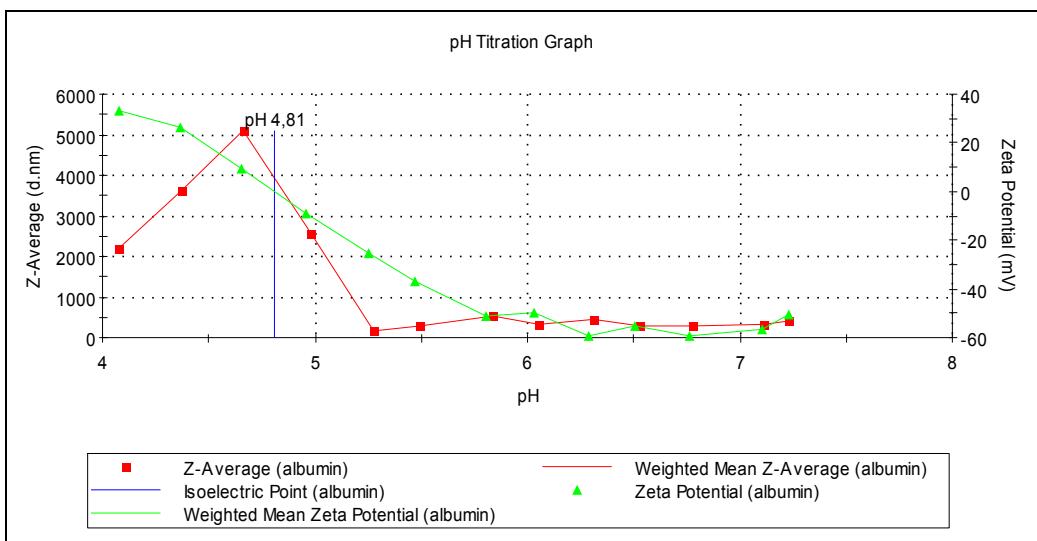
Pri titraciji hitosana in alginata s kislino ali bazo, smo dokazali, da imata oba polimera v intervalu pH= 2,5- 5,3 stalen naboj. Hitosan ima pozitiven, alginat pa negativen zeta potencial (slika 10).



Slika 10: Odvisnost zeta potenciala alginata in hitosana od pH raztopine

4.1.2. Izoelektrična točka ovalbumina

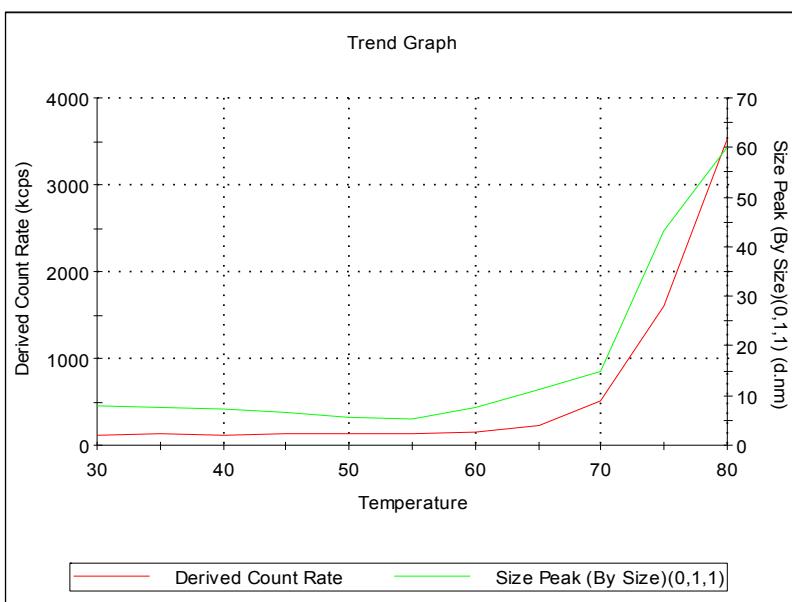
Izoelektrično točko smo določili pri pH= 4,81 (slika 11). V tem območju je topnost proteina najmanjša, saj tvori notranjo sol. To odraža tudi porast ovalbumina v tem pH območju. Zeta potencial molekul je v tej točki 0 mV, vendar pa protein nosi tako pozitiven kot negativen naboj. Pri pH pod izoelektrično točko nosi ovalbumin večinoma pozitiven naboj, pri pH nad izoelektrično točko pa večinoma negativen (33).



Slika 11: Odvisnost zeta potenciala ovalbumina od pH raztopine

4.1.3. Temperatura denaturacije ovalbumina

Denaturacijo ovalbumina smo določili pri temperaturi 55,0 °C. Protein pri tej temperaturi izgubi svojo globularno konformacijo in njegova velikost začne značilno naraščati (slika 12). Temperaturo denaturacije naprava Zetasizer določili na podlagi izmerjene intenzitete.

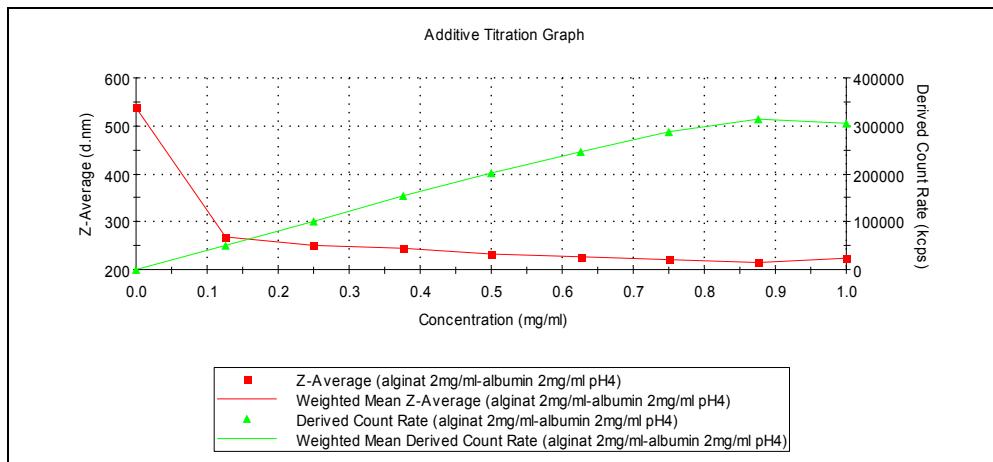


Slika 12: Odvisnost povprečne velikosti verig ovalbumina in števila sisanja v odvisnosti od temperature (°C)

4.1.4. Spremljanje tvorbe kompleksov

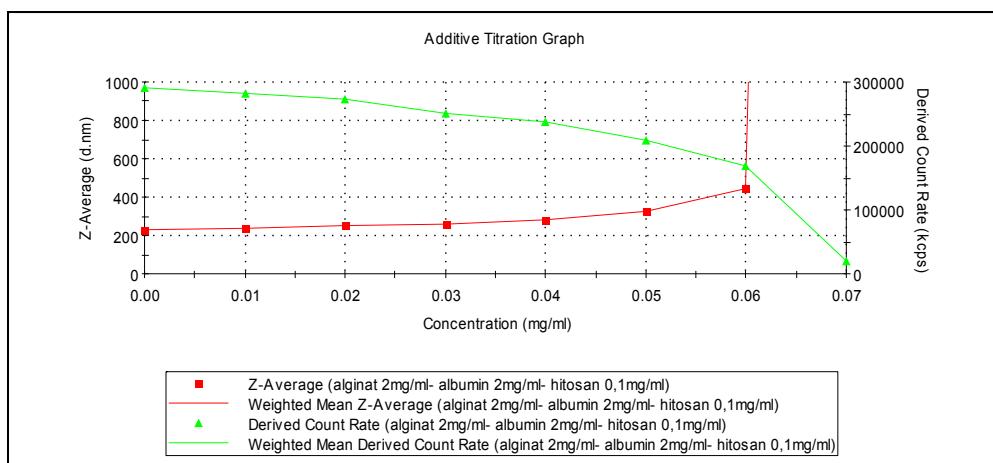
Pri titraciji alginata z ovalbuminom opazimo skokovit padec velikosti po prvem dodatku ovalbumina (slika 13). Pri pH 4 večinoma pozitivno nabit protein kompleksira negativno nabite verige alginata ter tako zmanjša in poenoti delce. Ob nadalnjem dodajanju

ovalbumina, se velikost zmanjšuje le minimalno, opazimo pa skoraj linearno naraščanje števila sipanja, ki se ustali pri določeni vrednosti. Iz tega podatka lahko sklepamo na naraščanje koncentracije tvorjenih kompleksov, dokler ne zakompleksiramo vsega alginata. Ob nadalnjem dodajanju proteina ta najverjetneje ostane raztopljen v raztopini.



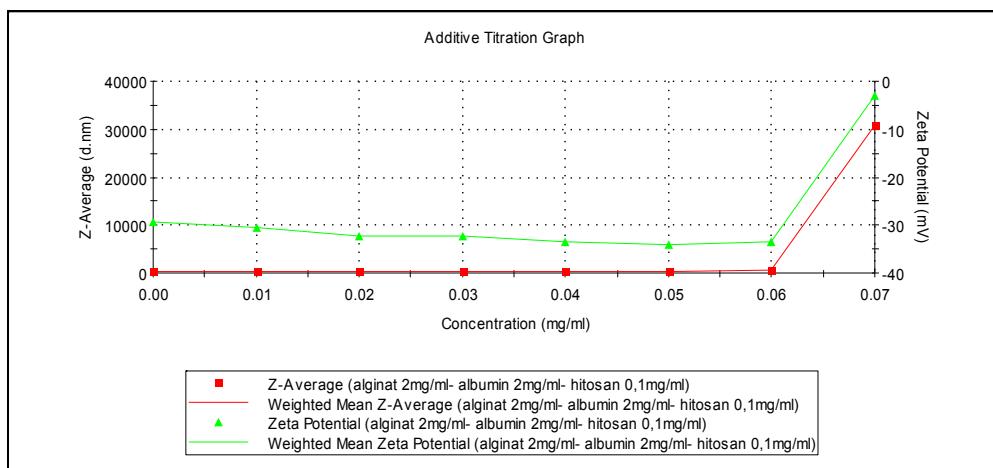
Slika 13: Povprečna velikost delcev in število sipanja pri titraciji alginata (c=2 mg/ml) z ovalbuminom (c=2 mg/ml). X-os podaja vrednosti koncentracije ovalbumina v raztopini.

Pri titraciji kompleksov alginat-ovalbumin s hitosanom opazimo rahlo povečevanje velikosti delcev (slika 14). Pozitivno nabit hitosan namreč obda komplekse in se veže preko negativnih nabojev ovalbumina in alginata. Dobimo večje delce z nižjo koncentracijo v raztopini, s čimer lahko pojasnimo padanje števila sipanja tekom titracije.



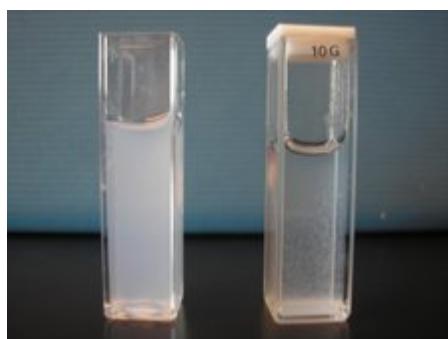
Slika 14: Povprečna velikost delcev in število sipanja pri titraciji kompleksov alginat-ovalbumin (c=2 mg/ml) s hitosanom (c= 0,1 mg/ml). X-os podaja vrednosti koncentracije hitosana v raztopini.

Zeta potencial kompleksov alginat-ovalbumin je med titracijo s hitosanom dokaj konstanten (slika 15). Kolikor hitro pa preseže kapaciteto vezanja s kompleksom alginat-ovalbumin, zeta potencial drastično poraste skoraj do pozitivnih vrednosti. Tudi vlikost delcev v tem območju močno poraste. Ko je zeta potencial ND v območju -30 mV, so kompleksi stabilni, saj med njimi delujejo odbojne sile. Sklepamo, da presežek hitosana najverjetneje zmanjša odbojne sile med delci, s čimer sproži njihovo agregacijo. Velikost agregatov je pribljižno 30 μm .



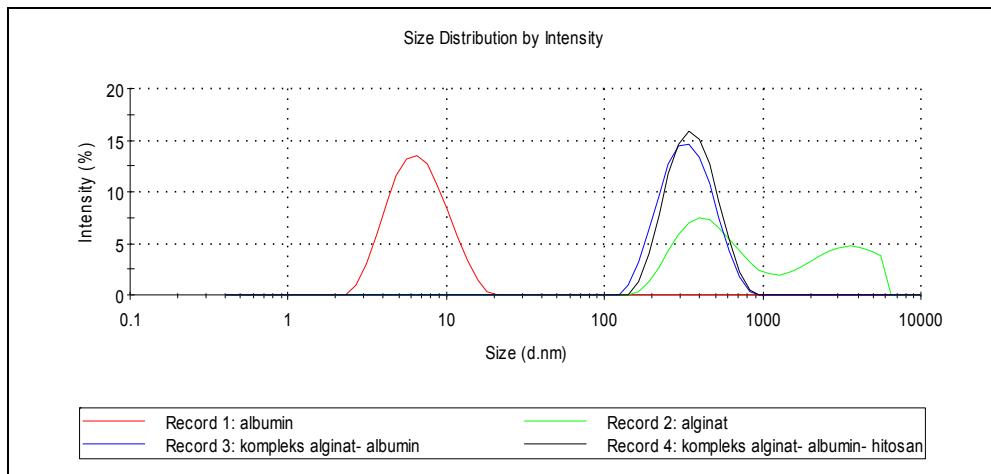
Slika 15: Povprečna velikost delcev in zeta potencial pri titraciji kompleksov alginat-ovalbumin ($c=2 \text{ mg/ml}$) s hitosanom ($c=0,1 \text{ mg/ml}$). X-os podaja vrednosti koncentracije hitosana v raztopini.

Na podlagi zgornjih rezultatov smo določili optimalne koncentracije posameznih komponent, pri katerih dobimo delce primerne velikosti z največjo možno koncentracijo v disperziji: 0,5 mg/ml ovalbumina, 0,5 mg/ml alginata in 0,05 mg/ml hitosana. Masno razmerje ovalbumin: alginat: hitosan je 1:1:0,1. Do podobnih ugotovitev sta prišla tudi S. De in D. Robinson, ki sta za optimalno kompleksiranje določila koncentraciji polimerov v masnem razmerju hitosan:alginat 0,1 (12). Pri nizkih koncentracijah hitosana v sistemu ne nastajajo kompleksi, pri visokih koncentracijah pa pride do agragacije in nastanka mikrodelcev (slika 16).



Slika 16: Stabilna disperzija kompleksov alginat-ovalbumin-hitosan (levo) in agregacija delcev ob presežku hitosana (desno).

Ob tvorbi kompleksov pride do poenotenja velikosti delcev (slika 17). Pik ovalbumina se nahaja v območju 10 nm in ima dokaj nizek polidisperzno indeks. Nasprotno so polimerne verige alginata in hitosana daljše in zelo različnih dolžin. Krivulja alginata ima bimodalno obliko. Pri tvorbi kompleksov med ovalbuminom in alginatom se velikost delcev poenoti v območju 100- 1000 nm. Temu velikostnemu razredu ustrezano tudi kompleksi z dodatkom hitosana.

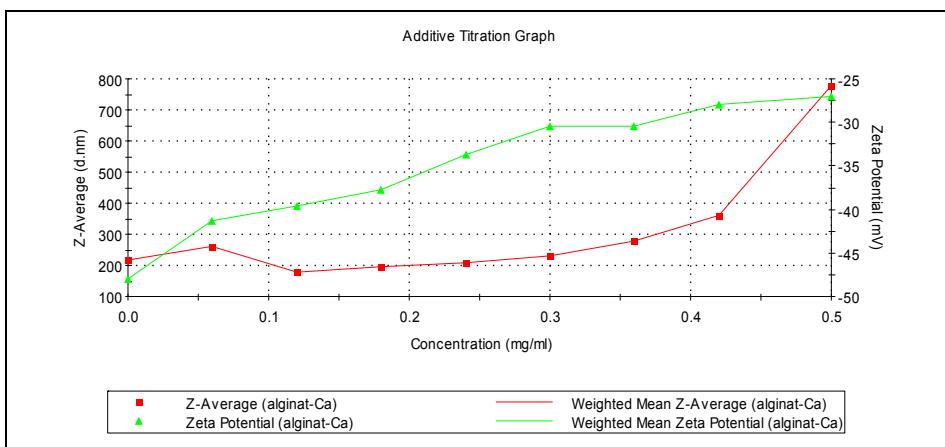


Slika 17: Porazdelitev velikosti delcev na podlagi intenzitete sipane svetlobe za ovalbumin, alginat, kompleks alginat-ovalbumin in kompleks alginat-ovalbumin-hitosan

4.1.5. Vpliv pregeliranja alginata s kalcijem na tvorbo nanodelcev

Pri uporabi alginata za tvorbo nanodelcev številni avtorji navajajo pomen predhodnega geliranja alginata s kalcijevimi ioni, s čimer lahko tvorimo začetno jedro ND. Spet drugi avtorji zanikajo vpliv kalcija pri tvorbi alginatnih PEK.

Pri naših poskusih smo ugotovili, da Ca minimalno vpliva na poenotenje velikosti delcev in tvorbo kompleksov. Pri nizkih koncentracijah kalcijevih ionov pride do intramolekularnih povezav samo guluronskih delov preko Ca znotraj posameznih verig. Na sliki 18 v območju, kjer je masno razmerje Ca:alginat < 0,2, opazimo rahel padec povprečne velikosti delcev z 216 nm na 180 nm. Pri višjih koncentracijah kalcijevih ionov (nad 0,4 mg/ml) pa prihaja do neselektivnih intermolekularnih povezav tako med guluronskimi kot tudi manuronskimi deli različnih verig in tvorbe večjih delcev (povprečna velikost naraste na 779 nm pri vsebnosti Ca 0,6 mg/ml).

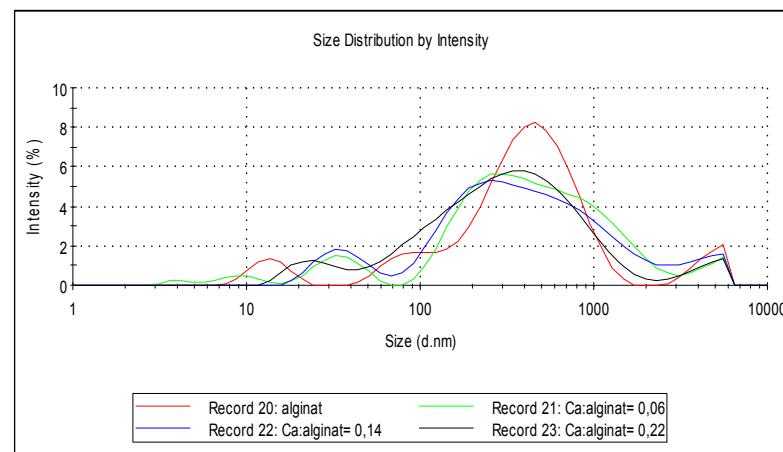


Slika 18: Povprečna velikost delcev in zeta potencial pri titraciji kompleksov alginata ($c=1$ mg/ml) s CaCl_2 ($c=1$ mg/ml). X-os podaja vrednosti koncentracije CaCl_2 v raztopini.

Pri nizkih koncentracijah kalcij nima pomembnega vpliva na poenotenje velikosti delcev (slika 19). Vendar pa močno zniža negativni naboj polimernih verig (pregledica 4). Zeta potencial se zmanjša z -47,9 na -37,7 mV pri vsebnosti Ca 0,22 mg/ml. V našem primeru je to nezaželeno, saj večji negativni naboj alginatnih verig vodi v močnejše asociiranje s pozitivno nabitim ovalbuminom.

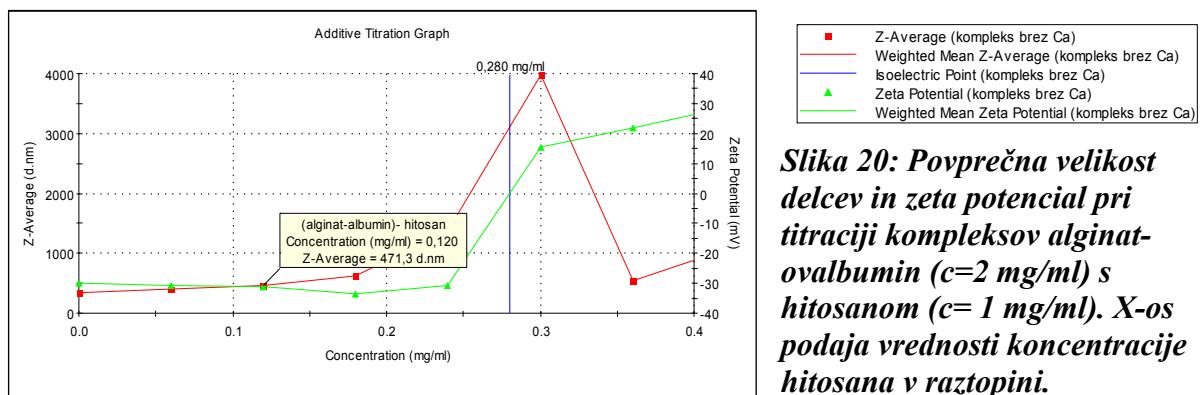
Ca (mg/ml)	Ca:alginat	d (nm)	Pdl	Zp (mV)
0	0	216	0,963	-47,9
0,06	0,06	262	0,584	-41,3
0,12	0,14	180	1,000	-39,6
0,18	0,22	196	0,541	-37,7
0,30	0,32	211	0,550	-33,7
0,36	0,43	231	0,556	-30,4
0,42	0,56	277	0,552	-30,5
0,50	0,72	361	0,737	-27,9

Pregledica 4: Povprečni premer delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial v raztopinah z različnim m/m razmerjem Ca:alginat

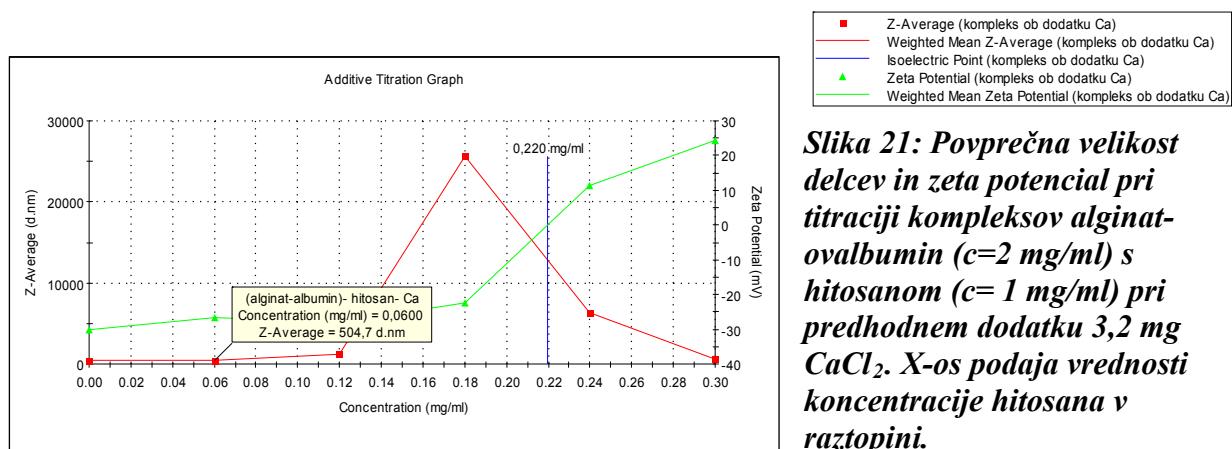


Slika 19: Porazdelitev velikosti molekul alginata na podlagi intenzitete sipane svetlobe ob dodatku CaCl_2

Nadalje, nastali kompleksi bodisi z dodatkom kalcija ali brez, izkazujejo razlicno kapaciteto za vezanje hitosana. Če primerjamo titraciji kompleksov alginat-ovalbumin s hitosanom ob predhodnem dodatku kalcijevih ionov (slika 21) in brez njih (slika 20), vidimo, da velikost delcev začne hitreje naraščati v primeru dodatka kalcija. To je najverjetneje posledica povečanja zeta potenciala zaradi elektrostatskih interakcij med Ca in alginatom. Nastali kompleks nosi manj negativnega naboja za vezavo s hitosanom. V primeru pregeliranja alginata s Ca dosežemo ustrezno kompleksiranje s hitosanom pri koncentraciji 0,06 mg/ml ($d= 504,7$ nm). Če pa Ca ni prisoten, je še sprejemljiva koncentracija hitosana 0,12 mg/ml ($d= 471,3$ nm). Prav tako se točka prehoda zeta potenciala agregatov iz negativnih v pozitivne vrednosti ob dodatku Ca zniža z 0,28 mg/ml hitosana na 0,22 mg/ml.



Slika 20: Povprečna velikost delcev in zeta potencial pri titraciji kompleksov alginat-ovalbumin ($c=2$ mg/ml) s hitosanom ($c=1$ mg/ml). X-os podaja vrednosti koncentracije hitosana v raztopini.



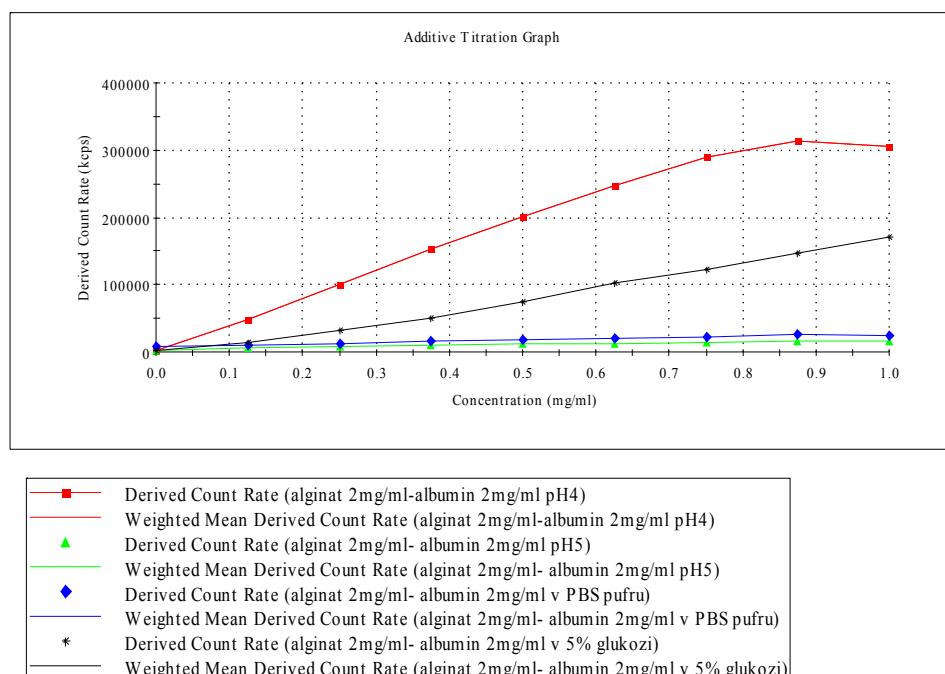
Slika 21: Povprečna velikost delcev in zeta potencial pri titraciji kompleksov alginat-ovalbumin ($c=2$ mg/ml) s hitosanom ($c=1$ mg/ml) pri predhodnem dodatku 3,2 mg CaCl_2 . X-os podaja vrednosti koncentracije hitosana v raztopini.

Pregeliranje alginata s kalcijem v našem sistemu ni zaželeno, saj nima značilnega vpliva na poenotenje velikosti delcev. Kvečjemu zmanjša negativni naboj delcev, ki je potreben za stabilizacijo in zniža koncentracijo hitosana, ki ga lahko dodamo za ustrezno tvorbo kompleksov.

4.1.6. Vpliv pH, elektrolitov in neelektrolitov (krioprotектantov) na tvorbo kompleksov

Močan vpliv pH pričakujemo predvsem v območju izoelektrične točke ovalbumina ($pI = 4,8$). Pri $pH < 4,8$ je protein večinoma pozitivno nabit in le v tem primeru se lahko ustrezeno kompleksira z negativnim alginatom. Vendar pa pH ne smemo spustiti pod $pK_{a,alginata} = 3,6$, saj je tu alginat slabo topen. Pri $pH > 4,8$ nosi protein več negativnega kot pozitivnega naboja. V tem območju pH pričakujemo manjšo afiniteto ovalbumina do alginata. Dodatno pH nad $pK_{a,hitosana} = 6,5$ ni zaželen z vidika slabe topnosti hitosana.

Neelektrolite smo uporabili kot krioprotектante pri zamrzovanju disperzij ND pred liofilizacijo, s pomočjo elektrolitov pa smo sprožili sproščanje ovalbumina iz kompleksov v PBS pufru. Zato smo na tem mestu preverili tudi vpliv teh dveh snovi na tvorbo kompleksov.



Slika 22: Koncentracija kompleksov pri titraciji alginata ($c=2 \text{ mg/ml}$) z ovalbuminom ($c=2 \text{ mg/ml}$) pri $pH=4$, $pH=5$, v PBS pufru in v 5% glukozi . X-os podaja vrednosti koncentracije ovalbumina v raztopini.

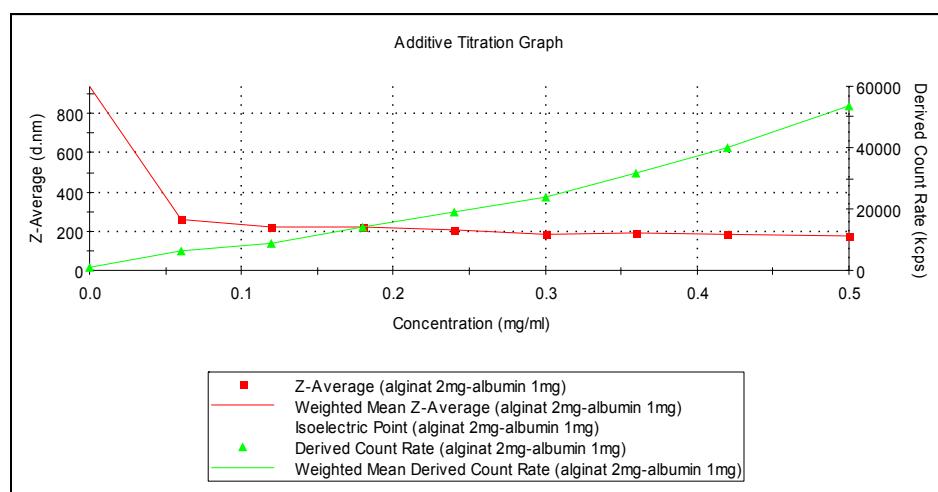
Iz grafov titracije alginata z ovalbuminom (slika 22) vidimo, da največje število sipanja dosežemo v primeru tvorbe nanodelcev pri pH 4. V disperziji s pH 5 nosi protein več negativnega naboja kot pozitivnega in se zato slabše asociira z negativnim alginatom (število sipanja je veliko nižje). Prisotnost elektrolitov v raztopini (PBS pufer) prav tako ovira asociiranje polimerov v kompleks. Prisotnost elektrolitov je torej pri izdelavi ND neželena, je pa potrebna za sproščanje proteina pri fizioloških pogojih v prebavnem traktu.

Opazen, vendar pa bistveno manjši vpliv na tvorbo kompleksov imajo tudi nenabite ozmotsko aktivne snovi, ki najverjetneje sterično ovirajo medsebojno asociranje polimernih verig. Velikosti PEK so zelo različne, saj se v večini primerov kompleksi slabo tvorijo.

4.1.7. Vpliv variiranja koncentracije ovalbumina na sestavo PEK

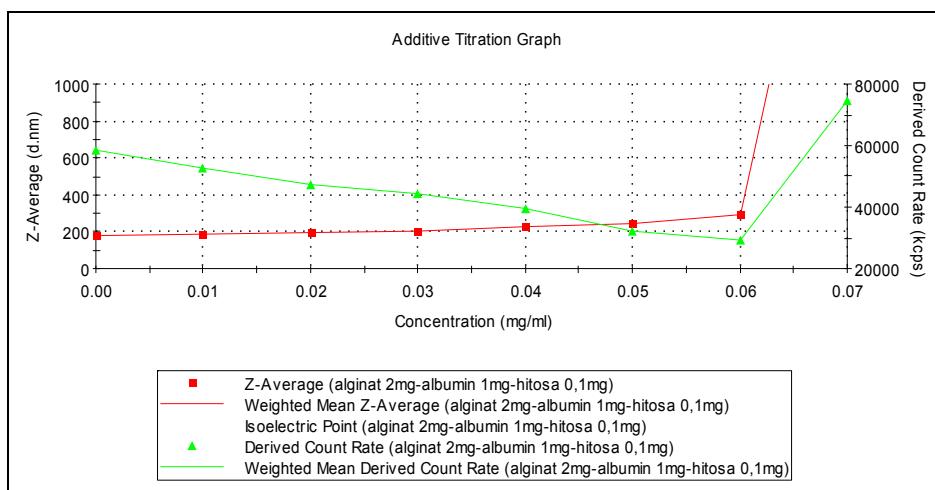
Razmerje komponent alginat:ovalbumin:hitosan v izdelanh PEK je 1:1:0,1. V literaturi običajno navajajo izdelavo ND z masnim razmerjem protein:zaščitni polimer = 0,1 (8, 13). V našem primeru je razmerje protein:polimer (alginat in hitosan) skoraj 1. Višja koncentracija polimerov je zaželena z vidika boljše zaščite proteina pred proteolizo. Zanimalo nas je, če lahko na račun nižje koncentracije pozitivno nabitega ovalbumina, vgradimo več pozitivno nabitega hitosana v kompleks. V ta namen smo alginat titrirali z nižjo koncentracijo ovalbumina in nato komplekse titrirali še s hitosanom do agregacije.

Iz slike 23 vidimo, da smo tudi z nižjo koncentracijo ovalbumina (1 mg/ml) uspeli kompleksirati verige alginata v delce nanometrskih velikosti. V grafu porazdelitve velikosti na podlagi intenzitete dobimo en pik v območju 200 nm. Vendar je število sipanja v tem primeru veliko nižje (60.000 kcps) kot v primeru titracije z ovalbuminom v koncentraciji 2 mg/ml (300.000 kcps- slika 13). Koncentracija nastalih kompleksov je torej pri uporabi višje koncentracije proteina veliko višja.



Slika 23: Povprečna velikost delcev in števila sipanja pri titraciji alginata ($c=2 \text{ mg/ml}$) z ovalbuminom ($c=1 \text{ mg/ml}$). X-os podaja vrednosti koncentracije ovalbumina v raztopini.

Preverili smo, ali pri uporabi nižje koncentracije ovalbumina lahko povečamo koncentracijo hitosana. Vendar smo tudi z kompleksom z manjšo vsebnostjo proteina lahko dodali hitosan le do koncentracije 0,06 mg/ml (slika 24). Enako kot pri koncentraciji ovalbumina 2 mg/ml hitosan torej bolj destabilizira negativno nabite nanodelce kot ovalbumin, najverjetneje zaradi stalnega naboja.

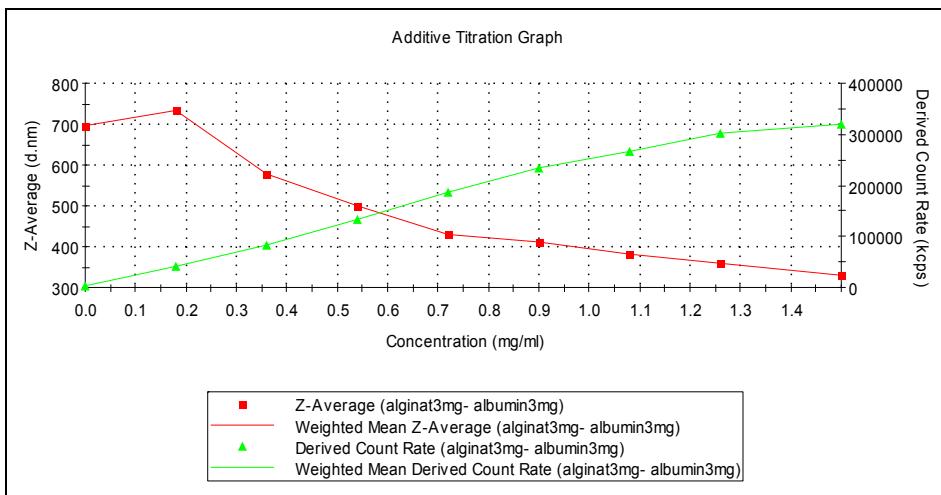


Slika 24: Povprečna velikost delcev in število sipanja pri titraciji kompleksov alginat-ovalbumin ($c=1,5 \text{ mg/ml}$) s hitosanom ($c= 0,1 \text{ mg/ml}$). X-os podaja vrednosti koncentracije hitosana v raztopini.

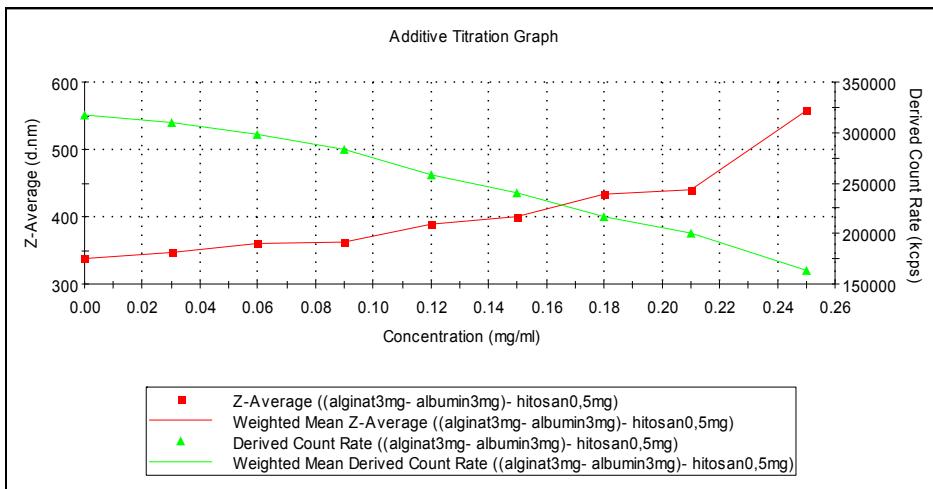
4.1.8. Vpliv celokupne koncentracije polimerov

Koncentracijo polimerov smo hoteli povečati z namenom, da dobimo večjo koncentracijo nanodelcev v disperziji, kar bi olajšalo nadaljnje procese sušenja tako s tehnološkega kot tudi ekonomskoga vidika. Po literturnih podatkih naj bi bila krioprotekcija pri liofilizaciji učinkovitejša pri uporabi bolj koncentriranih disperzij nanodelcev.

Pri dvigu začetnih koncentracij alginata in ovalbumina z 2 mg/ml na 3 mg/ml (slika 25), ne opazimo značilnega porasta v številu sipanja nastalih kompleksov (v obeh primerih je vrednost okoli 300.000 kcps). Očitno ostane velik delež polimerov še vedno raztopljen v mediju.



Slika 25: Povprečna velikost delcev in število sipanja pri titraciji alginata ($c=3\text{ mg/ml}$) z ovalbuminom ($c=3\text{ mg/ml}$). X-os podaja vrednosti koncentracije ovalbumina v raztopini.



Slika 26: Spremljanje povprečne velikosti delcev in števila sipanja pri titraciji kompleksov alginat-ovalbumin ($c=3\text{ mg/ml}$) s hitosanom ($c=0,5\text{ mg/ml}$). X-os podaja vrednosti koncentracije hitosana v raztopini.

Pri uporabi višjih začetnih koncentracij polimerov je bilo optimalno razmerje komponent alginat:ovalbumin:hitosan = 1:1:0,22. Končne koncentracije polimerov v disperziji nanodelcev so bile: $c_{\text{alg}} = 0,9\text{ mg/ml}$, $c_{\text{alb}} = 0,9\text{ mg/ml}$, $c_{\text{hit}} = 0,2\text{ mg/ml}$. Celokupna koncentracija polimerov ($c_{\text{cel}} = 2,0\text{ mg/ml}$) je torej skoraj dvakrat večja kot pri prvi sestavi ($c_{\text{cel}} = 1,05\text{ mg/ml}$). Z dvigom koncentracije negativno nabitega alginata smo uspeli dvigniti tudi koncentracijo hitosana.

Problem visokih koncentracij polimerov v raztopini pa je tvorba večjih delcev po daljšem času mešanja.

4.1.9. Vpliv koncentracije ovalbumina na učinkovitost asociiranja in delež vgrajenega ovalbumina

Delež vgrajenega proteina in učinkovitost asociiranja v komplekse smo določevali pri različnih začetnih koncentracijah ovalbumina

Iz preglednice 5 vidimo, da se pri uporabi višje koncentracije ovalbumina pri izdelavi nanodelcev delež vgrajenega proteina (LC) v komplekse pričakovano poveča. Hkrati pa koncentracija ovalbumina skorajda nima vpliva na učinkovitost asociiranja polimerov (AE). Pri desetkratnem zmanjšanju koncentracije proteina opazimo povečanje učinkovitosti asociiranja le za 4%. Vidimo, da se kljub izredno visokemu masnemu razmerju proteina glede na zaščitna polimera v komplekse asociira več kot 80% ovalbumina.

konz. ovalbumina	LC _{teor} (%)	LC _{eks} (%)	AE (%)
0,5	47,62	38,22	80,26
0,25	31,25	26,14	83,63
0,1	15,38	12,66	82,31
0,05	8,33	7,05	84,63

Preglednica 5 : Teoretični in eksperimentalni delež vgrajenega ovalbumina (LC) ter učinkovitost asociiranja (AE) v disperzijah z različno koncentracijo ovalbumina

4.1.10. Vpliv časa mešanja in neelektrolitov (krioprotектantov) na stabilnost kompleksov

Z namenom, da preučimo vpliv dodatka krioprotектantov na stabilnost kompleksov, smo dvajsetim mililitrom sveže pripravljene disperzije nanodelcev (vzorec1 v preglednici 6) dodali 400 mg manitola (vzorec1+manitol). Število sisanja delcev je pri tem padlo na polovico. Presenetljivo se je po enem dnevu mešanja te disperzije (vzorec1+manitol po enem dnevu) število sisanja dvignilo skorajda do prvotne vrednosti. Predvidevamo, da manitol trenutno zmoti medsebojno kompleksiranje polimerov z vrivanjem med polimerne verige, po daljšem času mešanja pa se ponovno vzpostavi prvotno stanje.

V primeru, ko smo izdelano disperzijo (vzorec2) mešali en dan (vzorec2 po enem dnevu), se je število sisanja nekoliko povečalo. Domnevamo, da pri daljšem času mešanja verige polimerov učinkoviteje asociirajo med seboj. Zasledili smo tudi manjši porast v velikosti delcev. Po dodatku manitola (vzorec2 po enem dnevu+manitol) se število sisanja tej disperziji ni bistveno znižalo, kar odraža večjo moč interakcij med polimeri, ki jih dodatek manitola ne

oslabi. Sklepamo lahko, da daljši čas mešanja ugodno vpliva na učinkovitost asociiranja polimerov in stabilnost nastalih kompleksov.

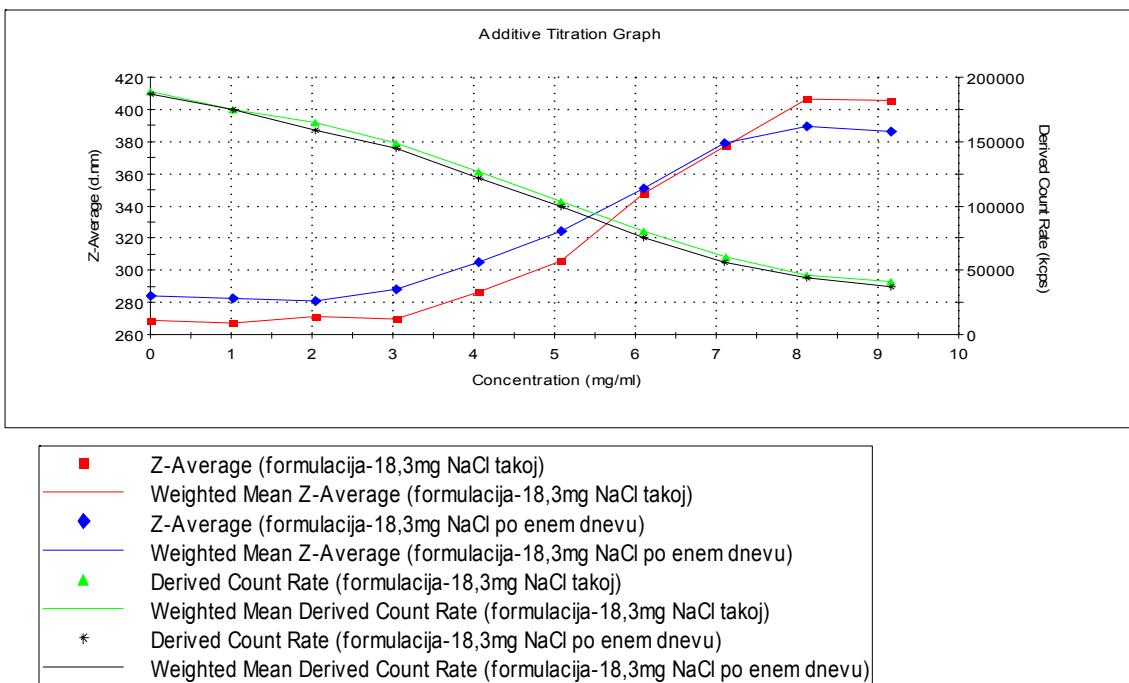
Preglednica 6: Velikost, polidisperzni indeks in koncentracija kompleksov v disperziji ob dodatku manitola takoj in po enem dnevu mešanja

vzorec	d (nm)	Pdl	št. sisanja (kcps)
vzorec1	273,3	0,215	260637,8
vzorec1+manitol	284,0	0,239	129410,7
vzorec1+manitol po enem dnevu	329,5	0,283	252997,6
vzorec2	281,3	0,235	286403,7
vzorec2 po enem dnevu	316,4	0,234	305798,6
vzorec2 po enem dnevu+manitol	333,0	0,250	278952,6

4.1.11. Vpliv časa mešanja in elektrolitov na stabilnost kompleksov

Vpliv elektrolitov na stabilnost kompleksov takoj po njihovi izdelavi in po enem dnevu mešanja smo preverili s titracijo disperzij ND z raztopino NaCl ($c = 18,3 \text{ mg/ml}$). Po titraciji znaša koncentracija NaCl 0,9%. Krivulji titracij takoj po izdelavi ND in po enem dnevu mešanja se skoraj popolnoma prilegata (slika 27). Število sisanja pade pri obeh iz 200.000 na 50.000 kcps. Močni elektroliti torej zmanjšajo elektrostatske interakcije med proteinom in polimeri neodvisno od časa predhodnega kompleksiranja. Posledično pride do razpada kompleksov. Za razliko od neelektrolitov, ki le minimalno znižajo število sisanja delcev, so elektroliti mnogo bolj agresivni in povzročijo razpad kompleksov neodvisno od časa predhodnega mešanja.

Porast velikosti delcev pri titraciji z NaCl razlagamo z zmanjšanjem interakcij med nasprotno nabitimi polimernimi verigami. Te se posledično raztegnejo, kar prispeva k večjim vrednostim povprečne velikosti in polidisperznega indeksa.



Slika 27: Povprečna velikost delcev in število sipanja pri titraciji disperzije ND z NaCl ($c=18.3 \text{ mg/ml}$) takoj po izdelavi ND in po enem dnevu mešanja. X-os podaja vrednosti koncentracije NaCl v raztopini.

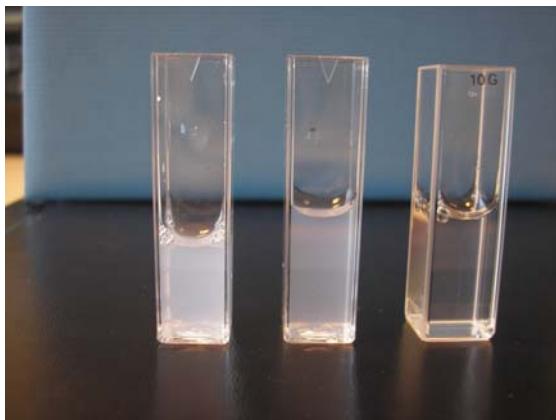
Elektroliti pomembno prispevajo k razpadu kompleksov in sproščanju proteina med raztopljanjem v pufru oziroma fizioloških tekočinah. Njihov vpliv smo dodatno preverili tako, da smo disperzijo redčili z 1 ml vode in 1 ml PBS pufra. Disperzijam smo pomerili povprečno velikost delcev, polidisperzni indeks in število sipanja delcev.

Rezultati kažejo, da smo v primeru redčenja disperzije z vodo zaznali bistveno manjši padec v številu sipanja delcev, kot pri redčenju s PBS pufrom (preglednica 7). Z dodatkom vode smo disperzijo le razredčili, z dodatkom PBS pufra pa dodatno povzročili še razpad kompleksov. Podobno pri redčenju z vodo ne opazimo spremembe v velikosti delcev (ta se celo rahlo zmanjša), medtem ko pri redčenju s PBS pufrom velikost naraste za več kot 100 nm, kar lahko razlagamo z razvitjem polimernih verig.

Preglednica 7: Velikost, polidisperzni indeks in koncentracija kompleksov v neredčeni disperziji, disperziji redčeni z vodo in disperziji redčeni s PBS pufrom

	d (nm)	Pdl	število sipanja (kcps)
vzorec	275	0,244	226.860
1 ml vzorca+ 1ml vode	271	0,262	150.790
1 ml vzorca+ 1ml PBS pufra	392	0,275	14.338

Na sliki 28 so prikazani vzorci disperzij tega poskusa. Vidimo, da se motnost izhodne disperzije (levo) pri redčenju z vodo nekoliko zmanjša (sredina), medtem ko je disperzija redčena s PBS skoraj popolnoma transparentna (desno). Soli PBS pufra so povzročile razpad kompleksov.



Slika 28: Fotografija neredčene disperzije (levo), disperzije redčene z vodo (sredina) in disperzije redčene s PBS pufrom (desno)

4.2. LIOFILIZACIJA NANODELCEV

Liofilizacijo smo izvedli z namenom pretvorbe disperzije ND v suho, stabilno stanje in jo optimirali z vidika ustreznega redispergiranja liofiliziranega produkta. Vzorce smo liofilizirali bodisi takoj po izdelavi ali po predhodnem čiščenju s centrifugiranjem in ponovnim redispergiranjem sedimenta v prečiščeni vodi. S centrifugiranjem namreč odstranimo v mediju raztopljene neasociirane polimere in soli, ki lahko neugodno vplivajo na sušeči se produkt. Problem centrifugiranja pa je zbitje nanodelcev v sediment, ki se težko ponovno redispergira, ter izgube kompleksov, ki ostanejo v supernatantu. S poskusi smo ugotovili, da je centrifugiranje ključnega pomena za ustrezno ponovno redispergiranje liofiliziranega produkta. Vzorec pred liofilizacijo v preglednici 8 pomeni centrifugiran in ponovno redispergiran vzorec v vodi.

Pri liofilizaciji disperzije ND brez centrifugiranja smo dobili liofilizat, katerega ni bilo mogoče ustrezno redispergirati v vodi. Predvidevamo, da v mediju raztopljene odvečne polimerne verige pri liofilizaciji povežejo komplekse med seboj v strukturo, ki je voda pri redispergiranju ne uspe več razgraditi.

Če smo v izdelano disperzijo ND dodali še krioprotектante, se je liofilizat sicer lepo redispergiral, vendar je bila disperzija bistveno bolj transparentna kot pred liofilizacijo. Zasledili smo tudi del oborjenih polimerov. Delci redispergiranega liofilizata s krioprotektanti

so imeli visok polidisperzni indeks in polimodalno distribucijo (več pikov v različnih velikostnih območjih). Sklepamo, da se soli, prisotne pri izdelavi ND, pri zamrzovanju vzorca koncentrirajo in vplivajo na razpad kompleksov. Nastali kristali tako soli kot ledu pa lahko predstavljajo dodatni mehanski stres za ND.

Preverili smo tudi vpliv shranjevanja vzorcev (inkubiranje) pri $T = -20^{\circ}\text{C}$, ki je nad temperaturo steklastega prehoda dodanega sladkorja (manitola) in pod temperaturo tališča ledu, na učinkovitost krioprotектantov. V eni seriji poskusov smo namreč vzorce pustili 18 ur v zamrzovalniku pri temperaturi -20°C , drugo serijo vzorcev pa smo liofilizirali takoj po zamrzovanju v tekočem dušiku.

Preglednica 8: Velikost delcev pred in po liofilizaciji v 2% raztopini manitola brez inkubiranja in z inkubiranjem 18 h pri -20°C

vzorec	d (nm)	PdI	število sipanja (kcps)	Indeks povečanja velikosti
pred liofilizacijo *	$398,9 \pm 9,2$	$0,227 \pm 0,004$	150.211 ± 8119	/
v 2% raztopini manitola **	$502,2 \pm 5,1$	$0,294 \pm 0,042$	363.860 ± 525	1,26
v 2% raztopini manitola z inkubiranjem vzorca pri -20°C **	$525,5 \pm 11,0$	$0,235 \pm 0,008$	473.499 ± 2751	1,32

* 20 ml disperzije ND

** redispersirano v 5 ml vode

Inkubiranje pri temperaturi -20°C nima značilnega vpliva na spremembo velikosti delcev (preglednica 8). Indeks povečanja velikosti sta v obeh primerih zelo podobna. Velikost delcev pri dodatnem inkubiranju vzorca 18 h na -20°C je primerljiva z velikostjo delcev po takojšnji liofilizaciji vzorca. Zanimivo pa v primeru inkubiranja vzorca opazimo veliko večji porast v številu sipanja (kar za 100.000 kcps). Sklepamo, da pri dvigu temperature iz -70°C na -20°C omogočimo popolno kristalizacijo manitola v bližini kompleksov, saj ta z vodikovimi vezmi lahko izpodrine vodo adsorbirano na trdno fazo. Posledično pride do difuzije vode skozi zmrznjen matriks in rasti ledeni kristalov stran od ND. Z inkubiranjem vzorca 18 h na -20°C torej omogočimo boljšo zaščito kompleksov pred mehanskim stresom, ki ga predstavljajo ledeni kristali in destabilizacijo ND z desorpcijo vezane vode (molekule vode nadomesti manitol). To se odraža v večji koncentraciji ND po redispersiranju oziroma v večjem povečanju v številu sipanja kot v primeru brez inkubiranja (obe števili sipanja po liofilizaciji sta večji od števila sipanja pred liofilizacijo, saj smo liofilizirali 20 ml disperzije ND in nato liofilizat redispersirali le v 5 ml prečiščene vode).

4.2.1. Krioprotektanti

Krioprotektante smo uporabili z namenom zmanjšanja stresa med zamrzovanjem. Ugotovili smo, da glukoza ni ustrezan krioprotektant pri liofilizaciji PEK. V bučki smo dobili sprijet in le delno suh liofilizat, ki ga nismo uspeli redispergirati. Tak produkt je morda posledica liofilizacije pri previsoki temperaturi, ki je blizu temperature steklastega prehoda glukoze ($T_{\text{liof}} \approx -50^{\circ}\text{C}$). Proces moramo izvesti pod temperaturo steklastega prehoda sladkorja, kjer ta v svojo amorfno strukturo ujame nanodelce in jih zaščiti pred agregacijo. Glukoza ima nizko temperaturo steklastega prehoda: $T_g = -42^{\circ}\text{C}$ (T_g' trehaloze je -30°C), zato bi liofilizacijo morali izvesti pri značilno nižji temperaturi. Prav tako se vrednosti T_g' razlikujejo tudi glede na čistost glukoze. T_g' čistega α -anomera je $-41,2 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$, β -anomera $-44,6 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, uravnotežene glukoze pa $-43,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ (34). Tudi v literaturi omenjajo kolaps liofilizata pri uporabi glukoze za zaščito nanodelcev med liofilizacijo (19). Kot temperauro kolapsa navajajo $T_c = -42^{\circ}\text{C}$. Do povečanja velikosti delcev sicer ne pride, vendar pa je tak liofilizat nesprejemljiv z vidika vsebnosti zaostale vode in podaljšanja časa redispergiranja zaradi odsotnosti porozne strukture.

Pri krioprotekciji smo zato uporabili glicin in manitol, ki kristalizirata in fizikalno ščitita nanodelce med zamrzovanjem in desorpcoijo topila (preglednica 9).

Preglednica 9: Velikost delcev po liofilizaciji ob uporabi krioprotektantov (glicina in manitola) v različnih koncentracijah

vzorec	d (nm)	PdI	število sipanja (kcps)	Indeks povečanja velikosti
pred liofilizacijo *	398,9 \pm 9,2	0,227 \pm 0,004	150.211 \pm 8119	/
po liofilizaciji brez krioprotektanta **	750,2 \pm 5,4	0,393 \pm 0,029	267.070 \pm 3172	1,88
v 0,5% raztopini glicina **	1354 \pm 77	0,586 \pm 0,095	211.395 \pm 8792	3,39
v 1% raztopini glicina **	1289 \pm 20	0,500 \pm 0,036	146.481 \pm 7419	3,23
v 2% raztopini glicina **	766,9 \pm 7,9	0,457 \pm 0,015	42.319 \pm 475	1,92
v 0,5% raztopini manitola **	786,6 \pm 15,4	0,447 \pm 0,034	294.251 \pm 638	1,97
v 1% raztopini manitola **	556,5 \pm 10,9	0,257 \pm 0,003	335.576 \pm 6452	1,40
v 2% raztopini manitola **	502,2 \pm 5,1	0,294 \pm 0,042	363.860 \pm 525	1,26

* 20 ml disperzije ND

** redispergirano v 5 ml vode

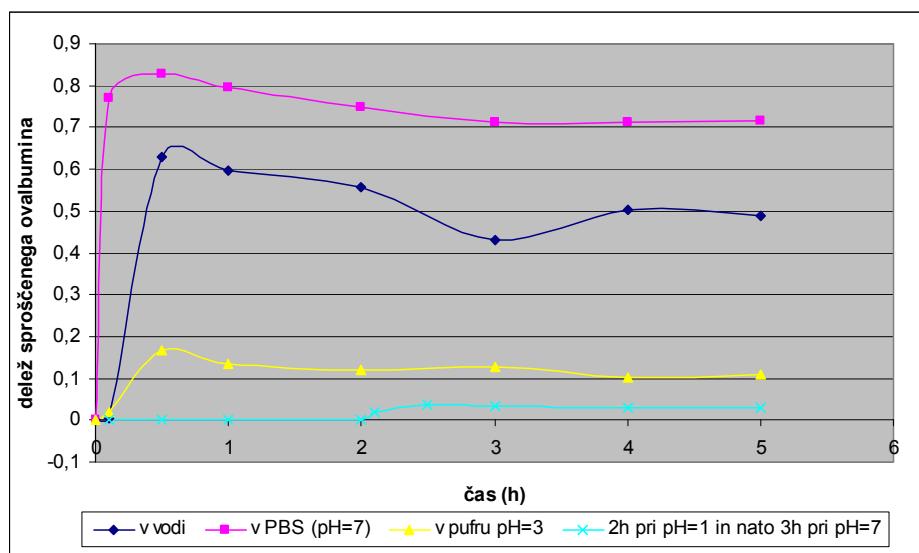
Ugotovili smo, da glicin ni ustrezen krioprotектант, saj se je velikost redispersiranega liofilizata še bolj povečala kot brez krioprotектanta. Velikost delcev se je z naraščajočo koncentracijo glicina sicer zmanjševala, vendar zaradi visokega polidisperznega indeksa težko trdimo o realnih razlikah med vzorci z različno koncentracijo glicina.

Manitol se je izkazal kot ustrezen krioprotектант za naš sistem. Velikost delcev redispersiranega liofilizata se je ob uporabi 2% raztopine manitola povečala za manj kot 1,3 (indeks povečanja velikosti je 1,26). Z naraščanjem koncentracije manitola v disperzijah narašča tudi število sipanja. Rezultati kažejo, da višja koncentracija krioprotектanta ugodno vpliva na associate polimerov. Posledično smo izmerili višjo koncentracijo kompleksov v redispersiranem liofilizatu in monomodalno distribucijo velikosti delcev z ustreznim nizkim polidisperznim indeksom.

4.3. SPROŠČANJE OVALBUMINA

Sproščanje smo izvedli v vodi, pufrih s pH 3 in 7 ter v 0,1 M HCl, katere pH smo po dveh urah z dodatkom Na₃PO₄ dvignili na 7.

Želeli smo preveriti vpliv pH in soli na sproščanje ovalbumina iz kompleksov (slika 29). Vidimo, da največje sproščanje ovalbumina iz PEK dosežemo v PBS pufru (80% vgrajenega ovalbumina). V vodi se sprosti približno 60% vgrajenega ovalbumina, v pufru s pH=3 pa manj kot 20%.



Slika 29: Sproščanje ovalbumina v vodi, PBS pufru (pH=7), pufru s pH=3 in sproščanje istega vzorca najprej 2h pri pH=1 in nato 3h pri pH=7

Pri pH=3 je alginat slabo topen (pK_a vrednosti monomernih enot manuronske in guluronske kisline sta 3,38 in 3,65). Slepamo, da se v tem območju alginat nahaja v manj topni obliki in zato zadrži ovalbumin v svoji strukturi. Posledično je sproščanje pri tem pH nizko.

Soli povzročijo razpad kompleksov, kot smo dokazali že v predhodnih poskusih. Sproščanje v PBS pufru je zato večje kot v deionizirani vodi.

V primeru sproščanja v 0,1 M HCl, ki simulira želodčno kislino, pri analitiki s HPLC ni prišlo do ločbe pikov. Predvidevamo, da pri tem pH protein denaturira in njegova detekcija ni več mogoča. To smo potrdili tudi z analizo samega proteina, raztopljenega v tem mediju. Tudi tu namreč ni prišlo do ločbe pikov.

Ko smo vzorcu nanodelcev dvignili pH z 1 na 7, se je krivulja sproščenega ovalbumina dvignila le za približno 5%. Sklepamo, da je delež zaščitnih polimerov v ND prenizek za ustrezen zaščitito proteina pred razgradnjou, zato ta ireverzibilno denaturira ozziroma poteče hidroliza s kislino. Možna rešitev tega problema je uporaba večjega deleža polimerov v primerjavi s proteinom ali dodatek gastrorezistentne obloge morebitni končni formulaciji.

Ne glede na odstotek sproščenega ovalbumina smo v vseh poskusih opazili »burst release«. V tem primeru je tako sproščanje ugodno, saj želimo doseči čim večji koncentracijski gradient na mestu absorpcije v prebavnem traktu, kar bi lahko izboljšalo biološko uporabnost proteina.

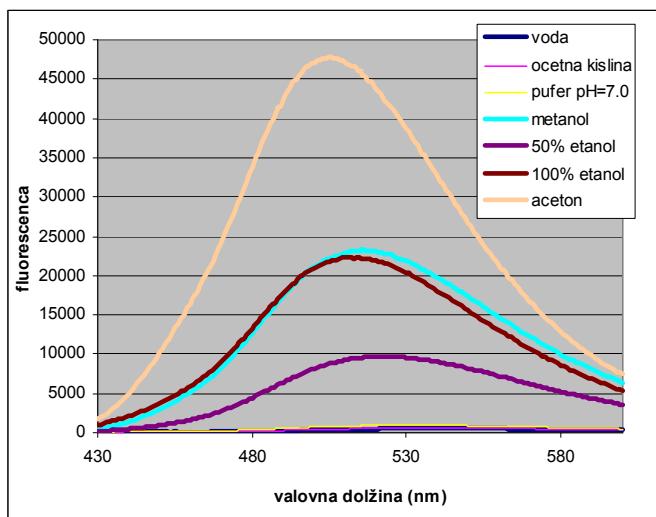
4.4. DOLOČANJE POVRŠINSKE HIDROFOBNOSTI PROTEINA S POMOČJO BARVILA BIS-ANS

Z merjenjem fluorescence ob dodatku barvila bis-ANS smo želeli primerjati površinske lastnosti prostega ovalbumina z lastnostmi ovalbumina v sistemu polielektrolitnih kompleksov. Fluorescensa barvila je odvisna tako od samega medija, v katerem se barvilo nahaja, kot tudi od preostalih topljencev. Protein na fluorescenco barvila bis-ANS vpliva preko elektrostatskih in hidrofobnih interakcij.

4.4.1. Vpliv topila na fluorescenco barvila bis-ANS

Elektronske premike znotraj molekule barvila pri ekscitaciji spremišča tudi spremembu dipolnega momenta barvila. Če imajo dipolni moment tudi molekule topila, pride v okolici

ekscitiranega barvila do energetsko ugodnejše reorientacije molekul topila. Ta proces, ki vodi v znižanje fluorescence, imenujemo relaksacija s topilom in je odvisen od polarnosti topila.

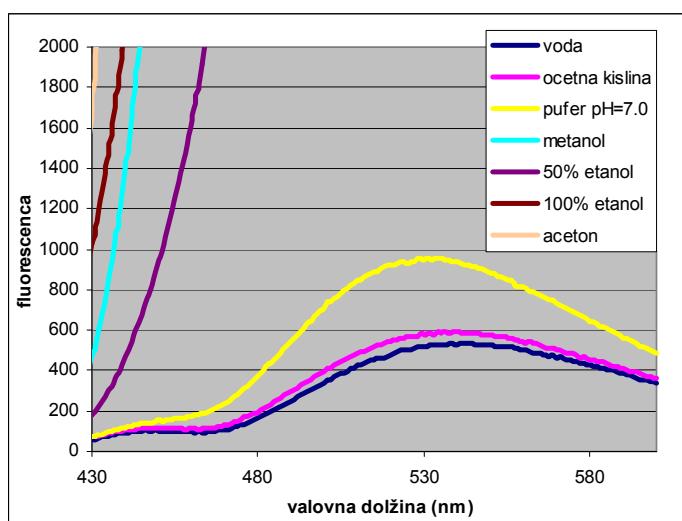


Slika 30: Fluorescencija barvila bis-ANS v različnih topilih

Preglednica 10: Dielektrične konstante posameznih topil

topilo	ϵ ($\text{A s V}^{-1} \text{m}^{-1}$)
voda	78,5
metanol	32,6
etanol	24,3
aceton	20,7

Slika 30 prikazuje naraščanje fluorescence barvila v manj polarnih topilih. Metanol in etanol izkazujeta primerljivo fluorescenco barvila kljub precejšnji razlike v vrednosti dielektrične konstante (preglednica 10). Aceton kot aprotično topilo najbolj poveča fluorescenco barvila kljub dielektrični konstanti primerljivi etanolu. Pričakovano v 50% etanolu zaznamo nižjo fluorescenco kot v 100% etanolu. Odziv fluorescence barvila je torej odvisen od dielektrične konstante topila in protičnosti topila.



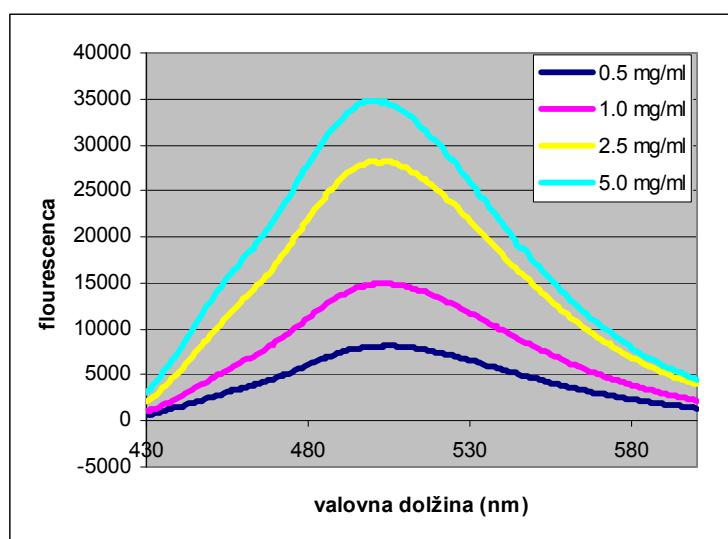
Slika 31: Fluorescencija barvila bis-ANS v vodnih raztopinah (graf s slike 30 s povečano Y skalo)

V vodi, ki je protično topilo z visoko dielektrično konstanto, je fluorescence barvila pričakovano zelo nizka (slika 31). Raztopina soli (pufer pH 7,0) sicer fluorescenco rahlo

poveča, vendar pa vidimo, da v topilih, katera smo uporabili za pripravo disperzije ND, bis-ANS skorajda ne fluorescira.

4.4.2. Vpliv koncentracije ovalbumina na fluorescenco barvila bis-ANS

Poleg tega, da barvilo fluorescira v odvisnosti od topila v katerem se nahaja, lahko zaradi svojega negativnega naboja vstopa tudi v interakcije z raztopljenimi spojinami, predvsem tistimi s pozitivnim nabojem.



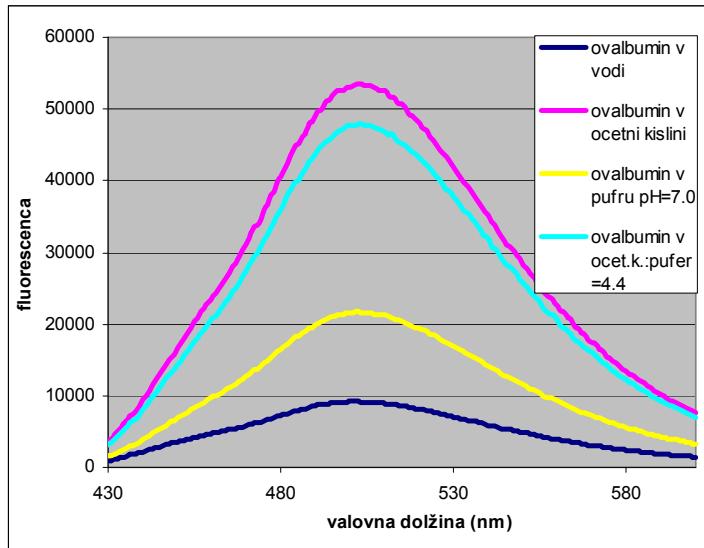
Slika 32: Fluorescenza barvila bis-ANS v raztopinah z različno koncentracijo ovalbumina

V prisotnosti ovalbumina v raztopini pride do interakcij med negativno nabitimi skupinami barvila bis-ANS in pozitivno nabitimi skupinami aminokislin proteina kot so histidin, lizin oziroma arginin. Te interakcije vodijo v spremembe polarnosti in viskoznosti okolja ter povzročajo fluorescenco barvila. Pri višjih koncentracijah ovalbumina v raztopini najverjetneje prihaja do intenzivnejših interakcij barvila s proteinom, kar posledično vodi v večjo fluorescenco. Vendar pa fluorescenza ne narašča linearno. To je lahko posledica prisotnosti nečistot v ovalbuminu.

4.4.3. Vpliv zeta potenciala ovalbumina na fluorescenco barvila bis-ANS

Vpliv naboja molekul na interakcije z barvilm in posledično njegovo fluorescenco smo preverili z dodatkom barvila bis-ANS raztopinam ovalbumina v vodi, fosfatnem pufru, ocetni

kislini in mediju ND. Zaradi različnih pH vrednosti teh raztopin, je bil tudi protein v posameznih raztopinah različno nabit. Izmerili smo različen zeta potencial ovalbumina (preglednica 11).



Slika 33: Fluorescencija barvila bis-ANS v raztopinah z različnim pH

Preglednica 11: pH raztopin ovalbumina v posameznih topilih in njegov zeta potencial

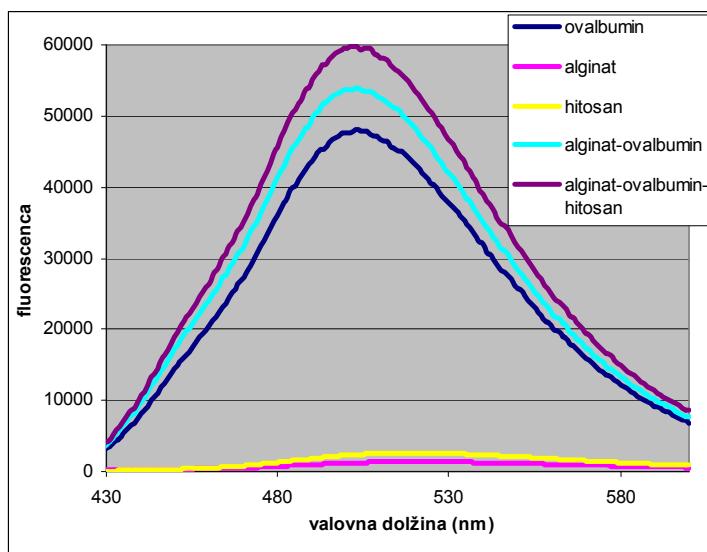
topilo	pH	Zp (mV)
voda	7,35	-14,60
fosfatni pufer pH 7,0	7,05	-11,30
0,25% ocetna kislina	3,13	54,60
ocet.k.:pufer=4:1	4,16	3,93

Samo barvilo bis-ANS v vodi, ocetni kislini in pufru pH= 7,0 skoraj ne fluorescira (slika 31). V vseh medijih smo raztopili enako koncentracijo proteina. Kljub temu pa je fluorescencija barvila v teh medijih različna. Rezultat lahko razložimo z vplivom pH topila na zeta potencial ovalbumina in interakcijami različno nabitega proteina z barvilm. Pri nižjem pH je namreč več aminokislinskih skupin ovalbumina pozitivno nabitih in pride do močnejših elektrostatskih interakcij z barvilm bis-ANS, kar vodi v povečanje fluorescence. Tako na primer barvilo veliko bolj fluorescira v raztopini ovalbumina v 0,25% ocetni kislini, katere pH je 3,13 in zeta potencial proteina pozitiven, kot v raztopini ovalbumina v vodi, katere pH je 7,35 in zeta potencial proteina negativen.

4.4.4. Vpliv tvorbe kompleksov na fluorescenco barvila bis-ANS

V prejšnjem poskusu vidimo predvsem vpliv elektrostatskih interakcij med barvilm in ovalbuminom na fluorescenco. Kljub temu, pa v literaturi dokazujejo prevlado hidrofobnih interakcij med barvilm bis-ANS in proteinom nad elektrostatskimi interakcijami (28). To smo izkoristili pri določevanju površinskih lastnosti proteina bodisi prostega ali v kompleksu. V mediju (0,25% ocetna kislina: pufer pH 7,0 = 4,4:1) smo raztopili alginat, hitosan ali ovalbumin v koncentracijah, kakršne so za posamezen polimer/protein v končni disperziji ND. Prav tako smo v tem mediju tvorili le komplekse med alginatom in ovalbuminom in

pripravili še končne komplekse alginat-ovalbumin-hitosan. V vseh teh raztopinah smo pomerili fluorescenco barvila bis-ANS.



Slika 34: Fluorescencija barvila bis-ANS v disperziji polimerov, ovalbumina in PEK

Preglednica 12: Zeta potencial posameznih polimerov, proteina in kompleksov v mediju ND pri pH=4

vzorec	Zp (mV)
ovalbumin	3,93
alginat	-35,9
hitosan	20,0
alginat-ovalbumin	-42,4
alginat-ovalbumin-hitosan	-40,5

Iz slike 34 vidimo, da alginat in hitosan povzročita le minimalno fluorescenco barvila. Zato pa pride do intenzivne fluorescence v raztopini ovalbumina, kar razlagamo z elektrostatskimi interakcijami med pozitivno nabitim proteinom in negativno nabitim molekulami barvila. Pri tvorbi kompleksov (tako med samima alginatom in ovalbuminom, kot tudi ob dodatku hitosana), pa dobimo delce z močno negativnim nabojem (zeta potencial je -42,4 in -40,5 mV). Tu torej ne moremo pričakovati elektrostatskih interakcij z negativno nabitim molekulami barvila. Pa vendar fluorescenza ne pade, ampak se celo poveča. Ker smo s predhodnimi poskusi dokazali, da je fluorescenza odvisna tudi od koncentracije ovalbumina, lahko z gotovostjo trdimo, da tako močne fluorescence ne more povzročiti le protein, ki se ni uspel asociirati v komplekse. Pač pa povečanje fluorescence pripisujemo spremembam površinskih lastnosti proteina v kompleksu. Predvidevamo, da ob tvorbi kompleksov protein na površino delcev izpostavi svoje hidrofobne dele (predvsem aromatske obroče), s katerimi interagira barvilo bis-ANS. Zato tudi v raztopinah kompleksov s celokupnim negativnim nabojem detektiramo močno fluorescenco.

Povečanje površinske hidrofobnosti ovalbumina bi lahko doprineslo k večji prehodnosti bioloških membran.

5. ZAKLJUČKI

V prvem delu naloge smo s pomočjo naprave Zetasizer določili optimalne pogoje za tvorbo PEK. Oba zaščitna polimera imata stalen naboj (alginat negativnega in hitosan pozitivnega), zato smo ustrezni pH tvorbe kompleksov izbrali glede na izoelektrično točko ovalbumina ($pI=4,8$). Ustreznejše kompleksiranje smo dosegli pri uravnavi pH na vrednost 4,0 v primerjavi s pH 5,0. Poleg tega je topnost obeh zaščitnih polimerov boljša pri pH 4,0. Celokupni naboj ovalbumina je pri teh pogojih pozitiven, zaradi česar izkazuje močnejše interakcije z negativno nabitimi verigami alginata. Nastali negativni kompleksi omogočajo nadaljnje kompleksiranje s pozitivno nabitim mukoadhezivnim hitosanom.

S stopenjskim spremeljanjem tvorbe kompleksov smo določili optimalne koncentracije posameznih polimerov in proteina v končni disperziji ($c_{alginata}=0,5\text{ mg/ml}$, $c_{ovalbumina}=0,5\text{ mg/ml}$, $c_{hitosana}=0,05\text{ mg/ml}$) in njihovo masno razmerje (alginat: ovalumin: hitosan=1:1:0,1). Neodvisno od koncentracije ovalbumina delež hitosana v formulaciji nismo uspeli povečati, saj smo s tem znižali naboj, ki stabilizira delce. Z dvigom celokupne koncentracije polimerov z 1,05 mg/ml na vrednost 2,0 mg/ml (razmerje komponent alginat: ovalumin: hitosan= 1:1:0,22 in koncentracije: $c_{alginata}=0,9\text{ mg/ml}$, $c_{ovalbumina}=0,9\text{ mg/ml}$, $c_{hitosana}=0,2\text{ mg/ml}$) smo dobili nestabilno disperzijo.

Pregeliranje alginata s Ca^{2+} naj bi ugodno vplivalo na tvorbo začetnih jeder in s tem nanodelcev, vendar se je v našem sistemu izkazalo za neustrezno. Večjega vpliva na poenotenje velikosti kompleksov nismo zaznali. Kvečjemu so kalcijevi ioni zmanjšali negativni naboj alginata in s tem kapaciteto vezanja pozitivno nabitega hitosana.

V drugem delu naloge smo PEK pripravili pri izbranih pogojih in jih ovrednotili. PEK so bili veliki od 200 do 400 nm s polidisperznim indeksom 0,2-0,3 in zeta potencialom med -45 in -30 mV. Število sipanja, ki odraža koncentracijo kompleksov v izdelanih disperzijah, je bilo v območju 150.000- 250.000 kcps. Učinkovitost asociiranja proteina v kompleks je bila visoka (do 80%) in je pri različnih začetnih koncentracijah proteina ohranila približno enak odstotek. Posledično je bil tudi delež vgrajenega ovalbumina za izbran sistem visok (38%).

Dodatek elektrolitov in neelektrolitov (krioprotektantov) k disperziji PEK povzroči razpad kompleksov, pri čemer imajo elektroliti močnejši vpliv. To je tudi pričakovano, saj se elektrostatske interakcije med nasprotno nabitimi verigami polimerov nadomeščajo z elektroliti. Pri tem smo zaznali zmanjšanje števila sipanja delcev v disperziji in povečanje

velikosti delcev. Neelektroliti za razliko od elektrolitov le trenutno zmotijo elektrostatske interakcije med polimeri, katere se po daljšem času mešanja ponovno vzpostavijo v prvotno stanje. Vpliv neelektrolitov je še manjši v primeru daljšega časa mešanja disperzije pri izdelavi, ker se pri tem polimerne verige najverjetneje učinkoviteje prepletejo v čvrstejše komplekse. Ne glede na način priprave ND močni elektroliti povzročajo disociacijo kompleksov, s čimer pomembno vplivajo na sproščanje vgrajenega proteina (na primer v fiziološki tekočini).

Z liofilizacijo smo izdelano disperzijo ND pretvorili v suho, stabilnejšo obliko. Ključnega pomena pri tem postopku je predhodna odstranitev neasociiranih polimernih verig in soli raztopljenih v disperziji ND. To dosežemo s centrifugiranjem disperzije in redispersiranjem sedimenta v prečiščeni vodi. Za zaščito kompleksov med procesom zamrzovanja in sušenja smo kot krioprotектante uporabili glukozo, glicin in manitol. Glukoza je dala produkt, ki ga ni bilo mogoče ponovno redispersirati. Pri uporabi glicina se je liofilizat sicer lepo redispersiral, vendar je bila velikost delcev celo večja kot v primeru liofilizacije brez uporabe krioprotектantov. Kot ustrezni krioprotектant se je izkazal manitol v 2% raztopini. Velikost nanodelcev po redispersirjanju je ostala v ustremnem območju (izračunan indeks povečanja velikosti je bil 1,26, kar ustreza kriteriju: indeks povečanja velikosti $< 1,3$). Postopek liofilizacije smo dodatno izboljšali z inkubacijo vzorcev 18 ur pri temperaturi -20°C po zamrzovanju v tekočem dušiku. Pri tem krioprotектant popolnoma kristalizira, kar daje boljšo zaščito kompleksom in ne povzroča njihove disociacije.

Pri sproščanju ovalbumina iz ND smo opazili visoke začetne koncentracije proteina oziroma »burst release«. Z vidika absorpcije in biološke uporabnosti je tak profil sproščanja zaželen, saj zagotovimo zadosten koncentracijski gradient, ki olajša prehod bioloških membran. Že po eni uri se je v pufru s pH 7 sprostilo 80% vgrajenega proteina. V vodi, kjer ni bilo prisotnih soli, je bilo sproščanje nižje (do 60%). V pufru s pH 3 smo določili le 20% sproščanje vgrajenega proteina. Slednje pripisujemo manjši topnosti alginata, ki med svoje verige ujame protein. V kislini pri pH 1 nismo uspeli ustreznou zaščititi proteina, zato pri HPLC analizi ločba pikov tu ni bila možna. Za ustrezejšo zaščito proteina bi pri izdelavi ND morali uporabiti večji delež zaščitnih polimerov oziroma ND obložiti z gastrorezistentno oblogo.

Z nekovalentnimi ekstrinzičnimi fluorescentnimi barvili (v našem primeru barvilo bis-ANS), smo dokazali spremembo površinskih lastnosti ovalbumina v kompleksu z alginatom in hitosanom v primerjavi s prostim ovalbuminom. Na podlagi povečanega odziva fluorescence predvidevamo, da ob tvorbi kompleksov protein na površino delcev izpostavi svoje

hidrofobne dele, s katerimi interagira barvilo. Povečanje površinske hidrofobnosti bi lahko doprineslo k večji prehodnosti bioloških membran.

Ovalbumin je zelo občutljiv na pogoje v gastro intestinalnem traktu. Poleg tega se kot hidrofilna makromolekula le v manjšem obsegu absorbira v kri. Peroralna biološka uporabnost proteinov je ponavadi manjša od 1%. Nanodelci predstavljajo obetaven sistem za zaščito in dostavo proteina na mesto absorpcije. Bioadhezivna polimera alginat in hitosan omogočata daljši stik kompleksov s sluznico, hitosan pa dodatno odpira medcelične tesne stike. »Burst release« ovalbumina iz ND zagotavlja visok koncentracijski gradient proteina na mestu absorpcije, asociiranje proteina v komplekse pa poveča njegovo površinsko hidrofobnost. Vsi ti dejavniki bi potencialno lahko doprinesli k večjemu prehajanju bioloških membran in s tem večji biološki uporabnosti proteina pri peroralni aplikaciji.

6. LITERATURA

1. J. Panyam, V. Labhsetwar. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003; 55: 329-347
2. K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 2001; 70: 1-20
3. M.P. Desai, V. Labhsetwar, E. Walter, R.J. Levy, G.L. Amidon. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Cacao-2 cells is size dependant. *Pharm. Res.* 1997; 14
4. M.P. Desai, V. Labhsetwar, G.L. Amidon., R.J. Levy. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm. Res.* 1996; 13: 1838-1845
5. R. Fernandez- Urrusuno, P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm Res.* 1999; 16: 1576-1581
6. L. Illum, N.F. Farraj, S.S. Davis. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm. Res.* 1994; 11: 1186-1190
7. Y. Pan, Y. Li, H. Zhao, J. Zheng, H. Xu, G. Wei, J. Hao, F. Cui. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *International Journal of Pharmaceutics.* 2002; 249: 139-147
8. B. Sarmento, A. Ribeiro, F. Veiga, P. Sampaio, R. Neufeld, D. Ferreira. Alginate/Chitosan Nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharm. Res.* 2007; 12: 2198-2206
9. M. Rajaonarivony, C. Vauthier, G. Couarrazé, F. Puisieux, P. Couvreur. Developement of a new drug carrier made from alginate. *J. Pharm. Sci.* 1993; 82:912-917
10. W. R. Gombotz, S. W. Wee, Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Del. Rev.* 1998; 31: 267-285

11. O. Skaugrud, A. Hagen, B. Borgersen, M. Dornish. Biomedical and pharmaceutical applications of alginate and chitosan. *Biotechnol. Bioeng.* 1999; 16: 23-40
12. S. De, D. Robinson. Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-L-lysine-alginate nanospheres. *Journal of Controlled Release* 2003; 89: 101-112
13. B. Sarmento, A. J. Ribeiro, F. Veiga, D. C. Ferreira, R. J. Neufeld. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginat ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2007; 7: 1-9
14. H. Vogt Saether, H. K. Holme, G. Maurstad, O. Smidsrod, B. T. Stokke. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2008; 74: 813-821
15. Gettins PGW. Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical Reviews*. 2002; 102: 4751-4804
16. M. H. Dominiczak, J. W. Baynes. *Medical Biochemistry*, 2d edition. 2005; p59
17. <http://en.wikipedia.org/wiki/Ovalbumin> (24.02.2009)
18. J. Liu. Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: Techniques and applications in freeze-drying development. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2006; 111: 185-192
19. W. Abdelwahwd, G. Degobert, S. Stainmesse, H. Fessi. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006; 58: 1688-1713
20. Malvern Instruments Ltd. Size theory. *Zetasizer Nano User Manual*. MAN0317; 2008: 14-1 do 14-6
21. D. Attwood, A. T. Florence. *Physical Pharmacy*. Pharmaceutical Press 2008; 25-26, 63-78

22. Malvern Instruments Ltd. Zeta Potential theory. Zetasizer Nano User Manual. MAN0317; 2008; 16-1 do 16-11
23. M. C. Manning, K. Patel, R. T. Borchardt. Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm. Res.* 1989; 6: 903-918
24. E. Y. Chi, S. Krishnan, T. W. Randolph, J. F. Carpenter. Physical stability of proteins in aqueous solutions: mechanisms and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm. Res.* 2003; 20: 1325-1336
25. W. Jiskoot, A. J. W.G. Visser, J. N. Herron, M. Sutter. Fluorescence spectroscopy. V W. Jiskoot, D. J. A. Crommelin. *Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals*. AAPS press, Arlington, 2005; 27-82
26. A. S. Ladokhin. Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis. V R. A. Meyers. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley, New York, 2000; 5762-5779
27. M. Cardamone, N. K. Puri. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem. J.* 1992; 282: 589-593
28. A. Hawe, M. Sutter, W. Jiskoot. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm. Res.* 2007; 25: 1487-1499
29. A. V. Pastukhov, I. J. Ropson. Fluorescent Dyes as Probes to Study Lipid-Binding Proteins. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 2003; 53: 607-615
30. C. G. Rosen, G. Weber. Dimer formation from 1-anilino-8-naphthalenesulfonate catalyzed by bovine serum albumin. A new fluorescent molecule with exceptional binding properties. *Biochemistry*. 1969; 8: 3915-3920
31. A. Bothra, A. Bhattacharyya, C. Mukhopadhyay, K. Bhattacharyya, S. Roy. A Fluorescence spectroscopic and molecular dynamics study of Bis-ANS/ protein interaction. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1998; 15: 959-966

32. D. Malkov, R. Angelo, H. Wang, E. Flanders, H. Tang, I. Gomez- Orellana. Oral Delivery of Insulin with the eligen® Technology: Mechanistic Studies. Current Drug Delivery. 2005; 2: 191-197
33. D.L.Nelson, M. M. Cox. Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Edition. W.H. Freeman 2004; p 86
34. L. S. Taylor, P. York, A. C. Williams, V. Mehta. Characterization of frozen glucose solutions. Pharmaceutical development and technology 1997; 2: 395-402

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA KRALJ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2009